

Ny diagnostik af infektioner: påvisning af bakterielt DNA med polymerasekædereaktion og identifikation ved DNA-sekventering

Overlæge Michael Kemp, projektforsker Keld Andresen, stud.scient. Majken Sørensen & overlæge Jens Jørgen Christensen

Statens Serum Institut, Afdeling for Klinisk Mikrobiologi

Resumé

Analysen af basesekvenser i gener, der koder for rRNA, benyttes med stort udbytte til identifikation af isolerede bakterier. Med *broad-range*-primere kan polymerasekædereaktion (PCR)-undersøgelser for bakterielle rRNA-gener udføres direkte på patientprøver, og artsbestemmelse kan udføres på det amplificerede DNA ved sekventering. Metoden er fortsat mere resursekrævende og har en lavere følsomhed end dyrkning. Endvidere giver den ikke direkte yderligere oplysninger om den enkelte bakteries egenskaber, som f.eks. antibiotikafølsomhed, hvorfor den skal ses som et supplement til og ikke en erstatning for dyrkning. Erfaringer med metoden er endnu begrænsede, men den synes ofte at kunne bidrage med eksakt bakteriologisk diagnose, hvor dyrkning af relevant patientmateriale giver negativt resultat, f.eks. pga. antibiotikabehandling og ved infektion med ikkedyrbare bakterier.

Sekvensanalyser af bakterielle rRNA-gener

Diagnostik af bakterielle infektioner udføres traditionelt ved udsåning af prøvemateriale på dyrkningsmedier med efterfølgende isolering og fænotypisk karakterisering af fremvoksende patogene bakterier. Anvendelse af molekylærbiologiske metoder til diagnostik af bakterielle infektioner er begrænset til situationer, hvor der er mistanke om infektioner med bakterier, der ikke eller kun langsomt vokser på standardmedier. Rutinemæssigt anvendes der således polymerasekædereaktionen (PCR) og andre genamplifikationsteknikker til undersøgelse for specifikke patogener som f.eks. bakterier, der forårsager atypisk pneumoni.

For 20-30 år siden indførtes der sekvensanalyser af baserne i DNA som et værktøj til at studere bakteriers udvikling og indbyrdes relation [1]. Man havde observeret, at der skete en tidsmæssig konstant langsom og tilfældig substitution af baser i gener, der koder for ribosomalt RNA i bakterier. Dette betyder, at graden af sekvenslighed mellem rRNA gensekvenserne i to bakterier, afspejler bakteriernes grad af beslægtethed.

Ændringerne i basesekvenserne sker ikke lige hurtigt i alle dele af rRNA-generne. Generne indeholder derfor områder, der er relativt varierede mellem konserverede områder. De konserverede områder udgør velegnede mål som bindings-

steder for primere, der kan benyttes til PCR-amplifikation af dele af rRNA-generne fra alle bakterier. Med sådanne universelle eller *broad-range*-primere kan der amplificeres DNA-stykker, der mellem de konserverede områder indeholder områder med stor variation. Analyser af basesekvensen i disse varierede områder er velegnet til sammenlignende formål. Fylogenetiske undersøgelser baseret på sammenlignende analyser af sekvenser i rRNA-generne har medført ændringer i opfattelsen af mange bakteriers indbyrdes relationer. Som en konsekvens af den mulighed, man vha. sekvensanalyser får for at kunne sammenligne bakterier, benyttes metoden også ved navngivning af bakteriearter. Til dette formål kan bestemmelse af basesekvenser i rRNA-generne dog ikke stå alene, men bruges sammen med fænotypisk karakterisering og DNA-DNA-hybridisering i såkaldt polyfasisk taksonomi.

Anvendelse af sekventering til artsidentifikation

Hvor DNA-sekventering tidligere var en langsommelig og arbejdskrævende metode, har den teknologiske udvikling gjort, at det i dag er muligt at foretage disse analyser hurtigt og i stort antal. Efterhånden som sekvenserne for rRNA-generne fastlægges for mange forskellige bakterieisolater, føjes de til kommercielle og offentlige databaser. Disse databaser kan udnyttes til identifikation af bakterier, idet sekvenser fra uidentificerede bakterier sammenlignes med kendte sekvenser i databaserne. Sikkerheden for korrekt artsidentifikation udført med basesekvensanalyse afhænger bl.a. af databasens størrelse og validitet og den diskriminative evne i forhold til andre arter for den pågældende bakterie i det aktuelle genområde. For eksempel er der blandt nogle streptokokarter så stor sekvenslighed i rRNA-generne, at de er vanskelige at adskille med sikkerhed. Man kan da benytte helt andre gener til artsidentifikation. Omvendt er der for nogle arter af bl.a. *Enterobacteriaceae* fundet meget varierende sekvenser inden for fænotypisk velkarakteriserede, relativt tæt beslægtede arter, hvilket medfører, at man må acceptere en identifikation trods forholdsvis lav sekvenslighed.

For sekventering af bakterielt DNA findes den største erfaring og dermed det bedste sammenligningsgrundlag i genet, der koder for 16S rRNA, og det er oftest i dette område, at der foretages sekvensbestemmelse til rutinebrug, specielt til identifikationsformål. Et vigtigt praktisk fund er, at for mange bakterier er sekventering af ca. 0,5 kb baser fuldt tilstrækkeligt til rutineidentifikation. Dette udgør en betydelig resurseffektivitet.

besparelse i forhold til bestemmelse af sekvensen i genets fulde længde på ca. 1,5 kb.

23S rRNA-genet er større (ca. 2,5 kb) og har større variation end 16S rRNA-genet. Derfor kan man ved sekvensanalyser i dette gen bedre skelne mellem arter.

Sekventering af 23S rRNA- og 16S rRNA-generne benyttes specielt ved isolater, der er vanskelige at identificere med traditionelle metoder. Erfaringerne med metoden er gode [2].

Analyse af patientprøver

Ved at benytte *broad-range*-primere direkte på patientprøver, er det muligt at undersøge for bakterielt DNA i prøven. Ved et positivt resultat kan det amplificerede DNA sekventeres, og identiteten af den inficerende bakterie fastslås. Det er derfor muligt at påvise bakterier, selv hvis bakterierne ikke kan dyrkes. *Broad-range*-amplifikation af 16S rRNA-DNA og efterfølgende sekventering er bl.a. blevet brugt til at identificere det ætiologiske agens ved bacillær angiomatose, human erlikiose og Whipples sygdom.

Den seneste udvikling i genamplifikations teknikker giver nye muligheder, som f.eks. kvantificering af relevant DNA ved realtids-PCR. Rutinemæssig PCR med *broad-range*-primere og efterfølgende sekventering direkte på patientprøver rummer dog også nogle begrænsninger, sådan som det udføres i dag. Metoden er ikke mere følsom end dyrkning, alene af den grund, at der kun udføres PCR på DNA oprenset fra et lille volumen af prøvematerialet. Selv dyrkningspositive prøver kan derfor være negative bedømt ved PCR. Ved infektion med mere end en bakterie kan der ikke udføres sekventering uden forudgående adskillelse af det amplificerede DNA fra de enkelte arter, hvilket ikke gøres rutinemæssigt. Som følge heraf giver metoden heller ikke mulighed for at udvælge patogene bakterier til videre karakterisering ved tilstedeværelse af normalflora. Der findes tekniske løsninger på disse problemer, men de er endnu ikke implementeret på rutineplan. Endelig fastlægges de inficerende bakteriers følsomhed for antibiotika ikke ved metoden. For bakterier, der kan have varierende resistensmønstre, kan det derfor i fremtiden blive relevant at udvikle hurtige genetiske analyser til undersøgelse for resistensegenskaber [3].

Resultater af PCR og sekventering anvendt på kliniske prøver

Mens der er talrige kasuistiske beretninger om diagnostik af bakterielle infektioner med PCR med *broad-range*-primere, er der endnu forholdsvis få samlede opgørelser af større serier af undersøgelser, hvor teknikken har været anvendt. *Rantakokko-Jalava et al* har opgjort resultatet af 536 kliniske prøver fra forskellige anatomiske lokalisationer indsendt til PCR for bakterier [4]. I alt 75 prøver fandtes positive; af disse havde 30 negativt dyrkningsresultat. I 16 PCR-negative prøver fandtes vækst af patogene bakterier. Overordnet var der god overensstemmelse mellem identifikation ved sekventering og ved

dyrkning. Det konkluderedes, at PCR og sekventering er særlig velegnet ved infektioner med bakterier med usædvanlige vækstkrav og på prøver taget under pågående antibiotisk behandling.

I et amerikansk studie af uforklaret død og kritisk sygdom anvendtes *broad-range*-PCR og sekventering på dyrkningsnegative prøver fra normalt sterile områder fra 46 patienter med et klinisk billede, der tydede på infektion, uden at diagnosen kunne bekræftes ved dyrkning [5]. Hos seks patienter fandtes en sandsynlig ætiologi i cerebrospinalvæske, pleuravæske eller knoglemarv. Alle seks patienter var i antibiotikabehandling på prøvetagningstidspunktet.

Infektios endokardit (IE)

Infektios endokardit (IE) udgør et oplagt mål for PCR til påvisning og identifikation af bakterier. Ved IE kan der være tale om bakterier, der ikke eller sjældent vokser under standarddyrkningsbetingelser. Ved *Broad-range*-PCR efterfulgt af sekventering har man påvist IE forårsaget af bl.a. *Coxiella burnetii*, *Tropheryma whippelii*, *Bartonella quintana* og *Bartonella henselae* samt *Granulicatella elegans* (defekte streptokokker) i dyrkningsnegative tilfælde.

Gaudochon et al foretog PCR og sekventering på reseceret klapmateriale fra 29 patienter med histologisk konfirmeret IE. Hos 27 var PCR positiv, og sekventering af det amplificerede DNA resulterede i identifikation af bakterier i overensstemmelse med bakteriemorfologi eller antistofundersøgelser ved histologi [6]. I tre tilfælde af positiv PCR-reaktion var dyrkningerne negative, og i andre tre blev den bakteriologiske diagnose korrigeret på basis af sekventeringen. Af de to PCR-negative tilfælde kunne der dyrkes enterokokker i det ene, mens det andet forblev negativt ved dyrkning og uden påviselige bakterier ved histologi. I et studie fra 1997 blev 18 resecerede hjerteklapper fra patienter med IE undersøgt ved PCR [7]. For to patienter var der overensstemmelse med dyrkninger fra klapperne, mens der i ni tilfælde, hvor der ikke kunne dyrkes fra det resecerede materiale, var overensstemmelse med tidligere bloddyrkninger. I to tilfælde kunne den bakteriologiske diagnose kun stilles ved PCR. PCR var negativ i to tilfælde med negativ dyrkning fra klapper, men med tidligere positive bloddyrkninger; i et tilfælde var der hæmning af PCR-reaktionen, og i to tilfælde kunne det amplificerede DNA ikke sekventeres.

Da fastlæggelse af ætiologien ved IE er væsentlig for korrekt antibiotisk behandling, vil udvidede diagnostiske muligheder give vigtige klinisk relevante oplysninger. Flere forfattere har foreslået, at påvisning af bakterielt DNA i blod eller bortopererede hjerteklapper kan indgå som diagnostisk kriterium for IE [7-9].

Infektioner i centralnervesystemet

Ved bakteriel meningitis er prompte antibiotikabehandling afgørende for prognosen, men relevant prøvetagning bliver

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

ikke altid udført inden behandlingen påbegyndes. For at behandlingen kan målrettes, er det nødvendigt at fastslå det infektiøse agens. *Kotilainen et al* fandt positiv PCR med *broad-range*-primere i cerebrospinalvæske fra fem af 46 patienter mistænkt for at have bakteriel meningitis [10]. Hos alle fandtes sekvenslighed i det amplificerede DNA med *Neisseria meningitidis*. Undersøgelse af cerebrospinalvæske fra en patient, fra hvem der kunne dyrkes *Listeria monocytogenes*, var negativ ved PCR. *Dicuonzo et al* undersøgte dyrkningsnegative cerebrospinalvæsker fra 126 patienter med 16S rRNA *broad-range*-primere [11]. De fandt bakterielt DNA i prøver fra seks patienter med formodet akut meningitis. Sekventering resulterede i identifikation af *Streptococcus pneumoniae* i tre tilfælde, *Neisseria meningitidis* i to og *Acinetobacter species* i et. Sidstnævnte var fra en neurokirurgisk patient, der senere fik påvist *Acinetobacter baumannii* ved dyrkning. I et finsk arbejde undersøgte pus og væv udtaget fra 44 patienter ved neurokirurgisk operation for intracerebral absces eller spondylitis [12]. Hos 17 kunne en endelig bakteriologisk diagnose etableres. Af disse var der seks med positivt resultat både ved dyrkning og ved PCR/sekventering, fem var kun positive ved dyrkning, og seks var negative ved dyrkning, men havde positivt PCR-resultat. De sidstnævnte var alle taget under igangværende antibiotisk behandling og indbefattede en hjerneabsces forårsaget af *Mycoplasma hominis*, som normalt ikke dyrkes under rutinebetinger.

Blod

Bloddyrkning er generelt en langt mere følsom metode til at påvise bakteræmi end PCR. Direkte sammenligning mellem de to metoder er vanskelig pga. kontaminationsrisiko ved begge, tolkning af betydningen ved fund af lavpatogene bakterier mv. I specielle situationer er det dog fundet, at PCR kan anvendes med fordel.

Kritisk syge patienter på intensiv afdeling har ofte tegn på bakterielle infektioner og er i behandling med antibiotika. *Sleigh et al* supplerede knap 200 rutinebloddyrkninger med PCR-undersøgelser af fuldblod på en stor intensiv afdeling [13]. Undersøgelsen rummede mange tolkningsproblemer, men overordnet var det forfatterens konklusion, at PCR på denne patientgruppe var omtrent dobbelt så effektivt som bloddyrkning til at påvise bakteræmi. I en anden undersøgelse fandt man endnu højere positivrate for PCR for bakterielt DNA i blod i bloddyrkningsnegative kritisk syge kirurgiske patienter [14]. PCR og bloddyrkning blev benyttet til at undersøge for bakteræmi hos 51 febrile intravenøse stofmisbrugere [15]. Hos 13 fandtes begge undersøgelser positive, fire var kun positive ved PCR og to kun ved bloddyrkning.

Også hos patienter med neutropeni er bloddyrknings ofte negative efter påbegyndt antibiotikabehandling. Bloddyrkning og PCR blev sammenlignet i en gruppe neutropene børn [16]. Af 111 febrile episode fandtes positiv bloddyrkning i 17

Tabel 1. Eksempler, hvor PCR- og DNA-sekventering har haft væsentlig betydning for diagnostisk udredning og behandling.

Patient nr./episode	Materiale	Dyrkning	Molekylærobiologisk identifikation	Andre relevante dyrkningsfund	Kommentar
1	Cerebrospinal væske	Negativ	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i> i bloddyrkning	Klinisk og biokemisk meningitis
2	Cerebrospinal væske	Negativ	To forskellige Streptokokarter, den ene sandsynligvis <i>S. pneumoniae</i>	<i>S. sanguis</i> i bloddyrkning	Klinisk meningitis, patienten var tidligere behandlet for infektiøs endocarditis
3	Hjerteklap	Negativ	<i>Streptococcus bovis</i>		Patienten var indlagt med infektiøs endocarditis. Pga. relationen mellem <i>S. bovis</i> og tyktarmskræft blev der foretaget undersøgelse af colon og fundet en ikke tidligere mistænkt tumor
4	Blod/urin (ved anaerob udsåning)	Grampositive anaerobe stave	<i>Actinobaculum schaalii</i>		Indlagt med urosepsis. Fænotypisk karakterisering af bakterien tydede på <i>Actinomyces meyerii</i> . <i>Actinobaculum schaalii</i> er en sjælden fundet anaerob bakterie, som dog tidligere er beskrevet som årsag til urinvejsinfektion
5/1	Blod	Grampositive stave	<i>Nocardia oititidiscaviarum</i>		Patienten havde malignt lymfom. CT-resultater af cerebrum var forenelige med cerebrale lymfomer. Bedring i almentilstanden efter antibiotikabehandling rettet mod den fundne bakterie
5/2	Intraabdominal absces	Negativ	<i>Nocardia oititidiscaviarum</i>		Efter overgang til peroral behandling atter regression i tilstanden. Eksplorativ laparotomi pga. akut abdomen. Under efterfølgende antibiotisk behandling bedredes almentilstanden atter og de cerebrale CT-forandringer aftog. Pga. af progression grundmorbus indstilledes behandlingen
6	Lymfeknude	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Francisella tularensis</i>		Diagnosen primært stillet ved PCR/sekventering, efterfølgende bekræftet med påvisning af flere artsspecifikke gener ved PCR. Fra materialet blev senere fremdyrket <i>F. tularensis</i> . Positiv serologi

VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

tilfælde. PCR kunne udføres på prøver fra 11 af disse episoder og var positiv i de ni. Der var overensstemmelse mellem bakterieidentifikation ved de to metoder. I tilgift fandtes bakterielt DNA i prøver fra 20 dyrkningsnegative episoder; heraf var der behandlet med antibiotika i de 18.

Hos små børn er bakteræmi ofte realiteret til større bakterietæthed end hos voksne, og det blodvolumen, der kan tages til undersøgelse, er selvsagt begrænset. *Jordan & Durso* sammenlignede PCR med standardbloddyrkning i næsten 550 parrede prøver fra neonatale [17]. Til PCR blev 200-500 µl blod, som var tilovers efter biokemisk analyse, præinkuberet fem timer i dyrkningmedium inden analysen blev udført. Der var stor overensstemmelse i resultaterne af de to anvendte metoder.

Led- og knogleinfektioner

I et studie på 154 ledvæsker fandtes der ingen gevinst af at supplere almindelig bakteriologisk undersøgelse med *broad-range*-PCR [18]. Man hæftede sig ved, at der ikke i disse prøver kunne påvises ikkedyrkbare bakterier. Sidstnævnte konklusion blev også draget i en undersøgelse af 227 uselektede, konsekutivt taget ledvæskeprøver sendt til rutinedyrkning i København [2]. Her fandtes 14 prøver positive ved både dyrkning og PCR, tre var udelukkende positive ved PCR, og syv var positive ved dyrkning, men negative ved PCR-undersøgelse. I et tilfælde kunne en hæmolytisk streptokok påvises ved PCR i en prøve, men først ved fornyet punktur tre uger senere kunne bakterien dyrkes. I dette studie var der overensstemmelse mellem bakterieidentifikation ved dyrkning og ved DNA-sekventering, når begge undersøgelser var positive.

Positivt resultat af dyrkning og 16S rRNA-genamplifikation fra reviderede hoftealloplastikker fra 120 patienter var henholdsvis 22% og 72% i en undersøgelse [19]. Der blev ikke foretaget sekvensanalyser af det amplificerede DNA.

Andre materialer

Listen over patientprøver, der har været undersøgt med PCR for bakterier, vokser til stadighed. Metoden har med held været appliceret til udredning af endoftalmi, interstitiel cystitis og infektioner i amnionvæske.

Egne erfaringer

DNA-sekventering i 16S- og 23S rRNA-generne har været brugt i tiltagende grad i de seneste år til identifikation af udvalgte kliniske isolater sendt til referencelaboratoriet på Afdeling for Klinisk Mikrobiologi på Statens Serum Institut. Erfaringerne med metoden er gode, idet der har været betydelig diagnostisk gevinst [2]. I det seneste år er metoden gradvist taget i brug til direkte undersøgelse af kliniske prøver.

I **Tabel 1** er der vist eksempler, hvor PCR- og DNA-sekventering har haft væsentlig betydning for diagnostisk udredning og behandling. Sygehistorierne er kun summarisk gennem-

gået, idet de er blevet eller vil blive publiceret i detaljer ved anden lejlighed.

Korrespondance: *Michael Kemp*, Afdeling for Klinisk Mikrobiologi, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, DK-2300 København S. E-mail: MKE@SSI.dk

Antaget: 23. juni 2004

Interessekonflikter: Ingen angivet

Litteratur

1. Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB et al. The phylogeny of prokaryotes. *Science* 1980;209:457-63.
2. Moser C, Andresen K, Kjerulf A et al. Molekylærbiologisk diagnostik ved KMA. *Statens Serum Institut. Nyt om Mikrobiologi* 2003;62:12-5.
3. Boissinot M, Bergeron MG. Toward rapid real-time molecular diagnostic to guide smart use of antimicrobials. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:478-82.
4. Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* 2000;38:32-9.
5. Nikkari S, Lopez FA, Lepp PW et al. Broad-range bacterial detection and the analysis of unexplained death and critical illness. *Emerg Infect Dis* 2002;8:188-94.
6. Gauduchon V, Chalabreysse L, Etienne J et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *J Clin Microbiol* 2003;41:763-6.
7. Goldenberger D, Kunzli A, Vogt P et al. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 1997;35:2733-9.
8. Lisby G, Gutschik E, Durack DT. Molecular methods for diagnosis of infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* 2002;16:393-412.
9. Millar B, Moore J, Mallon P et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis – a new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis* 2001;33:673-80.
10. Kotilainen P, Jalava J, Meurman O et al. Diagnosis of meningococcal meningitis by broad-range bacterial PCR with cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1998;36:2205-9.
11. Dicuonzo G, Lorino G, Lilli D et al. Polymerase chain reaction, with sequencing, as a diagnostic tool in culture - negative bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect* 1999;5:92-6.
12. Kupila L, Rantakokko-Jalava K, Jalava J et al. Aetiological diagnosis of brain abscesses and spinal infections: application of broad range bacterial polymerase chain reaction analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:728-33.
13. Sleight JW, Cursons RT, La Pine M. Detection of bacteraemia in critically ill patients using 16S rDNA polymerase chain reaction and DNA sequencing. *Intensive Care Med* 2001;27:1269-73.
14. Kane TD, Alexander JW, Johanningham JA. The detection of microbial DNA in the blood. *Ann Surg* 1998;227:1-9.
15. Rothman RE, Majmudar MD, Kelen GD et al. Detection of bacteraemia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis* 2002;186:1677-81.
16. Ley BE, Linton CJ, Bennett DM et al. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:247-53.
17. Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteraemia. *J Clin Microbiol* 2000;38:2574-8.
18. Jalava J, Skurnik M, Toivanen A et al. Bacterial PCR in the diagnosis of joint infection. *Ann Rheum Dis* 2001;60:287-9.
19. Tunney MM, Patrick S, Curran MD et al. Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1999;37:3281-90.