Projektleder KU/SSI	Stig Milan Thamsborg
Projektgruppe	Rune Stensvold, Lasse Vestergaard
Fagfællebedømmer	Helena Mejer
Kontaktperson i FVST	Inge-Lis Kyllesbæk Andersen

Dato for henvendelse	Dato for svarfrist	Dato for afsendelse	Versionsnummer
07-12-2020	hurtigst muligt 11-12-2020	11-12-2020	1

Journalnummer/sagsnummer	FVST	KU	SSI
	2020-28-29-01362	061-0181/20-3680	20/14715

Besvarelse vedr.

KUs rådgivning om *Enterocytozoon bieneusi*

Resumé

Vores viden om infektion med *E. bieneusi* er generelt begrænset og vi kender ikke til forekomst i DK. Genotypning af infektioner er vigtig i relation til mulige reservoirer i husdyr eller i miljø. Udskillelse af sporer er ofte langvarig og kan fortsætte efter ophør af symptomer, eller eventuelt slet ikke være ledsaget af symptomer. I immunkompetente individer er sygdomsforløbet oftest selvbegrænsende. Inkubationsperioden er ikke kendt, men afhænger sandsynligvis af dosis og et skøn er 6-9 dage, baseret på et enkelt veldokumenteret udbrud hos mennesker.

Baggrund, relevans og perspektiv

Foder og Fødevaresikkerhed er blevet kontaktet af Fødevareenhed København, der ønsker hjælp og sparring i forbindelse med et større sygdomsudbrud på en fødevarevirksomhed. Den foreløbige hypotese er, at de smittede medarbejdere er blevet syge af mad fra kantinen. Vi har brug for mere viden om udskillelse, da det kan have betydning for, om virksomheden skal kalde deres fødevarer tilbage.

Ekspertvurdering vedr.:
Generelt om denne parasit (epidemiologi, forekomst i DK, smitteveje), herunder

- Inkubationstid og infektiv dosis
- Udskiller smittede personer sporer, inden klinisk sygdom viser sig og udskiller de tilsvarende sporer efter symptomophør.

Metode, data m.m.

Besvarelse er baseret på review af originallitteratur og enkelte lærebøger.
I diskussionen har vi forsøgt at svare på mere specifikke spørgsmål, baseret på tilgængelige data.

Resultater

E. bieneusi tilhører gruppen af mikrosporidier, som er encellede parasitiske svampe, der tidligere blev

betragtet som protozoer. De er obligat intracellulære og sporedannende parasitter, der forårsager infektion i tarm, og lejlighedsvis galdegange og luftveje, hyppigst i mennesker men også dyr inficeres (Deplazes et al., 2016; Li et al., 2020). Kvæg, svin, får og ged udgør de væsentligste reservoirer blandt husdyr. Infektionen blev påvist relativt hyppigt ved diarre i AIDS-patienter i 80erne, og er siden fundet i stigende grad i forbindelse med ikke-blodig diarre, mavesmerter og vægttab i immunkompetente mennesker, eks. børn, ældre og efter rejse. I det fleste tilfælde vil sygdommen være selvbegrænsende indenfor 1-2 uger, men persisterende tilfælde på flere måneder ses.

Livscyklus, diagnostik og typning
Sporen (0.5 x 1.5 my) er det infektive stadium. Ved optagelse i tarmen inficeres enterocytterne (evt. respiratoriske epithel) ved at sporens indhold (=sporoplasma) skydes ind i cellerne, hvorefter en ukønnet opformering (merogoni) finder sted i cellens cytoplasma, der efterfølges af en sporedannelse. Når cellen er fuld af sporer, ødelægges denne og sporerne kan inficere nye celler eller afgå med fæces.

Diagnostik ved påvisning af sporer i fæces ved almindelig mikroskopi efter farvning og ved fluorescens mikroskopi efter histokemi eller ved anvendelse af MAb. Et kit med MAb skulle være tilgængeligt fra Bordier Affinity Products SA (Switzerland). Hyppigst anvendt og mest sensitiv er real-time PCR (e.g. Verweij et al., 2007). Endvidere kan anvendes serologi, men dette synes ikke særligt udbredt.

Typning foregår ved sekventering af ribosomal ITS fra sporer i fæces (evt. miljø), og det skønnes, at der i dag er over 500 genotyper (Li et al., 2020) mod blot 100 for 10 år siden (Santin & Fayer, 2011). Genotyperne kan groft opdeles i Gruppe 1 med ringe værtsspecificitet og dermed forventet væsentligt zoonotisk potentiale, Gruppe 2 med nogen værtsspecificitet og stigende zoonotisk betydning og Grupperne 3-11 med stærk specificitet og meget begrænset zoonotisk betydning (Li et al., 2020). Typning baseret på andre genetiske markører end ITS er endnu ikke rutine.

Epidemiologi
Smitteveje
Smitte ved oral indtagelse af sporer samt muligvis ved inhalation. Dette kan ske ved kontaminerede fødevarer og vand, men muligvis også ved direkte kontaktsmitte, som erkendt for andre mikrosporidier (Didier et al., 2004). Egentlig evidens for kontaktsmitte med *E. bieneusi* har vi ikke fundet i litteraturen. Zoonotisk smitte er også sandsynlig, bl.a. med baggrund i ovennævnte forekomst af fælles genotyper. Det er således som med *Giardia* sandsynligvis tale om zoonotiske og ikke-zoonotiske genotyper. Samme genotyper af *E. bieneusi* findes i non-human primater som i mennesker: 11.4% af aberne i Kina havde fækal udskillelse og af 16 genotyper tilhørte de 7 zoonotiske grupper (Karim et al., 2014). Infektionen er tidligere overført fra menneske og abe til gnotobiotiske svin (Kondova et al., 1998). Imidlertid fremhæves det i flere nyere reviews og lærebøger, **at der ikke findes evidens, der direkte kæder humane infektioner sammen med infektioner i dyr (Deplazes et al. 2016) eller husdyr (Li et al., 2020)**.

Overlevelse af sporer i miljøet og fødevarer
Sporerne har kitin i den ydre skal og god overlevelse i miljøet (måneder). Sporers infektivitet er vist eksperimentelt efter opbevaring i 2 år i vand ved 4°C (Kondova et al., 1998). Sporer er påvist i grund-, overflade- og spildevand (Dowd et al., 1998; Fournier et al., 2000; Thurston-Enriquez et al., 2002). Siden har mere end 20 videnskabelige artikler rapporteret både formodede zoonotiske og animalske genotyper af *E. bieneusi* i lignende typer vand (Li et al., 2020). Et enkelt studium påviser sporer i vegetabilske fødevarer som bær, spirer m.v. (Jedrzejewski et al., 2007).

Prævalens
Prævalensen er ikke kendt i DK i både dyr og mennesker, og der er os bekendt ikke gennemført screeningsundersøgelser af hverken syge eller raske i denne sammenhæng. I Sverige er der humant

fundet 1 positiv case i et prospektivt studium blandt 417 cases med diarre og 203 kontroller (Svenungsson et al., 2000). Endvidere er der i får fra hele Sverige fundet en høj udskillelse blandt lam og ingen blandt voksne dyr (45% positive; N=109) tilhørende Gruppe 2 (Stensvold et al., 2014). Infektionsrater i andre europæiske studier på husdyr (>30 dyr med eller uden symptomer) omfatter 6.3-15.4% i kvæg, 5.0-93.7% i svin, 0-9.2% i kat og 0.8-8.3% i hund (reviewed i Li et al., 2020).

Humane udbrud
Vi har kun fundet detaljeret beskrivelse af et humant udbrud. Ved et et-dagsmøde på et hotel i Sverige i 2009 blev fundet *E. bieneusi* sporer i fæces i 7 af 11 cases, som ved PCR på ITS blev bestemt type C (Gruppe 1) (Decraene et al., 2012). Opfølgende spørgeskemaundersøgelse fandt, at >100 mennesker blev syge på hotellet og viste symptomer i 6 dage (median; 1-20 dage). Enkelte havde symptomer 3-4 måneder efter, og 3 af 3 personer med vedvarende symptomer udskilte fortsat sporer efter 1 måned. Rå grønsager (agurk fra Spanien, sandsynligvis kontaminerede før høst) blev anset for smittekilde, men ingen fødemidler blev undersøgt pga. den lange inkubation.

Inkubationsperioden er ukendt. I det svenske udbrud blev den gennemsnitlige (median) inkubationsperiode bestemt til 9 dage for alle syge (range 0-21), og 3-15 dage for fire verificerede cases (Decreane et al., 2012). En enkelt person udviklede symptomer samme dag som mødet fandt sted, dvs. inkubation på 8-9 timer, men dette tilfælde var ikke blandt de få verificerede og anden ætiologi kan ikke udelukkes.

Et retrospektivt studie med immunkompetente mennesker med længerevarende diarre og påvist *E. bieneusi* infektion efter rejse i troper viste også persisterende udskillelse af sporer efter ophør af symptomer, og i øvrigt uafhængigt af albendazol behandling (Wichro et al., 2005). Albendazol forventes ikke at have effekt overfor *E. bieneusi*.

Eksperimentel model
I det ovenfor nævnte eksperimentelle studie blev anvendt nyfødte pattegrise podet med 5.000-500.000 sporer (Kondova et al., 1998). Ingen sygdom blev iagttaget, så inkubation ukendt. Immunsupprimerede grise i forsøget havde væsentligt større og tidligere (4-6 dage) sporeudskillelse end ikke-supprimerede (9-12 dage før udskillelse). Udskillelsen fortsatte indtil aflivning; i det seneste tilfælde efter 50 dage.

Referencer
Decraene, V., Lebbad, M., Botero-Kleiven, S., Gustavsson, A.M., Löfdahl, M., 2012. First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. Epidemiology and Infection. 140, pp. 519–527.
Deplazes, P, Eckert, J., Mathis, A., Samson-Himmelstjerna, Gv., Zahner, H., 2016. Parasitology in Veterinary Medicine, Wageningen Academic Publishers.
Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K. and Didier, P.J. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. Veterinary Parasitology. 126, pp. 145–166.
Dowd SE, Gerba CP, Pepper IL. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi, Encephalitozoon intestinalis,* and *Vittaforma corneae* in water. Applied and Environmental Microbiology 1998; 64: 3332–3335.
Fournier S, et al. Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2000; 29: 95–100.
Jedrzejewski S, et al. Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. Applied and Environmental Microbiology 2007; 73: 4071–4073.
Karim MR, Wang R, et al., 2014. Genetic polymorphism and zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi* from nonhuman primates in China. Applied and Environmental Microbiology, 80(6), 1893–1898.
Kondova, I., K. Mansfield, M. A. Buckholt, B. Stein, G. Widmer, A. Carville, A. Lackner, and S. Tzipori. 1998.

Transmission and serial propagation of *Enterocytozoon bieneusi* from humans and rhesus macaques in gnotobiotic piglets. Infect. Immun. 66:5515–5519.

Li, W., Feng, Y., Xiao, L., 2020. Diagnosis and molecular typing of Enterocytozoon bieneusi: the significant role of domestic animals in transmission of human microsporidiosis, Research in Veterinary Science, 2020, 133:251-261

Santin, M., Fayer, R., 2011. Microsporidiosis: Enterocytozoon bieneusi in domesticated and wild animals. Res. Vet. Sci. 90, 363–371.

Stensvold, C.R., Beser, J., Ljungstrom, B., Troell, K., Lebbad, M., 2014. Low host-specific *Enterocytozoon bieneusi* genotype BEB6 is common in Swedish lambs. Vet. Parasitol. 205, 371–374.

Svenungsson B, et al. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. Clinical Infectious Diseases 2000; 30: 770–778.

Thurston-Enriquez JA, et al. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. Journal of Food Protection 2002; 65:378–382.

Verweij JJ, Ten Hove R, Brienen EA, van Lieshout L. Multiplex detection of Enterocytozoon bieneusi and Encephalitozoon spp. in fecal samples using real-time PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007 Feb;57(2):163-7.

Wichro E, Hoelzl D, Krause R, Bertha G, Reinthaler F, Wenisch C. Microsporidiosis in travel-associated chronic diarrhea in immune-competent patients. Am J Trop Med Hyg. 2005 Aug;73(2):285-7. PMID: 16103591.

Diskussion

‣I relation til de specifikke spørgsmål har vi ovenfor besvaret forhold omkring epidemiologi og smitteveje.

- Asymptomatiske smittebærere synes at være almindeligt forekommende i senfasen af infektioner. Udskillelse af sporer vil således med stor sandsynlighed finde sted efter symptomophør. Desværre blev kun symptomatiske tilfælde re-testet for sporer i det svenske udbrud (Decraene et al., 2012).
- Det er også muligt, at infektionsdosis kan være så lav, at kliniske symptomer ikke opstår, men infektionen etablerer sig og dermed medfører langvarig udskillelse af sporer, som iagttaget i svinemodellen (Kondova et al., 1998).
- Hvorvidt der er sporeudskillelse inden de kliniske symptomer, er ikke beskrevet i litteraturen. Ud fra livscyklus virker dette ikke sandsynligt, men afhænger som sagt formodentlig af infektionsdosis.
- Det er sandsynligt, at zoonotisk transmission finder sted, men klar evidens for smitte fra dyr til mennesker findes tilsyneladende ikke.
- Vi har ikke fundet data på forekomst i mennesker eller dyr DK.
- Inkubationstid kendes ikke, men det omtalte svenske udbrud tyder på 6-9 dage
- Mindste infektive dosis kendes ikke, men en dosis på 5.000 sporer etablerede sig, som nævnt, i gnotobiotiske pattegrise (Kondova et al., 1998)
- Risiko for overførsel fra inficerede medarbejdere til en produktion vil afhænge af de hygiejniske forhold og deraf risiko for fækal forurening.

Konklusion og perspektivering

‣ Viden om infektion med *E. bieneusi* er begrænset på grund af, at mange ældre studier behandler microsporidier generelt og muligvis ikke har gennemført egentligt typning. Endvidere er der et væsentligt behov for karakterisering ved flere genetiske markører for at komme tættere på om samme subtyper findes hos mennesker og dyr og derved bedre få belyst det zoonotiske aspekt. Desuden mangler viden om påvisning, forekomst og overlevelse af *E. bieneusi* i fødevarer.