

på legekantoret sitt. Legetimer ble utsatt.

Hard behandling

Målet vårt var naturligvis at de som var smittet skulle bli kvitt sin MRSA. Men hvor stor er sjansen for at eldre mennesker blir det? Dårlig hudstatus er ingen god kombinasjon med behandlingsmetoden som anbefales; Hibiscrub kroppssåpevask er nemlig sterk for huden, og anbefales kun hvis huden er hel og «sterk nok» til å tåle det.

Det vi så var heldigvis at sår ble tilhelet og at både pasienter og helsepersonell ble kvitt sin MRSA. I hvert fall foreløpig.

Latent i underhuden

«Engang MRSA, alltid MRSA», sa smittevernlegen vår. Og han hadde rett. Så fort hudstatusen i området ble dårlig igjen, ble ny prøve tatt og MRSA ble påvist på nytt. Den lå tydeligvis latent i underhuden.

Da var det full smitteoppsporing igjen. Det gledelige var at de gangene dette skjedde, fant vi ingen andre MRSA positive. Verken blant medpasienter eller ansatte. De ansatte var tydeligvis blitt eksperter på hygiene.

Under kontroll

Det skulle gå to år før Folkehelseinstituttet reviderte sin MRSA-veileder. I den nye anbefalte de ikke lenger å isolere sykehjemsbeboere med MRSA. Årsaken var den store belastningen som langvarig isolasjon er. MRSA hadde dessuten vist seg å ikke være så smittsom som man trodde. Situasjonen ved sykehjemmene var under kontroll, og få nye var blitt smittet.

Nå ble det heller anbefalt å lage en høyrisikosone inne på rommet til pasienten og en lavrisikosone i fellesområdene. Inne på pasientrommet skulle personalet nå bruke beskyttelsesutstyr bare når de hjalp pasienten fysisk, eller håndterte pasientens utstyr eller urene tekstiler. Ute i fellesområdene kunne pasienten vandre fritt. MRSA-pasientene skulle daglig få tøyskift, rene bandasjer, sengetøyskift og renhold av rommet. Det var anbefalt ekstra renhold av felles berøringspunkter i avdelingen, og at god håndhygiene ble vektlagt.

Skeptiske til nye råd

Det skal innrømmes at vi var litt skeptiske til de nye smittevernåkene fra Folkehelseinstituttet. Vi var redde for økt smittespredning. Men vi var lojale også mot den nye veilederen, isolasjonen ble opphevet og pasientene fikk et nytt liv.

Det viste seg at det ikke ble noe mer smittespredning. Økt oppmerksomhet om hygiene ga resultater: God håndhygiene, bruk av beskyttelsesutstyr, arbeidstøy, utstyr, renhold og desinfeksjon, avfallshåndtering og tekstilhåndtering. Dette kalles basale smittevernrutiner. Gjennomføres de, kommer man langt med det smitteforebyggende arbeidet.

I Norge er det dessverre fortsatt pasienter i sykehjem som blir isolert på grunn av MRSA. Det blir de heldigvis ikke i vårt fylke.

Lærdom

Hva lærte jeg sånn rent mikrobiologisk av dette første møtet med MRSA?

- Jo, at det er viktig med:
 - Riktig prøvetaking.
 - Riktig merking av prøvematerialet.
 - Riktig utfylling av rekvisisjonen.
 - Å få prøvene raskt til laboratoriet.

Jeg lærte også at analysesvarene ikke kommer raskere ved å mase på bioingeniørene.

Det å ha en god dialog med folket på laboratoriet fra starten av, slik at vi kan formidle gjensidig kunnskap og erfaring, er også viktig. Det kan redusere frustrasjonen.

Svar som setter spor

I den nye MRSA veilederen er ikke anbefalingene om screening og smitteoppsporing mye endret. Dere vil med andre ord fortsatt få mange prøver som dere må dyrke ut på skålene deres. Dere må lese av funn om MRSA og dere må formidle dem videre.

Men etter å ha lest dette, stopper dere kanskje opp noen sekunder neste gang en MRSA påvises? Kanskje er dere litt mer bevisste på hvor viktig arbeidet deres er, og hvilke følger det kan ha for pasienten.

Livet dere dyrket fram på skåla, kan nemlig sette dype spor i livet til den som får svaret. ■

Clostridium difficile

PÅ ST. OLAVS Hospital gjøres ribotyping av bakterien *Clostridium difficile* for å overvåke sykehusinfeksjoner og spore utbrudd. På grunn av nye hypervirulente stammer er dette viktigere enn noen gang.



Av **MARTHE LIND KROKNES**,
Spesialbioingeniør M.Sc.¹,
JANNE FOSSUM MALMRING
Spesialbioingeniør M.Sc.¹,
JAN EGIL AFSET, overlege og
førsteamanuensis^{1,2},

E-post: marthe.lind.kroknes@stolav.no

Bakterien *Clostridium difficile* er den vanligste årsaken til antibiotikaassosiert diarré. Bakterien kan gi sykehusinfeksjon, det vil si en infeksjon ervervet under opphold på sykehus. *C. difficile* er en spore-dannende anaerob gram positiv stavbakterie. Sporene er svært robuste og kan overleve i ulike miljøer i flere måneder. Dette kan gjøre det vanskelig å bli kvitt bakterien i for eksempel sykehusmiljøer (1).

Både voksne og barn kan få en *C. difficile*-infeksjon (CDI) når de er innlagt på sykehus. Når pasienter eksponeres for et miljø der *C. difficile*-sporer er vanlig, kan de koloniseres gjennom fekaloral smitte. Den aller første betingelsen for at en infeksjon skal etableres, er en forstyrrelse av den normale tarmfloraen. Tarmfloraen fungerer normalt som en koloniseringbarriere som beskytter mot CDI.

1. Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital
2. Institutt for laboratoriemedisin, barne- og kvinnesykdommer, Norges teknisk naturvitenskaplige universitet (NTNU).

C. difficile i sykehus – behov for økt oppmerksomhet?

Denne barrieren svekkes når floraen er forstyrret. Antibiotikabehandling er den viktigste årsaken til forstyrrelse av tarmfloraen. Andre forhold som kan endre denne floraen er kjemoterapi eller syrenøytraliserende behandling. Det er en stor utfordring for smittevernet i sykehus at innlagte pasienter med diaré raskt kan forurense omgivelsene med sporer og dermed skape et potensial for et sykehusutbrudd (figur 1) (1-3). Hos innlagte pasienter med mistenkt eller påvist CDI anbefales isolasjon inntil de er symptomfrie (4). For noen pasienter kan dette innebære isolasjon over lengre tid. Sporer fra *C. difficile* lar seg ikke fjerne med alkoholbaserte desinfeksjonsmidler. Det er derfor viktig å bruke desinfeksjonsmiddel som for eksempel PeraSafe for å kvitte seg med eventuelle sporer i miljøet.

Sykdomsforløp og ansvarlig toksin

Infeksjon med *C. difficile* kan gi symptomer som diaré, magesmerter og feber. Symptomene er vanligvis milde og kortvarige, men infeksjonen kan utvikle seg til alvorlig pseudomembranøs ulcerøs kolitt og i sjeldne tilfeller den alvorlige komplikasjonen toksisk megakolon. Personer som har en normal immunrespons mot *C. difficile*-toksiner er mindre utsatt for CDI (figur 1). Nyfødte som ennå ikke har en fullt utviklet tarmflora, er svært ofte kolonisert av *C. difficile*, men forblir asymptomatiske i de fleste tilfeller. Årsaken er at de ikke har utviklet spesifikke reseptorer for toksinet i tarmcellene (5).

Ved kolonisering produserer *C. difficile* to toksiner som er de viktigste virulensfaktorene, vanligvis kalt toksin A (TcdA) og toksin B (TcdB). TcdA er et enterotoksin som opprinnelig var antatt å være nødvendig for virulens. Etter hvert er det imidlertid funnet at enkelte TcdB positive stammer som manglet TcdA har vært årsak til utbrudd av alvorlig CDI. TcdB er et cytotoxin som har vist seg å være 100

Symbol: ● Sporer / Bakterieceller

Kontaminert miljø

Sykehusmiljø forurenses med sporer fra *C. difficile*



Overføring

Helsepersonell, andre pasienter eller pårørende forurenser pasienten med sporer (f.eks. via hendene)



Vekst av bakterieceller

Pasienten svelger sporer som spirer til bakterieceller i tynntarmen og formerer seg i tykktarmen



Utfall

Dersom *C. difficile* produserer toksiner og pasienten har et svekket immunforsvar utvikles en symptomatisk *C. difficile*-infeksjon, som fører til diaré og komplikasjoner



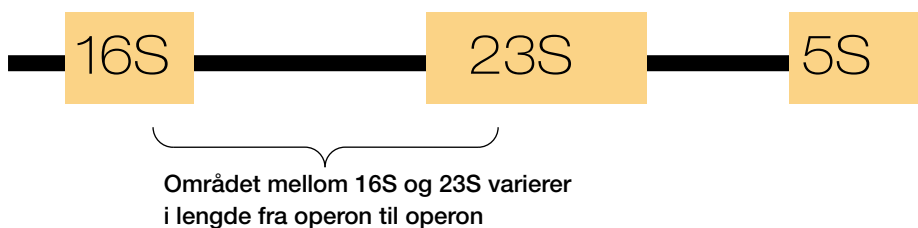
Diaré



Komplikasjoner

FIGUR 1: Overføring av *C. difficile*-smitte i sykehusmiljøer.

Figuren er hentet fra «Clostridium difficile Infection in Europe: a CDI Europe report» og trykkes med tillatelse fra eier. Copyright Astellas Pharma Europe, 2013.



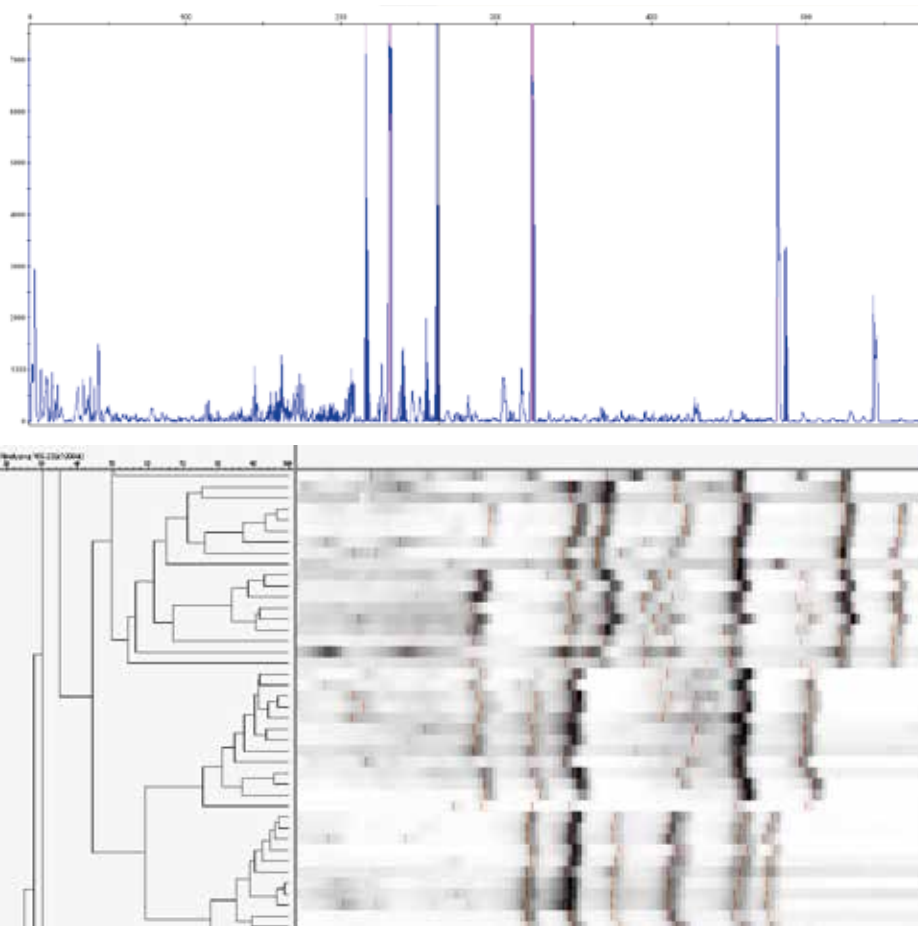
FIGUR 2. Illustrasjon av området mellom genene som koder for 16S og 23S. Lengden på området varierer mellom ulike operoner. Ved PCR amplifikasjon vil det dannes PCR-produkter av ulik lengde.

til 1000 ganger mer toksisk enn TcdA i enkelte typer cellekultur. Det er derfor sannsynlig at både TcdA og TcdB kan være av betydning for bakteriens virulens. *C. difficile*-stammer som ikke produserer toksiner anses ikke å være patogene (6).

Økning i antall tilfeller

Siden år 2000 har antallet CDI økt i USA,

Canada og enkelte europeiske land. Mellom 2002 og 2005 ble en epidemi av CDI identifisert i Canada (7). Ved hjelp av molekylære typingsmetoder ble den skyldige organismen identifisert til å være en stamme av *C. difficile* kalt PCR ribotype 027 eller Nord-Amerikansk pulsfelt type 1 (NAP1). Det er rapportert flere tilfeller av denne stammen i ulike land over hele verden. Stammen har vært forbundet



FIGUR 3 A) OG B) PCR-produktene separeres vha kapillær gelelektroforese og synliggjøres med fluorescensmerkede primere. Fingerprintene sammenlignes mot hverandre og et panel kjente ribotyper i databasesoftwarens BioNumerics. En likhetsmatriks dannes basert på statistiske metoder (Pearson correlation).

med regionale utbrudd av CDI og alvorlig kolitt som i verste fall har vært dødelig. Denne stammen har en mutasjon i et regulatorisk gen som forårsaker hyperproduksjon av toksin (8). I Europa ble PCR ribotype 027 først rapportert i England i 2005 og kort tid etterpå i Nederland (9). Senere har epidemier av CDI forårsaket av PCR ribotype 027 blitt oppdaget på sykehus i mange europeiske land. Det er derfor behov for økt oppmerksomhet i laboratoriet for å kartlegge hvilke typer som sirkulerer. Det er også stor variasjon i de europeiske landene på hvor mye oppmerksomhet denne infeksjonen får. Det er også forskjeller i diagnostiske prosedyrer på sykehus, typingsmetoder og nasjonal overvåking.

Laboratoriediagnostikk

Ved St. Olavs Hospital er laboratoriediagnostikk av CDI basert på PCR-påvisning, samt dyrkning av PCR-positive prøver. Alle prøver med mistanke om CDI analyseres med en in-house PCR for deteksjon av *tcdB*, gen som koder for toksin B. Alle prøver med PCR-funn av *tcdB* bekreftes med anaerob dyrkning på Fastidious Anaerob agar (FAA) og cykloserin-cefoxitin-fruktose-agar (CCFA-skål m /metronidazol 5 mikrogram). I tillegg til påvisning gjør St. Olavs Hospital rutinemessig genotyping av alle av *C. difficile*-isolater.

Ribotyping

Ribotyping er en genotypingsmetode som baserer seg på størrelsesvariasjon i området mellom gen som koder for 16S og gen som koder for 23S. Mellom disse finnes et ikke-kodende område som varierer i lengde mellom ulike operoner (figur 2). Et operon er et kompleks av bakteriens DNA hvor genene kontrolleres av et felles regulatorområde. 16S-, 23S- og 5S rRNA-gener er organisert i RNA-operoner hos *C. difficile*. Hver enkelt bakterie har flere kopier av dette operonet i sitt genom, og det er dette som utnyttes når man ribotyper bakterien. Primerne er rettet mot siste del av 16S-genet og første del av 23S-genet, fordi dette er konserverte områder. Størrelsen på PCR produktene vil avhenge av lengden på området mellom primerne, vanligvis mellom 200 og 900 basepar. Disse separeres ved gelelektroforese og synliggjøres med fluorescens. PCR-produkter med ulik stør-

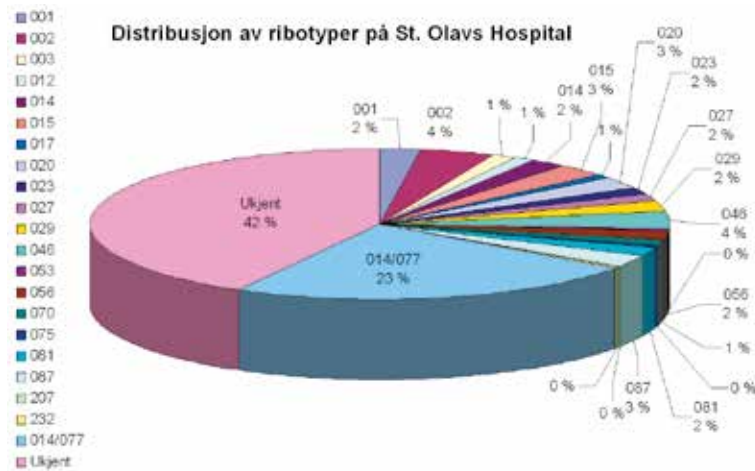
relse utgjør et mønster, et såkalt «fingerprint». Hvert unike «fingerprint» definerer en ribotype. Det er til nå internasjonalt beskrevet og gitt navn til over 400 ulike ribotyper. «Fingerprintene» fra de ulike bakteriestammene sammenlignes med kjente ribotyper i et panel internasjonale prototypestammer. Denne epidemiologiske typingsmetoden er et viktig verktøy i overvåkingen av *C. difficile* og kan brukes i sporing av utbrudd (10, 11). Metoden har vært brukt rutinemessig på St. Olavs Hospital siden 2008. Oslo universitetssykehus ((OUS), Rikshospitalet, er referanselaboratorie for *C. difficile* og utfører PCR ribotyping samt andre metoder for karakterisering av bakterien.

På St. Olavs Hospital blir positive prøver dyrket på FAA og en koloni blir kokelysert i ekstraksjonsbuffer. Lysatet blir analysert ved hjelp av konvensjonell PCR og PCR-produktene blir analysert med Agilent Bioanalyzer DNA 1000 kit (Agilent technologies). Dette er et instrument som separerer og detekterer PCR-produkter basert på størrelse og framstiller resultatet automatisk. For å få en mer presis bestemmelse av størrelsen på PCR-produktene er metoden videreutviklet til avlesning ved hjelp av kapillær gelelektroforese med fragmentseparasjon på ABI 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Denne metoden avhenger av fluorescensmerkede primere som detekteres i instrumentet og gjenspeiler den nøyaktige størrelsen til hvert PCR-produkt (figur 3). De samme «fingerprintene» som beskrevet over kan kartlegges enda mer nøyaktig med denne formen for fragmentanalyse.

Overvåking

En kartlegging av de ulike ribotypene er nyttig for å oppdage eventuelle utbrudd og forøvrig forstå spredningen av *C. difficile*. I tillegg er visse ribotyper forbundet med en høyere risiko for alvorlig eller komplisert CDI. Fordelingen av ribotyper kan derfor gi viktig informasjon. I England og Nederland fikk de bedre kontroll over epidemien av *C. difficile* PCR ribotype 027 etter at ribotyping ble gjennomført nasjonalt, og man så også en markert reduksjon i forekomst og dødelighet av CDI (9, 12).

European *Clostridium difficile*-infection surveillance network (ECDIS-net) er etablert for å øke deteksjonen og overvåkingen av CDI i Europa. Det er en tverrfaglig



FIGUR 4.
Fordeling av ribotyper ved St. Olavs Hospital.

gruppe av forskere som arbeider i samarbeid med nasjonale folkehelseinstitutter. Prosjektet har som mål å etablere en europeisk nomenklatur for *C. difficile* ribotyper, lage en referansesamling og database av *C. difficile*-stammer og utvikle en europeisk overvåkingsprotokoll for CDI (<http://www.ecdisnet.eu>).

St. Olavs Hospital og OUS Rikshospitalet har i samarbeid med Folkehelseinstituttet deltatt i en pilotstudie for overvåking der antall tilfeller av CDI ble rapportert i en tre-månedersperiode. Et utvalg av stammer diagnostisert i denne perioden ble sendt til Nederland for validering av lokal ribotypingmetode (figur 4). St. Olavs Hospital, OUS, Rikshospitalet og Bærum sykehus deltok i en lignende europeisk multisenterstudie i 2008.

Studien som ble gjennomført sommeren 2013 viste at 65 % av innlagte pasienter på St. Olavs Hospital som fikk påvist toksinproduserende *C. difficile* i fæces, hadde en sykehuservvert infeksjon. 30 % av pasientene opplevde å få residiv av CDI og hadde vedvarende symptomer i flere måneder. Studien bekreftet at de fleste sykehuservvede CDI kommer som en følge av antibiotikabehandling (upublisert materiale).

Funn av toksinproduserende *C. difficile* ble gjort meldepliktig til Meldesystem for smittsomme sykdommer (gruppe C, MSIS) fra 1. juli 2012. ■

Takk

Metoden for PCR ribotyping ble innledningsvis testet ut av bioingeniørstudentene Camilla Olaisen og Silje Mari Nilsen Reinjfell som en bacheloroppgave: «PCR Ribotyping av *Clostridium difficile*».

Referanser

1. Delmée M, Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect, 2001, 7: 411-416.
2. Kuijper EJ, Barbut F, Brazier JS, Kleinkauf N et al. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe. Eurosurveillance, 2008, 13(7-9).
3. Brazier JS. The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*. J Antimicrob Chem, 1998, 41, Suppl. C, 47-57.
4. Smittevern 6. Isoleringerveilederen, FHI.
5. Jangi S, Lamont JT. Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2010, 51(1): 2-7.
6. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML et al. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature, 2010, 467(7316): 711-713.
7. Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet, 2005, 366: 1079-1084.
8. Wolff D, Brüning T, Gerritzen A. Rapid detection of the *Clostridium difficile* ribotype 027 tcdC gene frame shift mutation at position 117 by real-time PCR and melt curve analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28: 959-62.
9. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BHB, Brazier JS et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet, 2011, 377(9759): 63-73.
10. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B et al. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. FEMS Microbiol Lett, 1999, 175: 261-266.
11. Stubbs SLJ, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. J Clin Microbiol, 1999, 37(2):461-463.
12. *Clostridium difficile* infection in Europe, A CDI Europe Report. 2013.