

# Har ny teknologi overflødiggjort Grams farvemetode?

Dansk Selskab for Klinisk Mikrobiologi

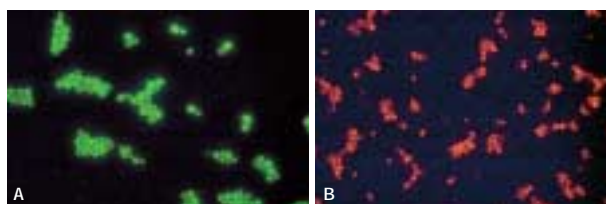
Overlæge Helle Krogh Johansen, adjunkt Thomas Bjarnsholt & professor Niels Høiby

Siden Gram publicerede sin farvemetode i 1884 har den været benyttet i alle bakteriologiske laboratorier verden over. Gramfarvningen opdeler bakterier i to store ubeslægtede grupper, de grampositive og de gramnegative. Denne inddeling har stor taksonomisk, identifikationsmæssig og klinisk betydning [1]. Imidlertid har gramfarvningen sine begrænsninger, da man med den kun kan artsidentificere ganske få bakterier ved direkte mikroskopi. For at få en endelig bakterieidentifikation er det nødvendigt med en dyrkningsperiode på 24-48 timer.

Blandt kliniske mikrobiologer har det længe været et ønske at få en metode, hvormed man kan stille artsdiagnosen på en mikroorganisme inden for få timer. Især inden for svampeområdet er der behov for hurtig diagnostik. Dels er det de mest syge patienter på hospitalet som får svampeinfektioner i blodet, dels har der været en markant stigning i azolresistensen i de senere år, hvorfor den anbefalede empiriske svampebehandling ofte er meget bredspektret [2].

En hurtig mikroskopisk metode til identifikation af hyppigt forekommende bakterier og svampe er kombination af fluoresceinmærket peptidnucleinsyre (PNA)-prober rettet mod rRNA i mikroorganismen til fluorescens in situ-hybridisering (PNA FISH). Der findes immunfluorescensmetoder til brug ved arter med ringe antigenvariation, f.eks. *Chlamydia trachomatis*, men ved arter med stor antigenvariation har denne metode ikke vundet indpas. PNA FISH kan benyttes direkte på blod fra en bloddyrkningskolbe, hvori der er påvist vækst af bakterier eller svampe, og som efterfølgende er fundet mikroskopipositiv ved gramfarvning. Det endelige artsvar med PNA FISH fås efter ca. to en halv time, hvor blodprøven bl.a. fikseres og hybridiseres med en specifik PNA-probe. Hvis denne metode benyttes, vil patienterne kunne sættes i korrekt antimikrobiel behandling meget hurtigt. Behandlingen må dog stadig baseres på lokale resistensforhold for de enkelte mikroorganismer, da resistensbestemmelse endnu ikke laves som hurtig diagnostik, men må afvente dyrkning.

Sensitiviteten og specificiteten af gramfarvning for grampositive bakterier er 91,3-99,7% og 99,3-99,8%, for gramnegative 92,1-98,7% og 98,9-100% og for svampe 97,8% og 100%. [3].



Figur 1. Peptidnucleinsyre-fluorescens in situ-hybridisering (PNA FISH) benyttet til diagnostik af A. *C. albicans* (grøn fluorescens) eller B. *C. glabrata* (rød fluorescens).

Sensitiviteten og specificiteten af PNA FISH for *Staphylococcus aureus* er 98,7% og 100%, for *Pseudomonas aeruginosa* 94,1% og 99,0%, for *Candida albicans* 98,7% og 100% og for *C. glabrata* 100% i begge tilfælde [4]. Sensitiviteten og specificiteten er således høj for begge farvemetoder; men fordelene ved PNA FISH sammenlignet med gramfarvningen er, at man med den kan give artsdiagnosen og dermed vejledning for definitiv antibiotikabehandling få timer efter, at bloddyrkingen viser vækst, mens gramfarvningen kun muliggør optimering af den empiriske antibiotikaterapi.

Grams farvemetode er stadig fundamentet i den diagnostiske kliniske mikrobiologi, idet den mere specifikke hybridiseringsdiagnostik, PNA FISH, ikke kan stå alene, men må vejledes af resultatet af gramfarvningen til valg af probe (Figur 1).

Korrespondance: Helle Krogh Johansen, Klinisk Mikrobiologisk Afdeling KMA, afsnit 9301, Laboratoriecentret, Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: hkj@cochrane.dk

Interessekonflikter: Ingen

## Litteratur

- Høiby N. Christian Grams berømte farvemetode. Ugeskr Læger 2007;169:2870.
- Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B et al. Semi-national surveillance of fungaemia in Denmark 2004-2006: increasing incidence of fungaemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. Clin Microbiol Infect 2008 Feb 22 (Epub ahead of print).
- Søgaard M, Nørgaard M, Schönheyder HC. First notification of positive blood cultures and the high accuracy of the Gram stain report. J Clin Microbiol 2007;45:1113-7.
- Shepard JR, Addison JR, Alexander BD et al. Multicenter evaluation of the *C. albicans*/*C. glabrata* PNA FISH method for simultaneous dual color identification of *Candida albicans* and *Candida glabrata* directly from blood culture bottles. J Clin Microbiol 2008;46:50-5.