



Screening auf darmpathogene Erreger

4. Kölner Hygienetag





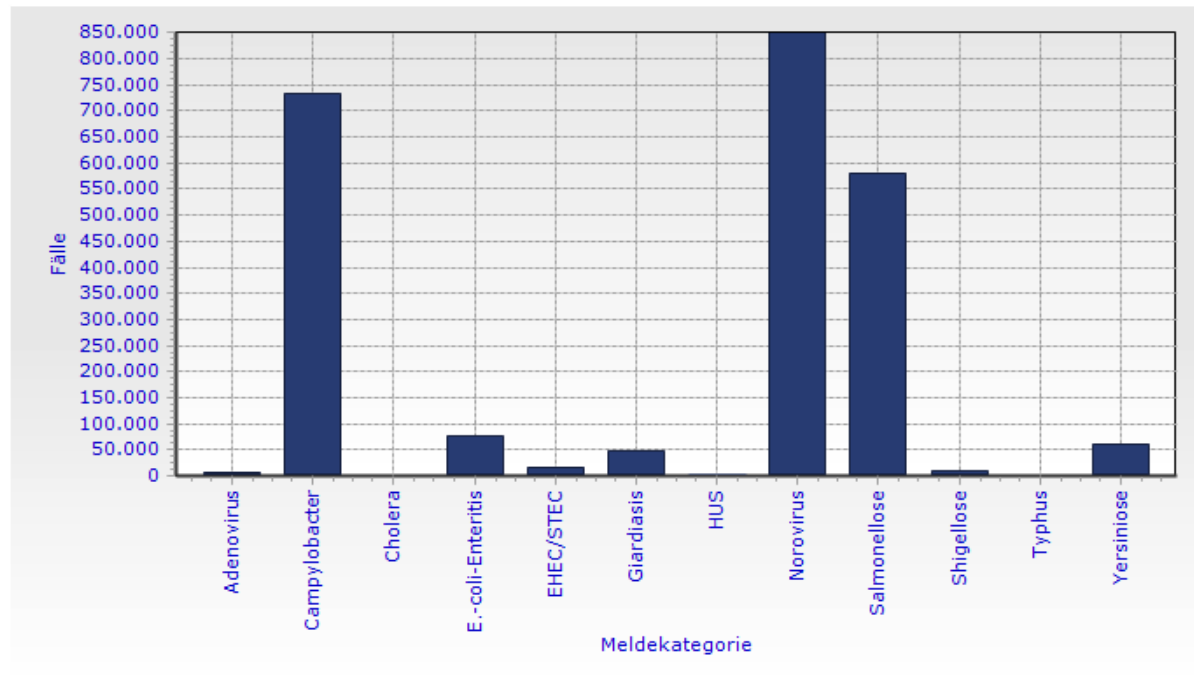
Es besteht kein Interessenkonflikt.....!





Relevanz: RKI Abfrage 2003 – 2012 (SurvStat)

Übermittelte Adenovirus-, Campylobacter-, Cholera-, E.-coli-Enteritis-, EHEC/STEC-, Giardiasis-, HUS-, Norovirus-, Salmonellose-, Shigellose-, Typhus- und Yersiniose-Fälle nach Meldekategorie, Deutschland, Fälle entsprechend der Referenzdefinition des RKI; Datenstand: 17.04.2013



Meldekategorie	Anzahl
Adenovirus	6772
Campylobacter	732788
Cholera	20
E.-coli-Enteritis	75914
EHEC/STEC	16641
Giardiasis	48875
HUS	1655
Norovirus	851153
Salmonellose	578897
Shigellose	10827
Typhus	852
Yersiniose	61416
Gesamt	2385810

Die Verwendung von Daten aus der SurvStat-Anwendung ist außer zu werblichen Zwecken gestattet, jedoch nur unter Quellenangabe. Vorgeschlagene Zitierweise:

»Robert Koch-Institut: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: <Datum der Abfrage>«.



Karsten C. et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2009) 28:935–943
 Incidence and risk factors for community-acquired acute gastroenteritis in north-west Germany in 2004

Table 2 Detected microorganisms

	Patients (n=1,086)			RKI Inzidenz	Controls (n=544)	
	Number tested	% positive	Incidence/100,000 inhabitants		Number tested	% positive
Norovirus	1,053	16	626 [287; 1,071]	Noro 141	532	3.4
Rotavirus	875	7	270 [124; 467]	Rota 75	464	2.8
Astrovirus	875	3	111 [51; 196]		464	1.7
Adenovirus	875	2.9	113 [52; 199]		464	0.2
Salmonella	1,046	2	162 [74; 290]		534	0
Campylobacter spp.	1,046	1.2	55 [25; 101]	Camp 81	534	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1,046	0.9	34 [16; 65]		534	0
<i>Plesiomonas</i>	1,046	0.1	Not calculated		534	0
<i>Aeromonas</i> spp.	1,046	0.7	31 [14; 58]		534	0.4
EPEC	1,046	0.3	Not calculated		534	0.6
Enterotoxin-encoding <i>S. aureus</i>	1,046	1.7	67 [31; 120]		534	0.6
No enteropathogen found	709 (65%)				484 (89%)	



RKI: Clostridium-difficile-assoziierte Diarrhoe (CDAD): Zunehmende Inzidenz in Deutschland. Epid Bull 2008; 15: 119. / Epid Bull. 2010; 10

Anzahl Enterokolitis durch *C. difficile* pro 100.000 Entlassungen

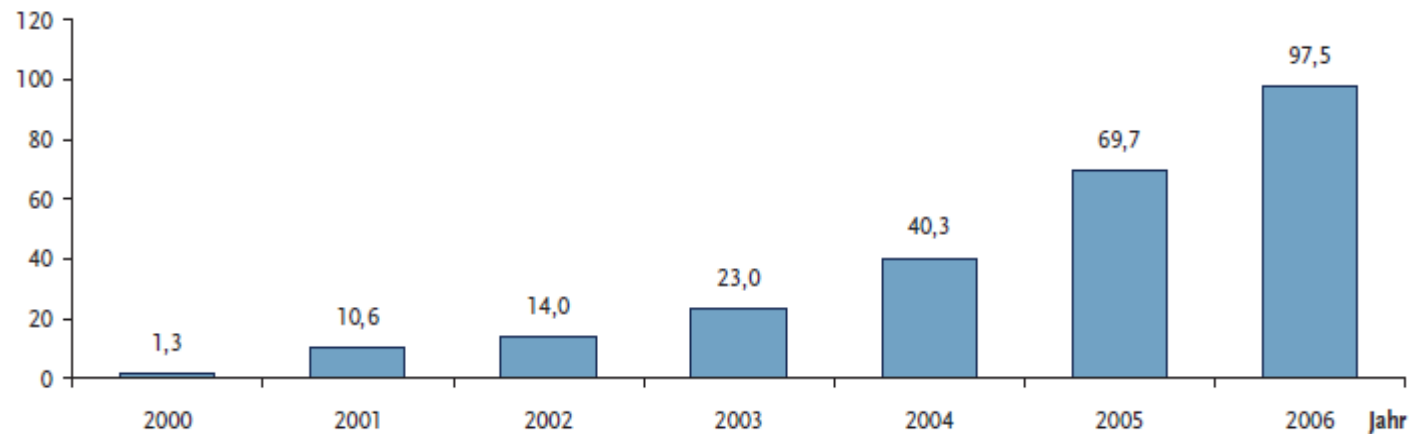


Abb. 1: Anzahl der Erkrankungen an *Clostridium-difficile*-assoziiierter Diarrhö (ICD-10-Diagnose A04.7) bei vollstationären Patienten in Deutschland, nach Jahr, Daten des Statistischen Bundesamtes 2000–2006

Beobachtung: Zunahme von schweren Verläufen



Karsten C. et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2009) 28:935–943
 Incidence and risk factors for community-acquired acute gastroenteritis in north-west Germany in 2004

Table 5 Self-reported symptoms of patients

Self-reported symptoms	Norovirus (n=168)	Rotavirus (n=61)	Astrovirus (n=26)	Adenovirus (n=25)	Salmonella (n=21)	Campylobacter spp. (n=13)	Yersinia enterocolitica (n=9)	S. aureus (n=28)
	%	%	%	%	%	%	%	%
Watery stool	75.4	65.6	47.0	42.1	68.8	63.4	37.0	55.6
Loose stool	43.7	54.6	42.7	38.3	31.7	17.1	61.7	61.7
Bloody stool	0.7	0	0	3.8	5.3	8.5	12.3	18.5
Abdominal pain	37.7	32.8	51.3	30.7	10.6	17.1	49.4	55.6
Loss of body weight	37.7	41.9	51.3	88.1	5.3	59.8	12.3	30.9
Fever	15.2	36.4	8.5	7.7	26.5	42.7	61.7	24.7
Fatigue	25.2	21.9	17.0	3.8	0	8.5	24.7	18.5
Vomiting	60.8	56.5	34.2	30.7	31.8	17.1	0	37.0
	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median	Median
Max. no. of bowel evacuations per 24 h	5	5	8	6	14.5	11	6	6
Additional symptoms ^a	1–10	2–5; 7–10	2; 3; 5–7	3; 10	2	none	1–3	1–3; 6; 8

^a Additional symptoms: 1=arthralgia, 2=headache, 3=nausea, 4=vertigo, 5=dorsalgia, 6=heartburn, 7=meteorism, 8=fever chills, 9=limb pain, 10=lack of appetite



Das Problem:

Ähnliche Symptome, viele mögliche Ursachen, viele Therapieoptionen

Mikrobiologische Ursachen können sein:

Viren

Bakterien

Parasiten

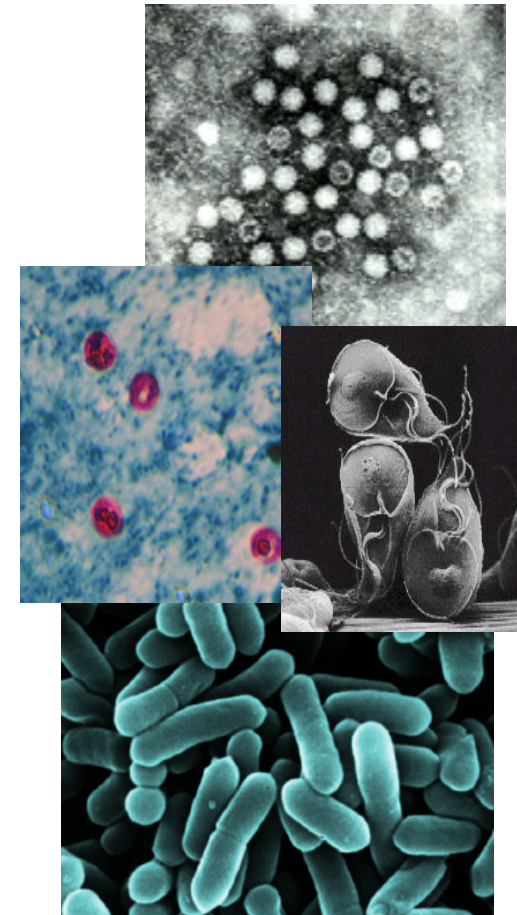
Toxine

Wichtig wäre eine Unterscheidung in Bezug auf

Therapie

Intervention

Hygienemassnahmen





Konsequenzen für die Therapie: symptomatisch und ggfs.

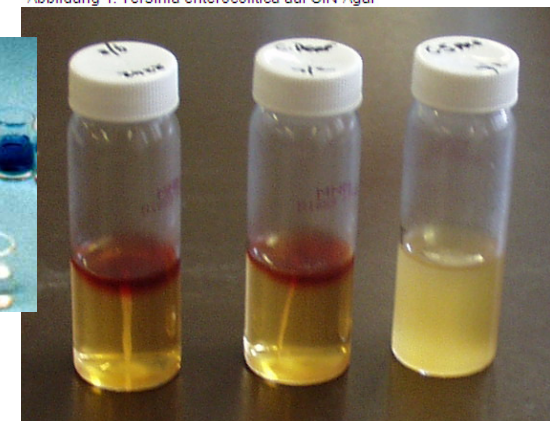
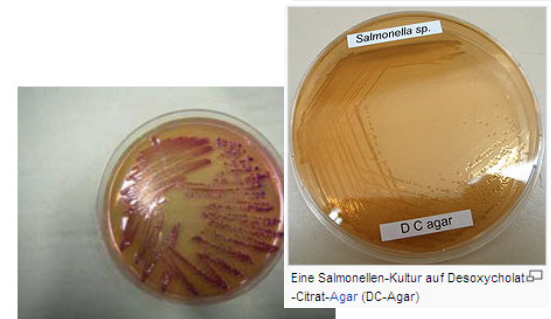
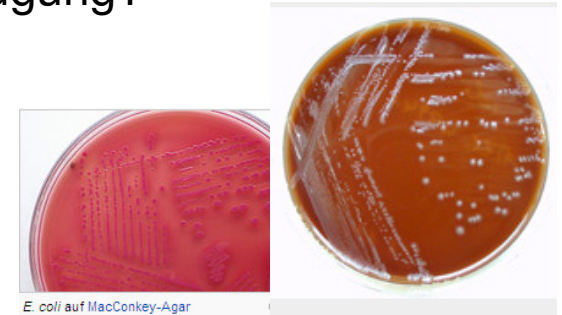
- Salmonellen = z.B. Ciprofloxacin, Ceftriaxon
- Shigellen = z.B. Ciprofloxacin, Ampicillin
- Escherichia Coli = z.B. Ciprofloxacin, Levofloxacin
- Campylobacter = z.B. Clarithromycin, Ciprofloxacin
- Yersinia enterocolica = z.B. Ciprofloxacin
- Clostridium Difficile = Vancomycin, Metronidazol
- Vibrio cholerae = Azithromycin, Ciprofloxacin, Doxycyclin
- EHEC, STEC = Umstritten
- Rotavirus = Impfung, Symptomatisch
- Adenovirus = Symptomatisch
- Norovirus = Symptomatisch
- Giardia = Metronidazol
- Entamoeba = Metronidazol
- Cryptosporidien = Azithromycin, Nitazoxanid



Welche diagnostischen Möglichkeiten stehen uns zur Verfügung?

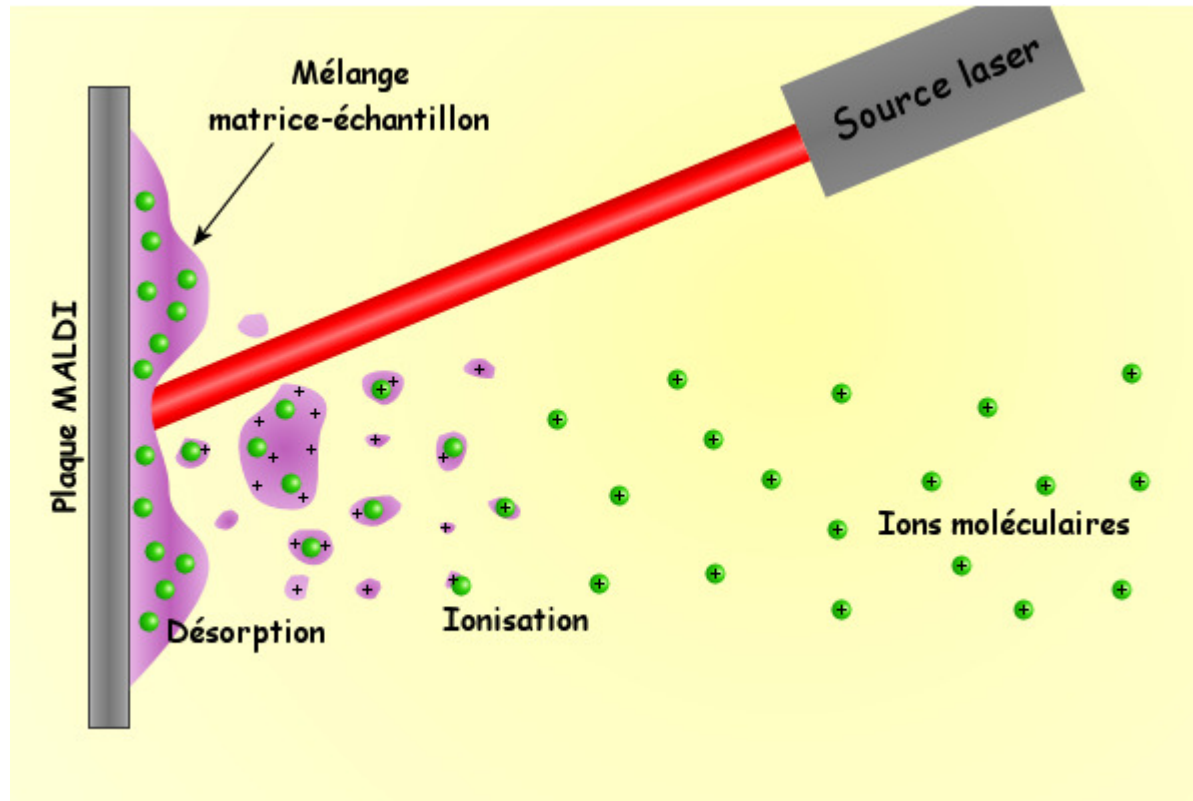
Die Bandbreite diagnostischer Möglichkeiten reicht von

- 2-10 Tage Kulturellem Nachweis (Spezialnährmedien)
- 2-10 Tage Biochemischer Nachweis (API, VITEK)
- 1 Tag ELISA (Antigen-, Toxin-, Erregernachweis)
- 2-10 Tage Antigennachweis per Agglutinationsverfahren
- 2-10 Tage Massenspektrometrie (MALDI-TOF)
- 1-2 Tage Immunfluoreszenz Ak Test (IFAT)
- 1-2 Tage Mikroskopie (SAF)
- 0,5-1 Tag Molekulargenetischer Nachweis (PCR)





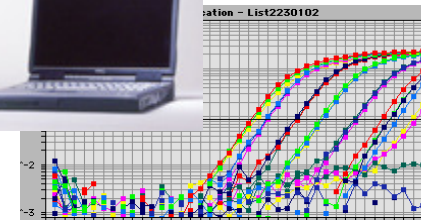
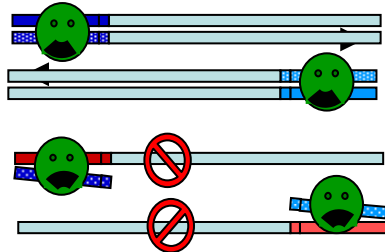
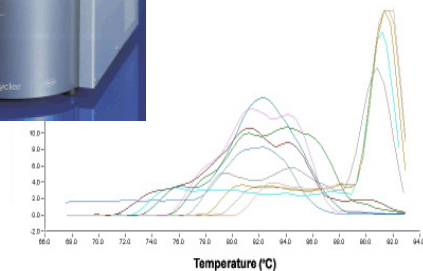
Massenspektrometrischer Nachweis darmpathogener Erreger: MALDI-TOF





Molekulargenetischer Nachweis darmpathogener Erreger

- Real-time PCR
 - Direkter Erregernachweis
 - Für Viren, Bakterien - Subtypen, Parasiten
- Multiplex PCR
 - Simultane Messung von bis zu 100 Analyten
 - Extrem geringe Mengen





Molekulargenetischer Nachweis darmpathogener Erreger



Vorteile:

Schnell
Spezifisch
Sensitiv

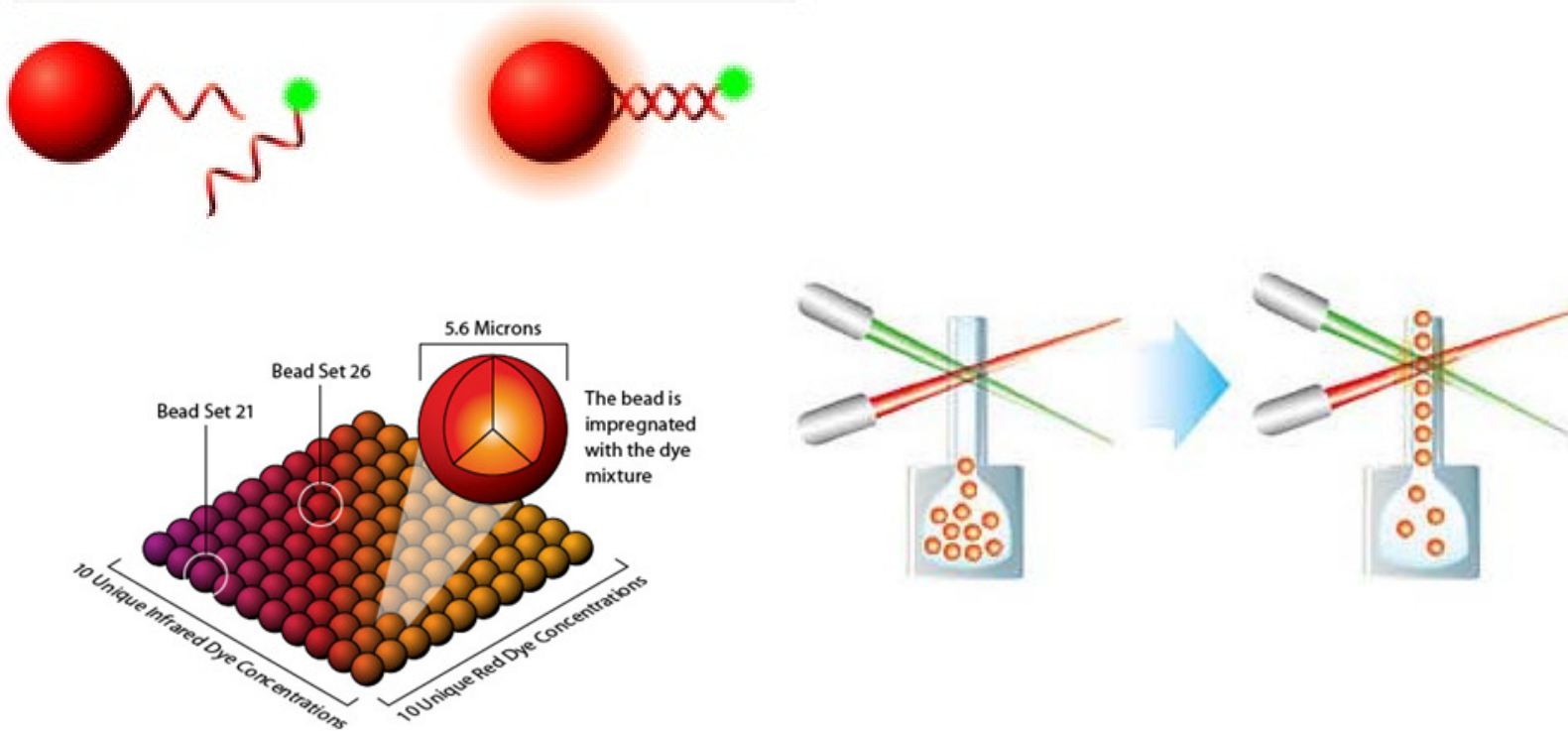
Nachteile:

Fehlerträchtig
Anfängerungeeignet
Präanalytik
DNA Extraktion mit
CAVE: Kontaminationsgefahr
CAVE: Stuhl enthält PCR-Hemmstoffe



xTAG GPP = Gastrointestinal Pathogen Panel, Luminex®-Technologie

Nucleic Acid Assay



<http://www.teomed.ch/images/stories/Labor/Luminex/>
www.viracor.com

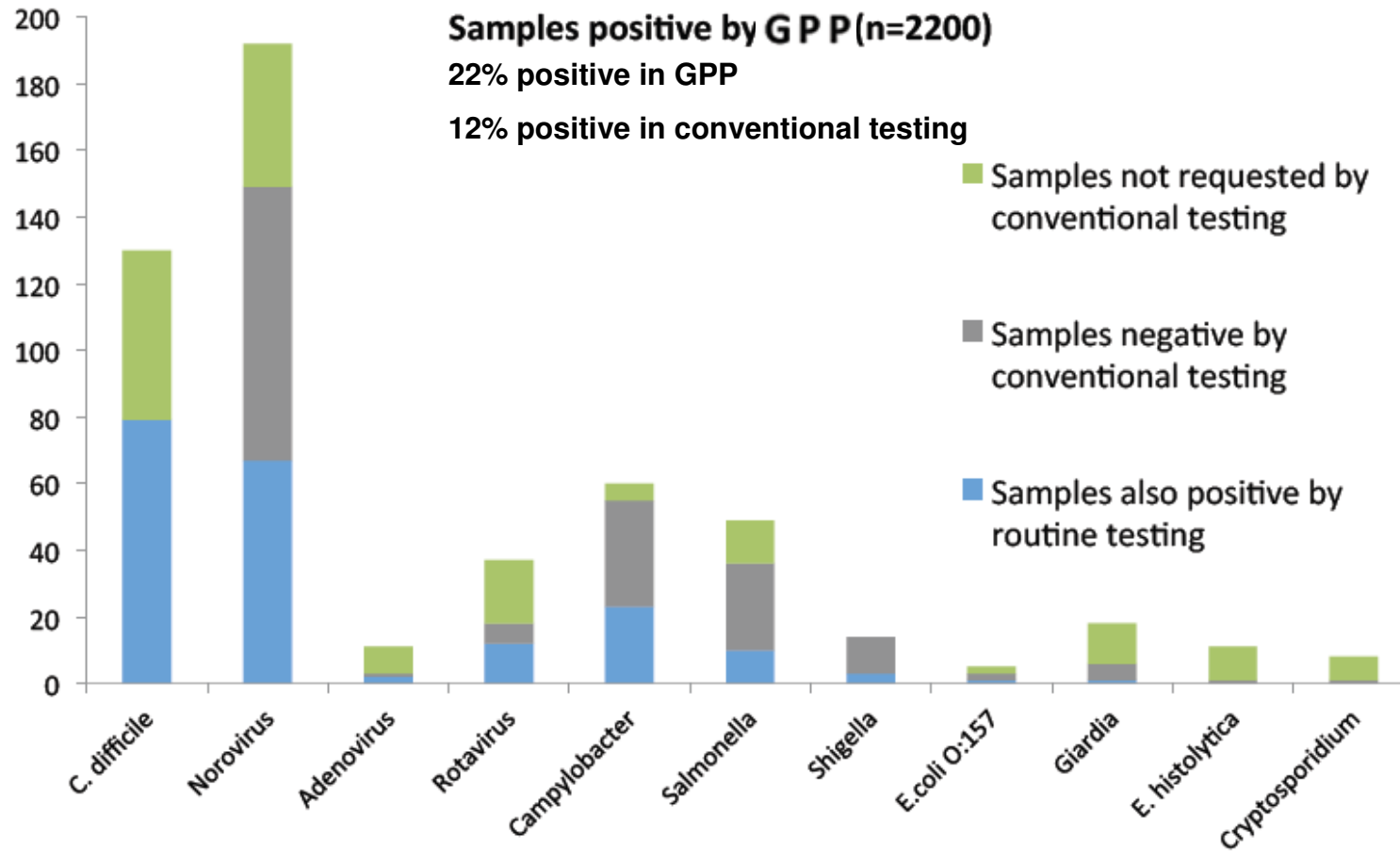


Tagets eines Multiplex-Panels Gastroenteritiserreger, z.B.: xTAG GPP =
Gastrointestinal Pathogen Panel, Luminex®-Technologie

- *Adenovirus 40/41*
- *Campylobacter*(nur *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*)
- *Clostridium difficile*-Toxin A/B (*C. difficile*)
- *Cryptosporidium*(nur *C. parvum* und *C. hominis*)
- *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*)
- *Escherichia coli* (*E. coli*) O157
- Enterotoxische *E. coli* (ETEC) LT/ST
- *Giardia* (nur *G. lamblia* – auch bekannt als *G. intestinalis* und *G. duodenalis*)
- *Norovirus GI/GII*
- *Rotavirus A*
- *Salmonella* (für bestimmte Serotypen, siehe Handbuch)
- Shiga-ähnliches Toxin produzierende *E. coli* (STEC) stx 1/stx 2
- *Shigella* (*S. boydii*, *S. sonnei*, *S. flexneri* und *S. dysenteriae*)
- *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*)
- *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*)



GPP Ergebnisse Halligen E. et al. UK, Kings College, eccmid 2013





Fazit von Halligen E. et al. UK, Kings College, eccmid 2013

- GPP verbessert die Sensitivität für den Nachweis von C.diff und Norovirus (EIA)
- GPP detektiert Erreger, die im konventionellen Test nicht angefordert werden
- GPP könnte zur verbesserten Surveillance beitragen
- Die meisten untersuchten Diarrhoen sind nicht-infektiös
- Die meisten Infektionen sind auf CDI und Norovirus zurückzuführen
- Hoher negativer prädiktiver Wert führt zu schnelleren Entisolierung



Verbessert die schnelle Diagnose einer *CDI* die Qualität der Patienten Versorgung?

Barbut F et al. CMI, 2013 Mar 20, ahead of print

- Period 1: Toxin+Kultur 36 of 359 (10%) pos
- Period 2: PCR 47 of 374 (12%) pos
- Period 3: GDH+PCR 48 of 389 (12%) pos
- Patienten in Gruppe P2 + 3 wurden früher mit Vancomycin oder Metronidazol behandelt.
- Die Patienten in P2 + 3 wurden seltener behandelt, wenn keine CDAD vorlag (6 % in P2 + 3 versus 13% in P1)

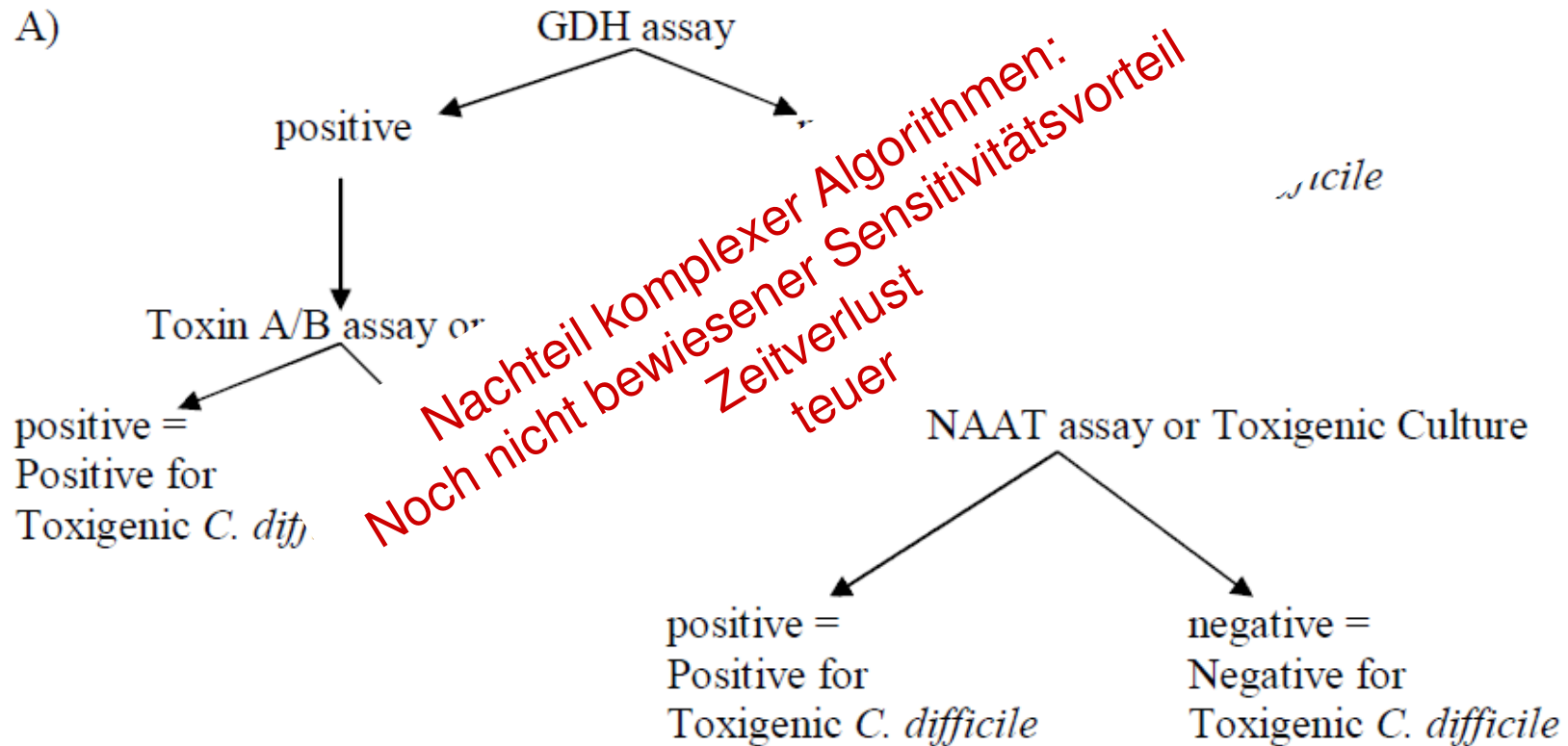
Schnelle Diagnostik führt zur früheren spezifischen Behandlung UND vermeidet falsche Therapien gastrointestinaler non-CDI Patienten



A Practical Guidance Document for the Laboratory Detection of Toxin-producing *Clostridium difficile* (November 21, 2010*)

THREE SAMPLE ALGORITHMS:

A)





American Society for Microbiology (ASM) JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 2010, p. 4347-4353

What Is the Current Role of Algorithmic Approaches for Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection?[∇]

Konsensus in der *C. difficile* Diagnostik:

- *C. difficile* Toxin-EIA sollte nicht als alleiniger Test eingesetzt werden.
- Bislang gibt es keinen Gold standard in der *C. difficile* Diagnostik.
- Der GDH Test erhöht zwar die Sensitivität, hat aber eine schlechte Spezifität muss in einem zweiten Test bestätigt werden.
- Molekulargenetische Tests zeigen eine hohe Sensitivität und Spezifität. Hier stehen noch Daten zur klinischen Relevanz und Wertigkeit aus.



Unrecognized Norovirus Infections in Health Care Institutions and Their Clinical Impact (Matthias FC et al. JMI 2012 (50:1) 140ff)

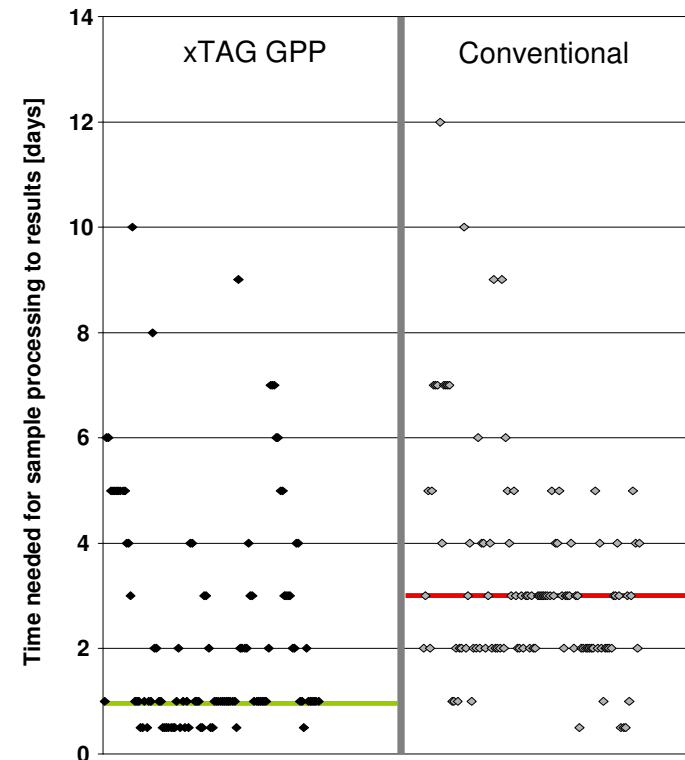
- Über 1200 Stuhlproben, die nur auf Noroviren getestet wurden, wurden nachträglich auf andere Erregerviren untersucht
- 45 Proben (4%) wiesen Erregerviren nach
- In der retrospektiven Analyse wurden diese 4% einen längeren Krankheitsverlauf, längere Bildgebung und längere Krankenhausaufenthalte zugeordnet
- Fungierten 6x als Index-Patienten für einen nosokomialen Ausbruch

Eine kombinierte Testung auf Noroviren und andere Erregerviren hätte potentiell Ausbrüche verhindern können!



Response time between sample entry in lab and micro result Gastrointestinal pathogen panel (GPP) by Luminex vs. conventional diagnostic

- GPP vs. konventionelle mikrobiologische Methoden
n=104
- Von 104 Proben, 70 mit identischen Ergebnissen GPP vs. konventionell
- **In 19% Erregernachweis nur im GPP** v.a. bei fehlender spezifischer Anforderung im mikrobiologischen Labor
- Im Median 1 Tag schnelleres Ergebnis
P < 0.001



Cite this article as: Kahlau *et al.*: Utility of two novel multiplexing assays for the detection of gastrointestinal pathogens – a first experience. *SpringerPlus* 2013 2:106.



Screening darmpathogener Erreger mittels Multiplex-PCR

Vorteile

- Hohe Sensitivität
- Hohe Spezifität
- Schnelles Ergebnis (6-10h nach Ansatz)
 - Diagnostik
 - Therapie
 - Hygienemaßnahmen
- In Ausbruchssituation schnellerer Überblick über Erregerspektrum
 - hoher Durchsatz
- Einzelstuhlprobe
- Erkennung seltener Erreger (sofern erwünscht)
- Epidemiologie (amb. erw. Durchfälle)



Screening darmpathogener Erreger mittels Multiplex-PCR

Nachteile

- Hoher Preis (v.a. bei geringer Probenanzahl pro Ansatz)
- Testung von Erregern, die nicht interessieren
(Cave: unerwünschte Nebenbefunde)
- Einzelstuhlprobe (fällt je nach Ausscheidungslage des Patienten falsch negativ aus)



Zusammenfassung Indikation Multiplex-PCR

- Frühes Screening sinnvoll zum schnellen Entscheid über Isolierung und spezifische Therapie
 - Ausbruchssituation
 - Gehäuftes Vorkommen ambulant erworbener Infektionen
 - Kontrolle bei V.a. CDI (Niedrige Sensitivität des Toxin A and B oder GDH EIA)
-
- Nicht immer für Diagnosesicherung und chron. Enteritiden geeignet
 - Nicht für Verlaufskontrollen geeignet
 - Ersetzt vorerst nicht den Goldstandard der 3fachen Einzeltestung in der Kultur bis Datenlage zum outcome der verschiedenen Strategien vorliegen.



Die Molekulare Diagnostik hat das Potential, die diagnostische Lücke bei der Detektion vieler ansonsten unentdeckter pathologischer Erreger zu schließen und somit die Diagnostik insgesamt zu verbessern.



Danke für Ihre
Aufmerksamkeit

