

**EKSTERNE KVALITETSVURDERINGER I BAKTERIOLOGI, MYKOLOGI OG
PARASITTOLOGI**

Rapport fra strategimøte

Hovedredaktører: Per Sandven og Martin Steinbakk

Strategimøte nr 23, 2009

Anaerob diagnostikk

Redaktører:

**Jørgen V. Bjørnholt, Peter Gaustad,
Anne Torunn Mengshoel og Carina Thilesen**

ISSN: 0804-8444

Forord

Det 23. Strategimøte i regi av Referansegruppen for eksterne kvalitetsvurderinger i bakteriologi, mykologi og parasittologi omhandlet ”Anaerob diagnostikk” og ble avholdt 06.11.2009 i Oslo. På møtet deltok 43 representanter fra landets medisinsk-mikrobiologiske laboratorier.

Anaerobe diagnostikk har tidligere vært behandlet på et strategimøte i 1989.

Ansvarlig programkomité, som også har ferdigstilt denne avsluttende rapporten, var Peter Gaustad (leder), Jørgen V. Bjørnholt, Anne Torunn Mengshoel og Carina Thilesen. Komitéen har hatt et spesielt ansvar for den innledende og oppsummerende delen, mens ansvaret for de enkelte innleggene i rapportens del 2 er overlatt til de enkelte innleiderne.

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

Oslo, 23.07.2010

For Referansegruppen

Per Sandven

Martin Steinbakk

INNHALDSFORTEGNELSE

<i>Program for møtet</i>	4
<i>Deltakere og observatører</i>	5
1 OPPSUMMERING	7
1.1 ANAEROB DIAGNOSTIKK - DEN PREANALYTISKE FASEN	7
1.2 ANAEROB DIAGNOSTIKK – UTSÆD, DYRKNINGSMEDIER OG METODER.	9
1.3 TAKSONOMISKE FORANDRINGER - BETYDNING FOR KLINISK MIKROBIOLOGI	10
1.4 EPIDEMIOLOGI - ANAEROBE FUNN INKLUDERT C. DIFFICILE I NORGE.	11
1.5 ANAEROB RESISTENS - EPIDEMIOLOGI	12
1.6 RESISTENSBESTEMMELSE AV ANAEROBE MIKROBER.	13
1.7 IDENTIFIKASJON AV ANAEROBER - HVOR LANGT SKAL VI GÅ? FENOTYPISKE OG GENOTYPISKE METODER. KLINISK BETYDNING AV FUNN.	14
1.8 DEN POLYMIKROBIELLE FLORA - MOLEKYLÆRBIOLOGISKE METODER OG DERES ROLLE I ANAEROB DIAGNOSTIKK.	16
1.9 CLOSTRIDIUM DIFFICILE - INFEKSJONSKONTROLL. HVILKE PASIENTER SKAL UNDERSØKES? INDIKASJON FOR PRØVETAKING.	17
1.10 CLOSTRIDIUM DIFFICILE - FRA TOKSIN-PÅVISNING TIL DYRKNING. HVA BØR LABORATORIERNE GJØRE - HVA BØR DE SENDE FRA SEG?.....	18
1.11 TYPING AV CLOSTRIDIUM DIFFICILE - FRA TOXINOTYPING TIL MLVA	20
1.12 REFERANSEFUNKSJON FOR ANAEROBE OG FOR CLOSTRIDIUM DIFFICILE - ER DET NØDVENDIG?.....	21
2 SAMMENDRAG AV INNLEGGENE	22
2.1 ANAEROB DIAGNOSTIKK - DEN PREANALYTISKE FASE	22
2.2 ANAEROB DIAGNOSTIKK - UTSÆD, DYRKNINGSMEDIER OG METODER.....	26
2.3 TAKSONOMISKE FORANDRINGER - BETYDNING FOR KLINISK MIKROBIOLOGI	31
2.4 EPIDEMIOLOGI - ANAEROBE FUNN INKLUSIVE CLOSTRIDIUM DIFFICILE I NORGE.	33
2.5 ANAEROB RESISTENS - EPIDEMIOLOGI	39
2.6 RESISTENSBESTEMMELSE AV ANAEROBE MIKROBER	42
2.7 IDENTIFIKASJON AV ANAEROBER - HVOR LANGT SKAL VI GÅ? FENOTYPISKE OG GENOTYPISKE METODER. KLINISK BETYDNING AV FUNN.	50
2.8 DEN POLYMIKROBIELLE FLORA - MOLEKYLÆRBIOLOGISKE METODER OG DERES ROLLE I ANAEROB DIAGNOSTIKK.	56
2.9 CLOSTRIDIUM DIFFICILE - INFEKSJONSKONTROLL. HVILKE PASIENTER SKAL UNDERSØKES? INDIKASJON FOR PRØVETAKING.	58
2.10 CLOSTRIDIUM DIFFICILE - FRA TOXINPÅVISNING TIL DYRKNING. HVA BØR LABORATORIERNE GJØRE? HVA BØR DE SENDE FRA SEG?	63
2.11 TYPING AV CLOSTRIDIUM DIFFICILE: FRA TOXINTYPER TIL MLVA.....	68

Program for møtet

Møteleder Peter Gaustad

- 10.00-10.10 Velkommen og innledning. *Peter Gaustad*
- 10.10 -10.45 Oppsummering av hovedpunkter i Strategirapport 1989: Anaerobe diagnostikk
Hva skal vi bygge videre på?
Viktige momenter: Preanalytisk fase (prøvetaking, transportmedier, forsendelse) og dyrkningsbetingelser.
Carina Thilesen og Anne Torunn Mengshoel
- 10.45-11.10 Taxonomiske forandring - betydning for klinisk mikrobiologi?
Jørn Arne Aas
- 11.10-11.35 Epidemiologi – anaerobe funn inkludert *Clostridium difficile* i Norge.
Jørgen V. Bjørnholt
- 11-35-11.50 Pause
- 11.50-12.15 Anaerob resistens epidemiologi.
Arnfinn Sundsfjord
- 12.15-12.40 Anaerob resistenstesting.
Metode og brytningspunkter. Hvilke midler skal vi teste på?
Martin Steinbakk
- 12.40-13.00 Er vi flinke nok til å påvise og identifisere anaerobe isolater?
Resistensbestemmelse. Erfaringer fra Ringtest.
Per Sandven
- 13.00-13.45 Lunsj

Møteleder Jørgen V. Bjørnholt

- 13.45-14.10 Identifikasjon av anaerober – hvor langt skal vi gå? Fenotypiske og genotypiske metoder. Klinisk betydning av funn. *Peter Gaustad*
Skal alt identifiseres til arts nivå?
- 14.10-14.35 Den polymikrobielle flora - molekylærbiologiske metoder og deres rolle i anaerob diagnostikk.
Jørn Arne Aas
- 14.35-15.00 *Clostridium difficile* - infeksjonskontroll. Hvilke pasienter skal undersøkes? Indikasjon for prøvetaking. Sykdomsspekter forutsettes kjent.
Egil Lingaas
- 15.00-15.20 *Clostridium difficile* - fra toxinpåvisning til dyrkning. Hva bør laboratoriene gjøre? Hva bør de sende fra seg?
Paal Naaber
- 15.20-15.40 Typing av *Clostridium difficile*: Fra toxintyper til MLVA.
André Ingebretsen
- 15.40-16.00 Referansefunksjon for anaerober og for *Clostridium difficile* – er det nødvendig?
Egil Lingaas og Peter Gaustad

Deltakere og observatører

Jan Egil Afset
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
St Olavs Hospital HF,
7006 Trondheim

Jørgen V. Bjørnholt
Mikrobiologisk institutt,
Rikshospitalet HF,
0027 Oslo

Linn Merete Brendefur
Mikrobiologisk avdeling,
Sykehuset Buskerud HF,
3004 Drammen

Peter A Csango
Unilabs Telelab
Strømdalsjordet 4,
3727 Skien

Lumnije Dedi
Mikrobiologisk avdeling,
Ullevål universitetssykehus HF,
0407 Oslo

Dagny Haug Dorenberg
Mikrobiologisk institutt,
Rikshospitalet HF,
0027 Oslo

Duong Quoc Duc
Mikrobiologisk avdeling,
Sykehuset Østfold HF,
1603 Fredrikstad

Aasmund Fostervold
Mikrobiologisk avdeling,
Akershus Universitetssykehus HF,
1478 Lørenskog

Peter Gaustad
Mikrobiologisk institutt,
Rikshospitalet HF,
0027 Oslo

Nils Grude
Mikrobiologisk laboratorium,
Sykehuset i Vestfold HF,
Postb. 2168,
3103 Tønsberg

Reidar Hjetland
Mikrobiologisk avdeling,
Helse Førde HF,
Sentralsykehuset,
6800 Førde

Mina Ø Høie
Seksjon for medisinsk mikrobiologi,
Laboratoriesenteret,
Sykehuset Asker og Bærum HF,
1309 Rud

Elisebet Haarr
Avd. for med. Mikrobiologi,
Stavanger Universitetssykehus,
4068 Stavanger

André Ingebretsen
Mikrobiologisk institutt og Avdeling
for sykehushygiene,
Rikshospitalet HF,
0027 Oslo

Alexandra Jakovlev
Avdeling for medisinsk mikrobiologi,
St Olavs Hospital HF,
7006 Trondheim

Pål Jenum
Seksjon for medisinsk mikrobiologi,
Laboratoriesenteret,
Sykehuset Asker og Bærum HF,
1309 Rud

Øystein H. Johansen
Mikrobiologisk laboratorium,
Sykehuset i Vestfold HF,
Postb. 2168,
3103 Tønsberg

Jørgen Lassen
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Truls Leegard
Mikrobiologisk institutt,
Rikshospitalet HF,
0027 Oslo

Christoffer Lindmann
Avd. for mikrobiologi og immunologi,
Helse Bergen HF,
Haukeland Sykehus,
5021 Bergen

Egil Lingaas
Avdeling for sykehushygiene,
Rikshospitalet HF,
0027 Oslo

Turid Mannsåker
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Anne Torunn Mengshoel
Mikrobiologisk avdeling,
Ullevål universitetssykehus HF,
0407 Oslo

Liisa Mortensen
Mikrobiologisk avdeling,
Nordlandssykehuset HF,
8092 Bodø

Heima Mylvaganam
Avd. for mikrobiologi og immunologi,
Helse Bergen HF,
Haukeland Sykehus,
5021 Bergen

Einar Nilsen
Mikrobiologisk laboratorium,
Helse Nordmøre og Romsdal HF,
6407 Molde

Ingvild Nordøy
Mikrobiologisk institutt,
Rikshospitalet HF,
0027 Oslo

Paul Naaber
Avd. for med. Mikrobiologi,
Stavanger Universitetssykehus,
4068 Stavanger

Annette Onken
Seksjon for medisinsk mikrobiologi,
Laboratoriesenteret,
Sykehuset Asker og Bærum HF,
1309 Rud

Eivind Ragnhildstveit
Mikrobiologisk avdeling,
Sykehuset Østfold HF,
1603 Fredrikstad

Trond E. Ranheim
Mikrobiologisk avdeling,
Akershus Universitetssykehus HF,
1478 Lørenskog

Rolf-Arne Sandnes
Avdeling for mikrobiologi,
Sykehuset Innlandet HF,
2629 Lillehammer

Per Sandven
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Martin Steinbakk
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Gaute Syversen
Mikrobiologisk avdeling,
Ullevål universitetssykehus HF,
0407 Oslo

Liv Jorunn Sønsteby
Mikrobiologisk laboratorium,
Haugesund sykehus,
Postboks 2170,
5504 Haugesund

Carina Thilesen
Mikrobiologisk avdeling,
Sykehuset Buskerud HF,
3004 Drammen

Ståle Tofteland
Avd. for medisinsk mikrobiologi,
Laboratorieavdelingen,
Sørlandet sykehus HF,
4604 Kristiansand S

Kristian Tonby
Bakteriologisk laboratorium,
Aker universitetssykehus HF,
0514 Oslo

Yngvar Tveten
Mikrobiologisk laboratorium,
Sykehuset i Vestfold HF,
3103 Tønsberg

Einar Vik
Laboratorium for medisinsk
mikrobiologi,
Helse Nordmøre og Romsdal HF,
6407 Molde

Astrid Wester
Divisjon for smittevern,
Nasjonalt folkehelseinstitutt,
0403 Oslo

Jørn Arne Aas
Institutt for oral biologi,
Postboks 1052 Blindern,
0316 Oslo

1 Oppsummering

1.1 Anaerob diagnostikk - den preanalytiske fasen

Påvisning av anaerobe bakterier i prøvemateriale er avhengig av korrekt prøvetaking og transport til mikrobiologisk laboratorium. Forurensning med normalflora i forbindelse med prøvetaking kan føre til misvisende dyrkningsresultater og unødig tid og ressursbruk i laboratoriet.

Prøvetakingsmetoder:

Ved prøvetaking fra hud og slimhinner bør prøven tas slik at normalfloraen i størst mulig grad unngås. Aspirasjon av puss og eksudater samt biopsier/vevsprøver er å foretrekke. Penselprøve benyttes evt i tillegg eller der aspirasjon ikke er mulig.

Prøvemateriale:

Anaerob dyrkning bør utføres på prøver tatt fra normalt sterile områder. Anaerob dyrkning anbefales **ikke** utført på følgende prøvemateriale, men unntak kan forekomme avhengig av den kliniske problemstilling:

- bronkialskyllvæske
- ekspektorat, naso-og endotrakeal-aspirat
- penselprøver fra nasopharynx, hals, munnslimhinne
- penselprøver fra overfladiske sår og ulcera
- penselprøver fra urethra, vagina og cervix
- feces – med unntak for *Clostridium difficile* påvisning
- tarminnhold fra stomiposer,
- urin og kateterurin

Transportmetoder:

Forventet transporttid til laboratoriet bør tas i betraktning ved valg av transportmetode.

Sprøyter:

Sprøyten fylles mest mulig opp, synlige luftblærer evakueres gjennom steril kompress. Sprøyten proppes. Egner seg bare ved kort transport tid, for eksempel på sykehus med eget mikrobiologisk laboratorium.

Steril beholder:

Må fylles godt opp (>2-3 ml flytende materiale).

Anaerob transportsystemer:

Transportposer, rør og sterile beholdere med pre-reduert agar og indikator-system for transport av flytende materiale og vevsbiter er kommersielt tilgjengelig. Det finnes flere egnede kommersielle transportsystemer.

Anaerob blodkulturflaske kan brukes til forsendelse av normalt sterile kroppsvæsker der mono-mikrobiell infeksjon forventes f.eks amnionvæske, ascites, dialysevæske, pericardvæske, leddvæske. Om ønskelig sendes prøvemateriale i steril beholder ved siden av slik at direkte PCR/mikroskopi evt kan utføres.

Transporttid:

Prøvemateriale	Optimal transporttid	Kommentarer
Aspirat < 1ml 1-2 ml >2ml	≤ 10 min ≤ 30 min ≤ 2-3 timer	Luft kan i løpet av 30 min. gradvis diffundere gjennom plastsprøyten. Mindre volumer bør derfor transporteres i egnet anaerob transportsystem. Send penselprøve i tillegg dersom anaerob transportsystem ikke benyttes.
Vev eller biopsi I steril beholder I anaerob- transportsystem	≤ 30 min ≤ 2-3 timer	Ved bruk av anaerob transportsystem kan purulent materiale >2ml i volum og større vevsbiter aksepteres for anaerob dyrkning i inntil 24 timer.
Penselprøve I transportagar	≤ 2-3 timer	Transportagar bestående av Amies medium er vist å ha bevart levedyktigheten av anaerobier i tilfredstillende grad i 24 timer.

Overskridelse av den optimale transporttiden bør kommenteres i svarbrevet til rekvirenten.

1.2 Anaerob diagnostikk – utsæd, dyrkningsmedier og metoder.

Før utsæd vurderes viktige prøvematerialer makroskopisk og eventuelt mikroskopisk. Rask utsæd og inkubering anbefales (i løpet av 15 min). Utsæd i anaerobt kammer er det optimale.

Medier

Anaerobe medier må inneholde blod, hemin og vitamin K1 (menadion). Ulike basalmedier kan benyttes.

Mediene bør være ferske (24-48 t hvis de lages i laboratoriet) eller preredusert.

Generelt anbefales en kombinasjon av selektive (med henholdsvis kanamycin og kanamycin-vankomycin) og ikke-selektive medier ved primærutsæd. På det ikke-selektive mediet anbefales bruk av metronidazol-lapp perifert på skålen der utsæden er tykkest.

Om en velger å anvende kun et ikke-selektivt medium, kan dette gjøres semi-selektivt ved i tillegg til metronidazol-lapp å legge på en gentamicinlapp (30 µg).

Ved blandingsinfeksjoner vil bruk av selektive medier (f. eks. et med aminoglykosid og et med aminoglykosid og vancomycin), øke funn av anaerobe mikrober.

For sterile væsker (amnionvæske, ascites, leddvæske, pericardvæske og synovialvæske), biopsier og fremmedlegemer (intravasale katetre, skruer, implantat) med forventet monomikrobiell infeksjon, kan man benytte kun ikke-selektivt medium (uten metronidazol-lapp). For disse sterile væskene kan dyrkning i blodkulturflasker med FOS-tilsetning ved mottak i laboratoriet, supplere, eventuelt erstatte utsæd på faste medier.

Ved viktig og lite prøvemateriale kan anrikningsbuljong (for eksempel thioglycolat) eller anaerob blodkulturflaske benyttes.

Inkuberingssystem

Ulike anaerobe inkuberingssystem er tilgjengelig og akseptable: skap, kolbe og forskjellige bag/posesystemer. Det anaerobe miljøet må overvåkes daglig med en oksidasjon-reduksjons-indikator og i tillegg bør man ha med anaerob/aerob vekstkontroll (eks *B. fragilis*/*P.aeruginosa*).

Inkuberingslengde

Etter utsæd bør skålene plasseres i anaerobt miljø umiddelbart og innkuberes ved 35-37 °C i 72t. Ytterligere innkubering kan være nødvendig for å identifisere langsomtvoksende anaerobe bakterier og viktig prøvemateriale bør inkuberes i totalt 5-7d.

Kvalitetskontroll

Medieproduksjonen bør være underlagt kvalitetskontroll.

1.3 Taksonomiske forandringer - betydning for klinisk mikrobiologi

Taksonomi er definert som klassifisering, identifisering og nomenklatur av mikroorganismer.

Studier av den orale mikroflora med 16S rRNA genbasert microarray hos friske personer og hos pasienter med rotkaries påviste 175 ulike bakteriearter og clustere, og konkluderte med at floraen var sammensatt og mer setespesifikk enn personspeisifikk. Videre er en stor del av denne flora ikke tidligere beskrevet.

Tilsvarende studier med 16S rRNA gensekvensering hos pasienter med rotkaries indikerte at mulige agens ved rotkaries inkluderer ikke bare *S. mutans*, laktobasiller og *Actinomyces* som tidligere antatt etter dyrkningsforsøk, men også arter innen *Atopobium*, *Olsenella*, *Pseudoramibacter*, *Propionibacterium* og *Selenomonas*.

Studier med miroarray antydte at andre arter enn de antatt patogenene *Actinomyces* og *S. mutans* kan spille en rolle i sykdomsutviklingen av rotkaries.

Endringer i taksonomi kan gi ny informasjon om bakteriers mulige rolle i sykdomsprosessen.

1.4 Epidemiologi - anaerobe funn inkludert *C. difficile* i Norge.

De fleste infeksjoner som involverer anaerobe bakterier er polymikrobielle og det kan være vanskelig å angi betydningen av de/det anaerobe funn og hvilke tiltak som bidrar mest til helbredelse. For monomikrobielle anaerobe infeksjoner antar man at den påviste mikroorganisme er årsak til infeksjonen.

Tradisjonelt angis at 2/3 av alle infeksjoner med anaerobe bakterier utgjøres av 5 bakteriegrupper:

- *B. fragilis*-gruppen (særlig *B. fragilis*)
- Pigmenterte Prevotella og Porphyromonas
- *Fusobacterium nucleatum*
- Anaerobe kokker
- *Clostridium* spp.

Forekomst av anaerobe infeksjoner i Norge.

Det finnes ingen nasjonal kartlegging eller overvåking av anaerobe infeksjoner i Norge. Det foreligger to arbeider som beskriver funn av anaerobe i blodkultur og ikke-kvalitetssikrede data fra NORM på innsendte anaerobe blodkultur-isolater fra 2005 - 2007. Andelen av positive anaerobe av totalt antall positive blodkulturer lå stabilt på 4,0 - 4,4 % pr år, tilsvarende ca 500 anaerobe funn pr år i perioden. Diskusjonen av rutine anaerob blodkultur versus kultur tatt på indikasjon er lagt død i Norge. En anbefaler rutinemessig sett bestående aerob og anaerob flaske, hvor dette er mulig.

Forekomst av *C. difficile* i Norge

Det foreligger ikke systematiske data for forekomsten av *C. difficile* infeksjoner i Norge. Det er internasjonalt, inklusive i Danmark, et pågående utbrudd av en hyper-virulent BI/NAP1/027 *C. difficile*-stamme. En spørreundersøkelse har adressert påvisning av *C. difficile* i Norge 2006 ved norske laboratorier. Det ble utført 21744 toksin-tester ved de 23 deltakende laboratorier. Positivraten var 11,8 %. Kun 6 av 22 laboratorier dyrket da *C. difficile*. Tilsvarende antall anga dyrkning som undersøkelsesmetode i Ringtest bakteriologi 4/2008.

Konklusjon

Det er ikke holdepunkter for en klar endring av forekomsten av anaerobe infeksjoner vurdert ut i fra funn i blodkultur i Norge, men observasjonstiden er kort. Det er uklart om det er et økende antall funn av *C. difficile* BI/NAP1/027, men stammen er observert i Norge, videre mistenkes forekomsten av CDAD å være reelt økende. Det synes rimelig å vurdere nasjonal overvåking av *C. difficile*-infeksjoner i Norge.

1.5 Anaerob resistens - epidemiologi

Resistens hos anaerobe bakterier har fått økt oppmerksomhet. Metodene for resistensbestemmelse har blitt bedre standardisert og man har også sett en økt forekomst av klinisk betydningsfull resistens..

I nyere tid er det bare en publisert norsk studie av anaerob resistens hos 202 blodkulturisolater innsamlet i perioden 1998-2003 ved Haukeland sykehus. De konkluderer med en høy forekomst av nedsatt følsomhet for eller resistens mot klindamycin hos anaerober generelt og særlig hos *B. fragilis* (38%) og *Clostridium* spp. (42%). Videre er nærmest hele *B. fragilis* gruppen og 40% av *Prevotella* spp. isolatene betalaktamaseproduserende. Metronidazol, imipenem og piperacillin-tazobaktam er trygge valg i empirisk behandling av alvorlige infeksjoner med anaerobe bakterier.

Resultatene fra Haukelandsstudien er i overensstemmelse med en rekke internasjonale studier. Trenden er en generell økende forekomst av høygradig klindamycin-resistens og en bredspektret betalaktamresistens (penicilliner og cefalosporiner) som kan reverseres med betalaktamaseinhibitorer. Følsomheten for metronidazol, piperacillin-tazobaktam og karbapenemer er gjennomgående høy.

Konklusjon

Den økte forekomsten av resistens hos anaerobe bakterier har klinisk betydning for empirisk behandling av alvorlige infeksjoner. Situasjonen krever nasjonal overvåkning og anbefales gjennomført som en regelmessig kartlegging av antibiotikafølsomhet hos klinisk signifikante anaerobe blodkulturisolater i NORM.

1.6 Resistensbestemmelse av anaerobe mikrober.

Resistensbestemmelse av anaerobe mikrober er vanskelig siden de ulike anaerobe mikrobene ofte har svært ulike krav til vekstmedier, er langsomtvoksende (2-5 d før god vekst) og det er vanskelig å utføre hele prosessen med tillaging av inokulum og oppsett under anaerobe forhold.

Som et minimum anbefales at man resistensbestemmer alle anaerobe bakterier isolert fra normalt sterile områder (blodkultur, spinalvæske, etc).

I tillegg bør enkelte større hospital (Universitetssykehus/Sentralsykehus) etablere oversikt over antibiogram hos utvalgte anaerobe mikrober.

Det finnes per i dag ingen enhetlig anbefaling for resistensbestemmelse av anaerobe mikrober. CLSI Anaerobic Working group har over flere år klart å etablere en referansemetode basert på agar-fortynning. Denne metoden er lite praktisk å bruke i daglig rutine og er tenkt brukt som referanse for andre og enklere metoder. Agar gradientdiffusjon er i dag den mest brukte metode til resistensbestemmelse av anaerobe bakterier. Metoden er rimelig godt evaluert og anbefales som standardmetode over det meste av verden. EUCAST har opprettet en egen arbeidsgruppe som i løpet av 2010 vil komme med en anbefaling for Europeiske forhold.

For mest mulig standardisert inokulum bør testmikrobe og ev. kontroll-mikrobe renyrkes på blodholdig medium i 24-48 t. Inokulum kan lages ved å suspendere kolonier direkte fra blod-agar evt fra buljong. For agar gradientfortynning anbefaler leverandør et inokulum på 1 McFarland, men vær oppmerksom på at gitt McFarland ikke representerer samme cfu/ml for forskjellige bakterie-species.

Inkubasjonsatmostfære skal inneholde 4-7% CO₂. Merk at metronidazol krever lavt redox-potensiale, minst -350 mEh, for aktivering.

Anbefalt inkubasjonstid er 20-24 t (hurtigvoksere) og 42-48 t (langsomtvoksende).

Kontrollstamme ved hvert oppsett *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 eller annen passende kontrollmikrobe.

AFA anbefaler at laboratoriene i Norge bruker brytningspunkter definert av EUCAST for anaerobe bakterier.

1.7 Identifikasjon av anaerobier - hvor langt skal vi gå? Fenotypiske og genotypiske metoder. Klinisk betydning av funn.

Grunner til å identifisere bakterier, ofte til artsnivå, er 1) stille en etiologisk diagnose, 2) finne den mest adekvate behandling og 3) få epidemiologisk informasjon. Ved mange anaerobe-infeksjoner er det en blanding av anaerobe og aerobe bakterier og den patogenetiske betydningen av de forskjellige artene er usikker. Resistensforhold, - metronidazol-følsomhet eller ikke - er ofte av større viktighet enn identifiseringen. Ved blandingsinfeksjoner fra visse områder kan det således være tilstrekkelig med identifisering til gruppe - eller slektsnivå (peritonsillær abscess, infeksjon i hode- nakkeregionen, intraabdominale infeksjoner, visse bløtdelsinfeksjoner, diabetiske fotsår).

Infeksjoner med monokultur hvor artsidentifisering og resistensbestemmelse er viktig:

- Funn av Gram positive kokker i kjeder, for eksempel fra abscess (lunge, hjerne, lever). Dette kan være isolater fra *S. milleri*-gruppen som primært kun vokser anaerobt. Disse er metronidazole-resistente. *Finegoldia magna* kan isoleres fra infiserte fremmedlegemer og 10-20% av isolatene er klindamycin-resistente.
- Funn av svermende klostridier. *C. septicum* og *C. tetani* er svermende. *C. septicum* er assosiert med malign lidelse.
- Klostridie-arter kan være resistente: *C. ramosum*, *C. innocuum*, *C. clostridiforme* for klindamycin og *C. ramosum*, *C. butyricum*, *C. clostridiforme* kan danne betalaktamase.
- Arter i slektene *Actinomyces* og *Propionibacterium* er potensielt patogene. *Actinomyces*-arter kan inngå i blandingsinfeksjoner eller være agens ved aktinomykose. *Propionibacterium*-arter kan gi alvorlige øyeinfeksjoner, protese- og shuntinfeksjoner – men er også ofte en forurensning fra hud. *Actinomyces*- og *Propionibacterium*-artene er resistente mot metronidazole og trenger derfor resistensbestemmelse og identifisering minst til slektsnivå.
- Gram-negative staver. *B. fragilis* er hyppigste funn og den mest virulente anaerobe arten ved infeksjoner. Andre arter i *B. fragilis*-gruppen isoleres også hyppig. I mer enn 95% av tilfellene er de følsomme for metronidazole, kloramfenikol, karbapenemer, piperacillin/tazobactam, mens de kan være resistente mot klindamycin. Bruk av bacteroides esculin-agar eller esculintablett og resistens mot kanamycin/vankomycin (skål/tablett) er til nytte for å identifisere *Bacteroides*-gruppen. Evt supplert med påvisning av betalaktamase (*Bacteroides fragilis*-gruppen).
- Arter i *Fusobacterium* blir isolert sjeldnere enn *B. fragilis* gruppen, men de er også potensielt virulente og i stand til å gi monoinfeksjoner.
- *F. necrophorum* kan gi postangial sepsis som er vanskelig å behandle til tross for følsomhet for anaerobe antibiotika. *F. nucleatum*, sees ved blandingsinfeksjoner, men kan også isoleres alene ved abscesser i hjerne, lunge eller lever. Kan sekundært gi sepsis.

Identifikasjon

1. Fenotypiske identifikasjons-flyteskjemaer bør brukes systematisk.
2. Kommersielle identifikasjons-systemer bør brukes med varsomhet og være samstemmende med basale fenotypiske tester.
3. Genotypisk identifikasjon er gullstandard og er i enkelt tilfeller indisert.
4. Massespektrometri, for eksempel MALDI-TOF, er en kost-effektiv, nøyaktig metode for rutine-identifikasjon av anaerobe bakterier på mindre enn 1 time. Er avhengig av enkelt-kolonier, men ikke renkulturer og kan erstatte biokjemisk identifikasjon i nær fremtid.

1.8 Den polymikrobielle flora - molekylærbiologiske metoder og deres rolle i anaerob diagnostikk.

Tidligere studier av infeksjonssykdommer var basert på en eller et lite antall patogener. Det som til nå har hindret oss i å undersøke komplekse blandinger av bakterier er 1) tradisjonen blant bakteriologer for å fokusere på få arter og 2) mangel på teknikker til å undersøke et stort antall bakterier i et stort antall prøver fra områder med kompleks mikroflora.

Nyvinninger innen mikrobielle diagnostiske teknikker som DNA-DNA hybridisering (checkerboard), micro array analyse og 16S rDNA sekvensering har nå gjort det mulig å identifisere bakterier i komplekse mikrobielle samfunn, herunder også anaerober.

Checkerboard teknikk

Checkerboard DNA-DNA hybridisering brukes vanligvis til å påvise inntil 40 bakteriearter fra 28 kliniske prøver på samme tid (1120 hybridiseringer på samme membran).

Micro array analyse og sekvensering

16S rRNA gener fra ekstrahert DNA PCR-amplifiseres med bakterielle universalprimere og merkes via Cy3-dCTP inkorporering i nok en "nested" PCR (HOMIM). 16S rRNA baserte, "reverse captured" oligonukleotidprober (18-20 baser) syntetiseres, "printes" på aldehyddekkede glassplater og skannes.

Cluster-analyse utføres på micro array dataene for å gruppere prøver med sammenfallende bakterieprofiler.

Molekylære teknikker er essensielle for å studere polymikrobiell mikroflora også hvor anaerober er til stede. Ved studier av polymikrobiell mikroflora må også ikke dyrkbare mikrober inkluderes.

1.9 Clostridium difficile - infeksjonskontroll. Hvilke pasienter skal undersøkes? Indikasjon for prøvetaking.

Tilstedeværelse av en toksinproduserende stamme av *C. difficile* i gastrointestinal-tractus er en nødvendig, men som regel ikke den eneste, forutsetning for at en pasient skal få *C. difficile* infeksjon (CDI). Antibiotika, enten som terapi eller profylakse, er den viktigste predisponerende faktor for utløsning av sykdom. Andre og tredje generasjons cefalosporiner, bredspektrede penicilliner og klindamycin er oftest involvert, siden årtusenskiftet også fluorokinoloner.

Det er varierende konklusjoner når det gjelder betydningen av eksogen smitte med *C. difficile* i sykehus versus seleksjon av bakterier som pasienten allerede var kolonisert med ved innleggelse. Bærerfrekvensen i avføring blant asymptomatiske og ellers friske voksne er under 5 %. Blant sykehuspasienter er det store variasjoner, og bærerfrekvens på opptil 25 % er rapportert. Et stort antall publikasjoner beskriver nosokomial smitte av *C. difficile*, dels i form av epidemiologiske data og dels som indirekte holdepunkter for smitteoverføring ved påvisning av bakterien i sykehusmiljø og på utstyr i tilknytning til pasienter med CDI og på hender og bekledning hos helsepersonell etter kontakt med pasientene. Sporer fra *C. difficile* overlever i måneder i sykehusmiljøet og fjernes ikke effektivt med ordinær rengjøring. Sporene er dessuten resistente mot mange vanlige desinfeksjonsmidler og alkoholbasert hånddesinfeksjon er ikke effektiv.

Testing av avføring på *C. difficile* skal bare utføres på uformet avføring, dvs. avføring som ”fyller ut” prøveglasset. Unntaket er pasienter der det mistenkes ileus på grunn av *C. difficile*. Testing av asymptomatiske pasienter anses ikke å ha nytteverdi og anbefales ikke. De europeiske retningslinjene anbefaler at alle pasienter med nosokomial diaré blir undersøkt på *C. difficile*. De anbefaler også at alle pasienter som innlegges på grunn av ikke-nosokomial diaré blir testet. Mikrobiologiske laboratorier bør systematisk teste på *C. difficile* i alle avføringsprøver fra pasienter med diaré og som har vært hospitalisert i mer enn 3 dager.

Gjentatt prøvetaking ved samme episode med diaré ikke er nødvendig. Det anbefales ikke å ta kontrollprøver for dokumentasjon av behandlingseffekt eller sanering. Det er heller ikke indikasjon for å ta prøver for å avgjøre om isolering skal opphøre eller ikke. Spørsmålet om varighet av isolering vil bestemmes av det kliniske forløpet. Smittefaren er størst fra pasienter med diaré, og isolering bør som et minimum fortsette i minst 48 timer etter at pasienten har fått formet avføring. Selv etter adekvat behandling vil mange pasienter imidlertid ha toksinpositiv avføring.

1.10 *Clostridium difficile* - fra toksin-påvisning til dyrkning. Hva bør laboratorierne gjøre - hva bør de sende fra seg?

C. difficile assosiert diaré hos hospitaliserte pasienter har fått økende oppmerksomhet siden 2002 grunnet utbrudd med en hypervirulent stamme *C. difficile* BI/NAP1/027.

Metodeoversikt tester for *C. difficile* :

	Sensitivitet % Variasjonsbredde (Gjennomsnitt)	Spesifisitet% Variasjonsbredde (Gjennomsnitt)	Fordele	Ulemper
Toxin A/B EIA (membran)	31-96 (72)# 32-77 (52)*	65-100 (98)# 84-100 (98)*	Egnet for enkeltprøver. Hurtig, høy spesifisitet. Bedre korrelasjon med klinisk sykdom?	Lavere sensitivitet enn kultur; ingen stammer tilgjengelig for videre us.
Toxin A/B EIA (brønn-type)	57-99 (82)# 48-79 (66)*	87-100 (97)# 97-100 (98)*		
GDH EIA (membran)	80-97 (90)#	75-100 (90)#	Egnet for enkeltprøver. Hurtig, høy NPV i de fleste studier. Egnet som screening test.	Lav spesifisitet, positive resultater må konfirmeres. Ingen stammer tilgjengelig for videre us.
GDH EIA (brønn-type)	91-96 (93)#	89-100 (89)#		
Real-time PCR	87-100# 84-97*	94-100# 93-100*	Høy sensitivitet og spesifisitet. Hurtig.	Dyr; få studier med kommersielle assays. Ingen stammer tilgjengelig for videre us.
Toksigen kultur (dyrking på selektivt medium + in vitro toksin test fra isolat)			Høy sensitivitet og spesifisitet. Mulighet for typing og antibiogram	Arbeidsintensiv og tidskrevende. Påviser kolonisering.
Cell culture cytotoxin assay			Høy sensitivitet og spesifisitet.	Arbeidsintensiv og tidskrevende, avhengig av cellekulturer. Påviser kun toksin B. Ingen stammer tilgjengelig for videre us.

sammenlignet med cell culture cytotoxicity assay; * sammenlignet med toksigen kultur

Tradisjonelt har påvisning av toksin B induert cytopatisk effekt i cellekultur (CCA) vært referansemetode for diagnostisering av CDI fra fæces. Flere oppfatter imidlertid nå påvisning av toksigen kultur som mer sensitiv. Real time PCR-metode med påvisning av *tcdB*, evt. i tillegg *cdtA/cdtB*, *tcdC*-delesjon er sannsynligvis så sensitive og spesifikke, at de kan erstatte toksigen kultur som referansemetode. Større studier mangler imidlertid og dyrkning er nødvendig for fullstendig typing av *C. difficile*.

Som følge av EIA-testenes variable prestasjon (se metodeoversikt), med lav PPV og akseptabel NPV i lavendemisk setting, er det foreslått flere to- og tretrinns algoritmer. De fleste har som første trinn en GDH-EIA og som andre trinn, om GDH er positiv, en toksin A/B-EIA og/eller toksigen kultur, alternativt CCA. Negative GDH-resultater kan rapporteres

ut som sanne negative, mens positive resultater må konfirmeres. Dyrkning i form av toksigen kultur anbefales generelt, men særlig ved utbrudd eller mistanke om dette.

Konklusjoner og anbefalinger:

- Direkte toksin-test alene er ikke optimalt og tillegg av dyrkning er anbefalt.
- Alternativt er algoritmer med sensitive screening-tester (som GDH) og påfølgende bekreftelse med toksin-test og/eller dyrkning.
- Kommersiell real-time PCR kan brukes som eneste diagnostisk test.
- Ved utbrudd er dyrkning og typing av isolater anbefalt.

1.11 Typing av *Clostridium difficile* - fra toxinotyping til MLVA

Den senere tids forandring i epidemiologi er en betydelig utfordring for helsevesenet og genotyping er et sentralt element i utbruddsoppklaring og populasjons analyser.

Genotypingsmetoder

a) Restriksjonsanalyser

- PFGE (Puls-felt gelelektroforese). Mest anvendt metode i USA og Canada der pulsfelt gelelektroforese er satt i et standardisert system kalt Pulsenet.
- REA (Restriction endonuclease analysis). En metode der det bakterielle genomet kuttes i mye større grad enn med PFGE.

b) PCR-baserte metoder

- Toxinotyping (baserer seg på variasjoner i PaLoc).
- FliC-typing (flagillin genet (*fliC*) amplifiseres og kuttes)
- Ribotyping (utnytter forskjellene i spacerregionene til 16S og 23S ribosomal DNA)
- AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

c) Sekvenseringsmetoder

- MLVA (Multilocus variable number tandem repeat analysis)
- MLST (Multilocus sequence typing)
- Tandem repeat sequencing
- TLST (Triple locus sequence analysis)
- slpAST (Surface Layer Protein A gene Sequence Typing)

Prestasjonen til de forskjellige metoder varierer fra 0,964 til 0,631 (discrimination index) i rekkefølgen MLVA, REA, PFGE, slpAST, PCR ribotyping, MLST og AFLP.

En forutsetning for genotyping med dagens metoder er at bakterien finnes i renkultur. Det vil si at alle laboratorier bør ha mulighet til å dyrke bakterien med egnede medier.

Det har i den senere tid dukket opp flere PCR-baserte metoder for å påvise et eller flere av genene i PaLoc. Dette kan utføres direkte på fæcesprøver og om målgenet er *tcdC*, kan slike PCR-metoder brukes som en sile-metode for å påvise epidemiske stammer av *C.difficile*.

I Norge er det etablert PCR ribotyping av *C.difficile* ved tre helseinstitusjoner; St.Olavs Hospital, Stavanger universitetssykehus og Oslo universitetssykehus Rikshospitalet.

1.12 Referansefunksjon for anaerobe og for *Clostridium difficile* - er det nødvendig?

Det norske mikrobiologiske miljø finner det hensiktsmessig at det etableres referansefunksjon for anaerobe bakterier og *Clostridium difficile*. Det er enighet om at det bør tildeles økonomisk støtte til referansefunksjoner.

Avgjørelsen om etablering av referansefunksjonen behandles per dags dato av departementet.

2 Sammendrag av innleggene

2.1 Anaerob diagnostikk - den preanalytiske fase

Carina Thilesen, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset Buskerud

Anaerobe bakterier utgjør del av normalfloraen på slimhinner i munnhulen, gastrointestinal- og genitaltraktus, og kan overstige de aerobe bakterier i forholdet 10:1 til 1000:1. Anaerobe er en vanlig årsak til endogene infeksjoner. Ved brudd i den normale slimhinnebarriæren kan anaerobe bakterier opptre som opportunistiske patogener og forekommer derfor ofte i polymikrobielle infeksjoner. Alvorlighetsgraden av slike infeksjoner kan variere fra mild til livstruende. Sjeldnere kan anaerobe infeksjoner oppstå som følge av eksogen smittekilde f. eks. clostridium infeksjoner (tetanus, botulisme og *Clostridium difficile* assosiert diarre).

Anaerobe bakterier isoleres ofte ved:

- Odontogene infeksjoner
- Hud- og bløtdelsinfeksjoner, spesielt hos pasienter med predisponerende faktorer (diabetes, immunsuppresjon)
- Pleuropulmonale infeksjoner
- CNS infeksjoner, inkludert shunt-infeksjoner
- Intra-abdominale infeksjoner
- Infeksjoner relatert til kvinnelig genital-traktus

Konferer senere innlegg om anaerob epidemiologi og *Clostridium difficile*.

Påvisning av anaerobe bakterier i prøvemateriale er avhengig av korrekt prøvetaking og transport til mikrobiologisk laboratorium. Forurensning med normalflora i forbindelse med prøvetaking kan føre til misvisende dyrkningsresultater og unødig tid og ressursbruk i laboratoriet. Ved prøvetaking fra hud og slimhinner bør prøven tas slik at normalfloraen i størst mulig grad unngås. Prøven skal tas før oppstart av antibiotikabehandling.

Prøvetakingsmetoder:

Penselprøver brukes hyppig, men kan ofte forurennes med normal- og koloniseringsflora. Av den grunn foretrekkes aspirasjon av puss og eksudater samt biopsier/vevsprøver. Penselprøver kan benyttes der aspirasjon ikke er mulig, for eksempel ved lite materiale.

Prøvemateriale:

Anaerob dyrkning bør utføres på prøver tatt fra normalt sterile områder. Anaerob dyrkning anbefales **ikke** utført på følgende prøvemateriale (1,2,3), men unntak kan forekomme avhengig av den kliniske problemstilling.

- bronkialskyllévæske (unntatt lungeabscess)
- ekspektorat, naso-og endotrakeal-aspirat
- penselprøver fra nasopharynx, hals, munnslimhinne (unntatt peritonsillærabscess)
- penselprøver fra overfladiske sår og ulcera (unntatt dyrebitt)
- penselprøver fra urethra, vagina og cervix
- feces – med unntak for *Clostridium difficile* påvisning
- tarminnhold fra stomi-poser,
- urin og kateterurin

Transportmetoder:

”Maintaining aerobic, anaerobic and facultative organisms in an anaerobic environment approaches an ideal method for transport of all bacteria”.

Finegold et al 1974. Isolation of anaerobic bacteria, p. 365-373. Manual of Clinical Microbiology, 2nd ed. ASM press.

Et ideelt transportsystem skal:

- i) opprettholde levedyktigheten av alle typer mikrober i prøvematerialet uten å fremme overvekst
- ii) hindre uttørring av prøvematerialet
- iii) beskytte prøvematerialet fra oksygen

Forventet transporttid til laboratoriet bør tas i betraktning ved valg av transportmetode. Sentraliseringen av laboratorietjenester er en årsak til forlenget transporttid.

Sprøyter:

Sprøyten fylles mest mulig opp, synlige luftblærer evakueres gjennom steril kompress. Sprøyten proppes. Egner seg bare på sykehus med eget mikrobiologisk laboratorium.

Steril beholder:

Må fylles godt opp (>2-3 ml flytende materiale).

Anaerob transportsystemer:

Rør og sterile beholdere med pre-reduert transport agar og indikator system for transport av flytende materiale og vevsbiter har vært i bruk i utlandet i mange år f. eks. Port-A-Cul Transport System (Becton Dickinson) og Anaerobic Transport System (Anaerobe Systems). Anaerobe Systems benytter PRAS-medie dvs ”Pre-Reduced Anaerobically Sterilized” og leverer i tillegg produkter for tannleger, hvilket benyttes av Odontologisk fakultet ved Universitetet i Oslo. De nevnte systemene er foreløpig ikke i handel i Norge (Odontologisk fakultet bestiller direkte fra produsent i USA), men Port-A-Cul systemet er CE merket for Sverige og Danmark og kan fremskaffes.

Transportposer:

Lukkbare plastikkposer med komponenter for å generere anaerob atmosfære f.eks GasPak Pouch (Becton Dickinson), AnaeroGen (Oxoid), AnaeroPouch (Mitsubishi). Egnet for transport av rør og små beholdere. (Lokket bør være løst inntil anaerob atmosfære er generert).

Transportagar (”penselprøver” eller ”swabsystemer”):

Hovedsakelig tre typer på markedet: Stuarts, modifisert Cairy-Blair og Amies. Formuleringer med og uten kull, agar gel eller flytende medium. Forskjellige leverandører. Skal alltid brukes ved penselprøve. Nylon flocked swab teknologi gir bedre opptak og frigjøring av bakterier.

I 2003 publiserte National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) dokumentet *Quality Control of Microbiological Transport Systems; Approved Standard – M40-A*. Dokumentet beskriver en kvantitativ metode som spesifiserer ”acceptance criteria for viability studies and overgrowth studies”. Transportagar bestående av Amies medium er vist å ha bevart levedyktigheten av anaerober i akseptabel grad i 24 timer (4,5,6).

Anaerob blodkulturflaske:

Til forskjell fra de øvrige transportmedier er dette som kjent et anrikningsmedium og overvekst av fakultative anaerober kan vanskeliggjøre diagnostikken av kravfulle anaerober. Kan brukes til forsendelse av normalt sterile kroppsvæsker der mono-mikrobiell infeksjon forventes f.eks amnionvæske, ascites, dialysevæske, pericardvæske, leddvæske (7). Flasken tilsettes 5-10 ml prøvemateriale. Fos tilsettes flasken i laboratoriet. Det bør alltid sendes prøvemateriale i steril beholder ved siden av slik at mikroskopi, evt. direkte PCR, kan utføres.

Transporttid:

Optimal transporttid til mikrobiologisk laboratorium er avhengig av type prøvemateriale og volum (1,2). Purulent prøvemateriale inneholder reduserende substanser som øker overlevelsen av anaerober. Urin og feces derimot inneholder enzymer som kan degradere bakterier og utsæd i laboratoriet bør derfor ikke forsinkes. Små vevsbiter bør beskyttes fra uttørkning. Det anbefales at aspirater og vevsbiter oppbevares og transporteres i romtemperatur (1) mens penselprøver i transportagar oppbevares i kjøleskap og transporteres i romtemperatur (4). Se tabell 1.

Tabell 1 (modifisert fra referanse 1)

Prøvemateriale	Optimal transporttid til laboratoriet	Kommentarer
Aspirat < 1ml 1-2 ml >2ml	≤ 10 min ≤ 30 min ≤ 2-3 timer	Luft kan iles 30 min. gradvis diffundere gjennom plasticsprøyten. Mindre volumer bør derfor transporteres i egnet anaerob transportsystem. Send penselprøve i tillegg dersom anaerob transportsystem ikke benyttes.
Vev eller biopsi I steril beholder I anaerob- transportsystem	≤ 30 min ≤ 2-3 timer	Ved bruk av anaerob transportsystem kan purulent materiale >2ml i volum og større vevsbiter aksepteres for anaerob dyrkning i inntil 24 timer.
Penselprøve I transportagar	≤ 2-3 timer	Transportagar bestående av Amies medium er vist å ha bevart levedyktigheten av anaerober i tilfredstillende grad i 24 timer.

Spørsmål til diskusjon og anbefalinger:

1. Bør spesifikke anaerobe transportsystemer anbefales innført i Norge?

Der transporttiden til laboratoriet er forventet å overstige det optimale på prøvematerialer som skissert i tabellen ovenfor, bør et anaerobt transportsystem benyttes.

2. Transporttid – hva er akseptabelt – hvordan kommentere?

Overskridelse av den optimale transporttiden (kfr. Tabell 1) bør kommenteres i svarbrevet til rekvirenten. I en travel hverdag er det lettere å operere med en ”generisk cut-off” hva gjelder optimal transporttid, i stedet for individuelle vurderinger av prøvematerialet, f.eks.: ”Til anaerob dyrkning må prøver uten transportmedium være på laboratoriet innen 3 timer og prøver i transportmedium innen 24 timer etter prøvetaking”. Anaerob dyrkning som allikevel blir utført på prøvemateriale mottatt utover de nevnte tidspunktene (for eksempel stor biopsi, stort volum, viktig prøvemateriale) bør kommenteres med ”Lang transporttid - mulig redusert verdi av anaerob dyrkning”.

Referanser:

1. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Second Edition. ASM Press. Volume 3, Section 4: Anaerobic Bacteriology. Henry D. Isenberg.
2. Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual, Sixth Edition. Jousimies H, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Star publishing company, Belmont California 2002.
3. Manual of Clinical Microbiology 9TH Edition. ASM Press. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Marie Lousie Landry, Michael A. Pfaller.
4. Evaluation of swab transport systems against a published standard. RP Human and GA Jones. *J Clin Pathol* 2004;57:762-763.
5. Comparison of the Copan ESwab System with Two Amies Agar Swab Transport Systems for Maintenance of Microorganism Viability. Kenneth G. Van Horn et al. *J Clin Micro* May 2008 p. 1655-1658.
6. Evaluation of a Flocked Nylon Swab Transport System (Copan ESwab) for Maintaining Viability of Anaerobes. S. D. Allen et al. ASM 2009. Abstr C-063.
7. Referensmetodikk for laboratoriediagnostikk ved klinisk mikrobiologiska laboratorier. Smittskyddsinstutet, I. Infeksjonsdiagnostikk, I,11 Bakteriologisk diagnostikk av infeksjoner i hud, mjkdelar, skjelett och indre organ. 1:a upplagan 2003.

2.2 Anaerob diagnostikk - utsæd, dyrkningsmedier og metoder

Anne Torun Mengshoel, Mikrobiologisk avdeling, Ullevål Universitetssykehus

Før utsæd undersøkes prøvemateriale makroskopisk og eventuelt mikroskopisk. I henhold til Wadsworth Manual bør man vurdere lukt, rød fluorescens (pigmenterte Phorphyromonas/Prevotella sp), sort nekrotisk vev/puss (pigmenterte gram-negative staver), sulfur granula, purulens og blod. Purulent materiale bør mikroskoperes. Dette forutsetter at prøvemateriale også sendes på steril beholder.

Prøvemateriale bør fortrinnsvis prosesseres i et anaerobt kammer, hvis det ikke er tilgjengelig anbefaler Wadsworth at dette skjer iløpet av 15 min.

Medier (ikke blodkultur flasker)

Aktuelle anaerobe dyrkningsmedier i henhold til CM Procedures Handbook og Koneman :

Ikke selektiv:

Faste:

- Brain Heart Infusion (BHI) blood agar
- Brucella blood agar
- CDC anaerobe blood agar (AnBAP)
- Columbia blood agar
- Trypticase soy agar (TSA) blood agar
- Schaedler blood agar

Flytende (anriknings buljong):

- Enriched thioglycolate medium (THIO)
- Chopped meat-carbohydrate medium
- Chopped meat-glucose medium

Selektive:

- Anaerobe laked kanamycin-vancomycin blood agar (KV)
- Anaerobe laked paromomycin-vancomycin blood agar (PV)
- Anaerobe phenylethyl alcohol blood agar (PEA)
- Colistin nalidixic acid agar (CNA)
- BBE (*Bacteroides bile* esculin agar)
- EYA (Egg yolk agar)

Referensmetodik fra Smittskyddsinstituttet angir fastidious anaerobe agar (FAA, LabM) og fastidious anaerob broth (FAB, LabM) som referenssubstrat. FAB ligner cooked meat medium (CM-buljong).

Anaerobe medier må være næringsrike og inneholde tilskudd som er essensielt for vekst av klinisk relevant anaerobe bakterier. Alle må inneholde blod, hemin og vitamin K1 (menadion). I Wadsworth angis 5% sau, hest el. kanin blod, 1 µg/ml vitamin K1 og 5 µg/ml hemin.

I Wadsworth angis at den anaerobe veksten kan variere avhengig av hvilket basalmedium man velger. Det er rapportert at Brucella agar gir bedre vekst av anaerobe gram-negative staver enn CDC og Schaedler, og at gram-positive kokker vokser i større antall på CDC agar enn på Brucella agar. FAA mediet gir god vekst av fusobakterier og noen formate-fumarate-krevende arter. BHI agar er bedre enn trypticase soy agar for isolering av Eubacterium species, men dårligere for pigmenterte gram-negative staver.

Murray (1978) sammenlignet fem ulike medier (Brucella agar, BHI agar, Columbia agar, Schaedler agar og TSA agar). Han konkluderet med at ingen var overlegne de andre i forhold til vekst av alle anaerobe isolater som ble undersøkt. Den kvantitative veksten var lik på mediene, men fersk SA (Schaedler agar) gav de største koloniene og raskest veksthastighet. Det ble også vist at effekten av tilskudd med reduserende stoffer eller reduksjon av medier før inokulasjon, varierte med type medie, lagringstid (aerobt) og bakterie som ble undersøkt.

Heginbothom et al (1990) sammenlignet fastidious anaerobe agar (FAA, Lab M) og anaerobe agar (GAA, Gibco) med fire andre medier (Columbia agar (Oxoid), Columbia agar med 0.5% gjær ekstrakt (Difco), 5 mg/L haemin og 10 mg/L vitamin K (E Col) brain heart infusion agar (Oxoid) og Wilkins Chalgren agar (Difco)). FAA og GAA gav bedre vekst ved renkultur enn de andre mediene. FAA gav best vekst (flest antall bakterier) fra subgingivale plaque. De konkluderte med at FAA ser ut til å være bedre enn de andre mediene for dyrkning av anaerobe bakterier.

CM Procedures Handbook, Koneman og Wadsworth anbefaler en kombinasjon av ikke-selektive og selektive medier, inklusive anriknings buljong, ved primærutsed.

I Referensmetodik fra Smittskyddsinstituttet beskrives de anaerobe skålene, FAA, som semiselektive ved å legge på aminoglykosidlapp (gentamicin 30 µg) og metronidazolapp (10 µg). Anaerob buljong (FAB) benyttes i tillegg som inkuberes anaerobt eller aerobt.

Mediene bør være ferske (24-48 t hvis de lages i laboratoriet) eller preredusert (CM Procedures Handbook, Koneman, Referensmetodik fra SSI). Koneman skriver at CDC Anaerobe Blood Agar kan oppbevares i "cellophane bags" i 6 uker. Før bruk bør de holdes i 4-16 timer under anaerobe forhold (85% nitrogen, 10% hydrogen og 5% karbondioksyd).

Hansen og Martin (1976) viste at ferske næringsrike medier fremmer vekst av anaerobe bakterier.

Mangels og Douglas (1989) sammenlignet fire ulike Brucella blod agar medier (Anaerobe Systems, BBL Microbiology Systems, Remel og Scott Laboratories). De viste at Anaerobe Systems PRAS brucella skåler gav generelt bedre vekst (større kolonier, mer og raskere vekst). De konkluderte med at dette skyldtes tilvirkningsmetoden PRAS (prereduced anaerobically sterilized) og måten skålene blir pakket på (i aluminiumsfolie under strikt anaerobe forhold).

Nylige studier har vist at medier som inneholder oxyrase kan være et alternativ til prereduksjon.

Wiggs et al. (1998) sammenlignet BBA (brucella blood agar) Oxyrase OxyPlate anaerobe incubation system med vekst på CDC anaerobe BAP inkubert i anaerobt skap. Disse to mediene er like hverandre, med unntak av oxyrase. OxyPlate skålen fungerer som et eget anaerobt kammer (med indikator) og medie inneholder oxyrase som fjerner oksygen. De konkluderte med at Oxyrase OxyPlate anaerobe incubation system er et akseptabelt alternativ til konvensjonell anaerob dyrkningsmetode for de fleste, men ikke alle, klinisk relevante anaerobe bakterier.

Inkuberingssystem.

Ulike anaerobe inkuberingssystem er tilgjengelig og akseptable (CM Procedures Handbook, Koneman og Wadsworth); skap, kolbe og forskjellige bag/pose system. Hvilket inkuberingssystem man velger er avhengig av antall anaerobe dyrkninger som utføres, hvor stor plass man har tilgjengelig og dessuten laboratoriets økonomi.

Anaerobt skap gir størst fleksibilitet (ved inkubering og avlesning), sikrer kontinuerlig anaerobt miljø (under avlesning, isolering og identifikasjon) og har størst kapasitet.

Anaerobt bag/pose system er et praktiske alternativ når få skåler skal inkuberes.

I kolber kan anaerobt dyrknings miljø oppnås ved en "evacuation-replacement" metode eller ved et kjemisk system. Anoxomat (Mart Microbiology, Lichtenvoorde, The Netherlands) er en automatisert "evacuation-replacement" metode som har vist seg å gi god anaerob vekst sammenlignet med andre system (Koneman, Wadsworth).

Enkelte system krever katalysator (palladium), den må aktiveres for hver ny inkubering.

Det anaerobe miljøet må overvåkes daglig med en oksidasjon-reduksjons indikator.

Ulike anaerobe bakterier har ulik sensitivitet for oksygen. Dyrkning av strikt anaerobe mikrober krever en rask generering av en atmosfære med oksygen nivå under 0.5%, mens

moderat anaerobe kan vokse ved oksygen nivå på 2-8%. Moderat anaerobe kan oppholde seg i vanlig atmosfære i 60-90 minutter uten å svekkes (Loesche, W. J. 1969).

Imhof og Heinzer (1996) sammenlignet ulike system som angitt i tabellen under, for opprettelse av anaerobt miljø i kolbe. De målte tiden det tok før oksygen konsentrasjonen var 0.5%. De konkluderer med at evacuation-replacement metode eller Oxoid AnaeroGen system bør benyttes for å opprette anaerobt atmosfære.

System	Virkning	Katalysator
Evacuation-replacement	Erstatter oksygen med hydrogen	Palladium
Oxoid AnaeroGen	Ascorbic acid absorberer oksygen og genererer karbondioksyd konsentrasjon mellom 9-13%	
Merck Anaerocult A	Iron powder binder oksygen	
BBL GasPak	Sodium borohydride frigjør hydrogen.	Palladium
BBL GasPakPlus		
Adams Scientific GasGendicator		
Difco Anaerobic		
bioMerieux Generbox		
anaer systems		

Downes et al (1990) sammenlignet tre systemer; anaerobt kammer, Anaerobic Pouch System Catalyst-Free (Difco Laboratories) og Bio-Bag Environmental Chamber Type A (Marion Scientific), ved tre ulike sentre. Flest isolater lot seg dyrke i anaerobt kammer, mens Anaerobic Pouch gav bedre uttelling enn Bio-Bag.

Delaney og Onderdonk (1997) sammenlignet AnaeroPack (Mitsubishi Gas Chemical America, Inc., New York, N.Y.) med GasPak (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) og konvensjonelt anaerobt kammer. AnaeroPack system krever ikke katalysator eller vann, produserer ikke hydrogen, men absorberer oksygen og genererer karbondioksid. Det er enkelt i bruk. Undersøkelsen viste at AnaeroPack er et utmerket alternativ til de etablerte metodene for opprettelsen av anaerobt miljø.

Inkubasjonslengde.

Etter utsæd bør skålene plasseres i anaerobt miljø umiddelbart og inkuberes ved 35-37 °C i 72t før de utsettes for oksygen. Hvis anaerobt skap benyttes, kan skålene inspiseres tidligere. Skålene må totalt inkuberes i minimum 72t, og ytterligere inkubering kan være nødvendig for å identifisere langsomtvoksende anaerobe bakterier, som *Actinomyces* og *Eubacterium*. I CM Procedures Handbook anbefales totalt 5-7 d, i Wadsworth anbefales at negative medier etter 48 t inkuberes i totalt minimum 7 d og i Koneman totalt 4-6 d. Anrikningsbuljong inkuberes også ved 35-37 °C og reutsæd gjøres hvis buljongen blir blakket eller ved inkubasjonstidens slutt, hvis ingen vekst på fast medium. I CM Procedures Handbook angis reutsæd av klar buljong etter 7 dager. I Koneman står det "Unless growth is apparent visually, broth cultures should be held a minimum of 5-7 days before discarding them as negativ."

I strategimøte nr 22 (2008) som omhandlet Bakterielle infeksjoner i CNS ble det for utvalgte prøvematerialer fra CNS, anbefalt anaerobt dyrkning på faste medier i 5-7 dager. For *Actinomyces* påvisning ble det i tillegg anbefalt buljong som skulle inkuberes i 7 dager før re-utsæd, deretter skulle re-utsæd skål inkuberes i 5 dager (avlesning dag 3 og 5).

I strategimøte nr 11 (1997) som omhandlet Bakterielle infeksjoner i hud og bløtdeler ble det generelt anbefalt anaerob inkubering i 2 dager for prøver ved bestemte problemstillinger (erysipelas, nekrotiserende fasciitt, akutte purulente infeksjoner, bittsår, diabetisk fotsår, decubitus (biopsi, abscess), postoperative sårinfeksjoner og spekkfinger).

Referanser.

- Brazier, J. S., and SA. Smith. 1989. Evaluation of the Anoxomat: a new technique for anaerobic and microaerophilic clinical bacteriology. *J. Clin. Pathol.*, 42:640-644.
- Delaney, M. L., Onderdonk A. B. 1997. Evaluation of the AnaeroPack system for growth of clinically significant anaerobes. *J Clin Microbiol.* 35(3):558-62.
- Downes, J., et al. 1990. Evaluation of Two Single-Plate Incubation Systems and the Anaerobic Chamber for the Cultivation of Anaerobic Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 28:246-248.
- Hanson, C. W., and W. J. Martin. 1976. Evaluation of Enrichment, Storage, and Age of Blood Agar Medium in Relation to Its Ability to Support Growth of Anaerobic Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 4:394-399.
- Heginbothom, M., T. C. Fitzgerald, W. G. Wade. 1990. Comparison of solid media for cultivation of anaerobes. *J. Clin. Pathol.* 43:253-256.
- Imhof, A., and I. Heinzer. 1996. Continuous Monitoring of Oxygen Concentrations in Several Systems for Cultivation of Anaerobic Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 34:1646:1648.
- Isenberg, H. D. 2004. *Clinical Microbiology Procedures handbook*, second edition. ASM Press. Kap. 4.3.- 4.5.
- Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, and W. C. Winn, Jr. 1997. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa. Chapter 16 The Anaerobic Bacteria.
- Loesche, W. J. 1969. Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.* 18:723-727.
- Mangels, J. I., and B. P. Douglas. 1989. Comparison of Four Commercial Brucella Agar Media for Growth of Anaerobic Organisms. *J. Clin. Microbiol.* 27:2268-2271.
- Murray, P. R. 1978. Growth of Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria on Agar Media: Effects of Media Composition, Storage Conditions, and Reduction Under Anaerobic Conditions. *J. Clin. Microbiol.* 8:708-714.
- Summanen. 2002. *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual* 5th ed.
- Wiggs, L. S., J. Cavallaro and M. Miller. 1998. Evaluation of the Oxyrase OxyPlate Anaerobe Incubation System. *J. Clin. Microbiol.* 38:499-507.
- Referensmetodik för laboratoriediagnostik vid kliniskt mikrobiologiska laboratorier. Smittskyddsinstitutet, I. Infektionsdiagnostik, I.11. Bakteriologisk diagnostik av infektioner i hud, mjukdelar, skjelett och inre organ. 1:a upplagan 2003.
- Strategimøte nr 22, 2008: Bakterielle infeksjoner i CNS.
- Strategimøte nr 19, 1997: Bakterielle infeksjoner i hud og bløtdeler.

2.3 Taksonomiske forandringer - betydning for klinisk mikrobiologi

Ingar Olsen og Jørn Arne Friedrich-Aaas, Institutt for oral biologi, Det odontologiske fakultet, Universitetet i Oslo

Taksonomi er definert som klassifisering, identifisering og nomenklatur av mikroorganismer. Hvis man legger denne definisjonen til grunn, blir svaret på spørsmålet i tittelen ovenfor avgjort ja. Vi vil belyse dette gjennom eksempler fra egen forskning som nylig er publisert.

Oral mikroflora hos eldre uten rotkaries (finsk munnhule) belyst med micro array analyse

I denne undersøkelsen ble bakterieprøver tatt fra tungerygg, overgangsfold, harde gane, supragingivalt plakk fra friske rotoverflater og subgingivalt plakk fra de samme tannrøttene (1). 16S rRNA genbasert microarray ble benyttet for samtidig påvisning av 300 ulike orale bakteriearter. 175 bakteriearter og clustere ble funnet. Disse representerte 8 fyla. Arter som tilhørte *Streptococcus*, *Veillonella* og *Fusobacterium* var vanlige i alle undersøkte seter. Antall arter per person varierte fra 51-81. 40 arter eller clustere var signifikant assosiert med minst 1 sete. Undersøkelsen viste også at den bakterielle diversitet i den orale mikrofloraen hos eldre med frisk munnhule var størst i kinn og gane. Bakteriearter som normalt forbindes med karies eller periodontitt, kunne sjelden eller aldri påvises.

Konklusjon. Den orale bakterieflora hos eldre er divers og mer setespesifikk enn den er personspeisifikk. En stor del av denne floraen er ikke tidligere blitt identifisert og beskrevet.

Rotkaries hos eldre analysert ved 16S rRNA gensekvensering

Dentalt plakk ble samlet inn fra rotoverflaten til 10 kontrollpersoner uten rotkaries og fra 11 personer med rotkaries (2). 16S rRNA gener fra ekstrahert DNA ble PCR-amplifisert, klonet og sekvensert for å identifisere bakteriearter i prøven. Fra 3544 kloner ble 245 dominerende arter eller fylotyper funnet. Disse representerte 8 bakterielle fyla. Størsteparten (54 %) hadde ikke tidligere blitt dyrket. Arter innen *Selenomonas* og *Veillonella* ble påvist i alle prøver. Prøver fra frisk mikroflora omfattet *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*, *Leptotrichia* spp., *Selenomonas noxia*, *Streptococcus cristatus* og *Kingella oralis*. *Lactobacillus*, som tradisjonelt er blitt assosiert med rotkaries, manglet. *Streptococcus mutans* ble funnet hos 1 og *Actinomyces* spp. hos halvparten av kontrollene.

Mikrofloraen fra kariøse seter var dominert av *Actinomyces* spp., laktobasiller, *S. mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Selenomonas* sp. klon CS002, *Atopobium*- og *Olsenella* spp., *Prevotella multisaccharivorus*, *Pseudoramibacter alactolyticus* og *Propionibacterium* sp. stamme FMAS. Bakteriefloraen ved rotkaries viste betydelig variasjon mellom individer og var mer komplisert enn tidligere antatt.

Konklusjon. Funnene indikerte at mulige agens ved rotkaries inkluderer ikke bare *S. mutans*, laktobasiller og *Actinomyces* som tidligere antatt etter dyrkningsforsøk, men også arter innen *Atopobium*, *Olsenella*, *Pseudoramibacter*, *Propionibacterium* og *Selenomonas*.

Rotkaries hos eldre analysert ved micro array

I denne studien ble supragingivalt plakk samlet inn fra 20 friske kontrollpersoner og fra friske og kariøse røtter og kariøst dentin fra 21 pasienter med rotkaries (3). 179 bakteriearter og artsgrupper ble påvist. Høyere bakteriell diversitet ble observert hos kontrollen enn hos pasienter. *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus* og *Pseudoramibacter alactolyticus* ble funnet i de fleste prøvene fra rotkaries. *S. mutans* ble påvist hyppigere i infisert dentin enn i de

andre prøvene, men forskjellen var ikke signifikant. *Actinomyces* ble funnet hyppigst hos kontroller.

Konklusjon. Ved rotkaries kan andre arter enn de antatte patogenene *Actinomyces* og *S. mutans* spille en rolle i sykdomsutviklingen.

Avslutning

Oppsummering. Endringer i taksonomi (klassifisering, identifisering og nomenklatur) kan gi ny informasjon om bakteriers mulige rolle i sykdomsprosessen.

Anbefaling. Taksonomi bør oppfattes som et bredt konsept, ikke alene som nomenklatur.

Problemstillinger. Hvilke taksonomiske teknikker er mest sentrale? Skal taksonomi hvile utelukkende på genetiske teknikker, eller bør den fremdeles være polyfasisk?

Referanser

1. Preza D, Olsen I, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Diversity and site-specificity of the oral microflora in the elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28 (9):1033-1040. Epub 2009 Apr 17.
2. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (6):2015-2021. Epub 2008 Apr 2.
3. Preza D, Olsen I, Willumsen T, Boches SK, Cotton SL, Grinde B, Paster BJ. Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28 (5):509-517. Epub 2008 Nov 28.

2.4 Epidemiologi - anaerobe funn inklusive *Clostridium difficile* i Norge.

Jørgen V. Bjørnholt, Mikrobiologisk Institutt, Rikshospitalet

Introduksjon

Den anaerobe mikrobiologis natur presenterer flere utfordringer for beskrivelsen av sammenhengen mellom mikrobiologiske funn og infeksjon. De anaerobe bakterier er en viktig del av menneskets normalflora spesielt i gastro-intestinal traktus, men også på hud og i vagina, og kontaminering av prøvemateriale med normalflora er et ikke uvanlig problem. Nært beslektet med dette er den til tider vanskelige påvisning av anaerobe bakterier i en blanding med andre mulige patogener/normalflora. Videre er påvisning av anaerobe bakterier i et gitt prøvemateriale meget følsom for prøvetakings metodikk og transport. Identifikasjon av enkelte species kan tillike være meget krevende og kostbar. Enkle kost-effektive tilnærminger er (med sannsynlig god grunn) derfor utbredt blant klinisk mikrobiologiske laboratorier.

Det foreligger likevel, en til dels stilltiende, aksept av deres epidemiologi og det er enkelt å finne publikasjoner i etablerte tidsskrifter om dette emne frem mot år 2000 hvor referanser utelukkende er tekstbøker av ennå eldre dato (1). Disse omstendigheter har da også medført en vis uenighet om forekomst og betydningen av anaerobe bakterier for infeksjoner og indikasjon for prøvetaking. Mest synlig i de akademiske fora er/har vært diskusjonen vedrørende rutine versus indikasjons betinget anaerob blodkultur (2-4).

I tillegg er de fleste publiserte studier av anaerobe infeksjoner retrospektive og har anvendt varierende laboratoriemetodikk som i mange tilfeller ikke har vært optimal. Således er det klart at det foreligger mulighet for betydelig bias i beskrivelsen av forekomsten og ikke minst i tolkning av betydningen av de anaerobe funn. Det vil bli for omfattende å gå gjennom hele den anaerobe litteratur her, men den anførte kritikk gjelder generelt. Det er ikke urimelig å antyde at den viktigste bias må være en underrapportering av anaerobe funn og deres betydning, noe en da for så vidt også fikk bekreftet i litteratur henvisningen i Ringtest 1/2009 til en prospektiv studie av forekomsten av Lemierre's syndrom i DK 1998-2001(5).

Den generelle anaerobe mikrobiologis epidemiologi.

Temaet omtales kort, da det ikke foreligger større studier som endrer på den etablerte kanon. Det synes hensiktsmessig å fokusere på 2 punkter; A) Infeksjoner som vanligvis involverer anaerobe bakterier og B) Forekomst av species spesifikke anaerobe infeksjoner.

Ad A). Alle infeksjoner kan i prinsippet involvere anaerobe bakterier. Langt de fleste med utgangspunkt i skadet slimhinne i gastro-intestinal traktus, betydelig sjeldnere hud/traumer og eksogent tilførte bakterier (eks. tetanus, CDAD, botulisme). Finegold SM (1) angir i flere av sine publikasjoner en liste gjengitt i tabell 1 som lider av de ovenfor nevnte svakheter, men likevel står uimotsagt i dag.

Tabell 1. Infeksjoner som kan involvere anaerobe bakterier (mod. fra referanse 1).

Subduralt empyem
End/pan-ophthalmitt
Peridontitis
Odontogene infeksjoner
Kronisk sinusitt/otitis media/mastoiditt
Peritonsillær abscess
Infeksjoner på hals
Aspirasjonspneumoni
Lungeabscess
Pleuraempyem
Pyogen leverabscess
Peritonitt
Intraabdominal abscess
Appendisitt
P.O. sårinfeksjoner etter colon kirugi / FGT
Endometritt/salpingitt/tube-ovarie abscess
Bittsår
Infiserte fotsår
Decubitus
Anaerob cellulitt
Clostridie myonecrose
Synergistisk non-clostridie myonecrose
Anaerob streptokokk myositt
Nekrotiserende fasciitt

I Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual 2002 (6) er det forsøkt å sette opp en tabell over forekomst av disse infeksjoner med angivelse av andel positive anaerobe kulturer og andel rene anaerobe kulturer, se tabell 2.

Tabell 2 (mod. fra referanse 6)

Infeksjon	Andel positive anaerobe kulturer (%)	Andel rene anaerobe kulturer (%)
Bakteriemi	2,8 - 5,7	-
Hjerneabscess	62 - 83	24 - 63
Kronisk sinusitt/otitis media	48 - 100	1 - 62
Peritonsillær abscess	82 - 87	17
Aspirasjonspneumoni	85 - 93	33 - 50
Intraabdominale infeksjoner	50 - 94	14 - 33
Bitt	50 - 67	0 - 6
Osteomyelitt	22 - 40	10 - 67

Spekteret av anaerobe bakterier som er identifisert i forbindelse med infeksjoner er meget bredt og blir ikke mindre, spesielt interessant blir funnene knyttet til nye teknikker som checker-board DNA-DNA hybridisering og Microarray (se annen presentasjon dette møte), om enn det synes langt frem å få kartlagt eventuelle årsaks forhold mellom funn og infeksjon.

Likevel vil antatt 2/3 av alle infeksjoner med anaerobe bakterier utgjøres av 5 bakterie grupper angitt i tabell 3 (1).

Tabell 3. Hyppigst forekommende anaerobe kliniske isolater.

B. fragilis gruppen (særlig <i>B. fragilis</i>)
Pigmenterte Prevotella og Porphyromonas
<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Anaerobe kokker
<i>Clostridium perfringens</i>

Som kommentar til denne tabell, som omfatter funn fra alle typer infeksjoner, er det fristende å vise til nedenstående tabell 4 og til tidligere nevnte arbeid av Hagelskjær Kristensen et al. (5). Erfaringsmessig ser vi stort sett andre Clostridier enn *C. perfringens*, i alle fall i blodkultur. Videre er dyrkning av fæces økende som følge av økt fokus på *C. difficile*, slik at denne bakterien i dag formodentlig vil dominere bildet.

Forekomst av anaerobe infeksjoner i Norge.

Det finnes ingen nasjonal kartlegging eller overvåking av anaerobe infeksjoner i Norge. Det eksisterer imidlertid data fra NORM på innsendte anaerobe blodkultur isolater fra 2005 -2008.

Tabell 4. Anaerobe blodkultur funn i Norge 2005 – 2007. Vennligst fremskaffet av GS Simonsen, NORM.

	2005	2006	2007
Positive Aerobe <i>antall</i>	10306	11589	12551
Positive anaerobe <i>antall (%)</i>	440 (4,1)	489 (4,0)	583 (4,4)
Anaerobe agens			
<i>Bacteroides fragilis</i> gruppen	152	168	206
<i>Bacteroides</i> spp. (øvrige)	50	47	68
<i>Porphyromonas</i> spp.	4	3	3
<i>Prevotella</i> spp.	16	14	17
<i>Leptotrichia</i> spp.	1	0	0
<i>Fusobacterium</i> spp.	19	35	38
<i>Veillonella</i> spp.	3	4	4
Uidentifisert anaerob GNST	4	12	9
<i>Clostridium</i> spp.	88	79	102
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	35	46	42
<i>Peptococcus</i> spp.	3	2	6
<i>Propionibacterium</i> spp.	42	31	33
<i>Bifidobacterium</i> spp.	2	0	1
<i>Lactobacillus</i>	8	19	17
<i>Actinomyces</i> spp.	1	5	5
<i>Eggerthella lenta</i>	1	1	6
<i>Actinobaculum</i> spp.	4	2	3
<i>Eubacterium limosum</i>	1	8	9
<i>Peptoniphilus</i> spp.	1	0	0
Uidentifisert anaerob GPST	2	10	9
Uidentifisert anaerob bakterie	3	3	5

Data er innhentet på samme premisser som øvrige NORM data (7), men oppfattes som preliminære da endelig kvalitets kontroll ikke foreligger (personlig meddelelse GS Simonsen).

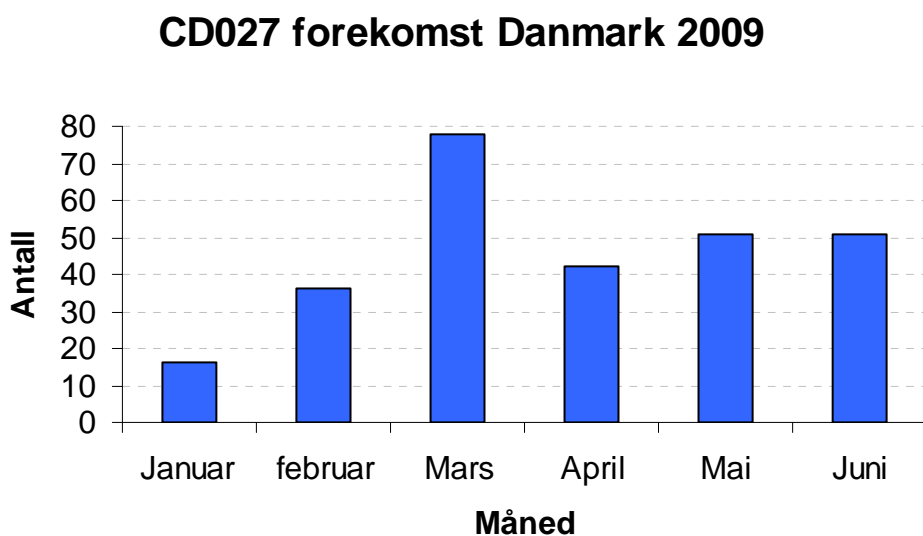
. Det er så langt kort observasjonstid (3 år), men funnrater synes å være stabile og i tråd med internasjonale tall. To norske studier fra nyere tid bekrefter også dette (8, 9).

Vedrørende diskusjonen av rutine anaerob blodkultur versus kultur tatt på indikasjon er denne vel foreløpig lagt død i Norge. En aksepterer en meget lav positivrate ut fra den anskuelse at blodvolumet suppleres med den anaerobe flaske, samt at mange av de fakultativt anaerobe også vil bli detektert av denne, og til dels tidligere enn i den aerobe flaske (10, 11). Videre kan det argumenteres for at funnraten totalt med stor sannsynlighet ville bli ennå lavere om anaerob blodkultur ble tatt på indikasjon, noe som vil være uheldig for en eventuell overvåking av innsidens og resistens forhold. Det synes viktig å opprettholde blodvolumet uansett (12), slik at den økonomiske besparelse vil være tilnærmet fraværende.

Forekomst av *C. difficile* i Norge

Det er kjent at det internasjonalt er et pågående utbrudd av en hypertoksinogen 027 *C. difficile* stamme (13). En bør imidlertid være klar over at en økt forekomst av Clostridie assosiert diarree og død som følge av dette er beskrevet i en registerstudie fra Finland i perioden 1996 – 2004 (14), altså før aktuelle utbrudd. I Danmark ble det 17 mars 2009 innført skjerpet overvåking av tilfeller med mistenkt eller påvist *C. difficile* hos personer med sannsynlig nosokomial gastroenteritt i forbindelse med utbrudd i hovedstadsområdet, se figur 1;

Figur 1. Overvåkningstall CD027 med toksinprofil A/B og binært toksin, mottatte isolater Statens Serum Institutt. (15)



Det foreligger ikke systematiske innhentede data for forekomsten av *C. difficile* infeksjoner i Norge, men det er gjennomført en spørreundersøkelse i 2007 som adresserte forekomst av *C. difficile* i Norge 2006. I 2007 ble det sendt ut spørreskjema til alle landets laboratorier fra Avd. for Sykehushygiene, Rikshospitalet. 23 laboratorier svarte og resultater er gjengitt i nedenstående tabell 5.

Tabell 5. *Clostridium difficile* påvisning ved norske laboratorier 2006, vennligst utlånt av A. Ingebretsen og E. Lingås, Avd. Sykehushygiene, Rikshospitalet.

Andel lab. som dyrker	Andel lab. som påviser Toksin A+B	Antall toksin tester utført	Antall positive toksin tester (%)	Positiv dyrkning* (%)
6/22	18/23	21744	2574 (11,8)	637 (24,7)

Enkelte laboratorier har ikke levert fullstendige data. * Kun dyrkning ved positiv toksin test, enkelte laboratorier dyrker ikke.

Bemerk den lave dyrkningsrate på de toksin positive prøver. Verdien er falsk lav, korrigeret for laboratorier som ikke dyrker anslås den til å være ca. 50 %. Per i dag er den nærmere 95 % med adekvat teknikk (personlig meddelelse Andre Ingebretsen). En mindre studie av positive toksin tester, dyrkningssvar og utskrivelsesdiagnoser fra Ahus pågår, riktignok også av retrospektiv natur. Mens den påviser et økende antall utførte toksintester, er det ikke økt positiv rate eller tilsvarende sikkert økende antall utskrivelses diagnoser (A04.7 og K52.8) i perioden 2000-2007, (personlig meddelelse A Føstervold og M Steinbakk).

Konklusjon

De anaerobe infeksjoners mikrobiologi hviler i stor grad på retrospektive epidemiologiske observasjoner. Tross dette er disse klart relevante, men flere prospektive observasjoner og studier med god metodologi er ønskelig. Det er ikke holdepunkter for en klar endring av forekomsten av anaerobe infeksjoner vurdert uti fra funn i blodkultur i Norge, men observasjonstiden er kort. Det er uklart om det er et økende antall funn av *C. difficile* 027, men den er observert i Norge (16), videre kan forekomsten av CDAD mistenkes å være reelt økende.

Spørsmål/diskusjonsemner

- 1) Fortsatt rutinemessig anaerob blodkultur ved anleggelse av blodkultur, unnatt når barneflaske må anvendes?
- 2) Overvåking av anaerobe funn i blodkultur?
- 3) Overvåking forekomst av *C. difficile* funn og CDAD, hvornår, hvorledes og av hvem?

Referanser

1. Finegold SM. Anaerobe infection in humans. *Anaerobe* 1995;1; 3-9
2. Lassmann et al. Reemergence of Anaerobic Bacteremia. *CID* 2007;44; 895-900
3. Hecht DW. Routine anaerobic blood cultures: Back where we started? *CID* 2007;44:901-3
4. Iwata K et al. Is anaerobic blood culture necessary? If so, who needs it? *Am J Med Sci* 2008;336(1):58-63.
5. Hagelskjær Kristensen L et al. Lemierre's syndrome and other disseminated *Fusobacterium necrophorum* infections in Denmark: a prospective epidemiological and clinical survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 557-63)
6. Wadsworth-KTL Anaerobic bacteriology manual 6 utg, Jousimies H, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Star publishing company, Belmont California 2002
7. NORM/NORM-VET 2007. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø / Oslo 2008. ISSN:1502-2307.
8. Kommedal Ø et al. Antibiotic susceptibility of blood culture isolates of anaerobic bacteria at a Norwegian university hospital. *APMIS* 2007;115:956–61
9. Hammerstrøm J, Røym AL, Gran FW. Bakteriemi ved maligne blodsykdommer. *Tidsskr Nor Legeforen* 2008; 128:1655-9
10. Grohs P et al. Relevance of routine use of the anaerobic blood culture bottle. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2711-15
11. Fenner L et al. Is the incidence of anaerobic bacteremia decreasing? Analysis of 114.000 blood cultures over a ten-year period. *J Clin Microbiol* 2008; 46:3432-34.
12. Rapport fra Strategimøte nr 16, 2002 Blodkultur. Hovedredaktører Lassen J og Sandven P ISSN: 0804-8444
13. Kelly CP, LaMont T. *Clostridium difficile* — More Difficult Than Ever *N Engl J Med* 2008;359:1932-40.
14. Lyytikäinen O et al. Hospitalizations and deaths associated with *Clostridium difficile* infection, Finland, 1996-2004. *Emerg Inf Dis* 2009;15. 761-765
15. Statens Serum Institutt , www.ssi.dk/sw64842.asp
16. Ingebretsen A, Hansen G, Harmanus C, Kuijper EJ. First confirmed cases of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Norway. *Euro Surveill.* 2008; 13(2):pii=8011. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8011>

2.5 Anaerob resistens - epidemiologi

Arnfinn Sundsfjord, Institutt for medisinsk biologi, Det helsevitenskapelige fakultet, Universitetet i Tromsø. Kompetansesenter for påvisning av antibiotikaresistens, Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Medisinsk klinikk, Universitetssykehuset Nord-Norge

Resistens hos anaerobe bakterier har fått økt oppmerksomhet gjennom en økt forekomst av klinisk betydningsfull resistens og bedre standardisering av metoder for resistensbestemmelse (1, 2). Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål (AFA) har angitt brytningspunkter for anaerobe bakterier for følgende antibiotika: penicillin G, ampicillin/amoxicillin, piperacillin-tazobaktam, imipenem, meropenem, ertapenem, klindamycin, kloramfenikol og metronidazol (www.antibiotikaresistens.no). Disse midlene inngår da også i nasjonale og internasjonale studier av anaerob resistens.

I nyere tid er det bare en publisert norsk studie av anaerob resistens (3). Kommedal og medarbeidere beskrev følsomheten for klindamycin, imipenem, metronidazol, penicillin G og piperacillin-tazobaktam hos 202 blodkulturisolater innsamlet i perioden 1998-2003 ved Haukeland sykehus. De dominerende anaerobe bakterier var *Bacteroides fragilis* gruppen (n=101; 50%), *Prevotella* spp. (n=13;5%), *Fusobacterium* spp. (n=11;5%), *Peptostreptococcus* spp. (n=32;16%) og *Clostridium* spp. (n=43;21%). Resistensbestemmelse ble utført med Etest og påvisning av betalaktamaseproduksjon med nitrocefim. Følsomhetskategoriseringen (S-I-R) ble vurdert ut i fra både CLSIs og AFAs brytningspunkter. De konkluderer med en høy forekomst av nedsatt følsomhet for eller resistens mot klindamycin hos anaerober generelt og særlig hos *B. fragilis* (38%) og *Clostridium* spp. (42%). Videre er nærmest hele *B. fragilis* gruppen og 40% av *Prevotella* spp. isolatene betalaktamaseproduserende. Metronidazol, imipenem og piperacillin-tazobaktam er trygge valg i empirisk behandling av alvorlige infeksjoner med anaerobe bakterier.

Resultatene fra Haukelandsstudien er i overensstemmelse med en rekke internasjonale studier (4-9). Trenden er en generell økende forekomst av høygradig klindamycin resistens og en bredspektret betalaktamresistens (penicilliner og cefalosporiner) som kan reverseres med betalaktamaseinhibitorer. Følsomheten for metronidazol, piperacillin-tazobaktam og karbapenemer er gjennomgående høy.

Mekanismene bak betalaktamresistens hos *B. fragilis* gruppen er i hovedsak iboende kromosomale cefalosporinaser som hydrolyserer penicilliner og cefalosporiner (1, 10). Disse cefalosporinasene er klassifisert som klasse A 2e enzymer som inaktiveres av betalaktamaseinhibitorer som tazobaktam, klavulanat og sulbaktam (10). Plasmidmedierte bacteroideslignende cefalosporinaser er nå også påvist hos *Prevotella* spp. (11-12). Hos en mindre genetisk subgruppe av *B. fragilis* (<5%) kan det påvises karbapenemasegener (*ccrA*, *cfiA*) som normalt ikke kommer til uttrykk (1). Dette er metallobetalaktamaser (MBL) som hydrolyserer hele betalaktamgruppen med unntak av monobaktamer (10). Det er interessant at karbapenemaseproduksjonen kan slås på ved at små mobile genetiske elementer (IS-elementer) plasserer seg ovenfor *ccrA/cfiA*-genet. Slike sporadiske isolater med høygradig karbapenemresistens og positiv MBL Etest er beskrevet i Norge (13). Det er også påvist nedsatt følsomhet for betalaktamantibiotika hos *B. fragilis* gruppen som skyldes endringer i penicillin-bindende-proteiner (PBP) med affinitetstap eller tap av poriner og ledsagende nedsatt permeabilitet (1).

Klindamycinresistens hos anaerobe bakterier skyldes metylaser (Erm) som modifierer bindingsstedet på 23S rRNA og medierer høygradig konstitutiv MLS-resistens slik som hos pneumokokker og gruppe A streptokokker (1). En rekke ulike *erm*-gener er påvist hos anaerobe bakterier. De kan overføres mellom bakterier med plasmider og overføres mellom ulike genetiske posisjoner intracellulært ved hjelp av transposoner.

Metronidazol har vært i klinisk bruk siden 1960. Nedsatt følsomhet for eller resistens mot metronidazol er likevel uvanlig. Resistens er assosiert til forekomsten av nitroimidazol-reduktaser som kodes av *nim*-gener (1, 14). Virkningsmekanismen er en enzymatisk modifiering som blokkerer en videre intracellulær aktivering 5-nitroimidazol prodrug. Det er allerede beskrevet i alt 7 ulike *nim*-gener (A-G). Overførbare plasmider med *nim*-gener er påvist. Metronidazol-resistens hos *B. fragilis* som ikke er assosiert *nim*-gener er beskrevet, men mekanismen er ikke identifisert.

I *Clostridie*-gruppen er følsomheten for ulike antibiotika variabel, med unntak av *C. perfringens* som gjennomgående synes følsom for penicillin (1). Nedsatt følsomhet for betalaktamer i denne gruppen anaerobe bakterier skyldes synes i hovedsak å være assosiert med PBP-endringer eller tap av poriner.

Kinoloner har tradisjonelt ikke vært effektive antibiotika mot anaerobe bakterier. Nyere fluorokinoloner som moxifloxacin har imidlertid en økt effekt mot anaerobe. Men forekomsten av moxifloxacin-resistens i *B. fragilis* gruppen er allerede rapportert som økende og høy (8). *In vitro* resistens har vært assosiert til både kromosomale mutasjoner i topoisomerasegener og effluks (1).

Konklusjon: Den økte forekomsten av resistens hos anaerobe bakterier har klinisk betydning for empirisk behandlingen av alvorlige infeksjoner (1, 2). Situasjonen krever nasjonal overvåkning og anbefales gjennomført som en regelmessig kartlegging av antibiotikafølsomhet hos klinisk signifikante anaerobe blodkulturisolater i NORM.

Referanser

1. Hecht DW. Anaerobes: Antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe* 2006;12:115-21.
2. Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ et al. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Inf Dis* 2000;30:870-6.
3. Kommedal Ø, Nystad TW, Bølstad B, Digranes. Antibiotic susceptibility of blood culture isolates of anaerobic bacteria at a Norwegian university hospital. *APMIS* 2007;115:956-61
4. Aldridge KE, Ashcraft D, Cambre K et al. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1238-43.
5. Glupczynski Y, Berhin C, Nizet H. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Belgium as determined by Etest methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:261-7.
6. Montravers P, Lepape A, Dubreil L et al. Clinical and microbiological profiles of community-acquired and nosocomial intra-abdominal infections: results of the French prospective, observational EBII study. *J Antimicrobial Chemother* 2009 ; Epub 5 Feb
7. Brazier J, Chmelar D, Dubreil L et al. European surveillance study on antimicrobial susceptibility of Gram-positive anaerobic cocci. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:316-20.
8. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA et al. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* Group: Report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. *Antimicrobial Agents Chemother* 2007;51:1649-55.
9. Jamal W, Shahin M, Rotimi VO. Surveillance and trends of antimicrobial resistance among clinical isolates of anaerobes in Kuwait hospitals from 2002 to 2007. *Anaerobe* 2009 Epub 4 april.
10. Livermore D. Betalactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:557-84.
11. Iwahara K, Kuriyama T, Shimura S et al. Detection of *cfxA*, the betalactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar infection by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2006;44:172-6.
12. Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant D. Detection and characterization of betalactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. *FEMS Microbiol Lett* 2005;15:319-24.
13. Walsh TR, A Onken, B Haldorsen, MA Toleman, A Sundsfjord. 2005. Characterization of a carbapenemase-producing clinical isolate of *Bacteroides fragilis* in Scandinavia: genetic analysis of a unique insertion sequence. *Scand J Inf Dis*. 37:676-9.
14. Rotimi VO, Khourshed M, Brazier JS et al. *Bacteroides* species highly resistant to metronidazole: an emerging clinical problem? *Clin Microbiol Infect* 1999;5:166-9.

2.6 Resistensbestemmelse av anaerobe mikrober

Martin Steinbakk, Avdeling for Bakteriologi og infeksjonsimmunologi, Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt

Resistensbestemmelse av anaerobe mikrober er vanskelig:

- de ulike anaerobe mikrober har ofte svært ulike krav til vekstmedier
- Mange anaerobe mikrober er langsomtvoksende (2-5 d før god vekst)
- det er vanskelig å utføre hele prosessen med tillaging av inokulum og oppsett under anaerobe forhold
- det er vanskelig å etablere gode tolkningskriterier for selve resistensbestemmelsen (Infeksjonen er oftest polymikrobiell og det ikke lett å avgjøre hvilke mikrober som bidrar mest til sykdom eller hvilket tiltak som bidrar mest til helbredelse)

Ved valg av metode gjelder de samme forutsetninger for anaerobe mikrober som for aerobe og fakultativt anaerobe mikrober. Kvalitetskontroll er om mulig enda viktigere ved resistensbestemmelse av anaerobe mikrober. Det betyr at de enkelte oppsett oftest bør følges av en kjent bakterie for (tilpasset) kvalitetskontroll – og at MIC-verdi for kvalitetskontrollstammen må gi resultater som forventet for de aktuelle midlene.

Trenger vi å resistensbestemme anaerobe mikrober?

Prøver fra infeksjoner hvor anaerobe mikrober er av betydning inneholder ofte en polymikrobiell flora. Det tar lang tid å isolere og identifisere de ulike mikrober som inngår i floraen og resultatet av en resistensbestemmelse kommer jo ofte for sent til at kliniker kan nyttiggjøre seg av informasjonen.

Dog er det flere rapporter om antibiotikaresistens hos anaerobe mikrober og at mangelfull (inappropriate) terapi kan resultere i dårlig klinisk respons og økt mortalitet (Nguyen et al 2001, Rosenblatt and Brook 1993). Det er de siste årene rapportert betydelig økning i klindamycin-resistens (<10 % til >40 %) hos *B. fragilis*-gruppen (Snydman et al 1999)

Som et minimum anbefales derfor at man resistensbestemmer alle anaerobe bakterier isolert fra normalt sterile områder (blodkultur, spinalvæske, etc). I tillegg bør enkelte større hospital (Universitetssykehus/Sentralsykehus) etablere oversikt over antibiogram hos utvalgte anaerobe mikrober: *Bacteroides fragilis* gruppen, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Clostridium* og *Bilophila wadsworthia* med minimum 30 ulike isolater i hver av gruppene. Merk at det kan være betydelige forskjeller mellom ulike arter slik at det enkelte isolat må være godt karakterisert og identifisert. Se ellers flytdiagram fra A. Wanger.

Valg av metode for å resistensbestemme anaerobe mikrober.

I 2006 kom ISO-standard som beskriver buljong-fortynning som standard metode for MIC-bestemmelse av hurtigvoksende aerobe bakterier (ISO 20776-1 Part 1 Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases).

Det finnes per i dag ingen slik enhetlig anbefaling for resistensbestemmelse av anaerobe mikrober. Det nærmeste en kommer slike anbefalinger er gitt av Clinical and Laboratory

Standards Institute (CLSI) i sin publikasjon M11-A7: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – Seventh Edition 2007. I tillegg er metoder beskrevet i ulike lærebøker.

En av grunnene til dette er at mange anaerobe bakterier har spesielle vekstkrav (anaerob atmosfære, spesielle krav til vekstmedium etc.).

CLSI Anaerobic Working group har over flere år klart å etablere en referansemetode basert på **agar-fortynning** med **brucella agar** tilsatt 5 µg hemin og 1 µg vitamin K1 med 5 % lysert (laked) saueblod som anbefalt medium. Anbefalt inkubasjonstid er 42-48 t.

Denne metoden er lite praktisk å bruke i daglig rutine og er tenkt brukt som referanse for andre og enklere metoder (CLSI 2007). Alternative metoder omfatter agar brytningspunktmetode, buljong mikrofortynning (virker godt for for *Bacteroides fragilis*-gruppen) og **agar gradientdiffusjon** (Etest (BioMerieux) eller M.I.C.E. (Oxoid)).

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (**EUCAST**) har opprettet en egen arbeidsgruppe under ledelse av Arne Rodloff som i løpet av 2010 vil komme med en anbefaling for Europeiske forhold.

Food and Drug Administration (FDA) i USA anbefaler mikrobuljong-frotyning som metode for resistensbestemmelse av enkelte hurtigvoksende anaerobe bakterier.

Agar gradientdiffusjon er i dag den mest brukte metode til resistensbestemmelse av anaerobe bakterier. Metoden er rimelig godt evaluert og anbefales som standard metode over det meste av verden.

Standardisering av inokulum: For mest mulig standardisert inokulum bør testmikrobe og ev. kontroll-mikrobe rendyrkes på blodholdig medium i 24-48 t. *Bacteroides fragilis*-gruppen og *Clostridium perfringens* vil vokse godt nok i løpet av 20-24 t, mens de fleste andre mikrober krever 48 t inkubasjon.

En oppslemming med tetthet 0,5 McFarland svarer til ca $1-2 \times 10^8$ cfu/ml av *E. coli* ATCC 25922, *B. fragilis* ATCC 25285 og *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, men bare $1-4 \times 10^7$ cfu/ml av *C. difficile* ATCC 700057.

Inokulum kan lages ved anriking i anaerob buljong (thioglycollat uten indikator, BHI, Schaedler el. Brucella tilsatt hemin og vitamin K) eller ved å suspendere kolonier direkte fra blodagar.

For **agar gradientfortynning** anbefaler leverandør et inokulum på 1 McFarland.

For **agar-fortynning** anbefales 10^5 cfu per spot for *B. fragilis* og *B. thetaiotaomicron*. Det er viktig å kontrollere inokulum ved bruk av agar-fortynning.

Anaerob atmosfære: Merk at inkubasjonsatmostfære skal inneholde 4-7% CO₂ og IKKE 20% som enkelte "pose-system" kan gi. For høyt innhold av CO₂ kan påvirke MIC-verdi ved at antimikrobiell aktivitet av enkelte midler påvirkes.

Merk at metronidazol krever lavt minst -350 mEh for aktivering. Manglende eller forsinket anaerob atmosfære er en vanlig årsak til in vitro metronidazol-resistens.

Anbefalt **inkubasjonstid** er 20-24 t (hurtigvoksere)
42-48 t (langsomt voksende)

Brytningspunkt.og aktuelle midler

AFA anbefaler vi i Norge bruker brytningspunkt definert av EUCAST.
EUCAST har gitt brytningspunkt for grupper av G+ anaerobe bakterier og G- anaerobe bakterier (oppdatert 15/10-09).

	G-anaerobe	G+ anaerobe
	S</R>	S</R>
Penicilliner		
Benzylpenicillin	0,25/0,5	0,25/0,5
Ampicillin	0,5/2	4/8
Amoxicillin	0,5/2	4/8
Amoxicillin/Klavulanat	4/8	4/8
Piperacillin	8/16	8/16
Piperacillin/tazobactam	8/16	8/16
Cefalosporiner		
Karbapenemer		
Doripenem	1/1	1/1
Ertapenem	1/1	1/1
Imienem	2/8	2/8
Meropenem	2/8	2/8
Glycopeptider		
Vankomycin	-	2/2
Makrolider		
Klindamycin	4/4	4/4
Andre midler		
Kloramfenikol	8/8	8/8
Metronidazol	4/4	4/4

Tetracykliner har fått følgende fotnote: *For anaerobic bacteria there is clinical evidence of activity in mixed intra-abdominal infections, but no correlation between MIC values, Pk/Pd data and clinical outcome. Therefore no breakpoint for susceptibility testing is given.*

Kvalitetskontrollgrenser ved bruk av agarfortynning

(Kilde: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard –Seventh Edition, CLSI M11-A7 2007)

Antibiotikum	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	<i>Clostridium difficile</i> ATCC 700057	<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 43055
Amoxicillin-klavulanat*	0,25-1	0,5-2	0,25-1	-
Ampicillin	16-64	16-64	1-4	-
Kloramfenikol	2-8	4-16	-	-
Klindamycin	0,5-2	2-8	2-8	0,06-0,25
Doripenem	-	-	0,5-4	-
Ertapenem	0,06-0,25	0,25-1	-	0,5-2
Imipenem	0,03-0,125	0,125-0,5	-	0,125-0,5
Meropenem	0,03-0,25	0,125-0,5	0,5-4	0,125-1
Linezolid	2-8	2-8	1-4	0,5-2
Metronidazol	0,25-1	0,5-2	0,125-0,5	-
Penicillin G	8-32	8-32	1-4	-
Piperacillin	2-8	8-32	4-16	8-32
Piperacillin-tazobactam*	0,125-0,5	4-16	4-16	4-16
Tetracyklin	0,125-0,5	8-32	-	-
Tigecyklin	0,125-1	0,5-2	0,125-1	0,06-0,5
Vankomycin	-	-	0,5-4	-

*) Bare angitt konsentrasjon for selve middel og ikke hemmer

-) Kvalitetskontrollgrense ikke etablert (for de fleste midler har CLSI ikke fått pålitelige resultat)

Blå skrift: foreløpige grenser (revurderes av CLSI)

Oppsummering av metode og medier

Metode: Gradient agardiffusjon (f. eks. Etest eller MICE)

Medium: Brucella agar med 5 % defibrinert saueblod (eller hesteblood) tilsatt 5 µg hemin/mL og 1 µg vitamin K₁/mL
Anaerob atmosfære med 4-7% CO₂

Inokulum 0,5-1 McFarland (direkte fra fersk kultur)

Inkubasjonstid 24-48 t ved 35°C (avhengig av mikrobe)

Kontrollstamme ved hvert oppsett

Antibiotika bare relevante midler i henhold til AFA/EUCAST

Metronidazol aktiveres ved -350 mEh (se ovenfor)

Eksempel på agar-fortynning.

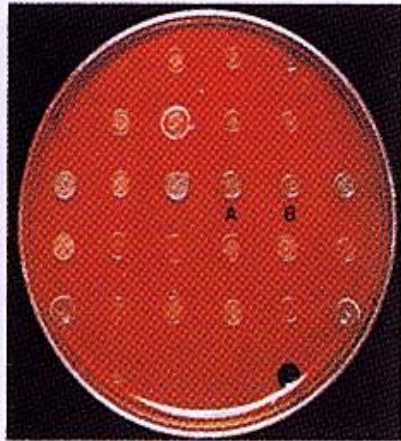


Plate 1. Growth Control.



Plate 2. Antimicrobial Agent (16 µg/ml).

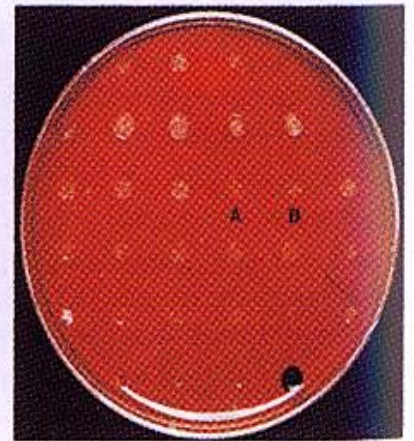
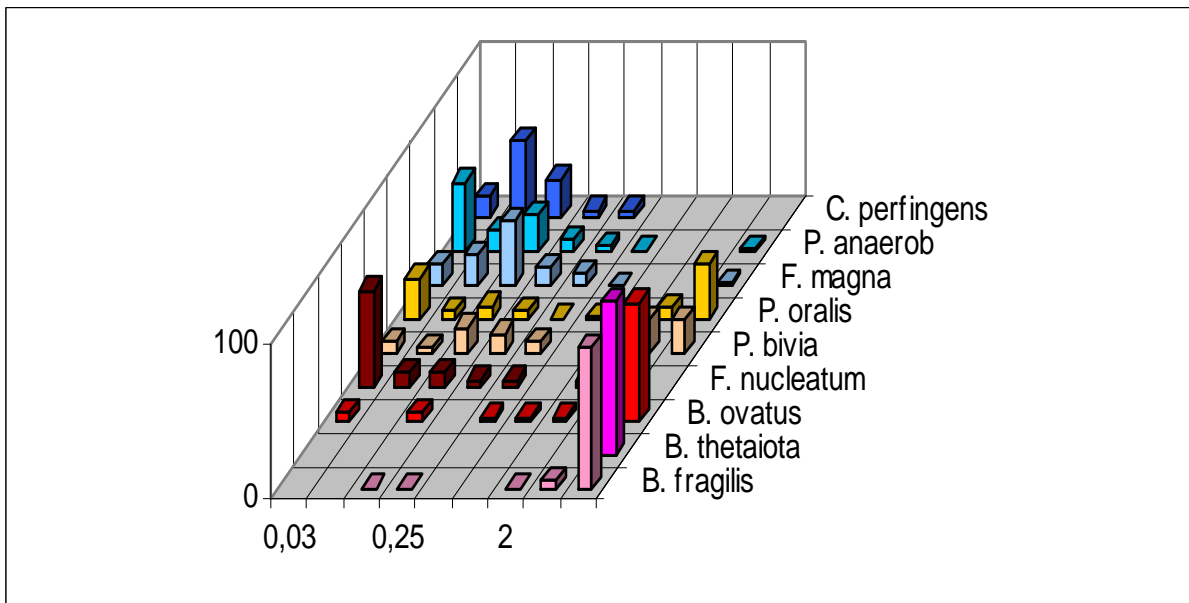
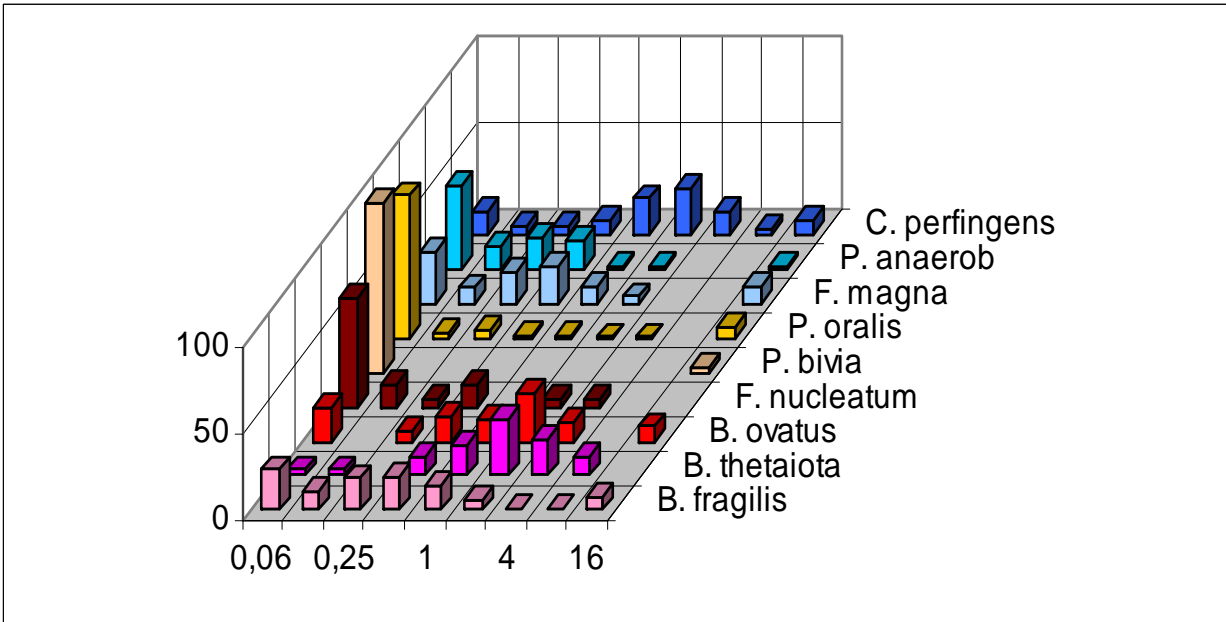


Plate 3. Antimicrobial Agent (32 µg/ml).

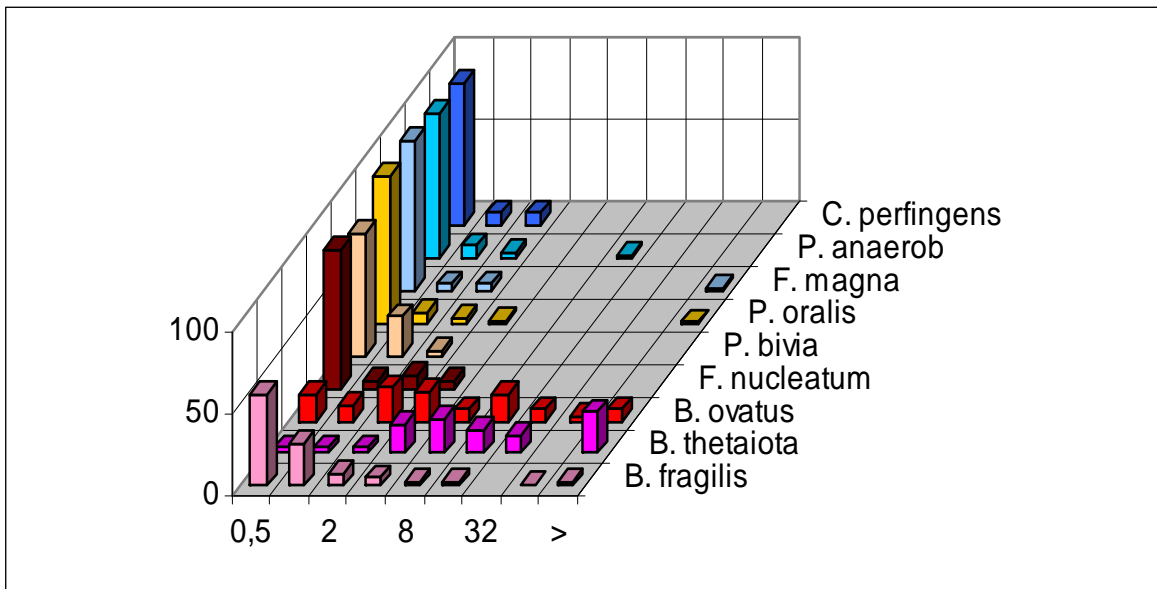
MIC-distribusjon for Penicillin G mot utvalgte anaerobe mikrober (Arne Rodloff)



MIC-distribusjon for Klindamycin mot utvalgte anaerobe mikrober (Arne Rodloff).
 Merk at brytningspunkt (4/4) ikke passer like godt for *B. thetaiotaomicron* som for *B. fragilis*



MIC-distribusjon for Piperacillin/tazobactam mot utvalgte anaerobe mikrober (Arne Rodloff)

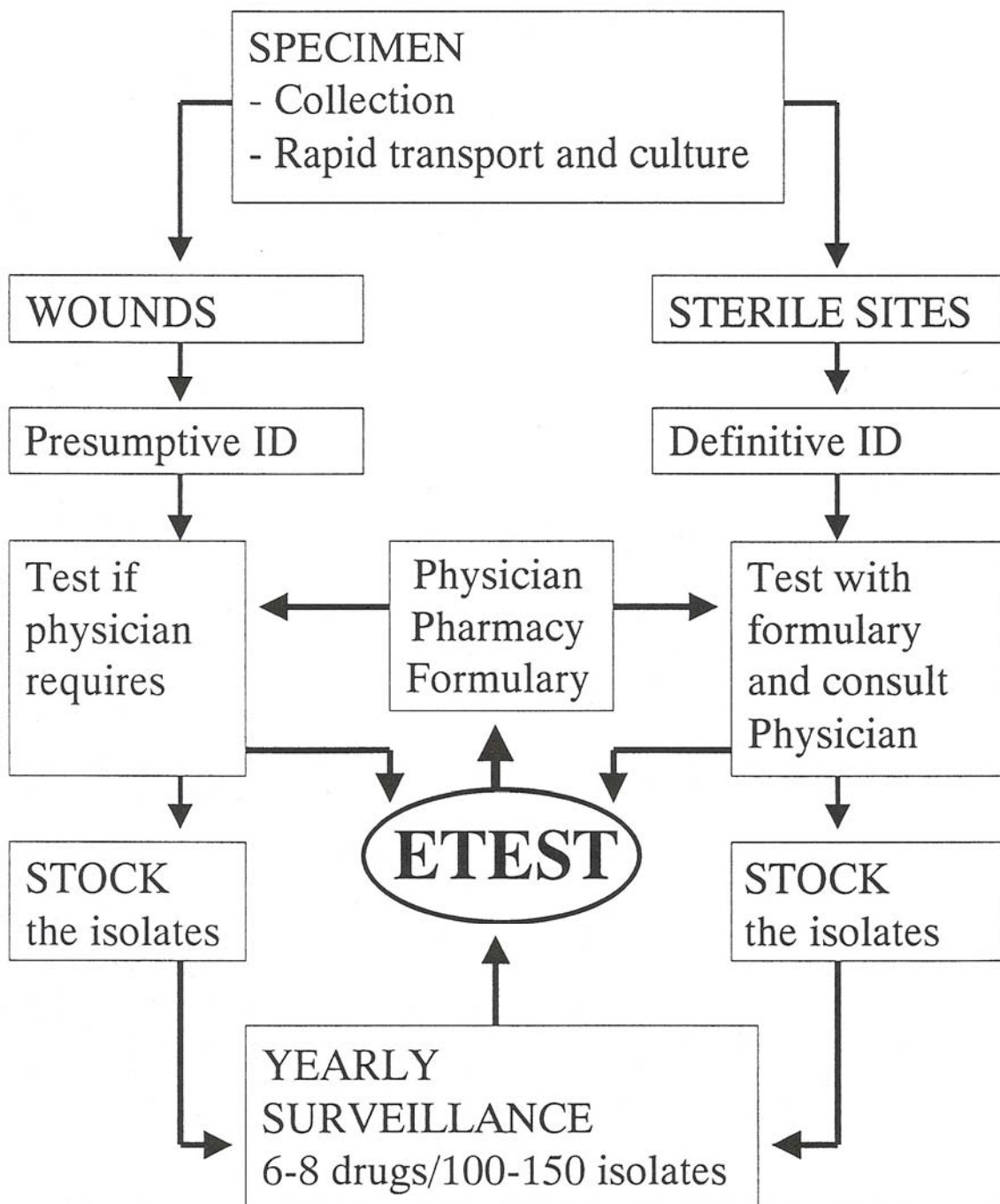


Referanser

- Diane M Citron and David W. Hecht: Susceptibility Test Methods: Anerobic Bacteria p 1141-48 In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH and Tenover FC (eds) Manual of Clinical Microbiology, ASM Press 2003.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) i sin publikasjon M11-A7: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard – Seventh Edition 2007
- Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, McDermott L, Wagener MW, Harrell L and Snyderman R. Antimicrobial resistance and clinical outcome of Bacteroides bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. Clin Infect Dis 2001; 30; 870-6.
- Rosenblatt JE and Brook I. Clinical relevance of susceptibility testing of anaerobic bacteria. Clin infect Dis 1993; 16: S446-S448
- Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott L, Supran S, Cuchural GJ, Finegold SM, Harrell LJ, Hecht DW, Iannini PB, Jenkins SG, Pierson CL, Rihs JD and Gorbach SL. Multicenter study of in vitro susceptibility of the Bacteroides fragilis group, 1996 to 1996, with comparison of resistance trends from 1990 to 1996. Antimicrob Agents Chemotherapy 1999; 43: 2417-22

ANAEROBE AST ALGORITHM

Univ. Texas, Houston Algorithm (Dr Audrey Wanger)



DRUGS TO TEST:

Cefoxitin
Penicillin G

Piperacillin/Tazobactam

Cefotetan
Metronidazole

Imipenem
Clindamycin

M0000319-M854

2.7 Identifikasjon av anaerobes - hvor langt skal vi gå? Fenotypiske og genotypiske metoder. Klinisk betydning av funn.

Peter Gaustad. Mikrobiologisk Institut, Rikshospitalet

Grunner til å identifisere bakterier, ofte til artsnivå, er:

- stille en etiologisk diagnose
- finne den mest adekvate behandling
- få epidemiologisk informasjon

For mange anaerobe bakterier - som gir endogene infeksjoner og sjelden er årsak til nosokomiale infeksjoner med epidemiologisk betydning - er ikke disse grunnene til art identifikasjon like godt begrunnet som for aerobe/fakultative bakterier:

- Artsidentifikasjon pga epidemiologi er sjelden indisert (unntak *Cl. difficile*) ved anaerobe mikrober.
- Ved mange anaerobe-infeksjoner er det en blanding av anaerobe og aerobe bakterier og den patogenetiske betydningen av de forskjellige artene er usikker.
- Resistensforhold – metronidazole følsomhet eller ikke – er ofte av større viktighet enn identifikasjonen.

At det blir utført dyrkning med påfølgende artsidentifikasjon av anaerobe bakterier vil i første rekke avhenge av:

- Prøver tatt fra normalt sterilt område.

For prøver tatt fra områder med normal flora er det sjelden indisert med anaerob dyrkning:

Ved prøver tatt fra følgende områder er det indisert å utføre anaerob dyrkning med identifikasjon og resistensbestemmelse:

- Sentral nervesystemet
 - alvorlige lungeinfeksjoner
 - lever abscesser
 - alvorlige bløtvevsinfeksjoner (→ gassgangren)
 - osteomyelitt
 - alle normalt sterile områder
- Prøvetaking som sikrer overlevelse av oksygen følsomme anaerobe arter.
 - Transport system som sikrer overlevelse av oksygen følsomme stammer.
 - Hurtig utsæd til generelle og selektive ”anaerobe” medier.
 - Rask inkubering ved anaerobe forhold.

Er disse forholdene oppfylt vil viktige kriterier for å utføre art identifikasjon og resistensbestemmelse være oppfylt, spesielt hvis den anaerobe bakterien vokser i renkultur.

Ved blandingsinfeksjoner fra visse områder kan det være tilstrekkelig med identifisering til gruppe- eller slektsnivå:

- peritonsillær abscess
- infeksjon i hode- nakkeregionen
- intraabdominale infeksjoner
- visse bløtdelsinfeksjoner
- diabetiske fotsår

Ved ukompliserte tilfeller vil det her være tilstrekkelig å rapportere metronidazol følsomhet og ikke utføre anaerob resistensbestemmelse.

De fleste av de Gram positive, ikke sporedannende anaerobe staver i slektene *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* og *Eubacterium* er vanligvis ikke forbundet med sykdom og trenger ikke artsbestemmelse med mindre de er isolert fra blod. Unntak er *Eubacterium brachy*, *E. timidum* og *E. nodatum* som kan gi infeksjon i kvinnelige genitalia.

Eksempler på infeksjoner med monokultur hvor artsidentifisering og resistensbestemmelse er viktig:

- Funn av Gram positive kokker i kjeder, for eksempel fra abscess (lunge, hjerne, lever). Dette kan være isolater fra *S. milleri*-gruppen som primært kun vokser anaerobt. Disse er metronidazole resistente. *Fingoldia magna* kan isoleres fra infiserte fremmedlegemer og 10-20% av isolatene er klindamycin resistente.
- Funn av svermende klostidier. *C. septicum* og *C. tetani* er svermende. *C. septicum* er assosiert med malign lidelse.
- Klostridie-arter kan være resistente: *C. ramosum*, *C. innocuum* og *C. clostridiforme* for klindamycin og *C. ramosum*, *C. butyricum* og *C. clostridiforme* kan danne betalaktamase.
- Arter i slektene *Actinomyces* og *Propionibacterium* er potensielt patogene. *Actinomyces* arter kan inngå i blandingsinfeksjoner eller være agens ved aktinomykose. *Propionibacterium* arter kan gi alvorlige øyeinfeksjoner, protese- og shuntinfeksjoner – men er også en forurensning fra hud. *Actinomyces* og *Propionibacterium* artene er resistente for metronidazole og trenger derfor resistensbestemmelse og identifisering minst til slektsnivå.
- Gram negative staver. *B. fragilis* er hyppigste funn og den mest virulente anaerobe arten ved infeksjoner. Andre arter i *B. fragilis* gruppen isoleres også hyppig. I mer enn 95% av tilfellene er de følsomme for metronidazole, kloramfenikol, karbapenemer, piperacillin/tazobactam, mens de kan være resistente for klindamycin. Bruk av bacteroides esculin agar eller esculintablett og resistens for kanamycin/vankomycin (skål/tablett) er til nytte for å identifisere *Bacteroides*- gruppen. Evt supplert med påvisning av betalaktamase (*Bacteroides fragilis* gruppen).
- Arter i *Fusobacterium* blir isolert sjeldnere enn *B. fragilis* gruppen, men de er også potensielt virulente og i stand til å gi monoinfeksjoner.
- *F. necrophorum* kan gi postangial sepsis som er vanskelig å behandle tross for følsomhet for anaerobe antibiotika. *F. nucleatum*, sees ved blandingsinfeksjoner, men kan også isoleres alene ved abscesser i hjerne, lunge eller lever. Kan sekundært gi sepsis.

Identifikasjon

5. Viktige enkle identifikasjonstester
6. Fenotypiske identifikasjons flyteskjemaer
7. Kommersielle identifikasjons systemer
8. Gasskromatografi
9. Genotypisk identifikasjon
10. Massespektrometri til bruk ved identifisering

Massespektrometri, for eksempel MALDI-TOF, er en kost-effektiv, nøyaktig metode for rutine identifikasjon av anaerobe bakterier på mindre enn 1 time. Er avhengig av enkelt kolonier, men ikke renkulturer og kan erstatte biokjemisk identifikasjon i nær fremtid.

Problemstillinger:

Kan behandlende lege stole på et svar hvor anaerob dyrkning er negativ og ikke gi anaerob antibakteriell dekning?

Er enkel identifisering og metronidazole følsomhet tilstrekkelig?

Hvilke prøvematerialer bør man gjøre identifikasjon på?

Hvilke prøvematerialer bør vi gjøre resistensbestemmelse på?

Bør det på grunn av mulig synergi mellom bakterier gjøres identifisering og evt res. best av alle bakteriene som blir isolert i et prøvemateriale?

Og gjelder dette også fra noen områder hvor det er anaerob normalflora?

Referanser

1. Citron DM, Appelbaum PC: How far should the clinical laboratory go in identification anaerobic isolates, and who should pay? Clin. Infect. Dis. 1993; 16(suppl 4):S435-8.
2. Seng P et al: Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin. Infect. Dis. 2009; 49:543-51.
3. Anaerobic infections in humans. Eds SM Finegold and WL George. Academic Press Inc 1989.
4. Clinical Microbiology procedures handbook. Sec. edition, vol. 1. Ed HD Isenberg. 2004.

Nyttig nettside: <http://www.tagejustesen.dk/anaerobebakterier/>

Oversikt over viktigste anaerobe bakterie spp. assosiert med infeksjoner hos menneske.

Listen er ikke fullstendig, videre er taksonomisk klassifisering i vedvarende endring, konferer referanser.

Anaerobe gram negative kokker

Veillonella spp:

V. parvula

V. atypica

V. dispar

Anaerobe gram positive kokker

Anaerococcus hydrogenalis

Anaerococcus lactolyticus

Anaerococcus octavius

Anaerococcus prevoti

Anaerococcus tetradius

Anaerococcus vaginalis

Anaerococcus murdochii

Finegoldia magna

Parvimonas micra

Peptoniphilus assacharolyticus

Peptoniphilus gorbachii

Peptoniphilus harei

Peptoniphilus ivorii

Peptoniphilus lacrimalis

Peptoniphilus olsenii

Peptostreptococcus anaerobius

Peptostreptococcus stomatis

Peptococcus spp:

P. niger

Andre genera:

Atopobium parvulum

Blautia hansenii

Blautia producta

Coprococcus eutactus

Coprococcus comes

Coprococcus catus

Sarcina ventriculi

Anaerobe gram negative staver

Bacteroides fragilis gruppen

B. fragilis

B. caccae

B. eggerthii

B. ovatus

B. stercoris

B. thetaiotamicron

B. uniformis

B. vulgatus

”*Bacteroides* spp” mfl. (uavklart taxonomi)

B. coagulans

B. pyogenes

B. tectus

B. ureolyticus

Parabacteroides merdae

Parabacteroides distasonis

Alistipes putredinis

Odoribacter splanchnicus

Pseudoflavonibacter cappilosus

Tanerella forsythia

Fusobacterium spp.

F. gonidiaformans
F. mortiferum
F. naviforme
F. necrogenes
F. necrophorum
F. necrophorum ssp necrophorum
F. necrophorum ssp funduliforme
F. nuleatum
F. nuleatum ssp fusiforme

F. nuleatum ssp nucleatum
F. nuleatum ssp polymorphum
F. nuleatum ssp vincentii
F. periodonticum
F russii
F. sulci
F. ulcerans

Filifacter alocis

Porphyromonas spp

P. assacharolytica
P. catoniae

P. endodontalis
P. gingivalis

Prevotella spp

P. bivia
P. buccae
P. corporis (pigmenterte spp)
P. dentalis
P.denticola (pigmenterte spp)
P. dissiens
P. enoeca
P. herinolytica

P. intermedia (pigmenterte spp)
P. loescheii (pigmenterte spp)
P. melanogenica (pigmenterte spp)
P. nigrecens (pigmenterte spp)
P. oris
P. tanneriae

Anaerobe gram positive staver

Actinomyces spp (metronidazolresistente)

Actinomyces israelii
Actinomyces naeslundii
Actinomyces funkei
Actinomyces europaeus
Actinomyces graevenitizii
Actinomyces urogenitalis
Actinomyces odontolyticus

Actinomyces viscosus
Actinomyces meyeri
Actinomyces gerencseriae
Actinomyces neuui
Actinomyces radingae
Actinomyces turicensis

Clostridium spp

C. bifermentans
C. botulinum
C. cadaveris
C. clostridioforme
C. difficile
C. fallax
C. histolyticum
C. innocuum
C. novyi type A
C. paraputrificium
C. perfringens
C. ramosum
C. septicum

C. sordellii
C. sporogenes
C. tertium
C. tetani

Propionibacterium spp (metronidazolresistente)

P. acnes
P. avidum
P. granulosum
P. propionicum

Eubacterium spp

E. cylindroides
E. contortum
E. limosum
E. notadum

Andre gram positive staver, ikke-sporedannende

Eggerthella lenta
Consinella aerofaciens
Pseudoamibacter alactolyticus
Atopodium spp
Olsonella spp
Lactobacillus spp (metronidazolresistente, lav virulente)
Bifidobacterium spp (lav virulente)

Referanser

- 1) Recently described clinically important anaerobic bacteria: medical aspects. S.M. Finegold and H. Jousimies-Somer CID 1997; 25(Suppl 2):S88-93.
- 2) Recent taxonomic changes and terminology update og clinically significant anaerobic gram negative bacteria(excluding spirochetes). H Jousimies-Somer and P Summanen. CID 2002; 35(Suppl 1):S17-21.
- 3) Taxonomy - general comments and update on taxonomy of clostridia and anaerobic cocci. S. M. Finegold, Y song and C Liu. Anaerobe 2002;8:283-285.
- 4) Health Protection agency (2009). Identification of anerobic cocci. National Standard methods BSOP ID 8, 14, 15, 25 Issue 2. http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sps.asp
- 5) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. <http://www.bergeys.org/index.html>

2.8 Den polymikrobielle flora - molekylærbiologiske metoder og deres rolle i anaerob diagnostikk.

Ingar Olsen og Jørn Arne Friedrich-Aaas, Institutt for oral biologi, Universitetet i Oslo

Dentalt plakk (biofilm) er satt i sammenheng med utbredte sykdommer i befolkningen som dental karies og marginal periodontitt. Plakket, som består hovedsakelig av bakterier, er et godt eksempel på polymikrobiell mikroflora. Nyere undersøkelser har vist at munnhulen inneholder hele 700 forskjellige bakteriearter (1). De fleste er anaerobe. Vi har vist at bare halvparten av denne mikrofloraen kan dyrkes. Spørsmålene som raskt melder seg er: hvorledes kan vi best undersøke denne diverse mikrofloraen, og hvorledes kan vi finne ut om noen bakterier her er mer relatert til sykdom i munnhulen enn andre?

Tidligere studier av infeksjonssykdommer var basert på en eller et lite antall patogener. Dette gjaldt også periodontitt der de resterende mikroorganismene ofte ble betraktet som normalflora (grønne streptokokker).

Vi tror nå at de resterende bakteriene i munnfloraen kan bidra til sykdommen og at mangel på vertskompatible bakterier kan være like viktig som tilstedeværelse av patogener. Det som til nå har hindret oss i å undersøke komplekse blandinger av bakterier er tradisjonen blant bakteriologer for å fokusere på få arter og mangel på teknikker til å undersøke et stort antall bakterier i et stort antall prøver fra seter med kompleks mikroflora, f. eks. tannbelegg. Nyvinninger innen mikrobielle diagnostiske teknikker som DNA-DNA hybridisering (checkerboard), micro array analyse og 16S rDNA sekvensering har nå gjort det mulig å identifisere bakterier i komplekse mikrobielle samfunn, herunder også anaerobes. Det finnes også andre molekylærbiologiske teknikker for mikrobiell diagnostikk, både genetiske og fenotypiske, men de tre ovennevnte brukes mest av oss.

Checkerboard teknikk

Checkerboard DNA-DNA hybridisering brukes vanligvis til å påvise 40 bakteriearter fra 28 kliniske prøver på samme tid (1120 hybridiseringer på samme membran). Membranen kan stripes av og påsettes 40 nye prober. DNA fra prøvene fikseres til membranen som så prehybridiseres. Etter dette plasseres membranen i en Miniblotter med "lanes" for DNA fra probene arrangert i rett vinkel på prøve "lanes". Checkerboard teknikken kan også gjøres omvendt, dvs. at oligonukleotidprober festes til membranen før applikasjon av prøve DNA. Teknikken benytter hele genomiske prober og benyttes i vår rutinediagnostikk.

Ved hjelp av 13321 subgingivale prøver har teknikken gjort det mulig å påvise 6 ulike bakteriekomplekser ved marginal periodontitt (2). Blant disse synes det røde kompleks bestående av *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* og *Treponema denticola* å være spesielt involvert i periodontitt. Det oransje komplekset (*Campylobacter gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Streptococcus constellatus*) ser ut til å være et bindeledd mellom tidlige kolonisatører av tannoverflaten og det røde kompleks.

Micro array analyse og sekvensering

Disse teknikkene er nylig blitt benyttet av oss til å analysere mikrofloraen ved rotkaries hos eldre (3). 41 personer 70-101 år ble undersøkt (5 menn, 36 kvinner). Plakkprøver ble samlet fra overflater med rotkaries og fra friske rotoverflater hos personer med rotkaries ($n=20$, kalt pasienter) og personer uten rotkaries ($n=21$) kalt kontroller. Hos kontrollene ble plakk fra 1

frisk eksponert rotoverflate samlet inn. Hos pasientene ble plakk fra 1 frisk eksponert rot og 1 kariøs rot, samt plakk fra underliggende dentin fra samme kariøse rot samlet.

16S rRNA gener fra ekstrahert DNA ble PCR amplifisert med bakterielle universalprimere og så merket via Cy3-dCTP inkorporering i nok en "nested" PCR (HOMIM). 16S rRNA baserte, "reverse captured" oligonukleotidprober (18-20 baser) ble syntetisert, "printet" på aldehyddekkede glassplater og skannet.

Cluster analyse ble utført på micro array dataene for å gruppere prøver med sammenfallende bakterieprofiler.

Våre data indikerte at micro array (HOMIM) er en pålitelig metode til å identifisere mikrobielle profiler direkte fra orale prøver slik som plakk fra rotoverflater. Resultatene fra HOMIM viste god overensstemmelse med de fra 16S rDNA sekvensering.

Avslutning

Oppsummering. Molekylære teknikker er essensielle for å studere polymikrobiell mikroflora også hvor anaerobier er til stede.

Anbefaling. I undersøkelser av polymikrobiell mikroflora må også ennå ikke dyrkbare mikrober inkluderes.

Problemstillinger. Hvilken klinisk rolle spiller den ennå ikke dyrkbare mikrofloraen? Kan vi utrope spesifikke årsaker til mikrobiell sykdom når vi ikke kjenner totalfloraen? Hvilken effekt har antibiotika på ikke dyrkbare bakterier?

Referanser

1. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000 2006;42:80-87.
2. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.
3. Preza D, Olsen I, Willumsen T, Boches SK, Cotton SL, Grinde B, Paster BJ. Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 509-517. Epub 2008 Nov 28.

2.9 Clostridium difficile - infeksjonskontroll. Hvilke pasienter skal undersøkes? Indikasjon for prøvetaking.

Sykdomsspekter forutsettes kjent.

Egil Lingaas. Avd. for sykehushygiene, Rikshospitalet

Tilstedeværelse av en toksinproduserende stamme av *Clostridium difficile* i gastrointestinaltractus er en nødvendig, men som regel ikke den eneste, forutsetning for at en pasient skal få *C. difficile* infeksjon (CDI). Antibiotika, enten som terapi eller profylakse, er den viktigste predisponerende faktor for utløsning av sykdom, som ikke sjelden debuterer først etter avsluttet behandling (1-6). Praktisk talt alle antibiotika har vært rapportert å kunne utløse CDI, men publiserte studier som har undersøkt risikoen knyttet til ulike antibiotika har ofte ikke kontrollert tilstrekkelig for konfunderende variabler og bias, slik som kombinasjonsbehandling, sekvensiell behandling og behandlingsvarighet (7,8). Immunitet mot *C. difficile* toksin(er) og bakteriens egen følsomhet for antibiotika påvirker også trolig risikoen for sykdom (9,10). Resultatene i litteraturen når det gjelder risikoen knyttet til spesifikke klasser av antibiotika varierer derfor mye. Uansett er god antibiotikapolitikk i sykehus ansett som et viktig forebyggende tiltak (11,12). Andre og tredje generasjons cefalosporiner, bredspektrede penicilliner og klindamycin er oftest involvert, siden årtusenskiftet også fluorokinoloner (13-27).

Bærerskap vs. smitte

Det er også varierende konklusjoner når det gjelder betydningen av eksogen smitte med *C. difficile* i sykehus versus seleksjon av bakterier som pasienten allerede var kolonisert med ved innleggelse. Bærerfrekvensen i avføring blant asymptomatiske og ellers friske voksne er under 5 % (28). Blant sykehuspasienter er det store variasjoner, og bærerfrekvens på opptil 25 % er rapportert (29-33). Epidemiologiske undersøkelser viser at bærerskap faktisk kan ha en viss beskyttende effekt mot klinisk sykdom (34,35). På den annen side er det holdepunkter for at asymptomatiske bærere kan være kilde for smittespredning (3,28,32,36-38).

Det er mulig det kan være en viss skjevhet med overrepresentasjon av publikasjoner om nosokomial smitte i motsetning til artikler som viser seleksjon hos allerede koloniserte pasienter. Det kan være grunn til å tro at funn i tilknytning til utbrudd og utbruddsoppklaring har større tilbøyelighet til å bli publisert enn funn forbundet med lav til moderat endemisk forekomst. Hvis det også er slik at tilfeller i tilknytning til utbrudd oftere er resultat av eksogen smitte, mens endemiske sporadiske tilfeller oftere skyldes seleksjon hos allerede koloniserte pasienter, vil det medføre at rapporter som beskriver eksogen smitte er overrepresentert i litteraturen.

Det er uansett et stort antall publikasjoner som beskriver nosokomial smitte av *C. difficile*, dels i form av epidemiologiske data og dels som indirekte holdepunkter for smitteoverføring ved påvisning av bakterien i sykehusmiljø og på utstyr i tilknytning til pasienter med CDI og på hender og bekledning hos helsepersonell etter kontakt med pasientene (39-49). Vonberg et al (49) rapportert en gjennomgang av 36 utbrudd som var meldt til Outbreak Database (50). Ved 19 av utbruddene var spredningsmåten ukjent eller ikke beskrevet spredningsmåte, mens 13 kontaktsmitte via hendene til helsepersonell ble rapportert for 13 utbrudd. Ved 6 utbrudd var smitemåten fra pasient til pasient, og i 7 utbrudd skjedde spredningen via kontaminerte flater.

Sporene overlever i måneder i sykehusmiljøet og fjernes ikke effektivt med ordinær rengjøring. Sporene er dessuten resistente mot mange vanlige desinfeksjonsmidler og alkoholbasert hånddesinfeksjon er ikke effektiv.

Klassifisering av CDI

CDI klassifiseres i følgende kategorier i forhold til tidspunktet for klinisk debut:

1. Sykdom som manifesterer seg de første 48 timer etter innleggelse regnes som samfunnsvervede, så fremt de ikke kan knyttes til et annet sykehusopphold de siste 4 uker før den aktuelle innleggelsen. I sistnevnte tilfelle regnes de som nosokomiale.
2. Ved debut mer enn 48 timer etter innleggelse regnes sykdommen som nosokomial.
3. Ved debut de første 4 uker etter utskrivelse klassifiseres sykdommen som samfunnsoppstått, men sykehuservervet, altså nosokomial.
4. Ved debut 4 – 12 uker etter utskrivelse anses det som ikke mulig å avgjøre om sykdommen er sykehus- eller samfunnservervet.
5. Sykdom som debuterer mer enn 12 uker etter utskrivelse regnes som samfunnservervet.

Forebygging av nosokomial smitte

I 2008 publiserte en europeisk samarbeidsgruppe en litteraturgjennomgang og oppdaterte anbefalinger for diagnostikk, forebygging og kontroll av *C. difficile* infeksjon (49). I 2009 utga European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) anbefalinger for diagnostikk (51), og i 2010 publiserte Society for Healthcare Epidemiology of America tilsvarende oppdaterte retningslinjer både for diagnostikk, kontroll og forebygging (52).

Hvilke pasienter skal undersøkes?

Begge retningslinjer fremhever at testing av avføring på *C. difficile* bare skal utføres på uformet avføring, dvs. avføring som "fyller ut" prøveglasset. Unntaket er pasienter der det mistenkes ileus på grunn av *C. difficile*. Testing av asymptomatiske pasienter anses ikke å ha nytteverdi og anbefales ikke, med mindre dette er et ledd i en planlagt epidemiologisk utredning. Det er ingen data som viser at aktiv screening av pasienter uten diaré bidrar til å redusere forekomsten av *C. difficile* i en endemisk situasjon (33,49). De europeiske retningslinjene anbefaler at alle pasienter med nosokomial diaré blir undersøkt på *C. difficile*. De anbefaler også at alle pasienter som innlegges på grunn av ikke-nosokomial diaré blir testet (49). Mikrobiologiske laboratorier bør systematisk teste på *C. difficile* i alle avføringsprøver fra pasienter med diaré som har vært hospitalisert i mer enn 3 dager (53).

Hvor mange prøver?

Både de nyeste amerikanske og europeiske retningslinjene for diagnostikk sier at gjentatt prøvetaking ved samme episode med diaré ikke er nødvendig.

Borek et al undersøkte konkordans mellom gjentatte prøver, testet med cellekultur, fra 670 pasienter (54). Til sammen 2940 prøver ble undersøkt over en 3 måneders periode. I 1101 tilfeller ble det sendt to prøver innen et intervall på 7 dager, og alle prøvene ga samme resultat, 1063 negative par og 38 par med positivt resultat. Det var altså 100 % konkordans mellom de to første prøvene. To hundre og førtisju pasienter ble testet med tredje prøve innenfor et tidsrom på 7 dager. Av disse var 238 negative og 9 positive, hvorav 7 hadde vært positive i tidligere prøver. Den tredje prøven påviste altså bare 0,8 flere positive enn én prøve alene, når prøven ble testet med cellekultur.

Cardona et al gjorde en lignende undersøkelse med bruk av en Toxin A/B EIA-test hos 3112 pasienter, hvorav 49 % ble testet flere ganger (55). Blant 3749 tester som opprinnelig var negative var 96 tester positive ved gjentatt testing innen 10 dager. Blant disse var 0,9 % positive ved gjentakelse samme dag (dag 0), 1,8 % på dag 1, 3,8 % på dag 2, 2,6 % på dag 3 og 5,4 % på dag 4-6, mens 10,6 % var positive på dag 7-10 etter første prøve. Blant pasienter som hadde første prøve positiv var gjentatt prøve tatt samme dag også positiv hos 91 %. Tilsvarende var gjentatte prøver positive hos 75 % etter 1 dag, 58 % på dag 2 og 14 % på dag 7-10.

Manabe et al rapporterte i 1995 at 34/43 (79 %) pasienter hadde positivt resultat på første prøve med en kombinasjon av EIA og cellekultur ved konsekutiv testing av 263 pasienter (56). Prøve nummer 2 påviste ytterligere 5 positive (kumulativt 91 %) mens tredje prøve var positiv hos ytterligere 4 pasienter. Den negative prediktive verdien av den første prøven var 97 %.

Kontrollprøver?

Det anbefales ikke å ta kontrollprøver for dokumentasjon av behandlingseffekt eller sanering (49,51). Det er heller ikke indikasjon for å ta prøver for å avgjøre om isolering skal opphøre eller ikke. Spørsmålet om varighet av isolering vil bestemmes av det kliniske forløpet. Smittefaren er størst fra pasienter med diaré, og isolering bør som et minimum fortsette i minst 48 timer etter at pasienten har fått formet avføring (49). Men selv etter adekvat behandling vil mange pasienter toksin positiv avføring (57). Det er også vist at omkring halvparten av pasientene fortsatt har *C. difficile* på huden på thorax/abdomen én uke etter opphør av diaré (47). Det er derfor mange som argumenterer for at pasienter med CDI bør isoleres til de utskrives.

Miljøprøver?

Rutinemessige prøver fra miljø og utstyr anbefales ikke (49,51).

Dyrkning og genotyping

Både de amerikanske og de europeiske retningslinjene fremhever betydningen genotyping, og derfor dyrkning (49,51). De europeiske retningslinjene anbefaler at alle toksin positive avføringsprøver tas vare på slik at man kan utføre dyrkning og genotyping, eventuelt ved et referanselaboratorium. Tilsvarende understrekes det i de amerikanske retningslinjene at det er helt nødvendig å utføre genotyping ved utbrudd og i situasjoner der epidemiologien eller alvorlighetsgraden av CDI endrer seg eller er vanskelig å forklare.

Referanser

1. Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M et al. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N Engl J Med* 1978;298:531–534.
2. McFarland LV, Surawicz CM, Stamm WE. Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *C. difficile*-associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. *J Infect Dis* 1990; 162: 678–684.
3. Brown E, Talbot GH, Axelrod P et al. Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-associated diarrhea. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1990;11:283–290.
4. Safdar N, Maki DG. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann Intern Med* 2002;136: 834–844.
5. Kreisel D, Savel TG, Silver AL et al. Surgical antibiotic prophylaxis and *Clostridium difficile* toxin positivity. *Arch Surg* 1995;130:989–993.
6. Oldfield EC III. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: risk factors, diagnostic methods, and treatment. *Rev Gastroenterol Disord* 2004;4:186–195.

7. Thomas C, Stevenson M, Riley TV. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1339–1350.
8. Wilcox MH, Freeman J. Epidemic *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2006; 354: 1199–1203.
9. Kyne L, Warny M, Qamar A et al. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 2001;357:189–193.
10. Baines SD, Saxton K, Freeman J et al. Tigecycline does not induce proliferation or cytotoxin production by epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1062–1065.
11. Valiquette L, Cossette B, Garant MP et al. Impact of a reduction in the use of high-risk antibiotics on the course of an epidemic of *Clostridium difficile*-associated disease caused by the hypervirulent NAP1/027 strain. *Clin Infect Dis* 2007;45 (suppl 2):S112–S121.
12. Fowler S, Webber A, Cooper BS et al. Successful use of feedback to improve antibiotic prescribing and reduce *Clostridium difficile* infection: a controlled interrupted time series. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:990–995.
13. Climo MW, Israel DS, Wong ES et al. Hospital-wide restriction of clindamycin: effect on the incidence of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and cost. *Ann Intern Med* 1998;128:989–995.
14. Wistrom J, Norrby SR, Myhre EB et al. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:43–50.
15. Walker KJ, Gilliland SS, Vance-Bryan K et al. *Clostridium difficile* colonization in residents of long-term care facilities: prevalence and risk factors. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:940–946.
16. Fowler S, Webber A, Cooper BS et al. Successful use of feedback to improve antibiotic prescribing and reduce *Clostridium difficile* infection: a controlled interrupted time series. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:990–995.
17. Aronsson B, Mollby R, Nord CE. Antimicrobial agents and *Clostridium difficile* in acute enteric disease: epidemiological data from Sweden, 1980–1982. *J Infect Dis* 1985;151:476–481.
18. Raveh D, Rabinowitz B, Breuer GS et al. Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-positive nosocomial diarrhoea. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:231–237.
19. Gifford AH, Kirkland KB. Risk factors for *Clostridium difficile*-associated diarrhea on an adult hematology–oncology ward. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:751–755.
20. Guyot A, Rawlins MD, Barrett SP. Clarithromycin appears to be linked with *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in the elderly. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:642–643.
21. Modena S, Bearely D, Swartz K et al. *Clostridium difficile* among hospitalized patients receiving antibiotics: a casecontrol study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26:685–690.
22. Freeman J, Wilcox MH. Ureidopenicillins and risk of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:719.
23. Samore MH, Venkataraman L, DeGirolami PC et al. Genotypic and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* correlated with previous antibiotic exposure. *Microb Drug Resist* 2006;12:23–28.
24. Thomas C, Stevenson M, Williamson DJ et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: epidemiological data from Western Australia associated with a modified antibiotic policy. *Clin Infect Dis* 2002;35:1457–1462.
25. Pepin J, Saheb N, Coulombe MA et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis* 2005;41:1254–1260.
26. Yip C, Loeb M, Salama S et al. Quinolone use as a risk factor for nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22:572–575.
27. McCusker ME, Harris AD, Perencevich E et al. Fluoroquinolone use and *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2003;9:730–733.
28. Viscidi R, Willey S, Bartlett JG. Isolation rates and toxigenic potential of *Clostridium difficile* isolates from various patient populations. *Gastroenterology* 1981; 81:5–9.
29. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY et al. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989; 320: 204–210.
30. Shim JK, Johnson S, Samore MH et al. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet* 1998; 351:633–636.
31. Samore MH, DeGirolami PC, Tlucko A et al. *Clostridium difficile* colonization and diarrhea at a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis* 1994; 18:181–187.
32. Barbut F, Corthier G, Charpak Y et al. Prevalence and pathogenicity of *Clostridium difficile* in hospitalized patients. A French multicenter study. *Arch Intern Med* 1996; 156: 1449–1454.
33. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF et al. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis* 2007; 45:992–998.

34. Johnson S, Clabots CR, Linn FV et al. Nosocomial *Clostridium difficile* colonisation and disease. *Lancet* 1990;336:97–100.
35. Shim JK, Johnson S, Samore MH et al. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet* 1998;351:633–636.
36. Samore MH. Epidemiology of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhoea. *J Hosp Infect* 1999; 43 (suppl): S183–S190.
37. Fekety R, Kim KH, Brown D et al. Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Med* 1981;70:906–908.
38. Kim KH, Fekety R, Batts DH et al. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 1981;143:42–50.
39. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY et al. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989;320:204–210.
40. Samore MH, Venkataraman L, DeGirolami PC et al. Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Med* 1996;100:32–40.
41. Cohen SH, Tang YT, Rehmani D, Silva J Jr. Persistence of an endemic (toxigenic) isolate of *Clostridium difficile* in the environment of a general medicine ward. *Clin Infect Dis* 2000;30:952–4.
42. Eckstein BC, Adams DA, Eckstein EC et al. Reduction of *Clostridium Difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus* contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods. *BMC Infectious Diseases* 2007;7:6
43. Wilcox MH, Fawley WN, Wigglesworth N et al. Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 2003; 54: 109–114.
44. Testore GP, Pantosti A, Cerquetti M et al. Evidence for cross-infection in an outbreak of *Clostridium difficile* associated diarrhoea in a surgical unit. *J Med Microbiol* 1988;26:125–128.
45. Cartmill TD, Panigrahi H, Worsley MA et al. Management and control of a large outbreak of diarrhoea due to *Clostridium difficile*. *J Hosp Infect* 1994;27:1–15.
46. Bennett GC, Allen E, Millard PH. *Clostridium difficile* diarrhoea: a highly infectious organism. *Age Ageing* 1984;13:363–366.
47. Bobulsky GS, Al Nassir WN, Riggs MM et al. *Clostridium difficile* skin contamination in patients with *C. difficile* associated disease et al. *Clin Infect Dis* 2008;46:447–50.
48. Dubberke ER, Reske KA, Noble-Wang J et al. Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities. *Am J Infect Control* 2007;35:315–8.
49. Vonberg RP, Kuiper EJ, Wilcox MH, et al. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:2–20.
50. Outbreak database. <http://www.outbreak-database.com>
51. Crobach MJT, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect Dis* 2009;15:1053–1066.
52. Cohen SJ, Gerding DN, Johnson SJ et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:431–455.
53. National *Clostridium difficile* Standards Group. Report to the Department of Health. *J Hosp Infect* 2004;56 (suppl 1):1–38.
54. Borek AP, Aird DZ, Carroll KC. Frequency of sample submission for optimal utilization of the cell culture cytotoxicity assay for detection of *Clostridium difficile* toxin. *J Clin Microbiol* 2005;43:2994–5.
55. Cardona DM, Rand KH. Evaluation of repeat *Clostridium difficile* enzyme immunoassay testing. *J Clin Microbiol* 2008;46: 3686–3689.
56. Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD et al. *Clostridium difficile* colitis: An efficient clinical approach to diagnosis. *Ann Intern Med* 1995;123:835–840.
57. Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN et al. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1012–1017.

2.10 *Clostridium difficile* - fra toxinpåvisning til dyrkning. Hva bør laboratoriene gjøre? Hva bør de sende fra seg?

Paul Naaber, Stavanger Universitetssjukehus

1. Introduction and new aspects of *C. difficile* infection

C. difficile is ubiquitous Gram-positive spore-forming anaerobic bacterium known as frequent cause of antibiotic-associated diarrhea in hospitalized patients. However, some recent studies have shown increasing frequency of *C. difficile* associated infection also in outpatients and persons without previous antibiotic treatment (with other factors that can disturb normal intestinal microflora). In several countries increasing incidence and death rate has been noted during recent years partly due to outbreaks of hypervirulent strains (such as PCR-ribotype 027).

2. *C. difficile* testing: methods overview

Summary of commonly used diagnostic tests is presented in the table

	Sensitivity % Range (Mean)	Specificity% Range (Mean)	Advantages	Disadvantages
Toxin A/B EIA (membrane)	31-96 (72)# 32-77 (52)*	65-100 (98)# 84-100 (98)*	Suitable for solitary samples Rapid; highly specific; better correlation with clinical disease?	Lower sensitivity than culture; no strains available for AB resistance testing and epidemiological investigations
Toxin A/B EIA (well-type)	57-99 (82)# 48-79 (66)*	87-100 (97)# 97-100 (98)*		
GDH EIA (membrane)	80-97 (90)#	75-100 (90)#	Suitable for solitary samples Rapid; high NPV in most studies; probably suitable as screening test	Low specificity (detects non-toxigenic strains and cross-reaction with some other bacteria); positive results should be confirmed; no strains available for further testing
GDH EIA (well-type)	91-96 (93)#	89-100 (89)#		
Real-time PCR	87-100# 84-97*	94-100# 93-100*	Highly sensitive & specific; rapid	Expensive; only few studies available about commercial assays; no strains available for further testing
Toxigenic culture (culture on selective medium + <i>in vitro</i> toxin test from isolate)			Highly sensitive & specific; availability of strains for sensitivity testing and typing	Labor-intensive and time consuming; need for anaerobic culture facilities; detects more colonization cases
Cell culture cytotoxin assay			Highly sensitive & specific	Labor-intensive and time consuming; need for cell cultures; detects only toxin B; no strains available for further testing

compared with cell culture cytotoxicity assay; * compared with toxigenic culture

The diagnostic tests for *C. difficile* can be divided:

a. Detection of *C. difficile* products – usually toxins or glutamate dehydrogenase (GDH)

The gold standard for toxin B detection is cell culture toxicity assay. Other commonly used test formats are EIAs (well-type and membrane type) available for detection of toxin A only or for detection of both toxins (A and B). For GDH several test formats are available e.g. well-type EIA, membrane-type EIA (rapid test) and latex test.

b. Cultivation of *C. difficile*

Culture following by *in vitro* toxin detection of isolated strain (toxigenic culture) has been described as most sensitive method for *C. difficile* detection. Culture is performed on selective media containing most commonly cycloserine and ceftiofime or moxalactam and norfloxacin. Several variations in antibiotic concentrations, agar bases and other ingredients (horse blood or egg yolk, sodium taurocholate) are in use. Pretreatment of fecal sample with alcohol (or heat) shock is recommended by some authors to reduce normal (non-spore forming) microflora and increase sensitivity.

c. Detection of *C. difficile* genes (toxin or other genes)

Real-time PCR test for several genes (*tcdB*, *tcdC*) have been elaborated. Two commercial real-time PCR assays are available: GeneOhm, Becton Dickinson (detects toxin B gene - *tcdB*) and Xpert, Cepheid (detects *tcdB* and additionally *cdtA/cdtB*, *tcdC*-deletion – genes associated with hypervirulent strains)

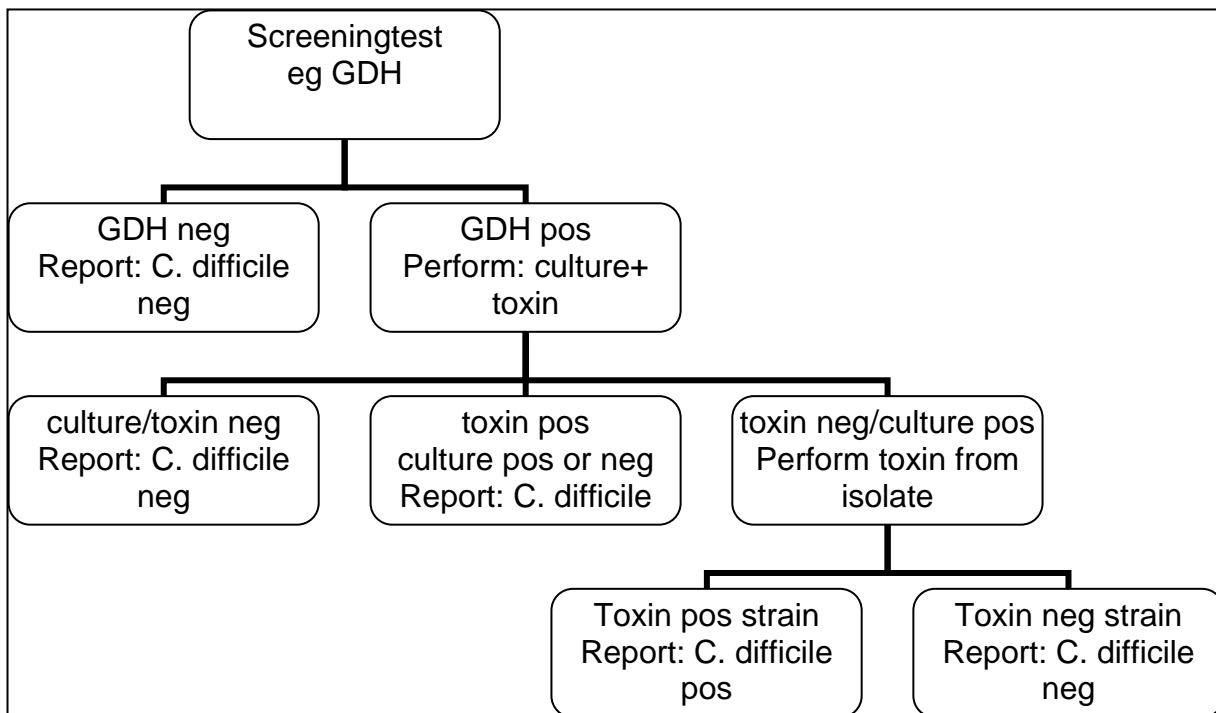
3. Diagnostic algorithms

Since there is no perfect test, combination of several methods has been recommended for diagnosis of *C. difficile*. **Probably the most sensitive and highly specific method is combination of toxin A/B test** (gold standard - cell culture cytotoxin assay has been replaced by less sensitive but more rapid EIA tests) **and toxigenic culture**. However, according to the European survey, only less than half of the labs are using this combination and the majority perform only toxin EIA. The situation is not better in Norway. According to the recent data (Ringtest for bakteriologi 4/2008) from 21 labs diagnosing *C. difficile* only 6 are using culture on selective medium (19 performing different toxin EIAs).

Advantages of this combination are (1) rapid preliminary result of EIA (positive result could be reported as real positive), (2) increased sensitivity (as compared with toxin test alone) and (3) availability of strains for further sensitivity testing or epidemiological investigations. Disadvantages are increased turnover time, costs and workload. To overcome these problems several **two and three steps algorithms** have been elaborated and evaluated during recent years. Most of these recommend **GDH rapid test as the first step**. This test shows high negative predictive value (NPV) but usually lacks specificity. However, sensitivity and specificity of different GDH test formats and products from different companies can vary. Thus, test selection should be based on reliable studies. **Negative GDH results could be reported as negative but positive should be confirmed by toxin test and/or toxigenic culture** (preferably by both). Advantages of this algorithm are (1) rapid negative result (no need for isolation of patient and specific treatment), (2) reduction of costs (about 80% of clinical samples are *C. difficile* negative and would not need further testing) and (3) rapid confirmation of most positive cases by toxin EIA. Addition of cultivation (4) increases sensitivity (GDH positive/toxin EIA false-negative cases) and (5) enables isolation of strains for further studies. Several variations of these algorithms has been evaluated and recommended. One example of this algorithm is shown in figure.

Real-time PCR is probably the most sensitive and specific alternative for screening and/or confirmation of toxigenic strains. It shows high sensitivity and specificity but high price of commercial assays limits its use. Also number of clinical studies evaluating commercial PCR systems is increasing rapidly.

Figure. *C. difficile* testing algorithm



4. Additional tests

Antibiotic susceptibility testing. Routine testing for vancomycin and metronidazole (antibiotics used for treatment of serious *C. difficile* infections) is usually not recommended. However, some studies have shown metronidazole (low to high level) resistance and reduced vancomycin susceptibility of clinical strains (6.3 and 3.1% in Madrid) and frequent metronidazole resistance (19%) in animal strains. It has been shown that resistance to metronidazole could be heteroresistance, inducible and unstable - this probably complicates its laboratory testing. The clinical consequences of inducible/heteroresistance is unclear. Testing strains for newer fluoroquinolones (e.g. Moxifloxacin) to detect emerging 027 ribotype has unknown sensitivity and specificity.

Typing – see other chapters/presentations

Lactoferrin test correlates with polymorphonuclear leucocytes counts in feces and has been recommended as marker to differ *C. difficile* colonization and infection. However this test is **neither sensitive nor specific to *C. difficile* infection** and should be interpreted together with other laboratory and clinical findings.

5. Special problems and discussion

Usefulness of toxigenic culture (i.e. culture followed by toxin production testing of isolated *C. difficile* strain). Emerging hypervirulent ribotypes (027; 078) has increased importance of culture. Due to long turnover time culture alone is not sufficient in most clinical cases and should be combined with other rapid tests. Different applications of culture could be used: (1) as routine diagnostic procedure in all labs diagnosing *C. difficile* infection; (2) as 2nd or 3rd step in diagnostic algorithms for selected samples; (3) for resistance and genotype distribution surveillance in reference lab or sentinel centers.

Clinical meaning of laboratory finding.

It is known that (1) 7-50% of hospitalized patients are (asymptomatically) colonized with toxigenic *C. difficile*, (2) 44-99% of antibiotic associated diarrheas are not caused by *C. difficile* but are just dysbiosis. Thus, it is quite likely situation of coincidence of mild dysbiotic diarrhea and *C. difficile* colonization.

It has been speculated that direct toxin test is clinically more relevant than culture (or PCR) since (1) pathological changes are caused by toxins and thus free toxin in feces can correlate with clinical symptoms, (2) culture (and probably also PCR) is too sensitive and detects also colonization. However, clinical data supporting this assumption are lacking. Although in one study higher toxin concentrations are associated with more severe symptoms, individual variation is high and no clear cut-off to differ colonization/infection or mild/severe infection could be defined.

Other proposed tests to differ infection and colonization (fecal lactoferrin and IL-8) have also some correlation with severity of disease but lack of sensitivity and specificity.

Repeated testing, control tests after treatment and surveillance cultures of asymptomatic patients. Submission of multiple samples will not increase the rate of detection of *C. difficile* infection cases in an endemic situation. However, in epidemic situation repeated testing may detect some additional cases. Treatment of asymptomatic *C. difficile* positive patients is not recommended and thus sampling of asymptomatic patients is not recommended (although frequently used in praxis). These tests may have value in epidemiological surveillance in some special situations. Repeated tests are not recommended for evaluation of effect of treatment (patient could remain asymptomatic carriers).

6. Conclusions and recommendations

- Performing of only direct toxin test is not optimal and additional culture is recommended.
- Alternative approach is usage of algorithms with sensitive screening test (GDH) and confirmation by toxin test and culture.
- Commercial real-time PCR could be used as single diagnostic test.
- In outbreak situation culture and typing of isolated strains is essential.

References

1. Åkerlund T *et al.* Correlation of disease severity with fecal toxin levels in patients with *Clostridium difficile* associated diarrhea and distribution of PCR ribotypes and toxin yields in vitro of corresponding isolates. J Clin Microbiol 2006; 44: 353-358.
2. Barbut F *et al.* A European survey of diagnostic methods and testing protocols for *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 989-996.
3. Crobach MJT *et al.* European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect. 2009; 15: 1053-1066.
4. Fenner L *et al.* Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2008; 46: 328-330.
5. Gillian PH. Is two-step glutamate dehydrogenase antigen-cytotoxicity neutralization assay algorithm superior to the Premier toxin A and B enzyme immunoassay for laboratory detection of *Clostridium difficile*? J Clin Microbiol 2008; 46: 1523-1525.

6. Guerrant RL *et al.* Measurement of fecal lactoferrin as marker of fecal leucocytes. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 1238-1242.
7. Huang H *et al.* Comparison of commercial multiplex real-time PCR to the cell cytotoxicity neutralization assay for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* 2009, 47: 3729-31.
8. Kvach EJ *et al.* Comparison of BD GeneOhm Cdiff real-time PCR assay with two-step algorithm and toxin A/B ELISA for diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* 2009 in press.
9. Manabe YC *et al.* *Clostridium difficile* colitis: an efficient clinical approach to diagnosis. *Ann Intern Med.* 1995; 123: 835-840.
10. McFee RB & Abdelsayed GG. *Clostridium difficile*. *Dis Mon* 2009; 55: 439-470.
11. Reller ME *et al.* Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 361-3605.
12. Reyes RC *et al.* Performance of TechLab C. DIFF QUIK CHEK™ and TechLab C.DIFFICILE TOX A/B II™ for detection of *Clostridium difficile* in stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 33-37.
13. Sandven P & Lassen J. Ringtest for bakteriologi -4/2008. Resultater og kommentarer. FHI 2008.
14. Schlepner MA *et al.* Concurrence of *Clostridium difficile* toxin A enzyme-linked immunosorbent assay, fecal lactoferrin assay, and clinical criteria with *C. difficile* cytotoxin titer in two patient cohort. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1755-1759.
15. Shin BM *et al.* Combined diagnostics algorithm of toxin immunoassay and stool culture for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2952-6.
16. Sloan LM *et al.* Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1996-2001.
17. Stamper PD *et al.* Comparison of commercial real-time PCR assay for *tcdB* detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 373-378.
18. Steiner TS *et al.* Fecal lactoferrin, interleukin-1 β , and interleukin-8 are elevated in patients with severe *Clostridium difficile* colitis. *Clin Diagnost Lab Immunol* 1997; 4: 719-722.
19. Terhes G *et al.* Comparison of rapid molecular-based method, BD GenOhm Cdiff assay to the most frequently used laboratory tests for the detection of toxin-producing *C. difficile* in diarrheal feces. *J Clin Microbiol* 2009 in press.
20. Ticehurst JR *et al.* Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1145-1149.
21. van den Berg RJ *et al.* Evaluation of real-time PCR and conventional diagnostic methods for detection of *Clostridium difficile* associated diarrhea in a prospective multicentre study. *J Med Microbiol* 2007; 56: 36-42.
22. Wren MW *et al.* Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. An evaluation of tests for faecal toxin, glutamate dehydrogenase, lactoferrin and toxigenic culture in the diagnostic laboratory. *Br J Biomed Sci* 2009; 66: 1-5.
23. Young WH *et al.* Comparison of fecal lactoferrin latex agglutination assay and methylene blue microscopy for detection of fecal leucocytes in *Clostridium difficile*-associated disease. *J Clin Microbiol*, 1994; 32: 1360-1361.

2.11 Typing av *Clostridium difficile*: Fra toxintyper til MLVA.

André Ingebretsen. Avd. for sykehushygiene og Mikrobiologisk institutt, RH, Oslo universitetssykehus

Clostridium difficile er en anaerob, Grampositiv, endosporedannende stavbakterie. Den ble først beskrevet i 1935, da som en del av tarmfloraen hos nyfødte. Den alvorligste sykdomsformen av *Clostridium difficile* infeksjon (CDI), pseudomembranøs kolitt, først ble beskrevet i 1893, men at sykdommen ble forårsaket av *C.difficile* ble først oppdaget i 1978. I 2002 ble det ved Pittsburgh Medical Centre, US observert en økning i antall CDI med et alvorlig sykdomsforløp. Lignende observasjoner ble gjort i Canada og senere i Europa. Stammen som fikk benevnelsen BI/NAP1/027 ble funnet å være årsaken til et stort antall infeksjoner i den observerte økningen av CDI-ratene i Nord-Amerika. Stammen er påvist ved sykehus i alle provinsene i Canada, 40 stater i USA og i de fleste europeiske land. I Norge har vi påvist den høyvirulente stammen ved 2 sykehus og 2 sykehjem. Samtidig så har vi funnet villtypen av BI/NAP1/027 i en retrospektiv studie ved et annet sykehus. Stammenavnet *C.difficile* BI/NAP1/027 har stammen fått på grunnlag av de forskjellige genotypingsmetodene som ble anvendt for å karakterisere den epidemiske stammen. Restriksjon endonuklease analyse (REA) ga type BI, pulsfelt gelelektroforese ga North-American Pulsed field type 1 (NAP1) og PCR ribotyping ga ribotype 027.

Hvorfor genotype *Clostridium difficile*?

I 2006 ble *Clostridium difficile* stamme 630 presentert som en virulent og multiresistens stamme hvor en stor andel av genomet (11%) besto av mobile genetiske elementer, i hovedsak konjugative transposoner. Kun 15% av genomet var felles med andre sekvenserte Clostridia (*C.acetobutylicum*, *C.botulinum*, *C.perfringens*, *C.tetani*). 50% var unike kodende sekvenser (CDS) for *Clostridium difficile*. Dette kan stemme overens med observasjoner gjort under fylogenetiske studier basert på 16S rRNA sekvenser utført på 90-tallet. I disse studiene så man at 16S rRNA gentreet dannet over 18 clusterer hvorpå kun cluster 1 ble foreslått å være "ekte" medlemmer av slekten *Clostridium* (*Clostridium sensu stricto*). *C. Difficile* er ikke med i denne clusteren.

Hva så med genetisk variasjon på subartsnivå?

I 2006 ble det utført en komparativ fylogenetisk analyse ved å bruke en mikromatrise med PCR prober spesifikke for 630 genomet. 75 forskjellige stammer ble analysert og kun 19,7% av genene var felles i alle stammene. Dette ble bekreftet i juni 2009 da det ble gjort en studie der man sammenlignet de to sekvenserte stammene *C.difficile* 630 og *C.difficile* QCD-32g58. Resultatet viste et "kjernegenom" på ca. 16%. Altså er det stor genetisk variasjon mellom de forskjellige stammene. 18 forskjellige *C.difficile* stammer er under sekvensering pr. august 2009. Resultatene fra en komparativ analyse mellom disse stammene vil være grunnlaget for en diagnostisk mikromatrise for *C.difficile*.

Den store genetiske variasjonen mellom stammer kommer til uttrykk i de fenotypiske egenskapene stammene innehar.

Undersøkelser om relasjonen mellom virulens og overflateproteiner i den epidemiske stammen *C.difficile* 027 indikerer at overflateproteinet SlpA er forandret i disse stammene.

Dette settes i sammenheng med økt adherens til humane tarmepitelceller.

C.difficile danner sporer som er meget resistente overfor uttørring, mange kjemikalier og ekstreme temperaturer. Sporene kan overleve de temperaturene og de desinfiserende trinnene

i en klesvask hos sykehusvaskeriet og også krysskontaminere sengetøy gjennom en slik vaskesyklus. Epidemiske *C.difficile* - stammer har en økt sporuleringsrate *in vitro* sammenlignet med ikke-epidemiske stammer. Videre viser epidemiske *C.difficile* stammer en økt sporuleringsrate *in vitro* også når de behandles med ikke-klorinbaserte desinfeksjonsmidler (detergent eller hydrogenperoksid) med en konsentrasjon som ligger under hemmende nivå.

Virulente stammer av *C.difficile* kan produsere enterotoksinet TcdA og cytotoksinet TcdB. Stammer som ikke produserer toksin, forårsaker heller ikke kolitt. Stammer som produserer kun TcdB er virulente, noe som antyder at TcdB er essensiell for virulens i *C.difficile*. TcdA og TcdB respektive gener *tcdA* og *tcdB*, finner man i et veldefinert genetisk element kalt PaLoc (patogenitetslocus). Her finnes også *tcdR*, *tcdE* og *tcdC*. *tcdR* koder for en alternativ sigmafaktor som er involvert i positiv transkripsjonell regulering av *tcdA* og *tcdB*. Genet *tcdC* koder for en negativ regulator og *tcdE* koder for et protein som ligner fag-holiner dvs. et protein hvis aktivitet potensielt vil frigjøre toksin fra cellen. Spesielle alleler av *tcdC* har enkelt-nukleotid mutasjoner, spesielt $\Delta 117$ og C184T, som resulterer i ikke-funksjonelle proteiner og korresponderende delesjoner (18 bp og 39 bp) som kan anvendes som markører. Stammer med disse allelene av *tcdC*, inkludert 027, har vist økt toksinproduksjon. Noen stammer, inkludert 027, produserer også det binære toksinet CDT. Dette toksinet kan bidra i patogenesen av CDI.

Genotypingsmetoder

Kan deles i 3 forskjellige hovedgrupper:

- a) Restriksjonsanalyser
- b) PCR-baserte metoder
- c) Sekvenseringsmetoder

a) Restriksjonsanalyser

- PFGE (Puls-felt gelelektroforese)
En metode der restriksjonsensymer kutter det bakterielle genomet slik at man får store DNA fragmenter. De store fragmentene støpes inn i en gel og separeres langsomt i et elektrisk felt der spenningen hele tiden forandres. DNA fragmentene vandrer forskjellige avstander utifra størrelsen på fragmentene. Fragmentene farges og de resulterende båndmønstrene (fingerprintene) fra forskjellige stammer sammenlignes med hverandre. Mest anvendt metode i USA og Canada der pulsfelt gelelektroforese er satt i et standardisert system kalt Pulsenet.
- REA (Restriction endonuclease analysis)
En metode der det bakterielle genomet kuttes i mye større grad enn med PFGE. Resultater i et stort antall DNA fragmenter som kan være vanskelig å tolke og reproducere. Er i bruk et fåtall av steder. Muligens kun D.Gerdings lab i Chicago som har biblioteket (og fortsatt gjør analysen).

b) PCR-baserte metoder

- Toxinotyping
Toxinotyping baserer seg på variasjoner i PaLoc og er en PCR-basert metode der *Clostridium difficile* stammer deles i toxinotyper utifra lengden og restriksjonsmønsteret på to (B1 og A3) fragmenter i PaLoc. Ved å sammenligne mønstrene med referansestammen *C.difficile* VPI 10463 kan man få opptil 27 toxinotyper (I-XXVII).

- FliC-typing
Lignende metode som toxinotyping, men her er det flagillin genet (fliC) som amplifiseres og deretter kuttes.
- Ribotyping
PCR ribotyping utnytter forskjellene i spacerregionene til 16s og 23S ribosomal RNA. Spesifikke primere brukes til å amplifisere DNA som koder for disse RNA regionene. Metoden produserer få bånd som kan visualiseres ved gelelektroforese. Mye anvendt metode i Europa. Referansebiblioteket finnes i Anaerobe Reference Lab, Cardiff.
- AFLP (Amplified fragment length polymorphism)
En metode der det bakterielle genomet blir kuttet og det blir ligert på adaptorene på fragmentene. En selektiv PCR sørger for å sortere fragmentene ved å bruke primere som er komplementære med adaptorsekvensen + enten 1, 2 eller 3 baser på restriksjonsfragmentene. Produserer komplekse båndmønstre som bør analyseres med riktig bioinformatisk verktøy.

c) Sekvenseringsmetoder

- MLVA (Multilocus variable number tandem repeat analysis)
MLVA er en metode der man teller antall repeat alleler i 7 forskjellige konserverte loci, som amplifiseres av PCR. Resultatet er en numerisk kode som lett kan sammenlignes mellom laboratorier. Det er to publiserte sett med konserverte loci. I Europa er det nederlandske settet som er konsensus og brukes ved referanselaboratoriene. Det finnes også et norsk sett markører som foreløpig er upublisert.
- MLST (Multilocus sequence typing)
Dette er den mest kostbare typingsmetoden. Man sekvenserer forskjellige konserverte loci (typisk husholdsgener) og gir hver allele et nummer. Kombinasjonen av disse nummerne gir en sekvenstype. Mye brukt metode i fylogenetiske studier.
- Tandem repeat sequencing
Ny metode (2009) der sekvensering av to tandem repeats (TR6 og TR10) gir forskjellige tr-typer. Ikke ulikt spa-typing for *Staphylococcus aureus*.
- TLST (Triple locus sequence analysis)
Ny metode (2008) der man sekvenserer de toksinregulatoriske genene tcdC, tcdR og cdtR. Hver sekvens som har et eller flere nukleotider i forskjell ble betraktet som et forskjellig allele. Og kombinasjonen av alleler gir en sekvenstype. I prinsippet lik MLST, men med andre markører.
- slpAST (Surface Layer Protein A gene Sequence Typing)
Den variable regionen i slpA hos hver stamme sekvenseres og sekvensene sammenlignes. En ikke utbredt metode.

Det er også utført en del andre PCR-baserte genotypingsmetoder, men disse er i bunn og grunn like de som er nevnt over. I 2008 ble det i JCM presentert en studie der man sammenlignet 7 forskjellige genotypingsmetoder med hensyn på oppløselighet. 42 isolater av *C.difficile* ble typet med REA, PFGE, PCR ribotyping, MLST, MLVA, AFLP og SlpA-typing. Alle isolatene lot seg type med de forskjellige metodene og DI (discrimination index) varierte fra 0,964 til 0,631 i rekkefølgen MLVA, REA, PFGE, slpAST, PCR ribotyping, MLST og AFLP.

Den pågående revolusjonen i klinisk mikrobiologi m.t.p. identifikasjon og typing av mikroorganismer har allerede introdusert en rekke nye metoder som er raske, billige, reproducerbare og høyoppløslige. Disse metodene vil gi oss sjansen til rutinemessig å identifisere mikroorganismene på subartsnivå og dermed gi oss en mengde mer informasjon

om isolatet fra en pasientprøve. Utvikling av typings/identifikasjonssystemer basert på (masse)spektroni, mikromatriser, hel-genomanalyser og nye sekvenseringsmetoder går for tiden raskt og vil i nær fremtid erstatte flere av metodene beskrevet i kapittelet over.

Hvordan genotype *C.difficile*?

En forutsetning for genotyping med dagens metoder er at bakterien finnes i renkultur. Det vil si at alle laboratorier bør ha mulighet til å dyrke bakterien med egnede medier.

De fleste kliniske laboratorier i Norge har en toksin A + toksin B test i sitt testutvalg. Det har i den senere tid dukket opp flere PCR-baserte metoder for å detektere en eller flere av genene i PaLoc. Dette kan utføres direkte på fæcesprøver. I og for seg er dette en genetisk karakterisering og hvis målmolekylet er *tcdC*, kan slike PCR-metoder brukes som en silemetode for å detektere epidemiske stammer av *C.difficile*.

Sørsmål:

1. Er det naturlig at alle laboratorier skal utføre slik siling?

For å avgjøre hvilke epidemiske/hypervirulente stammer vi har med å gjøre, må man utføre genotyping med en metode som beskriver disse stammene dvs. enten med PCR ribotyping, REA eller PFGE. I Europa er PCR ribotyping mest utbredt selv om metode ikke er like oppløselig som f.eks. PFGE. I Norge er det etablert PCR ribotyping av *C.difficile* ved tre helseinstitusjoner; St.Olavs Hospital, Stavanger universitetssykehus og ved Oslo universitetssykehus Rikshospitalet. Alle disse bruker samme protokoll og ligger i hver sin helseregion. Slik sett ligger alt til rette for et regionalt ribotypingsnettverk.

2. Skal PCR ribotyping utføres på alle dyrkede isolater uansett pasientens tilstand?

3. Skal PCR ribotyping utføres i hver sin helseregion eller kun på Referanse-laboratoriet for *Clostridium difficile*?