

Ny diagnostik af bakterielle infektioner efter indførelse af øget biologisk beredskab

Overlæge Jens Jørgen E. Christensen, cand. scient. Keld Andresen & overlæge Michael Kemp

Statens Serum Institut, Afdeling for Klinisk Mikrobiologi

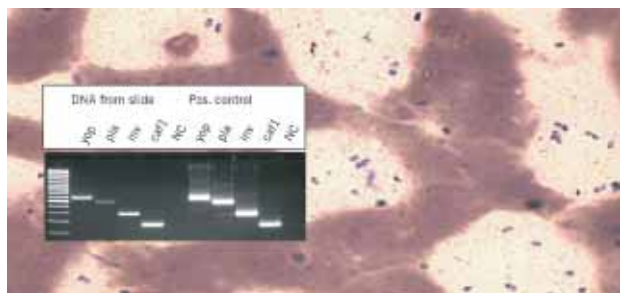
Som et led i det nationale biologiske beredskab over for biologisk terrorisme er der på Statens Serum Institut (SSI) indført en række nye analyser til påvisning af bakterier og virus, der traditionelt anses som potentielle biologiske kampstoffer [1]. For at kunne stille eksakte diagnoser hurtigst muligt og for at undgå de sikkerhedsproblemer, der er forbundet med opformering af særlig farlige bakterier, er der etableret immunologisk og molekylærbiologisk baserede undersøgelser. Samtidig er der sikret dyrkningsmuligheder i biosikkerhedsklasse 3-laboratorier.

De samlede tiltag har sikret tilgængelighed af hurtig og præcis diagnostik af bakterier, der er sjældent forekommende i Danmark, og som det kan være vanskeligt eller umuligt at undersøge i laboratorier, der ikke er specielt indrettet til det. Siden etableringen har der i øvrigt været en løbende efterspørgsel på disse ydelser, uden at der har været mistanke om forsætlig eller tilfældig spredning af disse organismer. I det følgende omtales eksempler, hvor nogle af de etablerede analyser har været anvendt.

Beskrivelse af de anførte molekylærbiologiske undersøgelser og detaljeret gennemgang af de enkelte bakterielle bioterrorrelevante muligheder kan ses på SSIs hjemmeside (www.ssi.dk) eller Center for Biologisk Beredskab (www.bioberedskab.dk).

Sygehistorier

I: *Yersinia pestis*. En 21-årig indfødt mand blev indlagt i Tanzania på mistanke om byldepest. Patienten havde en uge



Figur 1. Mikroskopipræparat fra et lymfeknudeaspirat fra en patient mistænkt for byldepest. Der ses talrige polymorfkærnede leukocytter og talrige bipolærtfarvede sikkerhedsnåls-lignende stave. Metylenblå farvning ved 400 × forstørrelse. Indsat: polymerasekædereaktion fra DNA ekstraheret fra præparatet og en positiv kontrol. Gelen viser tilstedeværelse af de plasmidbårne *Yersinia pestis* virulensgener *cafI*, *yopM* og *pla* samt det kromosomale *inv* gen (Foto: Lasse S. Vestergaard).

inden indlæggelsen rejst 250 km fra et område med forekomst af pest. I aspiratet fra lymfeknuder fandtes talrige bipolært farvede, sikkerhedsnåls-lignende stave (Figur 1). Patientens symptomer progredierede hurtigt med tegn på sepsis og fulminant lungeinfektion. Mors indtrådte få timer efter indlæggelsen. År senere blev der ekstraheret DNA fra det oprindelige mikroskopipræparat, og ved polymerasekædereaktion (PCR) påvist fire *Y. pestis*-specifikke sekvenser (Figur 1).

Kommentar

Pest er en hurtigt forløbende sygdom med meget høj mortalitet. Pest forekommer overvejende i den tropiske del af Asien, Afrika, Sydamerika og det vestlige USA. Gnavere er værter for *Y. pestis*, som kan overføres til mennesker via loppebid. Der ses 1.000-3.000 tilfælde årlig, langt overvejende i form af byldepest. Ved bioterrorrelateret, aerosoliseret brug vil lungepest og septikæmi formentlig være dominerende.

II: *Francisella tularensis*. En otteårig dreng var på Fur blevet bidt af flåt. Efterfølgende fik han symptomer, som var forenelige med harepest [2]. Fra en hævet inguinal lymfeknude påvist DNA fra *F. tularensis* ved PCR af 16S rRNA-genet og efterfølgende DNA-sekventering [3]. Artsdiagnosen blev konfirmeret ved påvisning af sekvenser, der er specifikke for *F. tularensis*. Samtidig fandtes der positiv serologi. Fra biopsien fremdyrkedes små gramnegative stave, som såvel fænotypisk som molekylærbiologisk blev identificeret som *F. tularensis*.

Kommentar

Harepest er ikke normalt forekommende i Danmark, og dette er det første tilfælde i nyere tid, hvor bakterien er dyrket efter smitte i dansk natur. Der er sandsynligvis tale om bakterier indført fra Norge eller Sverige, hvor der i 2003 var ekstraordinært mange tilfælde. Mennesker kan smittes ved direkte kontakt med dyr (eller dyreskind), som er værter for *F. tularensis*. Flåter og myg kan også overføre bakterien til mennesker ved bid. Smitte kan tillige forekomme ved indtagelse af kontamineret vand eller fødevarer og ved inhalation af aerosoler. Den i Skandinavien forekommende type giver sjældent alvorlige infektioner.

III: Obs. *Bacillus anthracis*. En 87-årig åndsfrisk, hjemmeboende pensionist modtog ultimo september 2001 et telegram med fødselsdagslykønskning underskrevet af det amerikanske præsidentpar og afsendt fra Det Hvide Hus den 15. september 2001. Efter en 14-dages-periode, hvor mange mennesker var blevet præsenteret for det nu indrammede telegram, mistænkte bioterrorrelateret aktivitet. En simpel forklaring på telegrammets oprindelse fandtes ikke umiddelbart, hvorfor

VIDENSKAB OG PRAKSIS | AKADEMISKE AFHANDLINGER

brevet blev sendt til undersøgelse primært mhp. udelukkelse af anthraxsporer.

I to et halvt døgn kunne anthrax ikke sikkert afkræftes, idet podning fra telegramoverfladen ved udsåning gav vækst af enkelte kolonier af bakterier, der ved indledende fænotypisk karakterisering var i overensstemmelse med denne diagnose. Ved yderligere fænotypisk karakterisering samt 16S rDNA-sekventering stilledes artsdiagnosen *Bacillus megaterium*, en kendt, apatogen, miljøbakterie. Den tonehaldagesperiode, over en week-end, hvor diagnosen var usikker, gav anledning til overvejelser omkring profylaktiske gøremål, hvor såvel Embedslægeinstitutionen som Sundhedsstyrelsen var involveret. Forklaringen på telegrammet var, at der i USA findes en ordning, hvor man mod indsendelse af mindre beløb til Det Hvide Hus, kan foranledige et lykønskningstelegram udsendt.

Kommentar

B. anthracis forekommer naturligt i jord overalt i verden. I Danmark har anthrax ikke været påvist i dyr siden 1988, og der har heller ikke været verificerede tilfælde blandt mennesker i mange år (>50 år). Ved ubehandlet inhalationsanthrax er dødeligheden >99%, mens fem ud af 11 patienter (45%) i forbindelse med anthraxterroren i USA i 2001 døde trods intensiv behandling [4]. Antibiotisk behandlet kutan anthrax har en dødelighed på få procent. Gastrointestinal anthrax er sandsynligvis altid dødelig, idet diagnosen er svær at stille i tide.

Burkholderia pseudomallei og Brucella melitensis

Undersøgelse for DNA fra *Burkholderia pseudomallei* har i et par tilfælde været anvendt på bronkoalveolær lavagevæske til udelukkelse af melioidose. I to tilfælde har man ved påvisning af artsspecifikke sekvenser fastslået identiteten af bakterier isoleret ved bloddyrkning som *Brucella melitensis*.

Kommentar

B. pseudomallei forekommer i jord og vand og foranlediger melioidose, som hyppigst ses i Sydøstasien og det nordlige Australien. Ved inhalation eller forurening af rifter giver den anledning til enten asymptomatisk, kronisk (tuberkulose-lignende) [5] eller fulminant infektion. Brucellose er en vigtig veterinær sygdom, som navnlig inficerer dyrs forplantningsorganer og derved forårsager abort og sterilitet. Dyreværter inkluderer geder, får, kvæg, rådyr, hunde, grise, kameler og mange andre. Mennesker smittes oralt ved indtagelse af upasteuriserede mælkeprodukter og ved tæt dyrekontakt.

Konklusion

De nævnte molekylærbiologiske undersøgelser er etableret som en del af beredskabet mod biologisk terrorisme og har endvidere vist sig at være anvendelige i tilfælde, hvor der ikke er mistanke om tilsigtet spredning. Det stående beredskab over for sjældent forekomne bakterielle infektioner har således fået en vigtig udbygning af de diagnostiske muligheder

som følge af oprustningen mod biologisk terrorisme. Dette diagnostiske beredskab vil sandsynligvis også fremover vise sig nyttigt i forbindelse med naturligt opståede eksotiske bakterieinfektioner i Danmark.

Korrespondance: Jens Jørgen E. Christensen, Statens Serum Institut, Bygn. 42, rum 126, DK-2300 København S. E-mail: jjc@ssi.dk

Antaget: 31. januar 2005
Interessekonflikter: Ingen angivet

Litteratur

1. Kemp M, Christensen JJ. Klinisk mikrobiologi og biologisk terror. Ugeskr Læger 2003; 165:1242.
2. Böcher S, Hertz B, Prag J et al. Dansk tilfælde af tularæmi. EPI-NYT 2003; uge 38.
3. Kemp M, Andresen K, Sørensen M et al. Ny diagnostik af infektioner: påvisning af bakterielt DNA med polymerasekædereaktion og identifikation ved DNA-sekventering. Ugeskr Læger 2004; 166:4351-4.
4. Jernigan JA, Stephens DS, Ashford DA et al. Bioterrorism-related inhalational Anthrax: the first 10 cases reported in the United States. Emerg Infect Dis 2001; 7:933-44.
5. Bremmelgaard A, Bygbjerg I, Høiby N. Microbiological and immunological studies in a case of human melioidosis diagnosed in Denmark. Scand J Infect Dis 1982; 14:271-5.

> AKADEMISKE AFHANDLINGER

Læge Lone Graff Stensballe:

Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection

Epidemiologic studies in a low- and a high-income setting

Ph.d.-afhandlingen, som udgår fra Bandim Health Project og Afdeling for Epidemiologisk Forskning, Statens Serum Institut, omhandler studier udført 1996-2004 i Guinea-Bissau, Vestafrika, og i Danmark og baseres på to publicerede artikler, en antaget artikel, et indsendt manuskript og et manuskript under udfærdigelse. Formålet med studierne var at studere risikofaktorer for alvorlig respiratorisk syncytialvirus (RSV)-infektion med fokus på forhold vedrørende transmission og den immunologiske tilstand hos værten. Vore studier viste

1. At den øgede sværhedsgrad af RSV-infektion hos drenge synes delvis at kunne tilskrives smitte fra moderen.
2. At BCG-vaccination og BCG-ar var associerede med en nedsat risiko for akut nedre luftvejsinfektion, herunder RSV-betinget nedre luftvejsinfektion.
3. At fremtidige danske epidemiologiske studier af RSV blandt spædbørn kan baseres på data fra Landspatientregisteret.
4. At disposition for astma og hvæsen og astma hos barnet øgede risikoen for indlæggelseskrævende RSV-infektion. Dette peger på, at mange børn, der får alvorlig RSV-infektion, allerede har hypersensitive luftveje.
5. At materielle RSV-neutraliserende antistoffer beskytter spædbørn, også spædbørn med astma, mod alvorlig RSV-infektion.
6. At materielle RSV-neutraliserende antistoffer er forbundet med øget risiko for tidlig astma blandt spædbørn.