

Diagnostik af bakterielle mave-tarminfektioner

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

FORORD	3
INTRODUKTION	4
PRØVETAGNING	4
FORSENDELSE AF FÆCESPRØVER	5
TRANSPORTTID	5
PRØVEANTAL	5
KONTROLDYRKNING	5
IDENTIFIKATIONSNIVEAU AF GENTAGNE ISOLATER FRA SAMME PATIENT	5
SPECIALMEDIER TIL TARMBAKTERIOLOGISK DIAGNOSTIK	6
INKUBATION	7
RESISTENSBESTEMMELSE	7
VIDERESENDELSE AF BAKTERIE KULTURER	7
FORSENDELSE AF BAKTERIE KULTURER	7
DYRKNING	8
EPIDEMIOLOGI	9
IDENTIFIKATION	14
Campylobacter jejuni/coli og øvrige Campylobacter spp.	14
Salmonella	16
Shigella	18
Yersinia enterocolitica	19
Vibrio/Aeromonas/Plesiomonas	20
Clostridium difficile	21
Diarréfremkaldende E. coli	22
Staphylococcus aureus	24
Bacillus cereus	24
Clostridium perfringens	24
Listeria monocytogenes	24
Candida	24
OVERVÅGNING OG REFERENCE	25
BIOSIKRING	28
KOLONIMORFOLOGI, FARVEPLANCHER	29

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

FORORD

I år 2003 udgav Dansk Selskab for Klinisk Mikrobiologi (DSKM) rapporten "Diagnostik af tarmpatogene bakterier - Anbefalinger fra DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi 2003." Siden denne publikation er der sket en række ændringer i diagnostik af bakterielle mave-tarminfektioner og der er behov for en opdatering af anbefalingerne. Nærværende dokument er udarbejdet af en arbejdsgruppe under DSKM bestående af repræsentanter fra forskellige klinisk mikrobiologiske afdelinger og Statens Serum Institut (SSI). Forfatternes ambitioner er høje, men ikke højere end, at anbefalinger må kunne forventes efterlevet af alle danske klinisk mikrobiologiske afdelinger.

Forfatterne, 2012

Arbejdsgruppens sammensætning:

Jørgen Engberg, Slagelse Sygehus

Hanne Marie Holt, Odense Universitetshospital

Lars Lemming, Aarhus Universitetshospital

Anne Lester, Hvidovre Hospital

Bente Olesen, Hillerød Hospital

Katharina E. P. Olsen, Statens Serum Institut

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

INTRODUKTION

En tarmbakteriologisk standardundersøgelse omfatter:

- *Campylobacter jejuni/coli*
- *Salmonella*
- *Shigella*
- *Yersinia enterocolitica*
- Andre bakterier som gror på de anvendte medier og som antages at kunne have sammenhæng med patientens sygdom, fx *Vibrio*, *Aeromonas* og *Plesiomonas shigelloides*.

Ved nosokomial diarré og/eller antibiotikainduceret diarré desuden for

- *Clostridium difficile* (CD)

Ved blodig diarré (synlig i prøven eller anamnestisk), alder under 7 år, diarré i forbindelse med udlandsrejse eller mistanke om hæmolytisk uræmisk syndrom (HUS) desuden for

- *E. coli* (VTEC, ETEC, EIEC, EPEC og A/EEC)

Bør desuden overvejes ved persisterende diarré (> 2 uger) og ved gastroenterit udbrud.

På særlige indikationer for:

- *Clostridium perfringens*: Ophobede tilfælde af infektiøs gastroenteritis med konkret levnedsmiddelmistanke og kort inkubationstid. Eventuel sygehuserhvervet gastroenteritis og mistanke om nekrotiserende enterocolitis.
- *Staphylococcus aureus*: Ophobede tilfælde af infektiøs gastroenteritis med konkret levnedsmiddelmistanke og kort inkubationstid
- *Bacillus cereus*: Ophobede tilfælde af infektiøs gastroenteritis med konkret levnedsmiddelmistanke og kort inkubationstid
- Gær: I særlige tilfælde fra immunsvækkede patienter
- *Listeria monocytogenes*: På særlig indikation
- Andre

Det enkelte lokale laboratorium afgør hvilke undersøgelser, man vil foretage, samt hvilke man vil visitere videre til Tarmbakteriologisk laboratorium, SSI, der er referencelaboratorium for tarmbakteriologi i Danmark.

PRØVETAGNING

Til opsamling og forsendelse af fæces anvendes godkendte forsendelsesrør fx ThermoFisher forsendelsesrør til fæces, SSI artikel nr. 40080 eller Copan Fecal Swab (Cary Blair), SSI artikel nr. 77519.

Fæces opsamles bedst i et varmedesinficeret bækken eller i rengjort og skoldet potte eller skål. Alternativt kan opsamling ske i wc-kumme præpareret med rigeligt toiletpapir. Hvis afføringen ikke er homogen, udvælges med prøvetagningskeens materiale fra vandige, løse,

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

slimede, purulente eller blodige områder.

FORSENDELSE AF FÆCESPRØVER

Prøven opbevares på køl indtil forsendelse. Forsendelse kan foregå uden afkøling.

TRANSPORTTID

Fæcesprøver bør udsås hurtigst muligt efter prøvetagningen. Det diagnostiske udbytte nedsættes normalt ikke væsentligt ved en transporttid op til 2-3 dage.

PRØVEANTAL

Generelt er sensitiviteten af undersøgelse af én prøve fra en patient 75-80 % sammenlignet med undersøgelse af 3 eller flere prøver. Ved undersøgelse af 2 prøver øges sensitiviteten med 20 %. Sensitiviteten er afhængig af antallet af bakterier i prøven. Da patogendensiteten er meget høj i fæces de første sygdomsdage, er det rimeligt at foreslå dyrkning af én fæcesprøve fra patienter, der kun har haft diarré få dage. Er dyrkningen negativ, foreslås dyrkning fra yderligere 2 fæcesprøver taget i forbindelse med forskellige toiletbesøg. Har patienten været syg i mere end 1 uge foreslås dyrkning af 3 fæcesprøver fra forskellige toiletbesøg med det samme.

For påvisning af CD toksin(er) ved PCR direkte på fæces: Én fæcesprøve er tilstrækkelig.

KONTROLDYRKNING

Anbefales normalt IKKE. Undtagelsestilfældene er tyfus og paratyfus, VTEC og *Shigella* for patienter med følsomme erhverv eller for børn i institutioner (foretages i overensstemmelse med den lokale embedslægeinstitutions retningslinjer, almindeligvis 2 konsekutive negative dyrkninger før raskmelding).

IDENTIFIKATIONSNIVEAU AF GENTAGNE ISOLATER FRA SAMME PATIENT

Gentagne isolater af bakterier af samme art og med samme resistensmønster (hvis det foreligger) kan svares ud som det episodeudløsende isolat, hvis det opfylder følgende kriterier:

For *Salmonella*: isoleret op til 6 måneder efter episodeudløsende isolat - samme O-gruppe som det episodeudløsende isolat.

For *Clostridium difficile*: Genfund af samme toksin profil eller antibiogram op til 2 måneder.

For alle andre: isoleret op til 1 måned efter det episodeudløsende isolat - enten samme biokemi eller samme O-type (alt efter hvad der er hurtigst at udføre).

NB! Teoretisk set er mere end 10 % af alle infektioner dobbeltinfektioner.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

SPECIALMEDIER TIL TARMBAKTERIOLOGISK DIAGNOSTIK

Selenit, 0,6 %

Flydende substrat til primær opformering af *Salmonella*. Hæmmer de fleste andre bakterier. Inkuberes natten over ved 35- 37°C. Sekundær udsåning af 1 µl på 9 cm SSI rød plade og/eller XLD, som inkuberes natten over.

SSI Enterisk Medium (Rød plade, "Gaarslevs plade")

Mildt selektivt substrat. Hæmmer *Proteus*-sværm. Laktose-positive kolonier fremtræder røde og kornede (udfældning af deoxycholsyre), medens laktose-negative er blege. H₂S-produktion giver sort centrum og evt metalskær (undtagen *Salmonella* Typhi og *Salmonella* Paratyphi A). Fenylalanin-deaminering (bl.a. *Proteus*) giver grå-brun farve omkring kolonierne. "Rough" transformation kan ses ved *Shigella sonnei*, hvor kolonierne bliver uregelmæssigt kantede. *Aeromonas* gror med opaque kolonier, mens kolonier af *Vibrio* er klare/gennemsigtige. *Yersinia* vokser med små kolonier, som perler på en snor.

XLD-plade (Xylose-Lysine-Deoxycholate)

Enterisk medium der er lidt mere selektivt end SSI Enterisk Medium.

Et godt supplement til SSI Enterisk Medium. *Salmonella* bliver lakse-farvede eller røde med sort centrum. *Shigella* er farveløse, gennemsigtige. Andre enterobakterier farves gule.

CIN-plade (Cefsoludin-Irgasan-Novobiocin, "YERSINIA-plade"):

Selektivt medium indeholdende galdesalte og antibiotika til isolation af *Yersinia*. *Yersinia*-kolonier har distinkt rødt centrum og gennemsigtig rand (okseøje).

Serratia, *Citrobacter* og andre kan ligne *Yersinia*, men er mere diffuse og med uigennemsigtig kant. *Aeromonas* gror godt på CIN-pladen og findes ved identifikation af oxidase-positive kolonier på pladen.

mCCDA-plade (modified Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate-Amphotericin)

Selektivt medium til isolation af *Campylobacter*. Kulagarplade med cefoperazon og amphotericin B. *Campylobacter*-kolonierne er farveløse, hvidlige, grå, eller orangefarvede, ofte spredende og med metalskær.

CCFA-plade (Cycloserin-Cefoxitin-Fruktose-Agar)

Selektivt og differentierende medium til dyrkning af *C. difficile*. *C. difficile* kolonierne er uregelmæssige, havregryns-lignende med ru overflade, spredende henover pladen. Hestestaldslugt (paracresoldannelse)

ChromID C. difficile agar®

Selektivt og differentierende medium til dyrkning af *C. difficile*. Indeholder antibiotika, der hæmmer de fleste bakterier/svampe; desuden peptoner og taurocholater, der fremmer germineringen til vegetative bakterier. Vækst af typiske grå til sorte kolonier med uregelmæssige eller jævne kanter efter 24 timer. Supplerende tests til bekræftelse af identifikation bør udføres.

Agar-plade

Basis medium til opformering af renkultur til agglutination og forgæring. Fremstillet af oksekødbouillon.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

TCBS-plade (Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sucrose, "kolera-plade")
Selektivt indikatormedium til *Vibrio*-diagnostik

PALCAM-plade
Selektivt medium til isolation af *Listeria*.

Sabouraud- eller Chromagar
Selektive svampemedier

d-tartrat
PCR-metode anbefales

For yderligere information om medier, se Statens Serum Instituts Substrathåndbog eller <http://www.ssi.dk/sw812.asp>.

INKUBATION

- Alle substrater inkuberes ved 35- 37°C, dog mCCDA ved 42°C, alternativt 37°C
- mCCDA inkuberes mikroaerobt (gerne med 3-5 % H₂) i 2 dage
- CCFA inkuberes anaerobt i 2 dage
- ChromID CDIF inkuberes anaerobt i 1 dag
- Alle andre substrater inkuberes aerobt i 1 dag

RESISTENSBESTEMMELSE

Såfremt der udføres resistensbestemmelse anbefales resistensbestemmelse i henhold til retningslinjerne fastsat af The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

VIDERESENDELSE AF BAKTERIE KULTURER

Se under de enkelte patogene bakterier. **SSI Blanket 9 benyttes altid.**

FORSENDELSE AF BAKTERIE KULTURER

"Opbevaring af kontrolbelagte bakteriekulturer - fx verocytotoksinproducerende *E. coli* isolater (VTEC/HUS) - i forbindelse med et sygdomsudbrud kræver ingen særlig tilladelse før 14 dage efter endt udredning, som godt kan foregå på flere forskellige laboratorier. Reglerne for transport af sygdomsfremkaldende bakterie isolater mellem laboratorier er fastlagt i de internationale ADR-regler UN 2814. Hvis der er tale om diagnostisk eller klinisk formål, så er kravene til landevejstransport lempeligere for visse bakterier. Efter CBB's vurdering kan isolater af VTEC/HUS, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* Typhi og *Vibrio cholerae* forsendes ifølge UN 3373-kravene, dvs. forsendes ligesom almindelige diagnostiske prøver med ukendt indhold." Fra: www.biosikring.dk - nyhed d. 1/6/2011.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

DYRKNING

Kolonimorfologi på forskellige enteriske medier. Se farveplancher for udvalgte bakterier nederst i dokumentet.

	SSI Enterisk Medium	XLD-agar	CIN-plade
<i>E. coli</i>	rød (bleg)	gul	- vækst
<i>Yersinia enterocolitica</i>	lille, klar, "perler på snor"	gul	pink med rød midte og gennemsigtig rand, "okseøje"
<i>Shigella boydii</i>	bleg	bleg/gennemsigtig	- vækst
<i>Shigella sonnei</i>	bleg, evt. ru kant	bleg/gennemsigtig	- vækst
<i>Salmonella non-Typhi</i>	bleg med sort midte "metalskær"	sort koloni (substrat bag kolonien pink)	- vækst
<i>Salmonella Typhi</i>	bleg, evt lille grå/sort midte	bleg/gennemsigtig	- vækst
<i>Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas</i>	bleg, brun, afgrænset flad, "krøllet"	gul	- vækst, dog vokser <i>Aeromonas</i> med pink kolonier med bleg kant
<i>Proteus</i>	bleg, grå med sort midte, agar "mørkfarves"	vokser dårligt, mørk/lys grå med sort midte	- vækst
<i>Citrobacter</i>	laksefarvet med sort midte	lys gul / sort midte	pink, god vækst

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

EPIDEMIOLOGI

Campylobacter spp. er den hyppigste årsag til bakteriel gastroenteritis i Danmark og internationalt. Der er en lang række smittekilder til *Campylobacter*. Kvantitativt vigtigst er fjerkræ, især kylling. Transmission sker ofte ved krydskontaminering til andre fødevarer. Andre smittekilder: Forurenet drikkevand, tæt kontakt med kæledyr og udlandsrejse. *Campylobacter* bakterier er kræsne og følsomme for fysiske og kemiske påvirkninger og stiller derfor krav til dyrkningsforhold, herunder dyrkningsmedium og gasblanding.

Salmonella slægten består af to species: (1) *S. enterica*, som er inddelt i 6 subspecies og (2) *S. bongori*. Artsnavnene har dog mindre praktisk betydning idet langt de fleste human patogene *Salmonella* kan identificeres indenfor underarten *S. enterica* subsp. *enterica* med navngivne serotype (= serovar) betegnelser. Fx *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (kort betegnelse *Salmonella* Enteritidis).

Salmonella Typhi og *S. Paratyphi* skiller sig ud fra de såkaldte zoonotiske *Salmonella*-typer ved altid at have mennesker som reservoir. Infektionerne er som oftest bakteriemiske. Sygdommene er individuelt anmeldelsespligtige for den behandlende læge på blanket 1515. Zoonotiske salmonellatyper smitter fra dyr og forårsager oftest diarrésygdom. De mest almindelige serotyper er *S. Enteritidis* der først og fremmest har konsumæg som reservoir og *S. Typhimurium*, hvis vigtigste reservoirer er svin, fjerkræ og kvæg.

Salmonella Dublin har kvæg som reservoir. Visse serotyper er mere invasive end andre, fx *S. Dublin*, *S. Virchow* og *S. Choleraesuis*. SSI sender *S. Typhimurium* og *S. Enteritidis* til Fødevarainstituttet, DTU til fagtypning som led i national overvågning.

Shigella spp. er årsag til bakteriel dysenteri (afgang af pus, mucus og blod med fæces), men kan også give ikke-blodig diarré. Der findes fire arter: *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* og *S. dysenteriae* og alle fire arter kan forårsage dysenteri, men *S. dysenteriae* serotype 1 er associeret til en særlig alvorlig form, som kan relateres til dens produktion af shiga-toksin (identisk med verocytotoksin VT1 i diarréfremkaldende *E. coli* (DEC)). *Shigella* er en hyppig årsag til rejseassocieret diarré. Der ses en del småepidemier i daginstitutioner. *S. sonnei* forekommer endemisk i Danmark.

Shigella er ikke en zoonose, smitte sker fra andet menneske, ofte gennem fækal forurenet drikkevand og levnedsmidler. Da infektionsdosis er meget lille ses også hyppigt direkte person-person spredning (sekundær spredning) som følge af utilstrækkelig håndhygiejne efter toiletbesøg. *Shigella sonnei* udbrud forekommer ikke sjældent i Danmark som følge af importerede forurenede levnedsmidler (grøntsager).

For den behandlende læge er *Shigella* infektion individuelt anmeldelsespligtig.

Yersinia enterocolitica er vidt udbredt i naturen; der findes mere end 70 serotyper, men kun få er associeret med sygdom hos mennesker. *Y. enterocolitica* forårsager diarré, især hos småbørn, men er også en hyppig årsag til mesenteriel adenit ("pseudoappendicitis").

Forårsager tillige immunologiske komplikationer i form af reaktiv arthritis og erythema nodosum (knuderosen), især hos voksne som har vævstypen HLA-B27.

Svin er det altdominerende reservoir for patogene stammer af *Y. enterocolitica*.

Aeromonas spp. og ***Plesiomonas shigelloides*** er ferskvandsbakterier. *Aeromonas* er vidt udbredt bl.a. i Danmark, men forårsager ret sjældent diarré og da ofte kun mildere sygdom. *Plesiomonas shigelloides* diarré er sjælden og oftest associeret med rejse til tropiske områder.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Vibrio er saltvandsbakterier og *V. cholerae* serotype O1 og O139 forårsager sygdommen kolera. Andre *Vibrio* arter, især *Vibrio parahaemolyticus*, samt andre serotyper af *Vibrio cholerae* kan forårsage gastroenteritis. Kolera forekommer sjældent i Danmark og er altid rejseassocieret. *Vibrio parahaemolyticus* og andre non-kolera vibrioner kan forekomme i danske farvande i varme somre, når havvandstemperaturen er over 20°C i længere tid. Infektioner kan også være relateret til importeret sea-food.

Clostridium difficile er hyppigste årsag til nosokomial og antibiotikainduceret diarré. Diarréen udløses af toksin B og toksin A. Toksin negative stammer er apatogene. Toksinproducerende CD er fundet hos 20-30 % med antibiotika associeret diarré og hos 95 % med pseudomembranøs colitis. Siden 2008 er der i Danmark registreret større udbrud af CD infektion (CDI) med sværere symptomer, større mortalitet og flere komplikationer end tidligere. Disse udbrud er vist at være forårsaget af især CD PCR ribotype 027. Den øgede patogenicitet tilskrives en større produktion af toksin A og toksin B samt tilstedeværelsen af det binære toksin. Betydningen af det binære toksin er dog fortsat delvist uafklaret. Den øgede produktion af toksin A og B tilskrives deletioner i et negativt regulerende gen *tcdC*. Det drejer sig om en 18 bp deletion og en punktmutation i position 117. Smitte sker ved direkte og indirekte kontakt og CDI udløses af antibiotikabehandling. CD bakteriesporer ødelægges af klor, men ikke af alkohol og Virkon.

Diarréfremkaldende E. coli (DEC) omfatter følgende typer: Verocytotoksin producerende *E. coli* (VTEC); enteropatogene *E. coli* (EPEC); intiminproducerende *E. coli* (A/EEC); enterotoksogene *E. coli* (ETEC); enteroinvasive *E. coli* (EIEC); enteroaggregative *E. coli* (EAEC). DEC adskiller sig som regel ikke fænotypisk fra andre *E. coli* stammer. Diagnostik af DEC gøres derfor bedst ved påvisning af virulensegenskaber og/eller virulensgener med samtidig eller efterfølgende påvisning af de bakterier, der indeholder dem.

VTEC (STEC, EHEC) har bredt klinisk spektrum – ublodig diarré – hæmorrhagisk colitis - *Shigella*-lignende dysenteri – Hæmolytisk Uræmisk Syndrom (HUS) og Trombotisk Trombocytopenisk Purpura (TTP) – død.

VTEC stammer indeholder verocytotoksin generne *vtx1* og/eller *vtx2*. VTEC stammer indeholder også ofte, men ikke altid genet *eae*. Der er beskrevet over 250 serotyper i forbindelse med human sygdom. Smitter via vand og fødemidler, samt person-person. Inkubationstid 3-5 dage (1-8 dage). HUS tilfælde har ofte et difasisk forløb: Først ublodig diarré i nogle dage, som går over i blodig diarré og efter ca. 1 uge, hvor patienten ellers synes i bedring tilkommer HUS. 2-7 % af inficerede udvikler HUS, som er den hyppigste årsag til akut nyresvigt hos børn < 4 år.

VTEC-infektioner er individuelt anmeldelsespligtige og børn må ikke komme i daginstitutioner og personer i følsomme erhverv må ikke gå i arbejde igen før de har 2 på hinanden følgende negative fæcesundersøgelser for VTEC, jvf Bekendtgørelse om lægers anmeldelse af smitsomme sygdomme m.v. Nr 277 af 14. april 2000, og Vejledning om lægers anmeldelse af sygdom forårsaget af hæmolytisk uræmisk syndrom (HUS) og verocytotoksinproducerende bakterier (VTEC), Nr. 61 af 14. april 2000.

EPEC giver spædbarnsdiarré med feber, kvalme, vandig ublodig diarré. Ret almindelig bakteriel årsag til diarré i Danmark (den hyppigste hos børn under 2 år). EPEC smitter fra person-person og formentlig også via levnedsmidler da de forekommer i tarmkanalen hos

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

mange dyr. For at være en EPEC stamme skal stammen opfylde to kriterier: Stammen skal være en "attaching and effacing *E. coli*" (A/EEC)" hvilket vil sige, at stammen skal indeholde genet *eae*, som koder for virulensfaktoren intimin og stammen skal have en EPEC serotype. Intimin sætter bakterien i stand til at hæfte sig til tarmepitelet og påvirke den underliggende celle. EPEC indeholder tillige andre kun delvist opklarede virulensfaktorer.

A/EEC er en gruppe *E. coli*, som indeholder genet *eae*, som koder for virulensfaktoren intimin, men har andre serotyper end de klassiske EPEC serotyper. En subgruppe af A/EEC er diarréfremkaldende og er associeret med persisterende ublodig diarré (>14 dage) hos både børn og voksne, men subgruppen kan for nuværende ikke nærmere identificeres. Kan ved langvarig diarré forsøges behandlet med antibiotika, men differential diagnostiske årsager til diarréen må overvejes.

ETEC er hyppig årsag til diarré i udviklingslande og er den hyppigste årsag til turistdiarré ved udlandsrejse. ETEC giver vandig koleralignende diarré udløst af et varmostabilt (ST) og/eller et varmelabilt (LT) enterotoksin. LT ligner koleratoksinet.

EIEC kan forårsage *Shigella*-lignende dysenteri. Symptomerne er feber, mavekramper, vandig diarré eller slim med pus og blod. EIEC er en mindre hyppig årsag til rejsediarré. EIEC påvises ved invasionsgenet *ipaH* med PCR. EIEC og *Shigella* spp. (som også har *ipaH*-genet) kan være vanskelige at skelne fra hinanden.

EAEC (påvises ikke rutinemæssigt) kan forårsage vandig diarré, opkastning, dehydrering og evt. abdominalsmerter, feber og blodig afføring. Studier af EAECs association med diarré er ikke entydige, formentlig fordi det drejer sig om en heterogen gruppe. Der er flere eksempler på levnedsmiddelbårne udbrud. Påvises et eller flere af følgende gener *aggR*, *aatA*, og *aaiC* med PCR regnes isolatet for EAEC. Den gyldne standard er påvisning af det særlige aggregative tilhæftningsmønster af EAEC på HEp-2 cellekulturer.

Staphylococcus aureus forårsager levnedsmiddelbårne udbrud, hvor levnedsmidler under tilberedningen er blevet forurenede med en enterotoksinproducerende stamme af *S. aureus* og derefter opbevaret ved høj temperatur således at bakterierne har kunnet formere sig og producere enterotoksin. Enterotoksinet er varmostabilt og kan derfor godt være til stede i maden selvom den er blevet opvarmet igen inden servering. I disse tilfælde vil bakterierne hverken kunne påvises i mad eller afføring.

Klinik: kort inkubationstid (1-6 timer), kort (men svær) sygdomsvarighed (mindre end 12 timer) med diarré og opkastninger.

Udbrud med *S. aureus* er forbundet med fødevarer med højt proteinindhold såsom, skinke, fjerkræ, kartoffel- og æggesalater, samt creme-fyldte kager, hvor disse er kontamineret under tilberedning af tilberederen.

Modtages fæces til diagnostik af *S. aureus* bør den lokale fødevareregion underrettes for at undersøge evt. madrester.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Bacillus cereus forårsager levnedsmiddelbårne udbrud, hvor levnedsmidler under tilberedningen er blevet forurenede med en enterotoksin- eller en emetisk toksin-producerende stamme af *B. cereus* og derefter opbevaret ved høj temperatur således at bakterierne har kunnet formere sig og producere toksin. Det emetiske toksin er varmelabilt og ødelægges således ikke, hvis maden genopvarmes. Enterotoksinet er varmelabilt, men da sporer fra bakterien vil kunne overleve opvarmning til en vis grad, er genopvarmning ikke nogen garanti mod enterotoksinproduktion i tarmen af *B. cereus* fra maden.

Klinik: *Emetisk toksin*: kort inkubationstid (1-6 timer), kort sygdomsvarighed (mindre end 12 timer) domineret af kvalme og opkastninger. Udbrud er associeret med ris som har været kogt og holdt varme i lang tid.

Enterotoksin: Lidt længere inkubationstid (8-16 timer), kort sygdomsvarighed (ca. 24 timer) domineret af diarré og mavekramper. Udbrud er associeret med kød- og grøntsagsretter foruden mælkeprodukter.

Modtages fæces til diagnostik af *B. cereus* bør den lokale fødevareregion underrettes for at undersøge evt. madrester.

Clostridium perfringens er en overset årsag til fødevearebårne infektioner pga. det sædvanligvis korte og benigne sygdomsforløb (især type A). Undersøgelser tyder på, at *C. perfringens* er en årsag til nosokomial diarré og nekrotiserende enterocolit (type C). *C. perfringens* forekommer hyppigt i fæcesprøver men kun de stammer, der producerer enterotoksin (omkring 15-20 % af stammerne) er diarréfremkaldende. Det er kun *C. perfringens* type A enterotoksin, der er associeret til madforgiftning.

Enterotoksinet er varmelabilt, d.v.s. det bliver destrueret ved grundig genopvarmning af mad. I forbindelse med fødevearebåren infektion har man traditionelt accepteret en årsagssammenhæng til levnedsmidlet, såfremt man har fundet bakterien i det mistænkte levnedsmiddel og i tæt vækst hos patienten uden at bekræfte toksinproduktionen.

Klinik: Inkubationstid mellem 8 og 16 timer, da forgiftningen skyldes toksiner som er produceret in vivo i modsætning til toksinerne produceret af *Staphylococcus aureus* og *Bacillus cereus* (emetisk toksin) som er preformede og derfor giver anledning til korte inkubationstider. Almindelige symptomer er diarré og mavekramper. Sygdomsvarighed ca. 24 timer.

C. perfringens udbrud er forbundet med indtagelse af oksekød og fjerkræ samt sovse. Udbrud forekommer især hvis fødevarerne er opbevaret mellem 15°C og 50°C som optimerer for germinering af sporer med toksinproduktion til følge.

Modtages fæces til diagnostik af *C. perfringens* bør den lokale fødevareregion underrettes for at undersøge evt. madrester.

Listeria monocytogenes er ubikvitært forekommende. Sygdom er oftest invasiv (sepsis, meningitis, intrauterin infektion) men levnedsmiddelbårne udbrud af gastroenteritis er beskrevet.

Den infektiøse dosis er formentlig høj og inkubationstiden ½-1 døgn.

Påvises der udbrud med *L. monocytogenes* er der indikation for epidemiologisk udredning i samarbejde med den lokale ELI og Fødevareregion evt. med hjælp fra SSI og Dansk Zoonosecenter.

Candida spp. findes hos 80 % af alle sunde voksne mennesker.

Der er ingen evidens for, at *Candida* forårsager diarré hos i øvrigt raske mennesker.

Diarré forårsaget af *Candida* kan ses hos svækkede patienter, der har fået bredspektret

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

antibiotisk behandling og hos patienter med svær immunsupprimerende sygdom. Hos patienter med formodet *Candida* diarré vil den vokse massivt i tarmen og der vil være myceliate former i fæces. Der er ingen holdepunkter for at *Candida* i tarmen kan forårsage ukarakteristiske almensymptomer.

IDENTIFIKATION

Campylobacter jejuni/coli og øvrige *Campylobacter* spp.

A. *C. jejuni/coli*:

Kan identificeres på makroskopisk morfologi.

I tvivlstilfælde foretages følgende:

- Mikroskopi af fugtigt præparat: Spiralformede livligt bevægelige bakterier.

Eventuelt suppleret med:

- Katalase: Positiv
- Oxidase: Positiv
- MALDI-TOF

Differentiering mellem *C. jejuni* og *C. coli* (ikke nødvendigt rutinemæssigt):

- Hippurat-test (OBS 7 % af *C. jejuni* er falsk negative)
- Species specifik PCR.

B: Non-*jejuni/coli* *Campylobacter* spp.:

Ved ønske om påvisning af andre *Campylobacter* spp. end *C. jejuni/coli*, herunder brintkrævende arter som fx *C. concisus*; diarréfremkaldende *Helicobacter* spp. og *Arcobacter* spp. anbefales supplement med filtermetoden: Udsåning på 5 % blodplade med ekstra gærekstrakt med filter (porestørrelse 0,4-0,8 µm), som fjernes efter ca. ½ times inkubation, hvorefter inkubationen forsætter 2 døgn mikroaerobt (6 % CO₂, 6 % O₂, 3 % H₂ og 85 % N₂) ved 35-37°C. *Arcobacter* spp. vokser desuden aerobt.

Identifikation af non-termofile *Campylobacter* spp.: Kombination af fæno- og genotypiske tests, herunder species specifik PCR.

Bemærkninger:

Tilsætning af H₂ (3 % eller mere) til den mikroaerobe gasblanding, høj luftfugtighed under inkubationen eller brug af substrat med nedsat agarindhold (0,5 %) fremmer sværmningen af *Campylobacter*.

Resistensbestemmelse:

Såfremt resistensbestemmelse ønskes udført anbefales Oxoid discs på Mueller Hinton agar med 5 % defibrineret hesteblood og 20 mg/L β-NAD, McFarland 0,5, inkubation i mikroaerob miljø, 42°C, 1 døgn. Ved aflæsning vinkles pladen bort fra læseren og den største zone aflæses.

Antibiotikum	Disc konc. (µg)	Zone-brydepunkt (mm)*		MIC-brydepunkt (mg/L)*	
		S ≥	R <	S ≤	R >
Ciprofloxacin	5	28	28	0.5	1
Erytromycin	15	25	25	4	4

*EUCAST brydepunkter er tentative for år 2012.

Anvend erytromycin for resistensbestemmelse af macrolider.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Overvågning og reference

Campylobacter isolater sendes ikke rutinemæssigt til SSI, men anbefales ved vand- eller levnedsmiddelbårne udbrud.

Isolater af andre arter end *C. jejuni/coli* kan sendes til identifikation.

Salmonella

Identifikation

- Fra suspekterte H₂S positive kolonier laves subkultur på agar-plade til agglutination (serotypning) og standard identifikation. En svag H₂S-reaktionen vil oftest blive stærkere hvis pladen står ved rumtemperatur et par timer. Bemærk: *S. Typhi* har kun svag H₂S-reaktion, forgærer glukose men danner ikke luft. *S. Paratyphi A* har ingen H₂S-reaktion. Kolonierne er derfor blege på SSI Enterisk Medium og på XLD
- Standard identifikation: MALDITOF, VITEK 2 og Api20E kan sædvanligvis identificere *Salmonella* til genus niveau.
- Ved problemer med identifikation foretages supplerende biokemisk undersøgelse. Som hurtigst kan anvendes pyrrolidonyl peptidase test (*Salmonella* og *Proteus* negativ, andre H₂S-positive tarmbakterier positive).
- Agglutination med *Salmonella* antisera.

Agglutination (serotypning)

Der findes over 2.500 *Salmonella* serotyper. I det følgende gøres der imidlertid kun rede for serotypning af typhoide *Salmonella* samt tre zoonotiske: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* og *S. Dublin* (invasiv).

Da flere *Enterobacteriaceae* (f.eks. *Citrobacter* spp.) har antigener, der kan kryds reagere med de diagnostiske antisera anvendt ved *Salmonella* serotypning er det vigtigt, at denne er forudgået af en identifikation.

Alle reagenser skal have stuetemperatur. På et objektglas eller i petriskål afsættes en dråbe antiserum. Kolonier fra agarplade opslemmes i antiserum til en jævn suspension. Vip glasset/skålen frem og tilbage over en mørk baggrund. Positiv agglutination skal være kraftig og synlig indenfor tidsgrænsen fastsat af producenten (sent aflæste reaktioner kan være falsk positive). Ved hasteundersøgelse kan man forsøge at agglutinere fra et af primærsubstraterne, men alle reaktioner bør bekræftes fra agar-pladekultur.

Der agglutineres først med fælles pool polyvalent A-E.

For at undgå krydsreaktioner anbefales det at benytte faktorsera i videst muligt omfang.

Agglutination med polyvalente pool antisera f.eks. A-E + Vi.

Poly A-E	Vi	Serotype
+	+	<i>S. Typhi</i> eller <i>S. Dublin</i> ¹
+	-	<i>Salmonella</i> spp.

¹Ikke alle *S. Typhi* og *S. Dublin* giver reaktion med antiserum mod Vi (kapselantigenet). Udtrykkes Vi er det ikke altid muligt at agglutinere i O-antiserum.

Agglutination med O:4

O:4	H:i	H:2	H:b	Serotype
+	+	+	-	<i>S. Typhimurium</i>
+	-	+	+	<i>S. Paratyphi B</i> ²

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

+	+	-	-	<i>Salmonella</i> spp. ³
+	-	+	-	
+	-	-	+	

²En zoonotisk variant findes: *S. Paratyphi* B var. Java som er tartrat-positiv.

³Her bør udføres faseinversion med hvilken den H-antigen fase som lader sig udtrykke (som regel 1. fase H-antigen) inhiberes: Tilsæt 100 µl faseinversions-antiserum mod den udtrykte H-antigen fase til 10 ml håndvarm Schwärmagar, der ved henstand stivner. Påsæt kultur i midten af petriskålen (5 cm), som inkuberes ét døgn ved 35-37°C med låget opad. Sværmer kulturen kan man agglutinere den nu udtrykte fase, hvis den ikke sværmer har kulturen kun én fase. Eksempel: *S. Typhi* har kun én H-antigen fase. Til brug for faseinversion af mulig *S. Typhimurium* skal der anvendes faseinversiosantisera SG2, hvis man initialt har agglutineret H:i og SG6, hvis man har agglutineret H:1,2.

Agglutination med O:9 og O:12

O:9 / O:12	H:G ⁴	H:m	H:p	H:q,s,t,p,u	H:d	Serotype
+ / +	+	+	-	-	-	<i>S. Enteritidis</i>
+ / +	+	-	+	+	-	<i>S. Dublin</i> ⁵
+ / +	-	-	-	-	+	<i>S. Typhi</i> ⁵
+ / +	+	+	-	+	-	<i>Salmonella</i> spp. ³
+ / +	+	-	+	+	-	

⁴Reagerer med faktor: f,g; g,m; g,p; g,p,u; g,q; g,s,t; m,t; g,z₅₁; g,z₆₂ og g,z₆₃.

⁵Hvis ingen agglutination er opnået med Vi udføres faseinversion for at afgøre om kulturen har to H-antigen faser, medmindre morfologi og biokemi er i overensstemmelse med *S. Typhi*.

Agglutination med O:2

O:2	H:a	Serotype
+	+	<i>Salmonella Paratyphi</i> A
+	-	<i>Salmonella</i> spp.

Link til White-Kauffmann-Le Minor skema:

<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>

Sørg altid for at have en negativ O-agglutination og en negativ H-agglutination som kontrol for at udelukke uspecifikke fund.

Andre antisera end de nævnte kan benyttes efter behov (se White-Kauffmann-Le Minor skema).

Videresendelse

Alle *Salmonella* isolater sendes til SSI. Der sendes til **overvågning**, hvis serotypen er opnået. Der sendes til **serotypning**, såfremt identifikationen er ufuldstændig. På indsendelsessedlen bemærkes de agglutinationsreaktioner der er foretaget primært.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Shigella

Identifikation

- Standard identifikation, fx VITEK 2 eller API20E. Da *Shigella* ikke kan omsætte så mange kulhydrater skal resultatet vurderes kritisk. Især er skelnen mellem *Shigella* og inaktiv *E. coli* vanskelig.
- Ved problemer med identifikation foretages supplerende biokemisk undersøgelse.
- Alle *Shigella* stammer indeholder *IpaH* genet (ligesom EIEC), hvorfor nogle stammer som ikke er fundet ved primærudsåningen kan identificeres i forbindelse med molekylærbiologisk diagnostik af diarréfremkaldende *E. coli*.
- Agglutination med *Shigella* antisera efter rendyrkning på agar plade.

Agglutination

Alle reagenser skal have stuetemperatur. En dråbe antiserum afsættes på objektglas eller i en tom petriskål. En dråbe saltvand afsættes ved siden af. Kolonier fra agar plade opslemmes i saltvandet til en jævn suspension, herefter sammenrøres med serum til en jævn, ikke for tæt suspension. Glasset/skålen vippes frem og tilbage over en mørk baggrund. De specifikke agglutinationer viser sig inden for de første 10 sek. (eller en tidsgrænse, som er fastsat af producenten). Sent aflæste reaktioner kan være falsk positive.

Ved hasteundersøgelse kan man forsøge at agglutinere fra et af primærsubstraterne, men **alle reaktioner bør bekræftes fra agarpladekultur.**

Der agglutineres med følgende *Shigella* antisera:

Shigella sonnei

Shigella flexneri

Shigella boydii

Shigella dysenteriae

Saltvand (kontrol)

Hvis den biokemiske identifikation er typisk for *Shigella* og agglutinationerne er negative kan det skyldes, at O-antigenet er dækket af en kapsel eller, at det kommercielle anti-sera system er inkomplet. Man vil relativt ofte støde på stammer, som ikke lader sig agglutinere. (Er dette tilfældet eller agglutinerer en kultur i saltvand (er autoagglutination) kan man evt. lave en tæt bakteriesuspension i saltvand som koges i vandbad i 15-30 minutter. Efter afkøling gentages agglutinationen. Er agglutinationen fortsat negativ eller er stammen fortsat autoagglutination, og identifikationen i øvrigt typisk for *Shigella*, kan prøven besvares som: *Shigella* species.

Biokemisk er *S. sonnei* som den eneste *Shigella*-art ornithin positiv.

S. dysenteriae skal mistænkes hvis stammen er mannitol negativ.

Videresendelse

Alle *Shigella* isolater sendes til SSI til overvågning.

Laboratoriesmitte forekommer lettere med *Shigella*-stammer end med de fleste andre tarmpatogene bakterier. Er der risiko for aerosoldannelse (som f.eks. ved agglutination) bør arbejde med levende *Shigella*-kulturer foregå i LAF-bænk.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Yersinia enterocolitica

Identifikation

- Standard identifikation, fx VITEK 2 eller MALDITOF
- Halvflydende 35°C og 22°C
- Ved problemer med identifikation foretages supplerende biokemisk undersøgelse med relevante reaktioner. Se i øvrigt identifikationsskema fra DSKMs referencegruppe.
- Evt. agglutination med *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 og O:9 antisera.

Aflæsning

Y. enterocolitica er **ubevægelig** ved 35°C, men bevægelig ved 22°C (sammenlign de to glas, forskellen kan være beskeden). Inkubation i flere dage kan være nødvendig). Den altdominerende type af *Y. enterocolitica* i Danmark er serotype O:3, biotype 4 (trehalose og nitrat positiv, salicin/æskulin, indol og xylose-negativ).

Biotype	Salicin/Eskulin	Indol	Xylose	Trehalose	Nitrat
1A	+	+	+	+	+
1B	-	+	+	+	+
2	-	(+)*	+	+	+
3	-	-	+	+	+
4	-	-	-	+	+
5	-	-	d	-	-

*(+): svagt pos. reaktion. d: 11-89% af stammerne positive

Apatogene stammer tilhører biotype 1A (positiv i alle de nævnte biotypereaktioner) og er oftest tillige D-arabitol positive og pyrazinamidase positive. Patogene stammer er D-arabitol-negative.

I Danmark sondres ikke mellem biotyperne 1B og 2. Fra SSI referencelaboratorium besvares således alle 1A som 1 og alle 1B som 2.

Videresendelse:

Isolater sendes til SSI til overvågning.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Vibrio/Aeromonas/Plesiomonas

Identifikation

- Standard identifikation, fx MALDITOF, VITEK 2 eller API20E, evt. med supplerende biokemiske undersøgelser.

Artsbestemmelse af *Aeromonas* kan være vanskelig pga. stor biodiversitet og har ikke kliniske konsekvenser. Kan evt. besvares som *Aeromonas* species, hvis den primære identifikation ikke er entydig.

Ved specifik mistanke om *Vibrio*-infektion kan sensitiviteten af undersøgelsen øges ved primært at så ud i peptonvand og efter ca. 5 timers inkubation ved 35- 37°C tilså en TCBS-agarplade sekundært. *V. cholerae* kolonier er flade og gule på dette substrat.

Mange *Vibrio*-arter (i modsætning til *Aeromonas* og *Plesiomonas*) vokser kun med salt til stede i mediet. Lidt krystallinsk salt eller ca. 1 ml 6 % saltbouillon (slutkonc. i mediet 1- 4 %) tilsættes ikke- saltholdige medier (indol, VP, nitrat) ved mistanke om *Vibrio*. Disse checkes altid for vækst inden reagens tilsættes.

Ved mikroskopi er *Vibrio* polært bevægelige og komma-formede.

Ved kolera med risvandslignende diarré kan diagnosen stilles med noget nær 100 % sikkerhed ved direkte mikroskopi af fæces i fugtigt præparat: Myriader af kommaformede, livligt bevægelige bakterier, som mister bevægeligheden og agglutinerer, når en dråbe diagnostisk antiserum (anti-O:1 eller anti-O:139) tilsættes ved kanten af dækglasset og derved suges ind i præparatet.

Vibrio cholerae identificeres biokemisk og ved agglutination.

V. cholerae serotype O1 biotypes:

Klassisk biotype er: non-hæmolytisk, gelatine negativ, polymyxinfølsom.

El Tor biotype er: hæmolytisk, gelatine positiv og polymyxin resistent.

Serotype O139 er altid biotype El Tor, ligesom de fleste andre non-O1 serotyper.

Agglutination

Alle reagenser skal have stuetemperatur. En dråbe antiserum afsættes på et objektglas.

Kolonier opslemmes i serum til en jævn suspension. Glasset vippes frem og tilbage i 1 min over en mørk baggrund. Der agglutineres med sera i følgende orden:

Vibrio cholerae antiserum poly

Vibrio cholerae antiserum Ogawa

Vibrio cholerae antiserum Inaba

Vibrio cholerae antiserum O139

Samtidigt vippes saltvandsopslemning til kontrol

Videresendelse

Alle *Vibrio* isolater bør indsendes til Tarmbakteriologisk laboratorium, Statens Serum Institut, der også udfører bestemmelse af *Vibrio cholerae* enterotoksin.

Aeromonas arter modtages til genotypisk artsbestemmelse.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Clostridium difficile

A. PCR

Påvisning af toksin-gener: Toksin B (*tcdB*) evt. også toksin A (*tcdA*) og optimalt i kombination med påvisning af binære toksin (*cdtA/B*) og undersøgelse for mutationer i det negativt regulerende gen *tcdC*.

Kan udføres direkte på fæces som ét-trins procedure eller på fremdyrkede kolonier i forbindelse med to-trins procedure.

B. To-trins procedurer

- Dyrkning på CCFA-agar eller chromID *C. difficile* agar, evt. BHIA-plade (eventuel forbehandling før udsåning: Alkohol eller kogning) efterfulgt af toksinundersøgelse af fremdyrkede kolonier.
- Glutamate dehydrogenase (GDH) test efterfulgt af toksinundersøgelse.

EIA for toksin A eller toksin A og B kan ikke anbefales som "alene test" grundet suboptimal sensitivitet.

Påvisning af toksin A alene anbefales ikke, da A⁻/B⁺ stammer ikke detekteres.

Identifikation

CCFA: *C. difficile* vokser som store, gule, flade havregrynslignende kolonier med uregelmæssige kanter med karakteristisk lugt (hestestald) på CCFA-plader efter 2 døgn anaerob inkubation. Gulfarvningen af kolonierne (fruktoseforgæring) kan strække sig ud i det omgivende medium. ChromID *C. difficile* agar: *C. difficile* vokser som grå til sorte kolonier efter 1 døgn anaerob inkubation. På BHIA-plader er *C. difficile* hvid, *C. innocuum* er grøn.

Kan suppleres med:

Mikroskopi: Gram-positive stave med ovale subterminale sporer

UV-belysning: gul/grøn fluorescens af *C. difficile*

Prolin aminopeptidase: *C. difficile* positiv, de fleste andre clostridier inkl. alle differentialdiagnostisk relevante, dvs. især *C. innocuum* er negative

Glutamate dehydrogenase (GDH) PCR

Kommentar

Undersøgelse for moxifloxacin resistens kan anvendes som grov markør for CD027, men kræver konfirmation ved toksinbestemmelse og PCR-ribotypning.

Videresendelse

Clostridium difficile isolater sendes til SSI ved

1. Dyrkningsbaseret diagnostik: Moxifloxacin-R
2. PCR-baseret diagnostik: *tcdA*, *tcdB* og *cdtA/B* positive som samtidig er negative for *tcdC* delta 117 mutationen (CD027 markør).
3. Svær klinik
4. Mistanke om udbrud

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Diarréfremkaldende *E. coli*

Verocytotoksinproducerende *E. COLI* (VTEC)

Identifikation

- Diagnosen stilles ved påvisning af verocytotoksin-generne *vtx1* og/eller *vtx2* ved PCR eller kolonihybridisering, efterfulgt af objektglas agglutination (OK-agglutination) og evt. tube agglutination (O-agglutination) af den rendyrkede VTEC koloni med *E. coli* antisera mod de hyppigst forekommende VTEC-typer.
- Påvisning af verocytotoksin på cellekultur (kun på SSI) er den gyldne standard.

Agglutination

Objektglas agglutination med OK sera:

Agglutination med serum pools af levende kultur (OK-typning) foretages direkte fra kolonier. En dråbe pool antiserum afsættes på objektglas. Suspekter kolonier opslemmes i serum til en jævn suspension. 10 forskellige kolonier kan blandes i 1 dråbe serum. Objektglasset vippes frem og tilbage i max. **10 sek.** over en mørk baggrund. Ved positiv agglutination i pool testes efterfølgende i OK enkelt sera.

Eventuelt kan tube agglutination med O sera foretages på kogte kulturer:

Levende kulturer indeholder både O og K-antigener, som kan kryds reagere. O-reaktioner kan kun med sikkerhed bedømmes ved agglutination af en kogt kultur i rene O-antisera:

Med vatpind laves en opslemning fra agarpladen i 1 ml filtreret oksebouillon (ca. 2,0 McFarland). Opslemningen koges i widalglas af glasmateriale ved 95°C i varmeblok i 1 time.

I widalglas af glasmateriale tilsættes 200 µl af det relevante specifikke enkelt O antiserum og 200 µl filtreret oksebouillon af kogt kultur. Kontrolglas for evt. autoagglutination: Widalglas tilsættes 200 µl 0,9 % saltvand og 200 µl filtreret oksebouillon med kogt kultur. Begge glas lukkes med plastprop og står i varmeblok ved 52°C natten over.

Tube agglutination aflæses ved undersøgelse for agglutination ved at holde widalglas mod mørk baggrund, eller op imod lyset fra en arbejdslampe, alternativt kan et hulspejl anvendes.

Videresendelse

Alle VTEC isolater bør sendes til konfirmation/virulenskarakterisering på SSI.

Enteropatoogene *E. coli* (spædbarnspatoogene *E. coli*, EPEC)

Identifikation

Påvisning af gen for intimin (*eae*) i en *E. coli* og positiv agglutination i OK-sera og evt. i O-sera fra en af de klassiske EPEC serogrupper.

Agglutination

Objektglas agglutination med serum pools (OK-typning) foretages direkte fra kolonier som beskrevet under VTEC. Dog testes kolonierne i 3 serum pools:

Pool 1 indeholder O26; O103; O111; O145; O157.

Pool 2 indeholder O55; O119; O125ac; O127; O128ab.

Pool 3 indeholder O86; O114; O121; O126; O142.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Tube agglutination med O sera kan evt. foretages på kogte kulturer, se VTEC.

Videresendelse

Alle EPEC isolater sendes til konfirmation/virulenskarakterisering på SSI.

Enterotoksinproducerende *E. coli* (ETEC)

Identifikation

ETEC producerer et varmelabilt toksin (LT) og/eller et varmestabilt toksin (ST). Diagnosen stilles ved påvisning af gener der koder for STa og/eller STb og/eller LT ved PCR eller kolonihybridisering. I de klinisk mikrobiologiske laboratorier vil man normalt ikke forsøge at bestemme O-gruppen på isolatet.

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

Identifikation

Diagnosen stilles ved påvisning af invasionsgenet *ipaH* ved PCR eller kolonihybridisering samt speciesidentifikation til *E. coli* (og ikke *Shigella*, som også har *ipaH*). Standard identifikation, fx VITEK 2 eller API20E. Da hverken *Shigella* eller EIEC kan omsætte særlig mange kulhydrater skal resultatet vurderes kritisk. Ved problemer med identifikation foretages supplerende biokemisk undersøgelse. I de klinisk mikrobiologiske laboratorier vil man normalt ikke forsøge at bestemme O-gruppen på isolatet.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Staphylococcus aureus

Identifikation

- Vækst på 5 % blodagar (evt. med antibiotika rettet mod Gram negative bakterier), 6% NaCl-plade eller Na-Azidplade.
- Standard identifikation.

Videresendelse

Staphylococcus aureus isolater bør sendes til SSI til påvisning af enterotoksin A for at konfirmere den kausale sammenhæng mellem fund og sygdom.

Bacillus cereus

Identifikation

- Vækst på 5 % blod-plade (evt. med antibiotika rettet mod gramnegative bakterier). Ofte ru og udflydende kolonier. EYA (egg yolk agar): *B. cereus* gruppen er lecithinase positiv.
- Mikroskopi: Gram-positive bevægelige stave med ellipsoide subterminale til centrale sporer.

Videresendelse

B. cereus isolater bør sendes til SSI til påvisning af non-hæmolytisk enterotoksin, NHE; hæmolytisk enterotoksin, HBL; cytotoxin K og cereulid (emetisk toksin) for at konfirmere den kausale sammenhæng mellem fund og sygdom.

Clostridium perfringens

Identifikation

- Vækst på 5 % blodagarplade (store, fede, hvide kolonier, ofte med hæmolyse). EYA (lecithinase +, lipase -).
- Mikroskopi: Sporer ovale, subterminale (men ses stort set aldrig i kulturer eller histologiske præparater).
- Standard identifikation

Videresendelse

C. perfringens isolater bør sendes til SSI til påvisning af enterotoksin (CPEnt) for at konfirmere den kausale sammenhæng mellem fund og sygdom.

Listeria monocytogenes

Identifikation

- Vækst på PALCAM-plade eller med typisk koloniuudseende i cefalosporinzone på 5 % blodagar.
- Standard identifikation

Videresendelse

L. monocytogenes isolater sendes til SSI til overvågning.

Candida

Identifikation

- Vækst på Sabouraud plade eller Chromagar inkuberet aerobt i 2 døgn ved 35-37°C.
- Myceliate former i fæces ved direkte mikroskopi.

Candida species identificeres i henhold til lokal laboratorieinstruks.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

OVERVÅGNING OG REFERENCE

Overvågning og referencefunktion for tarmpatogene bakterier varetages af Tarmbakteriologisk laboratorium, SSI.

Indberetning

For infektioner med tarmpatogene bakterier skal ugentlig indberetning til SSI ske for hver episode (én type tarmpatogen bakterie isoleret fra én patient) og omfatte:

- Arten af den tarmpatogene bakterie (både almindeligt kendte tarmpatogene bakterier så som *Salmonella species*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella species*, *Vibrio cholerae*, diarréfremkaldende *E. coli*, *Clostridium difficile* og andre bakterier, som af den diagnostiske afdeling skønnes at kunne have forårsaget tarmsygdom)
- Patientens CPR-nummer
- Prøvens art
- Dato for modtagelse i det diagnostiske laboratorium
- Rekvirent
- Udlandsrejse med hjemkomst senest en uge før sygdomsdebut (såfremt oplysningerne er tilgængelige for det diagnostiske laboratorium)

På baggrund af disse data kan en ugentlig opdateret oversigt af bakterielle tarminfektioner på lands- og regions-niveau ses på Tarminfektionsmonitor (TiM) på internetadressen: <http://www.tim.dk>

Ifølge BEK nr. 277 af 14/04/2000, Bekendtgørelse om lægers anmeldelse af smitsomme sygdomme m.v. §§ 11 - 13 skal laboratorier, der diagnosticerer listeriose kvartalsvis indberette undersøgelsesresultaterne til SSI.

Af hensyn til udbrudsdetektion og smitteudredning anbefales dog løbende indberetning.

Indsendelse af bakterie isolater

Af nedenstående tabel fremgår det, hvilke tarmpatogene bakterier, der bør sendes til SSI for videre typebestemmelse i forbindelse med den løbende overvågning af vand- eller fødevarebårne udbrud.

SSI Blanket 9 benyttes altid.

De specifikke typningsopgaver på SSI er fordelt mellem Tarmbakteriologisk laboratorium og afsnit for Fødevarebårne bakterier og typning (<http://www.ssi.dk/Smitteberedskab/Referencelaboratorier/Bakterier>). De mest benyttede metoder inden for molekylær typning er PFGE og MLVA. På baggrund af typningsresultaterne vurderer SSI om en udbrudseftersporing skal iværksættes med tilbagemelding til den indsendende KMA og/eller embedslæge.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Overvågning (bør indsendes):

	Typning	Blanket 9
Alle <i>Salmonella</i> spp.^a	Serotypning og molekylær typning	<i>Overvågning: Indsendt stamme</i>
<i>Clostridium difficile</i> 1. Moxifloxacin-R 2. Svær klinik 3. Udbrudsmistanke 4. Molekylærbiologisk metode: Positiv for generne kodende for toksin A, toksin B og binært toksin med undtagelse af patientprøver, hvori der er påvist CD027 markør ($\Delta 117$ punktmutation i <i>tcdC</i>)	Genotypisk toksin profilering: (Toksine A, Toksin B og binært toksin + 18bp deletion) og PCR ribotypning	eller <i>Salmonella, Shigella, Yersinia: Serotypning</i>
Alle verocytotoksin producerende <i>E. coli</i> (VTEC)	Virulotypning og O:H serotypning samt molekylær typning	
Alle enteropatoogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Verocelleassay, virulotypning og O:H serotypning	
Alle <i>Listeria monocytogenes</i>	Molekylær typning herunder serogruppering	
Alle <i>Shigella</i> spp.	O-gruppering af subgrupper (<i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> og <i>S. sonnei</i>)	
Alle <i>Yersinia enterocolitica</i>	O-gruppering og biotypning (biotype 1-5)	
Alle <i>Vibrio</i> spp.	O-gruppering (<i>V. cholerae</i>) samt genotypisk artsbestemmelse (<i>V. cholerae</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> og <i>V. parahæmolyticus</i>) inkl. <i>cholerae</i> enterotoksin.	
Ved mistanke om vand- eller fødevarerbåret udbrud med f.eks. <i>Campylobacter</i> eller diarréfremkaldende <i>E. coli</i> bedes et udvalg af isolater sendes til videre typebestemmelse på SSI		<i>Andet: Mistanke om udbrud</i>

^a De stammer, som enten ikke er serotypet eller kun delvis serotypet på den lokale KMA, indsendes med kryds i serotypning (*Salmonella*) på blanket 9.

Nedenstående tarmpatogene bakterier kan sendes til SSI for videre typebestemmelse. Det er den enkelte KMA, der vurderer, hvilke isolater, der skal indsendes og identificeres. Indsendelsen kan være begrundet i: A. Mistanke om et dansk erhvervet vand- eller fødevarerbåret, eller nosokomielt udbrud, B. Konfirmering af den kausale sammenhæng mellem fund og sygdom eller C. Kvalitetsmonitorering af metodik til udvalgte tarmpatogene bakterier.

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Reference (kan indsendes):

	Typning	Blanket 9
<i>Campylobacter</i> spp.^a	Genotypisk artsbestemmelse (<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. upsaliensis</i> og <i>C. lari</i>)	<i>Identifikation</i>
<i>Bacillus cereus</i>	Genotypisk toksin profilering: enterotoksin NHE og HBL, cytotoxin K og cereulid (emetisk toksin)	<i>Identifikation</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Genotypisk analyse: <i>S. aureus</i> enterotoksin A	<i>Identifikation</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	Genotypisk analyse: <i>C. perfringens</i> enterotoksin (CPEnt)	<i>Identifikation</i>
<i>Aeromonas</i> spp.	Genotypisk artsbestemmelse (<i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. veronii biovar sobria</i>)	<i>Identifikation</i>
<i>Plesiomonas Shigelloides</i>	biotypning	<i>Identifikation</i>
Øvrige diarréfremkaldende <i>E. coli</i>: Intimin-producerende <i>E. coli</i> (<i>eae</i> positive non-EPEC^b), EIEC, ETEC og EAggEC	Genotypisk virulenskarakterisering og O:H serotypning	<i>Virulenskarakterisering af diarréfremkaldende <i>E. coli</i></i>

^aTre KMA afdelinger (Ålborg, Odense og Slagelse) sender månedligt *Campylobacter* isolater til DANMAP resistensovervågning.

^bEPEC er defineret ud fra forekomst af genet for intimin (*eae*) og en EPEC O-gruppe.

Kontakt:

Det Nationale Referencelaboratorium for Enteropatogene bakterier
Afdeling for Mikrobiologisk Diagnostik
Katharina E. P. Olsen
Tlf.: 3268 8423
Fax: 3268 8130
E-mail: keo@ssi.dk

Afdeling for Mikrobiologisk Overvågning og Forskning
Fødevarebårne bakterier og typning
Eva Møller Nielsen
Tlf.: 3268 3644
Fax: 3268 8238
E-mail: emn@ssi.dk

Afdeling for Mikrobiologisk Overvågning og Forskning
WHO Collaborating Centre for Reference and Research
on Escherichia and Klebsiella
Flemming Scheutz
Tlf.: 3268 3334
Fax.: 3268 3096
E-mail: fsc@ssi.dk

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

BIOSIKRING

Jævnfør ”Bekendtgørelse om sikring af visse biologiske stoffer, fremføringsmidler og relateret materiale” af 15. oktober 2009 er besiddelse, fremstilling, anvendelse og opbevaring af stoffer eller komponenter med dobbelt anvendelighed, d.v.s., at de kan anvendes i forbindelse med fremstilling af biologiske våben, kun lovlig med tilladelse fra Center for biosikring og beredskab, CBB (www.biosikring.dk). Det medfører, at f.eks. hospitalslaboratorier, forskningsinstitutioner m.m. skal søge om tilladelse til at arbejde med visse biologisk stoffer og andet materiale. CBB er den nationale myndighed på området og er jf. § 21 pålagt at kontrollere, at biosikringsloven overholdes.

På listen over biologiske stoffer, fremføringsmidler og relateret materiale falder nedenstående ind under Tarmbakteriologien – se <http://www.biosikring.dk/132> for komplet liste.

I. Bakterier, hvad enten de er naturlige, forstærkede eller modificerede, enten i form af isolerede levende kulturer eller i form af materiale, der omfatter levende materiale, der forsætligt er inokuleret eller kontamineret med sådanne kulturer:

Clostridium botulinum

Salmonella Typhi

Shigella dysenteriae

Vibrio cholerae

Epsilon-toksinproducerende typer af *Clostridium perfringens*

Enterohaemorrhagisk *E. coli*, serotype O157 og andre verocytotoksinproducerende serotyper

II. Toksiner og underenheder af disse:

Botulinumtoksiner

Clostridium perfringens-toksiner

Shigatoksin

Staphylococcus aureus-toksiner

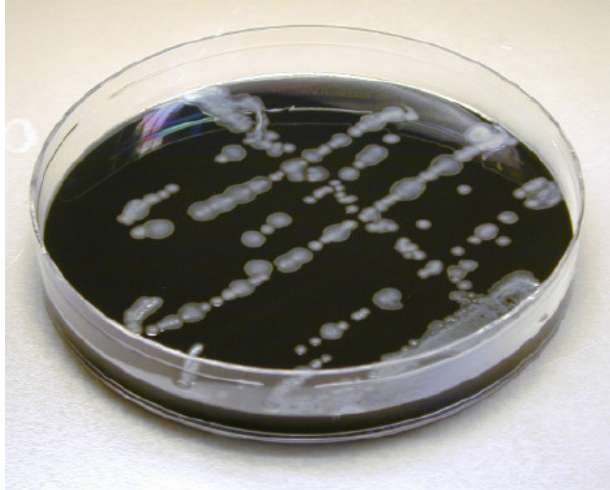
Verocytotoksin og shiga-lignende proteiner

Koleratoksin

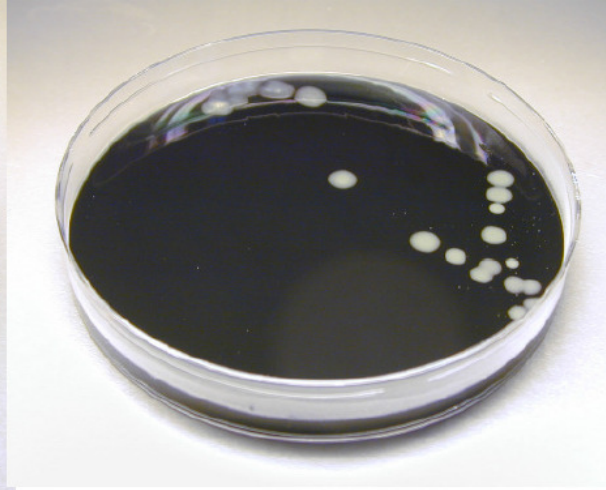
Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Campylobacter jejuni på mCCDA

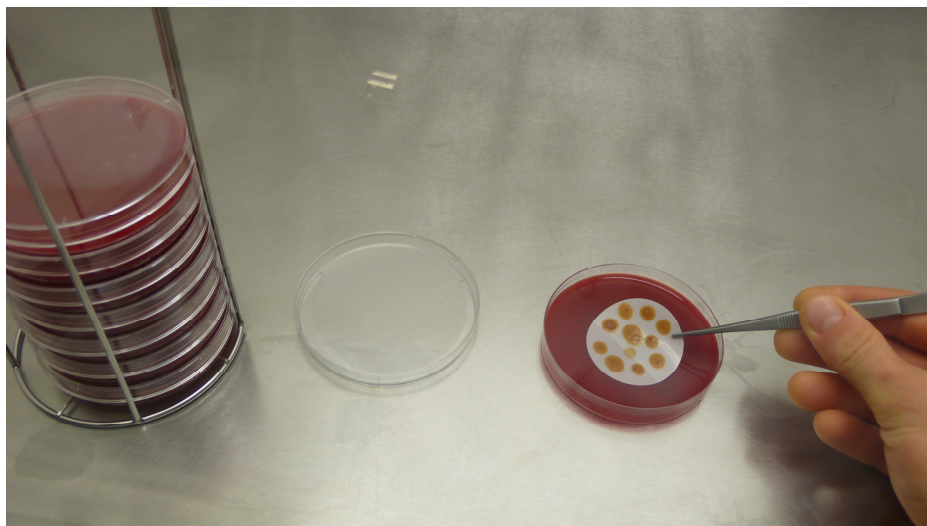


Kolonimorfologi A



Kolonimorfologi B

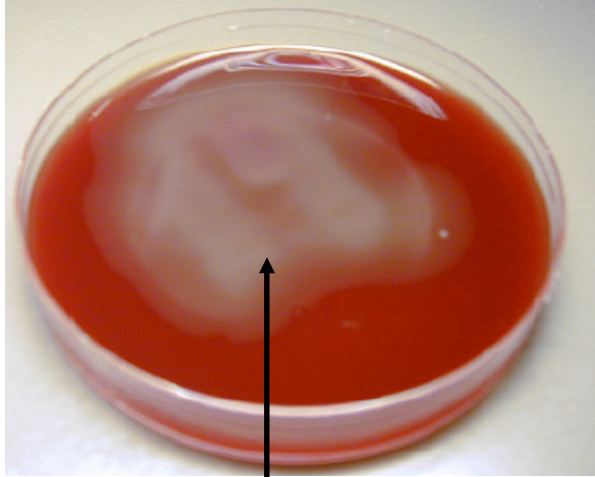
Filtermetoden: Filter med fæces suspension på 5 % blodplade med ekstra gærekstrakt



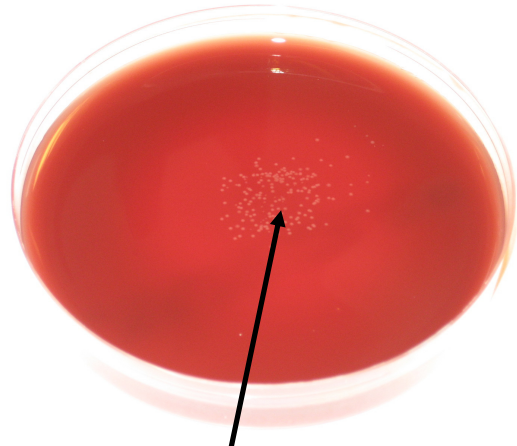
Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

Filtermetoden: *Campylobacter* på 5 % blodplade med ekstra gærekstrakt



Campylobacter jejuni

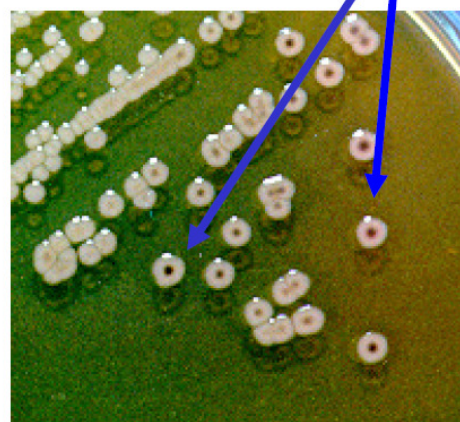


Campylobacter concisus

Salmonella på SSI Enterisk Medium



Salmonella Enteritidis

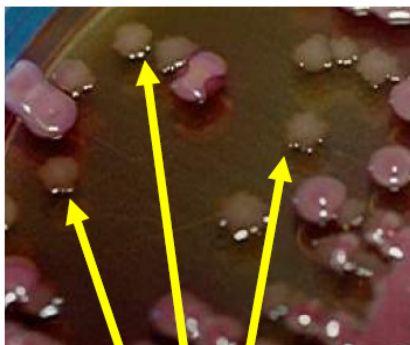


Salmonella Typhi

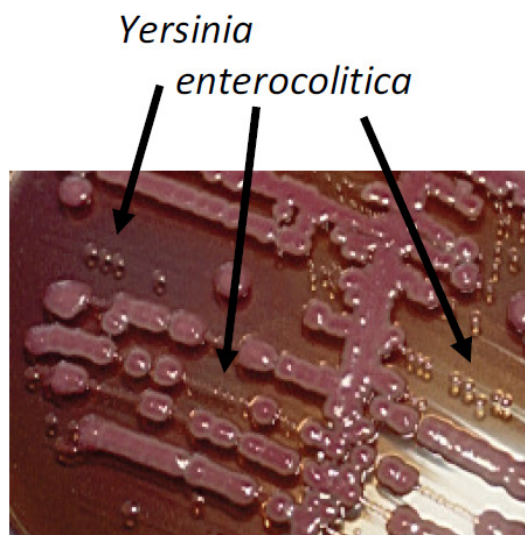
Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

***Shigella sonnei* og *Yersinia* på SSI Enterisk Medium**

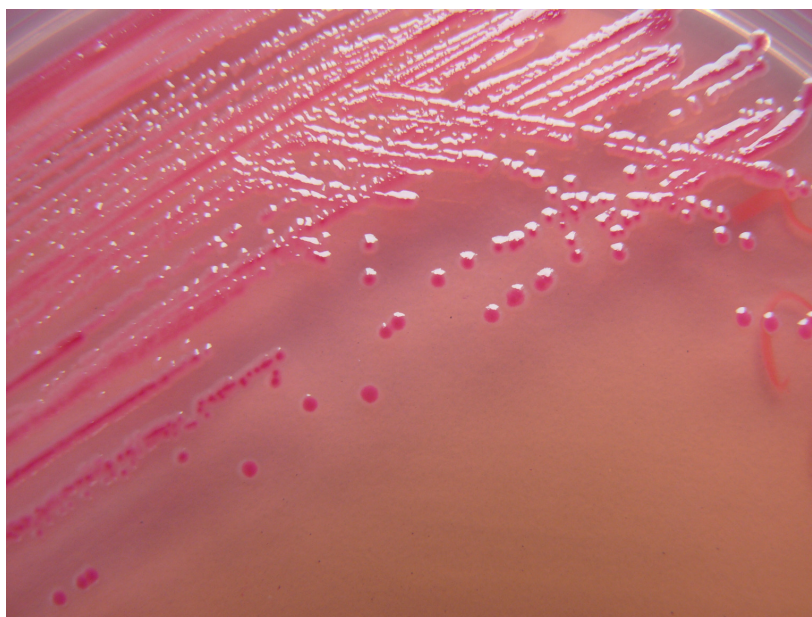


Shigella sonnei



*Yersinia
enterocolitica*

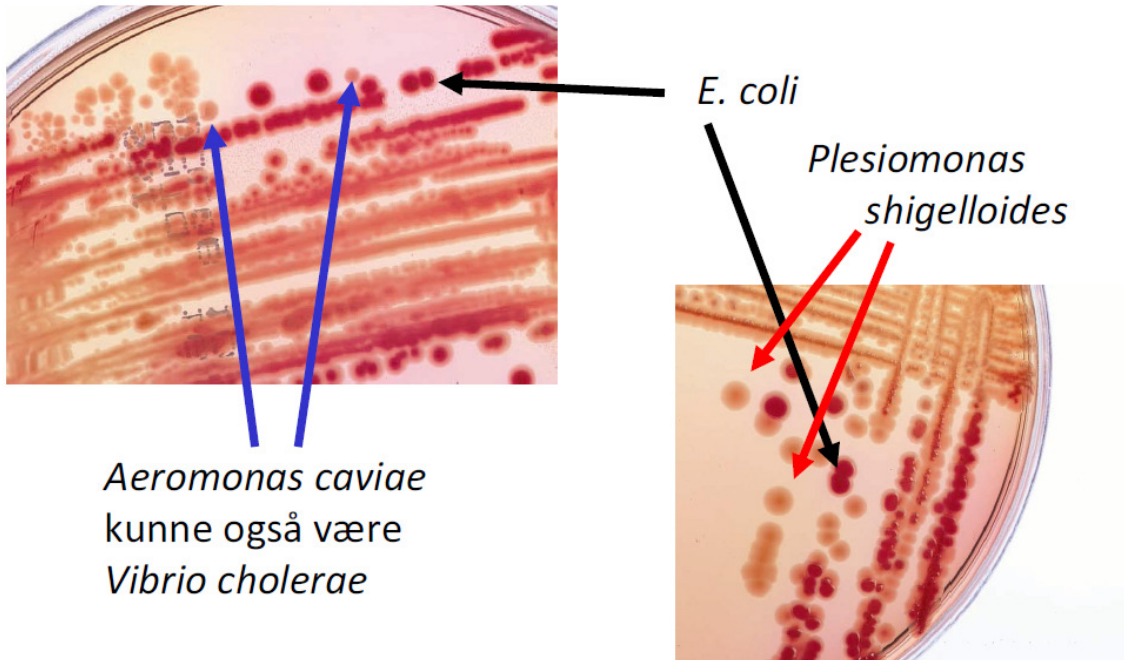
***Yersinia enterocolitica* på CIN-plade**



Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

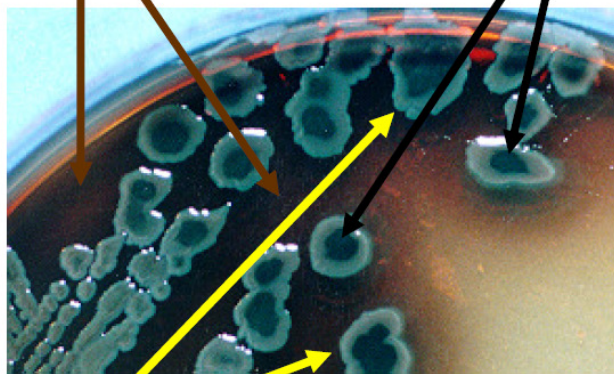
Vibrioner på SSI Enterisk Medium



Proteus på SSI Enterisk Medium

Phenylalanindeaminasereaktion

H₂S-reaktion



Sværm hæmmet

Anbefalinger udarbejdet af DSKMs arbejdsgruppe for tarmbakteriologi.

Jørgen Engberg, Hanne Marie Holt, Lars Lemming, Anne Lester, Bente Olesen og Katharina E. P. Olsen

***Clostridium difficile* på ChromID C. difficile agar**

