

STRATEGIRAPPORT

2018

STRATEGIMØTE NR 29, 2015

Bakteriologisk fecesdiagnostikk

Programkomité:

Astrid Louise Wester (leder)

Heidi Cecilie Villmones

Trygve Tjade

EKSTERNE KVALITETSVURDERINGER I BAKTERIOLOGI, MYKOLOGI OG
PARASITTOLOGI

Strategimøte nr. 29, 2015

BAKTERIOLOGISK FECESDIAGNOSTIKK

30. oktober 2015, kl. 10.00 – 16.00

Gjestehuset Lovisenberg

Programkomité

Astrid Louise Wester (leder), Heidi Cecilie Villmones, Trygve Tjade

ISSN 0804-8444

Forord

Forord

Det 29. Strategimøte i regi av Referansegruppen for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi handlet om "Bakteriologisk fecesdiagnostikk" og ble avholdt 30.10.2015 i Oslo. På møtet deltok 51 representanter fra landets medisinsk-mikrobiologiske laboratorier.

Ansvarlig programkomité, som også har ferdigstilt denne avsluttende rapporten, var Astrid Louise Wester (leder), Heidi Cecilie Villmones og Trygve Tjade.

Rapporten inneholder en innledende og oppsummerende del som til dels er ført i pennen av programkommiteen i forståelse med forfatterene av innleggene, til dels av forfatterene av innleggene, i tillegg gjengis et gjennomarbeidet sammendrag av forelesernes innlegg med referanser som ble sendt ut til alle deltakere i forkant av møtet.

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

Oslo, 12.07.2017

For Referansegruppen

Martin Steinbakk

Innholdsfortegnelse

PROGRAM	4
DELTAKERE OG OBSERVATØRER	5
KORT SAMMENDRAG OG ANBEFALINGER	7
OVERSIKT OVER BENYTTETE FORKORTELSER	7
PRØVETAKNING OG TRANSPORT - INKLUSIVE VALG AV TRANSPORTMEDIUM	8
DIAGNOSTIKK AV TARMPATOGENE BAKTERIER – METODEVALG OG PANELER.....	9
FECES-PCR/NAAT – METODEUTFORDRINGER OG RAPPORTERINGSRÅD.....	15
UTDYPENDE KAPITTEL OM DIAGNOSTIKK AV TARMPATOGENE <i>E. COLI</i>	17
IDENTIFIKASJON OG RESISTENSBESTEMMELSE.....	27
KONTROLLPRØVER, MSIS-MELDING OG INNSENDINGSPLIKT	30
ANDRE TARMPATOGENE AGENS IKKE YTTERLIGERE OMTALT	32
SEROLOGI	33
ABSTRACTS OG LYSBILDER FRA MØTET	34
PRØVEMATERIALE: KAN REKTALPRØVE ERSTATTE FECESPRØVE?	34
TRANSPORTMEDIER – KAN ETT MEDIUM DEKKE ALLE BEHOV?	36
UTVALG AV TESTER/AGENS	37
DETALJERINGSGRAD AV IDENTIFIKASJON – HVA TRENGER KLINIKER, VI SELV OG ANDRE?	44
IDENTIFIKASJON MED MALDI TOF MS	47
BD PHOENIX VED IDENTIFIKASJON AV TARMPATOGENE BAKTERIAR	51
DYRKNINGSBASERT DIAGNOSTIKK	54
RESISTENSBESTEMMELSE AV ENTEROPATOGENE BAKTERIER - HVILKE OG HVORDAN?	57
METODOLOGISKE UTFORDRINGER FECES PCR-ANALYSER.....	61
VALIDERINGSRESULTATER BRED FECES PCR-BASERT ANALYSE	66
HVILKE POSITIVE FUNN VED DYRKNINGSUAVHENGIGE TESTER SKAL GENERERE DYRKNING MHT EPIDEMIOLOGISK OVERVÅKNING OG SMITTEVERNTILTAK?	69
KONTROLLPRØVER	73
MELDING TIL MSIS AV ATYPISKE EPEC OG PCR ALENE POSITIVE PRØVER.....	74
E. COLI KAPITTELET FRA 2011 – BEHOV FOR NYE ENDRINGER?.....	76
GRADERT SMITTEVERN VED EHEC.....	77
EAE ALENE HOS TARMPATOGENE E. COLI	81
HVILKET DIAGNOSTISK NIVÅ BØR PRIMÆRLABORATORIET HA VS. HVA BØR LIGGE PÅ REFERANSELABORATORIET?.....	84

Program

Tid	Tema	Innleder
10:00	Velkommen og innledning (Dag Harald Skutlaberg, leder Ref-gruppen)	
Del 1: Generelt (møteleder Astrid Wester)		
10:05	Prøvetaking: Kan feces erstattes med rectalprøve?	Truls Leegaard
10:20	Kan ett transportmedium dekke alle behov?	
10:35	Utvalg av tester/agens	
10:50	Detaljeringsgrad av identifikasjon – hva trenger kliniker, vi selv og andre?	Astrid L. Wester
11:00	Automatisert identifikasjon – pitfalls <ul style="list-style-type: none"> • Maldi-tof • Phoenix 	André Ingebretsen Reidar Hjetland
11:20-11:30	Benstrekk	
DEL 2: Dykningsbasert diagnostikk (møteleder Heidi Vilmones)		
11:30	Screening og seleksjon av <ul style="list-style-type: none"> • Salmonella, Shigella, Yersinia, Campylobacter • EHEC/STEC • Andre tarmpatogene E. coli • Andre agens (Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas) 	Dag Harald Skutlaberg
11:50	Resistenstesting – Gjennomføres på hvilke? Rapporteres på hvilke?	Arnfinn Sundsfjord
12:05-12:50	LUNCH	
DEL 3: Nukleinsyrebasert screeningdiagnostikk (møteleder Trygve Tjåde)		
12:50	Funn ved bred PCR-screening vs. dyrkning	Truls Leegaard mfl
13:00	MSIS meldingskriterier	Solveig Jore
13:15	E. coli-diagnostikk: <ul style="list-style-type: none"> - Gradert smittevernrespons EHEC/STEC? - 2011-revidert E. coli kapittel – behov for nye endringer? - <i>eae</i> alene positive prøver – håndtering i lab. 	Astrid L. Wester Astrid L. Wester Nils O. Hermansen
14:15-14:35	Kaffe med noggo attåt	
14:35	Metodologiske utfordringer	Jan Egil Afset
14:50	Dyrkning av PCR-positive prøver	Peter Gaustad
15:05	Kontrollprøver: Dyrkning, PCR eller begge deler?	Jan Egil Afset
15:20	Hvilket diagnostisk nivå bør primærlaboratoriet ha vs. hva bør ligge på referanselaboratoriet?	Astrid L. Wester
15:55	Oppsummering, avslutning (Dag Harald Skutlaberg)	

Deltakere og observatører

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

Aasmund Fostervold
Avd. for medisinsk mikrobiologi,
Stavanger Univ.sjukehus
Helse Stavanger HF,
4068 STAVANGER

Åse Kristiansen
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Anita B. Andreassen
Mikrobiologisk laboratorium,
Sykehuset i Vestfold HF,
3103 TØNSBERG

Lidia Garcia-Augudo
Mikrobiologisk avdeling,
Helse Nordmøre og Romsdal HF,
6407 MOLDE

Angela Kümmel
Avdeling for laboratoriemedisin
Medisinsk mikrobiologi
Sykehuset Levanger
7600 LEVANGER

Kåre Bergh
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
St Olavs Hospital HF,
7030 TRONDHEIM

Peter Gaustad
Først Medisinsk Laboratorium
Søren Bullsvei 25,
1051 OSLO

Geir Kvam
Avdeling for laboratoriemedisin
Medisinsk mikrobiologi
Sykehuset Levanger
7600 LEVANGER

Thea Bergheim
Mikrobiologisk avdeling,
Oslo universitetssykehus Ullevål
0407 OSLO

Nils Olav Hermansen
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

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

Stine Botten Bergom
Avdeling for medisinsk mikrobiologi
Sykehuset Innlandet HF
2629 LILLEHAMMER

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

Irene Høyland Löhr
Avd. for medisinsk mikrobiologi,
Stavanger Univ.sjukehus
Helse Stavanger HF,
4068 STAVANGER

Aina Fortun Borgersen
Mikrobiologisk laboratorium,
Sykehuset i Vestfold HF,
3103 TØNSBERG

Mina Ø. Høie
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
Sykehuset Vestre Viken HF,
Bærum sykehus,
1309 RUD

Maria Mathisen
Avd. for mikrobiologi og smittevern,
Universitetssykehuset Nord-Norge,
Postboks 56,
9038 TROMSØ

Lin Brandal
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Andre Ingebretsen
Mikrobiologisk avdeling,
Oslo universitetssykehus
Rikshospitalet
0407 OSLO

Anne Torunn Mengshoel
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 OSLO

Hanne Brekke
Mikrobiologisk avdeling,
Oslo universitetssykehus Ullevål
0407 OSLO

Pål A. Jenum
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
Sykehuset Vestre Viken HF,
Bærum sykehus,
1309 RUD

Amir Moghaddam
Først Medisinsk Laboratorium
Søren Bullsvei 25,
1051 OSLO

Tine Nilsen Dons
Avdeling for medisinsk mikrobiologi
Sykehuset Innlandet HF
2629 LILLEHAMMER

Solveig Jore
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Nora Elisabeth Nyquist
Avdeling for mikrobiologi og
smittevern,
Akershus Universitetssykehus HF,
1474 LØRENSKOG

Sigrid Rasdal Eliassen Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt, 0403 OSLO	Terese S. Karlsen Avdeling for medisinsk mikrobiologi Vestre Viken HF, Drammen sykehus 3004 DRAMMEN	Nadine Pular Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Sykehuset Vestre Viken HF, Bærum sykehus, 1309 RUD
Andreas Emmert Unilabs Laboratoriemedisin AS 3736 SKIEN	Øyvind Kommedal Avd. for mikrobiologi og immunologi, Helse Bergen HF, Haukeland Universitetssykehus, 5021 BERGEN	Niclas Raffelsberger Avd. for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset Nord-Norge, 9038 TROMSØ
Cathrine Fladeby Mikrobiologisk avdeling, Oslo universitetssykehus Ullevål 0407 OSLO	Martin Steinbakk Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt, 0403 OSLO	Ståle Tofteland Avd. for medisinsk mikrobiologi, Sørlandet sykehus HF, 4604 KRISTIANSAND S
Trond Ranheim Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Akershus Universitetssykehus HF, 1474 LØRENSKOG	Arnfinn Sundsfjord Avd. for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset i Nord-Norge, Institutt for medisinsk biologi, Universitetet i Tromsø, 9038 TROMSØ	Didrik Vestrheim Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt, 0403 OSLO
Malgorzata Richter Mikrobiologisk laboratorium, Haugesund sykehus, 5504 HAUGESUND	Heidi Syre Avd. for medisinsk mikrobiologi, Stavanger Univ.sjukehus Helse Stavanger HF, 4068 STAVANGER	Heidi Cecilie Villmones Mikrobiologisk laboratorium, Sykehuset i Vestfold HF, 3103 TØNSBERG
Per Sandven Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt, 0403 OSLO	Gaute Syversen Mikrobiologisk avdeling, Oslo universitetssykehus Ullevål 0407 OSLO	Astrid Louise Wester Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt, 0403 Oslo
Elisabeth Sirnes Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St Olavs Hospital HF, 7030 TRONDHEIM	Liv Jorunn Sønsteby Mikrobiologisk laboratorium, Haugesund sykehus, 5504 HAUGESUND	Sandra Åsheim Bakteriologisk enhet, Avd. for laboratoriemedisin, Nordlandssykehuset HF, 8092 Bodø
Dag Harald Skutlaberg Avd. for mikrobiologi og immunologi, Helse Bergen HF, Haukeland Universitetssykehus, 5021 BERGEN	Trygve Tjade Først Medisinsk Laboratorium Søren Bullsvei 25, 1051 OSLO	Arne Martin Slåtsve Bakteriologisk enhet, Avd. for laboratoriemedisin, Nordlandssykehuset HF, 8092 Bodø
Fabian Åhrberg Avd. for medisinsk mikrobiologi, Helse Møre og Romsdal HF, Molde sjukehus, 6407 MOLDE		

KORT SAMMENDRAG OG ANBEFALINGER

Oversikt over benyttede forkortelser

Tabell 1. Forkortelser	
Forkortelse	Betydning
aEPEC	Atypiske EPEC. EPEC som mangler bfp-gen
bfp gen	Bundle forming pilus gen
CCDA	Charcoal-Cefoperazone-Desoxycholat-Agar. Selektiv dyrkningsskål for <i>Campylobacter</i> , <i>Arcobacter</i>
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin. Selektiv dyrkningsskål for <i>Yersinia</i> .
CT-SMAC	Sorbitol MacConkey med cefixime og tellurit. Selektiv dyrkningsskål for sorbitolfermenterende EHEC.
CT-verdi	Ved utførelse av real-time PCR, stedet hvor reaksjonskurven krysser terskellinjen. Stedet viser antall sykler som er nødvendig for å få et positivt signal fra prøven.
eae	<i>E. coli</i> attachment effacement gene, gen for intimin adheranse protein
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	Enterohemorragiske <i>E. coli</i>
EHEC-LST	EHEC som har mistet sine toksin-gener
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EMA	European Medicines Agency
EPEC	Enteropatogene <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoksigene <i>E. coli</i>
HUS	Hemolytisk-uremisk syndrom (med nyresvikt)
LSU	Laktose sukrose urea. Selektiv dyrkningsskål for <i>Salmonella</i> og <i>Shigella</i> /EIEC, <i>Aeromonas</i> , <i>Plesiomonas</i>
Lt gen	Varme-labil enterotoksin gen
MAC	MacConkey. Dyrkningsskål for tarmpatogene bakterier, ikke <i>Campylobacter</i> og noen <i>V. cholerae</i> serotype O1.
NAAT	Nucleic Acid Amplification Test. PCR eller annen molekylær metode med amplifikasjonstrinn
SF	Sorbitolfermenterende
SMAC	Sorbitol MacConkey. Semi-elektiv dyrkningsskål for sorbitolfermenterende EHEC
SSI-Enteric	Statens Serum Institutt's selektive skål for <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> /EIEC, <i>Aeromonas</i> , <i>Plesiomonas</i>
St gen	Varme-stabilt enterotoksin gen
STEC	Shigatoksinproduserende <i>E. coli</i>
Stx1 gen	Shiga toksin 1 gen
Stx2 gen	Shiga toksin 2 gen
TCBS	Thiosulfat Citrate Bile Salt Sucrose. Selektiv dyrkningsskål for <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> og <i>Plesiomonas</i>
tEPEC	Typiske EPEC. EPEC som har både eae og bfp gen som til sammen koder for et sykdomsfremkallende protein
XLD	Xylose lysin desoxycholat agar. Selektiv dyrkningsskål for <i>Salmonella</i> og <i>Shigella</i> /EIEC

Prøvetaking og transport - inklusive valg av transportmedium

Prøvetaking: rektalpensel versus fecesprøve

Rektalprøve vil ha klare fordeler fremfor en fecesprøve. Den kan tas på et legekontor eller i en seng i sykehus (økt frekvens av levert prøve når indisert, raskere forsendelse til laboratorium) og gir enklere prøvebehandling og standardisering av videre prosesser. I tillegg kan man anføre at slik prøve er enklere å ta og enklere å prosessere i laboratoriet. For PCR-påvisning av tarmpatogene bakterier synes rektalprøve å være like bra som fecesprøve, men dokumentasjonen for at dyrkningen går like bra, er mer usikker. Rent vitenskapelig er det derfor ikke godt nok grunnlag til å endre praksis, og optimalt sett bør en studie designes hvor man sammenlikner den diagnostiske sensitiviteten ved bruk av to prøvematerialer. Imidlertid anses fordelene ved rektalprøve likevel så tungveieende at det åpnes for følgende pragmatiske holdning:

Fecesprøve er eneste prøvemateriale som har god vitenskapelig dokumentasjon for både dyrkningsbasert og PCR-basert feces-diagnostikk, inklusive dyrkning fra PCR-positive prøver. Imidlertid fører totalvurderingen av praktiske hensyn og gode erfaringer med bruk av rektalpensel til at rektalpensel med synlig avføring likestilles med feces-prøve.

Transportmedier

Vitenskapelig dokumentasjon for at det er betydningsfull forskjell på de ulike tilgjengelige transportmediene er sparsom, men det som fins, tyder på at ulike feces-transportmedier, gitt optimale transportforutsetninger, fungerer like godt. Erfaring tilsier at Cary Blair, modifisert Cary-Blair og flytende Amies (eks. FecalSwab eller ESwab) er gode. For mikroskopi med hensyn på parasitter trengs fortsatt feces uten tilsetning eller med preserveringsmiddel (f. eks formalin).

Anbefaling: Cary Blair, modifisert Cary Blair og flytende Amies medium kan benyttes både til dyrkning av bakterier og PCR-påvisning av bakterier, virus og parasitter. For direkte mikroskopi med hensyn på parasitter må man fortsatt benytte feces uten tilsetning. Merk at tillaging av (permanent) fargede preparater krever preserveringsmiddel (varierer med fargemetode).

Diagnostikk av tarmpatogene bakterier – metodevalg og paneler

I en årrekke har norske medisinsk-mikrobiologiske laboratorier utført dyrkningsbaserte analyser med hensyn på tarmpatogene bakterier. Smittevernråd er basert på resultater funnet ved denne metoden. Flere laboratorier har i løpet av de siste årene gått over til bred PCR-basert diagnostikk, som også inkluderer tarmparasitter og virus. Det fins kommersielle kit, noen benytter in-house PCR-metoder, og utvalget av markør-gener varierer. Begrunnelsene for et slikt skifte i metodeplattform har vært en kombinasjon av antatt økt sensitivitet for flere agens, raskere påvisning, mindre hands-on tid per prøve i laboratoriet. I tillegg åpner dette for en mer målrettet dyrkning (av PCR-positive prøver). Beregninger utført ved noen av de større laboratoriene viser at totalkostnaden ved de to strategiene er omtrent på samme nivå. Sensitiviteten for påvisning av virus og parasitter med nukleinsyretester er antakelig svært mye høyere enn proteinbaserte tester for virus eller mikroskopi av tarmparasitter. **Samlet taler dette for at alle laboratorier bør basere seg på en bred PCR-basert diagnostikk med påfølgende målrettet dyrkning av bakterier for identifikasjon og folkehelserettede analyser ved PCR-positivt resultat.**

Betydning av kliniske opplysninger

Ved dyrkningsbasert diagnostikk kan det være hensiktsmessig å etablere ulike prøve-pakker avhengig av klinisk sykdomsbilde og alder. Ved PCR-basert diagnostikk er dette mindre hensiktsmessig.

Reiseinformasjon, immunstatus og utbruddssituasjon vil alltid være av betydning da dette kan fordre utvidede undersøkelser som ikke inngår i standard-panel. Se nedenfor.

Standardpanel ved bred PCR-basert diagnostikk av tarmpatogene bakterier.

Utvalget av agens-markører inkludert i kommersielle kit og i in-house PCR tar sikte på å dekke de vanligst forekommende agens. Når det gjelder ETEC, er det foreløpig bare noen få laboratorier som har inkludert markører for denne bakterien. I forrige strategirapport ble ETEC omtalt som lite aktuell å teste for. Miljøet åpner nå for diagnostikk også av ETEC, kanskje spesielt ved utbruddsopklaring og hos immunsvekkede pasienter med diaré hvor øvrige undersøkelser er negative.

Tabell 2. Standardpanel ved bred PCR-basert diagnostikk		
Bakterier	Virus	Parasitter
<i>Campylobacter</i>	Norovirus	Cryptosporidier
<i>Salmonella</i>	Sapovirus	Giardia lamblia
<i>Shigella</i> /EIEC	Rotavirus	Entamoeba histolytica
<i>Yersinia</i>	Adenovirus	
EHEC		
EPEC		
ETEC		

Det ble ikke full enighet om dette bør rekvireres som 3 separate analysepakker (bakterier, virus og parasitter) og som rekvirenten velger mellom, eller om alle de 3 «pakkene» alltid bør settes opp.

Mange mente at man ikke bør lete etter protozoer av usikker patogen betydning. Ved en slik strategi vil mikroskopi bare være indisert når det spørres etter andre sykdomsfremkallende protozoer enn de som omfattes av PCR-analyse, og ved klinikk som gir mistanke om infeksjon med helminter.

Standardpanel ved dyrkningsbasert diagnostikk

- *Campylobacter*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Yersinia*

Indikasjon og metodevalg for undersøkelse på EHEC og EPEC, se eget kapittel.

Panel ved reiser til tropiske/sub-tropiske områder

Reise til tropisk område med tilknytning til sjø (bading, inntak av sjømat). Vurdere tillegg av:

- *Vibrio cholerae* (risvannliknende diaré)
- *Vibrio non-cholerae*
- *Aeromonas*
- *Plesiomonas*

Ellers vurdere tarmpatogene *E. coli* og parasitter, se bred PCR-basert diagnostikk.

Panel ved kjent immunsvikt

Utredning av kronisk diarétilstand ved negativ bred PCR-basert diagnostikk, vurder også:

- *Plesiomonas*
- *Aeromonas*
- Ikke-cholera *Vibrio*
- *Arcobacter*
- *Mycobacterium tuberculosis* og andre mykobakterier
- Microsporidier

Panel ved utbrudds-oppklaring

Det anbefales at prøver fra de første pasientene undersøkes med en bred diagnostikk som innbefatter vanlige tarmpatogene agens, både bakterier, virus og parasitter. Etter at etiologi er klarlagt og dersom man er sikker på at prøvene fra de neste pasientene kommer fra samme utbrudd, anses det ikke som nødvendig å undersøke flere prøver fra dette utbruddet. Men det må vises smidighet, og et samarbeid med smittevern er sentralt.

Følgende agens bør være dekket:

Førstelinje-diagnostikk bør dekke

- *Campylobacter*
- *Salmonella*
- *Yersinia*
- *Shigella*
- EHEC
- EIEC
- EPEC
- ETEC
- Adenovirus
- Norovirus og evt. Sapovirus
- Rotavirus
- Giardia
- Cryptosporidium

Videre på indikasjon: *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio* spp. (inntak av sjømat, opphold i tropiske områder)

Det har vært liten tradisjon for å undersøke feces fra pasienter med hensyn på **bakterier eller bakterietoksiner som gir såkalt matforgiftning**. I henhold til [Helsedirektoratets oversikt over nasjonale medisinsk-mikrobiologiske referansefunksjoner](#) har

- MatMikroLab ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) referansefunksjon for påvisning av [Bacillus cereus-toksin](#) og [Clostridium perfringens \(selve bakterien\)](#)
- Veterinærinstituttet for påvisning av [Stafylococcus aureus toksin](#).

Imidlertid oppgis det på laboratorienes nettsider at analysene gjelder for påvisning i mat.

Dyrkningsmedier og inkubasjon når dyrkning er startpunkt

De siste årene er det kommet flere nye dyrkningsmedier, inklusive kromogene agarskåler. Imidlertid er det ikke fremkommet overbevisende dokumentasjon som tilsier at de godt utprøvde selektive dyrkningsmediene bør skiftes ut. Dette gjelder både faste medier og buljong-baserte medier. Kromagarer kan imidlertid benyttes som støtte for andre medier, for eksempel ved utbrudd med stamme som er kjent at lar seg detektere med slik skål. På møtet ble det i liten grad diskutert hvilke medier som skal anbefales.

Anbefaling: hovedanbefalingene vedrørende dyrkningsmedier og inkubasjon fra Strategimøte nr. 10 1996 opprettholdes, for oversikt se tabell 3. På neste side er det inkludert noen ytterligere medier og agens, og gruppert med utgangspunkt i mikrobe.

Tabell 3. Medietyper og inkubasjon								
Medie-type	Ikke-selektiv	Diff. medium	Selektiv Salm/Shig/Yers	Selektiv Yersinia	Selektiv Camp	Anrikn. Salm.	Anrikn. Salm/Shig	Anrikn. Yers
Medier for primærutsæd	Lactose/Blåskål*	LSU og XLD	Deoxy-cholat citrat	CIN	CCDA	Tetra-thionat	Evt. Selenitt	Evt. Selenitt
Inkubasjon	37°C Ca. 24 timer			29°C 24-48t	42°C Mikro-aerob 24-48 timer	37°C Ca. 24 timer		22°C Ca. 24 timer
Medier til utsæd fra buljong/ Sekundærarbeide	Lactose/blåskål + LSU				CCDA	Lactose* + deoxy-cholatcitrat		CIN
Inkubasjon	37°C Ca. 24 timer				37°C, ca. 24 t, mikroaerob anaerob aerob	37°C Ca. 24 timer		

*Vekstkontroll: hvis ingen vekst ved primærutsæd, bør dette kommenteres i prøvesvaret

Campylobacter: CCDA: 41-42 °C i mikroaerob atmosfære i 32-48 timer (evt. 35-37 °C – mindre selektivt)

Salmonella: Evt. Selenitt-buljong + XLD/LSU/SSI-Enteric + MacConkey: 35 °C i 16-24 timer

Shigella/EIEC: Evt. Selenitt-buljong + XLD/LSU/SSI-Enteric + MacConkey: 35 °C i 16-24 timer

EHEC/EPEC: Evt. MacConkey-buljong + MacConkey: 35 °C i 16-24 timer

ETEC: Ikke omtalt på strategimøtet. Ved det laboratoriet som foreløpig har størst erfaring med selektiv dyrkning ved positiv ETEC-markør, oppgis det at man benytter Oxoid Brilliance UTI, hvor *E. coli* fremtrer som rosa kolonier, som så spres til McConkey agar før bekreftende PCR.

Yersinia: CIN: 30 °C i 16-24 timer - 48 timer

Vibrio: TCBS 35-37 °C 16-24 timer

Plesiomonas/Aeromonas: SSI-Enteric/LSU (evt. XLD) + MacConkey 35 °C i 16-24 timer

Arcobacter og Campylobacter fetus: CCDA: 35-37 °C i mikroaerob atmosfære 32-48 timer

Aktuelle anrikningsbuljonger

Selenittbuljong foretrekkes nå av de fleste for å øke sensitiviteten med tanke på *Salmonella* og *Shigella*: 35 - 37 °C i 18-24 t – deretter utsed til differensialmedier. Selenitt reduserer andre tarmbakterier som *E. coli*.

Kan også brukes til anrikning av *Yersinia*: 22-28 °C i 18-24 t (sjelden behov, *Yersinia* vokser første uke også i Cary-Blair transportmedium både i kjøleskap og romtemperatur)

Tetrathionat buljong m/ jod-jodkalium: kan legges til for ytterligere økt sensitivitet med tanke på

Salmonella: 36-37 °C i 18-24 t, med sekundær utsed til SSI-Enteric + MacConkey agar.

MacConkeybuljong øker sensitivitet av EHEC/EPEC undersøkelser

Sterkt selektive medier som brilliantgrønn eller bismut sulfitt anbefales ikke til rutinebruk, men kan brukes ved utbrudd av *Salmonella* Typhi.

Dyrkningsverifikasjon av positivt PCR-funn

Dyrkning er nødvendig for å identifisere tilstedeværelse av levende patogene bakterier og for å identifisere serovar/serogruppe assosiert med sykdom, for resistensbestemmelse, samt molekylære type-bestemmelser med henblikk på epidemiologi.

Innsendingsplikten er presisert i MSIS-forskriftens paragraf 2-4a (Innsendingsplikt for smittestoff og prøvemateriale):

Mikrobiologiske laboratorier som undersøker prøver av human opprinnelse, skal sende smittestoff eller prøvemateriale til relevant laboratorium med nasjonal referansefunksjon i medisinsk mikrobiologi etter dets nærmere angivelser.

Hovedhensikten i denne paragrafens formuleringer er nettopp å sikre at det i de tilfeller hvor referanselaboratoriet angir å få tilsendt smittestoff som er påvist (inklusive ved PCR), har primærlaboratoriet plikt til – der det er mulig utfra bakteriens egenskaper - å dyrke og isolere før sending til referanselaboratoriet¹.

Det har skjedd en betydelig utvikling i metodene siden forrige strategirapport som innebærer mer bruk av MALDI-TOF/automatiserte metoder og molekylærgenetiske teknikker og kanskje en utvikling i retning mindre behov for biokjemiske enkelttester og agglutinasjon.

Erfaringen fra flere laboratorier er at dyrkningsverifikasjon er vanskelig ved høy CT-verdi (få mikrober i prøven).

Strategimøtet kom ikke frem til noen entydig konklusjon når det gjelder dyrkningsverifikasjon av positive *Campylobacter* DNA-funn². Dyrkning for resistensbestemmelse er nødvendig ved alvorlig klinikk hos innlagte pasienter. Dyrkning er også nødvendig for å kunne gjøre molekylær typing ved mistanke om utbrudd. Vi minner om at det ved utbrudd skal sendes representative *Campylobacter* isolater til Referanselaboratoriet for tarmpatogene bakterier. Referanselaboratoriet ønsker også at alle blodkulturisolater av *Campylobacter*, samt isolater fra pasienter med annen svært alvorlig klinikk, sendes inn for typing og definitiv species-identifikasjon. Utover dette gjør referanselaboratoriet resistensbestemmelse på isolater som er innsendt som ledd i resistensovervåkingen i NORM.

¹ Det vil altså si at hvis referanselaboratoriet ber om isolat av et gitt bakteriespesies, har primærlaboratoriene ikke anledning til å velge vekk fremdyrkning av isolat ved positiv PCR. Denne plikten spesifiseres av referanselaboratoriet, og vil ikke nødvendigvis sammenfalle med MSIS-meldingskriteriene.

² De fleste NAAT-analyser benyttet ved primærlaboratorier skiller ikke mellom ulike *Campylobacter*-arter.

Tabell 4. Oversikt over alternative dyrkningsmedier for selektiv isolering av tarmpatogene bakterier.								
Agens	XLD	LSU	SSI-E	MAC/lactose/blåskål*	CIN	CCDA	TCBS	SMAC
<i>Campylobacter</i>				X		x		
<i>Salmonella</i>	x	x	x	X				
<i>Shigella</i> /EIEC	x	x	x	X				
EHEC/EPEC				X				(x)
<i>Yersinia</i>				X	x			
<i>Vibrio</i>				X			x	
<i>Plesiomonas</i>	(?)	x	x	X			x	
<i>Aeromonas</i>	(?)	x	x	X			x	
<i>Arcobacter</i>				X		x		

*) Med som vekstkontroll

XLD: Xylose lysin desoxycholat agar – *Salmonella* og *Shigella*/EIEC

LSU: Laktose sukrose urea – *Salmonella* og *Shigella*/EIEC, *Aeromonas*, *Plesiomonas*

SSI-Enteric (Statens Serum Institut) - *Salmonella* og *Shigella*/EIEC, *Aeromonas*, *Plesiomonas*

MAC/MacConkey (eller laktose-skål) – alle tarmpatogene *Enterobacteriaceae* vokser på MacConkey unntatt enkelte *V. cholerae* serotype O1.

Sorbitolskålen (SMAC= Sorbitol MacConkey, og CT-SMAC= med tillegg av cefixime og tellurit) har mistet mye av betydningen ved diagnostikk på tarmpatogene *E. coli* p.g.a. økende forekomst av sorbitolfermenterende stammer, kanskje særlig EHEC O157: H-, som i tillegg kan være følsom for tellurit. Skålen kan imidlertid være aktuell ved utbrudd med «klassisk» sorbitol-negativ O157-stamme eller ved kontrollprøve hos pasient med tidligere påvist slik stamme.

CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin) – *Yersinia*

CCDA (Charcoal-Cefoperazone-Desoxycholat-Agar) – *Campylobacter*, *Arcobacter*

TCBS (Thiosulfat Citrate Bile Salt sucrose) – *Vibrio*, *Aeromonas* og *Plesiomonas*

Selektive kromskåler: Må valideres før bruk.

Feces-PCR/NAAT – metodeutfordringer og rapporteringsråd

Metodologiske utfordringer

Valg av NAAT/PCR-metode

På grunn av krav om CE-merking og kvalitetskontroll av diagnostiske metoder vil det for de fleste laboratorier være mest naturlig å satse på en kommersiell metode. Ved valg av leverandør må det vurderes hvilke agens en ønsker å etablere molekylær diagnostikk for siden ulike kommersielle metoder kan ha noe ulike testpaneler. I tillegg er det viktig å være klar over om de enkelte kit skiller mellom ulike relevante varianter av gen, for eksempel *stx1* versus *stx2*, *lt* versus *st*, etc.

Dersom en ønsker å satse på in-house metodikk, f.eks. basert på publiserte NAAT/PCR-metoder, må det velges mest mulig konservative målsekvenser hos de aktuelle tarmpatogene bakterier slik at ikke genetisk polymorfisme vil hindre påvisning (gi falskt negativt resultat). Det vil også generelt være ønskelig å satse på kromosomalt lokaliserte målsekvenser siden disse normalt er mer stabile enn plasmidlokaliserede sekvenser. Likevel vil det for flere tarmpatogene bakterier være nødvendig å benytte målsekvenser lokalisert i plasmider fordi art, patotype eller bakteriens virulens er definert på grunnlag av plasmidlokaliserede virulensgener.

Forbehandling

Kommersielle tilbydere anbefaler gjerne en spesifikk forbehandling og ekstraksjon for egen NAAT/PCR-metode. Men det er ikke gitt at deres anbefalte metodikk gir optimalt resultat. Ingen forbehandlings- og ekstraksjonsmetode vil være optimal for alle typer tarmpatogene bakterier (ulik cellevegg hos Gram-positive og Gram-negative bakterier), og i tillegg må en ta hensyn til virus og parasitter dersom en også ønsker å bruke ekstraherte nukleinsyrer fra prøven for analyse av slike agens. I tillegg vil forbehandling måtte tilpasses den type ekstraksjonsinstrument en vil benytte.

Til forbehandling benyttes gjerne ulike kombinasjoner av koking, mekanisk knusing med kuler, bruk av lysisbuffer og frysing/tinging. Alle som vil etablere NAAT/PCR-basert diagnostikk anbefales å kontakte andre laboratorier som allerede har etablert slik metodikk for å kunne høste av deres erfaringer. Laboratoriene må gjøre egen validering av valgt metode.

Behov for anrikning

Anrikning i Selenitt-buljong gir økt sensitivitet mht *Salmonella* og anrikning i MacConkey buljong gir økt sensitivitet med hensyn til EHEC. Valg av anrikningsmedium kan imidlertid være problematisk fordi selenitt-buljong er godt egnet til anrikning av *Salmonella*, men hemmer veksten av *E. coli*. MacConkey buljong angis også å skulle være egnet til anrikning *Salmonella*, men gir lavere bakteriekonsentrasjon enn Selenittbuljong. For de fleste vil det være u hensiktsmessig å benytte to ulike anrikningsbuljonger, så en må da velge hva som anses mest viktig. Det finnes også andre anrikningsbuljonger. En ulempe ved bruk av anrikningsbuljong er at svartiden blir forlenget.

Leverandører av kommersielle kit anbefaler vanligvis ikke bruk av anrikningsbuljong.

Inhibisjon-interkontroller

Avføring inneholder mange faktorer som kan hemme DNA-polymerasen. Det er viktig å benytte interkontroller som kan identifisere prøver hvor PCR-reaksjonen hemmes.

Veiledning for besvarelse av bred NAAT/PCR-basert analyse

I de fleste tilfeller vil funn av et gen være ensbetydende med påvisning av en bestemt bakterieart. Men gener lokalisert i mobile genetiske elementer kan finnes i ulike bakteriearter. For eksempel vil funn av *stx* og *eae*-gener kunne bety at det finnes en EHEC med *stx* og *eae* i prøven. Men det kan også være at *stx*-genet er fra en fri bakteriofag eller fra en annen bakterie enn *E. coli*, eller at *stx* og *eae* finnes i ulike *E. coli*. I slike tilfelle vil det være viktig å kunne verifisere funnet av virulensgener i renkultur av *E. coli*. **Ved besvarelse er det viktig å presisere om NAAT-analysen er utført på blandingsflora eller om en har funn i renkultur.**

Utdypende kapittel om diagnostikk av tarmpatogene *E. coli*

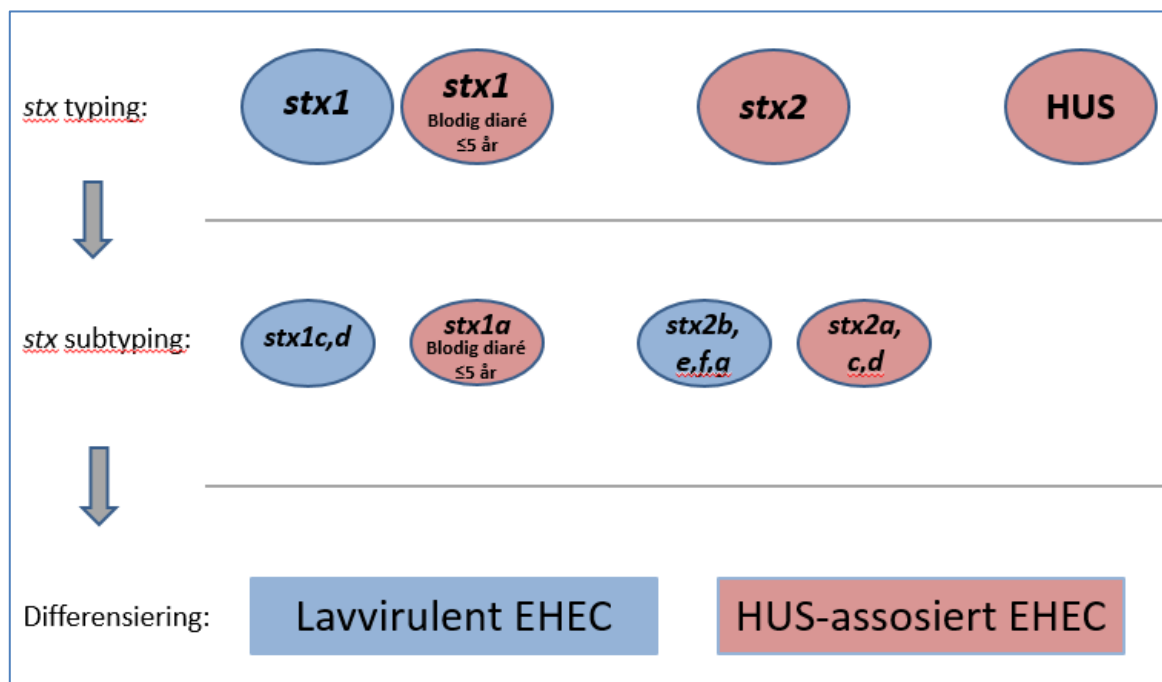
EHEC

Infeksjon forårsaket av EHEC kan gi ulik sykdomsutvikling og alvorlighetsgrad. Det kliniske bildet kan variere fra et asymptomatisk forløp eller ukomplisert diaré til alvorlige tilfeller med massiv blodig diaré. I 10-15 % av tilfellene, særlig hos barn, eldre og immunsupprimerte, kan infeksjonen føre til hemolytisk-uremisk syndrom (HUS) som kan være dødelig. Sannsynligheten for at infeksjonen kompliseres med HUS er primært avhengig av bakteriens virulensprofil, men også av vertsfaktorer som alder og immunrespons.

Basert på ny kunnskap og oppsamlet erfaring, differensierer Folkehelseinstituttet EHEC som HUS-assosiert og lavvirulent EHEC (figur 1).

- **HUS-assosiert EHEC** defineres som EHEC isolert fra HUS-pasient (uavhengig av virulensprofil), EHEC med *stx2a*, *stx2c* og *stx2d* eller EHEC med *stx1a* isolert fra barn ≤ 5 år med blodig diaré. I helt spesielle tilfeller, ut i fra klinisk, mikrobiologisk og epidemiologisk begrunnelse, kan en *eae*-positiv *E. coli* der man ikke finner shigatoksiner bli klassifisert som HUS-assosiert EHEC etter analyse ved referanselaboratoriet (se kapittel om EPEC/*eae* positive *E. coli*). I de få tilfellene der det er aktuelt, vil dette bli kommunisert til aktuell kommuneoverlege.
- Andre EHEC enn de nevnt over defineres som **lavvirulente EHEC**.

Pasienter med HUS-assosiert EHEC anbefales en annen oppfølging enn pasienter med lavvirulent EHEC ([Smittevernveilederens kapittel kontroll og oppfølging av pasienter med tarminfeksjoner](#)). For utdypende informasjon om definisjoner og råd om smittevern, se kapittelet om [E. coli-enteritter](#).



Figur 1. Laboratoriebaset differensiering av EHEC i **lavvirulente** og **HUS-assosierte**. I helt spesielle tilfeller, ut i fra klinisk, mikrobiologisk og epidemiologisk begrunnelse, kan en *eae*-positiv *E. coli* der man ikke finner shigatoksiner bli klassifisert som HUS-assosiert EHEC (se kapittel om EPEC/*eae*-positive *E. coli* under).

Indikasjoner for undersøkelse på EHEC

(uendret fra 2011-versjonen)

1. Ved kliniske symptomer:

A) Sterk anbefaling³ (basert på god vitenskapelig dokumentasjon som har støtte i norsk epidemiologi og erfaring):

- **Klinisk HUS**, mulig eller sannsynlig; alle aldre
- **Blodig diaré**; alle aldre
- **Diaré hos barn under skolealder (≤ 5år)**

B) Moderat anbefaling (basert på utenlandske studier med sannsynlig relevans for norske forhold):

- Sannsynlig **infeksjonsutløst diaré hos**
 - sykehjemspasienter (økt risiko for død ved EHEC-infeksjon)
 - sterkt immunosupprimerte pasienter (økt mottakelighet for smitte)
 - personer i smitterisikogruppe 1 (personer i næringsmiddelvirksomhet eller som håndterer mat som skal serveres rå eller uten ytterligere oppvarming, inklusive barnehageansatte som håndterer mat) (økt risiko for smittespredning via mat)

C) Svak anbefaling (basert på risikovurdering)

- Sannsynlig **infeksjonsutløst diaré hos**
 - personer som kan ha vært utsatt for laboratorieassosiert smitte med EHEC
 - personer (eks. bønder, veterinærer) som har hatt kontakt med drøvtyggere

2. Ved smitteoppsporing (rundt et tilfelle med HUS-assosiert EHEC, eller ved utbrudd med HUS-assosert EHEC eller lavvirulent EHEC): se [Smittevernveilederens kapittel om E. coli-enteritter](#)

- Ved oppsporing rundt et foreløpig **enkelttilfelle** er det indikasjon (fra laboratoriet sitt ståsted) for å undersøke feces (uavhengig om diaré eller ikke) hos personer som oppgis å ha epidemiologisk link til tilfellet
- Ved oppsporing i et **begrenset utbrudd**, for eksempel i en barnehage eller et sykehjem, vil indikasjonen fortsatt være epidemiologisk link til et tilfelle i utbruddet
- Ved et **nasjonalt utbrudd**
 - Hovedregelen bør fortsatt være epidemiologisk link
 - Ved svært alvorlig nasjonalt utbrudd, kan i tillegg «flat-screening» av alle med diaré gjennomføres i en begrenset tidsperiode. Dette siste må anses å være en mikrobiologisk «unntakstilstand». En slik avgjørelse bør tas sentralt, etter nøye vurdering

Laboratorie-diagnostikk av EHEC

PCR-basert analyse for *stx1*, *stx2* og *eae* med påfølgende dyrkning og bekrefelse av gen-funn i isolat anses som nødvendig for god EHEC-diagnostikk, alternativt EIA-basert shigatoksin-test. Sistnevnte antas imidlertid å ha betydelig lavere sensitivitet. Fordi shigatoksin-egenskapen kan mistes, kan ikke sistnevnte type tester anses som tilstrekkelig ved alvorlig klinikk hos enkeltpasient eller ved utbrudd med HUS-assosiert EHEC. Ved lav CT-verdi, tilsier erfaringen at spredning av ca. 5 kolonier er tilstrekkelig. Ved høy CT-verdi (protokoll-avhengig) er sannsynlighet for å lykkes med isolering lav. Innsending av blandingskultur til referanselaboratoriet er kun indisert i helt spesielle tilfeller (se tabell 5). Anbefalinger for håndtering av EHEC og *eae*-positiv *E. coli* i primærlaboratoriet er angitt i tabell 5.

³I henhold til Helsedirektoratets ”Retningslinjer for retningslinjer” (IS 2653, fra 2002) foreslås at anbefalingers styrke angis i ”sterk”, ”moderat” eller ”svak”. Dette handler om den vurderingen av kvaliteten og relevansen på den vitenskapelige dokumentasjonen og ikke om hvor sterkt ønsket er om at praksisen skal etterfølges. angis i ”sterk”, ”moderat” eller ”svak”.

Tabell 5. Håndtering i primærlaboratorier av EHEC og eae-positive E. coli. Melding til MSIS og smittevernråd.							
Funn og situasjon	Klinikk	Initial håndtering i primærlaboratoriet					Smittevernråd når svar fra Referanselaboratoriet foreligger
		Isolere & agglutinere	Sende ref.lab.		MSIS-melding	Smittevernråd til risikogrupper ²	
			Ren	Blanding ¹			
stx1 Index	Diaré	+	+	-	+	-	-
	Blodig diaré	+	+	-	+	≤5 år	Opprettholde når <i>stx1a</i> Nedjustere når <i>stx1c, d</i>
	HUS	+	+	+ ¹	+	+	+
stx1 Smitteoppsporing eller utbrudd	Index m/HUS, eller barn ≤5 år med blodig diaré	+	+	-	+	+	Opprettholde når lik index-stamme, ellers ny vurdering mht smittevernråd
stx2	Uavhengig av klinikk og situasjon	+	+	+ ¹	+	+	Opprettholde ved <i>stx2a, c, d</i> Nedjustere ved <i>stx2b, e, f, g</i>
eae alene Index	Diaré > 5 år	-	-	-	-	-	-
	Diaré ≤ 5 år ³	+	+	-	+	-	Igangsette når EHEC-LST ⁴
	Blodig diaré > 5 år	-	-	-	-	-	-
	Blodig diaré ≤ 5 år	+	+	-	+	+	Igangsette når EHEC-LST ⁴
	HUS	+	+	+ ¹	+	+	+
eae alene: Smitteoppsporing eller utbrudd	Index m/HUS-assosiert EHEC	+	+	-	+	+	Opprettholde når lik index-stamme, ellers ny vurdering mht smittevernråd
	Index m/HUS	+	+	+ ¹	+	-	Hvis lik index

¹Blandingskultur skal sendes inn til Referanselaboratoriet kun i spesielle tilfeller der renkultur med aktuelle karakteristika ikke har latt seg isolere ved spredning av 5-10 E. coli

²I henhold til [Smittevernveilederens kapittel om kontroll og oppfølging av pasienter med tarminfeksjoner](#), avsnitt om risikogrupper, kontrollprøver og prøveintervaller

³Indikasjon for undersøkelse er barn ≤5 med langvarig diaré, diaré etter opphold i U-land eller utbrudd i barnehage/barneavdeling

⁴Angitt i [Smittevernveilederens kapittel om om E. coli-enteritt \(inkludert EHEC-infeksjon og HUS\)](#) at eae-alene positiv E. coli stamme i helt spesielle tilfeller kan bli klassifisert som HUS-assosiert EHEC etter analyse ved referanselaboratoriet. I de få tilfellene der det er aktuelt, vil dette bli kommunisert til primærlaboratoriet og håndtert deretter, i samråd mellom FHI og ansvarlig smittevernlage.

Vurdering av Shigatoksin-tester (fra 2011-revisjonen)

Påvisning av toksin ble opprinnelig utført ved påvisning av toksisk effekt på Vero-celler, men denne metoden er i dag knapt i bruk i klinisk mikrobiologi. I stedet benyttes varianter av ELISA-tester, agglutinasjonstester eller immunkromatografiske hurtigtester for påvisning av toksinene Stx1 og Stx2. Noen tester skiller ikke mellom de to toksinene, mens andre gjør det. I USA er slike tester anbefalt primært (1), da PCR ikke er FDA-godkjent.

Følgende kommersielle kits synes å være aktuelle:

Kit	Produsent	Kommentar
Premier EHEC	Meridian Diagnostics, Inc. (Cincinnati, Ohio)	ELISA-format. På buljong. Skiller ikke mellom Stx1 og 2.
ImmunoCard STAT! EHEC	Meridian Diagnostics, Inc. (Cincinnati, Ohio)	Hurtigtest (kort) på kolonier eller buljong Skiller mellom Stx1 og 2.
VTEC Screen "Seiken"	Denka Seiken (Japan)	På isolat. (kolonistrøk). Agglutinasjon på mikrotiterplate. Skiller ikke mellom Stx1 og 2, men produsenten leverer også tilleggstester til bruk på kolonier.
rBiopharm Ridascreen Verotoxin Enzyme Immunoassay	R-Biopharm AG, (Darmstadt, Tyskland)	ELISA-format. På buljong. Skiller ikke mellom Stx1 og 2.
ProSpecT Shiga Toxin E. coli Microplate Assay	Remel (Lenexa, Kansas)	ELISA-format. På buljong. Skiller ikke mellom Stx1 og 2.
DuoPath Verotoxin test	Merck (Tyskland)	På kolonier subkultivert fra buljong. Hurtigtest (kort). Skiller mellom Stx1 og 2.

Noen av testene kan utføres direkte på fæces, men generelt anbefaler produsentene at prøvene inkuberes 16-24 t i en anrikningsbuljong før testing for økt sensitivitet.

Sensitivitet og spesifisitet Shigatoksin-tester (fra 2011-revisjonen)

Det er publisert en rekke studier av disse testene, men beregning av sensitivitet og spesifisitet er i stor grad basert på studier av bakteriestammer i renkultur, på sammenligninger med andre hurtigtester, eller på dyrkning kombinert med ulike teknikker, og finner sensitivitet og spesifisitet i størrelsesorden 90-100 %. Vi finner bare tre studier som systematisk sammenligner slike tester med PCR i klinisk prøvemateriale; Beutin 2002 (2), Pulz 2003 (3) og Grif 2007 (4). Oppgitt sensitivitet for hurtigtester i disse studiene varierer mellom 61% og 95%, og spesifisitet mellom 46% og 99,4%. Det kan synes som om visse toksin-undertyper er vanskeligere detekterbare enn andre. Det er også en praktisk erfaring at slike tester kan være så vel falsk negative som falsk positive.

Når det gjelder sammenligning mellom testene, er det også vanskelig å finne gode, systematiske studier. Det foreligger flest studier for Premier EHEC, som synes å komme godt ut i sammenligning med andre hurtigtester.

Litteratur Shigatoksin-tester:

1. Gould LH, Bopp C, Strockbine N, Atkinson R, Baselski V, Body B, et al. Recommendations for diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR Recomm Rep* 2009;58(RR-12):1-14.
2. Beutin L, Zimmermann S, Gleier K. Evaluation of the VTEC-Screen "Seiken" test for detection of different types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC) in human stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42(1):1-8.
3. Pulz M, Matussek A, Monazahian M, Tittel A, Nikolic E, Hartmann M, et al. Comparison of a shiga toxin enzyme-linked immunosorbent assay and two types of PCR for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stool specimens. *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4671-5.
4. Grif K, Orth D, Dierich MP, Wurzner R. Comparison of an immunochromatographic rapid test with enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction for the detection of Shiga toxins from human stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59(1):97-9.

Kromogene agarmedier og andre spesialmedier til påvisning av *E. coli* i feces, med særlig vekt på EHEC⁴ (fra 2011-revisjonen)

Leveran-dør	Agar	Vali-dert materiale	Prinsipp-Produkt-angivelse	Målbakterie(r) for direkte id	Farge på kolonier	AB-tilset-ning?	Fabrikasjon	Ref
BD	BBL CHROM- agar Orientati on	Urin	β-gal beta- glucosidase tryptofan deaminase	<i>E. coli</i> enterokokker <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Klebsiella</i>	Rosa	Ikke angitt	Ferdige skåler fra CHROMagar	3)
					Blå/blågrønn Bleke/beige			4)
					Rosa			5)
	BBL CHROM- agar O157	Feces, (matvarer)	Ikke angitt	<i>E.coli</i> O157		Ikke angitt	Ferdige skåler	1) 2) 4) 5)
CHROM-agar (v/SmithMED)	CHROM- agar O157	Feces	Ikke angitt	<i>E.coli</i> O157, samt mulig noen få andre EHEC og andre <i>E. coli</i> Fleste andre <i>E. coli</i>	Rosa-lilla	Ikke angitt	Pulver	6)
								7)
					blå			8)
Oxoid	Brilliance UTI Agar	Urin	β-gal beta- glucosidase tryptofan deaminase	<i>E.coli</i> enterokokker <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Klebsiella</i>	Rosa Blå Brun	Ikke angitt	Lisens fra CHROMagar, modifisert Ferdige skåler	3) 5)
Bio-Mérieux	ChromID O157:H7	Feces	β-gal	<i>E. coli</i> O157:H7	Blå-grønne	CT*	Ferdige skåler	3)
			β-gur	ikke O157:H7 <i>E. coli</i>	Rosa/burgun der			
	ChromID CPS	Urin	β-gur, β-gal beta- glucosidase tryptofan deaminase	<i>E.coli</i> enterokokker <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Klebsiella</i>	Turkis Brun		Ferdige skåler	
flere	SMAC	Feces	Sorbitol			-		
flere	CT-SMAC	Feces	Sorbitol/ cefexim/ telluritt			CT*		
flere	CR-SMAC	Feces	Sorbitol/ cefexim/ rhamnose			cefexim		

*CT = cefixim og telluritt β-gur = beta-glucuronidase β-gal = beta-galaktosidase

Ulike leverandører har vært kontaktet. Kontaktpersoner har vært: David Smith (SmithMedical), Wibecke Aasnæs (Oxoid), Kjell Baekvang (bioMerieux), Vigdis Lysø (Becton Dickinson).

⁴ Det kan være andre kromogene medier på markedet som ikke tatt med i denne oversikten.

Oppsummering/konklusjon

- Kromogene medier som fra leverandørens side er validert for fecesprøver har den klassiske O157:H7 som mål-bakterie. I hvilken grad slike skåler f. eks. vil fange opp SF O157 fra 2009-2010-utbruddet (som blant annet er tellurit følsom), er uvisst
- Kromogene "UTI"- skåler påviser *E. coli* av alle typer, men er fra leverandørens side kun validert til bruk på urinveisprøver (sannsynligvis bare på urinveis- *E. coli*, og ikke tarmpatogene *E. coli*). En vurdering av i hvilken grad disse mediene kan egne seg for isolering av non-O157 tarmpatogene *E. coli*, er svært vanskelig, ettersom litteraturen på området synes svært sparsom:
 - Se ref 4 (liten omtale av tarmpatogene *E. coli* spesielt) og ref 5
 - Det finnes flere publikasjoner på sammenlikning av tradisjonelle fecesagarer (SMAC etc) og kromogene fecesagarer som fanger O157 positive stammer, men få som sammenlikner tradisjonelle agarer og kromogene agarer som fanger alle (non O157) *E. coli*

Referanse og utvalgte nettsider:

1. Church DL et al: Evaluation of BBL CHROMagar O157 versus Sorbitol-MacConkey Medium for Routine Detection of *E. coli* in a Centralized Regional Clinical Microbiology Laboratory. *JCM* 2007; 45:3098-3100.,
2. Vetterli KM. Comparison of BBL™ CHROMagar O157 to Sorbitol MacConkey for Recovery of *E. coli* in stool cultures. *Abstract ASM New Orleans 2004*
3. Miles KI, Wren WD. Evaluation of three commercial agar preparations for the presumptive identification of significant urinary isolates. *British Journal of Biomedical Science* 2005; 62:179-81
4. Ohkusu K. Cost-Effective and Rapid Presumptive Identification of Gram-Negative Bacilli in routine Urine, Pus, and Stool Cultures: Evaluation of the Use of CHROMagar Orientation Medium in conjunction with Simple Biochemical Tests. *JCM* 2000; 38:4586-92
5. Filius PM et. Al. Comparative evaluation of three chromogenic agars for detection and rapid identification of aerobic Gram-negative bacteria in the normal intestinal microflora. *CMI* 2003;9:912-18
6. Bettelheim KA. Reliability of CHROMagar O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. *J Appl Microbiol* 1998;85:425-428
7. <http://www.smithmed.com/>
8. www.chromagar.com

EPEC/*eae*-positive *E. coli*

Det kliniske bildet hos en person som bærer *eae*-positive *E. coli* kan variere fra asymptomatisk bærerskap, til ukomplisert diaré, blodig diaré eller HUS.

En *eae*-positiv *E. coli* bør derfor håndteres i henhold til klinikk, mikrobiologiske funn og epidemiologi, og kan derfor defineres som:

- **Atypisk EPEC (aEPEC)** er en *eae*-positiv *E. coli* som ut fra en totalvurdering av klinikk, mikrobiologiske funn og manglende epidemiologisk link til HUS-assosiert EHEC, samt manglende funn av *bfp*, kan sannsynliggjøres at er en "sann" aEPEC
- **EHEC-LST** er en *eae*-positiv *E. coli* som kan være en HUS-assosiert EHEC som har mistet sine shigatoksingener. Ut fra en totalvurdering av klinikk, mikrobiologiske funn og epidemiologisk link til HUS-assosiert EHEC, sannsynliggjøres at aktuell *eae*-positiv *E. coli* er en EHEC som har mistet sine bakteriofag-kodende *stx*-gener
- **Typisk EPEC (tEPEC)** er en *eae*-positiv *E. coli* som også bærer *bfp*

Håndtering av *eae*-positive *E. coli* i primærlaboratoriet

Nedenforstående gjelder når det ikke er funnet annen mer sannsynlig mikrobiologisk årsak, eller annen sannsynlig patofysiologisk årsak.

1. Alvorlig klinikk:

- a. **HUS-pasient og *eae* alene.** Stammen håndteres som EHEC-LST. Renkultur/alternativt sveip fra blandingskultur^{5*} sendes referanselaboratoriet.
- b. **Blodig diaré og *eae* alene hos barn ≤5 år.** Stammen håndteres som EHEC-LST. Renkultur sendes referanselaboratoriet slik at videre karakterisering kan si om isolatet representerer en HUS-assosiert EHEC som har mistet sine shigatoksingener (EHEC-LST).

2. Smitteoppsporing og *eae* alene:

- a. **rundt et HUS-tilfelle:** Renkultur/alternativt sveip fra blandingskultur sendes referanselaboratoriet
- b. **rundt tilfelle med påvist HUS-assosiert EHEC:** Renkultur sendes til referanselaboratoriet.

3. Pågående lokalt eller nasjonalt utbrudd og *eae* alene:

- a. **HUS-utbrudd:** Renkultur/alternativt sveip fra blandingskultur sendes referanselaboratoriet.
- b. **Utbrudd med HUS-assosiert EHEC:** Renkultur sendes referanselaboratoriet. Blandingskultur kan eventuelt vurderes sendt inn, avhengig av klinisk alvorlighetsgrad hos pasienter i utbruddet, eller hvor tett knyttet til et alvorlig tilfelle den aktuelle personen er.

4. Langvarig diaré hos barn (≤5 år) og *eae* alene:

Renkultur sendes referanselaboratoriet

5. Diaré hos barn (≤5 år) etter opphold i U-land og *eae* alene:

Renkultur sendes referanselaboratoriet

6. Utbrudd i barnehage eller på barneavdeling uten annen mer sannsynlig årsak:

Renkultur sendes referanselaboratoriet

I situasjon 1-6 svares prøven ut foreløpig som positiv for EPEC-markør, og at isolatet (evt. blandingskultur i henhold til tabell 5) sendes til referanselaboratorium for videre undersøkelse.

Ved funn av *eae* i avføringsprøve i andre situasjoner enn beskrevet i punktene 1-6, kan undersøkelsen avsluttes uten forsøk på isolering av *eae*-positiv stamme, og prøven svares ut som negativ med hensyn på *eae*. Referanselaboratoriet presiserer at *eae*-positiv stamme fra barn og

⁵ Blandingskultur er definert som blandingskultur av *E. coli* bakterier

voksne med diaré uten at det foreligger tilleggskriterier som spesifisert under punktene 1-6, ikke skal sendes til referanselaboratoriet.

Laboratorie-diagnostikk av *eae*-positive *E. coli*

Primærdiagnostikk av *eae*-positive *E. coli* baseres på PCR-undersøkelse med hensyn på *eae*. Laboratorier uten slik diagnostikk bør videresende prøver fra pasienter med klinikk som kan representere HUS-assosiert EHEC-sykdom eller ved utbrudd, se nærmere spesifisert i avsnittet over.

Enkelte laboratorier har i tillegg etablert PCR-diagnostikk for å påvise tEPEC (deteksjon av *bfp*), men dette er ikke høyt prioritert diagnostikk siden forekomsten av tEPEC i Norge anses å være lav. Primærlaboratoriet bør spesielt være overvåkne på *eae*-positive *E. coli* SFO157, O103, O26 og O145.

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

Det vises til Smittevernveilederens kapittel om [E. coli enteritt](#).

Enterotoksigene *E. coli* (ETEC)

Fra tidligere har man ansett ETEC som assosiert med turstdiaré alene, og at patogenet forsvant raskt slik at diagnostikk etter hjemkomst hadde liten verdi. Foreløpige tall fra det laboratoriet som har innlemmet ETEC-markør i sin bred PCR-plattform (Drammen, se side 65) viser en forekomst på ca. 3% i testede prøver i et uselektert materiale, og på nivå med *Salmonella*.

Funnene støttes av en europeisk multisenterstudie, som fant en forekomst på vel 5%, imidlertid i de aller fleste tilfeller sammen med annet patogen (Spina A, Kerr KG, Cormican M et al. Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicentre study of community-acquired gastroenteritis. *CMI* 2015;21(8):719-728).

Det vises forøvrig til Smittevernveilederens kapittel om [E. coli enteritt](#).

Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), fra 2011-versjonen

Definisjon

EAEC er definert som diaregivande *E. coli* med typisk aggregerende adheranse til HEp-2 celler i kultur og danning av karakteristisk biofilm på tarmepitel. EAEC er ei heterogen gruppe, og det er ikkje påvist nokon enkelt virulensfaktor som er felles for alle bakteriar i denne gruppa. EAEC tilhører heller ikkje spesifikke serogrupper av *E. coli* (1).

Patogenese og klinisk bilde

Patogenesen er ikkje fullstendig kartlagd, men adheranse til tarmmukosa, danning av biofilm samt produksjon av ulike toksin er viktige faktorar (1). Mikroben synest å ha evne til å unngå verten sitt immunforsvar og kan vera årsak til asymptomatisk kronisk inflammasjon i tarmen (2). Det er påvist samanheng mellom vertsgenotype (polymorfisme i IL-8 promoterregion) og symptom ved EAEC-infeksjon (3). Det kliniske bildet spenner frå asymptomatisk infeksjon, via milde symptom som magesmerter, kvalme og oppkast til akutt vandig diare med eller utan slim/ blod. Lavgradig feber kan førekomma. EAEC årsakar også kronisk diare. Kronisk inflammasjon i tarm kan truleg føra til malabsorbsjon/ malnutrisjon, også utan at det føreligg gastrointestinale symptom (4).

Epidemiologi

I utviklingsland er funn av EAEC assosiert med **akutt diare** hos både born og vaksne. I industrialiserte land er funn av EAEC først og fremst assosiert med akutt diare hos personar som har reist til

utviklingsland (turistdiare), men det er også påvist ein svak assosiasjon med akutt diare hos barn utan slik reiseanamnese (5). Det er usikkert om HIV-infiserte personar er meir utsett for symptomatisk EAEC-ineksjon enn HIV-negative personar (6). Akutt infeksjon med EAEC førekjem både som sporadiske tilfelle og som ledd i større utbrot. Smitte via næringsmidlar er viktigaste smitteåte (1, 4). Funn av EAEC er assosiert med kronisk diare (varigheit > 14 dagar) i utviklingsland, særleg hos barn < 2 år (4). Kronisk EAEC-infeksjon hos barn i utviklingsland er assosiert med malabsorbsjon.

Indikasjon for diagnostikk av EAEC i Noreg

Den norske EAEC-epidemiologi er ukjent og det ville vore nyttig med ein norsk/ nordisk studie med tanke på å kartleggja førekomsten av denne mikroben hos ulike grupper av norske/ nordiske pasientar med kronisk diare. I mangel på kjennskap til nasjonal epidemiologi, baserer tilrådingane for diagnostikk seg på internasjonal litteratur.

- Akutt diare: Det er rimeleg å anta at akutt EAEC-infeksjon først og fremst er aktuelt hos personar som kjem frå, eller har vore på reise i utviklingsregionar. Det er også rimeleg å anta at ein akutt EAEC-infeksjon vil vera sjølvavgrensande og det synest derfor ikkje rimelig å tilrå rutinemessig påvising av EAEC ved akutt diare.
- Vedvarande diare: Det kan vera aktuelt å utføra spesifikk EAEC-diagnostikk hos personar med vedvarande diare (> 14 dagar), særleg hos personar som kjem frå utviklingsregionar (t.d. flyktningar og innvandrarar), og i alle fall dersom ein ikkje påviser annan årsak til vedvarande diare.
- Malabsorbsjon: Spesifikk EAEC-diagnostikk kan vera aktuelt hos barn (< 2 år), særleg frå utviklingsland, med symptom på malabsorbsjon, og der annan årsak til dette ikkje blir påvist.
- Utbrotsoppklaring: EAEC kan smitta via næringsmiddel og har dermed eit utbrotspotensiale. Det kan derfor vera aktuelt med spesifikk EAEC-diagnostikk i samband med utgreiing av mistenkt næringsmiddelassosiert sjukdomsutbrot.

Påvising og identifikasjon av EAEC

Gullstandard er påvising av typisk aggregerande adheranse til HEp-2 celler i kultur, men denne metoden er svært arbeidskrevjande og lite eigna for rutinediagnostikk (4).

Serotyping har ingen plass i identifikasjon då EAEC har stor tendens til autoagglutinasjon samt at dette er ei svært heterogen gruppe med tanke på serotypar (1).

Det er publisert ulike molekylærbiologiske metodar for påvising av EAEC som baserer seg på påvising av virulens- eller regulatorgener slik som EAEC heat-stable toxin (EAST1) og et protein involvert i colonisering (Pic), samt CVD432-sekvensen (7). Dessverre er det så langt ikkje påvist slike gener som går igjen i alle EAEC og/ eller som er spesifikke for EAEC. Desse metodane har derfor lav sensitivitet og spesifisitet samanlikna med gullstandard (4). Som eksempel kan nemnast at *AggR*, som truleg er ein av dei mest nytta målsekvensane til påvising og identifikasjon av EAEC, i ein studie vart påvist i berre om lag 90% av isolata (1). På trass av dette er det nok slike molekylærbiologiske metodar som er mest realistisk å ta i bruk ved norske rutinelaboratorium. Biofilm-assay har også vore nytta ved screening med tanke på å påvisa EAEC. Dette kan vera ein nyttig metode, særleg i større epidemiologiske studiar (4).

Konklusjon med anbefaling

Påvising av EAEC i Noreg er først og fremst aktuelt ved persisterande diare (>14 dagar). Det er usikkert kor stort behovet for diagnostikk er, og ideelt sett bør det gjennomførast ein klinisk-epidemiologisk undersøking for å kartleggja dette. Sjølv om det bør finnast tilbod om diagnostikk

med tanke på EAEC i Noreg, er behovet truleg så lite at det vil vera tilstrekkeleg å ha tilbod på nasjonalt eller regionalt nivå.

Litteratur EAEC:

1. Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol*. 2007 Jan;56(Pt 1):4-8.
2. Okhuysen PC, Dupont HL. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *J Infect Dis*. (2010) 202 (4): 503-505.
3. Jiang ZD, Okhuysen PC, Guo DC, He R, King TM, DuPont HL, Milewicz DM. Genetic susceptibility to enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea: polymorphism in the interleukin-8 promoter region. *J Infect Dis*. 2003 Aug 15;188(4):506-11. Epub 2003 Jul 25.
4. Kaur P et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010;2010:254159. Epub 2010 Mar 11.
5. Huang DB, Nataro JP et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* Is a cause of Acute Diarrheal Illness: A Meta-Analysis. *Clin Infect Dis*. 2006; 43(5): 556-63
6. Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 2006 55: 1303-1311
7. Pereira AL, Ferraz LR, Silva RS, Giuglioano LG. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence markers: positive association with distinct clinical characteristics and segregation into 3 enteropathogenic *E. coli* serogroups. *J Infect Dis* 2007;195(3):366-74

Identifikasjon og resistensbestemmelse

Identifikasjon av bakterieisolat

Alle laboratorier bør kunne identifisere samtlige aktuelle genus, de alvorligste og hyppigste species og noen klinisk viktige serovar/serogrupper. **Det anbefales å opprettholde detaljert informasjon om mikrobiologiske karakteristika til kliniker, inklusive evt. korrigerte detaljer fra referanselaboratoriet.**

- MALDI-TOF MS er foretrukne identifikasjonssystem og brukes nå av de fleste norske laboratorier.
- Biokjemiske (konvensjonelle tester) og automatiserte systemer som Vitek2/API-20E/Phoenix 100 og liknende er viktige supplement sammen med tre-rørs forgjæring (Hajna-oppsett) og single fenotypiske tester.
- Antigen-tester/ Agglutinasjon aktuelle for norske laboratorier:
 - Innen *Salmonella*-gruppen dreier det seg om *S. Typhi* (9-12:Vi:d:-), *S. Paratyphi A* (2-12:a:-), *S. Paratyphi B* (4-5-12:b:1.2), *S. Typhimurium* (4-5-12:i:1.2) og *S. Enteritidis* (9-12:gm:-).
 - *Y. enterocolitica* O-antisera: O3, O9.
 - *Shigella*: polyvalente O-antisera for identifikasjon av dysenteriae, boydii, flexneri, sonnei.
 - HUS-assosierte EHEC: **Det var divergerende syn på hvor viktig det er å ha *E. coli* O-antisera.** O-serogruppe hos de hyppigst forekommende HUS-assosierte EHEC er O157, O103, O145, O26 og O91.
- Påvisning av toksiner:
 - Fra isolat anses PCR-påvisning av *stx1* eller *stx2* som likeverdig med påvisning av selve Shigatoksinet
 - *Clostridium difficile* toksin (*tcd* gener) også som immunkromatografisk hurtigtester (*tcdA* + *tcdB*), se [Strategirapport 2009 – anaerob diagnostikk](#).
 - Toksiner fra *B. cereus*, *S. aureus*, *C. perfringens* i feces (eller oppkast) var lite omtalt på strategimøtet. Mattilsynet, Veterinærinstituttet og FHI har tilsammen slik kompetanse, også på noen algetoksiner og mykotoksiner. Basert på at det er toksinet alene som gir symptomer, og derved ikke er smittsomt fra menneske til menneske, anbefales ikke at slik diagnostikk etableres ved norske medisinsk-mikrobiologiske primærlaboratorier.
- Spesifikk PCR: Omtales i kapittel 1.2

Campylobacter: MALDI-TOF til genus og species er vanligvis godt nok for feces-isolater. Ved utbrudd eller mistanke om utbrudd, samt ved *Campylobacter*-funn i blodkultur bør isolatet (renkultur) sendes til referanselaboratorium (FHI) for species-bekreftelse og molekylærepidemiologisk undersøkelse. I tillegg sendes et utvalg isolater fra noen utvalgte laboratorier til FHI for resistensbestemmelse til NORM.

Salmonella: MALDI-TOF til genus. MALDI-TOF vil ikke gi sikker species eller serovar-typing. Serovar/gruppe bør tilstrebes, minimum for å identifisere serovar *S. enterica* Typhi/Paratyphi A/B/C. Mange laboratorier agglutinerer antigen på A-67 og et utvalg av O-antigener, Vi-antigen samt et utvalg av H-antigener, se over. Renkultur sendes alltid referanselaboratorium (FHI)

Shigella/EIEC: MALDI-TOF kan ikke skille de to genus. 3-rørs forgjæring (Hajna-oppsett) og automatiserte fenotypiske tester vil komme i mål med differensieringen for enkelte EIEC (hvis de er biokjemisk aktive), og enkelte *Shigella* (hvis de slår greit til i antisera og passer biokjemisk i tillegg), mens skillet mellom noen EIEC og *Shigella* kan være svært problematisk. O-antisera skiller mellom *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* og *S. dysenteriae*. Renkultur sendes alltid referanselaboratorium (FHI).

EHEC/EPEC: MALDI-TOF kombinert med laktose positivitet og funn av *stx* og/eller *eae* (alternativt shigatoksin) gir høy sannsynlighet for korrekt species. Til slutt eventuelt serotyping: O157, O103, O145, O26, O91. Se for øvrig kapittel 1.3 og tabell 5.

Funn av laktose-negativ (og *stx* og *eae* negativ) tilsynelatende *E. coli*, kan være *Shigella* og bør håndteres i henhold til omtalen over. Renkultur til referanselaboratoriet.

Yersinia: MALDI-TOF er ok på genus, men usikker på species. Identifikasjon til artsnivå er essensielt for vurdering av patogenitet. I tillegg til *Y. enterocolitica*, kan *Y. pseudotuberculosis* (årsak til mesenterial lymfadenitt/pseudo-appendicitt) gi sykdom hvor etiologi kan påvises ved feces-undersøkelse. PCR-påvisning av *ail-* og *gyrB* (positiv) medfører høy sannsynlighet for *Y. enterocolitica*. Eventuelt agglutinasjon/antigentest O3 (viktigst i Norge) og O9. Bevegelighet og sukkerforgjæring kan være til hjelp. Antatt patogene isolater (renkultur) sendes referanselaboratorium (FHI) for sikker identifikasjon av species.

Vibrio: MALDI-TOF vil i ulik grad identifisere species. Ved treff på *V. cholerae* sendes isolatet referanselaboratorium (FHI) både for å verifisere funn og for å påvise evt. toksinproduksjon. Forekomst i Norge er så sjelden at det anses lite hensiktsmessig å ha antisera mot O1 og O139 ved primærlaboratorier. Ved klinikk forenlig med kolerasykdom og usikker species, skal isolatet alltid sendes referanselaboratoriet for nærmere identifikasjon.

Aeromonas, Arcobacter og Plesiomonas shigelloides: MALDI-TOF er foreløpig noe usikker. Supplerende analyser tilrådes ved funn av isolater som tolkes som klinisk relevante.

Resistenstesting- og rapportering

Agardiffusjonsmetode ad modum Nordic-AST og EUCAST anbefales som standardmetode for resistensbestemmelse. Møtet konkluderte ikke med noen klar anbefaling for hvilke situasjoner som skal lede til antibiotika følsomhetstesting eller om det kunne tilrådes konsekvent testing, men med utrapportering i henhold til klinisk setting. Klarere anbefalinger vil sannsynligvis komme under Strategimøtet 2017.

S. Typhi/Paratyphi og Shigella resistensbestemmes alltid.

Salmonella: Agardiffusjonsmetode med lapper: Ampicillin, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacin som minimum + azitromycin, cefotaxim (ceftriaxon følger), ceftazidim, meropenem for sykehusinnlagte og som ledd i smittevern (ESBL).

Shigella: Agardiffusjonsmetode med lapper: Ampicillin, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacin som minimum + azitromycin, cefotaxim (ceftriaxon følger), ceftazidim, meropenem for sykehusinnlagte og som ledd i smittevern (ESBL)

Yersinia og non-typhoid Salmonella resistensbestemmes, men rapporteres vanligvis ikke ut

Yersinia: Agardiffusjonsmetode med lapper: Cefotaxim, ciprofloxacin, gentamicin, kloramfenikol, tetracyclin og trimetoprim-sulfametoxazol

Salmonella: Agardiffusjonsmetode med lapper: Ampicillin, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacin som minimum + evt azitromycin, cefotaxim (ceftriaxon følger), ceftazidim, meropenem for sykehusinnlagte og som ledd i smittevern (ESBL)

Campylobacter resistensbestemmelse på indikasjon

Campylobacter: Agardiffusjonsmetode med lapper: Erytromycin (azitromycin følger), ciprofloxacin, tetracyclin + evt karbapenemer med MIC-metode.

Aeromonas, Arcobacter, Plesiomonas og Vibrio på indikasjon. MIC-metode og farmakologiske, artsuavhengige brytningspunkter (EUCAST/NordicAST)

EHEC: Anbefales fortsatt ikke resistensbestemt

EIEC: Ble ikke omtalt på strategimøtet, og heller ikke i strategirapporten fra 1996, men aktuelle midler å teste, er som for *Shigella*.

Kontrollprøver, MSIS-melding og innsendingsplikt

Kontrollprøver og smittevern

For situasjoner der det bør tas kontrollprøver, og antallet negative prøver som anses nødvendig, samt smitteverntiltak rundt enkeltpasienter og ved utbrudd vises det til Smittevernveilederen kapittel om [Kontroll og oppfølging av pasienter med tarminfeksjoner](#), og kapittelet om [E. coli-enteritt \(inkludert EHEC-infeksjon og HUS\)](#).

Analysestrategier ved kontrollprøver

Ved kontrollprøve anbefales diagnostikk rettet mot det agens man skal kontrollere for.

Anbefalinger:

- **HUS-assosiert EHEC.** PCR⁶, alternativt toksinpåvisning, bør være primær analyse-metode med påfølgende dyrkning for å sannsynliggjøre at det er samme stamme (basert på stx-hovedtype og serogruppe), samt for å utelukke frie stx-bakteriofager (som man ikke kjenner til smittepotensialet til). Ved høy CT-verdi og «dårlig kurve», kan prøven svares ut som negativ. Bruk av spesialmedium slik som for eksempel sorbitol-skål eller EHEC/STEC kromagar, kan være ressurs sparende, gitt at man vet at bakterien vokser på det aktuelle mediet.
- For **lavvirulente EHEC** er kontrollprøver vanligvis ikke indisert.
- For **andre tarmpatogene bakterier** gjøres primært selektiv dyrkning med hensyn på det aktuelle agens, med en relativt enkel species-diagnostikk av isolat.

Melding til MSIS

Hovedformålene med MSIS er å følge med på forekomsten av smittsomme sykdommer og oppdage utbrudd. Kriteriene for melding til MSIS tilpasses kasus-definisjonene for det europeiske smitteverninstituttet (ECDC), samt til nasjonale forhold, og er derfor jevnlig gjenstand for revisjon. Den gradvise endringen til PCR-baserte analyser for undersøkelse på tarmpatogene bakterier, og hvor laboratoriene ikke alltid får frem et bakterieisolat, har medført usikkerhet om hva disse funnene betyr klinisk og smittevernmessig. Analyseresultat må samholdes med klinisk bilde. Når det gjelder smitteverntiltak, er dagens råd basert på dyrkning som er en mindre sensitiv metode enn PCR-basert analyse. Dette har vært bakgrunnen for den nylige revurderingen av smittevernråd ved EHEC og flere av de andre tarmpatogene bakteriene.

Meldingsplikt i henhold til reviderte kriterier per mars 2017:

Alle prøver med påvist stx eller shigatoksin, fortrinnsvis isolat med bekreftet gen eller toksin meldes til MSIS i henhold til primærlaboratoriets funn. Meldingskriteriene for EHEC er ikke endret som følge av differensieringen i HUS-assosierte og lavvirulente EHEC. Også alle eae-positive funn skal meldes til MSIS, selv i de tilfeller hvor man tolker det som klinisk irrelevant.

Andre tarmpatogene bakterier: meldes fortrinnsvis på isolat. Der hvor det ikke lykkes å isolere bakterien, meldes tilfellet likevel, men med angivelse av at det kun er påvist med PCR/NAAT. Sykdomstilfellet vil i MSIS merkes som "sannsynlig kasus".

⁶ Her har programkomiteen hatt litt ulike holdninger. FHI ønsker å oppreholde høy sensitivitet = PCR for HUS-assoserte EHEC, parallellt med at arbeidet (og smittevernet) rundt pasienter med eae alene positive prøver og prøver med bare stx1 er betydelig redusert.

Innsendingsplikt til Referanselaboratoriet for tarmpatogene bakterier

I henhold til MSIS-forskriften har primærlaboratoriene plikt til å «sende inn isolater eller prøvemateriale slik referanselaboratoriet angir». Formuleringene er ment å sikre folkehelsemikrobiologiske hensyn og behov for referansediagnostikk både i pasientbehandlingsøyemed og med hensyn på smittevern rundt enkeltpasienter, som innenfor dagens metodehorisont befordre innsending av isolater. Se for øvrig i tidligere avsnitt om dyrkningsverifikasjon ved positivt PCR-funn, [hvor det presiseres at dette innbefatter dyrknings-og isoleringsplikt der påvisning av patogen \(som referanselaboratoriet ber om innsending av isolater\) er gjort med PCR.](#)

[For til enhver tid oppdatert spesifikasjon av hva primærlaboratoriene bes sende inn av isolater til Referanselaboratoriet for tarmpatogene bakterier, se referanselaboratoriets nettside. Per juni 2017 gjelder følgende innsendingsplikt av isolater identifisert som, eller hvor det er mistanke om, følgende patogener:](#)

- *Listeria* fra normalt sterile lokalisasjoner
- *Campylobacter*
 - o fra blodkultur
 - o ved usikker species-identifikasjon
 - o ved mistanke om utbrudd
 - o til resistenstesting som del av NORM resistensovervåkingen
- EHEC og EPEC i henhold til kapittelet i denne rapporten
- ETEC ved mistanke om utbrudd
- Alle førstegansisolater samt isolater fra "dype prøver" (inklusive blodkultur, leddvæske ol)
 - o *Salmonella*
 - o *Shigella*
 - o EIEC
 - o *Y. enterocolitica* og *Y. pseudotuberculosis*
 - o *V. cholerae* og *V. parahaemolyticus*

Referansediagnostikk

Nasjonalt referanselaboratorium for enteropatogene bakterier ved Folkehelseinstituttet utfører referanseanalyser som kan ha konsekvenser for diagnostikk og smittevern for den enkelte pasient. Resultater fra referanseanalysene inngår i stor grad også som del av overvåkingen med hensyn på utbrudd. Laboratoriet gjennomfører resistenstesting for nasjonal rapportering i NORM og internasjonal rapportering til ECDC, som publiserer resistensrapport i samarbeid med både det europeiske mattilsynet EFSA (European Food Safety Authority) og det europeiske legemiddelverket EMA (European Medicines Agency). Snarlig vil også data rapporteres til WHO sitt globale resistensovervåkingssystem GLASS.

Helgenomsekvensering av innsendte isolater vil antagelig i stor grad ta over for mer tradisjonelle type-metoder i løpet av noen få år. Foreløpig gjennomføres diagnostikken med en kombinasjon av tradisjonell biokjemi, serotyping og PCR-baserte metoder.

Andre tarmpatogene agens ikke ytterligere omtalt

Arcobacter spp. Dekkes ikke i ordinær diagnostikk i de fleste laboratorier. Kan være aktuelt agens hos immunsvekkede, inklusive små barn. CCDA-skål i mikroaerob eller aerob atmosfære i 35-37 grader 32-48 timer.

***Clostridium difficile* toxin** –er dekket i *Strategirapport nr. 23, 2009: Anaerob diagnostikk*. Nytt fra februar 2015: OUS- Rikshospitalet tildelt funksjonen som referanselaboratorium. Det er ønske om at flere isolater sendes RH ved uttalt klinikk og/eller ønske om resistensbestemmelse.

Helicobacter pylori – Dyrkning fra duodenalbiopsier, ikke feces. Omtales ikke nærmere her. Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset i Østfold har utviklet spesielt god kompetanse i påvisning av *Helicobacter pylori*.

Listeria monocytogenes – Dyrkning av feces for identifikasjon av mikroben som indikator på Listeriose er ikke anbefalt. Se for eksempel den generelle omtalen av [listeriose hos Centre for Disease Control \(CDC\)](#) og den amerikanske foreningen for gynekologi og obstetrikk sin omtale av mulig [listeriose hos gravide](#)

Microsporidier – nylig reklassifisert som sopp. Aktuelt agens hos hiv-syke, organtransplanterte og andre immunsvekkede. Direkte mikroskopi med ulike fargemetoder, bl.a. Calcofluor white el., immunfluorescens. Spesifikke PCR assay. OUS-RH er referanselaboratorium for diagnostikk av sopp.

Mycobacterier, inklusive *M. tuberculosis* – Foretas av mycobacterielaboratorier med oppdatert kunnskap om slik diagnostikk. FHI er referanselaboratorium.

Tropheryma whippelii – Diagnostikk på duodenal- og tynntarmsbiopsier med PCR. Kan sendes St. Olavs hospital.

Parasitter/amøbesykdom – Dekket i *Strategirapport nr. 28, 2014: Fecesparasittologi*.

Sopp – Sjelden aktuelt å dyrke fra feces. Henviser til *Strategirapport nr. 27, 2013: Soppinfeksjoner*

Serologi

Dette var ikke et tema på dette strategimøtet. Innholdet er derfor en lett revidert versjon fra Strategirapport 1996.

Infeksjoner med enteropatogene agens gir ofte både sene og upålitelige antistoffsvar. **Akutt diaré er derfor ikke indikasjon for serologiske undersøkelser. Både spesifisitet og sensitivitet er for dårlig.**

Men slike undersøkelser kan være nyttige ved enkelte komplikasjoner etter diaré. Den diagnostiske verdien er imidlertid svært usikker også her, og det er derfor svært få laboratorier som har tilbud om slike analyser.

Tabell 6. Aktuelle indikasjoner, metoder og utførende institusjon			
Agens	Indikasjon	Metode	Utførende instans
<i>Salmonella</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktiv artritt • Reiters syndrom • Erytema nodosum • Pseudoappendisitt • Febris causa ignotae 	Elisa IgG, IgM, IgA	Gjøres ikke i Norge
<i>S. Typhi</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mistanke om bærerskap 	Elisa IgG, IgM, IgA	Gjøres ikke i Norge
<i>Shigella</i>	Ingen		
<i>Yersinia</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Reaktiv artritt • Erytema nodosum • Mesenterial adenitt • Terminal ileitt • Exudativ faryngitt 	Elisa IgG, IgM, IgA	Se «Metodekatalogen» på MikInfo
<i>Campylobacter</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Guillain-Barré • Arthritt 	Elisa IgG, IgM, IgA	OuS, Ullevål
<i>Helicobacter</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Høyprevalensgrupper • Evt. behandlingskontroll >6 mndr. etter behandling hvis 0-prøve foreligger 	Elisa IgG	Se «Metodekatalogen» på MikInfo
<i>V. cholerae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Evt. av epidemiologiske grunner 	Elisa toxin	FML

ABSTRACTS OG LYSBILDER FRA MØTET

Prøvemateriale: Kan rektalprøve erstatte fecesprøve?

Truls Leegaard, Akershus universitetssykehus, Lørenskog

En rektalprøve vil ha klare fordeler fremfor en fecesprøve. Den kan tas på et legekontor eller i en seng på sykehus og gir mindre ubehag for prøvetager og bioingeniør. Men, det finnes mulige ulemper: vil en rektalprøve ha for lav konsentrasjon av patogener? Fins det dokumentasjon eller «tunge» erfaringer?

Vi diskuterer her i prinsippet bakterier og parasitter. For virus er det godt dokumentert at PCR uansett prøvetagning vil være bedre enn tidligere type diagnostikk^{1,2}.



Når det gjelder bakterier og parasittene finnes det noen publikasjoner som viser at rektalswab er like bra som fecesprøve for PCR^{3,4}. Ct verdiene vil generelt være litt høyere, men rektalswab detekterer det man er ute etter. Det artiklene imidlertid ikke sier noe om, er om rektalswab kan benyttes til å dyrke bakteriene etterpå. Den ene studien som sier noe om dette, viser at en rektalswab som inkuberes i buljong vil ha like god sensitivitet som PCR og bedre sensitivitet for dyrkning enn prøver som kun dyrkes⁵. Da vil man altså få begge analysene.

En artikkel der man ser på Shigella viser at rektalswab med PCR er mer sensitiv enn fecesdyrkning, men sammenligner ikke feces-PCR mot rektalswab PCR. Studien har ikke som formål å sammenligne rektalswab mot feces til PCR, og det er litt uklart om det kun er rektalswab som er brukt i PCRen⁶.

Anbefaling til Strategimøtet: Carey-Blair, flytende amies (eSwab) eller annet egnet medium til fecesprøve må benyttes inntil videre. Vi anbefaler ikke at man går over til å benytte rektalswab i stedet for fecesprøve. Dokumentasjon på at man ved bruk av rektalswab er i stand til å dyrke alle bakteriene man finner ved PCR, er foreløpig ikke god nok.

Referanser

1. L Gustavsson, J Westin, LM Andersson, M Lindh. Rectal swabs can be used for diagnosis of viral gastroenteritis with a multiple real-time PCR assay. *J Clin Virol* 2011; 51: 275– 8
2. JA Sidler, R Käch, C Noppen, M Dangel, M Battegay, R Bingisser, O Dubuis, AF Widmer. Rectal swab for detection of norovirus by real-time PCR: similar sensitivity compared to faecal specimens, *CMI* 2014; 20: O1017-9
3. JC Kabayiza, ME Andersson, C Welinder-Olsson, T Bergström, G Muhirwa, M Lindh. Comparison of rectal swabs and faeces for real-time PCR detection of enteric agents in Rwandan children with gastroenteritis. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13: 447
4. DM Goldfarb, AP Steenhoff, JM Pernica, S Chong, K Luinstra, M Mokomane, L Mazhani, I Quaye, I Goercke, JM Mahony, M Smiejaa. Evaluation of Anatomically Designed Flocked Rectal Swabs for Molecular Detection of Enteric Pathogens in Children Admitted to Hospital with Severe Gastroenteritis in Botswana. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3922–7
5. LH Lin, CY Tsai, MH Hung, YT Fang, QD Ling. Rectal swab sampling followed by an enrichment culture-based real-time PCR assay to detect Salmonella enterocolitis in children. *CMI* 2011; 17: 1421–5
6. Wang SM, Ma JC, Hao ZY, Zhang ZY, Mason C, Sethabutr O, von Seidlein L, Wang XY, Xu ZY. Surveillance of shigellosis by real-time PCR suggests underestimation of shigellosis prevalence by culture-based methods in a population of rural China. *J Infect* 2010; 61:471-5

<p>Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO</p> <p>Bakteriologisk fæcesdiagnostikk</p> <p>Prøvetagning: Kan rectalprøve erstatte fæcesprøve? Transportmedier – kan ett medium dekke alle behov? Utvalg av tester/agens</p> <p>Truls Leegaard</p>	<p>Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO</p> <p>Prøvetagning: Kan rectalprøve erstatte fæcesprøve?</p> <ul style="list-style-type: none">• Carey-Blair, flytende amies (eSwab) eller annet egnet medium til fæcesprøve må benyttes inntil videre. Vi anbefaler ikke at man går over til å benytte rektalswab i stedet for fæcesprøve. Dokumentasjon på at man ved bruk av rektalswab er i stand til å dyrke alle bakteriene man finner ved PCR er foreløpig ikke god nok.
---	---

Transportmedier – kan ett medium dekke alle behov?

Truls Leegaard, Akershus universitetssykehus, Lørenskog

Finnes det et medium som vil dekke alle behov uavhengig av agens; både bakterier, virus, parasitter (holdbarhet, temperatur)? Vil det samme medium også kunne fungere uavhengig av metode; dyrkning og PCR?

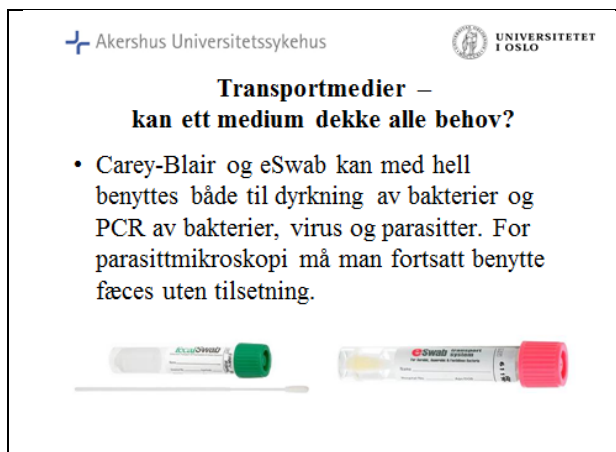
Det er sannsynligvis ikke nødvendig å ha et agensspesifikt medium. Vårt laboratorium har nå lang erfaring og tall på at Cary-Blair fungerer godt, både for PCR og for dyrkning av bakterier. I valideringsperioden viser vi at Cary-Blair er et tilstrekkelig godt medium¹. For f.eks. parasittmikroskopi vil det imidlertid, som hos oss i dag, sannsynligvis være nødvendig å benytte feces uten tilsetning, slik at man fortsatt vil ha behov for mer enn ett transportmedium. Det er lite litteratur om emnet, men en studie viser at forskjellige media som feces-transportmedium og eSwab begge fungerer utmerket ved optimale vilkår under transporten². eSwab er i bruk ved andre laboratorier i Norge, og også i Sverige.

Et annet problem vil oppstå når andre leverandører begynner å produsere transportmedier, og vi gjennom anbudsrunder blir pålagt å bytte leverandør, uten at disse er tilstrekkelig validert.

Anbefaling til Strategimøtet: Carey-Blair og eSwab kan med hell benyttes både til dyrkning av bakterier og PCR av bakterier, virus og parasitter. For parasittmikroskopi må man fortsatt benytte feces uten tilsetning.

Referanser

1. TM Leegaard, B Follin-Arbelet, TH Nguyen, H Esnaashari, HS Tunsjø, TE Ranheim, AK Kvissel. Evaluation of a commercial system (R-Biopharm RIDAGENE) for molecular detection of gastrointestinal infections. Poster P0853. 24th ECCMID, Barcelona, mai 2014
2. JJ Hirvonen, SS Kaukoranta. Comparison of FecalSwab and eSwab Devices for Storage and Transportation of Diarrheagenic Bacteria. J ClinMicrobiol 2014; 52: 2334–9



Utvalg av tester/agens

Truls Leegaard, Akershus universitetssykehus, Lørenskog

Vi får som regel for lite kliniske opplysninger til at det blir et reelt valg å dele opp analyser i flere PCR-pakker som hjemme-borte, akutt vs. kronisk diaré, blodig vs. grønn/grøtt, immunstatus, osv. Det virker derfor fornuftig å ha en standard PCR-pakke for diagnostikk av de vanligste agens, slik vi har i dag, som rett og slett er basert på forekomst^{1,2}. Denne kan brukes både på polikliniske og innlagte pasienter. Vi vil allikevel forsøke å besvare de enkelte spørsmål nedenfor.

Bør man ha egne paneler basert på smittede? F.eks. et "hjemme-panel" og et "borte-panel"? I så fall, er "hjemme" da Norden, Nord-Europa, Nord-Amerika og "borte" alle de andre?

Nei, alle bør få samme panel. Pakken som finnes for standard feces PCR er laget med tanke på smitte i vestlige land, inklusiv parasittene. Hvis det er opplysninger om reise utenfor Europa hadde det vært interessant å ha en PCR for cholera og de vanligste parasitter (Strongyloides, anycolostoma, necator, trichiuriasis, ascaris, toxocara, Schistosoma hematobium, japonicum og mansoni, Taenia saginata og solium). Her kan man også spørre seg hvor viktig det er å ha PCR vs. mikroskopi? Mange av disse parasittene er jo lett gjenkjennelig ved mikroskopi. Samtidig vil ofte de agens som er vanlige i vestlige land også være vanlige i tropiske land og land med lavere hygiene slik at det er fornuftig å undersøke både reisende og de som kommer fra slike land med den vanlige diarépakken først³. Samtidig er det antydninger om at de med langvarig diaré muligens vil ha nytte av å bli undersøkt med tanke på sporeformende protozoer, cryptosporidier, microsporidier, cyclospora og isospora⁴.

Anbefaling til Strategimøtet: Vi anbefaler ikke å etablere ulike prøve-pakker avhengig av reiseinformasjon.

Bør man ha paneler basert på type diaré og klinikk for øvrig? Her kan man tenke på akutt mot kronisk diaré, ikke-blodig mot blodig diaré, for dem med feber, pasienter med nedsatt allmenntilstand, etc. Eller, kan som oftest "alt gi alt"?

Nei, alt kan gi alt. I spesielle tilfeller, basert på klinikk, bør man nok se etter agens som ikke inngår i en standard feces PCR-pakke. Clostridium difficile bør sannsynligvis undersøkes for seg, da indikasjonen for å lete etter C. difficile er en annen enn for de andre diaréfremkallende agens. Et annet eksempel er cryptosporidier som er et agens som meget gjerne kan gi diaré hos dem med nedsatt immunforsvar. Her kan også nevnes Listeria hos immunsvekkede. Listeria er ofte forbundet med utbrudd eller systeminfeksjon, og vil oppdages i andre sammenhenger. Dersom Listeria kun gir diaré vil denne som oftest være selvbegrensende og relativt kortvarig hos immunfriske⁵.

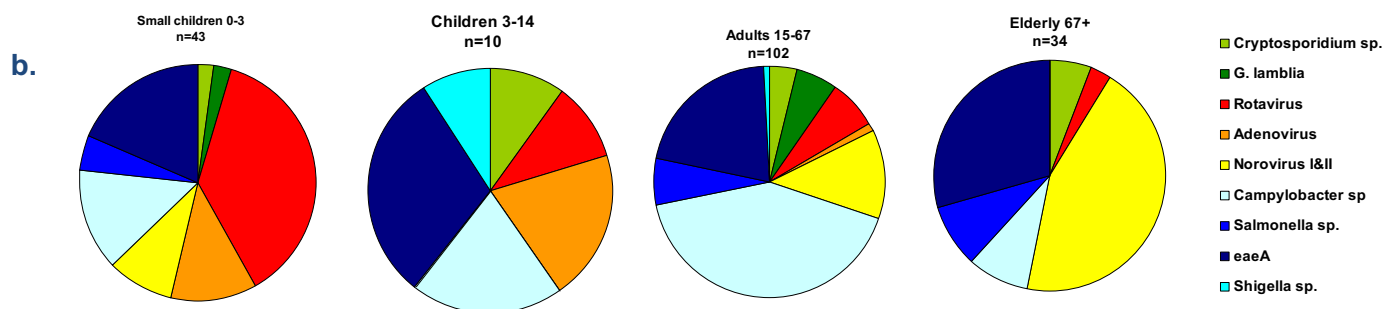
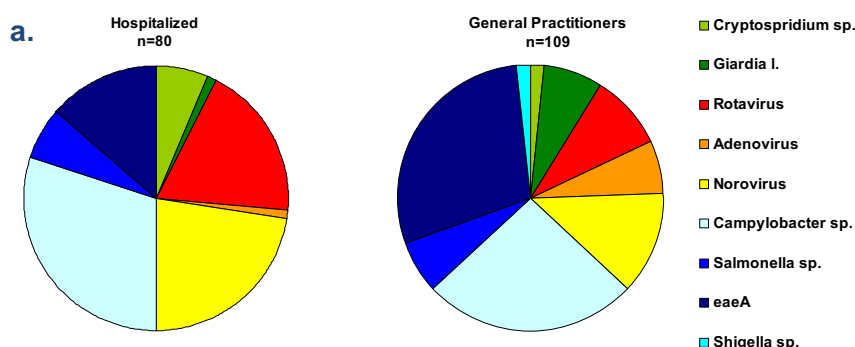
Anbefaling til Strategimøtet: Vanligvis ikke spesielle indikasjoner basert på klinisk uttrykk av infeksjonen.

Bør man ha egne paneler basert på alder?

Virus dominerer hos små barn, og kunne godt ha blitt kjørt for seg, men finnes samtidig i alle aldersgrupper, slik at det sannsynligvis ikke er hensiktsmessig. Se figur⁷. Hos eldre og de minste er det dehydrering og elektrolyttforstyrrelser som gir problemer, ikke noe som er knyttet til spesifikke agens, men det er stort sett ikke et problem i Norge^{6,7}.

Anbefaling til strategimøtet: Vi anbefaler ikke egne paneler basert på alder.

- Distribusjon av agens avhengig av hvor infeksjonen er oppdaget (3a) eller aldersgruppe (3b)
- Rotavirus og Norovirus var overrepresenterte hos sykehuspasienter, og ble oftere funnet hos små barn og eldre
- *Campylobacter* spp. Ble oftere funnet hos voksne, og hos sykehuspasienter



Hvilke agens finner man hos dem med nedsatt immunstatus? Er det også innen denne pasientgruppen variasjoner? Man kan tenke seg at de som er sterkt immunsupprimerte har f.eks. mindre tarmpatogene bakterier og heller cryptosporidier eller microsporidier.

Dagens “pakke” som inngår i en feces PCR bør være tilstrekkelig. Det kan imidlertid godt hende at laboratorier som pr. i dag ikke har tilgang til feces PCR bør sende prøver til analyse ved annet laboratorium, da mikroskopi av protozoer har såpass dårlig sensitivitet i forhold til PCR, slik at enkelte protozoer vanskeligere vil oppdages.

Anbefaling til Strategimøtet: Laboratorier som ikke har bred feces-PCR bør videresende feces-prøve til laboratorium med slik screening hvis pasienten har en kjent immunsviktilstand.

Bør utbrudd behandles annerledes enn ikke-utbrudd?

På utbrudd i institusjon bør man utføre vanlig standard-PCR både for virus og bakterier på de første 2-3 pasientene for å sikre rask og fullstendig diagnostikk. Deretter bør man ikke utføre PCR på nye pasienter i samme utbrudd. Det er ikke alltid norovirus eller andre virus som er synderen. Et eksempel fra AHUS er 9 jordmødre med *Campylobacter* og/eller EPEC, som riktignok hadde reist til Marokko sammen, men *Campylobacter* kunne de jo fått i Norge også.

Anbefaling til Strategimøtet: Vi anbefaler at prøver fra de første pasientene bør undersøkes med en bred screening som innbefatter vanlige tarmpatogene agens (både bakterier og virus og parasitter). Dersom man er ganske sikker på at de prøvene til de neste pasientene kommer fra det samme utbruddet, anser vi det ikke som nødvendig å undersøke flere prøver fra det samme utbruddet. Her må det imidlertid vises smidighet, og et samarbeid med smittevern er sentralt.

Når bør man lete etter vibrio, aeromonas og/eller plesiomonas?

Indikasjonen for å lete etter vibrio, aeromonas og/eller plesiomonas er ikke endret siden siste strategimøte der dette ble omtalt. Det er fortsatt dyrkning på indikasjon som gjelder. Eventuelt

kan man diskutere om disse agens bør være med i en utvidet PCR, hvis den skal være med i en PCR i det hele tatt.

Stikkord er (salt)-vann og sjømat. I den forrige rapporten står det imidlertid spesifikt Asia. Dette bør kanskje utvides? Vi vet om kjente utbrudd på bl.a. Haiti og Cuba.

Anbefaling til Strategimøtet: Indikasjon for å lete etter vibrio, aeromonas eller plesiomonas er reise til tropisk område med tilknytning til sjø (bading, og spesielt inntak av sjømat). Da mellom-Amerika/Karibien nå har hatt anerkjente utbrudd med *Vibrio cholera* bør også prøver fra disse områdene undersøkes, ikke bare prøver fra Asia.

Finnes der tilfeller der en bredere agens-liste bør inngå rutinemessig eller hyppigere?

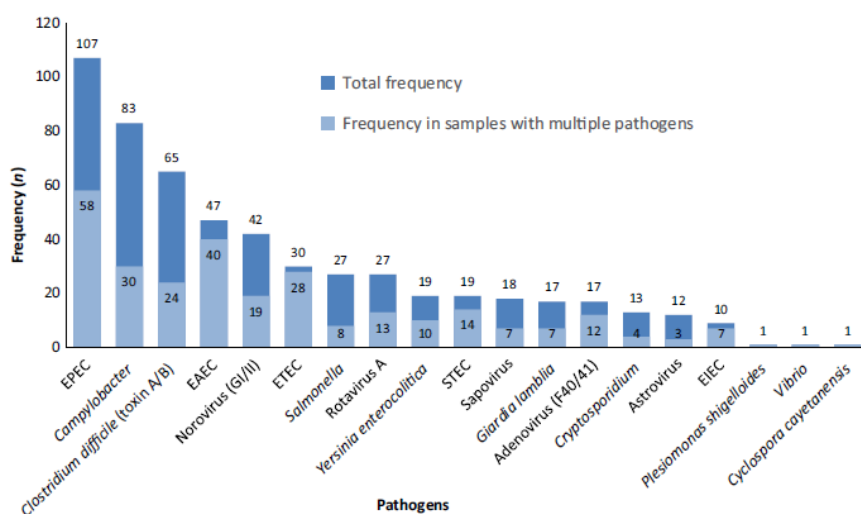
Slik situasjonen er i dag, med tekniske og ressursmessige begrensninger, er dette ikke aktuelt. Vi kan imidlertid ønske oss en bredere pakke, der andre agens enn de vi leter etter i dag (f.eks. vibrier, aeromonas og plesiomonas) inngår. Et slikt tilbud er allerede på markedet og andre større "pakker" vil sannsynligvis komme, men tilgangen vil være begrenset av pris².

Anbefaling til Strategimøtet: Anses ikke veldig aktuelt foreløpig.

Bør man se nærmere på virus? I dagens "pakker" inngår som oftest norovirus, rotavirus og adenovirus. Bør andre virus inngå?

Som vi ser av vedlagte figur som baserer seg på en PCR med et bredt utvalg agens, inkluderes ofte astrovirus i utvalget². Astrovirus er imidlertid ingen hyppig årsak til diaré, og finnes neste like ofte hos friske bærere som hos dem med diaré⁷, slik at man kan spørre seg om nytten.

Anbefaling til Strategimøtet: Norovirus, rotavirus og adenovirus bør inngå som del av standardpanelet, mens andre virus er lite aktuelle.



Når bør man tenke på bakterier som produserer matforgiftnings-toksiner (*B. cereus*, *S. aureus*)?

Diaré forårsaket av matforgiftnings-toksiner gir akutt diaré. Det vil sannsynligvis ikke bli tatt prøve av de fleste av disse pasientene. Her er man avhengig av klinikers innsikt og behov, og det er sannsynligvis huller i vår kunnskap om hva dette faktisk betyr. Det finnes generelt lite litteratur om betydningen av diaré forårsaket av toksinproduserende bakterier utover at det er beskrevet som årsak til flere utbrudd. Det dreier seg stort sett om *B. cereus*, *S. aureus* (stafylokokk enterotoxin type B), *C. perfringens* og enkelte forfattere har nevnt Enterotoxinogen *Bacteroides fragilis* som en "coming" agens¹¹. Ved utbrudd der det er viktig å finne en årsak, f.eks. i institusjon kan det likevel være aktuelt å se etter denne typen agens når vanlig feces-PCR-undersøkelse er negativ.

Anbefaling til Strategimøtet: Det er behov for mer kunnskap om betydningen av diaré forårsaket av toksinproduserende bakterier før vi kan anbefale at diagnostiske laboratorier bør endre dagens praksis.

I dagens praksis for parasitter finnes klare regler? Bør de revideres?

Vi ser ingen grunn til å endre disse reglene. De parasittene som inngår i en feces PCR er rettet mot agens vi kan forvente å finne i eget land og i andre vestlige land. Ett års rutinedrift på AHUS viser at vi finner Cryptosporider i 1 % av alle fecesprøvene som er analysert med PCR. Tilsvarende tall for Giardialamblia er 1,6 %. Entamoeba histolytica er med i feces PCR av en helt annen grunn, nemlig for å kunne skille ekte amøber fra andre cyster. Eventuelt kunne man utelate å ha med E. histolytica i standard-pakken. Vi fant den første positive etter å ha hatt PCR i bruk i 14 måneder. Parasittmikroskopi bør derfor ikke utføres før man har utført en screening for andre agens, fortrinnsvis med feces PCR.

Anbefaling til Strategimøtet: Indikasjon for feces-parasittundersøkelse endres ikke.

Bør Clostridium difficile inngå i "standardpanelet"?

Clostridium difficile bør ikke inngå i "pakken". C. difficile har en annen indikasjon enn de andre agensene. Her er svartid også avgjørende, og dersom man ikke kan garantere at feces PCR vil kunne ha en like rask svartid som C. difficile-undersøkelsene så er man bedre tjent med å kjøre dette separat.

Imidlertid er sannsynligvis C. difficile ofte underdiagnostisert, til tross for at det av kliniske og smittevernmessige årsaker er viktig å identifisere pasienter med denne infeksjonen. En artikkel i Lancet Infectious Diseases fra 2014 fant følgende: "Funn fra EUCLID studien viser at C.difficile infeksjoner er underdiagnostisert i Europa, først og fremst på grunn av manglende klinisk mistanke og, derfor, manglende testing for C.difficile infeksjon⁸.

Anbefaling til Strategimøtet: Vi anbefaler at man har lav terskel for å undersøke inneliggende pasienter med diaré for C. difficile. Analysen bør, slik vi ser det, ikke inngå i et feces-PCR-panel, men bør settes opp separat med en "god nok" metode.

Egne funn (Ahus)

Til sammenligning finner vi i det første driftsåret, følgende:

	Antall (%)	% innlagt	Median alder	Multiple funn %
Alle	3266 (100)	49,5	45	
Alle positive	1082 (33,1)	43,7	32	16,5
Campylobacterspp.	313 (9,6)	46	44	22
Yersiniaenterocolitica	9 (0,3)	11	20	33
Salmonella spp.	74 (2,3)	39	37	36
Shigella spp.	31 (0,9)	35	26	48
EHEC	22 (0,7)	45	29	23
EPEC	329 (10,1)	35	28	36
Norovirus	185 (5,7)	62	57	22
Rotavirus	151 (4,6)	68	1	23
Adenovirus	79 (2,4)	38	2	37
Giardialamblia	52 (1,6)	21	37	25
Cryptosporidium	32 (1,0)	16	25	29





Våre egne funn sammenfaller godt med funn fra andre europeiske studier² (bl.a. sammenlignet med grafikken ovenfor). Det er flere som spør seg om nytten av å finne EPEC. Langt fra alle har infeksjoner, og det er igangsatt studier som skal se på sammenhengen mellom PCR-funn av EPEC og klinikk. Fra valideringen vet vi at vi finner det vi skal mht. bakterier og at vi finner langt fler virus og parasitter¹.

















Konklusjonen er at funn i "standard-pakken" ikke ekskluderer andre funn, slik at vedvarende symptomer eller alvorlig sykdom bør utløse videre utredning. Feces-PCR har utvilsomt tilført en ny dimensjon til fecesdiagnostikken, og med den tekniske utviklingen som skjer innen mikrobiologi for tiden er det å forvente at ytterligere ny kunnskap om dette emnet vil komme i de neste årene.





Stor takk for bidrag fra kolleger på AHUS til alle tre underdelene: Veselka Petrova, Silje Bakken Jørgensen, Bjørn Odd Johnsen og Nina Handal

Referanser

1. TM Leegaard, B Follin-Arbelet, TH Nguyen, H Esnaashari, HS Tunsjø, TE Ranheim, AK Kvissel. Evaluation of a commercial system (R-Biopharm RIDAGENE) for molecular detection of gastrointestinal infections. Poster P0853. 24th ECCMID, Barcelona, mai 2014
2. Spina A, Kerr KG, Cormican M, Barbut F, Eigentler A, Zerva L, Tassios P, Popescu GA, Rafila A, Eerola E, Batista J, Maass M, Aschbacher R, Olsen KE, Allerberger F. Spectrum of enteropathogens detected by the FilmArray GI Panel in a multicenter study of community-acquired gastroenteritis. ClinMicrobiol Infect 2015; 21: 719-28
3. Hill DR & Beeching NJ. Travelers' diarrhea. Curr Opin Infect Dis 2010; 23: 481-7
4. Goodgame R. Emerging Causes of Traveler's Diarrhea: Cryptosporidium, Cyclospora, Isospora, and Microsporidia. Curr Infect Dis Rep 2003; 5: 66-73
5. Johnsen BO, Lingaas E, Torfoss D, Strøm EH, Nordøy I. A large outbreak of Listeria monocytogenes infection with short incubation period in a tertiary care hospital. J Infect 2010; 61: 465-70
6. Trinh C, Prabhakar K. Diarrheal Diseases in the Elderly. Clin Geriatr Med 2007; 23: 833-856
7. Dennehy PH. Viral gastroenteritis in children. Pediatr Infect Dis J 2011; 30: 63-4
8. Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, Delmée M, Fitzpatrick F, Ivanova K, Kuijper E, Macovei IS, Mentula S, Mastrantonio P, von Müller L, Oleastro M, Petinaki E, Pituch H, Norén T, Nováková E, Nyč O, Rupnik M, Schmid D, Wilcox MH. Underdiagnosis of Clostridium difficile across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of Clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). Lancet Infect Dis 2014; 14: 1208-19

<p style="text-align: center;">   </p> <p style="text-align: center;">Utvalg av tester/agens</p>	<p style="text-align: center;">   </p> <p style="text-align: center;">Bør man ha egne paneler basert på smittested?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vi anbefaler ikke å etablere ulike prøve-pakker avhengig av reiseinformasjon
---	--

<p>  Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO </p> <p>Bør man ha paneler basert på type diaré og klinikk for øvrig?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vanligvis ikke spesielle indikasjoner basert på klinisk uttrykk av infeksjonen, men hos enkelte kan det være aktuelt å se etter andre, uvanlige agens utover det som finnes i et standardpanel. 	<p>  Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO </p> <p>Bør man ha egne paneler basert på alder?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vi anbefaler ikke egne paneler basert på alder.
<p>  Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO </p> <p>Hvilke agens finner man hos dem med nedsatt immunstatus?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Laboratorier som ikke har bred fæces-PCR bør videresende fæcesprøve til laboratorium med slik screening hvis pasienten har en kjent immunsviktilstand. 	<p>  Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO </p> <p>Bør utbrudd behandles annerledes enn ikke-utbrudd?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vi anbefaler at prøver fra de første pasientene bør undersøkes med en bred screening som innbefatter vanlige tarmpatogene agens • Dersom man er ganske sikker på at de prøvene til de neste pasientene kommer fra det samme utbruddet, anser vi det ikke som nødvendig å undersøke flere prøver fra det samme utbruddet. • Her må det utvises smidighet, og et samarbeid med smittevern er sentralt.
<p>  Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO </p> <p>Når bør man lete etter vibrio, aeromonas og/eller plesiomonas?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Indikasjon for å lete etter vibrio, aeromonas eller plesiomonas er reise til tropisk område med tilknytning til sjø (bading, og spesielt inntak av sjømat) • Da mellom-Amerika/Karibien nå har hatt anerkjente utbrudd med Vibrio cholera bør også prøver fra disse områdene undersøkes, ikke bare prøver fra Asia. 	<p>  Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO </p> <p>Finnes det tilfeller der en bredere agens-liste bør inngå rutinemessig eller hyppigere?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Anses ikke veldig aktuelt foreløpig.
<p>  Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO </p> <p>Bør man se nærmere på virus?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Norovirus, rotavirus og adenovirus bør inngå som del av standardpanelet, mens andre virus er lite aktuelle. 	<p>  Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO </p> <p>I dagens praksis for parasitter finnes klare regler? Bør de revideres?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Indikasjon for fæces-parasittundersøkelse endres ikke.

<p>Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO</p> <h3>Bør Clostridium difficile inngå i "standardpanelet"?</h3> <p>Vi anbefaler at man har lav terskel for å undersøke inneliggende pasienter med diare for C. difficile. Analysen bør, slik vi ser det, ikke inngå i et fæces-PCR-panel, men bør settes opp separat med en "god nok" metode.</p> 	<p>Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO</p> <h3>Egne funn</h3> <p>Våre egne funn sammenfaller godt med funn fra andre europeiske studier (bl.a. sammenlignet med grafikken ovenfor). Det er flere som spør seg om nytten av å finne EPEC. Løngt fra alle har infeksjoner, og det er bl.a. igangsett studier som skal se på sammenhengen mellom PCR-funn av EPEC og klødd. Fra valideringen vet vi at vi finner det vi skal mht bakterier og at vi finner løngt flere virus og parasitter</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Antall (N)</th> <th>% Innløgt</th> <th>Median alder</th> <th>Multiple funn %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Alle</td> <td>3266 (100)</td> <td>48,5</td> <td>43</td> <td>16,5</td> </tr> <tr> <td>Alle positive</td> <td>1082 (33,1)</td> <td>43,7</td> <td>32</td> <td>16,5</td> </tr> <tr> <td>Campylobacter spp.</td> <td>313 (9,6)</td> <td>46</td> <td>44</td> <td>22</td> </tr> <tr> <td>Yersinia enterocolitica</td> <td>9 (0,3)</td> <td>11</td> <td>20</td> <td>33</td> </tr> <tr> <td>Salmonella sp.</td> <td>74 (2,3)</td> <td>39</td> <td>37</td> <td>36</td> </tr> <tr> <td>Shigella spp.</td> <td>31 (0,9)</td> <td>35</td> <td>26</td> <td>48</td> </tr> <tr> <td>EHEC</td> <td>22 (0,7)</td> <td>45</td> <td>29</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>EPEC</td> <td>329 (10,1)</td> <td>35</td> <td>28</td> <td>36</td> </tr> <tr> <td>Norovirus</td> <td>183 (5,7)</td> <td>62</td> <td>37</td> <td>22</td> </tr> <tr> <td>Rotavirus</td> <td>151 (4,6)</td> <td>68</td> <td>1</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>Adenovirus</td> <td>79 (2,4)</td> <td>38</td> <td>2</td> <td>37</td> </tr> <tr> <td>Giardialambila</td> <td>22 (0,7)</td> <td>21</td> <td>37</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>Cryptosporidium</td> <td>32 (1,0)</td> <td>16</td> <td>25</td> <td>29</td> </tr> </tbody> </table>		Antall (N)	% Innløgt	Median alder	Multiple funn %	Alle	3266 (100)	48,5	43	16,5	Alle positive	1082 (33,1)	43,7	32	16,5	Campylobacter spp.	313 (9,6)	46	44	22	Yersinia enterocolitica	9 (0,3)	11	20	33	Salmonella sp.	74 (2,3)	39	37	36	Shigella spp.	31 (0,9)	35	26	48	EHEC	22 (0,7)	45	29	23	EPEC	329 (10,1)	35	28	36	Norovirus	183 (5,7)	62	37	22	Rotavirus	151 (4,6)	68	1	23	Adenovirus	79 (2,4)	38	2	37	Giardialambila	22 (0,7)	21	37	23	Cryptosporidium	32 (1,0)	16	25	29
	Antall (N)	% Innløgt	Median alder	Multiple funn %																																																																			
Alle	3266 (100)	48,5	43	16,5																																																																			
Alle positive	1082 (33,1)	43,7	32	16,5																																																																			
Campylobacter spp.	313 (9,6)	46	44	22																																																																			
Yersinia enterocolitica	9 (0,3)	11	20	33																																																																			
Salmonella sp.	74 (2,3)	39	37	36																																																																			
Shigella spp.	31 (0,9)	35	26	48																																																																			
EHEC	22 (0,7)	45	29	23																																																																			
EPEC	329 (10,1)	35	28	36																																																																			
Norovirus	183 (5,7)	62	37	22																																																																			
Rotavirus	151 (4,6)	68	1	23																																																																			
Adenovirus	79 (2,4)	38	2	37																																																																			
Giardialambila	22 (0,7)	21	37	23																																																																			
Cryptosporidium	32 (1,0)	16	25	29																																																																			
<p>Akershus Universitetssykehus  UNIVERSITETET I OSLO</p> <h3>Konklusjon</h3> <ul style="list-style-type: none"> Funn i "standard-pakken" ekskluderer ikke andre funn, slik at vedvarende symptomer eller alvorlig sykdom bør utløse videre utredning. Fæces-PCR har utvilsomt tilført en ny dimensjon til fæcesdiagnostikken, og med den tekniske utviklingen som skjer innen mikrobiologi for tiden er det å forvente at ytterligere ny kunnskap om dette emnet vil komme i de neste årene. Vi får som regel for lite kliniske opplysninger til at det blir et reelt valg å dele opp analyser i flere PCR-pakker 																																																																							

Detaljeringsgrad av Identifikasjon – hva trenger kliniker, vi selv og andre?

Astrid Louise Wester, Folkehelseinstituttet

Hva har kliniker behov for?

Salmonella:

Ved **laboratoriet i Drammen** har man siden mars 2015 kun gitt ut svar *Salmonella* sp (utenom når det foreligger Typhi eller Paratyphi). Dette fordi det er arbeidsbesparende og fordi man har stilt seg tvilende til hvilken nytte svaret har for kliniker. Det har ikke kommet tilbakemeldinger med ønske om typebestemmelse.

Laboratoriet i har i forbindelse med Strategimøtet gjort en **spørreunde**:

- Vestre Vikens infeksjonsmedisinere:
 - o Fra én infeksjonsmedisinere angis at det er faglig interessant å få vite typebestemmelse selv om det ikke får praktisk konsekvens utover en teoretisk mulighet for å kunne oppdage utbrudd. Vedkommende har ikke lagt merke til at det ikke lenger kommer slike svar.
 - o Fra de to andre sykehusene med infeksjonsmedisinere angis at man ikke har lagt merke til at det ikke kommer svar på typebestemmelse, og at dette ikke har noen betydning.
- Allmennpraktikere: Vi har forespurt Vestre Vikens praksiskonsulenter som har diskutert dette på møte og angir at de ikke har lagt merke til at det ikke kommer svar på typebestemmelse og at dette heller ikke er noe ønske.
- Smittevernlegen i Drammen har ikke behov for typebestemmelse da dette ikke anvendes.

Basert på våre erfaringer og den uformelle undersøkelsen virker det ikke å ha noen vesentlig betydning for kliniker om man utgir svar på typebestemmelse for *Salmonella*.

Yersinia: Identifikasjon til artsnivå er essensielt for vurdering av patogenesitet.

Campylobacter: Vi påviser *Campylobacter* species ved PCR og dyrker ikke. Nærmere identifikasjon ville bety betydelig merarbeid, og vi har ikke holdepunkt for at kjennskap til art har betydning for behandling eller smittevern. Dersom arbeidsmetode er slik at identifikasjon til artsnivå ikke medfører merarbeid synes det imidlertid ikke urimelig å angi art.

Shigella: I likhet med *Salmonella* har det neppe vesentlig betydning for kliniker med kjennskap til artsbestemmelse. Dersom arbeidsmetode er slik at identifikasjon til artsnivå ikke medfører merarbeid, synes det imidlertid ikke urimelig å angi art.

Hva trenger vi selv?





Didaktisk... faglig stolthet.....

Hva trenger andre?

Elektroniske meldinger => nasjonal mikrobiologidatabase i framtida?

Anbefaling til strategimøtet: Fortsette detaljert utsvaring.

<p style="text-align: right;"></p> <h2 style="text-align: center;">Detaljeringsgrad ved ut-svaring, hva trenger kliniker, vi selv og andre?</h2> <p style="text-align: center;">Pål Jenum, Einar Weme, Astrid L. Wester</p>	<h2 style="text-align: center;">Salmonella (Pål)</h2> <ul style="list-style-type: none"> • Vi gir nå kun ut Salmonella og ettersender ikke nytt svar med type når vi får svar fra ref.lab <ul style="list-style-type: none"> – på dette halvåret ikke fått noen tilbakemeldinger med ønske om typebestemmelse. • Typhi/Paratyphi behandles særskilt og rapporteres på basis av VITEK-ID og Vi agglutinasjon (nytt svar Pål?)
<h2 style="text-align: center;">Uformell sp.us. Vestre Viken (Einar T. Weme)</h2> <ul style="list-style-type: none"> • Vestre Vikens infeksjonsmedisinere: <ul style="list-style-type: none"> – én infeksjonsmedisinere angir at typebestemmelse er faglig interessant, selv om det ikke får praktisk konsekvens utover en teoretisk mulighet for å kunne oppdage utbrudd. Vedkommende har ikke lagt merke til at det ikke lenger kommer slike svar. – Fra de to andre sykehusene med infeksjonsmedisinere angis at man ikke har lagt merke til at det ikke kommer svar på typebestemmelse, og at dette ikke har noen betydning. • Vestre Vikens praksiskonsulenter (allm.med) som har diskutert dette på møte og angir at de ikke har lagt merke til at det ikke kommer svar på typebestemmelse og at dette heller ikke er noe ønske. • Smittevernlegen i Drammen har ikke behov for typebestemmelse da dette ikke anvendes. 	<h2 style="text-align: center;">Trenger virkelig ikke kliniker dette?</h2> <ul style="list-style-type: none"> • Tjei? • Pasientjournal – dokumentasjon....
<h2 style="text-align: center;">Campylobacter (Pål)</h2> <ul style="list-style-type: none"> • Campylobacter rapporteres vanligvis bare med species ut fra PCR • det dyrkes for res.bestemmelse <ul style="list-style-type: none"> – opplysning om behandlingssvikt, – eventuelt spesielt alvorlig infeksjon/inneliggende pasient 	<h2 style="text-align: center;">Yersinia enterocolitica (Pål)</h2> <ul style="list-style-type: none"> • PCR screening <ul style="list-style-type: none"> – sekvens fra gyrB som iflg Roche skal være spesifikt for enterocolitica. Ingen av våre PCR-positive har i ettertid vist seg å være annen art • Alle pos funn dyrkes, agglutineres O:3 og O:9 <ul style="list-style-type: none"> – indikere human patogenitet

<h3>Shigella (Pål)</h3> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• PCR-påvisning av <i>ipaH</i>-genet som også finnes hos EIEC• Alle pos funn dyrkes<ul style="list-style-type: none">– Resistenstesting– ID: De ulike <i>Shigella</i>-species gir lignende sykdomsbilde. 	<h3>Hva trenger vi selv?</h3> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Faglig stolthet• Opplæringsøyemed• Vanskelig å slå opp/ikke gå i surr v. spørsmål<ul style="list-style-type: none">– Fra ref.lab– Fra smittevern (som kan ha vært i kontakt med FHI) 
<h3>Hva trenger andre?</h3> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Framtidig sanntidsregister basert på XML-meldinger fra lab 	<h3>Anbefalinger</h3> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Beholde detaljeringsgrad inntil videre 

Identifikasjon med MALDI TOF MS

André Ingebretsen, Oslo universitetssykehus

De senere årene har identifikasjon av mikroorganismer ved hjelp av massespektrometri erstattet mange av de eldre, fenotypiske identifikasjonstestene. Noen av fordelene ved å identifisere bakterier ved bruk av MALDI TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) er metodens kostnad, hurtighet, sensitivitet og reproduserbarhet. Som for alle automatiske og semiautomatiske identifikasjonssystemer er man helt avhengig av kvaliteten på identifikasjonssystemets spekterdatabase for å få gode identifikasjoner. Kommersielle spekterdatabaser finnes det flere av, men som oftest brukes spekterdatabaser som er knyttet til leverandøren av selve MS-instrumentet. Databasene varierer i størrelse og oppbygging avhengig av leverandør.

Det er rapportert at MALDI TOF MS er et godt verktøy til å identifisere enteropatogene mikrober, men med noen unntak (1).

For generelt å bedre identifikasjonen av mikroorganismer så velger laboratorier å supplere kommersielle databaser med sine egne databaser(2).

***E.coli* og *Shigella* sp.** Det er kjent at MALDI TOF MS ikke kan skille disse artene fra hverandre. Man er dermed avhengig av supplerende informasjon for å kunne identifisere disse artene. Nylig har det blitt rapportert at man ved å generere en MSP database basert på MLVA profiler av *E.coli* og *Shigella* sp. vil kunne skille disse fra hverandre(3). Også ved å lete etter spesifikke protein biomarkører kan man ikke bare skille disse artene, men også subtype *E.coli*(4-6).

***Salmonella* sp.** *Salmonella enterica* lar seg identifisere til artsnivå ved MALDI TOF MS. Metoden viser potensial til subtyping og har blitt brukt til å skille *Salmonella enterica* serovar *typhi* fra andre serovar (7) og identifisere serovar innenfor *Salmonella enterica* subsp *enterica*(8).

***Campylobacter* sp.** *Campylobacter* sp. lar seg også godt identifisere ved hjelp av MALDI TOF MS(9), men det har blitt rapportert variasjon i identifiseringsscore under ulike vekstbetingelser(10).

***Yersinia* sp.** MALDI TOF MS identifiserer *Yersinia enterocolitica*, men best resultater får man ved å bygge sin egen database (11). Folkhälsomyndigheten i Sverige har utviklet en egen metode for subtyping av *Yersinia enterocolitica*, men anbefaler bruk av biokjemiske tester for å skille biotype 1A og 1B(12).

Det er generelt få MSP av ***Vibrio cholerae*** i de kommersielle databasene. Det anbefales å supplere med sine egne MSP eller bruke andre tilgjengelige databaser(13).

En rekke andre mikrober som kan assosieres med gastroenteritt (***Aeromonas* sp, Clostridium sp, Plesiomonas shigelloides, Bacillus sp**) identifiseres i ulik grad. Det hele avhenger av kvaliteten og størrelsen på spekterdatabasen og i noe mindre grad av ekstraksjonsprotokoll. Ergo vil den stadig voksende spekterdatabasen føre til stadig bedre identifikasjon av mikroorganismer.

Anbefaling til Strategimøtet: MALDI TOF egner seg for identifikasjon av *Salmonella enterica* (men ikke serovar) og *Campylobacter species*, noe usikkert for *Yersinia enterocolitica*. Metodikken skiller ikke mellom *E. coli* og *Shigella*, og gir usikker identifikasjon for andre tarmpatogene bakterier. For disse må det suppleres med tradisjonelle identifiseringsmetoder.

Referanser

1. Deng J, Fu L, Wang R, Yu N, Ding X, Jiang L, et al. Comparison of MALDI-TOF MS, gene sequencing and the Vitek 2 for identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens. *Journal of Thoracic Disease*. 2014;6(5):539-44.
2. Schaumann R, Knoop N, Genzel GH, Losensky K, Rosenkranz C, Stîngu CS, et al. Discrimination of Enterobacteriaceae and Non-fermenting Gram Negative Bacilli by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *The Open Microbiology Journal*. 2013;7:118-22. PubMed PMID: PMC3722536.
3. Paauw A, Jonker D, Roeselers G, Heng JM, Mars-Groenendijk RH, Trip H, et al. Rapid and reliable discrimination between *Shigella* species and *Escherichia coli* using MALDI-TOF mass spectrometry. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2015 Jun-Aug;305(4-5):446-52. PubMed PMID: 25912807. Epub 2015/04/29. eng.
4. Khot PD, Fisher MA. Novel approach for differentiating *Shigella* species and *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013 Nov;51(11):3711-6. PubMed PMID: 23985919. Pubmed Central PMCID: PMC3889755. Epub 2013/08/30. eng.
5. Ojima-Kato T, Yamamoto N, Suzuki M, Fukunaga T, Tamura H. Discrimination of *Escherichia coli* O157, O26 and O111 from other serovars by MALDI-TOF MS based on the S10-GERMS method. *PLoS One*. 2014;9(11):e113458. PubMed PMID: 25411793. Pubmed Central PMCID: PMC4239071. Epub 2014/11/21. eng.
6. Christner M, Trusch M, Rohde H, Kwiatkowski M, Schluter H, Wolters M, et al. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2014;9(7):e101924. PubMed PMID: 25003758. Pubmed Central PMCID: PMC4087019. Epub 2014/07/09. eng.
7. Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W, Zimmermann O, Weig M, Bader O, et al. Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar Typhi from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*. 2012;7(6):e40004. PubMed PMID: 22768195. Pubmed Central PMCID: PMC3386914. Epub 2012/07/07. eng.
8. Dieckmann R, Malorny B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and environmental microbiology*. 2011 Jun;77(12):4136-46. PubMed PMID: 21515723. Pubmed Central PMCID: PMC3131644. Epub 2011/04/26. eng.
9. Bessedé E, Solecki O, Sifre E, Labadi L, Megraud F. Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011 Nov;17(11):1735-9. PubMed PMID: 21375659. Epub 2011/03/08. eng.
10. Martiny D, Visscher A, Catry B, Chatellier S, Vandenberg O. Optimization of *Campylobacter* growth conditions for further identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Journal of microbiological methods*. 2013 9//;94(3):221-3.
11. Stephan R, Cernela N, Ziegler D, Pfluger V, Tonolla M, Ravasi D, et al. Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of microbiological methods*. 2011 Nov;87(2):150-3. PubMed PMID: 21914454. Epub 2011/09/15. eng.
12. Rizzardi K, Wahab T, Jernberg C. Rapid Subtyping of *Yersinia enterocolitica* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for Diagnostics and Surveillance. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 December 1, 2013;51(12):4200-3.
13. Erler R, Wichels A, Heinemeyer EA, Hauk G, Hippelein M, Reyes NT, et al. VibrioBase: A MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans. *Systematic and applied microbiology*. 2015 Feb;38(1):16-25. PubMed PMID: 25466918. Epub 2014/12/04. eng.

IDENTIFIKASJON AV ENTEROPATOGENE MIKROBER VED HJELP AV MALDI TOF MS.

André Ingebretsen
Oslo universitetssykehus
Avd. for mikrobiologi og Avd. for smittevern

Noen punkter å tenke på

1. Vekstbetingelser
2. Identifikasjon med modifikasjon
3. "Open source" databaser

Vekstbetingelser

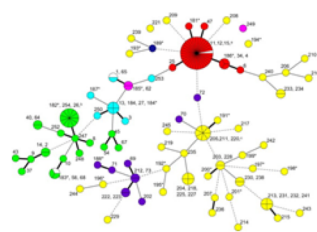
	n1	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	
Species	<i>C. jejuni</i>	60	60	57	56	41	36
	<i>C. coli</i>	40	35	36	32	33	34
Atmosphere	Air	50	49	45	45	38	34
	Incubator	50	49	45	42	35	35
Temperature	27 ° C	50	49	44	45	40	45
	42 ° C	50	49	49	45	34	27
Medium	Columbia	20	20	17	16	15	14
	CampyBAP	20	20	20	20	19	16
	CampyESof	20	20	20	16	15	15
	Karmali	20	16	20	16	14	16
	Butalar	20	20	16	16	11	9

Martiny et al. 2013. J Microb. Methods. 94: 221-223.

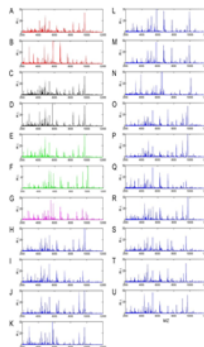
Modifikasjoner

- Egne MSPs i egen database
- Forskjellig vektning av forskjellige toppler
- Bruk av annen programvare (ClinProTools, Bionumerics, MATLAB)

Skille mellom *E.coli* og *Shigella* sp.



Paauw et al. 2015. Int.J.Med.Microb.

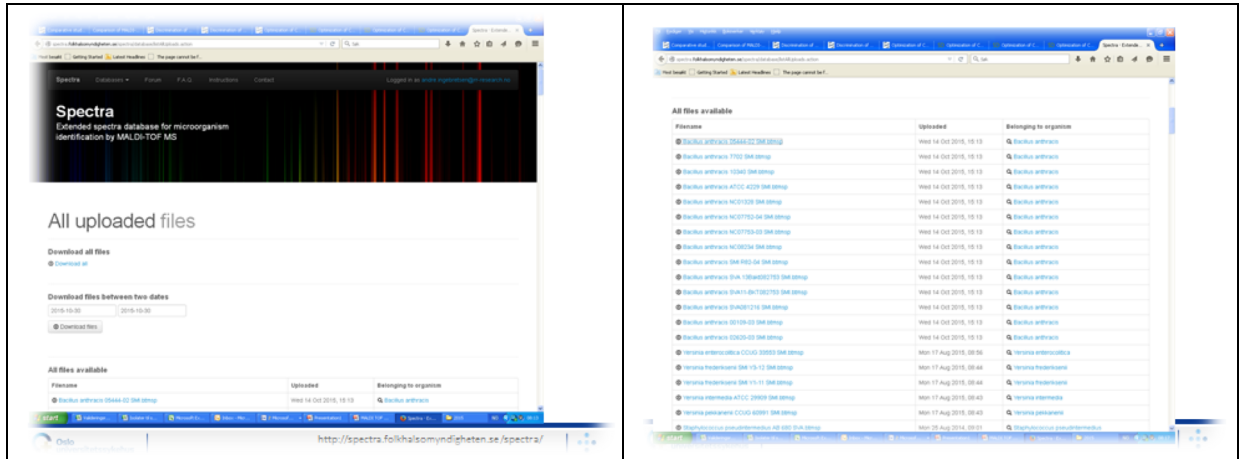


Skille mellom *E.coli* og *Shigella* sp.

Bacteria	No. of isolates	Correct	Incorrect	Indecisive
<i>E. coli</i>	64	60 (93.8%)	1 (1.6%)	3 (4.7%)
<i>Shigella</i> sp.	116	110 (94.8%)	5 (4.3%)	1 (0.9%)
Total	180	170 (94.4%)	6 (3.3%)	4 (2.2%)

Paauw et al. 2015. Int.J.Med.Microb.

Anbefalinger: utvalg av tester



BD Phoenix ved identifikasjon av tarmpatogene bakteriar

Reidar Hjetland, Helse Førde

Om Phoenix 100

Phoenix 100 ID/AST-systemet (Becton Dickinson Co., Sparks, Md.) er eit automatisert system for identifikasjon og resistensbestemming av bakteriar. Det nyttar fenotypiske testar i sine panel, og det er det Gram-negative panelet som er aktuelt for tarmpatogene bakteriar.

Av aktuelle tarmpatogene agens inngår i dette panelet *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* og *Vibrio* spp. *Campylobacter* inngår ikkje.

Aktuelle studiar

Den mest fullstendige studien av dette panelet i høve til tarmpatogene bakteriar (1) fann:

Bakterie	n	Korrekt species	Kun genus	Mis-lukka	Feil	Komm.
Enterobacteriaceae generelt	507	456 (89,9)	10 (3,9)			
E. coli	30	29 (96,7)			1 (3,3)	
Salmonella	34	26 (76,5)	1 (2,9)	1 (2,9)	7 (20,6)	7/34 identif. som <i>E. coli</i>
Shigella	10	6 (60)			4 (40)	
Yersinia	24	18 (66,7)	6 (33,3)			2/11 <i>Y. enterocolitica</i> feilid. som <i>Y. fredriksenii</i>
Aeromonas	10	6 (60)	4 (40)			
Plesiomonas shigelloides	10	10 (100)				
Vibrio (inkl. ikkje tarmpatogene)	138	123 (89,1)	7 (5,1)	3 (2,2)	5 (3,6)	

Forfattaren av denne studien konkluderer med at Phoenix ikkje er eigna til identifikasjon av tarmpatogene bakteriar, då det ikkje oppnår 90% korrekt identifikasjon.

I andre studier inngår tarmpatogener i mindre tal.

Eigne røynslar:

Ved Førde Sentralsjukehus vert Phoenix ikkje rutinemessig nytta ved identifikasjon av *Salmonella*, men har blitt brukt ved *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Aeromonas* og *Plesiomonas*.

I 8 SLP-prøvar har det vore feil i 2 (*Vibrio* og *Shigella*)

Cumitech: I USA seier Humphrey et al (2) i Laboratory Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis, ein oppdatering av Cumitech 12A generelt om automatiserte identifikasjonssystem at «Isolates that yield reactions consistent with enteropathogens on these secondary screening media are further identified using either a manual identification system such as API 20E or an auto-mated identification system such as MicroScan, Vitek2, Phoenix, MALDI-TOF MS, etc. These systems perform well at identifying some enteropathogens but fall short for others. For instance, commercial systems are notoriously poor at the correct identification of *Vibrio* species to both the genus and species levels»

Anbefaling til Strategimøtet:

Phoenix bør ikkje brukast som einaste fenotypiske identifikasjon av tarmpatogene agens. Den kan evt. brukast som supplement til andre metodar (3-røyr-forgjæring o.l.), men då med kritisk vurdering av resultatet opp mot klinikk og andre testar. Referanselaboratorium bør nyttast liberalt.

Litteratur:

1. O'Hara CM. Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST system and NID panel for identification of Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, and commonly isolated nonenteric gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2006;44(3):928-33.
2. Humphries RM, Linscott AJ. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. Clinical microbiology reviews. 2015;28(1):3-31

<div data-bbox="413 696 569 806" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="256 853 740 929" style="text-align: center;">Automatisert identifikasjon – pitfalls Phoenix</p> <p data-bbox="395 943 608 1043" style="text-align: center;">Strategimøtet 30.10.15 Reidar Hjetland Mikrobiologisk avdeling Helse Førde</p>	<p data-bbox="970 703 1259 739" style="text-align: center;">Phoenix 100 ID/AST</p> <ul data-bbox="858 770 1369 1055" style="list-style-type: none"> • Becton Dickinson Co. • Automatisert system for identifikasjon og resistensbestemming av bakteriar. <ul style="list-style-type: none"> – Det nyttar fenotypiske testar i sine panel – Gram-negativt panel NID er aktuelt for tarmpatogene bakteriar. <ul style="list-style-type: none"> • 45 ulike substrat. Fluorescens og kolorimetrisk. 2-12 timar • E. coli, Salmonella, Shigella, Yersinia, Aeromonas, Plesiomonas og Vibrio spp. • Campylobacter inngår ikkje. • Oppgir 1 (og kun 1) ID når $\geq 90\%$ sannsynleg <p data-bbox="1369 1077 1377 1088" style="text-align: right;">2</p>																																																															
<p data-bbox="384 1167 619 1202" style="text-align: center;">Aktuelle studiar</p> <p data-bbox="237 1238 598 1258">Kun ein omfattande studie for tarmpatogene</p> <p data-bbox="264 1263 724 1319">O'Hara CM. Evaluation of the Phoenix 100 ID/AST system and NID panel for identification of Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, and commonly isolated nonenteric gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2006;44(3):928-33.</p> <p data-bbox="237 1352 659 1373">Ein guideline som omfattar automatiserte id-system</p> <p data-bbox="264 1377 730 1415">Cumitech 12A: Humphries RM, Linscott AJ. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. Clinical microbiology reviews. 2015;28(1):3-31.</p> <p data-bbox="237 1449 715 1516">Elles finst det ei rekke studiar der div. tarmpatogene inngår saman med mange andre Gram-negative. For små tal for tarmpatogene til å konkludere.</p> <p data-bbox="756 1547 764 1559" style="text-align: right;">3</p>	<p data-bbox="1026 1167 1211 1202" style="text-align: center;">O'Hara 2006</p> <table border="1" data-bbox="852 1234 1380 1547"> <thead> <tr> <th>Bakterie</th> <th>n</th> <th>Korrekt species</th> <th>Kun genus</th> <th>Mis-lukka</th> <th>Feil</th> <th>Komm.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Enterobacteriaceae generelt</td> <td>507</td> <td>456 (89,9)</td> <td>10 (3,9)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>E. coli</td> <td>30</td> <td>29 (96,7)</td> <td></td> <td></td> <td>1 (3,3)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Salmonella</td> <td>34</td> <td>26 (76,5)</td> <td>1 (2,9)</td> <td>1 (2,9)</td> <td>7 (20,6)</td> <td>7/34 identif. som E. coli</td> </tr> <tr> <td>Shigella</td> <td>10</td> <td>6 (60)</td> <td></td> <td></td> <td>4 (40)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Yersinia</td> <td>24</td> <td>18 (66,7)</td> <td>6 (33,3)</td> <td></td> <td></td> <td>2/11 Y. enterocolitica feilid. som Y. frederiksenii</td> </tr> <tr> <td>Aeromonas</td> <td>10</td> <td>6 (60)</td> <td>4 (40)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Plesiomonas shigelloides</td> <td>10</td> <td>10 (100)</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Vibrio (inkl. ikkje tarmpatogene)</td> <td>138</td> <td>123 (89,1)</td> <td>7 (5,1)</td> <td>3 (2,2)</td> <td>5 (3,6)</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="1369 1547 1377 1559" style="text-align: right;">4</p>	Bakterie	n	Korrekt species	Kun genus	Mis-lukka	Feil	Komm.	Enterobacteriaceae generelt	507	456 (89,9)	10 (3,9)				E. coli	30	29 (96,7)			1 (3,3)		Salmonella	34	26 (76,5)	1 (2,9)	1 (2,9)	7 (20,6)	7/34 identif. som E. coli	Shigella	10	6 (60)			4 (40)		Yersinia	24	18 (66,7)	6 (33,3)			2/11 Y. enterocolitica feilid. som Y. frederiksenii	Aeromonas	10	6 (60)	4 (40)				Plesiomonas shigelloides	10	10 (100)					Vibrio (inkl. ikkje tarmpatogene)	138	123 (89,1)	7 (5,1)	3 (2,2)	5 (3,6)	
Bakterie	n	Korrekt species	Kun genus	Mis-lukka	Feil	Komm.																																																										
Enterobacteriaceae generelt	507	456 (89,9)	10 (3,9)																																																													
E. coli	30	29 (96,7)			1 (3,3)																																																											
Salmonella	34	26 (76,5)	1 (2,9)	1 (2,9)	7 (20,6)	7/34 identif. som E. coli																																																										
Shigella	10	6 (60)			4 (40)																																																											
Yersinia	24	18 (66,7)	6 (33,3)			2/11 Y. enterocolitica feilid. som Y. frederiksenii																																																										
Aeromonas	10	6 (60)	4 (40)																																																													
Plesiomonas shigelloides	10	10 (100)																																																														
Vibrio (inkl. ikkje tarmpatogene)	138	123 (89,1)	7 (5,1)	3 (2,2)	5 (3,6)																																																											

O'Hara 2006, forts.

- Forfattere konkluderer med at Phoenix ikkje er eigna til identifikasjon av tarmpatogene bakteriar, då det ikkje oppnår 90% korrekt identifikasjon.

Eigne røymsler

- Ved Førde Sentralsjukehus vert Phoenix ikkje rutinemessig nytta ved identifikasjon av Salmonella, men har blitt brukt ved Shigella, Yersinia, Vibrio, Aeromonas og Plesiomonas.
- I 8 SLP-prøvar har det vore feil i 2 (Vibrio og Shigella)

Aktuelle ringtestar Førde

UKNEOAS	Fasit	Phoenix-100	
3596-2430	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Alle Phoenix korrekt
3596-2430	<i>Aeromonas hydrophila/veronii</i>	<i>Aeromonas sobria</i>	Sjåprøve Alle Phoenix korrekt
3554-2295	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella sonnei</i>	
3541-2252	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Alle Phoenix korrekt
3514-2174	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i> 90%	Metode: <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 90%
3463-2012	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Metode: <i>Y. enterocolitica</i> (API 20E: <i>Y. pestis</i>)
3377-1884	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	Sjåprøve
Fre			
4/2014-592	<i>Yersinia enterocolitica</i> O9	<i>Yersinia enterocolitica</i>	

Cumitech 12A (Humphrey et al 2015)

«Isolates that yield reactions consistent with enteropathogens on these secondary screening media are further identified using either a manual identification system such as API 20E or an auto-mated identification system such as MicroScan, Vitek2, Phoenix, MALDI-TOF MS, etc. These systems perform well at identifying some enteropathogens but fall short for others. For instance, commercial systems are notoriously poor at the correct identification of *Vibrio* species to both the genus and species levels»

Forslag til konklusjon

Phoenix bør ikkje brukast som einaste fenotypiske identifikasjon av tarmpatogene agens. Den kan evt. brukast som supplement til andre metodar (3-røyr-forgjæring o.l.), men då med kritisk vurdering av resultatet opp mot klinikk og andre testar. Referanselaboratorium bør nyttast liberalt.

Dyrkningsbasert diagnostikk

Haima Mylvaganam, Haukeland Universitetssykehus

Dyrkning er viktig for å få tak i de patogene bakterie-isolatene for videre karakterisering, inkludert identifikasjon av serovar/serogrupper som er assosiert med sykdom og eventuell resistensbestemmelse. I tillegg er isolatene tilgjengelige for type-bestemmelse med henblikk på epidemiologi og eventuell utbruddsavklaring samt spesialundersøkelse knyttet til virulens og lignende. Derfor kan dyrkning ikke erstattes av de nukleinsyre-basert metodene for patogen identifikasjon (1).

Generelt, gjelder fremdeles anbefaling fra strategirapporten fra 1996 om dyrkningsdiagnostikk, som samsvarer med anbefaling i andre europeisk land samt WHO (2,3,4,5). Utviklingene i metoder for identifikasjon i de siste 19 årene har ført til en hurtigere og enklere identifikasjon av tarmpatogene bakterier. De fleste laboratoriene vil ha gått fra manuelt oppsett av biokjemiske reaksjoner til systematiserte biokjemiske tester (API-20E/Vitek/lignende) eller protein-basert diagnostikk (MALDI-TOF) og bruker supplerende nukleinsyrebasert diagnostikk (16S rDNA sekvensering, D-tartrat gen påvisning). Likevel brukes biokjemiske tester i noen spesielle tilfeller hvor de nye metoder ikke kommer til mål (eks. for å skille mellom laktose negative E.coli og Shigella). Selektive medier som bruker biokjemiske egenskaper for hurtig identifikasjon av tarmpatogene bakterier er kommersielt tilgjengelig, og kan være nyttig ved utbrudd (eks. C. difficile, Salmonella), men disse må valideres før de tas i bruk.

Påvisning av toksiner (eks. EHEC, C. difficile), virulensfaktorer eller genene som koder for disse (eks. stx1/stx2, eae, bfp hos diarrè fremkallende E. coli) er en viktig del av patogen identifikasjon. Påvisning av disse patogene/virulens-egenskapene fra kolonier har høyere sensitivitet og spesifisitet enn testing direkte fra avføring. Direkte påvisning fra prøver, som gir et hurtigere svar, bør kombineres med samtidig dyrkning, for å få både hurtig identifikasjon og god sensitivitet og spesifisitet (6).

Seleksjon (immunomagnetisk separasjon (IMS), selektive medier) av relevante serogrupper innen en species (eks. EHEC), etterfulgt av videre dyrkning og identifikasjon kan være en fordel, særlig ved lave konsentrasjoner av patogene bakterier eller når disse er blandet med ikke-patogene bakterier (7), men er kanskje lite relevant for kliniske prøver med antatt høyt antall patogene bakterier.

Den oppdaterte versjon av Strategimøterapporten, dreier seg om tarmpatogene E. coli (EHEC og EPEC) som viser til et stadig økende antall av EHEC infeksjoner i 2007 i Norge. Utvidet indikasjoner for undersøkelse med henblikk på EHEC og EHEC-LST finnes på side 96 i rapporten. Informasjon via litteratursøk er i samsvar med dette men det kommer også frem at EHEC undersøkelsen ikke bør begrenses til blod i avføring, bestemt aldersgruppe eller sesonger (5). Videre er det belyst i rapporten at andre serogrupper enn O157:H7 har blitt assosiert med EHEC infeksjon i de siste årene, og undersøkelsen for kun O157:H7 vil dekke kun en tredje del av alle EHEC tilfellene. Derfor bør vi ha en lav terskel for EHEC undersøkelse, primær utsæd på et selektivt medium som laktoseskål og eventuelt et anrikningsmedium for E. coli, og diagnostikken bør baseres først på identifikasjon av E. coli, påvisning av toksiner eller toksin-genene, og deretter skal EHEC isolatet serotypes.

Det ønskes å presisere behov for å bli løpende oppdatert innen tarminfeksjoner, inkludert utbruddssituasjoner, endring i epidemiologi, som påvirker fecesdiagnostikk, som for eksempel referansen publisert i 2015 om Cholera vibrio (8). Med stadig økende antall av immunsupprimerte pasienter, bør undersøkelsen for Plesiomonas foretas. Det stilles stadig spørsmål stadig om identifikasjon av Listeria monocytogenes i avføring. Dette anbefales ikke som indikator for Listeriose (9,10). Toksinproduserende C. difficile bør dyrkes med tanke på typing/epidemiologi. Undersøkelse for moxifloxacin resistens kan anvendes som grov markør for CD027, men krever konfirmasjon med toksinbestemmelse og PCR-ribotyping.

Anbefaling til Strategimøtet:

Dyrkningsbasert diagnostikk er viktig for videre karakterisering som er nødvendig for å kunne si noe om risiko for alvorlig sykdom, for deteksjon av utbrudd, og i smittevernøyemed. Dyrkningsuavhengig screening bør derfor etterfølges av dyrkningsbasert isolering og karakterisering. Hovedprinsippene fra 1996-rapporten kontinueres.

Referanser:

1. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6409a4.htm>
2. <http://dskm.dk/Mave-tarminfeksjoner-2012.pdf>
3. <http://referensmetodik.folkhalsomyndigheten.se/w/Huvudsida#Infektionsdiagnostik>
4. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/343955/B_30i_8.1.pdf
5. <http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/protocols/gfn%20stool%20culture-nov2010.pdf>
6. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5812a1.htm>
7. <http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/protocols/e%20coli%20methods.pdf>
8. Updated Global Burden of Cholera in Endemic Countries. Mohammad Ali , Allyson R. Nelson, Anna Lena Lopez, David A. Sack. Published: PLOS Neglected tropical diseases. June 4, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003832
9. <http://www.acog.org/Resources-And-Publications/Committee-Opinions/Committee-on-Obstetric-Practice/Management-of-Pregnant-Women-With-Presumptive-Exposure-to-Listeria-monocytogenes>
10. <http://www.cdc.gov/listeria/diagnosis.html>



Dyrkningsbasert fæces-diagnostikk

Hvorfor må vi fortsette med dyrkning

- Isolasjon av patogene bakterier
 - Påvisning av protein/gener for toksiner/virulensfaktorer
 - Resistensbestemmelse
 - Utbruddsundersøkelse

Endringer fra forrige strategimøte

- Lettere og hurtigere artsidentifikasjon
- "Emerging" infeksjoner, eks. *C. upsaliensis*, *Plesiomonas*
- Lettere tilgang til oppdatert epidemiologisk situasjon nasjonalt og internasjonalt (MikInfo; ECDC/CDC/WHO)

Spesielle/spesifikke problemstillinger

- EHEC/STEC: Dersom ikke «flatscreening» er det avgjørende med kliniske opplysning
- Dyrkning av toksinproduserende *C. difficile*
- Screening for *Listeria* som indikator for Listeriose: Nei
- Seleksjon av bakterier (IMS): ansees ikke nødvendig for kliniske prøver



Dyrkning av EHEC/STEC

Indikasjon for undersøkelsen

- Flat screening?
- Blodig diare?
 - Hva om man påviser andre patogener som sannsynlig årsak til blodig diare?
- Alderskriterium?
 - Barn og eldre større risiko for alvorlig klinikk HUS

Medier

- Laktose-/MacConkey/ andre differensierende medier
 - Ved bruk av Sorbitol-skål må både sorbitol-negative og positive kolonier testes for toksiner assosiert med EHEC/STEC
- Anrikingsmedier for *E. coli*/seleksjon av bestemte serotypene assosiert med EHEC kan vurderes



Konklusjon

- Hovedprinsippene om dyrkningsbasert diagnostikk fra 1996-rapporten kontinueres
- Kultur-uavhengige metoder må valideres mot dyrkningsbasert diagnostikk
- Dyrkningsuavhengig screening bør etterfølges av dyrkningsbasert isolering og karakterisering av smittestoff
 - Dyrkningsbasert diagnostikk er gull-standard mht. spesifisitet
 - Vurdere risiko for alvorlig sykdom
 - Smittevern (deteksjon og oppfølging av utbrudd)



Resistensbestemmelse av enteropatogene bakterier - hvilke og hvordan?

Arnfinn Sundsfjord. Avd. for mikrobiologi og smittevern, Universitetsykehuset i Nord-Norge, Institutt for medisinsk biologi, Universitetet i Tromsø,

Generelle vurderinger

Resistensbestemmelse av sykdomsfremkallende bakterier kan ha flere formål:

1. Å sannsynliggjøre effekten av valgt antimikrobiell terapi hos enkeltpasienter.
2. Påvisning av utvalgte resistensmekanismer som kan kreve spesifikke smitteverntiltak
3. Epidemiologisk overvåking i en lokalt, nasjonalt og internasjonal kontekst og hvor resultatene danner grunnlag for empirisk bruk av antibiotika og spesifikke tiltak.

Pasientrelaterte indikasjoner for resistensbestemmelse er avhengig av det kliniske bildet og den aktuelle mikrobe. Behovet for en rask, veiledende resistensbestemmelse vil variere og være større for enteropatogene bakterier som kan forårsake invasiv sykdom slik som *Salmonella* og *Shigella* spp.. Hos slike bakterier kan også resistensprofilen være mindre forutsigbar på grunn av den økte forekomst av multiresistens hos Gram-negative tarmbakterier.

Det bør også kommenteres at rapportering av resultater fra resistensbestemmelser kan oppfattes som en oppfordring til bruk av antimikrobielle midler uten at det nødvendigvis foreligger indikasjon for behandling. Generell (alle undersøkte antibiotika) eller selektiv (utvalgte antibiotika) rapportering med veiledende kommentarer anbefales derfor.

Agardiffusjonsmetoden ad modum EUCAST anbefales som standardmetode for resistensbestemmelse med mindre spesifikke anbefalinger for enkeltspesies eller spesifikke kombinasjoner av bakterieart og enkeltantibiotika er angitt (1-3). Ulike MIC-metoder (buljongfortynning, gradienttest, agarfortynning) er i slike tilfeller aktuelle.

De enkelte enteropatogene bakterier: metoder og antibiotikavalg

Campylobacter

Behandling med antibakterielle midler er sjelden indisert ved *Campylobacter*ose. Ved påvirket allmenntilstand eller langvarig diaré anbefales erytromycin evt. azitromycin. Resistens mot fluorokinoloner er utbredt, men kan også brukes etter resistensbestemmelse. Resistensbestemmelse anbefales med selektiv rapportering.

Anbefalt metode: EUCAST agar-diskdiffusjonsmetode (1, 2).

Antibiotikapanel: Brytningspunkter for agar-diskdiffusjonsmetode er etablert for erytromycin, ciprofloxacin og tetracyklin. Følsomheten for azitromycin predikeres av erytromycin. Andre antibiotika vil også være aktuelt ved bakteriemi og er avhengig av korrekt spesiesdiagnostikk. Det henvises til spesiallitteratur (4, 5). *C. jejuni* og *C. coli* er resistente mot betalaktamantibiotika med unntak av imipenem. Ved behov for utvidet resistensbestemmelse må MIC-metode benyttes.

Helicobacter pylori

Det anses viktig at resistensmønsteret for *H. pylori* overvåkes da det vil kunne få konsekvenser for anbefalt terapi. Alle isolater bør resistensbestemmes.

Anbefalt metode: MIC-metode etter prosedyrer fra leverandør. Standardisert agar-diskdiffusjonsmetode er ikke etablert (1, 2).

Antibiotikapanel: amoxicillin, klaritromycin, levofloxacin, metronidazol, rifampicin, tertacyklin.

Salmonella

Salmonellaenteritter går ofte spontant over i løpet av noen dager og skal vanligvis ikke behandles med antibakterielle midler. Antibakterielle midler kan forlenge symptomer og indusere bærertilstand ved å påvirke tarmfloraen. Rutinemessig resistensbestemmelse av fekale Salmonellaisolater anbefales ikke for behandlingsformål. Eventuelt utføres resistensbestemmelse med selektiv rapportering og kommentar. Resistensforholdene er uforutsigbar på grunn av økende forekomst av multiresistens. Første- og andre generasjons cefalosporiner og aminoglykosider ansees ikke egnet i behandlingen av Salmonella-infeksjoner (4)

Typhoid- og Paratyphoid: Alle isolater skal resistensbestemmes og rapporteres så snart som mulig.

Anbefalt metode: Agardiffusjonsmetode (1, 2).

Antibiotikapanel: Ampicillin, trimetoprim-sulfametoxazol og ciprofloxacin som et minimum. Utvidet resistensbestemmelse med azitromycin, cefotaxim, ceftazidim og meropenem ved sykehusinnleggelse for påvisning av eventuell ESBL-produksjon som vil ha konsekvenser for terapi og smittevern. Ceftriaxone kan være et aktuelt preparat i behandlingen hos barn. Følsomheten for ceftriaxon følger følsomheten for cefotaxim.

Shigella

Symptomatiske Shigella-enteritter skal som hovedregel behandles med antibakterielle midler. Terapivalg avhenger av resistensforholdene. Multiresistente stammer er vanlig. Alle isolater bør derfor rapporteres med resistensbestemmelse. Første- og andre generasjons cefalosporiner og aminoglykosider ansees ikke egnet i behandlingen av Shigella-infeksjoner (4)

Anbefalt metode: Agardiffusjonsmetode (1, 2).

Antibiotikapanel: Ampicillin, trimetoprim-sulfametoxazol og ciprofloxacin som et minimum. Utvidet resistensbestemmelse med azitromycin, cefotaxim, ceftazidim og meropenem ved sykehusinnleggelse for påvisning av eventuell ESBL-produksjon som vil ha konsekvenser for terapi og smittevern. Ceftriaxone kan være et aktuelt preparat i behandlingen av hos barn. Følsomheten for ceftriaxon følger følsomheten for cefotaxim.

Yersinia

Ved ukompliserte enteritter foreligger ikke sikre indikasjoner for antibiotikabehandling. Resistensbestemmelse anbefales med selektiv rapportering og veiledende kommentar. *Y. enterocolitica* har kromosomale betalaktamaser som gjør de iboende resistente overfor penicilliner (4).

Anbefalt metode: Agardiffusjonsmetode (1, 2).

Antibiotikapanel: cefotaxime, ciprofloxacin, gentamicin, kloramfenikol, tetracyklin, og trimetoprim-sulfametoxazol.

Clostridium difficile

I lette tilfeller bør man seponere all antibakteriell behandling. I moderate til alvorlige tilfeller kan man gi metronidazol. Ved behandlingssvikt og i mer alvorlige tilfeller anbefales vankomycin peroralt eller fidaksomicin.

Anbefalt metode: brytningspunkter for agardiffusjonsmetode er ikke etablert. MIC-metode anbefales (1, 2).

Antibiotikapanel: metronidazol og vankomycin.

Andre bakteriearter: Plesiomonas, Aeromonas, Vibrio

Behovet for resistensbestemmelse må vurderes i de enkelte tilfeller i forhold til den kliniske problemstillingen. Species-spesifikke brytningspunkter er ikke angitt. Bruk av MIC-metode og farmakologiske, arts-uavhengige brytningspunkter anbefales (1-2).




Anbefalinger til Strategimøtet:

Generell (alle undersøkte antibiotika) eller selektiv (utvalgte antibiotika) rapportering med veiledende kommentarer anbefales. EUCAST-metodikk anbefales.

- *C. jejuni* og *C. coli*: agar-diskdiffusjonsmetode, erytromycin, ciprofloxacin og tetracyklin
- *H. pylori*: MIC-metode, amoxicillin, klaritromycin, levofloxacin, metronidazol, rifampicin, tertacyklin
- Salmonella og Shigella: agar-diskdiffusjonsmetode, ampicillin, trimetoprim-sulfametoxazol ciprofloxacin, azitromycin, cefotaxim, ceftazidim og meropenem
- *Yersiniaenterocolitic*: agar-diskdiffusjonsmetode trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacin, cefotaxime, gentamicin, kloramfenikol, tetracyklin
- *Cl. Difficile*: MIC-metode uten etablerte brytepunkter, metronidazol og vankomycin

Referanser

1. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. <http://www.eucast.org/>
2. Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - NordicAST. <http://www.nordicast.org/>
3. Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål – AFA. <http://www.unn.no/afa/category10274.html>
4. Manual of Clinical Microbiology 11 Ed. Jorgensen JH et al. (Editors), ASM Press 2015.
5. Ge B et al. Antimicrobial resistance in Campylobacter: susceptibility testing methods and resistance trends. J Microbiol Methods 2013;95:57-67

<p>RESISTENSBESTEMMELSE – gjennomføres og rapporteres på HVILKE?</p> <p>Strategimøte i bakteriologi, Oslo, 30 oktober 2015</p> <p>Arnfinn Sundsfjord</p> <p>    </p>	<p style="text-align: center;">Resistensbestemmelse formål, metoder og rapportering</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formål: <ul style="list-style-type: none"> – Veiledning for valg av antibiotika – Smittevernhensyn – Overvåkning • Metoder: <ul style="list-style-type: none"> – EUCAST disk diffusjonsmetode (EUCAST-dd) – MIC-metoder – AFAs anbefalte resistenspaneler • Rapportering: ja, nei, selektiv med kommentar
--	---

<p style="text-align: center;">Salmonella</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test: Ja, EUCAST-dd • Hvilke: <ul style="list-style-type: none"> – AFA - standard: cefotaxim, ceftazidim, meropenem, ciprofloxacin, trim-sulfa – Utvidet: ceftriaxon, azitromycin (MIC) , kloramfenikol, ciprofloxacin (MIC/perfloxacin) • Rapporteres: <ul style="list-style-type: none"> – Para-/typhoid: Ja – Non-typhoid: <ul style="list-style-type: none"> • Nei /Ja: selektivt med kommentar? 	<p style="text-align: center;">Shigella</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test: Ja, EUCAST-dd • Hvilke: <ul style="list-style-type: none"> – AFA - standard: cefotaxim, ceftazidim, meropenem, ciprofloxacin, trim-sulfa – Utvidet: ceftriaxon, azitromycin (MIC) , kloramfenikol, ciprofloxacin (MIC) • Rapporteres: <ul style="list-style-type: none"> – Ja – Ja: selektivt med kommentar?
<p style="text-align: center;">Yersinia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test: Ja, EUCAST-dd • Hvilke: <ul style="list-style-type: none"> – AFA - standard: cefotaxim, ceftazidim, meropenem, ciprofloxacin, trim-sulfa – Utvidet: ceftriaxon, azitromycin (MIC) , kloramfenikol, ciprofloxacin (MIC) • Rapporteres: <ul style="list-style-type: none"> – Nei – Ja: selektivt med kommentar? 	<p style="text-align: center;">Campylobacter (<i>coli og jejuni</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test: Ja, EUCAST-dd • Hvilke: <ul style="list-style-type: none"> – AFA: Erytromycin, ciprofloxacin – Ved bakteriemi: <ul style="list-style-type: none"> • Korrekt ID + utvidet panel med MIC-metode • Rapporteres: <ul style="list-style-type: none"> – Nei – Ja: med kommentar
<p style="text-align: center;">Clostridium difficile</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test: <ul style="list-style-type: none"> – selektivt ved terapivikt/residiv? – MIC-metode • Hvilke: <ul style="list-style-type: none"> – Vankomycin, metronidazol • Rapporteres: <ul style="list-style-type: none"> – Ja: med kommentar 	<p style="text-align: center;">ANDRE Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test: <ul style="list-style-type: none"> – Selektivt – MIC-metode • Hvilke: <ul style="list-style-type: none"> – Aktuell litteratur • Rapporteres: <ul style="list-style-type: none"> – Ja: med kommentar

Metodologiske utfordringer feces PCR-analyser

Jan Egil Afset, St.Olavs hospital

Påvisning ved PCR er vist å gi høyere sensitivitet enn dyrkning for de fleste tarmpatogene bakterier. I tillegg er PCR-metodikk mindre avhengig av erfaring hos den enkelte laboratorietekniker enn dyrkning. Mange laboratorier vurderer derfor å ta i bruk PCR-metodikk til diagnostikk av tarmpatogene bakterier. Valg av PCR-metode: Det er viktig å bestemme seg for om en vil benytte kommersielle metoder eller etablere in-house metoder. På grunn av økende krav til CE-merking og kvalitetskontroll av diagnostiske metoder vil det for de fleste laboratorier være mest naturlig å satse på en kommersiell metode. Dersom en likevel ønsker å satse på in-house metodikk, feks basert på publiserte PCR-metoder, vil det være viktig å velge målsekvenser hos de aktuelle tarmpatogene bakterier som er mest mulig konserverte slik at ikke genetisk polymorfisme skal hindre påvisning. Det vil også generelt være ønskelig å satse på kromosomalt lokaliserte målsekvenser siden disse normalt er mer stabile enn plasmidlokalisererte sekvenser. Likevel vil det for flere tarmpatogene bakterier være nødvendig å benytte målsekvenser lokalisert i plasmider fordi art, patotype eller bakteriens virulens er definert på grunnlag av plasmidlokalisererte virulensgener.

Dersom en satser på en kommersiell PCR metode, må en vurdere om en ønsker en metode som kan kjøres på de PCR-maskiner en allerede har i laboratoriet, eller om en har økonomi til å kjøpe den maskinvare som metoden krever. En må også vurdere hvilke agens en ønsker å etablere molekylær diagnostikk for siden ulike kommersielle metoder kan ha noe ulike testpaneler. I tillegg er det viktig å være klar over at enkelte kit ikke skiller mellom ulike varianter av gen, for eksempel stx1 vs stx2, lt vs st, etc. Enkelte metoder gir kanskje svar på flere analyser/ agens enn en egentlig ønsker. En må da vurdere hvilke resultater en vil rapportere til kliniker. Et annet aspekt som er viktig å sjekke er logistikken i prøveoppsett knyttet til ulike metoder: hvor mange arbeidsprosesser/oppsett/plater/PCR-kjøringer kreves per prøve etc.

Behov for anrikning: I en studie av de Boer et al (2010) fant man vesentlig flere tarmpatogene bakterier ved PCR enn dyrkning, bortsett fra for Salmonella. Grunnen til at man ved PCR ikke fant flere av sistnevnte bakterieart ble forklart med at dyrkning allerede var optimalisert for denne bakterien ved anrikning i Selenit-buljong før utsæd på fast medium. Også for påvisning av enterohemorragisk E.coli (EHEC) gir anrikning i dyrkningsbuljong, for eksempel MacConkey buljong, bedre sensitivitet og lavere CT-verdier sammenlignet med direkte påvisning i feces (egne observasjoner). Valg av anrikningsmedium er imidlertid problematisk: Selenit-buljong er godt egnet til anrikning av Salmonella, men hemmer veksten av E.coli. Sistnevnte er en fordel når en skal så ut fra anrikningsbuljongen til fast medium for å påvise Salmonella-bakterier i renkultur. MacConkey buljong angis også å skulle være egnet til anrikning Salmonella, men ga 10 X lavere bakteriekonsentrasjon enn Selenittbuljong da disse to buljongene ble sammenlignet hos oss. For de fleste vil det være u hensiktsmessig å benytte to ulike anrikningsbuljonger, så en må da velge hva som anses mest viktig: anriking av Salmonella eller E.coli. Det finnes også andre aktuelle anrikningsbuljonger (eks GBG buljong, de Boer 2015), men uten av vi har noen erfaring med disse. Leverandører av kommersielle kit anbefaler vanligvis ikke bruk av anrikningsbuljong. En ulempe ved bruk av anrikningsbuljong er at svartiden blir forlenget.

Forbehandling⁷: Valg av metode for forbehandling og ekstraksjon av DNA/RNA fra avføringsprøver er avgjørende for hvor godt resultat en får. Kommerielle tilbydere anbefaler gjerne en spesifikk

⁷ bakgrunnen til vårt valg av forbehandling til ekstraksjon bygger på:

- de Boer et al. J.Clin. Microbiol. Nov 2010, P.4140-4146
- Diagnostic microbiology and infectious disease 69 (2011) 240 -244 (Groningen, Nederland)

forbehandling og ekstraksjon for deres PCR-metode, men vår erfaring er at deres anbefalte metodikk ikke nødvendigvis gir optimalt resultat. Ingen forbehandlings- og ekstraksjonsmetode vil være optimal for alle typer tarmpatogene bakterier (ulik cellevegg hos Gram-positive og Gram-negative bakterier), og i tillegg må en ta hensyn til virus og parasitter dersom en også ønsker å bruke ekstraherte nukleinsyrer fra prøven for analyse av slike agens. Det er derfor viktig med en helhetlig vurdering av analysepanelet når en bestemmer hvilken forbehandling og ekstraksjonsmetode en vil satse på, slik at en får en tilstrekkelig god ekstraksjon for hvert agens. I tillegg vil forbehandling måtte tilpasses den type ekstraksjonsinstrument en har/vil benytte. Alle som vil etablere PCR-basert diagnostikk anbefales å kontakte andre laboratorier som allerede har etablert slik metodikk for å kunne lære av deres erfaringer. Til forbehandling benyttes gjerne ulike kombinasjoner av koking, mekanisk knusing med kuler, bruk av lysisbuffer, frysing/tinging, og som nevnt over anriking i buljong for enkelte agens (se litteraturliste).

Ved St Olavs Hospital har vi nylig gjennomført en sammenligning av fire ulike metoder for forbehandling av avføringsprøver kombinert med ekstraksjon av RNA/DNA for bakterier, virus og parasitter på et EasyMag instrument (BioMérieux). Den protokollen som ga best resultat hos oss presenteres som eksempel:

Dag 0

- En ertformet mengde feces eller 3-4 dråper (150-200µL) flytende feces tilsettes til et 1,5 ml rør.
- Tilsett 200µL MBG-vann og 200µL lysisbuffer (Easymag, Biomerieux) til røret.
- Vortex til feces er fullstendig oppløst eller totalt 1 min.
- Fryses ved -20°C overnatt.
- Inokuler feces i Selenittbuljong.
- Selenittbuljongen inkuberes ved 35°C i ca 16 timer.

Dag 1

- Sentrifuger røret (som har vært frosset overnatt) ved 13 000 rpm i 5 min.
- Overfør 1) 200µL supernatant fra prøven som var frosset og 2) 50µL fra selenittbuljongen som har vært inkubert overnatt, til 2 ml lysisbuffer.
- Vortex.
- Inkuber 10 min ved romtemp (lysering).
- Prøven ekstraheres så med utvidet vaskeprotokoll i forhold til standard ekstrahering på EasyMAG (Spesific B protokoll med off-board lysis).

Inhibisjon-internkontroller: Det er velkjent at avføring inneholder mange faktorer som hemmer DNA-polymerasen. Selv om en ved moderne ekstraksjonsmetoder har redusert dette problemet, er det viktig å benytte internkontroller som kan identifisere prøver hvor PCR-reaksjonen hemmes.

Svarrapportering: Ved rapportering av PCR-resultat er det viktig å angi i svaret at det er et bestemt gen som er påvist. I de fleste tilfelle vil dette være ensbetydende med en bestemt bakterieart. Gener lokalisert i mobile genetiske elementer kan finnes i ulike bakteriearter, og dette må en ta hensyn til i svarrapporten: for eksempel vil funn av stx og eae-gener kunne bety at det finnes en EHEC med stx og eae i prøven, men det kan også være at stx-genet er fra en fri bakteriofag eller fra en annen bakterie enn E.coli, eller at stx og eae finnes i ulike E.coli. I de to siste alternativene vil funnets kliniske betydning være usikker. I slike tilfelle vil det være viktig å kunne verifisere funnet av virulensgener i renkultur av

-
- Anbefalt forbehandling av feces fra BioMérieux. (Spesific B ekstraksjonsprotokoll)

E.coli. Ved besvaring er det viktig å presisere om det er gener i blandingsflora eller om en har funn i renkultur.

Anbefaling

Det finnes flere publiserte metoder for forbehandling og ekstraksjon av avføringsprøver for PCR-påvisning av tarmpatogene bakterier, og kommersielle aktører anbefaler gjerne en bestemt metode for sine kit. Når en skal velge metode for forbehandling og ekstraksjon bør en ha hensyn til om en kun vil benytte metoden for tarmpatogene bakterier eller om en også vil inkludere virus og parasitter. I tillegg må en vurdere hva kit-leverandøren anbefaler, hvilke instrumenter en har tilgjengelig i laboratoriet, samt sjekke litteratur og innhente erfaringer fra laboratorier som allerede har etablert slik metodikk. Endelig bør en gjøre en egen validering. Det forventes at det vil skje en betydelig optimalisering av metoder for forbehandling og ekstraksjon av fecesprøver for PCR-basert diagnostikk i de kommende år.

Litteratur

1. de Boer RF, Ott A, Keszyüs B, Kooistra-Smid AM. Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4140-6.
2. Cunningham SA, Sloan LM, Nyre LM, Vetter EA, Mandrekar J, Patel R. Three-hour molecular detection of *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, and *Shigella* species in feces with accuracy as high as that of culture. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2929-33.
3. Persson S(1), de Boer RF, Kooistra-Smid AM, Olsen KE. Persson et al, Five commercial DNA extraction systems tested and compared on a stool sample collection. 2011;69:240 -244
4. Biswas JS, Al-Ali A, Rajput P, Smith D, Goldenberg SD. A parallel diagnostic accuracy study of three molecular panels for the detection of bacterial gastroenteritis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 Nov;33(11):2075-81.
5. Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, Pritt BS, Patel R, Binnicker MJ. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *J. Clin Microbiol.* 2014 Oct;52(10):3667-73.
6. de Boer RF, Ferdous M, Ott A, Scheper HR, Wisselink GJ, Heck ME, Rossen JW, Kooistra-Smid AM. Assessing the public health risk of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by use of a rapid diagnostic screening algorithm. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1588-98.
7. Humphries RM, Linscott AJ. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jan;28(1):3-31.
8. Binnicker MJ. Multiplex Molecular Panels for the Diagnosis of Gastrointestinal Infection: Performance, Result Interpretation and Cost-Effectiveness. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug 26. pii: JCM.02103-15.

<p style="text-align: center;">Metodologiske utfordringer</p> <p style="text-align: center;">Jan Egil Afset St. Olavs Hospital</p>	<p style="text-align: right;">Tema</p> <ul style="list-style-type: none"> • Valg av PCR-metode • Forbehandling • Ekstraksjonsmetode • Svarrapportering
---	---

<h3 style="text-align: center;">Valg av PCR-metode</h3> <ul style="list-style-type: none"> • For de fleste laboratorier vil det være mest hensiktsmessig å satse på kommersiell PCR-metodikk? • Når en skal velge PCR-metode for analyse av et panel av tarmpatogene agens er det viktig å vurdere logistikken mht prøveoppsett, hvor mange arbeidsprosesser/oppsett/plater og PCR-kjøringer som kreves 	<h3 style="text-align: center;">Forbehandling av prøven</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Anrikningsbuljong <ul style="list-style-type: none"> – For best mulig sensitivitet for påvisning av Salmonella anbefales bruk av anrikningsbuljong. Selenitbuljong er egnet både for PCR og dyrkning. – Det er enda ikke avklart hvilken type buljong som vil gi anriking av flest mulig av aktuelle tarmpatogene bakterier.
<h3 style="text-align: center;">Forbehandling av prøven</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Annen forbehandling <ul style="list-style-type: none"> – Mange alternativer å velge mellom <ul style="list-style-type: none"> • Eks: koking, mekanisk knusing, lysisbuffer, frysing/tining – Ingen forbehandling eller ekstraksjonsmetode vil være optimal for alle typer tarmpatogene bakterier, parasitter og virus – En må velge metode for forbehandling og ekstraksjon basert på <ul style="list-style-type: none"> • kit-leverandørens anbefaling, men også • hvilke mikrobielle agens som det skal undersøkes for • hvilke instrumenter en har • hva andre laboratorier har erfart at fungerer 	<h3 style="text-align: center;">Inhibisjon-internkontroll</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Det er vel kjent at avføringsprøver inneholder mange ulike komponenter som hemmer DNA polymerase • Det er derfor viktig å inkludere en internkontroll i hver prøve for å kunne vurdere grad av inhibisjon av PCR-prosessen
<h3 style="text-align: center;">Erfaring fra St Olavs Hospital</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Dag 0 <ul style="list-style-type: none"> – En ertformet mengde fæces eller 3-4 dråper (150-200µL) flytende fæces tilsettes til et 1,5 ml rør. – Tilsett 200µL MBG-vann og 200µL lysisbuffer (Easymag, Biomerieux) til røret. – Vortex til fæces er fullstendig oppløst eller totalt 1 min. – Fryses ved -20 °C overnatt. – Inokuler fæces i Selenitbuljong. – Selenitbuljongen inkuberes ved 35°C i ca 16 timer. • Dag 1 <ul style="list-style-type: none"> – Sentrifuger røret (som har vært frosset overnatt) ved 13 000 rpm i 5 min. – Overfør 1) 200µL supernatant fra prøven som var frosset og 2) 50µL fra selenitbuljongen som har vært inkubert overnatt, til 2 ml lysisbuffer. – Vortex. – Inkuber 10 min ved romtemp. (lysering). – Prøven ekstraheres så med utvidet vaskeprotokoll i forhold til standard ekstrahering på EasyMAG (Specific B protokoll med off-board lysis). 	<h3 style="text-align: center;">Svarrapportering</h3> <ul style="list-style-type: none"> • I svar til rekvirent er det viktig å skille mellom funn av gener i bakterieisolat vs i blandingsflora/avføringsprøve. • Gen eller mikrobefunn som ikke anses klinisk relevant (isolert eae, blastocystis, funn med CT-verdi >40 etc) <ul style="list-style-type: none"> – Kan vi tillate oss å la være å rapportere?

Og endelig.....

- Det forventes en betydelig optimalisering av metoder for forbehandling og ekstraksjon av fæcesprøver for PCR-diagnostikk i de kommende år

Valideringsresultater bred feces PCR-basert analyse


Ahus-resultater

<p style="text-align: center;">Strategimøtet i bakteriologi 2015</p> <p style="text-align: center;">Hva kan dyrkes ved positiv PCR?</p>	<p style="text-align: center;">Recovery of STEC isolates versus stx Ct-value</p> <p style="text-align: center;">HS Tunsjø, B Follin-Arbelet, AK Kvissel, TE Ranheim, TM Leegaard. Low detection rates of Shiga toxin genes in human fecal samples by real-time PCR. APMIS 2015; 123: 872-78</p>																										
<p style="text-align: center;">EPEC (eaeA)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓243 Ridagene positive, 53 i fjor. Det er 9,1% av prøver. ✓224 bekreftet på blanding kultur (20 inko). ✓Renkultur kun fra 46 prøver. ✓Klinisk betydning av EPEC funn iff hvor mye tid vi kan bruke. <p style="text-align: center;">Antall Renkultur i RIDAGENE Over tid</p>	<p style="text-align: center;">CAMPYLOBACTER (16s)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓Mest vanlig, 258 funn. Svak median Ct. ✓Vanskelig å dyrke - kun 52% av de PCR positive lot seg dyrke. ✓6 PCR positive som kunne ikke dyrkes ble bekreftet med annet PCR ✓Usikker betydning av de svakt positive/ikke bekreftede ✓128 C. jejuni, 6 C. coli, 1 C. lari, 1 C. upsaliensis <p style="text-align: center;">CAMPYLOBACTER VIKT (TT-Ct-MEDI)</p>																										
<p style="text-align: center;">Salmonella (ttr)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓49 funn, 33 kunne dyrkes. (83 funn i fjor). ✓Ingen dyrkes med Ct over 32. ✓1 tilfeldig funn. ✓Vi bruker fortsatt selenitt buljong <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tbody> <tr><td>SALMONELLA ENTERITIDIS</td><td>9</td></tr> <tr><td>SALMONELLA ENTERICA SUBSP ECHEIDERA</td><td>6</td></tr> <tr><td>SALMONELLA THYRIUMURUM</td><td>5</td></tr> <tr><td>SALMONELLA SPECIES</td><td>4</td></tr> <tr><td>SALMONELLA PARATYPHI B</td><td>2</td></tr> <tr><td>SALMONELLA DELBERG</td><td>1</td></tr> <tr><td>SALMONELLA INFANTIS</td><td>1</td></tr> <tr><td>SALMONELLA BOVIS/DISPERSONS</td><td>1</td></tr> <tr><td>SALMONELLA COELIN</td><td>1</td></tr> <tr><td>SALMONELLA STANLEY</td><td>1</td></tr> <tr><td>SALMONELLA VIRCHOW</td><td>1</td></tr> <tr><td>SALMONELLA AGAR</td><td>1</td></tr> <tr><td>SALMONELLA DUBLINOVI</td><td>1</td></tr> </tbody> </table>	SALMONELLA ENTERITIDIS	9	SALMONELLA ENTERICA SUBSP ECHEIDERA	6	SALMONELLA THYRIUMURUM	5	SALMONELLA SPECIES	4	SALMONELLA PARATYPHI B	2	SALMONELLA DELBERG	1	SALMONELLA INFANTIS	1	SALMONELLA BOVIS/DISPERSONS	1	SALMONELLA COELIN	1	SALMONELLA STANLEY	1	SALMONELLA VIRCHOW	1	SALMONELLA AGAR	1	SALMONELLA DUBLINOVI	1	<p style="text-align: center;">Shigella/EIEC (ipaH)</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓23 Shigella funn, vanlig sterk Ct, men vanskelig å dyrke (40%). ✓4 S. sonnei, 6 S. flexnerii ✓Ingen S. dysenteriae (eller S. boydii), eller bekreftet EIEC ✓80% med reise historikk. Mange har EPEC samtidig ✓Sensitiv PCR
SALMONELLA ENTERITIDIS	9																										
SALMONELLA ENTERICA SUBSP ECHEIDERA	6																										
SALMONELLA THYRIUMURUM	5																										
SALMONELLA SPECIES	4																										
SALMONELLA PARATYPHI B	2																										
SALMONELLA DELBERG	1																										
SALMONELLA INFANTIS	1																										
SALMONELLA BOVIS/DISPERSONS	1																										
SALMONELLA COELIN	1																										
SALMONELLA STANLEY	1																										
SALMONELLA VIRCHOW	1																										
SALMONELLA AGAR	1																										
SALMONELLA DUBLINOVI	1																										

Yersinia enterocolitica (ail)

- ✓8 funn, 6 er serotype 9, 1 type 3
- ✓1 kunne ikke dyrkes
- ✓Militær utbrudd

Drammen-resultater



PCR-screening vs. dyrkning

Data fra Vestre Viken, Drammen

	PCR Drammen (2015) <small>(Et halvt år fra 1.4.15 til 30.9.15)</small>			Dyrkning Drammen (2014) <small>(Et halvt år fra 1.4.14 til 30.9.14)</small>		
	Antall prøver	Positive funn	%	Antall prøver	Positive funn	%
Prøver analysert (alle)						
Campylobacter	1368	150	11,00 %	1261	120	9,50 %
Salmonella	1365	30	2,20 %	1196	47	3,90 %
Shigella/EIEC	1333	13	1,00 %	1333	4	0,30 %
Yersinia enterocolitica	1353	11	0,80 %	1353	2	0,10 %
EHEC	1350	15	1,10 %			
EPEC	1350	97	7,20 %			
ETEC	1330	38	2,90 %			
Giardia	1340	26	1,90 %			
Cryptosporidier	1346	21	1,60 %			
Entamoeba histolytica	1365	2	0,15 %			
Sum (n=2)	1350	403	32,40 %	1286	173	13,90 %

Resultater fra St. Olavs Hospital

Foreløpige resultater fra validering av multiplex PCR for tarmpatogene bakterier, parasitter og virus ved St Olavs Hospital i en fem-ukers periode (11/8-17/9-2015).

Agens*	Multiplex PCR			Rutine/ verifikasjon**		
	Antall prøver	Positive funn	%	Antall prøver	Positive funn	%
Campylobacter	949	96	10,1	688	86	12,5
Salmonella	949	45	4,7	674	35	5,2
Shigella/EIEC	949	3	0,3	641	0	0,0
Yersinia enterocolitica	949	11	1,2	643	6	0,9
EHEC	949	20	2,1	194	20	10,3
EPEC	949	146	15,4	194	68	35,1
ETEC	949	29	3,1	43	18	41,9
EABC	949	68	7,2	0	0	
Aeromonas (funn med CT verdi <40)	949	16	1,7		1	
Vibrio (funn med CT verdi <40)	949	8	0,8		0	
Giardia	949	11	1,2	140	6	4,3
Cryptosporidier	949	18	1,9	16	9	56,3
Entamoeba histolytica	949	0	0,0			
C. difficile	949	73	7,7	304	70	23,0
Norovirus GI	949	12	1,3	290	10	3,4
Norovirus GII	949	9	0,9	290	10	3,4
Rotavirus	949	6	0,6	135	6	4,4
Astrovirus	949	0	0,0	130	0	0,0
Sapovirus	949	5	0,5			
Adenovirus (40, 41)	949	1	0,1	130	15	11,5
SUM	949	≥428	45,1			

* Allplex™ Gastrointestinal Panel 1 (virus), 2 (Bakt I) og 3 (Bakt II) Assay fra BioMérieux, RIDA® Q&B Parasitic Stool Panel II fra Biopham; ** Analyse (dykning, in-house PCR eller IF mikroskop) enten rekvidert primært eller gjort pga funn i multiplex PCR

Hvilke positive funn ved dyrkningsuavhengige tester skal generere dyrkning mht epidemiologisk overvåking og smitteverntiltak?

Peter Gaustad

Feces-diagnostikk er basert på tradisjonelle metoder som dyrkning, mikroskopi og toksinpåvisning. Vi er inne i et skifte når det gjelder metodevalg. Dyrkning er fortsatt mest brukte metode, men antigen tester er i bruk og noen få laboratorier har tatt i bruk molekylær mikrobiologiske metoder for screening av feces, og flere er i planlegningsfase.

Bruk av ikke dyrkningsbasert fecesdiagnostikk medfører at flere etiologiske agens testes i et oppsett med direkte, kvalitativ påvisning. PCR-undersøkelser har høy spesifisitet og høy sensitivitet og påviser levende og døde mikrober. Prøver kan være positive som ved tradisjonell diagnostikk er negative. Ved bruk av ikke dyrkningsbasert screening av feces må prøvene oppbevares inntil resultatet av undersøkelsen foreligger, slik at dyrkning kan utføres på positive prøver. Laboratoriet bør derfor ha valgt et egnet transportmedium for PCR undersøkelse og dyrkning.

Epidemiologisk overvåking: Siden ikke dyrkningsbasert fecesdiagnostikk påviser også døde mikrober/bakterier er denne diagnostikken ikke egnet når det behov for levende agens til detaljkarakterisering for å detektere utbrudd og å se på epidemiologi eller resistenstesting. Ved funn av agens som vist i tabell 1 (*Campylobacter spp* kun ved alvorlig sykdom/utbrudds mistanke?) samt *Cl. difficile*, må undersøkelsen suppleres med dyrkning samme dag. Hvis prøven er flere dager gammel bør det vurderes om det skal bes om ny prøve. Påvist isolat kan da brukes til videre karakterisering, evt resistensbestemmelse og innsending til FHI som vanlig.

Ved PCR positiv på *Salmonella ssp* gjøres dyrkning for å typebestemme ved primær laboratoriet med hensyn til invasive stammer. For *Cl. difficile* sendes faeces eller isolat til referanselaboratorium på OUS-Rikshospitalet for nærmere karakterisering. **Alle eller kun ved mistanke om utbrudd?**

Ved positiv EHEC må det alltid gjøres tilleggstest for å differensiere mellom *stx1/Stx1*, *stx2/Stx2*, og positive stamme isoleres. Ved HUS eller utbruddsmistanke (1 tilfelle HUS = utbrudd) skal også *eae* positive stammer fra screenede personer dyrkes siden de kan representere stammer som har mistet *stx1/Stx1*, *stx2/Stx2*.

For *Yersiniaenterocolitica* må man vite om det er patogen serotype – **må derfor alltid utføre dyrkning?** Om dyrkning er nødvendig er avhengig av primer valg ved PCR. **PCR som påviser ail-genet er tilstrekkelig?**

Tabell 1: Agens som ved positiv PCR krever dyrkning og skal sendes til referanselaboratorium

<p><i>Salm. Typhi</i> <i>Salm. Paratyphi</i> <i>Shig. dysenteriae 1</i> EHEC</p>
<p>Shigella sp. (andre enn Shig.dys.1) EIEC</p>
<p>Salmonella sp. (andre enn tyfoid- og paratyfoidgruppen)</p>
<p><i>Vibrio cholerae</i> Campylobacter spp. Yersiniaenterocolitica</p>

Smittevernstiltak: skal alle pasienter hvor faecesprøven er dyrknings negativ, men PCR positiv, oppfattes å utgjøre en smitterisiko, eller bare agens hvor smittedosen er lav (EHEC, EIEC, *Shigella*)? Velge dyrkning ved hjelp av Ct verdier? For *S. Typhi*, *S. Paratyphi* er man avhengig av isolat for artsdiagnostikk siden PCR kun angir *Salmonella ssp.* EHEC: PCR positiv/dyrkningsnegativ. Hvordan avgjøre om *stx2/Stx2* positiv som skal ha strengere smittevernsopplegg enn *stx1/Stx1* positive? Tillegstest for *stx2/Stx2* positiv?

Alltid bruke PCR som primær test på agens med liten smitte dose?

Hvor lenge utgjør pasienten en smitterisiko når PCR positiv/dyrknings negativ?

Anbefaling til Strategimøtet: Ved bruk av ikke dyrkningsbasert fecesdiagnostikk bør prøvene oppbevares inntil resultatet av undersøkelsen foreligger, slik at dyrkning kan utføres på positive prøver. Dyrkning bør gjennomføres på alle positive prøver, men funn av svært høy Ct-verdi tilsier at det er liten sannsynlighet for å lykkes.

<p>Hvilke positive funn ved dyrknings uavhengige tester skal genere dyrkning mht epidemiologisk overvåkning og smitteverntiltak?</p> <p>Peter Gaustad</p> 	<p>Hva undersøkes faeces rutinemessig på?</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bakte Virus Parasitter  <p>Akutt diaré – hvilke agens er hyppigst? Virus: hyppigst, men minst testet på. Norovirus, Rotavirus Bakterier: hyppigst testet på, men positivt 1-10% av tilfellene. <i>Cl. difficile</i> viktig også utenfor sykehus. Parasitter: vannbårne som <i>Giardia</i> og <i>Cryptosporidier</i> lite testet på.</p>
---	---

<p>Dyrkningsuavhengig diagnostikk i fæces prøver Ikke dyrkningsbasert faecesdiagnostikk</p> <p>Molekylærdiagnostisk mikrobiologi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Flere etiologiske agens i et PCR oppsett (Multiplex real-time PCR) • Direkte, kvalitativ påvisning • Påviser levende og døde mikrober • Høy spesifisitet • Høy sensitivitet <p>Antigen påvisning</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1-2 agens per oppsett • Direkte, kvalitativ påvisning • Påviser levende og døde mikrober • Spesifisitet og sensitivitet ikke alltid tilfredsstillende. 	<p>Aktuelle bakterielle GI paneler for molekylær diagnostisk mikrobiologi</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bakteriepanel i fæces <ul style="list-style-type: none"> • Campylobacter spp • Salmonella spp • Shigella spp • Y. enterocolitica • EHEC • EPEC • EIEC • Cl. difficile toksin • Bakteriell agens <ul style="list-style-type: none"> • Salmonella Typhi EHEC • EIEC • Andre Salmonella arter EPEC • ETEC • Shigella • Campylobacter • Yersinia Clostridium difficile • Listeria monocytogenes • Vibrio cholerae • Andre Vibrio arter 																																
<p>Bakterielle funn ved bruk av GI panel for molekylær diagnostisk</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tidsperiode: 01.08,2014 – 20.10.2015 • Antall prøver: 9865 • Pos. for tarmpatogene bakterier: 3031 (33%) • Funn av 1 patogen (inklu virus): 2423 (40%) • Funn av mer enn 1 patogen (inklu virus): 484 (5%) <table border="1"> <thead> <tr> <th>Bakterie</th> <th>PCR +</th> <th>Dyrk +</th> <th>Dyrk -</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>EPEC</td> <td>1328</td> <td>21 (18%)</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Dyrkning utført 121</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Campylob</td> <td>979</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Yersinia</td> <td>29</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>EHEC</td> <td>138</td> <td>33 (24%)</td> <td>105</td> </tr> <tr> <td>Shigella/EIEC</td> <td>155</td> <td>18 (12%)</td> <td>137</td> </tr> <tr> <td>Salmonella</td> <td>241</td> <td>162 (60%)</td> <td>79</td> </tr> </tbody> </table>	Bakterie	PCR +	Dyrk +	Dyrk -	EPEC	1328	21 (18%)	100			Dyrkning utført 121		Campylob	979			Yersinia	29			EHEC	138	33 (24%)	105	Shigella/EIEC	155	18 (12%)	137	Salmonella	241	162 (60%)	79	<ul style="list-style-type: none"> • Ved bruk av ikke dyrkningsbasert feces diagnostikk må prøvene oppbevares inntil resultatet av undersøkelsen foreligger slik at dyrkning kan utføres på positive prøver. Laboratoriet bør derfor ha valgt et egnet transportmedium for PCR undersøkelse og dyrkning. Cary-Blair egnet? Alternativer? • Dyrkning nødvendig for ytterligere undersøkelser (Resistenstesting og detaljkarakterisering for å detektere utbrudd og å se på epidemiologi av virulensfaktorer) ?? • Dyrkning: laktose + selektive skåler??
Bakterie	PCR +	Dyrk +	Dyrk -																														
EPEC	1328	21 (18%)	100																														
		Dyrkning utført 121																															
Campylob	979																																
Yersinia	29																																
EHEC	138	33 (24%)	105																														
Shigella/EIEC	155	18 (12%)	137																														
Salmonella	241	162 (60%)	79																														
<p>Dyrkning etter positiv PCR</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kun de agens hvor det er nødvendig for: <ul style="list-style-type: none"> ➢ Smitteoppfølging ➢ Epidemiologi ➢ Resistens bestemmelse • EHEC • Shigella sp. EIEC • Salmonella sp. (inkludert tyfoid- og paratyfoidgruppen) • Campylobacter spp. • Yersinia enterocolitica 	<p>Epidemiologisk overvåkning</p> <ul style="list-style-type: none"> • Campylobacter spp. Slekt tilstrekkelig. Videre karakterisering og innsending til FHI kun ved alvorlig sykdom/utbrudds mistanke? • Cl. difficile toksin: <ul style="list-style-type: none"> • Kommerseill real-time PCR kan brukes som eneste diagnostiske test. • Ved utbrudd er dyrkning og innsending til RH for typing av isolater anbefalt. • Dyrkning og innsending til FHI: • Salmonella spp, Shigella spp, Y. enterocolitica, EHEC, EIEC 																																

<p style="text-align: center;">Smittevernstiltak:</p> <ul style="list-style-type: none">• Skal alle pasienter hvor faecesprøven er dyrknings negativ, men PCR positiv, oppfattes å utgjøre en smitterisiko, eller bare agens hvor smittedosen er lav (EHEC, EIEC, Shigella)?• Velge dyrkning ved hjelp av Ct verdier? Funn av svært høy Ct-verdi tilsier at det er liten sannsynlighet for å lykkes.• For S. Typhi, S. Paratyphi er man avhengig av isolat for artsdiagnostikk siden PCR kun angir Salmonella spp.• EHEC: PCR positiv/dyrknings negativ. Hvordan avgjøre om stx2/Stx2 positiv som skal ha strengere smittevernsopplegg enn stx1/Stx1 positive? Tilleggstest for stx2/Stx2 positiv?• Alltid bruke PCR som primær test på agens med liten smitte dose?• Hvor lenge utgjør pasienten en smitterisiko når PCR positiv/dyrknings negativ?	<p>Anbefaling til Strategimøtet:</p> <ul style="list-style-type: none">➤ Ved bruk av ikke dyrkningsbasert fecesdiagnostikk bør prøvene oppbevares inntil resultatet av undersøkelsen foreligger, slik at dyrkning kan utføres på positive prøver.➤ Dyrkning bør gjennomføres på alle positive prøver med unntak av EPEC??, Campylobacter?? og C. difficile??.
--	---

Kontrollprøver

Jan Egil Afset

I henhold til Smittevernbooka fra FHI anbefales kontrollprøver hos enkelte grupper av pasienter etter funn av visse tarmpatogene bakterier. Siden det da kun vil være av interesse å teste for gjeldende bakterie, vil det gjerne bli uforholdsmessig dyrt å undersøke slike prøver for hele panelet av agens som er inkludert i et kommersielt kit. Det vil i slike tilfelle være naturlig å tilpasse metoden til aktuelle bakterie. Det vil da trolig være mest hensiktsmessig å benytte tradisjonell metodikk med dyrkning for agens som Salmonella, Shigella, Campylobacter og Yersinia, mens det for tarmpatogene E.coli vil kunne variere hvilken påvisningsmetode som vil være mest egnet. Dersom bakterien kan påvises med for eksempel kromogenagar kan en slik agar benyttes for screening. Et annet alternativ kan være å benytte dyrkning med agglutinasjon med O-antisera dersom den aktuelle bakteriestammen tilhører en av de vanlige O-serogruppene. Dersom bakterien ikke lar seg påvise med enkle fenotypiske metoder kan det være nødvendig å benytte PCR-basert påvisning av aktuelle virulensgener etv kombinert med anrikning ved dyrkning, enten ved bruk av PCR-panelet som benyttes i rutinediagnostikken eller en alternativ singel-PCR for aktuelle mikrobe/ virulensgen. Hvilken metode som vil være best egnet må vurderes i det enkelte tilfelle.

Ved funn av gastroenterittvirus og Clostridium difficile anbefales vanligvis ikke kontrollprøver. Når en likevel mottar kontrollprøver fra slike pasienter bør laboratoriet vurdere om prøvene skal avvises.

Anbefaling

Valg av metode for diagnostikk av kontrollprøver bør tilpasses aktuelle tarmpatogene mikrobe. For vanlige tarmpatogene bakterier vil trolig påvisning ved dyrkning være mest kost-effektivt, mens påvisning av tarmpatogene E.coli oftest vil kreve kombinasjon av dyrkning og PCR-påvisning.

<p>Kontrollprøver</p> <p>Jan Egil Afset St Olavs Hospital</p>	<p style="text-align: center;">Anbefaling</p> <ul style="list-style-type: none"> • Smittevernbooka ved FHI anbefaler kontrollprøver hos enkelte grupper av pasienter etter funn av visse typer tarmpatogene bakterier • Valg av metode for analyse av kontrollprøver må tilpasses den aktuelle bakterie <ul style="list-style-type: none"> – Dyrkning for bakterier som kan enkelt påvises ved dyrkning <ul style="list-style-type: none"> • Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia • Andre bakterier som også kan påvises ved dyrkning (eg. EHEC O157:H7 på SMAC-agar/ kromogenagar) i kombinasjon med PCR – Singel PCR for bakterier hvor påvisning baseres på tilstedeværelse av virulensgener, evt i kombinasjon med dyrkning <ul style="list-style-type: none"> • EHEC (stx, eae), EIEC etc • Laboratoriet bør vurdere å avvise kontrollprøver ved allerede diagnostisert Clostridium difficile infeksjon
--	---

Melding til MSIS av atypiske EPEC og PCR alene positive prøver

Heidi Lange/Line Vold, Avdeling for infeksjonsovervåkning, FHI

Antallet EHEC meldt til MSIS har økt fra xx/år i 20XX til xx/år i 2015. Også antallet meldte tilfeller av EPEC, aEPEC, ETEC, EIEC, Campylobacter, Salmonella og Cryptosporidium har økt. Mye av denne økningen kommer som en følge av at flere og flere laboratorier benytter seg av en bred PCR-basert screening (dyrkningsuavhengig diagnostikk uten funn i dyrkning).

Pr i dag er funn av *eae* meldingspliktig kun dersom det påvises sammen med enten Stx1 eller Stx2 eller ved dyrkning. PCR- påvisning av Cryptosporidium er meldingspliktig, men ETEC, EIEC, Campylobacter og Salmonella er meldingspliktig kun ved dyrkning. Flere laboratorier som gjør bred PCR-basert screening melder likevel PCR påvisning av disse.

 <p>folkehelseinstituttet</p> <p>MSIS – meldingskriterier & DUD</p> <p>Solveig Jore Avd. for infeksjonsovervåkning</p>	<h3>Formålet med MSIS</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Beskrive forekomsten av smittsomme sykdommer over tid og etter geografiske og demografiske forhold • Oppdage og bidra til oppklaring av utbrudd av smittsomme sykdommer • Gi råd til publikum, helsepersonell og forvaltning om smitteverntiltak • Evaluere virkninger av smitteverntiltak • Drive, fremme og gi grunnlag for forskning om smittsomme sykdommers utbredelse og årsaker
<h3>MSIS - meldingskriterier</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Meldingskriteriene: sist revidert 2014 • Campylobakteriose, salmonellose, shigellose og yersiniose: klinisk forenlig tilfelle med epidem tilknytning <i>eller</i> isolat • EHEC: klinisk forenlig tilfelle med epidem tilknytning <i>eller</i> PCR • EPEC/ETEC/EIEC: isolat • Giardiasis, kryptosporidiose: klinisk forenlig tilfelle med epidem tilknytning <i>eller</i> PCR 	<h3>MSIS: DUD versus dyrkning</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Overvåking så langt basert på isolat for mange patogener • Endring i metodikk: ikke sammenlignbart mht trender • Folkehelsemikrobiologi <ul style="list-style-type: none"> • Resistensbestemmelse • Utbruddsdeteksjon • Endring i patogener over tid • Nåværende håndtering av meldinger basert på DUD <ul style="list-style-type: none"> • For Campylobacter: EPEC/EIEC/ETEC & Salmonella: laget en egen «mistenkte» kategori når PCR meldes <ul style="list-style-type: none"> • 2014 Campy: 25/28 (Dyrkning)/2/29 (PCR) • 2015 Campy: 20/20 (Dyrkning)/0/21 (PCR)

<h3 style="text-align: center;">Smitteverntiltak</h3> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Hensikt: hindre videre smitte• Nåværende tiltak er basert på diagnostikk ved dyrkning<ul style="list-style-type: none">– DUD mer sensitivt– Klinisk relevans av funn– Virulens-epidemiologi eks. vaksiner– Når er man ikke smitteførende lenger? Jf 5 negative EHEC prøver 	<h3 style="text-align: center;">Norge i en særstilling</h3> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Godt forankret innsending til ref.lab jf forskrift om meldingssystem for smittsomme sykdommer• God forståelse isolat-dyrkning<ul style="list-style-type: none">– Pasientbehandling: resistens– Virulensmarkører/smittevern rundt enkeltpasienter– Folkehelsemikrobiologi 
<h3 style="text-align: center;">Europa</h3> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Varierende tradisjon & lowerk mhp innsending til reflat• Dyrkningsuavhengig diagnostikk (DUD) skyver vekk dyrkning ?• Noen land endrer meldingskriterier• Videre rapportering til ECDC 	

E. coli kapittelet fra 2011 – behov for nye endringer?

Tabell. Håndtering av positiv STEC/EHEC innledende undersøkelse								
		Primærlab-håndtering			Melde MSIS	Initiale oppflg.prøver	Oppflg.prøver når svar fra Ref.lab	Smitteoppsporing
		Isolere + agglutinere (O26-103-145-157)	Sende reflat Renkultur	Blanding*				
eae-pos alene	Diaré	nei	nei	nei	nei	intet	ikke relevant	nei
	Blodig diaré	ja, hvis barn	ja	nei	nei	intet	avhenger av Ref.lab svaret og klinisk vurdering (diff.diagnoser)	nei
	HUS	ja, uansett alder	ja	ja	ja	ja	ja	ja
	Utbrudd/tilfell i b.hg stx2							
	- index-casus: diaré	nei	nei	nei	nei	nei	ikke relevant	
	- index-casus: blodig diaré	ja	ja	nei	nei	nei	Hvis bekreftet identisk med index-isolat	(er i situasjon smitteoppsporing)
	- index-casus: HUS	ja	ja	ja	nei	nei		
stx2	Uavhengig av klinikk og situasjon	ja	ja	ja	ja	ja	Ja hvis stx2a, stx2c, stx2d Nei hvis stxb, stx2e, stx2g	
stx1	diaré	ja	ja	nei	ja	intet	hvis O26:H11 eller O103:H2 hos barn?	?
	blodig diaré	ja	ja	nei	ja	ja, hvis barn	ja, hvis barn?	?
	HUS	ja	ja	ja	ja	ja, uansett alder	ja, uansett serotype og alder	ja
	Utbrudd/tilfelle i b.hg HUS + stx1	ja	ja	nei	ja	ja	ja	(er i situasjon smitteoppsporing)

Gradert smittevern ved EHEC










Heidi Lange/Solveig Jore/Line Vold, Avdeling for infeksjonsovervåkning FHI

Infeksjon forårsaket av EHEC kan gi ulik sykdomsutvikling og alvorlighetsgrad. Det kan variere fra et asymptomatisk forløp eller ukomplisert diaré til alvorlige tilfeller av massiv blodig diaré. I 10-15 % av tilfellene, særlig hos barn, eldre og immunosupprimerte, kan infeksjonen gi utvikling av hemolytisk-uremisk syndrom (HUS) som kan være dødelig. Sannsynligheten for at infeksjonen kompliseres med HUS, er primært avhengig av bakteriens virulensprofil, men også vertsfaktorer som alder og immunologiske forhold er av betydning.

EHEC utgjør en betydelig utfordring for smittevernet både økonomisk i form av fravær fra jobb, enten i forbindelse med yrkesrelatert smittefare eller som forelder, og psykisk i form av påkjenninger på familier med barn som må holdes hjemme fra barnehage over lengre tid. Det er derfor viktig at smittevernet differensieres mellom HUS assosierte EHEC og andre mer lavvirulente EHEC.

Vi foreslår derfor at pasienter med lavvirulente EHEC, det vil si de som bare har Stx1 og ikke blodig diaré kan returnere til jobb og barnehage to dager etter avsluttet diaré. Pasienter med HUS-assosiert EHEC, det vil si de med Stx2, blodig diaré og Stx1, eller serotype O157, O26, O145 bør ha 3-5 negative avføringsprøver før de kan returnere til barnehage eller jobb (hvis matproduksjon eller servering). Dersom videre typing av isolatet ved referanselaboratoriet viser at Stx2 subtypen er 2b, 2e eller 2g og pasienten ikke har hatt blodig diaré, kan pasienten returnere til jobb eller barnehage to dager etter avsluttet diaré og oppfølgingsprøver er ikke nødvendig.



<p> Dk: HUS-ass. VTEC</p> <p>HUS associerede VTEC VTEC kan opdeles i henhold til O gruppe/serotype, toksintyper samt andre virulensfaktorer. De hyppigst forekommende O grupper er O26, O103, O117, O145, O146 og O157 - tilsammen udgør disse O grupper 64 %, men det er kun undertyper af visse O grupper, der ofte er associeret til HUS. Sandsynligheden for, at en infektion kompliceres med HUS er primært bestemt af virulensprofilen, men der er også begrundet mistanke om at visse antibiotika indgivet i den akutte fase af sygdomsforløbet kan øge risikoen for udvikling af HUS. Følgende virulensprofiler har en klinisk relevant association til HUS:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. vbx1 og vbx2 og eae 2. vbx2 og eae 3. vbx2 i en enteroaggregativ E. coli (EAggEC) fx. O104 og O111 4. vbx2d i eae negative VTEC. <p></p>	<p> Sundhedsstyrelsen <small>Danish Health and Medicines Authority</small></p> <p>10. september 2015 Sag nr. 4-1216-11/ Befølgelse: 1106 T: 7222 7400 E: styb@stat.dk</p> <p>Retningslinjer for håndtering af hæmolytisk uræmisk syndrom (HUS) og verocytotoxinproducerende E. Coli (VTEC)</p> <p>Hygiejniske retningslinjer samt undersøgelse af kontakter i forbindelse med påvist tilfælde af HUS-associerede VTEC</p> <p>1. Hos et barn med tilknytning til en børneinstitution Der bør gives generel information om de hygiejniske forholdsregler såvel til husstanden som til den berørte institution. Ved et tilfælde i en institution bør andre børn og personale, der enten har diare, har haft diare inden for en uge eller umiddelbart får diare, undersøges for VTEC.</p> <p>Ved påvist HUS-associeret VTEC, skal barnet være klinisk rask, og der skal foreligge to på hinanden følgende negative afføringsprøver for vedkommende igen kan møde i institutionen.</p> <p></p>
<p>Norske studie</p> <p>Brandal et al. <i>BMC Infectious Diseases</i> (2015) 15:324 DOI 10.1186/s12879-015-1017-6</p> <p> BMC Infectious Diseases</p> <p>RESEARCH ARTICLE Open Access</p> <p>Shiga toxin-producing <i>escherichia coli</i> infections in Norway, 1992–2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome</p> <p>Lin T. Brandal^{1*}, Astrid L. Wester¹, Heidi Lange², Inger Løbersli¹, Bjørn-Arne Lindstedt³, Line Vold² and Georg Kapperud^{4,5}</p> <p></p>	<p>Acknowledgements</p> <p>We want to thank the staff at the Department of Foodborne Infections at the Norwegian Institute of Public Health for skillful technical assistance, including Torbjørn Bruvik who was involved in molecular serotyping and <i>stx</i> subtyping. We also would like to thank Kirsten Konsmo at the Department of Infectious Disease Epidemiology at the Norwegian Institute of Public Health for quality assurance of the MSIS data. Finally, we will thank all medical microbiological laboratories in Norway for the tremendous work load put into isolating STEC from patient samples and forwarding the isolates to the NIPH for further characterization. Infection control of STEC on both the local and national level relies heavily on their efforts.</p> <p></p>
<p>Norske, unike STEC (n=333)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ikke inkludert <i>eae</i>-alene pos <i>E. coli</i> • Ca 1/3 hver <ul style="list-style-type: none"> – <i>stx1</i> alene – <i>stx2</i> alene – <i>Stx1</i> og <i>stx1</i> • O157 hos ca 1/3, hvorav NSF hyppigst • 40% ≤ 5 år, 10% ≥ 65 år • 25 pas med HUS (7.5%) <p></p>	<p>Norske STEC & HUS-risiko</p> <p><i>stx1</i> og klinikk:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 pas med <i>stx1</i> og HUS, men hos denne også funnet <i>stx2a</i> • Av pas m/<i>stx1</i> alene, 35% med blodig diaré <ul style="list-style-type: none"> - O103:H2; <i>stx1</i> – 40% med blodig diaré - O26:H11; <i>stx1</i> – 40% med blodig diaré <p><i>stx2</i> og klinikk:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>stx2a</i> selvstendig risikofaktor for HUS • Ingen HUS-pas hadde <i>Stx2b</i>, <i>d</i>, <i>f</i> eller <i>g</i> • 2 HUS-pas hadde <i>stx2c</i>, men 1 hadde samtidig <i>stx2a</i> => lav statistisk styrke for denne assosiasjonen <p></p>

STEC - virulensgradering

Lavvirulente STEC

stx1

stx2b
stx2e
stx2g

HUS-assosierte STEC

stx2

stx2a
stx2c
stx2d

Hvis Blodig diaré/HUS

eae+
(stx neg)

SFO157
O26:H11
O145:H7
O103:H23

STEC – gradert smittevernrespons?

Lavvirulente STEC

(ca 40% av alle stx-positiv STEC)

stx1

stx2b
stx2e
stx2g

Ingen oppfølgingsprøver?

Klinikk, smittepotensial, epidemiologi

stx2

stx2a
stx2c
stx2d

3? 5? oppfølgingsprøver

HUS-assosierte STEC

Hvis Blodig diaré/HUS

eae+
(stx neg)

SFO157
O26:H11
O145:H7
O103:H23

Jammen....hva med?

- O103:H2; *eae* og *stx1a*?
- O26:H11; *eae* og *stx1a* – ca 8% HUS Tyskland?
- Stx1* og blodig diaré: ingen ktr.prøver eller smitteoppsporing?
 - Blodig diaré mer alvorlig klinikk i seg selv
- BD ikke testet om selvstendig risikofaktor for HUS (alle HUS-pas med blodig diare hadde også *stx2a*)

Hvem gjør hva og når? Og i hvilken situasjon?

- Initiale ktr.prøver
- Melding til MSIS
- Sending til ref.lab
 - Anledning til å sende blanding?
- Virulensfaktorer vs.
 - alder og klinikk hos syk
 - Prøve tatt i utbrudd/smitteoppsporing (ikke index-pas)

Anbefalinger

(NB! MSIS-ansvar i blek skrift)

Situasjon	Klinikk	Primær-lab-håndtering				Oppflg.prøver		Smitte-oppspor
		Isolere agglut	Ren	Bland*	MSIS-meld	Initialt	Når svar ref.lab	
stx1: person med klinikk	Diaré	+	+	-	+	-	≤5 år & O26:H11 O103:H2	-/+
	Blodig diaré (BD)	+	+	-	+	≤5 år 3?	≤5 år 3?	≤5 år 3
	HUS	alle	+	+	+	3	Forts 3?	+
stx1: smitteoppsporing/utbrudd <i>stx1</i> -pos	Index (<i>stx1</i>) Og HUS, ellers ikke	+	+	-	+	3	Forts. 3?	Er i situasj. oppsp./utbrudd

*hvis ikke klarer å isolere i renkultur

Situasjon	Klinikk	Primær-lab-håndtering				Oppflg.prøver		Smitte-oppspor
		Isolere agglut	Ren	Bland*	MSIS-meld	Initialt	Når svar ref.lab	
stx1: person med klinikk	Diaré	+	+	-	+	-	≤5 år & O26:H11 O103:H2	-/+
	Blodig diaré (BD)	+	+	-	+	≤5 år 3?	≤5 år 3?	≤5 år 3
	HUS	alle	+	+	+	3	Forts 3?	+
stx1: smitteoppsporing/utbrudd <i>stx1</i> -pos	Index (<i>stx1</i>) Og HUS, ellers ikke	+	+	-	+	3	Forts. 3?	Er i situasj. oppsp./utbrudd

*hvis ikke klarer å isolere i renkultur

Situasjon	Klinikk	Primærlab-håndtering				Oppflg.prøver		Smitte-oppspor
		Isolere ægg/ut	Senderef.lab Ren	Bland.*	MSIS- meld	Initialt	Nårsvar ref.lab	
eae alene: person med klinikk	Diaré	-	-	-	-	-	-	-?
	Blodig diaré (BD)	≤ 5 år	+	-	-	-	Virulens og diff- diagn.	?
	HUS	alle	+	+	+	3? 5?	Forts 3? 5?	+
eae alene: smitte- oppsporing/ utbrudd stx2-pos	Index (stx2) Diaré	-	-	-	-	-	-	Er i situasj. oppssp/ utbrudd
	Index (stx2) BD	+	+	-	-	-	Hvis lik index	
	Index (stx2) HUS	+	+	+	-	-	Hvis lik index	

*hvis ikke klarer å isolere i renkultur

Tarmpatogene *E. coli*

- EHEC/STEC vs EHEC-LST (*eae*-alene pos)
 - *stx2*/*Stx2*: alt skal isoleres, sendes og meldes, evt. sendeblanding
 - *Stx1*/*Stx1*: alt skal isoleres, sendes og meldes, IKKE sendeblanding
 - *eae* alene, avh. Av alder, klinikk, setting (=> Nils)
- EPEC (*eae*)
 - «sann» aEPEC
 - typisk EPEC (*eae*+*Bfp*)
- EIEC (*ipaH*)
- ETEC (varmelabile & varmostabile toksiner, *LT*, *ST*)
- EAEC? (engeraggative *E. coli*; *aggR*)
- DAEC? (diffust adhererende *E. coli*; *Afa/Dr*)

eae ALENE hos tarmpatogene *E. coli*

Nils Olav Hermansen, Avdeling for Næringsmiddelbårne Infeksjoner, Folkehelseinstituttet

BAKGRUNN

Enteropatogen *E. coli* (EPEC) er en av flere varianter av tarmbakterien *E. coli* som kan gi diaré. Atypisk *E. coli* (aEPEC) er en eae-positiv *E. coli* som ut fra en totalvurdering av klinikk, mikrobiologiske funn og manglende epidemiologisk tilknytning til EHEC tilfelle, samt manglende funn av bfp, kan sannsynliggjøre en «SANN» aEPEC. I en norsk studie ble aEPEC funnet hos 10% av friske barn < 5år. (1). I de senere år er det blitt klart at aEPEC kan representere shigatoksinproduserende eller enterohemorragiske *E. coli* (EHEC) som har tapt sine shigatoksin-gener (stx1 og/eller stx2) (EHEC-LST). Det er i utbruddssammenheng påvist stx-negative *E. coli* isolat med identisk genotype med epidemiologisk relaterte EHEC (2).

PROBLEMSTILLING

Funn av eae alene? Er dette en «SANN» aEPEC eller representerer funnet en EHEC-LST?

Helt avgjørende for god videre vurdering av eae-alene funn, baseres på gode kliniske opplysninger, gjerne i direkte kontakt med rekvirerende/behandlende lege. Laboratoriet er også helt avhengig av gode epidemiologiske opplysninger.

Normal tarmflora? Årsak til diaré? Årsak til blodig diaré? Potensiale til å gi pasienten/personen HUS? Er dette laboratoriefunnet eae alene hos *E. coli* årsak til pasientens kliniske diagnose HUS?

STATUS FOR PROBLEMSTILLING I DAG

Ved mange laboratorier utføres diagnostikk av enteropatogene *E. coli* i dag med PCR for genene stx1, stx2 og eae (blandingskultur fra dyrkningsस्कål, anrikningsbuljong eller fra ekstrahert faeces). Primærlaboratorier som ikke har etablert PCR-undersøkelse med hensyn på eae, må videresende faecesmateriale til samarbeidende mikrobiologisk avdeling/Regionslaboratorium, når det er indikasjon for denne type undersøkelse. Se under.

Forslag til anbefalinger

Anbefalingene gjelder når det ikke er funnet annen mer sannsynlig mikrobiologisk årsak eller annen sannsynlig patofysiologisk årsak.

- 7. HUS pasient og eae alene.** Stammen håndteres som EHEC-LST:
Renkultur/alternativt blandingskultur sendes referanselaboratorium.
- 8. BLODIG DIARÉ og eae alene.** Stammen håndteres som EHEC-LST?
Renkultur sendes referanselaboratorium.
Primærlaboratoriet bør spesielt være overvåkne på eae positive SFO157,O103,O26 og O145.
- 9. eae alene og pågående lokalt eller nasjonalt EHEC-UTBRUDD**
Ved HUS utbrudd/HUS assosiert EHEC sendes blandingskultur til referanselaboratoriet.
IKKE HUS utbrudd sendes renkultur til referanselaboratoriet.
- 10. eae alene og SMITTEOPPSPORING rundt et EHEC/HUS tilfelle.**
Blandingskultur sendes referanselaboratoriet ved HUS tilfelle ellers sendes renkultur til referanselaboratoriet.
- 11. eae alene hos små barn (<skolealder) med langvarig diaré.**
Renkultur sendes referanselaboratorium.
- 12. eae alene hos små barn (<skolealder) etter opphold i U-land.**
Renkultur sendes referanselaboratorium.

13. **eae alene ved UTBRUDD i barnehage/barneavdeling.**

Renkultur sendes referanselaboratorium.

VED FUNN AV eae I AVFØRINGSPRØVE I ANDRE SITUASJONER ENN BESKREVET I PUNKTENE 1-7, kan undersøkelsen avsluttes uten forsøk på isolasjon av eae-positiv stamme.

Eae positiv stamme fra barn og voksne med DIARÉ uten at det foreligger tilleggskriterier som spesifisert under punktene 1-7 skal ikke sendes til referanselaboratoriet.

Blandingskultur er definert som blandingskultur av E.coli bakterier.

REFERANSER

1. Afset JE, Bevanger L, Romundstad P, Bergh K. Association of atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) with prolonged diarrhoea. J. Med. Microbiol 2004;53:1137-44.
2. Schimmer B, Nygard K, Eriksen HM, Lassen J, Lindstedt BA, Brandal LT, Kapperud G, Aavitsland P. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive Escherichia coli O103:H25 traced to cured mutton sausages. BMC Infect Dis. 2008 Apr.3;8:41.

	<h2>PROBLEMSTILLING</h2> <ul style="list-style-type: none">• «SANN» aEPEC ?• EHEC-LST ?
<h2>HUS pasient og eae alene.</h2> <ul style="list-style-type: none">• Stammen håndteres som EHEC-LST• Renkultur /alternativt blandingskultur sendes referanselaboratoriet.	<h2>BLODIG DIARE og eae alene</h2> <ul style="list-style-type: none">• Stammen håndteres som EHEC-LST???• Renkultur sendes referanselaboratoriet.• Primærlaboratorium bør spesielt være overvåkne på eae positive SFO157,O103,O26 og O145.

<p>eae alene og pågående lokalt eller nasjonalt EHEC-UTBRUDD</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Ved HUS utbrudd/HUS assosiert EHEC sendes blandingskultur til referanselaboratoriet.• IKKE HUS utbrudd sendes renkultur til laboratoriet. 	<p>eae alene og SMITTEOPPSPORING rundt et EHEC/HUS tilfelle</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Blandingskultur sendes referanselaboratoriet ved HUS tilfelle ellers sendes renkultur til referanselaboratoriet. 
<p>eae alene hos små barn (<skolealder) med langvarig diare.</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Renkultur sendes referanselaboratoriet. 	<p>eae alene hos små barn (<skolealder) etter opphold i U-land</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Renkultur sendes referanselaboratoriet. 
<p>eae alene ved UTBRUDD i barnehage/barneavdeling</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none">• Renkultur sendes referanselaboratoriet. 	<p>VED FUNN AV eae I AVFØRINGSPRØVE I ANDRE SITUASJONER ENN BESKREVET, KAN UNDERSØKELSEN AVSLUTTES</p> 

Hvilket diagnostisk nivå bør primærlaboratoriet ha vs. hva bør ligge på referanselaboratoriet?

Astrid Louise Wester, FHI

Salmonella:

Primærlaboratoriene: Identifikasjon til genusnivå er enklest med MALDI-TOF, alternativt med tradisjonell biokjemi. MALDI-TOF kan imidlertid ha noen problemer med å identifisere subspecies hotenae som Salmonella. Siden serovarianter av *S. enterica ssp entericae* dominerer, anses det ikke strengt tatt nødvendig med biokjemisk differensiering mellom *S. bongori* og *S. enterica*, og videre de ulike subspecies av *S. enterica* (*salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* og *indica*).

Alle laboratorier bør imidlertid kunne sannsynliggjøre de alvorligste og hyppigste serovariantene.

Innen Salmonella-gruppen dreier det seg om *S. Typhi* (9-12:Vi:d:-), *S. Paratyphi A* (2-12:a:-), *S. Paratyphi B* (4-5-12:b:1.2), *S. Typhimurium* (4-5-12:i:1.2) og *S. Enteritidis* (9-12:gm:-).

Referanselaboratoriet: Isolatene blir identifisert til serovar-nivå og undersøkt for antibiotikaresistens i henhold til avtale med NORM. Alle isolater av *S. Typhimurium* og *S. Enteritidis* blir undersøkt fortløpende med MLVA, og clustere blir rapportert til MSIS/ECDC. Ved behov settes det opp en generisk alle-Salmonella MLVA.

Listeria:

Listeria dyrkes vanligvis ikke fra feces-prøver, men har klar klinisk relevans ved funn i blodkultur eller spinalvæske. Identifikasjonen anses uproblematisk.

Referanselaboratoriet: Isolatene blir identifisert til serogruppenivå med PCR og MLVA.

Campylobacter:

Alle laboratorier bør dyrke selektivt for *Campylobacter*, også de som benytter PCR-basert innledende analyse av feces, og minst skille mellom de to vanligst species (*C. jejuni* og *C. coli*).

Referanselaboratoriet skiller mellom flere *Campylobacter*-species ved hjelp av multiplex PCR.

Laboratoriet arbeider med å teste ut om MALDI-TOF kan egne seg for epidemiologisk typing av *C. jejuni*. Hvis dette lykkes, vil utbruddsdeteksjon av *C. jejuni* kunne fungere uten at isolatene må sendes inn til Ref.lab.

Vibrio:

MALDI-TOF har usikker treffsikkerhet for *V. cholerae*, og tradisjonell biokjemi anses som nødvendig.

Referanselaboratoriet verifiserer species, bestemmer om det er en av de epidemiske serotypene, samt undersøker tilstedeværelse av gen for toksinproduksjon.

Yersinia:

PCR-basert innledende analyse gir muligens en underdiagnostisering av *Yersinia enterocolitica* sammenliknet med tradisjonell dyrkningsbasert innledende analyse. **Bør dette få konsekvenser for de aktuelle laboratoriene?** MALDI-TOF ser ut til å kunne identifisere *Yersinia* til speciesnivå [1, 2].

Tradisjonell biokjemi alene bør kunne skille ut *Y. enterocolitica*. Alle laboratorier bør ha antisera mot O3 og O9.

Referanselaboratoriet benytter tradisjonell biokjemi for speciesidentifikasjon, biotyping og påvisning av virulensplasmid. En in-house multiplex-PCR med påvisning av virulensgener planlegges innlemmet i rutine-diagnostikken. Det gjøres agglutineringsreaksjoner mot en rekke antisera. For de vanligst forekommende patogener *Y. enterocolitica* gjøres det i tillegg en generisk MLVA som støtte for deteksjon av utbrudd.

Shigella (og EIEC):

Isolering av Shigella ved dyrkningsmetode alene har muligens gitt en underdiagnostisering av denne typen infeksjon. PCR-basert innledende analyse kan øke sensitiviteten for dette agenset (og for EIEC). Primærlaboratoriene må kunne identifisere Shigella til minst genusnivå. Innen Shigella-gruppen dreier det seg om å identifisere de 4 species. Det er tilstrekkelig med polyvalente sera for hver av artene. Noen Shigella og såkalte inaktive E. coli kan være svært vanskelig å skille.

Referanselaboratoriet: Isolatene blir verifisert som Shigella biokjemisk og ved påvisning av *ipaH*-genet, og identifisert til serotypnivå. Alle isolater blir undersøkt fortløpende med MLVA.

Tarmpatogene E. coli

- **EHEC:** Primærlaboratoriene bør som et minste minimum ha toksintest, helst PCR for påvisning av Stx/stx, samt skille mellom stx1 og stx2. Hvis ikke dette er oppnåelig, bør det gjøres avtale med annen primærlab hvor de kan sende prøver ved mistanke om EHEC. Ved alvorlig klinikk hos pasient HUS, eller blodig diaré hos barn under skolealder), eller ved erkjent utbrudd med stx2-positiv stamme, bør laboratorier som bare har toksin-test videresende til laboratorium som har eae-påvisning for å sikre deteksjon av EHEC-LST. Alle laboratorier bør ha monovalent antisera for de seks viktigste EHEC-serovariantene (O26, O103, O111, O121, O145, 157). Ved påvisning av Stx2/eae e.l. må renkultur dyrkes frem for forsendelse av isolat for videre identifisering, å eventuelt avkrefte falske Stx2-resultater. Kun ved HUS og smitteoppsporing rundt HUS-tilfeller kan det sendes inn blandingskultur til referanselaboratoriet.
- **EPEC ("sann aEPEC" og typisk EPEC)** Laboratorier som ikke har PCR-basert innledende analyse som inneholder målsekvenser mot *eae*, må være ekstra oppmerksomme på kronisk diaré hos barn, utbrudd med aEPEC for eksempel i barnehage, og tEPEC hos barn som svært nylig har vært i utviklingsland. I slike situasjoner bør prøven videresendes til annet primærlaboratorium som gjør *eae*- og evt *Bfp*-påvisning.
- **ETEC:** Erfaringer fra Vestre Viken, Drammen, kan tyde på at ETEC forekommer hyppigere ved diaré i Norge enn tidligere antatt. **Skal dette få konsekvens for primærdiagnostikken?**
- **EIEC** se Shigella




Anbefalinger til Strategimøtet: Arbeidsfordelingen mellom primærlaboratorier og Ref.lab anbefales å bestå omtrent som tidligere. Imidlertid bør laboratorier som har innført bred PCR som innledende analyse for tarmpatogene agens vurdere å dyrke parallelt med tanke på *Y. enterocolitica*, og la være å legge ned dyrkning av prøver som er positive for *Campylobacter* i påvente av at Ref.lab muligens får MALDI TOF basert epidemiologisk typing opp å gå. Strategimøtet bør også diskutere om ETEC påvisning bør inkluderes systematisk. Når det gjelder EHEC-diagnostikk, er et minstemål å ha toksinpåvisning, aller helst PCR, og sistnevnte bør skille mellom *stx1* og *stx2*.

Referanser

1. Ayyadurai S, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M: **Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.** *BMC microbiology* 2010, **10**:285.
2. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G: **Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology.** *FEMS microbiology reviews* 2012, **36**(2):380-407.

 <p>Anbefalt diagnostisk nivå fecesbakteriologi anno 2016</p> <p>Astrid L. Wester</p>	<h3>Overgang til bred PCR-basert screening?</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Kanskje verd «overgangsarbeidet» <ul style="list-style-type: none"> – Økt sensitivitet for de fleste agens – Måltrettet dyrkning = gøy! • Ulemper: <ul style="list-style-type: none"> – Teknisk sensitivitet vs. Avklart klinisk og smittemessig relevans; «flatscreening».... – MSIS meldingsplikt?
<h3>Dyrkning bortfaller?</h3> <ul style="list-style-type: none"> • NEI for de fleste lab'er og agens <ul style="list-style-type: none"> – Campy-dyrkning kuttet ut m/unntak et par steder • For andre agens gjennomgående at dyrker <ul style="list-style-type: none"> – Patogenisitet & resistenstesting – folkehelsemikrobiologi 	<h3>Salmonella</h3> <ul style="list-style-type: none"> • PCR-basert eller dyrkningsbasert screening synes nesten likeverdig • MALDI-TOF identifiserer ok til genus, men har litt vansker med <i>S. enterica</i> ssp. <i>houtenae</i> (som er sjelden) • Primærlab bør kunne sannsynliggjøre de mest alvorlige serovariantene • Ref.lab fortsetter med full ID + MLVA for <i>S. Tm</i> og <i>S. Ent</i> + res.testing (NORM, ECDC, WHO)
<h3>Listeria</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Fortsatt <u>ikke</u> indikasjon for Listeriapåvisning i feces • ID fra blodkultur/sp.væske synes grei • Få tilfeller i året • Ref.lab: molekylær serotyping + MLVA 	<h3>Campylobacter</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Alle laboratorier bør dyrke selektivt for Campylobacter • skille mellom de to vanligst species (<i>C. jejuni</i> og <i>C. coli</i>). • Ref.lab skiller mellom flere Campylobacter-species (multiplex PCR). • MALDI-TOF MS databasebygging og analyse => egnethet for epidemiologisk typing av <i>C. jejuni</i> => mye bedre utbruddsdeteksjon av <i>C. jejuni</i> uten innsending av isolater

<p style="text-align: center;"><i>Vibrio</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Vibrio: MALDI-TOF har usikker treffsikkerhet for <i>V. cholerae</i>, tradisjonell biokjemi anses nødvendig • <i>V. cholera</i>, og mulige <i>V. cholera</i>, sendes til ref.lab for <ul style="list-style-type: none"> – ID (biokjemisk) – epidemiske serotyper – Påvisning av toksin-gener 	<p style="text-align: center;"><i>Yersinia enterocolitica</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • PCR-basert screening = en viss underdiagnostisering (?) • MALDI-TOF ser ut til å kunne identifisere <i>Yersinia</i> til speciesnivå • tradisjonell biokjemi alene gir som oftest korrekt species, men ikke alltid • Alle laboratorier bør ha antisera mot O3 og O9. 
<p style="text-align: center;"><i>Y. enterocolitica</i> forts</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ref.lab. • tradisjonell biokjemi for speciesidentifikasjon, biotyping og påvisning av virulensplasmid. • Multiplex-PCR med påvisning av virulensgener planlegges innlemmet i rutine-diagnostikken • agglutinerings mot en rekke antisera • generisk MLVA som støtte for deteksjon av utbrudd av patogene YE 	<p style="text-align: center;"><i>Shigella</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • PCR-basert screening m/påflg dyrkning øker påvisning • MALDI TOF skiller ikke mellom <i>Shigella</i> og <i>E. coli</i> • Fleste antisera peker ut species • Ref.lab etablert PCR som sannsynligvis skiller bedre mellom inaktive <i>E. coli</i> og <i>Shigella</i> 
<p style="text-align: center;">EHEC og EHEC-LST</p> <ul style="list-style-type: none"> • Primærlaboratoriene bør som et minste minimum ha toksintest, helst PCR for påvisning av Stx/stx, samt skille mellom stx1 og stx2. Hvis ikke dette er oppnåelig, bør det gjøres avtale med annen primærlab hvor de kan sende prøver ved mistanke om EHEC. • Ved alvorlig klinikk hos pasient HUS, eller blodig diare hos barn under skolealder, eller ved erkjent utbrudd med stx2-positiv stamme, bør laboratorier som bare har toksin-test videresende til laboratorium som har eae-påvisning for å sikre deteksjon av EHEC-LST. • Alle laboratorier bør ha monovalent antisera for de seks viktigste EHEC-serovariantene (O26, O103, O111, O121, O145, 157). 	<p style="text-align: center;">EHEC og EHEC-LST forts</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stx pos. Isolat bør dyrkes fram og bekrefte at stx til stede. • Kun ved HUS og smitteoppsporing rundt HUS-tilfeller kan det sendes inn blandingskultur til referanselaboratoriet 

<h3>EPEC (sann aEPEC og tEPEC)</h3> <ul style="list-style-type: none">• Laboratorier som ikke har PCR-basert screening med <i>eae</i>, må være ekstra oppmerksomme på<ul style="list-style-type: none">– kronisk diare hos barn,– utbrudd med aEPEC for eksempel i barnehage– tEPEC hos barn som svært nylig har vært i utviklingsland.• I slike situasjoner bør prøven videresendes til annet primærlaboratorium som gjør <i>eae</i>- og evt <i>Bfp</i>-påvisning 	<h3>Andre tarmpatogene <i>E. coli</i></h3> <ul style="list-style-type: none">• ETEC: Erfaringer fra Vestre Viken, Drammen, kan tyde på at ETEC forekommer hyppigere ved diare i Norge enn tidligere antatt. Skal dette få konsekvens for primærdiagnostikken?• EIEC kan være vanskelig å skille fra Shigella• EAEC? Ikke enda• DAEC? Ikke enda 
<h3>Anbefalinger</h3> <ul style="list-style-type: none">• Arbeidsfordelingen primærlab vs Ref.lab ok• laboratorier som har innført bred PCR screening<ul style="list-style-type: none">– dyrke parallelt med tanke på <i>Y. enterocolitica</i> (?)– Ikke legge ned dyrkning av Campy-pos PCR prøver før svar på om MALDI TOF basert epidemiologisk typing duger• Bør ETEC påvisning inkluderes systematisk?• EHEC-diagnostikk<ul style="list-style-type: none">– Minstemål toksinpåvisning (og disse lab'ene må videresende hvis alvorlig utbrudd pga EHEC-LST)– aller helst PCR, og sistnevnte bør skille mellom stx1 og stx2 	

Utgitt av Folkehelseinstituttet
Juli 2018
Postboks 4404 Nydalen
NO-0403 Oslo
Telefon: 21 07 70 00
Rapporten kan lastes ned gratis fra
Folkehelseinstituttets nettsider www.fhi.no