

# Når bakterien skal afsløres hurtigt

*Jo hurtigere, man kan afsløre hvilken bakterie, der er skyld i en infektion, jo bedre.*

*Afsløring af bakterier foregår typisk ved mikroskopi og ved at dyrke bakterierne i petriskåle, men ved at bruge dna-baserede metoder er det ofte muligt at få et resultat væsentligt hurtigere.*

Af Tine Yding Wolff,  
Per Halkjær Nielsen,  
Claus Moser og  
Trine Rolighed Thomsen

■ I Danmark er der hvert år ca. 250.000 indlæggelser som følge af en infektionssygdom. At være ramt af en infektion betyder, at en sygdomsfremkaldende mikroorganisme (også kaldet et patogen) har invaderet og formerer sig i eller på en del af kroppen og medfører skade. Det indtrængende patogen kan være en bakterie, svamp, virus eller parasit. Infektioner dækker således over et meget bredt udsnit af mere eller mindre alvorlige sygdomme. Influenza, blærebetændelse, meningitis og HIV er alle eksempler på sygdomme opstået på baggrund af en infektion.

Når der er mistanke om, at en patient har fået en alvorlig infektion, gælder det om at identificere den forårsagende mikroorganisme hurtigst muligt for at kunne give en målrettet behandling. På sygehusene identificeres bakterier i dag hovedsageligt vha. mikroskopi og dyrkning på forskellige typer af næringsmedier (agarplader eller blodkolber). Desuden laves forskellige biokemiske tests for at kunne skelne



*Bioanalytiker Pia Poss arbejder med sekventeringsmaskinen på Klinisk Mikrobiologisk Afdeling på Rigshospitalet for at identificere bakterier på baggrund af deres 16S rRNA gen.*

bakterierne fra hinanden.

Fordelen ved den traditionelle dyrkning er, at metoden som regel viser både bakteriearten, og hvorvidt den er resistent overfor forskellige

antibiotika, ligesom mikroskopisk påvisning af mikroorganismen i relevant prøvemateriale underbygger betydningen af dyrkningsfundet. Ulempen er, at der går relativt lang tid,

inden dyrkningen giver et svar (oftest 1-2 døgn), og at visse mikroorganismer ikke kan dyrkes under de forhold, der rutinemæssigt anvendes i hospitalslaboratorier.

## Dna afslører mikroben

Nu er dna-baserede metoder til at identificere mikroorganismer også ved at vinde indpas på sygehusene, da de giver mulighed for meget hurtigere resultater. Disse metoder bygger på den såkaldte *polymerase chain reaction* (PCR – se boks). Metoden er baseret på analyse af dna fra mikroorganismens genom, og er dermed uafhængig af, om bakterien kan vokse på et medie. Når man anvender PCR til at identificere mikroorganismer, udnytter man, at hver art har en unik sammensætning af dna.

Metoden kan sammenlignes med en kopimaskine, hvor enzymet dna-polymerase aflæser en dna-sekvens og vha. byggesten i form af nukleotider laver en dna-streng komplementær til denne (en kopi). På denne måde opformeres dna'et i prøverne til mængder, det er muligt at analysere på (se boks).

Det er både muligt at lave en bredspektret PCR-analyse, hvor man undersøger for mange bakterier på én gang eller en specifik PCR-analyse, hvor man leder efter netop de mikroorganismer, man har mistanke om, at patienten er inficeret med.

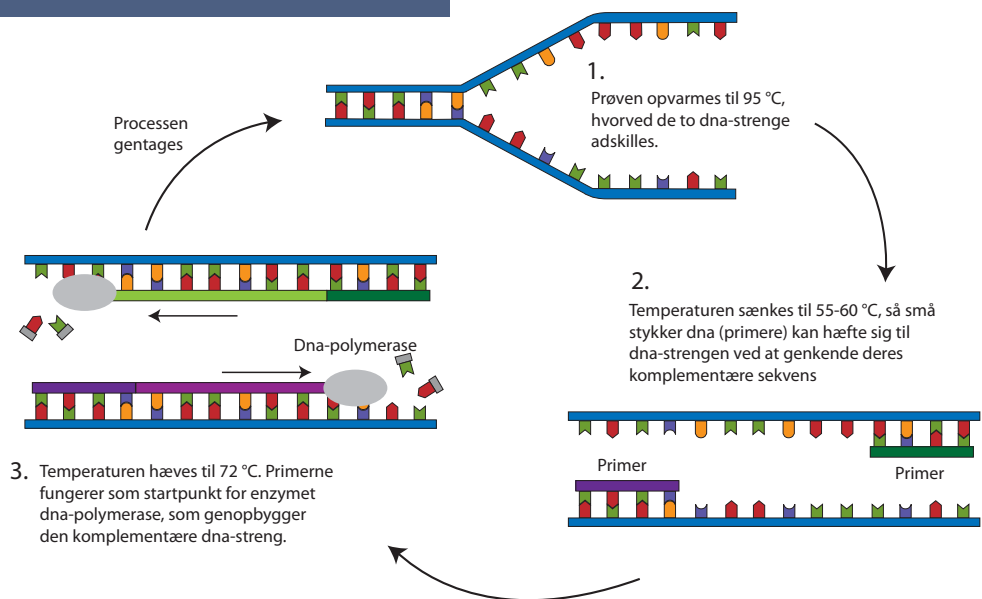
Inden for bredspektret PCR findes flere metoder f.eks. direkte 16S sekventering, der tager udgangspunkt i et bestemt gen (16S, se boks). Direkte sekventering er hurtig men til gengæld uegnet i tilfælde, hvor flere bakteriearter er til stede i den samme prøve. Et alternativ er fremstilling af såkaldte klonbiblioteker, hvor de enkelte produkter, der produceres i den bredspektrede PCR-proces, adskilles og analyseres hver for sig. Dette gør, at man kan påvise flere forskellige bakteriearter i en prøve, hvilket er en fordel i tilfælde, hvor en prøve er inficeret med flere bakteriearter på én gang. Fremstilling af klonbiblioteker er dog temmelig tidskrævende og anvendes derfor mest i forsknings- og udviklingsammenhæng.

Den specifikke metode er derimod hurtig og kan give et resultat i løbet af få timer, hvor bestemmelse via traditionel dyrkning vil tage mindst et døgn.



Farvet elektronmikroskop-billede af legionella-bakterier (*Legionella pneumophila*), som er årsag til den såkaldte Legionærsyge. Dna-baserede metoder kan være en hurtig vej til at afsløre sådanne bakterier.

## Opformering af dna med PCR



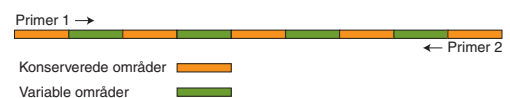
For at kunne identificere bakterier på baggrund af deres dna er det nødvendigt at opformere en lille del af deres genom. I *Polymerase chain reaction* (PCR) efterlignes cellernes dna-kopiering, så der på få timer dannes millioner af kopier af en bestemt dna-sekvens (se figur). Man tilsætter små stykker dna kaldet primere, som har en sekvens af dna-byggesten (nukleotider), der er komplementær til en del af den dna-sekvens, man gerne vil opformere. Med udgangspunkt i disse primere

kan enzymet dna-polymerase lave en kopi af den ønskede dna-sekvens. PCR-reaktionen forløber i tre trin, der typisk gentages 30-40 gange.

Selvom alle organismer har unikke genomer, er der ofte store ligheder mellem generne hos de forskellige arter. Et eksempel er genet 16S rDNA, der koder for en del af bakteriens ribosom (ribosomer indgår i proteinsyntesen og findes i alle organismer). Genet består af ni variable områder, der er unikke for den pågældende bakterieart, og otte konserve-

rede områder, som stort set er ens i næsten alle bakterier. De variable og konserverede områder er fordelt imellem hinanden over hele 16S-genet, og ved at anvende universelle primere specifikke for to konserverede områder kan man få et PCR-produkt, der dækker både konserverede og variable områder (se figur). Ved hjælp af 16S PCR kan man med andre ord opformere dna fra mange forskellige bakterier på én gang, og 16S genet er derfor et hyppigt anvendt target til identifikation af bakterier.

Udsnit af genet 16S rDNA, der består af konserverede og variable områder. Ved at anvende primere, der er specifikke for to konserverede områder, kan man opformere dna fra mange forskellige bakteriearter på én gang.





Undersøgelse af bakteriers resistens overfor forskellige antibiotika.

## Bakteriedyrkningens begrænsninger

Når man identificerer sygdomsfremkaldende bakterier og deres resistensmønster, foregår dette i dag overvejende vha. dyrkning på forskellige vækstmedier efterfulgt af biokemiske tests. Der går som regel mindst et døgn og ofte længere tid, inden der foreligger svar på dyrkningen, og flere forskellige faktorer har indflydelse på udfaldet af dyrkningen. Eksempelvis kræver visse mikroorganismer nogle andre vækstforhold end dem, der rutinemæssigt anvendes i hospitalslaboratorier. Et eksempel på dette er bakterier af *Chlamydia*-familien, der er såkaldt intracellulære bakterier. Det betyder, at de kun kan leve inden i andre celler, f.eks. epitelceller, og derfor kræver det særlige cellekulturer at dyrke dem. Kighoste-bakterien *Bordetella pertussis* er et andet eksempel på en mikroorganisme, der ikke vokser i standard vækstmedier, og den kræver desuden 4-5 dages vækst, inden kolonierne kan ses med det blotte øje.

En anden parameter, der kan påvirke mikroorganismernes evne til at vokse, er hvis der er givet antibiotika. I mange tilfælde hvor en patient har symptomer på en alvorlig infektion gives en bredspektret antibiotikabehandling, inden årsagen til infektionen er kendt. Hvis behandlingen gives, inden der udtages materiale til dyrkning, kan dette hæmme mikroorganismene og være årsag til, at de ikke vokser frem i vækstmedierne.

En tredje forhindring er, hvis bakterierne vokser i en såkaldt biofilm, der er en slimet substans bestående af én eller flere bakterie- eller svampearter, dna, proteiner samt polysakkarider udskilt af mikroorganismene. Det er ofte tilfældet, når bakterier eller svampe vokser på en overflade som det f.eks. er tilfældet ved kateterinfektioner og plak på tænderne. Bakterier i biofilm kan både være vanskelige at dyrke i laboratoriet, ligesom de ofte er mere tolerante overfor antibiotika end planktoniske (fritsvømmende) bakterier af samme art.

### PCR-metoder på sygehusene

På landets sygehuse er det som regel kun bakterier, svampe og enkelte parasitter, der diagnosticeres vha. dyrkning. De fleste parasitter identificeres vha. mikroskopi eller ved påvisning af antistoffer i patientens blod, mens landets store sygehuse i stadigt stigende omfang anvender PCR til at identificere virus

og svært dyrkbare bakterier og svampe som f.eks. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae* og pneumocyster. På de klinisk mikrobiologiske afdelinger benyttes primært specifik PCR frem for den bredspektrede metode. Dette betyder som nævnt, at der skal foretages en specifik PCR-analyse for hver af de mikroorganismer, som lægen vurderer,

kan være årsag til en infektion. Ofte omfatter søgningen altså nogle specifikke mikroorganismer, og det er derfor vigtigt at være bevidst om, at en negativ PCR-analyse ikke nødvendigvis udelukker, at der er tale om en infektion – det er muligvis bare en anden organisme, der er årsagen.

Også derfor vinder den bredspektrede metode i stigende grad frem som supplement, når dyrkningsprøver har givet negativt resultat og er særligt interessant i de tilfælde, hvor der er tydelige kliniske tegn på infektion.

Fordelen ved en specifik PCR er også, at den kan benyttes i prøver, hvor der må forventes en del normalflora. I disse tilfælde er den bredspektrede metode ikke velegnet, da den ikke kan skelne mellem dna fra forskellige bakterier, og dna fra eventuelle patogener risikerer dermed at "drukne" i mængden af dna fra normalfloraen.

### Hjerterinfektion under lup

På Teknologisk Institut og Aalborg Universitet beskæftiger man sig meget med PCR som redskab til at identificere bakterier i forbindelse med forskellige typer infektioner. Analyserne foregår i samarbejde med flere af landets sygehuse og har bl.a. omfattet infektioner i hjertet, i lungevæv, på urinkatetre, ved knæ- og hofteproteser samt i kroniske sår.

En af vore undersøgelser har fokuseret på *infektios endokardit*, som er en relativt sjælden, men alvorlig sygdom, der rammer ca. 300 danskere om året. Sygdommen opstår, når mikroorganismer i blodet slår sig ned på indersiden af hjertet (endokardiet). Det er typisk en eller flere af de fire hjerteklapper, der er mest udsat for infektion, og i svære tilfælde kan en ultralydsscanning af hjertet afsløre store klumper af bakterier, der vokser på hjerteklappen i en biofilm. Konsekvensen af sygdommen kan være skadede, ineffektive hjerteklapper, der ikke længere slutter tæt, og dette kan medføre, at hjertet skal arbejde hårdere for at pumpe blodet rundt

i kroppen. I de alvorligste tilfælde bliver klappen helt utæt, og der opstår hjertesvigt med en meget høj dødelighed til følge.

Hvor hurtigt en korrekt diagnose kan stilles har betydning for, hvor omfattende skaderne på hjertet bliver, og hvorvidt behandling med antibiotika er tilstrækkelig, eller om patienten skal have en hjerteoperation. Når diagnosen infektiøs endokardit er stillet, forsøges det at identificere den relevante mikroorganisme vha. forskellige dyrkningsmetoder, hvor enten blod eller væv fra hjertet er udgangspunkt for dyrkningen. I mange tilfælde kan der dog ikke dyrkes noget frem enten pga. forudgående antibiotikabehandling eller forekomst af bakterier, der kræver særlige dyrkningsforhold.

### Tankevækkende resultater

I et studium, der blev udført på Aalborg Universitet i samarbejde med Rigshospitalet og Teknologisk Institut på tilbageværende materiale efter standardundersøgelser, blev forekomsten af bakterier i 19 hjerteklapper undersøgt med traditionelle dyrkningsmetoder og PCR-metoder.

Blod- og vævsdyrkning var positiv for hhv. ni og syv prøver, mens der med PCR-metoderne blev påvist dna fra bakterier i alle prøverne. Med dyrkningsmetoderne blev der primært fundet stafylokokker, streptokokker og enterokokker, der alle er meget velkendte patogener og ofte er involveret i denne sygdom. Disse bakterier blev også fundet med PCR-metoderne, men derudover blev der også påvist dna fra bakterier, der sjældent forbindes med sygdommen, f.eks. *Legionella*, *Pseudomonas* og *Propionibacterium*. Efterfølgende viste en kvantitativ PCR-analyse specifik for *Legionella*, at der i en af prøverne var en meget høj forekomst af *Legionella*-dna, hvilket bekræftede fundet af denne bakterie i klonbiblioteket.

Et andet interessant resultat var, at der med dyrkningsmetoderne udelukkende blev påvist infektion med monokulturer,

mens PCR-metoderne i flere tilfælde påviste dna fra flere forskellige bakterier i den samme prøve. Det skal understreges, at betydningen af disse dyrkningsuafhængige fund ikke er afklaret og kan skyldes flere andre faktorer end infektion (f.eks. at prøverne er blevet forurenede et sted i processen).

I det hele taget ligger der en stor fremtidig opgave i afklaring af betydningen af dyrkningsuafhængige fund i lighed med de kriterier som Robert Koch satte op for omtrent 100 år siden, for at kunne sammenholde et dyrkningsfund med en infektions sygdom.

### Nyt lys over katetres bakterieflora

I et andet lignende studium blev centralvenekatetre fra 18 patienter undersøgt. Denne type katetre lægges i en central blodåre, hvor den kan sidde i flere måneder, mens den anvendes til at give medicin og væske direkte i blodet. Jo længere tid kateteret sidder i patienten, des større er risikoen for, at der opstår en infektion. Dyrkning af bakterier fra katetrene foregår normalt ved en såkaldt Makis metode, hvor spidsen af kateteret ruller på en agarplade, og indstiksstedet siges at være inficeret, hvis der fremkommer mindst 14 bakteriekolonier på pladen. Mange mener, at Makis metode er utilstrækkelig, da den kun giver oplysninger om bakterier uden på kateterets spids, mens bakterier længere oppe ad kateteret og på indersiden risikerer at blive overset.

I undersøgelsen blev kateter-spidserne undersøgt med Makis metode på Rigshospitalet, mens både inder- og yderside af de 18 katetre blev undersøgt med PCR-metoder. Makis metode var positiv for 11 af 18 katetre, og med denne metode blev der primært fundet såkaldt koagulase-negative stafylokokker, der er en del af den naturlige bakterieflora på menneskets hud.

PCR-metoderne bekræftede forekomsten af disse stafylokokker i mange af katetrene, men der blev også påvist dna fra en stor blanding af andre bakterier.

Resultaterne af undersøgelsen viste desuden, at der var stor forskel på hvilke bakterier der fandtes på inder- og ydersiden af katetrene, og at der var en større diversitet af bakterier, jo længere tid kateteret havde siddet i patienten.

### Et supplement til værktøjskassen

Som det er tilfældet med dyrkningsmetoderne, er identifikation af bakterier med PCR-metoder forbundet med både fordele og ulemper. At metoden er baseret på detektion af dna betyder, at den er uafhængig af, om mikroorganismen er i stand til at vokse, og med PCR kan man således påvise svækkede og ikke dyrkbare bakterier, svampe samt virus. Desuden er den specifikke PCR, hvor man ønsker at påvise tilstedeværelsen af en bestemt mikroorganisme, en hurtig metode, der giver et svar i løbet af få timer. Bredspektret PCR med efterfølgende fremstilling af klonbiblioteker er derimod meget tidskrævende og er derfor ikke egnet som et hurtigt diagnostisk værktøj.

PCR-metodens høje følsomhed kan dog være en ulempe, når den skal bruges til at identificere bakterier i en infektion. Metoden kan nemlig ikke skelne mellem dna fra levende og døde bakterier, og i den kliniske mikrobiologi er det derfor en udfordring at tolke, om de påviste bakterier er relevante for infektionen, eller om fundene stammer fra døde eller klinisk uvæsentlige bakterier. Der findes i dag kits på markedet, der kan fjerne fritliggende dna fra en prøve, så der efterfølgende kun arbejdes videre med dna fra intakte, aktive bakterier.

Det er vigtigt at pointere, at PCR-metoden ikke viser resistensmønstret og dermed ikke giver det endelige svar på, hvordan en infektion skal bekæmpes. På sigt bliver det måske muligt at bruge PCR til at undersøge bakteriens resistensmønster ved at målrette PCR mod forskellige relevante resistensgener.

Selvom PCR altså ikke kan erstatte dyrkning af bakterier i



Foto: Trine Rolighed Thomsen

Nærbillede af en kateterspids klar til undersøgelse.

dag, kan metoden fungere som et værdifuldt supplement.

De dyrkningsuafhængige metoders præcision og hurtighed forbedres hele tiden via nyt apparatur, hvilket på sigt vil gøre dem til et meget værdifuldt diagnoseværktøj på landets hospitaler. I et igangværende projekt støttet af ABT-fonden undersøger Rigshospitalets klinisk mikrobiologiske afdeling, Teknologisk Institut og Aalborg Universitet effekten af dna-baserede metoder som diagnostisk værktøj. Alle positive blod- og dyrkninger er i en tre måneders periode blevet undersøgt med gængse dyrkningsmetoder og med 16S sekventering, og i halvdelen af tilfældene blev resultatet af 16S sekventeringen inddraget i overvejelserne omkring anbefaling af antibiotisk behandling. På nuværende tidspunkt er det ved at blive gjort op, om 16S sekventeringen har haft en gunsti betydning i form af en hurtigere diagnose, forkortede indlæggelsestider og mindsket brug af bredspektret antibiotika. ■

### Om forfatterne:



Tine Yding Wolff er civilingeniør i bioteknologi og konsulent ved Teknologisk Institut  
Tlf: 72202454  
tyw@teknologisk.dk



Per Halkjær Nielsen er professor ved Sektion for Bioteknologi, Aalborg Universitet  
Tlf.: 99408503  
phn@bio.aau.dk



Claus Moser er afdelingslæge ved Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Rigshospitalet  
Tlf.: 35456409  
claus.moser@rh.regionh.dk



Trine Rolighed Thomsen er mikrobiolog, ph.d. og senior-konsulent ved Teknologisk Institut samt lektor ved Sektion for Bioteknologi, Aalborg Universitet  
Tlf.: 72201828  
E-mail: trt@teknologisk.dk

### Videre læsning:

Larsen et al, 2008: Use of cultivation-dependent and -independent techniques to assess contamination of central venous catheters: a pilot study. *BMC Clinical Pathology* 2008;8:10.

Thomsen et al, 2010: The bacteriology of chronic venous leg ulcer examined by culture-independent molecular methods. *Wound Repair and Regeneration* 2010;18(1):38-49.

[www.abtfonden.dk/sitecore/content/abtfonden/home/projekter/andrel/forkortelse\\_indlaeggelser.aspx](http://www.abtfonden.dk/sitecore/content/abtfonden/home/projekter/andrel/forkortelse_indlaeggelser.aspx)