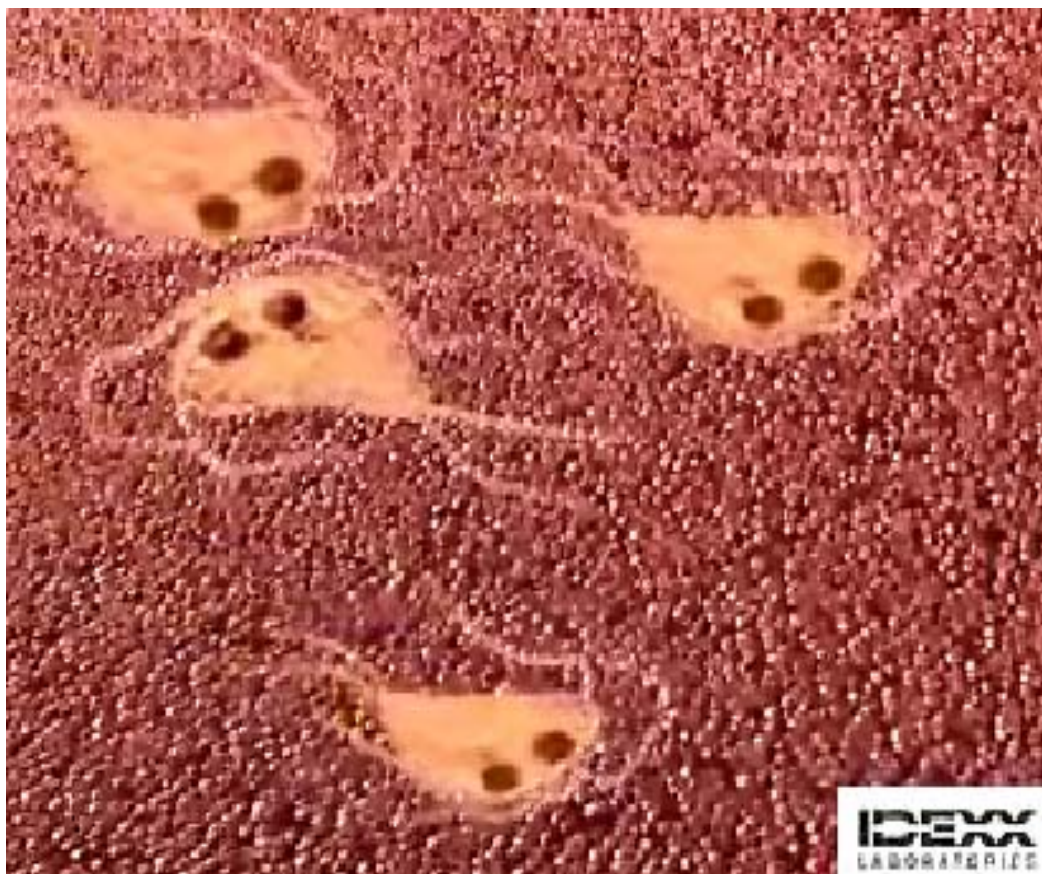


*Forekomst og udbredelse af Giardia med afsæt i
sammenligning af to forskellige testmetoder*

Hanne Kirk Nielsen



Oktober 2005

Hovedopgave ved fagdyrlægekurset 2005

1 Summary

An ELISA test (IDEXX Snap® *Giardia*) (SNAP) for use in veterinary small animal practice was evaluated on 44 fecal samples from dogs with diarrhea, and 29 samples from clinically normal dogs. The test results were compared to results obtained using an immunofluorescence assay (Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescence Assay) (IFA). This test was performed at the Danish Veterinary College (KVL).

The results from the SNAP test and the results obtained from the same samples from KVL's IFA test showed no similarity.

Test results were also obtained from 2 different laboratories, Vet Med Lab (VML) and the Danish Veterinary College (KVL).

VML tests for *Giardia* using an ELISA test from Remel: ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay (ProSpecT). The results from this laboratory were from dogs and cats. They were submitted to the laboratory by Danish veterinarians during the years 2003 and 2004.

KVL uses the Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescence Assay (IFA). The samples tested by these laboratories were submitted to the laboratory by Danish veterinarians during the years 2000 – 2005.

When comparing the test results from KVL, with the test results from VML, a significant difference in the amount of positive results was found.

Dogs younger than 1 year tested positive for *Giardia*, a more often than older dogs. No seasonal distribution of the disease was found in this study. The geographical distribution of positive test results was examined. The parasite seemed to be evenly distributed in Denmark.

2 Sammendrag

En ELISA test, IDEXX Snap® *Giardia*, (SNAP) til brug i praksis blev afprøvet på hunde med og uden diarré. Til sammenligning blev der brugt en immunfluorescens test (Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescence Assay (IFA)). Denne test blev udført på Centrallaboratoriet på den Kgl. Veterinær og Landbohøjskole (KVL)

Undersøgelsen viste, at der ikke var nogen sammenhæng mellem de resultater, som SNAP testen frembragte og de resultater, der blev fundet på de samme prøver ved hjælp af IFA testen.

Resultater fra prøver indsendt af danske dyrlæger til to forskellige laboratorier, Centrallaboratoriet på KVL og Vet Med Lab (VML) blev gennemgået.

VML bruger en ELISA test fra Remel: ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay (ProSpecT) ved undersøgelse for *Giardia*. Der var tale om prøveresultater fra hunde og katte indsendt i årene 2003 og 2004.

KVL bruger Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunofluorescence Assay (IFA). Materialet var fra hunde og katte og indsendt i årene 2000-2005.

Ved sammenligning af mængden af positive tests blev der fundet en signifikant forskel mellem de 2 laboratorier.

Der var flere hunde under et år, der blev fundet positive for *Giardia*, end ældre hunde. Der blev ikke fundet nogen årstidsvariation på mængden af positive resultater. Parasitten syntes, at være jævnt udbredt i Danmark.

3 Formålet med undersøgelsen

Formålet med denne undersøgelse var at undersøge anvendeligheden af IDEXX Snap[®] *Giardia* testen (SNAP).

Formålet var desuden at undersøge, om der var sæson- eller aldersvariation i mængden af smittede dyr, og om dyr med diarré hyppigere var smittede med *Giardia* end raske dyr.

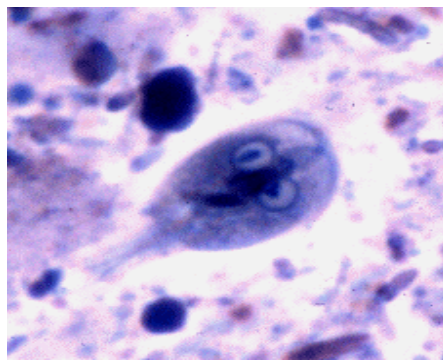
Parasittens udbredelse i Danmark blev undersøgt.

Prævalensen af sygdommen blev vurderet ud fra resultater på prøver indsendt af danske dyrlæger til to forskellige laboratorier.

4 Indledning

Giardia er en flagelbærende protozo, der tilhører klassen zoomastigophora, ordenen diplomonadida og familien hexamitidae. Parasitten formerer sig ved ukønnet forering¹. Flagellaten findes i en trophoitform og en cysteform. Det infektiøse stadium er cysten.²

Trophozoiten er pæreformet, bilateralt symmetrisk med 2 kerner og otte flageller. Den er 10-15µm lang og 6-10µm bred. Den er i besiddelse af en ventral sugeskive. Cysten er 8-13µm lang og 7-10µm bred. Den indeholder 2 ufuldstændigt separerede trophozoiter³.



Figur 1 *Giardia* cyste og trophozoit (P.W.Pappas og S.M.Wardrop).

4.1 Epidemiologi

Ved infektioner hos mennesker og husdyr findes en morfologisk ensartet organisme kaldet *G. duodenalis* (syn. *G. lamblia*/*G. intestinalis*). Ved udførelsen af molekylærepidemiologiske undersøgelser har det vist sig, at der ikke er tale om en genetisk homogen organisme.

Herudover findes der en hel del værtsspecifikke genotyper som muligvis er forskellige species. Der findes muligvis en *G. duodenalis* undergruppe der kun inficerer hunde¹

Parasitten vil i det følgende kun blive benævnt *Giardia*. Med *Giardia* menes *Giardia duodenalis* med undergrupper.

Giardia spp. findes hos alle vertebrater over hele verden. Mennesket synes at være det primære reservoir. Parasitten er sammen med *Cryptosporidium* den vigtigste årsag til problemer med drikkevandet i udviklingslandene. Det har endnu ikke været muligt at spore infektionsgangen, det vides derfor ikke, om dyr er den primære kilde til forurening af vandet.¹

Giardia menes at være en zoonose.²

Cysterne er O₂ tolerante.⁴ Cysterne er ufølsomme overfor klorering af drikkevand, hvilket har givet anledning til store vandbårne udbrud. I koldt vand eller i våde kolde omgivelser kan de overleve i adskillige måneder udenfor værten. Ved 20° kan overlevelsen være op til 3 mdr. De kan tåle ned til -20° i 10 timer og ned til -13° i 2 uger. Cysterne er følsomme overfor udtørring og direkte sollys³

Giardia smitten forekommer desuden ved fæcal-oral kontakt eller ved indtagelse af føde, der er forurenset med cyster.⁵

4.2 Patofysiologi

4.2.1 Parasitten

Trophozoiten er det patogene stadie. Den er ikke invasiv, men lever frit i tyndtarmen. Trophozoiterne etablerer sig i den forreste del af tyndtarmen og reproducerer sig ved deling, således at kolonisation af værten bibeholdes⁵. De encystrer sig sandsynligvis i ileum eller colon. Cystestadiet har ingen mulighed for adhesion til tarmepitelet og udskilles derfor med fæces. Udskillelsen af cyster begynder 5-12 dage efter optagelsen. Der er intermitterende cysteudskillelse³ og negative perioder på 20-30 dage er beskrevet hos mennesker⁶. Cysteudskillelse kan forekomme i måneder til år.

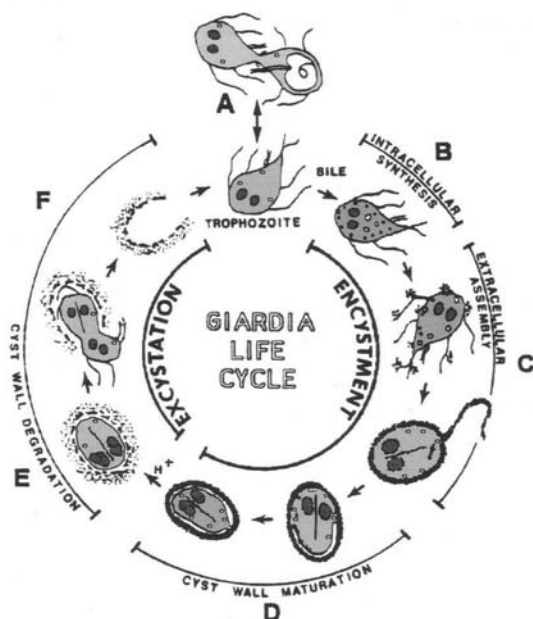
Giardia er en potentielt patogen organisme.³ Parasitten beskadiger epitelet ved hjælp af sine sekretoriske og ekskretoriske produkter. Påvirkningen er sandsynligvis dosisafhængig.⁷

4.2.2 Værten

Ved en *Giardia* infektion ses altid afkortning af mikrovilli og øget epitelieturnover. Værtens T-lymfocytter synes at være medvirkende til villusatrofien. Atrofien forårsager nedsat disaccaridase aktivitet samt nedsat overfladeareal. Resultatet er nedsat absorption af vand og glukose i hele tarmens længde. Denne malabsorption og maldigestion medfører diarré. Der kan desuden forekomme nedsat lipaseaktivitet med steatorrhoea.⁷

Den øgede permeabilitet af mucosa medfører øget makromolekylær optagelse i jejunum.⁸

Infektion med *Giardia* medfører cirkulerende og sekretoriske antistoffer. Mennesker der lever i endemiske områder har ofte en hvis grad af immunitet⁹. Der findes undersøgelser der viser sammenhæng mellem udvikling af allergi og giardiose. Børn der er smittet med *Giardia* har signifikant forøgede IgE niveauer overfor fødevareallergener.



Figur 2. Parasittens livscyklus

4.3 Patologi

Når makroskopiske forandringer forekommer, ses katarrhalsk enteritis, forstørrede krøslymfeknuder og fortykkelse af slimhinden i duodenum og jejunum. Histologisk ses infiltration af lymfocytter og plasmaceller i epitelet .

4.4 Symptomer

De klassiske symptomer på giardiose hos hund og kat skyldes maldigestion og malabsorption. Der ses blege ildelugtende fæces. Steatorrhoea kan forekomme. Symptomerne kan være konstante eller

intermitterende. Ofte forsvinder symptomerne ved uspecifik diarrébehandling, men vender tilbage efter seponering af behandlingen. Typisk for sygdommen er slimede, halvformede fæces. Meget vandig eller hæmorrhagisk diarré er som regel ikke udelukkende forårsaget af *Giardia*. Feber og vomitus er heller ikke typisk ved giardiose.¹⁰ Der kan forekomme mavesmerter, intestinal hypermotilitet og diarré. Opkastning og kløe er beskrevet.

Af og til forekommer kronisk diarré og vægttab eller nedsat tilvækst, ofte trods god appetit. Hos hvalpe og killinger ses hyppigt nedsat vækst.⁹

Sygdommen kan være asymptomatisk, men kan udvikle sig til kronisk malabsorptionssyndrom. Voksne dyr optræder ofte som symptomløse cysteudskillere.

Hos mennesker kan symptomerne strække sig over 3-20 dage, helt op til 7 uger. Hos 30-50% ses kronisk diarré med vægttab på op til 10-20% af kropsvægten¹¹ Der er beskrevet urtikarier hos mennesker med giardiose.¹²

4.5 Diagnostik

4.5.1 Ova og parasit metoder (O&P)

Giardia trophozoiter kan ses i dråbepræparat af fæces ved høj forstørrelse. Cysterne kan også ses, men ses bedst ved opkoncentrering. Almindelige flotationsmedier til diagnosticering af andre tarmparasitter destruerer cysterne, så de bliver ukendelige. Der findes et utal af medier til sedimentation eller flotation af giardiacyster.

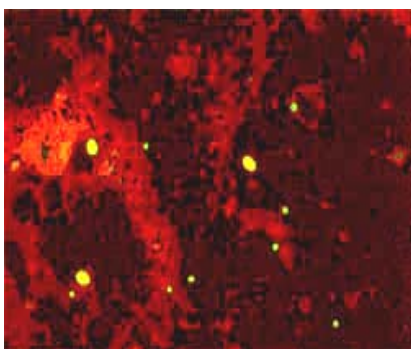
Der bør opsamles fæcesprøver fra 3 dage grundet den intermitterende cysteudskillelse.¹⁰

4.5.2 Immunfluorescens

Ved immunfluorescens synliggøres cysterne ved tilsætning af monoklonale antistoffer udviklet mod cysteoverflade antigener. Disse antistoffer er bundet til et fluorescerende stof (fluorescein isothiocyanat (FITC))¹³ Præparatet undersøges ved hjælp af fluorescensmikroskopi. Giardiacysterne lyser op med tydelig æblegrøn farve.¹⁴

Når testen indeholder antistoffer mod både *Giardia* og *Cryptosporidium*, kaldes den Immunofluorescens Assay (IFA)

Når testen kun indeholder monoklonale antistoffer overfor enten *Giardia* eller *Cryptosporidium* benævnes den Direct Immunoflorescent Assay (DFA).



Figur 3 Giardia cyster og Cryptosporidium oocyster demonstreret ved immunfluorescens. Giardia cysterne er størst. (Billede fra Meridians hjemmeside. www.mdeur.com)

4.5.3 ELISA

Fælles for ELISA tests er at de reagerer på et trophozoitantigen kaldet GSA65. Det er et antigen der både findes på cysten og trophozoiten.

En nyere undersøgelse udført på ProSpecT viser, at den muligvis i stedet reagerer på et antigen, CWP1, der findes på cysternes overflade, men også frigives ved encystring. Der er tale om et stabilt vandopløseligt protein.¹⁵



Figur 4 ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay (Fra Remels hjemmeside. www.remel.com)

4.6 Terapi

4.6.1 Antibiotika

5-nitroimidazole midler er kendt for at være effektive mod giardiose. Der er begyndende resistens mod metronidazol, derfor er nyere typer af 5-nitroimidazolmidler taget i brug med bedre effekt. De absorberes hurtigere og bedre end metronidazol og har længere halveringstid end denne¹⁶.

Helbredelses procenten ved brug af metronidazol angives at være 67 % ved en dosis på 20-25mg/kg BID i 7 dage hos hunde.³ Hos kat er foreslået en dosis på 10mg/kg BID i 5 dage. Der er beskrevet bivirkninger ved meget høje doser, så som vomitus, nystagmus og ataksi.¹⁷

Drontal® comp.vet kan bruges ved behandling af parasitten. Der skal behandles i minimum 2 dage, eventuelt 3 med den anbefalede dosis.¹⁸. Ved behandling med den anbefalede dosis i 2 dage sås en helbredelses procent på 92,1 %.^{19 20, 21}

Albendazol (Valbazen®vet) og fenbendazol (Panacur® vet) bruges til behandling af både mennesker og dyr. Begge har vist sig effektive i behandlingen af giardiose hos hunde. Et studie viser, at Albendazole givet i doser på 25mg/kg bid i 2 dage er effektivt og bivirkningsfrit.²²

Fenbendazol i den godkendte dosering i 3 dage har en helbredelses procent på 90¹⁷ Fenbendazol har vist sig effektiv til behandling hos kat.¹⁶

Ingen af midlerne er registreret til behandling af giardiose i Danmark.

Som kuriositet kan nævnes, at hvidløg har vist sig effektivt *in vivo* og *in vitro*. Både intakt hvidløg og flere af hvidløggets komponenter har vist sig effektive mod *Giardia*.²³

4.6.2 Vaccination

Ved naturlige *Giardia* infektioner tager det ofte uger til måneder for værten at rense sig for parasitten, idet infektionen ikke stimulerer immunsystemet tilstrækkeligt. Desuden kan parasitten virke immunosupprimerende. Vaccination både oralt og systemisk har vist gode resultater hos mennesker. Vaccinen kan bruges mod forskellige *Giardia spp.*⁹

Vaccination synes især at være effektiv hos kroniske smittebærere. En af teorierne er, at disse dyr har udviklet et højt T-suppressor repons i tarmmucosaen. Vaccinen forårsager dannelse af humorale antistoffer og derved eliminerer af parasitten.⁹

Vaccination kan foretages fra 8 ugers alderen og giver beskyttelse i op til 1 år mod klinisk sygdom.²⁴ Desuden vil vaccinerede dyr udskille færre levende cyster. Der er ikke set bivirkninger af vaccinen.⁹

I USA og Canada forhandles en *Giardia* vaccine via Fort Dodge Animal Health (*Giardia-vax*TM) Der har også været en Fel-O-Vax *Giardia* til kat, men den er udgået.

4.7 Forebyggelse

God hygiejne med opsamling af fæces er vigtig. Desuden kan desinfektion med klorin reducere cystetrykket.¹⁰ Kvarternære ammoniumforbindelser (Rodalon) er også effektive til desinfektion. Disse inaktiveres af organisk materiale, så det kan være svært at desinficere løbegårde og lignende.

Parasitten tåler ikke udtørring.

5 Materialer og metoder

5.1 Eget materiale

Fæcesprøver blev indsamlet fra hunde der indgår i Frederiksværk Dyrehospitals patientmateriale. To prøver blev indsendt fra Maribo Dyrehospital og fire prøver fra Otterup-Søndersø dyrlægerne. Prøverne blev indsamlet fra 44 hunde med diarré. Desuden indgik en kontrolgruppe på 29 raske hunde. I alt indgik der 73 prøver i undersøgelsen.

Diarré blev defineret som afvigelse fra normal fæceskonsistens. Der blev ikke skelnet mellem forskellige typer diarré.

Alle fæcesprøverne blev undersøgt ved hjælp af SNAP testen. Resten af fæcesprøven blev lagt i 10 % neutralt formalin og indsendt til Klinisk Centrallaboratorie på KVL. Her blev der foretaget en undersøgelse ved hjælp af Merifluors IFA test.

De 2 testresultater blev sammenlignet ved hjælp af en McNemar test.

SNAP testens positive og negative prædiktive værdier blev udregnet ved en anslået prævalens på 4 % - 20 %. Værdierne for testens sensitivitet og specificitet blev taget fra produktbladet.

Sammenhængen mellem smitte med *Giardia* og forekomsten af diarré blev undersøgt ved hjælp af en X^2 test. På samme måde blev det undersøgt, om dyr under 1 år var hyppigere smittede end dyr over 1 år.

5.1.1 Håndtering af smittede dyr

Hvis et dyr blev fundet positiv på SNAP testen blev en behandling iværksat. Hovedparten af de positive dyr blev behandlet med Drontal[®] comp. vet i den anbefalede dosering 1x dagligt i 3 dage. De hunde der var febrile, eller havde blodig diarré blev behandlet med metronidazol, 20-25mmg/kg BID i 7 dage. Det blev anbefalet at indsende en kontrolprøve, men resultatet af denne indgik ikke i undersøgelsen.

5.2 Eksternt materiale

Øvrigt materiale, der indgik i undersøgelsen er VML's resultater for *Giardia* fra Danmark for 2003 og 2004. Desuden indgår KVL's resultater for *Giardia* og *Cryptosporidium* for 2000 til 2005. Disse eksterne resultater er både for hund og kat.

Resultaterne for KVL og VML blev slået sammen, kodet på postnumre og udlagt på et Danmarkskort.

En årstidsvariation for forekomsten af *Giardia* hos hund og kat blev undersøgt på KVL's og VML's resultater for *Giardia*. Resultaterne blev delt på vinter og sommer. Vinterhalvåret blev defineret som oktober, november, december januar, februar og marts. Sommerhalvåret som april, maj, juni, juli august og september. Resultaterne blev sammenlignet ved hjælp af en X^2 test.

En anslået prævalens for *Giardia* blev udregnet for KVL's resultater samt VML's resultater. Desuden blev de prædiktive værdier udregnet på basis af anslåede prævalens værdier fra 4%-20%. Begge testenes sensitivitet og specificitet blev valgt fra litteraturen.²⁵

En sand prævalens blev udregnet på baggrund af testenes sensitivitet og specificitet.

5.3 Introduktion af de prøvetyper der indgår i opgaven

5.3.1 Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* Direct Immunfluorescens Assay (IFA)

Denne test benyttes af KVL. Testen blev brugt til sammenligning med SNAP testen.

IFA testen udføres på fæces der er opbevaret i 10 % neutral formalin, da cysterne ellers går i opløsning under forsendelse. Testen er designet til human brug.

5.3.2 ProSpec[®] *Giardia* Microplate Assay (Remel, tidligere Alexon)(ProSpecT)

Denne test udføres på VML.

Der er tale om en ELISA test. Testen kan udføres på frisk fæces eller fæces, der er opbevaret i formalin. Testen er designet til human brug.

5.3.3 IDEXX Snap® Giardia (SNAP)

Denne test blev brugt ved undersøgelse af eget materiale i klinikken. Det er en ELISA test. Testen skal laves på frisk fæces. Dette kan dog opbevares på køl i op til 7 dage. Testen er designet til brug på hund og kat.

6 Resultater

6.1 Sammenligning af SNAP testen med IFA testen

Der blev fundet 12 *Giardia* positive hunde ud af de 73 undersøgte ved brug af SNAP testen.

På de samme 73 prøver blev der fundet 2 positive ved undersøgelse på KVL ved hjælp af IFA testen. Der var ikke sammenfald mellem de positive resultater.

Ved undersøgelsen med IFA testen blev der desuden fundet 6 *Cryptosporidium* positive prøver.

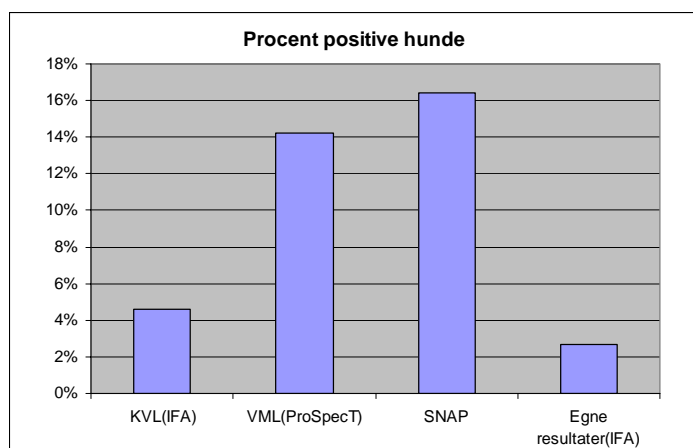
Tabel 1 Sammenhæng mellem IFA testen og SNAPtesten på eget materiale.

	IFA positive	IFA negative	I alt
SNAP positive	0	12	12
SNAP negative	2	59	61
I alt	2	71	73

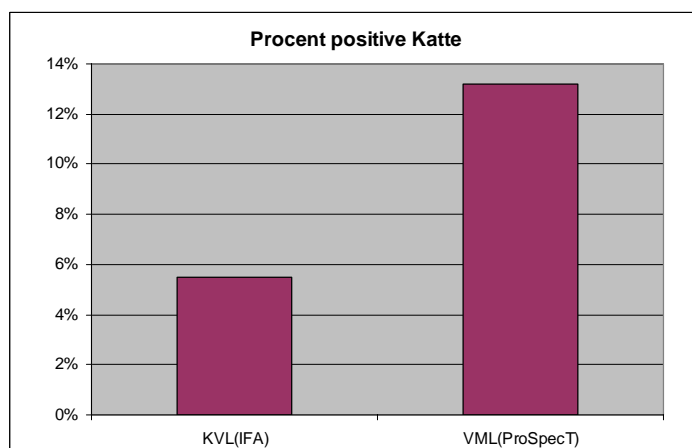
Ved udførelse af McNemar's test for forskelle mellem 2 korrelerede proportioner fandtes en signifikant forskel på de to prøvers resultater med en X^2 på 8,6 og en OR på 6.

Hvis man antager, at de 2 IFA positive er falsk negative på SNAP, og at alle de SNAP positive er sandt positive, får man en sensitivitet for SNAP på 85,7 % og en specificitet på 100%.

6.2 Sammenligning af KVL's resultater med Vet Med Lab's resultater og egne resultater



Figur 5. Procent positive hunde ved de forskellige tests. KVL (IFA) og VML (ProSpecT) er ikke udført på det samme materiale. SNAP og Egne resultater (IFA) er begge udført på materiale fra denne undersøgelse.



Figur 6. Procent positive katte ved de 2 forskellige tests. Kvl (IFA), VML (ProSpecT). Prøverne er ikke udført på det samme materiale.

Ved sammenligning af resultaterne for hunde viste det sig, at der ikke var signifikant forskel på VML's ProSpecT og SNAP testen ($p=0,61$). Der var heller ikke signifikant forskel, mellem de resultater KVL havde fået på andres tilsendte prøver, og på de resultater de fik på prøver indsendt i forbindelse med denne undersøgelse. ($p=0,73$).

Derimod var der signifikant forskel, mellem den prævalens, der blev fundet på KVL's IFA test og den prævalens, der blev fundet på VML's ProSpecT. Der var ligeledes signifikant forskel mellem de prævalenser, der blev fundet på KVL's IFA test og på SNAP testen. ($p= 0.001$).

Ved sammenligning af resultaterne for katte ses, som ved resultaterne for hunde, at der ikke er nogen lighed mellem proportionen af positive resultater, der findes på KVL og den proportion af positive resultater der findes på VML. χ^2 er 6,55 og $p=0,01$

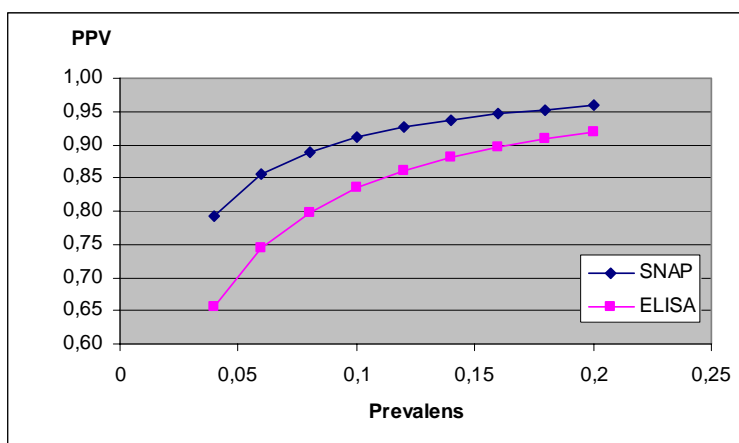
Se bilag 1 og 2.

6.3 Positive og negative prædiktive værdier (PPV og NPV)

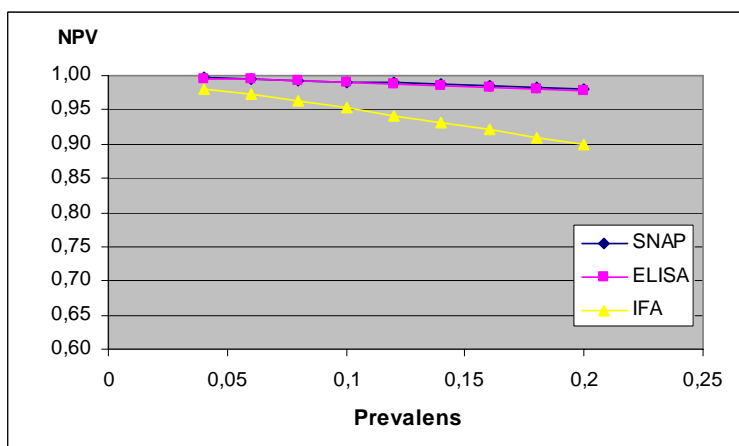
Ved brug af nedenstående værdier for sensitivitet og specificitet blev de 3 tests positive og negative prædiktive værdier udregnet.

Tabel 2 Oversigt over de værdier for sensitivitet og specificitet der er brugt ved udregningen af de prædiktive værdier.

	Sensitivitet	Specificitet
Idexx Snap	0,92	0,99
IFA egne	0,55	1
Meriflour IFA,	0,55	1
ELISA VML	0,91	0,98



Figur 7 Positive prædiktive værdier (PPV) ved forskellig prævalens. IFA testen er ikke medtaget da den giver 1 ved alle prævalenser.



Figur 8 Negative prædiktive værdier (NPV) ved forskellig prævalens.

De prædiktive værdier viser testens evne til at vise et korrekt positivt og negativt resultat ved forskellig prævalens af sygdommen.

6.4 Udregning af sand prævalens

6.4.1 Sand prævalens hos hund

Ved udregning af den sande prævalens for parasitten hos hund blev følgende fundet:

KVL: Anslået prævalens 4,6% Sand prævalens 8,3%

Vet Med Lab: Anslået prævalens 14,2% Sand prævalens 18,2%

SNAP: Anslået prævalens 16,4% sand prævalens 16,9%

IFA egne resultater: Anslået prævalens 2,7% Sand prævalens 4,9%

6.4.2 Sand prævalens hos kat

KVL : Anslået prævalens 5,5%. Sand prævalens 10%

Vet Med Lab: Anslået prævalens 13,2% Sand prævalens 17,1%

Den anslåede prævalens er den prævalens, der blev fundet ved brug af de forskellige testmetoder. Ved udregningen af den sande prævalens er værdierne for sensitivitet og specificitet, der er vist i tabel 2 brugt.

Hvis man bruger de værdier som producenten af Merifluor IFA test oplyser, er den sande prævalens for IFA testene = den fundne prævalens. Dette gælder både for hund og kat.

Se desuden bilag 1 og 2.

6.5 Sammenhæng mellem forekomsten af diarré og et positivt testresultat for *Giardia* målt på IFA testen eller SNAP testen

Tabel 3 Raske hunde sammenlignet med hunde med diarré (egne resultater).

	Diarré	Rask	I alt
Giardia positiv	10	4	14
Giardia negativ	34	25	59
	44	29	73

Der blev ikke påvist nogen statistisk sammenhæng mellem det at have diarré og det at være positiv for *Giardia*. χ^2 (Yates)= 0,42 p= 0,52 OR var 1,84. Konfidensintervallet for OR= (0,45-7,8)

Der var dog en tendens til en overhyppighed af *Giardia* positive hunde med diarré i forhold til *Giardia* positive hunde, der var raske. De *Giardia* positive hunde udgjorde 23% af hundene med diarré, og i gruppen med raske hunde udgjorde de *Giardia* positive hunde 14%.

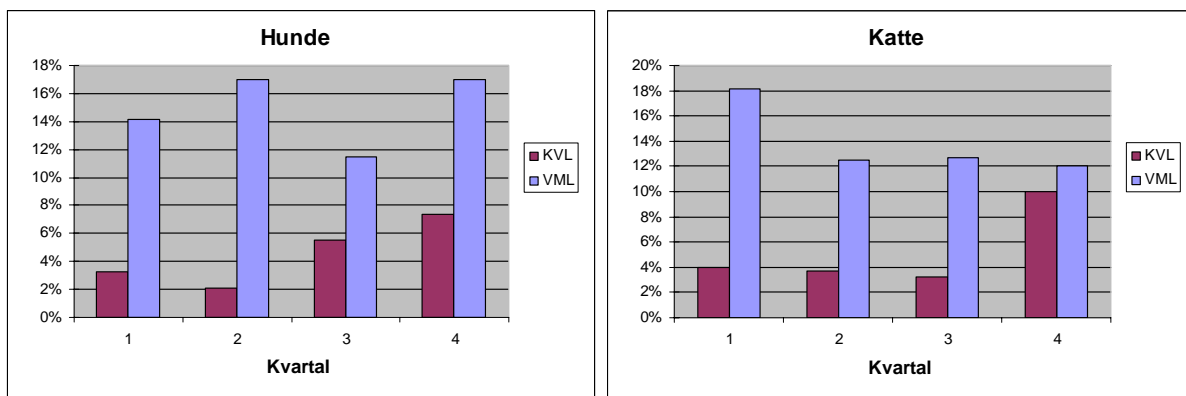
6.6 Sammenhæng mellem smittestatus og alder (egne resultater)

Tabel 4 smitte status i forhold til alder (egne resultater).

	Under 1 år	Over 1 år	I alt
Positiv	5	7	12
Negativ	6	45	51
	21	52	73

Der var en overhyppighed af testpositive dyr under 1 år. χ^2 (Yates)= 4,13 p= 0,02 OR var 5,36. Konfidensintervallet for OR= (0,97-27,54).

6.7 Sæsonvariation for smitte



Figur 9 Sæson variation for smittestatus for resultater for VML og KVL.

6.7.1 Resultater KVL

Der blev ikke fundet signifikant forskel på antal positive hunde fordelt på sommer- og vinterhalvåret. χ^2 (Yates) = 0,17. p= 0,72 OR= 1,81 med konfidensintervallerne 0,33-18,28.

Hos katte viste resultaterne heller ikke nogen årstidsvariation. χ^2 (Yates) = 0,14. p= 0,75 OR= 1,62 med konfidensintervallerne 0,37-9,81.

6.7.2 Resultater VML

Samme forhold gjorde sig gældende for hunde testet på Vet Med Lab som på KVL. Der blev ikke fundet nogen signifikant årstidsvariation. χ^2 = 0,11. p= 0,74 OR= 1,11 med konfidensintervallerne 0,58-2,10.

For katte testet hos VML sås heller ingen sæsonvariation. χ^2 = 0,05. p= 0,82 OR= 1,11 med konfidensintervallerne 0,43-2,85.

6.8 Udbredelse i Danmark

Se kortene i bilag 3

7 Diskussion

7.1 Forekomst af Giardia

Som det fremgår af kortene, bilag 3, bliver *Giardia* diagnosticeret over det meste af Danmark. Der blev ikke fundet tegn på forøget prævalens i særlige områder. Der undersøges dog meget lidt for parasitten, så resultatet er behæftet med stor usikkerhed.

Ved undersøgelse på eget materiale blev der ikke fundet en sammenhæng mellem det at have diarré og det at være *Giardia* positiv. Dog blev der fundet en tendens til en overhyppighed af test positive med diarré. Dette resultat var som forventet idet det beskrives, at der ikke er sammenhæng mellem smittestatus og fæceskonsistens.^{3,26}

På det samme materiale blev der fundet en overhyppighed af testpositive hunde der var under et år. Dette er som forventet ifølge litteraturen. Det beskrives i en undersøgelse fra USA at 17,5% af de undersøgte hunde under 2 år er positive for *Giardia*. Hos hunde over 2 år falder mængden af smittede til 2,1%.²⁷

Resultatet for sammenhæng mellem smittestatus og diarré og resultatet med overhyppighed af testpositive unghunde skal tolkes med forsigtighed. Testene er udført på et lille materiale og der er tvivl om hvor præcise IFA og SNAP testene er.

7.2 Vurdering af prævalensen for parasitten

Den anslåede prævalens af *Giardia* hos danske hunde, undersøgt ved hjælp af IFA testen, ProSpecT og SNAP, var henholdsvis 4,6, 14,2 og 16,4.

Ved en tidligere undersøgelse på danske hunde er prævalensen af *Giardia* 17,1%. Hos hunde fra kenneler var prævalensen 20%.³ I forsøget var der stor overvægt af hunde på under 4 måneder, hvilket kan føre til forhøjet prævalens

Prøverne i den danske undersøgelse er undersøgt ved hjælp af flotation. Undersøgelsens sensitivitet er øget ved at indsamle prøver hver anden dag 3 gange. Der er tale om en undersøgelsesmetode, der er meget lidt sensitiv. Sensitiviteten beskrives til at være på 50-70% alt efter hvem der foretager undersøgelsen²⁷ Det skønnes derfor, at prævalensen i den danske undersøgelse ikke er voldsomt forhøjet.

I Tyskland er der fundet en prævalens på 16,5 % på familiehunde. Undersøgelsen er foretaget over 3,5 år, og prøverne er undersøgt ved hjælp af ProSpecT testen²⁸.

Det er rimeligt at sammenligne forholdene i Danmark med forholdene i Tyskland af geografiske årsager.

Det kunne derfor forventes, at de resultater, der blev fundet på danske dyr, havde en prævalens der ikke signifikant adskilte sig fra disse to undersøgelses resultater.

Resultaterne fra VML og fra KVL stammede fra dyr, der havde fået taget en fæcesprøve som led i en diagnostisk udredning. Det vides ikke om der var tale om familiedyr, eller om der var tale om dyr fra kenneler. Alderssammensætningen var heller ikke kendt. Nogle af prøverne kunne være indsendt som kontrolprøver efter afsluttet behandling. På baggrund af at de omtalte prøver stammede fra syge dyr, eller fra dyr der havde gennemgået en sygdom, var der muligvis selekteret, så prævalensen blev højere end ved en undersøgelse af et vilkårligt udsnit af familiehunde. Derfor var den prævalens, der blev fundet ved undersøgelse med IFA testen lavere end forventet, mens prævalensen fundet ved hjælp af ProSpecT var højere end det forventede.

De fleste af prøverne, der indgår i evalueringen af SNAP, blev udtaget i sommerhalvåret. Dette kan have medført færre positive, end hvis undersøgelsen havde kørt et fuldt kalenderår. Flere forfattere beskriver sæsonvariation med lavere hyppighed i sommermånederne.^{27,29}²⁷ Dette kunne dog ikke bekræftes ved undersøgelse af VML eller KVLs resultater, som dog viste en tendens til lidt flere smittede om vinteren. Årsagen til, at der ikke var tydelig sæsonvariation, kan være, at der var tale om et selekteret materiale og ikke et repræsentativt udsnit af danske dyr. Man kan selvfølgelig også overveje, om vejrforholdene i Danmark altid er så kolde og våde at parasitten begunstiges.

Ved udregning af den sande prævalens for de forskellige prøver, er det tydeligt, at der er stor forskel på testene. Den sensitivitet, der blev valgt for IFA testen, stammer fra Aldeen et al.²⁵. Valget skyldes, at patient materialet er selekteret på samme måde, idet Aldeen et al beskæftiger sig med prøver fra individer, der er klinisk syge.

Ved udregning af de sande prævalensværdier i denne undersøgelse ses meget afvigende tal. Dette viser, at de værdier for sensitivitet og specificitet, der er brugt til beregningen er forkerte. Præcisionen af de forskellige tests bør undersøges yderligere.

Der findes ingen viden om hvad sandheden er. Da der ikke er nogen test, der med sikkerhed kan bruges som gold standard, vil en præcis viden om prævalensen være svær at fremskaffe.

7.3 Sammenligning af SNAP testen med IFA testen

Der var ingen sammenhæng mellem på de resultater, der blev fundet ved undersøgelse med IFA testen og SNAP testen. Sammenligning viste, at der var 6 gange så stor sandsynlighed for at få et positivt resultat på SNAP testen som på IFA testen.

Ved sammenligning af antal positive resultater fundet på de forskellige tests blev en lignende forskel fundet på resultaterne af KVLs egne prøver i forhold til VMLs egne prøver. Derimod var der ikke statistisk forskel mellem proportionerne for SNAP og ProspecT. Procent positive tests fra eget materiale undersøgt ved IFA testen var ikke signifikant forskellige fra procent positive prøver, der blev fundet på KVL's egne prøver fra de sidste 5 år.

Dette fører til den hypotese, at forskellen på SNAP testen og IFA testens resultater skyldes forskel på test metoden, ikke skævheder som følge af udtagning, opbevaring, forsendelse eller udvælgelse af materialet.

Det tyder på, at der er tale om forskelle på resultaterne alt efter om man bruger en ELISA test, eller IFA testen. Denne hypotese bør undersøges yderligere.

Forskellen i antal positive kan skyldes, at det er forskellige ting man tester for. Ved et positivt fund på IFA testen er der synlige cyster i fæces. Dette svarer til et positivt fund på en almindelig direkte mikroskopi, men eliminerer de fejlkilder, der er ved denne metode, ved at gøre cysterne synlige.

Testen kan ikke reagere på trophozoiter eller vandopløselige antigener fra encystrerende trophozoiter, således som ELISA testen kan.

I visse stadier af infektionen med *Giardia* kan der ses trophozoiter i fæces, ikke cyster. Parasitten har stærkt intermitterende cysteudskillelse.¹⁰ Hvis man tager dette i betragtning, bør man finde flere positive prøver ved at bruge en ELISA test, fordi den reagerer på et antigen, som kan findes i fæces, både når der er trophozoiter og cyster, samt når trophozoiterne encystrer sig.

De fleste af de undersøgelser, der er foretaget på de forskellige diagnostiske kit, er udført på fæces fra mennesker. Dette antages ikke at være et problem, da der sandsynligvis er stor biokemisk homogenitet blandt *G. duodenalis* grupper og undergrupper. Der findes muligvis en undergruppe der kun kan inficere hunde. Der er således stadig mangel på viden omkring parasittens genetik og der hersker stor uenighed omkring opdelingen af species og subspecies. En hypotese kan være, at IFA og ELISA testene muligvis er målrettede mod hver deres *Giardia spp.*, og at dette er årsagen til den store variation mellem testene.

7.4 Vurdering af sensitivitet og specificitet for de involverede testmetoder

ProSpecT er hos Aldeen fundet mere sensitiv end både O&P og DFA testen (se p. 5), når *Giardia* skal findes hos mennesker med symptomer. O&P og DFA er lige sensitive. I denne undersøgelse har testen en sensitivitet på 91% og en specificitet på 98%, mens både O&P og DFA testene har en sensitivitet på 55% og en specificitet på 100%.²⁵

I en undersøgelse er det vist, at IFA testen er bedre til at finde smittede individer med lav parasitbyrde end ProSpecT. ProSpecT har i den nævnte undersøgelse en sensitivitet på 90,6% og en specificitet på 99,5% ved sammenligning med IFA, når dennes sensitivitet og specificitet sættes til 100%.²⁹

I en anden undersøgelse hvor DFA testen sammenlignes med direkte mikroskopi af fæces og med ProSpecT[®] *Giardia* Microplate Assay, bedømmes både DFA testen og ELISA testen til at have en sensitivitet på 99,8%³⁰. Garcia et al udregner sensitiviteten af ProSpecT vurderet på baggrund af DFA testen til 94%. I sidst nævnte undersøgelse findes en specificitet på ProSpecT på 100%.³¹

Producenten for ProSpecT beskriver 2 undersøgelser. Den ene måler en diagnostisk sensitivitet på 100% og en specificitet på 100%, når man sammeligner med O&P undersøgelse. Den anden undersøgelse måler sensitiviteten til 98% og specificiteten til 98% også sammenlignet med O&P³². Begge undersøgelser tester ELISA testen på prøver, der er fundet positive for parasitten.

Ved fastsættelse af sensitivitet og specificitet for SNAP testen bliver en immunfluorescens test (DIFM; Cyst-A-Glo[®] Kit Waterbourne, Inc), samt ProSpecT brugt som sammenligningsgrundlag. Der findes god sammenlignelighed mellem immunfluorescens testen og ProSpecT. Der er flere positive fund ved immunfluorescens metoden end ved ProSpecT, henholdsvis 24% mod 14%. SNAP har en sensitivitet på 90% og en specificitet på 96% sammenlignet med immunfluorescens testen og en sensitivitet på 92% og en specificitet på 99,8% sammenlignet med ProSpecT ELISA testen. Fæcesprøverne er fra både syge og raske dyr³³.

Ved sammenligning i denne undersøgelse af SNAP med IFA, blev der fundet 2 prøver der var positive på IFA og negative på SNAP. Disse må betragtes som værende falsk negative på SNAP testen. Ved en vurdering af testens sensitivitet på dette grundlag, blev der opnået en værdi på 85,7%. Dette tal er lavere end forventet. Da der er tale om en vurdering på baggrund af et meget lille materiale, bruges tallet ikke i beregninger i undersøgelsen.

Ovenstående tegner et kompliceret billede. Der er tydeligvis ikke enighed om testenes præcision. Generelt vurderes testmetodernes sensitivitet og specificitet ud fra andre testmetoder. Det skyldes, at parasitten er svær at diagnosticere, fordi den nemt går i opløsning ved præparation. Da der samtidig er stærkt svingende cysteudskillelse, er det vanskeligt at finde et sandt billede at vurdere smitten ud fra. De forskellige testmetoders sensitivitet varierer muligvis alt efter, hvor stor parasitbyrden er. En forsigtig konklusion på dette kan være, at ELISA testen vil fungere bedst i de tilfælde hvor der undersøges dyr med symptomer, mens IFA testen virker bedre ved screeninger af klinisk raske patienter. Både falsk negative og falsk positive svar må dog forventes.

8 Konklusion

Giardia er ubiquitært forekommende i Danmark. Den sande prævalens kan ikke bestemmes, da de forskellige testmetoder er for usikre.

Idexx SNAP[®] *Giardia* test er blevet afprøvet mod en kendt test. Dens egnethed er ikke afklaret, men kræver yderligere undersøgelser. Begge testmetoder synes at være fejlbehæftede. Et mere tilfredsstillende resultat ville kunne findes, hvis der blev indsamlet 3 fæcesprøver, udtaget hveranden dag. Dette ville minimere falsk negative prøver som følge af den intermitterende cysteudskillelse.

Der blev ikke fundet nogen tydelig sæsonvariation blandt de smittede dyr i undersøgelsen.

Det er sandsynliggjort, at man opnår forskellige resultater alt efter om man vælger at undersøge med en ELISA test eller en IFA test. De 2 testtyper kan eventuelt med fordel kombineres, da de 2 prøvetyper sandsynligvis tester for forskellige egenskaber ved parasitten.

Tak til Vet med Lab og Centrallaboratoriet på KVL for lån af deres prøvesvar på *Giardia* og *Cryptosporidium*

Tak til Kruuse fordi de har stillet Idexx SNAP[®] *Giardia* testen til rådighed for min undersøgelse

Tak til PDA's fond for økonomisk støtte til betaling af indsendte prøver

Tak til Mariann Criél for grundig rådgivning omkring statistikken

¹ Thompson R.C.A. Towards a Better Understanding of Host Specificity and the Transmission of *Giardia* : the Impact of Molecular Epidemiology. Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 55-69

² Pung O.J. Other Noteworthy Zoonotic Protozoa: Richardson, Krause (ed): *World class Parasites*: Kluwer Academic Publishers 2003, (6) 165-183

³ Hansen E. H., Nielsen A.L., Monrad J., Vibe-Petersen G. (2000) Giardiose hos hunde i Danmark. DVT, 83, (16), 13-17

⁴ Lloyd D., Harris J.C., Biagini G.A., Maroulis M.R., Turner M.P., Ralphs J., Hann A.C., Wadley R., Ellis J., Paget T. Oxygen Homeodynamics in *Giardia* Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 31-45

⁵ Erlandsen S.L., Weissner S., Ottenwaelter C. Investigation into the Life Cycle of *Giardia* Using Videomicroscopy and Field Emission SEM Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 3-14

⁶ Dupont H. L Sullivan P.S. Giardiasis: the clinical spectrum, diagnosis and therapy. *Pediatric Infectious Disease*. 1986 5, (1): 131-138

⁷ Buret A.G., Scott K.G.-E., Chin A.C. Giardiasis: Pathophysiology and Pathogenesis. Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 109-125

⁸ Hardin J.A. Buret A.G. Olson M. E. Kimm M.H. Gall D.G.. Mast Cell Hyperplasia and Increased Macromolecular Uptake in an Animal Model of Giardiasis. *J. Parasitol.* 1997 83 (5) 908-912

⁹ Olson M.E., Ceri H. Morck D.W. *Giardia* Immunoprophylaxis and Immunotherapy. Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 139-155

¹⁰ Kirkpatrick C.E. Giardiasis. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 1987 17. 6. 1377-1387

¹¹ Farthing M.J.G. Giardiasis as a Disease. Thompson, Reynoldson, Lymbery (ed) *Giardia: From Molecules to Disease*. CAB International 1994 15-37

¹² Clyne C.A., Eliopoulos G.M. Fever and Urticaria in Acute Giardiasis. *Arch Intern Med* 1989, 149, 939-940

¹³ Perez M.J., Aetio R., Martin E.. *Giardia* Tests: An Evaluation of a Commercial Enzyme Linked Immunoassay and a Commercial Immuno-Fluorescence Assay. Thompson, Reynoldson, Lymbery (ed) *Giardia: From Molecules to Disease*. CAB International 1994 357-358

¹⁴ MeriFluor[®] *Cryptosporidium/Giardia*. Direct Immunofluorescent Detection Procedure. Meridian Bioscience Europe Produktblad

¹⁵ Boone J.H., Wilkins T.D., Nash T. E. Brandon J.E., Macias E.A., Jerris R.C., Lysterly D. M, TechLab and Alexon *Giardia* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits Detect Cyst Wall Protein 1 *Journal of Clinical Microbiology*, 1999 611-614

-
- ¹⁶Reynoldson J.A. Therapeutics and New Drug Targets for Giardiasis. Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 159-175
- ¹⁷Zarjac A.M. LaBranche T.P. , Donoghue A.R., Chu T. Efficacy of fenbendazole in the treatment of experimental *Giardia* infection in dogs. *Am J Vet Res* 1998 59 (1) 61-63
- ¹⁸Gianguaspero A. , Traldi G., Bianciardi P. Evaluation of the Therapeutic Efficacy of Pyrantel Embonate, Febantel and Praziquantel against *Giardia* spp. in Naturally Infected Adult Dogs. Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 181-185
- ¹⁹Barutzki D. , Schimmel A., Schaper R. Efficacy of Pyrantel Embonate, Febantel and Praziquantel against *Giardia* spp. In Naturally Infected Dogs. Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 177-180
- ²⁰Schlüsche A. Grewing M., Mehlhorn H., Schimmel A., Schaper R. Efficacy of Febantel and Pyrantel Embonate (Drontal[®] Puppy) on *Giardia*- Infections of Dogs and Mice: a Therapeutic and Cytologic Study. Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 201-208
- ²¹Barr S. Bowman D.D Frongillo F. Joseph S.L. . Efficacy of a drug combination of praziquantel, pyrantel pamoate, and febantel against giardiasis in dogs; *Am J Vet Res* ;1998 . 59 (9) . 1134-1136
- ²²Barr S. Bowman D.D. Heller R.L Hollis N. Efficacy of albendazole against giardiasis in dogs. *Am J Vet Res* 1993 54 (6) .926-928
- ²³Harris J.C. Plummer S., Turner M.P., Lloyd D. *Allium sativum* (Garlic) and some of its Components are Effektive Antigiardials *in vitro* Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 187-197
- ²⁴Greene C.E. Infektionssygdomme Efterårsmøde på Hindsgavl slot sept. 2002
- ²⁵Aldeen W.E., Hale D. Robison A.J. Carroll K. Evaluation of a Commercially Available ELISA Assay for Detection of *Giardia Lamblia* in Fecal Specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1995;21:77-79
- ²⁶Jacobs S.R., Forrester C.P.R., Yang J.,: A Survey of Prevalence of *Giardia* in Dogs Presented to Canadian Veterinary Practices. Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 81-85
- ²⁷Kirkpatrick C.E. Epizootiology of Endoparasitic Infections in Pet Dogs and Cats Presented to a Veterinary Teaching Hospital Veterinary Parasitology 1988 (30) 113-124
- ²⁸Barutzki D. Prevalence of *Giardia* spp. In Dogs in Germany. Olson, Olson, Wallis (ed) *Giardia the cosmopolitan Parasite* CABI publishing 2002 91-95
- ²⁹Johnston S. P., Ballard M.M., Beach M. J., Causer L., Wilkins P.P., Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003 41(2) 623-626.
- ³⁰Zimmerman S.K., Needham C.A. Comparison of Conventional Stool Concentration and Preserved- Smear Methods with Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* EZ Mikroplate Assay for Detection of *Giardia Lamblia* , *Journal of Clinical Mikrobiology*, 1995, 33, (7) 1942-1943
- ³¹Garcia L. C, Shimizi R. Y., Evaluation of Nine Immunoassay Kits (Enzyme Immunoassay and Direct Fluorescence) for detection of *Giardia Lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. 35 (6). 1526-1529
- ³²Remel. ProSpecT[®] *Giardia* Mikroplate Assay Datablad
- ³³Groat R., Monn M., Flynn L. Curato J. Survey of Clinic Practices and Testing for Diagnosis of *Giardia* Infections in Dogs and Cats. IDEXX Laboratories, Inc., Research and Development, Westbrook, Maine. Fremlagt ved 141st American Veterinary Medical Association Annual Convention 2004 for Joint Meeting of The American Association of Veterinary Parasitologists 49th Meeting and The American Society f Parasitologists 79th Meeting.

Bilag 1

	Positive	Negative	I alt	Anslået prevalens	Sand prevalens
KVL(IFA)	9	185	194	4,6%	8,3%
VML(ELISA)	51	309	360	14,2%	18,2%
SNAP(ELISA)	12	61	73	16,4%	16,9%
Egne resultater(IFA)	2	71	73	2,7%	4,9%

Egne resultater: korrelation mellem KVL's Merifluor IFA test, VML's ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay og IDEXX SNAP test

Bilag 2

	Positive	Negative	I alt	Anslået prevalens	Sand prevalens
KVL	11	187	198	5,5 %	10%
VML	23	151	174	13,2 %	17,1%

Prøveresultater for katte

Bilag 3

Hunde

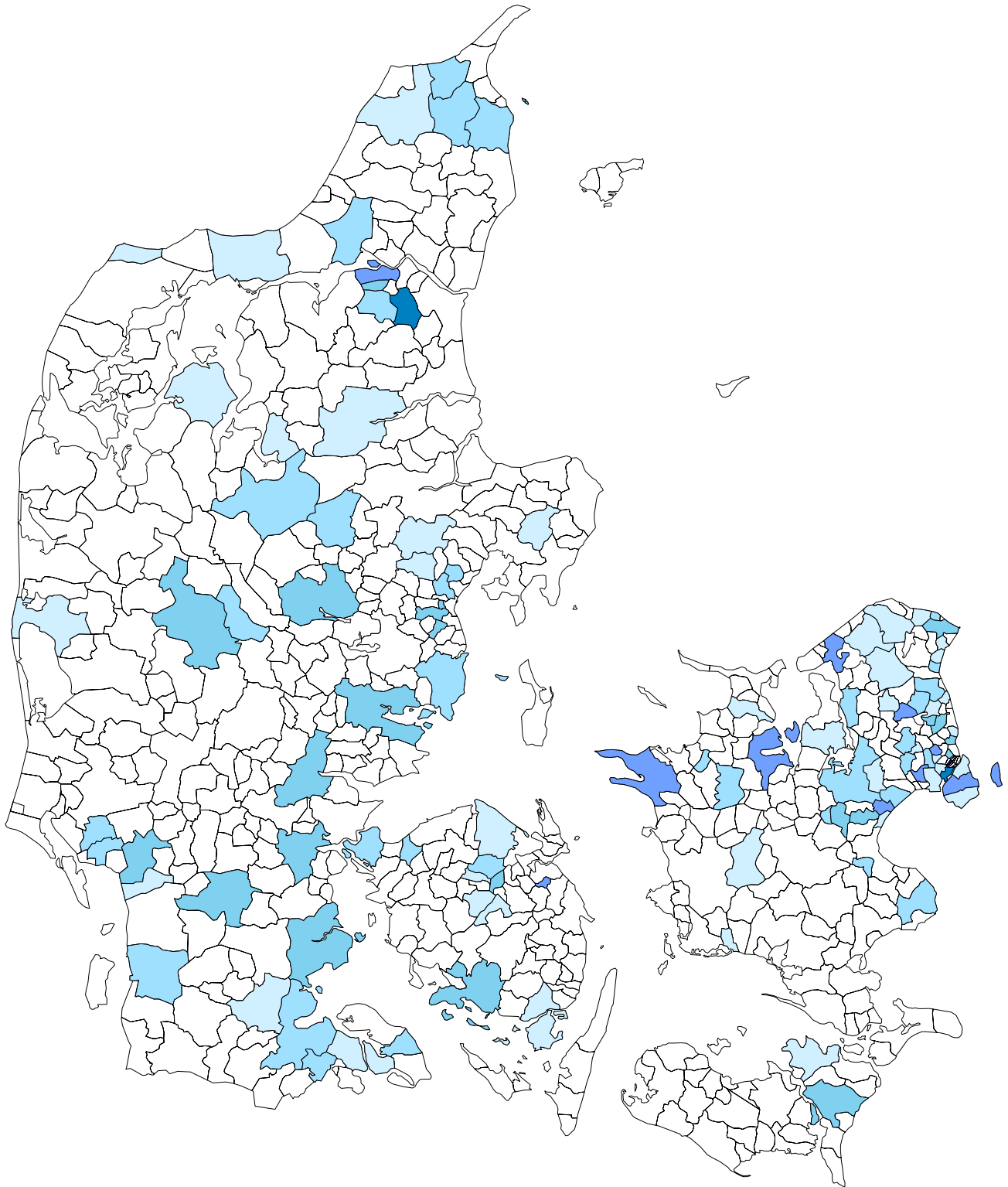
VML: 2003-2004

KVL: 2000-2005

Postnumre hvor der er foretaget test

Antal test

50 to 115	(1)
20 to 50	(2)
10 to 20	(10)
5 to 10	(22)
2 to 5	(35)
1 to 2	(41)

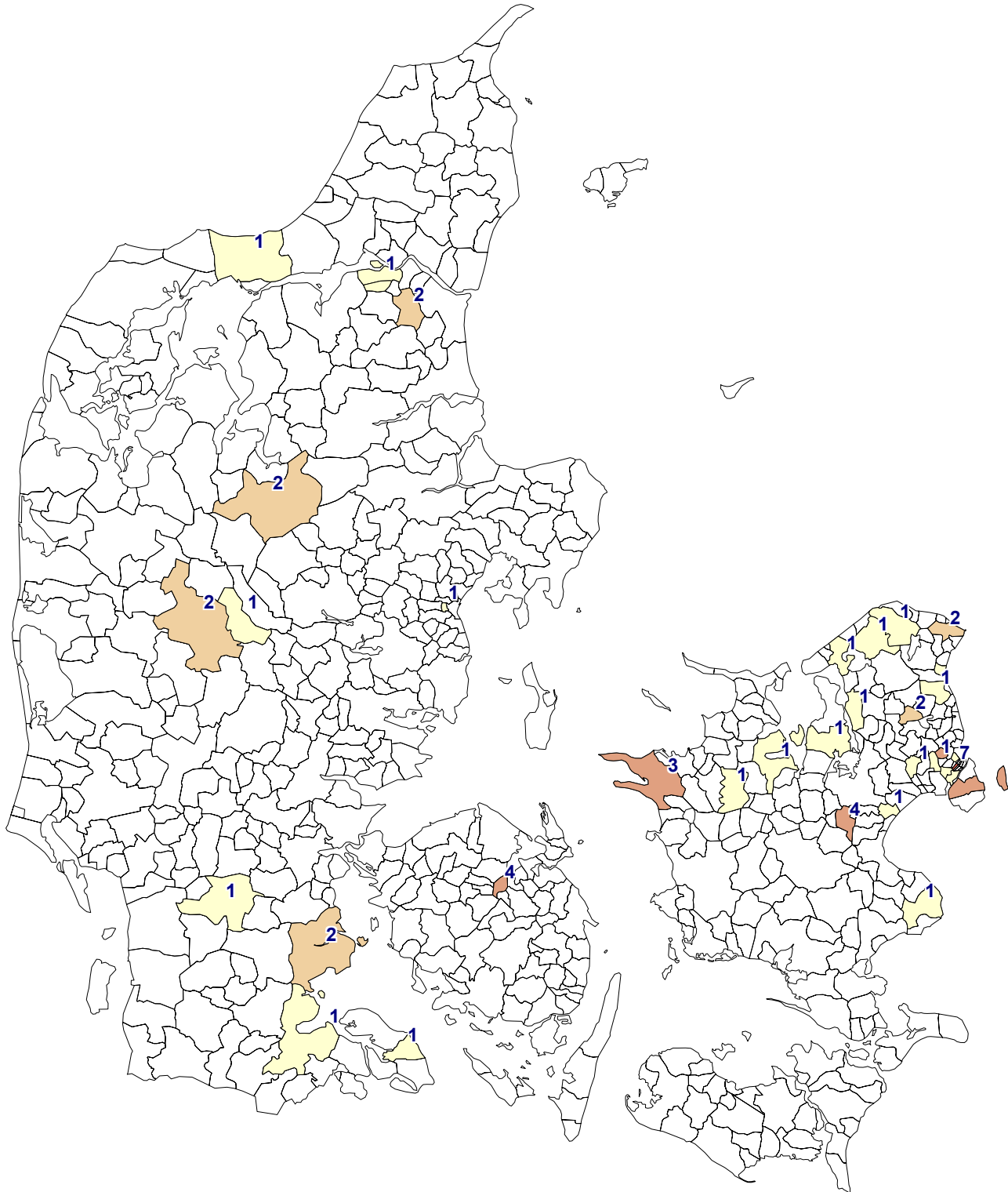
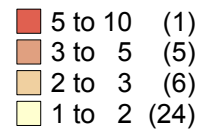


Hunde

VML: 2003-2004

KVL: 2000-2005

Antal positive



Katte

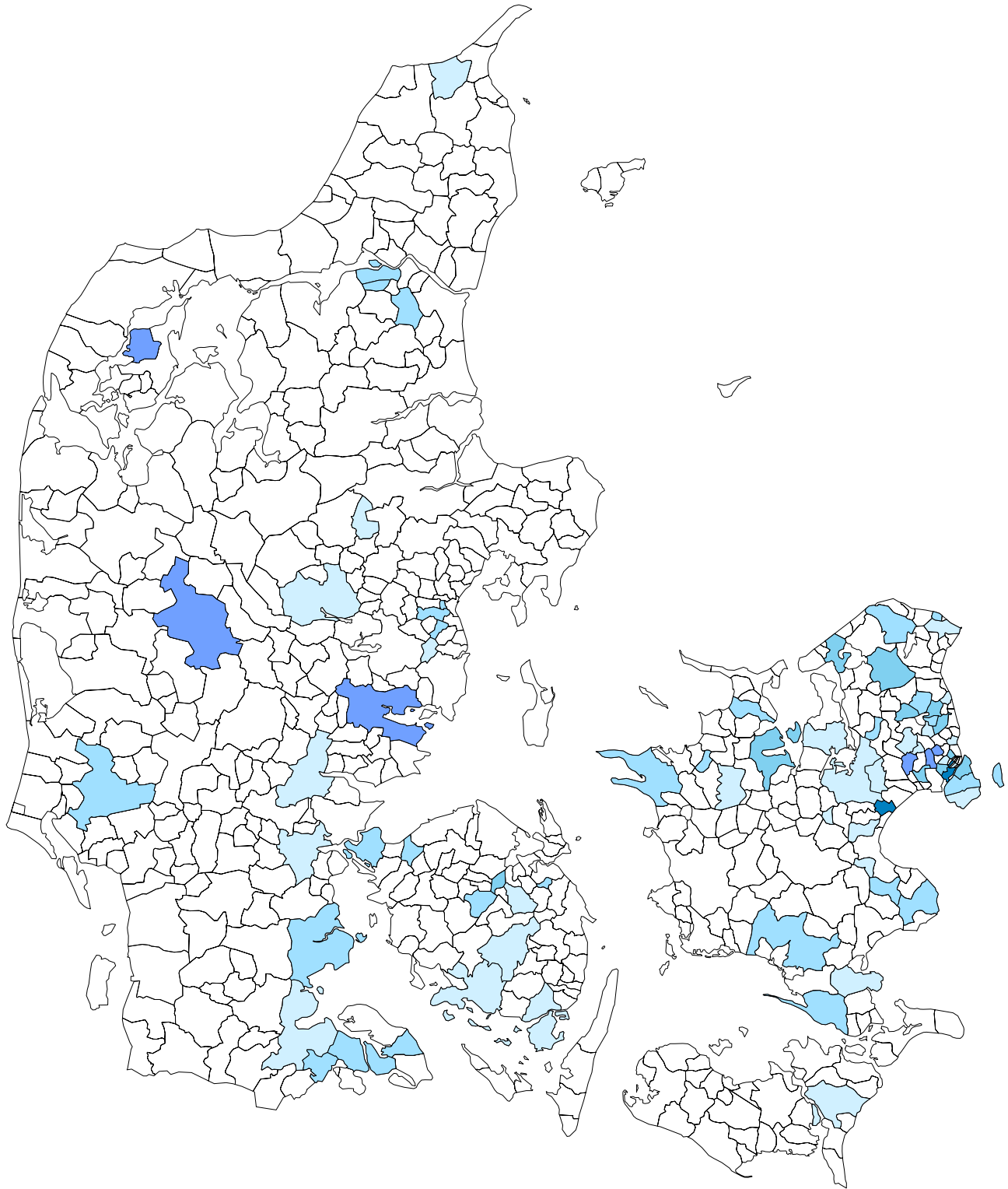
VML: 2003-2004

KVL: 2000-2005

Postnumre hvor der er foretaget test

Antal test

20 to 50	(3)
10 to 20	(6)
5 to 10	(11)
2 to 5	(28)
1 to 2	(28)



Katte

VML: 2003-2004

KVL: 2000-2005

Antal positive

- 3 to 5 (4)
- 2 to 3 (6)
- 1 to 2 (10)

