

ÅRSRAPPORT 2012

Nasjonalt referanselaboratorium for *Francisella tularensis*

Bakgrunnsinformasjon

Helse Midt-Norge RHF ved St Olavs Hospital HF ble tildelt nasjonal referansefunksjon for diagnostikk av *Francisella tularensis* i 2005, etter tidligere å ha utført denne type diagnostikk for rekvirenter fra hele landet fra 1980-årene. Arbeidet med referansefunksjonen er integrert i laboratoriet henholdsvis i Seksjon for virologi og genteknologi (serologiske og genteknologiske metoder), Seksjon for bakteriologi og prøvemottak (dyrkning og resistensbestemmelse) og Seksjon medisin.

Påvisning

Til serologiske analyser benyttes både mikroagglutinasjonsmetodikk (helcelleantigen, in-house metode), Elisa for påvisning av spesifikt IgM og IgG, og en hurtigtest (immunkromatografisk metode, VIRapid@TULAREMIA, Vircell). I løpet av året tok vi bruk en kommersiell Elisa-test (Serion Elisa classic *Francisella tularensis* IgG/IgM) til erstatning for vår gamle in-house metode. For molekylærdiagnostisk påvisning benyttes en in-house real-time PCR spesifikk for et 17-kDa lipoproteingen som finnes hos alle *F.tularensis* subspecies. Dyrkning utføres på sårsekret, aspirater og vevsprøver med bruk av Cystin Heart Agar med og uten antibiotika i tillegg til konvensjonelle medier. Vi har også metodikk for analyse av vannprøver fra drikkevann.

Identifisering og verifisering av innsendte isolater

Diagnostikken av *F.tularensis* gjøres oftest ved serologi og PCR-analyse direkte på prøvemateriale, men laboratoriet mottar også mistenkte tularemi-isolater fra andre laboratorier for identifikasjon og resistensbestemmelse.

Pasientprøver som kan inneholde *F.tularensis* er i henhold til nasjonale og internasjonale retningslinjer for transport av infeksøst materiale klassifisert som kategori B, mens bakterieisolater som anses suspekt på eller er sikkert identifisert som *F.tularensis* klassifiseres som kategori A (1), og må derfor sendes i henhold til retningslinjer for transport av mikroorganismer innen Kategori A (2).

Detaljkarakterisering

Vi benytter en publisert real-time PCR metode for å kunne skille isolater av *F.tularensis* subspecies *tularensis* fra andre subspecies (3). I løpet av året har vi i tillegg startet etablering av en in-house PCR metodikk for "High resolution melt analysis" av *F.tularensis* for subspecies klassifisering.

Resistensundersøkelser

Alle *F.tularensis*-stammer resistentestet i henhold til anbefaling i "WHO Guidelines on Tularemia" med brytningspunkter fra CLSI (4). Det er ikke etablert nasjonale retningslinjer for resistentesting av *F.tularensis* i Norge.

Stammebanketablering

Vi har etablert stammebank for *F.tularensis* påvist hos mennesker hvor alle nye stammer oppbevares (totalt 31 isolater). I tillegg har vi ca 20 dyreisolater mottatt fra Veterinærinstituttet i Oslo. Vi har også fått referansestammer fra Forsvarets mikrobiologiske forskningsinstitutt, Umeå, Sverige, og har kjøpt stammer fra CCUG, slik at vi nå følgende *Francisella* species og subspecies tilgjengelig: *F.tularensis* subspecies *tularensis*, *F.tularensis* subspecies *holarctica*, *F.tularensis* subspecies *mediasiatica*, *F.novicida*, *F.philomiragia* og en fiskepatogen kalt *F.piscicida*.

Kvalitetskontroll

Kvaliteten av de diagnostiske analyser kontrolleres ved positive og negative kontroller: eksternt kvalitets-kontrollprogram for PCR påvisning av *F.tularensis* (Instand e.V.), og samarbeider med Norrlands Universitetssjukhus, Umeå for eksternt kvalitetskontroll av *F.tularensis* serologi, både for mikroagglutinasjon og Elisa. Det finnes så langt vi vet ikke noe eksternt kvalitetskontrollprogram for dyrkning av *F.tularensis*.

Reagens- og stammeforsyning til brukerlaboratoriene

Det har så langt vært få forespørsler om reagens- eller stammeforsyning til brukerlaboratorier.

Metodeutvikling og forskning

Vi har i 2012 gjennomført en utprøving av to kommersielle Elisa-tester, en immunkromatografisk hurtigtest og sammenlignet disse med våre in-house mikroagglutinasjon og Elisa-tester: Deler av dette ble presentert som poster på 7th International Conference on Tularemia, Breckenridge, Colorado i september. Det er etablert en in-house real-time PCR for

differensiering mellom *F.tularensis* subspecies *holarctica* og subspecies *tularensis*, og det er igangsatt arbeid med etablering av PCR metodikk for ”High resolution melt analysis” av *F.tularensis* for subspecies klassifisering. I løpet av året har vi dessuten i samarbeid med FHI bearbeidet data fra utbruddet i 2011, og planlegger å publisere dette i løpet av 2013. Vi har i 2012 også innledet samarbeid med veterinærinstituttet om serologisk analyse av sera fra syke og friske hunder, og med forsvarrets mikrobiologiske forskningsinstitutt (Swedish Defence Reserach Agency) i Umeå, Sverige om genomsekvensering av *F.tularensis*-stammene som ble dyrket fra pasienter med tularemi i 2011. Begge studier pågår fortsatt.

I løpet av 2012 deltok vi på flere nasjonale og internasjonale seminar/konferanser:

- Tularaemia in humans in Norway, Jan Egil Afset, muntlig presentasjon ved nordisk workshop “Tularemia in Sweden, Norway and Finland in a One Health framework” SVA, Uppsala, Sverige, 9. februar 2012.
- Method development of real-time PCR for the detection of *Francisella tularensis*. Flakne A, Rønning T, Bergh K. Poster presentasjon ved The 30th World congress of Biomedical laboratory Science, Berlin, 18-22. August 2012,
- Tularemia on the increase in Norway? Epidemiology of a large, nationwide outbreak in 2011. Kjersti Wik Larssen, muntlig presentasjon ved 7th International Conference on Tularemia, Beaver Run Resort Breckenridge Colorado, Sept 17-20, 2012.
- Comparison of four serological methods for the diagnosis of tularemia. Afset JE, Wik Larssen K, Solberg M and Bergh K. Poster presentasjon ved 7th International Conference on Tularemia, Beaver Run Resort Breckenridge Colorado, Sept 17-20, 2012.

Rapportering

Resultat av prøveanalyser rapporteres til rekvirent, og til MSIS ved nye positive funn. Dersom praktisk mulig informeres rekvirent per telefon samme dag ved positivt funn. I de tilfeller hvor vi treffer rekvirent på telefon ber vi om informasjon vedrørende type infeksjon, mistenkt smittested og smitemåte fra rekvirent.

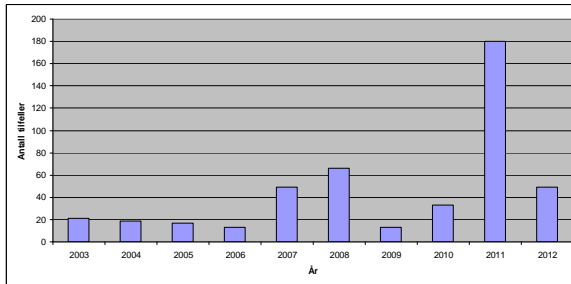
Informasjon og tilbakemelding

Informasjon om diagnostiske metoder ved referanselaboratoriet finnes tilgjengelig på Mikinfo, og vi planlegger å legge ut slik informasjon også på avdelingens hjemmeside (<http://www.stolav.no/mikrobiologi>).

Kommentarer til funn

Vi har som forventet i 2012 sett en betydelig reduksjon i antall prøver og positive funn i forhold til 2011 hvor vi opplevde det største utbruddet i Norge i moderne tid. Likevel var prøvetallet vesentlig høyere enn de foregående tre årene. Trolig skyldes dette både økt oppmerksomhet som følge av utbruddet året før, samt at det også i 2012 var relativt mange tularemi- tilfeller (Figur 1). Som vanlig var det mest prøver til serologisk analyse, men også et høyt antall prøver til PCR og dyrkning (Tabell 1). For de fleste tilfeller som ble meldt ble diagnosen stilt på grunnlag av funn ved serologi, enten ved påvist serokonversjon eller høyt titer i enkeltprøve kombinert med typisk klinisk bilde. For 14 av pasientene var det positivt funn i PCR (hovedsakelig abscessmateriale og sårsekret, men også en spinalvæske), mens det var funn ved dyrkning hos tre pasienter (to sårsekret og en fra spinalvæske/blod primært dyrket ved annet laboratorium).

Figur 1 Antall tularemi-tilfeller meldt til MSIS i siste 10-års periode



Tabell 1 Antall prøver analysert sammenlignet med tall fra foregående år.

	2008	2009	2010	2011	2012
Serologi	753	2616	1794	6919	3718
PCR	98	49	91	503	182
Dyrkning	49	36	40	214	133
Totalt	900	2701	1925	7636	4033

Referanser

- Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2009–2010.
http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_HSE_EPR_2008_10.pdf
- Forsendelse av smittefarlig biologisk materiale. Praktisk veileder.
<http://dsb.no/Global/Publikasjoner/2008/Tema/BiologiskMaterialeWEB%20kortutgaven%20mai%202008.pdf>
- Tomaso H, Scholz HC, Neubauer H, Al Dahouk S, Seibold E, Landt O, Forsman M, Splettstoesser WD. Real-time PCR using hybridization probes for the rapid and specific identification of *Francisella tularensis* subspecies tularensis. Mol Cell Probes. 2007;21:12-6.
- Appendix B1 Antimicrobial susceptibility (s81) i ”WHO Guidelines on Tularemia”, tilgjengelig via
<http://mikrobiologi.fhi.no/no/Prosedyrer/Prosedyrebok/Francisella-tularensis-/F-tularensis---referanser/>