

Klinisk betydende forandringer i mikrobiologisk diagnostik

Michael Kemp

PROFESSOR- TILTRÆDELSES- FORELÆSNING

Klinisk Mikrobiologisk
Afdeling, Odense
Universitetshospital

Identifikation og karakterisering af mikroorganismer fra patienter med infektionssygdomme er et centralt punkt i klinisk mikrobiologi. Det er det klinisk mikrobiologiske laboratoriums opgave så hurtigt og præcist som muligt at tilvejebringe relevante beskrivelser af infektiøse agens med betydning for behandling af den enkelte patient. Karakterisering af påviste mikroorganismer danner hyppigt basis for foranstaltninger mod videre spredning. Dermed har laboratoriediagnostikken hos den enkelte patient også en vigtig samfundsmæssig funktion.

Dyrkning er den grundlæggende teknik til påvisning af bakterier. Dyrkning er enkel, billig, oftest rimelig hurtig og muliggør karakterisering af isolerede bakterier ved f.eks. resistensbestemmelse over for forskellige antibiotika. Dyrkning har dog også visse begrænsninger. En del bakterier vokser ikke eller kun langsomt under standardbetingelser, nogle rummer risiko for smitte af det personale, der håndterer dem, og for nogle bakterier kan der ikke opnås god sikkerhed i identifikationen ved dyrkningsbaserede metoder alene.

Den teknologiske udvikling har muliggjort en række ændringer i de diagnostiske muligheder inden for klinisk bakteriologi de seneste ti år. Anthraxbrevene i USA og andre terroranslag i starten af dette årtusinde bidrog til at katalysere udnyttelsen af disse nye muligheder på Statens Serum Institut. Med øn-



Udviklingen i diagnostisk mikrobiologi har gennem de seneste ti år givet bedre og hurtigere identifikation af bakterier, herunder bakterier, der ikke kan dyrkes in vitro. Samtidig øges den klinisk relevante funktionelle karakterisering af bakterier til stadighed. Disse fremskridt kommer behandlingen af den enkelte patient til gode og skaber ny basal viden om infektionssygdomme.

sket om et bedre beredskab mod biologisk terrorisme blev der stillet krav om bedre, hurtigere og sikrere diagnostiske procedurer ved mistanke om tilsigtet frigivelse af mikroorganismer [1]. I løbet af kort tid blev der etableret molekylærbiologiske og immunologiske metoder til supplerende af de eksisterende dyrkningsbaserede teknikker til identifikation og karakterisering af bakterier, der kunne anvendes som biologiske våben [2, 3]. Det viste sig forholdsvis hurtigt, at der eksisterede et udækket behov for disse analyser – ikke kun i forbindelse med beredskab over for forsætlig spredning, men også i den daglige diagnostik af danske patienter, der naturligt havde pådraget sig infektioner, der kunne associeres med biologisk terror. Eksempelvis kan mennesker få harepest i den danske natur, og danske rejsende kan få melioidose under udlandsophold [4], ligesom danskere kan få brucellose efter indtagelse af mad tilberedt i udlandet.

Netop laboratoriediagnostik af brucellose er et godt eksempel på fordelene ved de nye teknologier. Med artsspecifikke polymerasekædereaktion (PCR)-analyser indledes undersøgelsen af patientmateriale eller en isoleret bakterie med ekstraktion af DNA, hvilket giver et ufarligt produkt for det videre arbejde, og i løbet af få timer foreligger der en eksakt artsdiagnose. Ved brucellose er hurtig, sikker og korrekt diagnose vigtig, ikke blot for behandlingen af den enkelte patient, men også for eksponeret personale i de laboratorier, hvor man primært har håndteret bakterien, og for udredning af andre muligt eksponerede personer i patientens omgangskreds. Erfaringerne fra etablering af analyser til undersøgelser for biologiske kampstoffer blev benyttet til udvikling af analyser for andre sjældne ikkedyrbare bakterier, der forårsager sygdomme som rickettsioser, ulcus molle [5] og Whipples sygdom. Med anvendelse af de nye analyser fandt man, at disse relativt upåagtede infektionssygdomme forekommer hos danske patienter. Med stigende rejseaktivitet og generel internationalisering i samfundet får de nye analyser for sjældne infektionssygdomme til stadighed større relevans.

I løbet af det seneste tiår er der gradvist indført identifikation af bakterier ved sekventering af DNA [6, 7]. Denne teknologi betyder, at man for nogle bakteriearters vedkommende kan opnå en både hur-

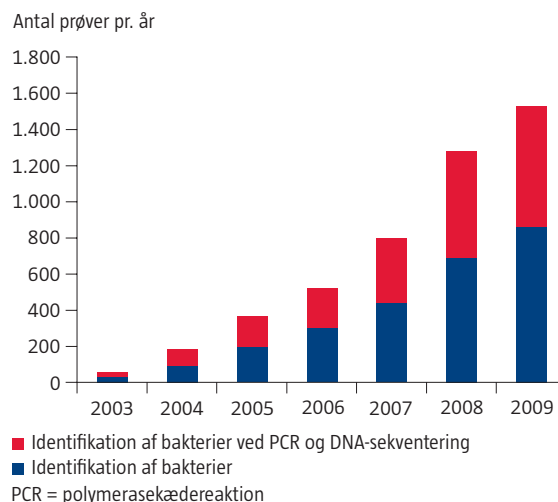
tigere og mere præcis identifikation, end det er muligt med dyrkningsbaserede teknikker alene. Brug af DNA-sekventering har ført til påvisning af en række i Danmark hidtil upågtede bakterieinfektioner [8-11]. Eksakt identifikation med konventionelle metoder kan for nogle bakterier tage uger. Med DNA-sekventering opnås bakteriediagnosen på en til to dage, dvs. mens det stadig har betydning for behandlingen af den enkelte patient. Dermed bliver præcis identifikation af disse bakterier klinisk relevant, hvilket er et vigtigt fremskridt i klinisk mikrobiologi. Indførelse af DNA-sekventering til rutinebrug i klinisk diagnostik bidrog til påvisning af, at mange bakterier, der tidligere var anset for at være apatogene, rent faktisk kan forårsage infektioner hos mennesker. For nogle, som f.eks. den urinvejspatogene bakterie *Actinobaculum schaalii*, viste det sig, at der ikke var tale om sjældne infektioner [12]. Bakterien stiller særlige krav til atmosfæren for dyrkning in vitro og kan findes relativt hyppigt, hvis prøvematerialet blot inkuberes under passende betingelser. Som illustreret med dette eksempel bidrog DNA-sekventering, der var indført som et diagnostisk hjælpemiddel til gavn for den enkelte patient, til en dybere forståelse af årsager til infektionssygdomme.

Sekventering af DNA fra bakterier kræver ikke opformering af levende celler. Ved dyrkningsnegative infektioner kan man med PCR kopiere bakterielt DNA direkte fra patientprøver og efterfølgende identificere, hvilke bakterier der er tale om ved DNA-sekventering af det opformerede DNA [13]. Siden påvisning og identifikation af bakterielt DNA i klinisk prøvemateriale blev indført som rutineanalyse har der været en støt stigende efterspørgsel (Figur 1). Ud over at tilvejebringe en ellers uopnåelig bakteriologisk diagnose hos den enkelte patient har metoden skaffet viden om, hvilke bakterier der i Danmark forårsager infektioner, fra hvilke bakterierne ikke kan dyrkes. Med metoden er der gjort mange uventede fund [14, 15]. Blandt de mere opsigtsvækkende var påvisning af Q-feber – en sygdom, der associeres med varme lande – i Grønland [16]. Seksuelt overførbare bakterier som *Treponema pallidum* og *Neisseria gonorrhoeae* er med metoden fundet som uventede årsager til led- og knogleinfektioner. Hundebidsbakterien *Capnocytophaga canimorsus*, der mest associeres med akutte sepsisstilstande, er flere gange fundet som årsag til langvarige vaskulære infektioner. Ekstrapulmonal tuberkulose er primært påvist med denne metode i flere tilfælde i Danmark.

Selv om der med metoden er påvist infektioner med organismer, der ikke kan dyrkes under standardbetingelser, som f.eks. *Coxiella burnetii*, *Bartonella quintana*, og *Mycoplasma*-arter, skyldes langt de fle-

FIGUR 1

Antal udførte undersøgelser for bakterielt DNA på klinisk prøvemateriale. Søjlerne er opdelt i undersøgelser, der førte til identifikation af en bakterie i prøvematerialet, og prøver, der var negative eller nonkonklusive ved identifikation.



ste infektioner, som påvises med metoden, velkendte bakterier, der er associeret med de i hvert enkelt tilfælde aktuelle kliniske manifestationer. Analysen blev i begyndelsen mest brugt ved alvorlige og dramatiske infektionssygdomme som meningitis, media-stenitis og endokarditis, men har senere vist sin værdi også ved andre typer af infektioner, herunder ikke mindst i knogler og led. Muligheden for en hurtig rutinemæssig generel påvisning og identifikation af bakterier i dyrkningsnegativt klinisk prøvemateriale repræsenterer yderligere en grundlæggende nyskabelse i dansk klinisk mikrobiologi [17].

Siden rutinemæssig DNA-sekventering blev indført, har modifikationer af eksisterende metoder og indførelse af nye teknikker løbende medført forbedringer i de diagnostiske muligheder, men en grundlæggende, klinisk betydende omvæltning i diagnostikken skete først igen, da det for et par år siden blev muligt rutinemæssigt at benytte massespektrometri (MS) til lynhurtig identifikation af bakterier. Med MS kan endelige bakteriediagnoser stilles på minutter på bakterier, der er isoleret fra dyrkningsplader eller fra flydende medier som bloddyrkningsflasker og i nogle tilfælde endog direkte på prøvemateriale fra patienter [18]. MS muliggør således akut mikrobiologisk diagnostik af hidtil uset hurtighed og har fundamentalt ændret diagnostisk bakteriologi for tredje gang inden for mindre end ti år. Der forestår dog et stort arbejde med etablering af databaser for MS-spektre fra kendte bakteriearter, inden man med MS kan opnå samme præcision som med DNA-sekventering.

Parallelt med den udvikling, der er foregået inden for identifikation af bakterier, er der sket en molekylærbiologisk udvikling til klinisk relevant karak-



FAKTABOKS

Indførelse af DNA-sekventering og massespektrometri til præcis og hurtigt identifikation af mikroorganismer har ligesom molekylærbiologisk identifikation af mikroorganismer i dyrkningsnegative prøver betydet en omvæltning i mikrobiologisk diagnostik.

Isolerede og identificerede bakterier bliver i stigende grad rutinemæssigt yderligere karakteriseret med analyser for klinisk relevante virulensfaktorer.

Den teknologiske udvikling har medført hurtigere og bedre diagnostik både til gavn for målrettet behandling af den enkelte patient og for forståelsen af infektionssygdommens patologi og epidemiologi.

terisering af identificerede bakterier. Det kan være relativt simple metoder til undersøgelse af, om en isoleret bakteriestamme har bestemte egenskaber; blandt andet om det har potentiale til at producere toksin som f.eks. *Corynebacterium diphtheriae* eller *Clostridium botulinum*, eller en resistensegenskab som resistens over for methicillin hos *Staphylococcus aureus*. I andre tilfælde er mere komplicerede analyser nødvendige for at bestemme bakteriers patogene potentiale. Eksempelvis kræver gruppering af diarefremkaldende *Escherichia coli* og evt. efterfølgende nærmere karakterisering af toksingener hos verotoksinproducerende *E. coli* (VTEC) en kombination af flere analyser. Relevant karakterisering af bakterier er et vigtigt redskab i den kliniske beslutningsproces; i eksemplet VTEC bl.a. for at kunne fastslå risikoen for udvikling af hæmolytisk uræmisk syndrom ved antibiotikabehandling af inficerede patienter. Klinisk relevant virulenskarakterisering af bakterier kan føre til nye erkendelser. Således var det en rutinemæssig fastlæggelse af en toksingenprofil, der gav mistanke om det første rapporterede tilfælde af infektion med *Clostridium difficile* af typen 027 herhjemme [19]. Mange sådanne karakteriseringer af bakterier isoleret fra patienter blev for relativt få år siden betragtet som avancerede specialanalyser, der mest var interessante i forskningssammenhæng. I dag udføres stadig flere klinisk relevante karakteriseringer som standard.

Udviklingen inden for identifikation og yderligere karakterisering af bakterier er et eksempel på, hvordan grundvidenskabelige fremskridt fører til nye kliniske procedurer. Et vigtigt afkast ved anvendelsen af disse er opnåelse af ny basal forståelse af infektionssygdommens epidemiologi og patogenese.

KORRESPONDANCE: Michael Kemp, Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Odense Universitetshospital, 5000 Odense.

E-mail: michael.kemp@ouh.regionsyddanmark.dk

ANTAGET: 29. november 2010

INTERESSEKONFLIKTER: Ingen

Artiklen er skrevet på basis af forfatterens professortilrædelsesforelæsning for at belyse aktive frontlinjeforskningsområder i Danmark.

LITTERATUR

1. Kemp M, Christensen JJ. Klinisk mikrobiologi og biologisk terror. Ugeskr Læger 2003;165:1242.
2. Andresen K, Dargis R, Kemp M et al. Detection of *Burkholderia pseudomallei* by SYBR Green real time PCR. The Open Pathology Journal 2009;3:30-2.
3. Christensen JJ, Andresen K, Kemp M. Ny diagnostik af bakterielle infektioner efter indførelse af øget biologisk beredskab. Ugeskr Læger 2005;167:3416-7.
4. Badran S, Pedersen TI, Roed C et al. Imported melioidosis in Danish travellers: a diagnostic challenge. Scand J Infect Dis 2010;42:445-9.
5. Holst H, Hartmann-Petersen S, Dargis R et al. Ulcus molle. Ugeskr Læger 2007;169:2124.
6. Christensen JJ, Andresen K, Justesen T et al. Ribosomal DNA sequencing: experiences from use in the Danish National Reference Laboratory for Identification of Bacteria. APMIS 2005;113:621-8.
7. Nielsen XC, Justesen US, Dargis R et al. Identification of clinically relevant non-hemolytic Streptococci on the basis of sequence analysis of 16S-23S intergenic spacer region and partial *gdh* gene. J Clin Microbiol 2009;47:932-9.
8. Abdul-Redha RJ, Balslew U, Christensen JJ et al. Globicatella sanguinis bacteraemia identified by partial 16S rRNA gene sequencing. Scand J Infect Dis 2007;39:745-8.
9. Abdul-Redha RJ, Prag J, Sonksen UW et al. Granulicatella elegans bacteraemia in patients with abdominal infections. Scand J Infect Dis 2007;39:830-3.
10. Ibler K, Truberg JK, Østergaard C et al. Six cases of *Aerococcus sanguinicola* infection: clinical relevance and bacterial identification. Scand J Infect Dis 2008;40:761-5.
11. Justesen US, Holt HM, Thiessen HC et al. Report of the first human case of *Caulobacter* sp. infection. J Clin Microbiol 2007;45:1366-9.
12. Reinhard M, Prag J, Kemp M et al. Ten cases of *Actinobaculum schaalii* infection: clinical relevance, bacterial identification, and antibiotic susceptibility. J Clin Microbiol 2005;43:5305-8.
13. 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.
14. Holst H, Salling N, Andresen K et al. Detection of anaerobic prosthetic joint infection by PCR and DNA sequencing – a case report. Acta Orthop 2008;79:568-70.
15. Kemp M, Holtz K, Andresen K et al. Demonstration by PCR and DNA sequencing of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* as a cause of joint infection and isolation of the same organism from a surface swab specimen from the patient. J Med Microbiol 2005;54:689-91.
16. Koch A, Svendsen CB, Christensen JJ et al. Q fever in Greenland. Emerg Infect Dis 2010;16:511-3.
17. Kemp M, Jensen KH, Dargis R et al. Routine ribosomal PCR and DNA sequencing for detection and identification of bacteria. Future Microbiology 2010;5:1101-7.
18. Hartmeyer GN, Jensen AK, Bocher S et al. Mass spectrometry: Pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. Scand J Infect Dis 2010;42:716-8.
19. Søes L, Mølbak K, Strøbbæk S, et al. The emergence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Denmark - a possible link with the increased consumption of fluoroquinolones and cephalosporins? Euro Surveill 2009;14:19176.