

# Påvisning af diaré-fremkaldende *Escherichia coli*

Brug af molekylærbiologisk metode giver højere diagnostisk gevinst



Artiklen er skrevet på baggrund af en eksamensopgave i november 2009 på Den Sundhedsfaglige Diplomuddannelse, Professionshøjskolen Metropol. Modul: Bio-medicin og bioanalytisk fortolkning med fokus på klinisk mikrobiologi og molekylærbiologi.

En opgørelse fra 1. kvartal 2008 lavet af overlæge Jørgen Engberg, tidligere afdelingslæge på Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Hvidovre Hospital, nu ansat på Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Slagelse Sygehus, viser, at serologiske metoder til påvisning af diaré-fremkaldende *Escherichia coli* (DEC) ikke er sensitive nok i forhold til molekylærbiologiske metoder.

I 2006 oplyste Statens Serum Instituts smitteberedskab, at diagnostik af DEC bør omfatte moderne molekylærbiologiske metoder, men at disse metoder kun i ringe grad var implementeret i danske laboratorier.

En undersøgelse i forekomsten af Verotoxin-producerende *Escherichia coli* (VTEC) viste, at i otte amter med ca. 2,8 millioner indbyggere, hvor der ikke blev anvendt en molekylærbiologisk metode, påviste man VTEC i ca. 0,7 tilfælde pr. 100.000 indbyggere. I de resterende 7 amter med ca. 2,7 millioner indbyggere, hvor en molekylærbiologisk metode blev anvendt, påviste man VTEC i ca. 4,8 tilfælde pr. 100.000 indbyggere. (1)

Det er endnu ikke alle danske laboratorier, der anvender en molekylærbiologisk metode til påvisning af DEC. I denne artikel vil jeg ud fra andre publikationer og artikler belyse, hvordan anvendelsen af en molekylærbiologisk metode til påvisning af DEC vil give en højere diagnostisk gevinst.

Verotoxin-producerende *Escherichia coli* (VTEC) omtales i engelsksproget litteratur som STEC. I denne artikel anvendes betegnelsen VTEC. Ligeledes omtales Verotoxiner som Shiga toxiner i engelsksproget litteratur, her anvendes Verotoxiner.



Af bioanalytikerunderviser //  
**Anne Bonde Jensen**  
Klinisk Mikrobiologisk Afdeling  
Slagelse Sygehus

Vejleder: **Kaj Nielsen, lektor, cand.scient.**  
Professionshøjskolen Metropol

## CDC - ANBEFALINGER TIL IDENTIFIKATION AF VTEC

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) har den 16. oktober 2009 udgivet Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), der omhandler anbefalinger til diagnostik af VTEC i de kliniske laboratorier.

Hurtig og præcis identifikation af VTEC er afgørende for patienten, idet behandling tidligt i infektionsforløbet nedsætter risikoen for komplikationer, fx i form af nyreskade.

CDC anbefaler, at alle fæcesprøver fra patienter med akut samfundserhvervet diaré (fx til undersøgelse for *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* og *Campylobacter spp.*) også undersøges for O157 VTEC på selektive agarmedier. Samtidig skal der også analyseres for ikke-O157 VTEC med en test, der påviser Verotoxiner, eller gener, der koder for Verotoxinerne. Alle O157 VTEC-stammer skal ydermere konfirmeres med en molekylærbiologisk metode. (3)

## KORREKT PRØVEMATERIALE GIVER KORREKTE SVAR

CDC anbefaler, at når man skal undersøge for VTEC, skal prøvematerialet være korrekt indsamlet. Det betyder, at afføringen skal indsamles tidligt i sygdomsforløbet, da verotoksingenerne ellers kan gå tabt pga. bakterier. Ved meget specifikke undersøgelseskriterier overses infektioner (fx hvis man kun tester for VTEC, hvis der ses synligt blod).

I fæces er mængden af frie verotoksingener lav, ved immunoassay anbefales det at bruge fæces opformeret i bouillon eller tage kolonier fra det primære isolationsmedie og ikke teste direkte fra fæces.

Rektale podninger er ikke optimale, når man skal undersøge for VTEC, idet de sjældent indeholder tilstrækkeligt afføring. Hvis de alligevel bruges, anbefales det, at man opformerer i bouillon.

Derudover anbefales det, at man altid følger producenternes indlægsesedler, når man anvender en given metode. (3)

## SEROLOGISKE KONTRA MOLEKYLÆRBIOLOGISKE METODER

Ifølge overlæge Jørgen Engberg er serotypning alene en alt for usikker metode til påvisning af DEC. En undersøgelse viste, at man efter implementeringen af en molekylærbiologisk metode på Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Hvidovre Hospital, fandt ca. 7,9 % flere DEC end ved serologisk metode alene.

Ud af 752 patientprøver fandt man kun 0,5 % DEC ved brug af en serologisk metode, ydermere var disse 0,5 % kun af typen EPEC. Ved den molekylærbiologiske metode fandt man 8,4 % DEC ud af de 752 patientprøver, herunder både VTEC, EPEC, A/EEC og EIEC. Ved brug af den molekylærbiologiske metode

**TABEL 1**  
VIRULENSGENER HOS DEC OG *SHIGELLA SPP.*

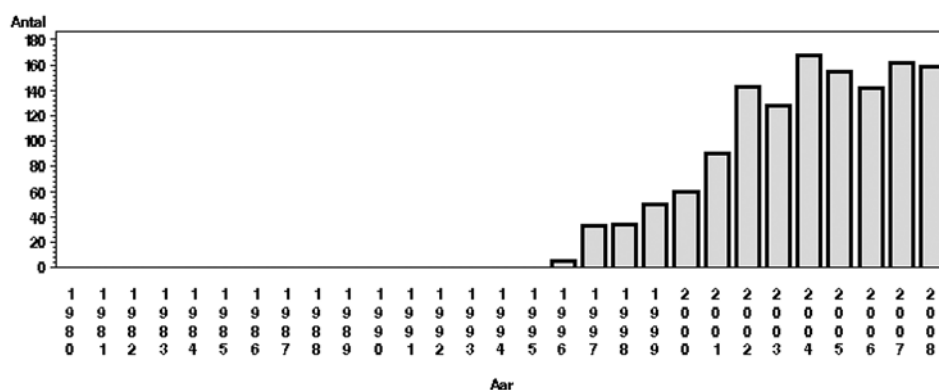
	Vtx1	Vtx2	eae	ST (ST1a eller ST1b og ST2)	LT (LT1 eller LT2)	ipaH
VTEC <sup>a</sup>	X	X	X			
EPEC <sup>b</sup>			X			
A/EEC <sup>b</sup>			X			
ETEC				X	X	
EIEC <sup>c</sup>						X
<i>Shigella spp.</i> <sup>c</sup>						X

<sup>a</sup> Hos VTEC og ETEC behøver alle virulensgener ikke at være til stede i bakterien samtidig.

<sup>b</sup> For at skelne EPEC og A/EEC udføres agglutination med både OK og O antisera.

<sup>c</sup> Der udføres fænotypisk karakterisering af isolater positive for *ipaH* for at skelne mellem EIEC og *Shigella spp.*

Antal registrerede patienter 1996–2008  
Ecoli VTEC



*eaeA*, *ST1b*, *LT1*, *ipaH* og *aggR*) og 1 intern kontrol. Denne metode kan detektere fem patogene DEC og *Shigella spp.* Metoden kaldes for "Octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis", en fluorescensbaseret metode til DNA-detektion, hvor PCR-produkterne separeres ved kapillær elektroforese.

Hver forwardprimer mærkes med et eller flere fluorochromer, der fluorescerer ved forskellige bølgelængder. Indeholder prøven et eller flere gener, som primeren/primerne kan sættes sig fast på, vil der ved PCR-reaktionen dannes DNA-fragmenter af forskellig størrelse. Ved hjælp af ABI prism 310 (Genetic analyser), der anvender laser-induceret fluorescens og multicolour CCD-detection, kan DNA fragmenterne detekteres ud fra størrelse og farve. Via et softwareprogram kan de amplificerede virulensgener aflæses som toppe i et elektroferogram. (6), (9).

Multiplex PCR-metoden har den fordel, at den er tidsbesparende, idet man kun behøver én PCR-kørsel for at analysere for alle relevante DEC-typer.

I den undersøgelse, som er baggrunden for Brandal L. T. et al's artikel, blev 110 bakteriestammer undersøgt, heraf 30 EHEC, 20 EPEC, 19 EIEC, 12 ETEC og 29 *Shigella spp.* (11 *S. dysenteriae*, 8 *S. boydii*, 5 *S. flexneri* og 5 *S. sonnei*). Isolaterne var blevet indsamlet i perioden 1985-2004 fra patienter med diaré.

Alle isolater var tidligere blevet fænotypisk bestemt, og alle EHEC og EIEC samt nogle af EPEC, blev ydermere analyseret ved 2 forskellige molekylærbiologiske metoder, alt efter hvilke gener man ville påvise.

## RESULTATER AF UNDERSØGELSEN

Resultaterne af Brandal L. T. et al's undersøgelse viste, at selv om der findes mange varianter inden for samme gener, så fandt man ved octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis, ved hjælp af de udvalgte primere, de vigtigste varianter af generne – dem, der forårsager diaré hos mennesker.

Ud af de 110 isolater påviste man virulensgener i 103 (94 %) tilfælde. Der var 7 isolater, hvor der ikke blev påvist virulensgener, men som tidligere var blevet klassificeret som ETEC. Hos alle, undtagen 5 isolater ud af de 103, fandt man det samme resultat, som fundet i oprindelige undersøgelser. Den interne kontrol blev amplificeret ved alle 110 isolater.

I de 5 prøver, der ikke stemte overens med tidligere resultater, fandt man i 2 af tilfældene, at isolaterne ved tidligere fænotypiske test var blevet identificeret som *Shigella boydii*. Ved den nye multiplex PCR fandt man dog genet, der kodet for, at det var en EPEC. Ved den 3. stamme, der tidligere blev fundet til at være en EPEC, blev genet, der koder for enteroaggregativ *E. coli* (EAEC), amplificeret. De sidste 2 stammer, der tidligere var blevet bestemt til at være ETEC, fandt man i den ene genet, der koder for EAEC, og i den anden genet, der koder for EPEC. (6)

Når resultaterne fra den molekylærbiologiske metode og de tidligere undersøgelser i fem tilfælde ikke stemmer overens, er det svært at afgøre, hvilke resultater der er mest sande. Dog ved vi med sikkerhed, at 4 af de 5 isolater, der ikke stemte overens i de tidligere undersøgelser og i multiplex PCR, ikke tidligere er konfirmeret med en molekylærbiologisk metode. Dette øger sandsynligheden for, at det er multiplex PCR-metoden, der påviser korrekt. De 5 isolater er alle påvist til at være diarréfremkaldende bakterier, men art og type varierer, alt efter hvilken metode der er anvendt.

Da vi mangler en golden standard, er det svært at beregne sensitivitet og specificitet for den molekylærbiologiske metode. Vi ved, at kontrollen blev amplificeret ved alle 110 isolater, så analysen har fungeret korrekt. Hvis vi antager, at alle resultaterne er valide, idet kontrollen er amplificeret korrekt, så vil den molekylærbiologiske metode have både en sensitivitet og en specificitet på 100 %, idet de sande positive isolater giver et positivt testresultat, og de sande negative isolater giver et negativt testresultat.

Hvis vi antager, at de 7 isolater, der ikke blev påvist virulensgener hos, faktisk er ETEC, som de blev fundet til ved de fænotypiske test, og hvis de 5 isolater, der gav forskelligt testresultat, tælles med i antal sandt positive, så vil sensitiviteten i stedet være 93,6 %. Dette er ikke en særlig høj sensitivitet, men da de 7 stammer ikke tidligere er konfirmeret med en molekylærbiologisk metode, er det mest sandsynligt, at de ikke indeholder virulensgener, som det blev påvist ved multiplex PCR.

## KLINISK RELEVANS

I forhold til behandling af patienterne er det vigtigt, at de metoder, der anvendes til påvisning af DEC, er så sensitive og spe-

## Referencer:

- 1 Espersen F. et al (red.). (2006). *Vi bliver fortsat syge af vores mad*. Statens Serum Instituts smitteberedskab, status. S. 10-11.
- 2 Statens Serum Institut. *E. coli infektioner*. Lokaliseret den 16. november 2009: <http://www.ssi.dk/sw1257.asp>
- 3 Gould L. H. et al. (2009). *Recommendations for diagnosis of Shiga Toxin Producing Escherichia coli Infections by Clinical laboratories*. MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report. Vol. 58 (No. RR-12). S. 1-14.
- 4 Centers for Disease Control and Prevention. (2008, 27. marts). *Escherichia coli*. Lokaliseret den 17. november 2009: [http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listing/stec\\_gi.html](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/stec_gi.html)
- 5 *Personlig meddelelse*: Overlæge Jørgen Engberg, Klinisk Mikrobiologisk afdeling Slagelse.
- 6 Brandal L. T. et al (2006). *Octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of human diarrhoeagenic Escherichia coli and Shigella spp.* Journal of Microbiological Methods. No 68. S. 331-341.

cifikke som muligt. Som tidligere nævnt vil en hurtig og korrekt diagnose nedsætte risikoen for komplikationer samt forbedre patientens udfald.

Når man afprøver en ny metode, er det en fordel at have en golden standard at holde resultatet op imod. I undersøgelsen lavet af Brandal L. T. et al sammenholdes resultaterne med resultater fundet i tidligere fænotypiske test (EHEC og EIEC, samt nogle af EPEC blev konfirmeret ved molekylærbiologisk metode), men ifølge MMWR skal de fænotypiske test altid konfirmeres med en molekylærbiologisk metode. Hos de 5 isolater, der gav forskelligt resultat ved de anvendte metoder, er der stor sandsynlighed for, at det er den molekylærbiologiske metode, der giver det korrekte resultat. Hverken *Shigella spp.* eller ETEC, som 4 af de 5 isolater ved tidligere undersøgelser var blevet bestemt til, blev tidligere konfirmeret med en molekylærbiologisk metode. (3), (6).

### KONKLUSION

Sammenholdt med anbefalingerne beskrevet i Morbidity and Mortality Weekly Report og undersøgelserne lavet af Brandal L. T. et al og Persson S. et al vil en molekylærbiologisk metode være den mest sensitive/valide metode til påvisning af DEC i de kliniske laboratorier. De serologiske undersøgelser udelukkes ikke, idet man ved positivt PCR-signal i *Vtx1* og *Vtx2* yderligere udfører slide agglutination med pool OK sera, med henblik på en OK og en O serotypning. Risikoen for at stille en forkert eller slet ingen diagnose vil på den måde formindskes betydeligt. (5)

En anden vigtig faktor er detektionstiden. Ved multiplex PCR kan de 5 almindeligste DEC og *Shigella spp.* påvises i samme analyse, hvor tidligere molekylærbiologiske metoder ikke har kunnet påvise alle virulensgener. Derved kan patienterne hurtigere sættes i korrekt behandling, og man vil kunne spare arbejdstid/personale. ▣

### DE, HOS MENNESKER, ALMINDELIGT FOREKOMMENDE DIARÉ-FREMKALDENDE *E. COLI* (DEC):

- Verotoksigene *E. coli* (VTEC) giver ofte blodig diaré, mest hos børn, kan forværres med hæmolytisk uræmisk syndrom (HUS) eller trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP)
  - O157 VTEC er den hyppigst identificerede serogruppe af VTEC
  - Ikke-O157 VTEC dækker over andre serotyper, der også medfører sygdom
- Enteropatogene *E. coli* (EPEC) spæd- og småbørnsdiaré, ofte langvarig
- Intiminproducerende *E. coli* (A/EPEC) giver diaré hos både børn og voksne
- Enterotoksigene *E. coli* (ETEC) hyppigste årsag til rejserelateret diaré
- Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) nært beslægtet med *Shigella spp.* (2)(4)

### TARMINFEKTIONSMONITOR

Statens Serum Institut, Enhed for Mave-tarminfektioner, har udarbejdet en hjemmeside, der oplyser om den aktuelle forekomst af sygdomstilfælde i Danmark, forårsaget af de væsentligste diaré-fremkaldende bakterier, herunder *E. coli*.

På [www.mave-tarm.dk](http://www.mave-tarm.dk) kan man finde både uge, måned og årsopgørelser over laboratoriefund af diaré-fremkaldende bakterier. For VTEC er der sket en kraftig stigning i antallet af tilfælde (Fig. 2). En af grundene til stigningen skyldes forbedrede diagnostiske metoder, fx multiplex PCR. (8)



7 Persson S. et al (2006). A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol. 13 (No. 5). S. 516-524.

8 Statens Serum Institut, *Enhed for Mave-tarminfektioner. Tarminfek-*

*tionsmonitor – VTEC*. Lokaliseret den 23. november 2009: <http://www.mave-tarm.dk/graphics/html/udbrudmonitor/Siderne/Hovedindex.htm>

9 *Deoxyribonucleic Acid & Ribonucleic Acid. ABI 310 sequencer DNA-sequencing of the principles and rules.*

Lokaliseret 25. november 2009: <http://ok-google.blogspot.com/2008/11/abi-310-sequencer-dna-sequencing-of.html>