

Jan Fohlman, docent, institutionen för medicinska vetenskaper, sektionen för infektion, Akademiska sjukhuset, Uppsala; överläkare, infektionskliniken, Centrallasarettet, Växjö (jan.fohlman@ltkronoberg.se, jan.fohlman@academic.se)

Jonas Blomberg, professor, klinisk virologi, institutionen för medicinska vetenskaper, Akademiska sjukhuset

Gunnar Fröman, universitetslektor, institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi, Biomedicinskt centrum, Uppsala universitet, nu Amersham Biosciences, Uppsala

Lars Engstrand, professor, Smittskyddsinstitutet, Stockholm

Anders Johansson, bitr klinikkchef, klinisk mikrobiologi

Göran Friman, professor, sektionen för infektion; båda institutionen för medicinska vetenskaper, Akademiska sjukhuset

Mikrobiell diagnostik med PCR blir kliniskt värdefull när analystiden kortas

II PCR (polymeraskedjereaktionsteknik) är den mest kraftfulla och användbara nukleinsyraförstärkningstekniken och upplevdes redan tidigt som mycket lovande för klinisk diagnostik.

Kary Mullis utvecklade PCR 1985, vilket belönades med Nobelpriset i kemi 1993 [1, 2]. Genom bland annat användning av värmestabilt polymeras från bakterier som lever i heta källor har tekniken förbättrats, och man uppnår snabbt en miljard kopior (1 000 gånger fler än i de tidiga experimenten).

Vi försöker här utvärdera hur PCR används praktiskt idag vid omhändertagandet av akuta infektionssjukdomar. Teknisk innovation av genetiskt baserad metodik kommer inom kort att generera en betydligt snabbare och mer exakt mikrobiologisk diagnostik än dagens metoder, med svar inom loppet av en timme och känslighet för enstaka mikroorganismer.

Med modern, kvantitativ realtids-PCR (Figur 1) upptäcks PCR-produkten (amplifikatet) med hjälp av fluorescerande prober (Figur 2). Antalet tillgängliga analyser ökar exponentiellt (Figur 3), men patent blockerar delvis utvecklingen. Antalet erbjudna analyser med »in-house«-teknik vid svenska laboratorier har det senaste året nästan fördubblats. Det är framför allt universitetsklinikerna som driver utvecklingen. Analys för *Chlamydia trachomatis* och MRSA (meticillinresistenta *Staphylococcus aureus*) görs dock på nästan samtliga laboratorier med PCR.

Ett flertal patogener kan upptäckas samtidigt med multiplexteknik. Teoretiskt skulle man samtidigt på ett objektglas med datorassisterad tolkning kunna screena för 120 rhinovirus, 64 enterovirus och samtliga influensasubtyper. Även genotypisk resistensbestämning [3] kan göras med PCR, men det är tveksamt om och när detta ersätter konventionell odlingsteknik.

Metodikutveckling

PCR kan beskrivas som en DNA-förstärkningsteknik, där man fördubblar antalet nukleinsyramolekyler vid varje cykel.

Sammanfattat

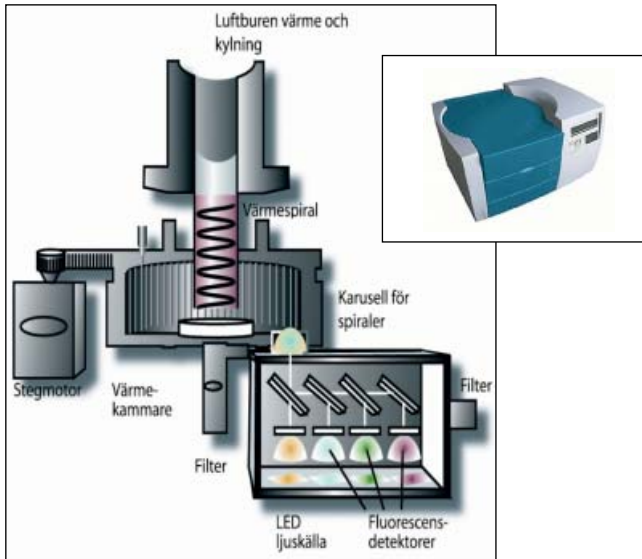


Den kliniska nyttan av PCR är idag förhållandevis ringa men kan bli genomgripande om dagens komplicerade och tidskrävande metoder för DNA-extraktion, PCR-analys och nukleinsyrasekvensning kan kortas ner till någon timme eller en halv dag, vilket är potentiellt möjligt.

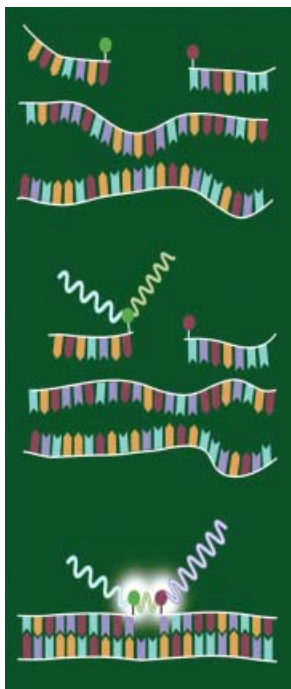
Med så kallad multiplexteknik kan man detektera ett flertal relevanta mikrober och analysera deras resistensgener. Med qPCR kan mängden mikrober i provet bestämmas, vilket varit av värde till exempel vid HIV- och HCV-infektioner. Serologisk analys med hjälp av PCR (PIA) är på god väg och kan även göras kvantitativt (qPIA).

I framtiden står kanske en liten väldesignad PCR-apparat med streckkodsteknik för olika provanalyser på läkarmottagningen och ger provsvar i patientens närvaro, för omedelbar diagnos och korrekt behandling.

Man kan praktiskt köra 20–40 cykler och får således teoretiskt 2^{20} = miljontals, 2^{30} = miljarder och 2^{40} = biljoner kopior (i praktiken något färre). För detektion krävs 10^6 DNA-kopior = attomol. För bakterier och högre organismer kan man utnyttja ribosomala gener (särskilt 16S-rRNA) som ofta finns i flera kopior i varje cell. Därmed kan i princip fragment av en bakteriecell upptäckas, till exempel efter insatt antibiotikabehandling och bakteriolyt. Traditionellt har PCR-produkten identifierats med hjälp av molekylviktsbestämning på en elektroforesgel. Ett elegantare sätt att upptäcka och identifiera



Figur 1. AlphaHelix superkonvektor (lilla bilden) och sprängskiss av Lightcycler från Roche. Efter varje cykel skickas en ljustråle genom provet, som då kan upptäcka eventuellt bildad PCR-produkt med fluorescensmarkör.



Figur 2. Princip för fluorescens med hybridiseringsprob, som kräver ett visst intermolekylärt avstånd för att sekundär fluorescens ska uppstå.

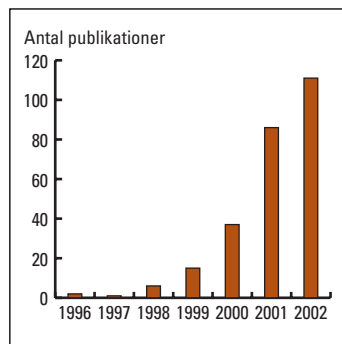
ra erhållit amplifikat är med fluorescensmärkta proboligonukleotider, som avläses med fluorescensdetektor (Figur 1). Detta sker i realtid, det vill säga PCR-reaktionen följs kontinuerligt genom att varje nybildad DNA-molekyl binds till en fluorescerande prob, som då avger en ljussignal (Figur 2). Resultatet blir kvantitativt (kallas ibland qPCR), känsligt, snabbt och specifikt, och dessutom är risken för kontaminering mycket liten eftersom allt sker i ett rör som aldrig behöver öppnas. Ett Uppsalabaserat företag kan med en »superkonvektor« klara 35 cykler på 10 minuter inkluderande detektionsanalys med fluorescerande prob. Processen underlättas av att alla reagens är förpipetterade i en »reagent cartridge« (Figur 4), som töms automatiskt i provröret med centrifugalkraften. I en DNA-mikromatris kan 100 000 prober placeras på en kvadratcentimeter och analyseras samtidigt [4, 5]. Vidare finns tillgång till mycket snabb DNA-sekvensningsmetodik, som kan utföras på PCR-produkten (amplifikatet) och ge upplysning om bortåt 1 000 baspar inom några timmar. Därmed kan inte bara enskilda mikrobiella arter identifieras, utan potentiellt även utvalda resistensmutationer upptäckas.

Klinisk utveckling

Luftvägsinfektioner: PCR kan användas för att påvisa de vanligaste patogenerna i luftvägarna som är svåra att odla, som Chlamydia pneumoniae och Mycoplasma pneumoniae. PCR i direktprov från luftvägarna har etablerats vid några laboratorier

II Fall 1

En 20-årig man insjuknar med akut insättande huvudvärk, hög feber och kräkning efter en veckas besvär av tilltagande hosta. Dagen efter är han medvetslös och inkommer till sjukhus med ambulans. Han är motoriskt orolig, har opistotonus växelvis och svarar inte på tilltal. Positiv Babinski bilateralt, nackstelhet och takypné registreras. Akut datortomografi görs, som visar generell svullnad. Man avstår initialt från lumbalpunktion och insätter ampicillin samt cefotaxim. Patienten överförs till centrala IVA, där man anlägger avlastande ventrikeldränage. Ett likvorprov tas, som är grumligt, färglöst och visar $101 \times 10^6/l$ poly (polynukleära leukocyter) och $46 \times 10^6/l$ mono (mononukleära leukocyter), men ingen sockerkonsumtion. Dagen efter är poly $272 \times 10^6/l$ och mono $69 \times 10^6/l$; fortfarande ingen sockerkonsumtion. Tre dagar senare har poly sjunkit till $2 \times 10^6/l$ och mono till 0. PCR på likvor är negativt för herpes simplex, influensa och mykoplasma. Immunfluorescens på nasofarynxsekret är negativt för influensa. Blod- och likvorodlingar blev negativa liksom urinodling. Man finner växt av Haemophilus influenzae i nasofarynx, men serologi på akut- och konvalescentserum är negativ för Haemophilus influenzae och Mycoplasma pneumoniae. CRP var 181 mg/l vid ankomsten, 194 dagen efter och 21 efter fem dagar. LPK (leukocyter, partikelkoncentration) var initialt $32,5 \times 10^9/l$, dagen efter 21 och efter fem dagar 18. Efter en vecka var alla värden normaliserade och patienten tillfrisknade utan sequelae. Ett finprickigt exantem utvecklades och kvarstod länge, sannolikt orsakat av ampicillin. PCR gjordes flera månader senare på likvor och påvisade DNA från meningokocker, och titerstegring av antikroppar mot meningokocker grupp B kunde demonstreras i parade sera.

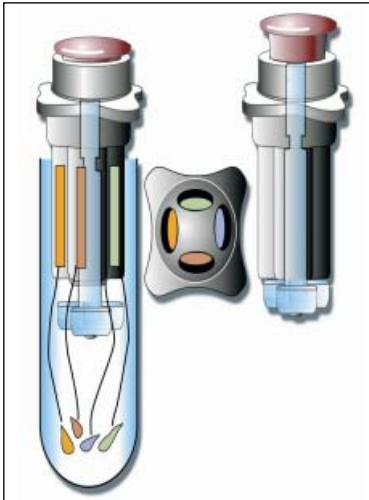


Figur 3. Antalet publicerade realtids-PCR-analyser vid infektionstillstånd enligt PubMed (2003-01-27).

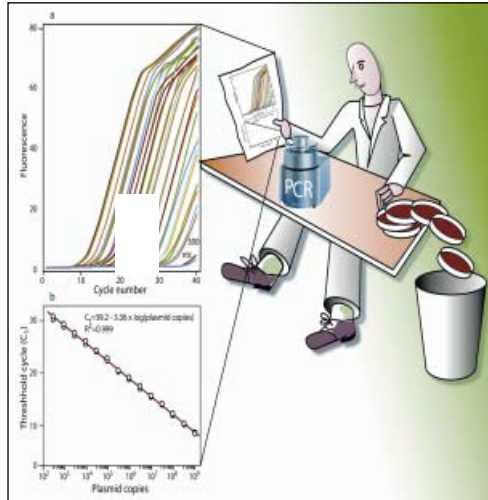
i landet. Emellertid finns ännu inga kommersiella test, och ett behov av standardisering har påkallats. Ett problem vid diagnostik av sputum är förekomsten av flera kontaminerande bakterier, men problemet kan vara mindre med PCR än med odling eftersom man letar endast med specifika prober efter ett fåtal misstänkta agens. För tbc är PCR mycket värdefullt och tidsbesparande men finns bara på fyra universitetssjukhus i Sverige. PCR-

metodik för pneumokocker finns, man kan även analysera serotyp och förekomst av resistensgener för penicillin, erytromycin och tetracyklin. PCR kan bli en snabb metod för fastställande av streptokocktonsillit, teknik finns men används inte eftersom det idag finns immunologiska snabbtest för GAS (grupp A-streptokocker). Snabbtest saknas dock för grupp C och G.

CNS-infektioner: Många infektiösa agens är svåra att påvisa tillförlitligt med konventionell metodik, till exempel enterovirus, herpesvirus, kryptokocker och toxoplasma. Vid herpesencefalit är PCR numera kliniskt mycket värdefull. Meningokocker, Haemophilus influenzae och pneumokocker kan vara svåra att få att växa i odling efter insatt terapi men kan då ofta påvisas med PCR (se fallbeskrivningar). Eftersom penicillinresistens, MIC (minsta hämmande koncentration)



Figur 4. AlphaHelix reagent cartridge, som innehåller förpipetterade reagens. Genom att trycka på det sinnrika locket och starta superkonvektorn centrifugeras provet och reagensen kommer ut.



Figur 5. qPCR ger en tröskelsignal vid en viss cykel, som är beroende av ursprungsmängden DNA i provet, och en kvantifiering kan göras enligt en standardkurva. Intern standard behövs inte. Om PCR kommer att ersätta traditionell diagnostik får framtiden utvisa.

$\geq 0,1$ $\mu\text{g/ml}$, hos pneumokocker är ett växande problem internationellt har metoder utvecklats för snabbdiagnostik. Som exempel sågs en ökning från 10 procent 1970 till 70 procent 1999 i Tennessee [6] och en trefaldig ökning av mortaliteten vid pneumokockinfektioner med MIC ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$. Med realtids-PCR kunde penicillin känsliga pneumokocker identifieras på en timme [7].

Sepsis och endokardit: PCR kan bli ett komplement till blododling eftersom metodiken är snabbare och kan kompletteras med resistensbestämning. Vid endokardit omöjliggör insatt behandling eller svårödlade mikroorganismer ett positivt odlingsresultat i 5–24 procent av fallen [8], vilket försenar diagnosen och ökar risken för klaffdestruktion och efterföljande toraxkirurgi. Millar och medarbetare använde PCR-förstärkning med 16S-rRNA för bakterier och 18S-, 28S- och 5,8S-rRNA för svamp i kombination med DNA-sekvensning på blodprov och kunde visa att god överensstämmelse erhöles med odlingsresultaten [8]. Vidare kunde elva olika resistensgener hos stafylokocker (mecA, aacA-aphD), streptokocker (PBP1A, PBP2B, gyrB, parE) och enterokocker (varA, varB, varC-1, varC-2, aacA-aphD, aphA3) undersökas direkt med PCR [9]. (Se även under Resistens.)

Mag-tarminfektioner: Erfarenheten från gastroenteritutbrott i landet visar att i de flesta utbrott kan inga mikrobiella agens påvisas med rutindiagnostik. De har därför i regel antagits vara virusorsakade. Rotavirus kan numera spåras med snabb EIA-metodik, men calicivirus har varit svårare. PCR för enterala virus, liksom för Clostridium difficile-toxin, är emellertid nu på god väg in i rutindiagnostiken [B Svennungsson, Stockholm, pers medd, 2003]. Vid infektion med enterotoxinbildande E coli (ETEC), den i särklass vanligaste orsaken till turistdiarré, är individuell diagnostik sällan påkallad. Däremot kan PCR-diagnostik av ETEC bli ett värdefullt redskap i epidemiologiskt arbete i utsatta länder, där ETEC är en viktig orsak till morbiditet och mortalitet bland barn.

Ett speciellt exempel är Whipples sjukdom, där man kunnat påvisa Tropheryma whipplei med sekvensanalys av bakteriens 16S-rRNA efter PCR-amplifiering.

Ögoninfektioner: PCR har beskrivits kunna ge snabb dia-

gnostik av vanliga patogener vid endoftalmit, som är en ovanlig infektion, ofta sekundär till kataraktkirurgi. I ett arbete har beskrivits att PCR kunnat identifiera mikrobiell patogen i 84–92 procent av fallen, mot 0–24 procent vid odling [10]. Med specialdesignad PCR kunde gramnegativa bakterier direkt skiljas från grampositiva, och man tyckte detta var väsentligt för att kunna rikta behandlingen, i synnerhet vid gramnegativ etiologi som har sämre prognos [11]. Tre olika svamparter kunde även påvisas snabbt med 18S-rRNA [12].

Snabbdiagnostik vid keratiter med herpes simplex-virus, varicella-zoster-virus, cytomegalovirus, adenovirus och Chlamydia trachomatis ger möjlighet till snabbt insatt riktad terapi [13]. I atypiska fall kan annars kortison bli insatt, som kan förvärra en viruskeratit, varför snabb och känslig diagnostik kan bli av värde [A Alm, Uppsala, pers medd, 2003].

Hudinfektioner: PCR-metodik för identifiering av dermatofyter finns beskriven och kan vara av värde, eftersom konventionell metodik är långsam (3–4 veckor) och har låg specificitet, så att korrekt terapi snabbare kan effektueras [14]. Även vid mykobakterieinfektion (M marinum, M bovinum och M tuberculosis) och herpesinfektioner kan PCR bli värdefullt [A Vahlquist, Uppsala, pers medd, 2003], och herpespåvisning görs numera med duplex (det vill säga både herpes simplex 1 och 2) realtids-PCR på flera universitetssjukhus. Vid bakteriella sårinfektioner kan man tänka sig en begränsning i spektrum och antalet insatta antibiotika om adekvata patogener utesluts eller identifieras direkt.

Nya infektioner: Det har visat sig att PCR spelat en särskilt stor roll för upptäckten av nya infektioner (»emerging infections«), till exempel med svårödlade bakterier. Exempel på detta är Helicobacter pylori vid magsår och herpesvirus 8 vid Kaposis sarkom hos HIV-patienter. Man har också med PCR påvisat Chlamydia pneumoniae i 29–50 procent av arteriosklerotiska kärl och i sklerotiska aortaklaffar, jämfört med 0–13 procent i kontrollvävnad [15, 16]. Dessa resultat indikerar en möjlig koppling mellan arterioskleros och Chlamydia pneumoniae-infektion i kärlväggen. Bartonella-infektioner har nyligen beskrivits från Sverige [17, 18]. Vid dessa långsamväxande bakterier är PCR ett viktigt redskap. I epidemisituationer, då man helt enkelt inte har tid att utveckla eller invänta konventionell odlingsmetodik, kan tillgång till PCR vara avgörande, till exempel vid Nipah-virus-utbrottet i Malaysia för några år sedan eller vid SARS-epidemin under våren 2003.

Resistens: PCR-teknik i kombination med sekvensanalys har även utvecklats för detektion av mikrobiell resistens. Särskilt i behandlingen av HIV-infekterade används genotypisk resistensbestämning, och man koncentrerar sig närmast på vissa gener, som proteas- eller omvänt transkriptas-generna. Vid behandling av andra viroser, som hepatit C med interferon och ribavirin, skulle man kunna dra nytta av information om eventuell resistens, men hit har utvecklingen ännu inte nått.

Vid ett flertal bakteriella infektioner, särskilt vårdrelaterade infektioner orskade av till exempel MRSA (meticillinresi-

II Fall 2

En 31-årig kvinna, som två år tidigare haft en pneumokockmeningit med krampor och medvetslöshet, insjuknar i slutet av sin graviditet med blixthuvudvärk och minskade fosterrörelser. Hon läggs in för observation på kvinnokliniken på grund av tilltagande huvudvärk. CTG (kardiotokografi) visar rikligt med fosterrörelser. Patienten utvecklar under följande natt feber och tilltagande svår huvudvärk och kräks på morgonen. Tillkallad infektionskonsult misstänker meningit, insätter ampicillin och cefotaxim samt beställer datortomografi av skallen, som visar sig vara normal. Efterföljande lumbalpunktion och provet visar $59 \times 10^6/l$ erythrocyter, $508 \times 10^6/l$ poly (polynukleära leukocyter) och $550 \times 10^6/l$ mono (mononukleära leukocyter). Spinalglukos är 0,2 mmol/l mot 6,3 mmol/l i blod, spinalalbumin är 1,86 mg/l. Hon överflyttas till IVA, blir snabbt feberfri och föder efter snabbt värkarbete en son tre dagar efter ankomsten. Likvorodlingen var negativ, men Haemophilus influenzae påvisades i nasofarynxodling. CRP var 64 mg/l vid ankomsten, som högst 163 efter två dagar och normaliserades efter en dryg vecka. Gossen var piggt men fick profylax med ampicillin. Vid uppföljande lumbalpunktion efter fem dagar var erythrocyter 0, poly 68 och mono 150.

PCR på det första likvorprovet påvisade DNA från Haemophilus influenzae, det andra var negativt. På grund av två bakteriella meningiter misstänktes immundefekt, men kontroll visade normala nivåer av immunglobulinsubklasser i serum och normal granulocyt- och komplementfunktion. Under konvalescensen förelåg uttalad trötthet, huvudvärk, balansproblem och senare även minnesstörning och inlärnings svårigheter. Pneumokock- och H influenzae-vaccin gavs.

stenta Staphylococcus aureus), MRSE (meticillinresistent Staphylococcus epidermidis), ARE (ampicillinresistent enterokocker), VRE (vankomycinresistent enterokocker) och multiresistent tarmbakterier (som Enterobacter cloacae, Acinetobacter baumannii och pseudomonader), är det angeläget att snabbt kunna spåra resistensutveckling och söka hindra nosokomial spridning av resistensgener. PCR-analys av genen för meticillinresistens (mecA-genen) hos Staphylococcus aureus har redan etablerats rutinmässigt och används idag efter framodling. Vissa mikrober tenderar att utveckla resistens under pågående antibiotikabehandling, vilket ofta leder till terapivikt. Inducerbara resistensgener kan snabbt upptäckas med PCR (eventuellt med sekvensstöd) och möjliggöra korrekt behandling. Till exempel har karbapenemresistent respektive totalresistent Acinetobacter baumannii nu beskrivits, och det är väsentligt att snabbt identifiera sådana sjukhuspatogener för att vidta hygienåtgärder. För Mycobacterium tuberculosis har man utvecklat ett DNA-baserat genotyptest, som efter amplifiering kan påvisa rifampicinresistensgenen inom loppet av en dag, mot 5–21 dagar för fenotypmetoder med konventionell odling och resistensbestämning.

För malaria har man beskrivit prover för detektion av både mutationer i dihydrofolatreduktasgenen som ger upphov till resistens mot proguanil och pyrimetamin och mutationer i dihydropteroatsyntasgenen som ger sulfonamidresistens. Vidare har en »multidroggen« (pfmdr1) beskrivits, som indikerar resistens även mot meflokin och artemeter. Klorokinresistens tycks kopplad till en annan gen (CG2-genen). Dessa framsteg möjliggör snabb resistensbestämning med PCR av malariaplasmidier.

För resistensbestämning av bakterier är odling med antibiotikalappar eller E-test fortfarande nödvändig under över-

skådlig tid men kommer förmodligen med framtida utveckling att successivt ersättas av sekvensning eller analys med DNA-hybridiseringsmatriser, som snabbt ger ett antibiotigram, förhoppningsvis inom några timmar.

Serologi: PCR kan kombineras med serologisk diagnostik (PCR-enhanced immunoassay, kallad PIA) för snabb identifiering av mikropspecifika antikroppar, vilket kan bli användbart i många sammanhang. Vi har vid infektion med enterovirus använt en »IgM capture«-metodik [19] för att först fånga patientens totala IgM i serum. Därefter har virus adderats. Med efterföljande PCR påvisas infångat virus kvantitativt, och metoden mäter således halten av virus-specifikt IgM hos patienten. Begränsningen vid enterovirus är det stora antalet serotyper, men genom att använda epidemiologiskt relevanta virusstammar kan ett stort antal serotyper diagnostiseras.

Automatiserad DNA-sekvensning: Utvecklingen av automatiserade DNA-sekvensmaskiner har varit mycket snabb, och nu finns det apparater som kan analysera 96 prov på mindre än tre timmar om sekvenserna är långa och på mindre än två timmar om sekvenserna är kortare (cirka 350 baspar).

Nackdelar med PCR

Metodiken är mycket känslig, och man har beskrivit att en enda mikroorganism kan detekteras, till och med en sönderfallen bakterie. Detta gör metoden känslig för kontamination. Särskilda rutiner med petimätternoggrannhet krävs därför vid uppsättningen, till exempel ett särskilt rum för provberedning (pre-PCR-room) och ett »post-PCR-room« för PCR-produkten (amplifikatet), som annars utgör en potentiell källa till kontamination. PCR-inhibitorer som ger upphov till falskt negativa resultat har beskrivits, men med olika åtgärder har man lärt sig behärska även detta.

Fynd av mikroorganismer på normalt sterila lokaler är ofta lättolkat. Vid fynd av patogener på hud och slemhinnor måste, som vid odling, alltid en klinisk bedömning av relevansen göras.

PCR-tekniken är för närvarande relativt dyr, i genomsnitt kostar en analys cirka 1 000 kronor, men när provmängderna ökar kan arbetstiden per prov minska och på så sätt besparingar göras. Man är redan nere i cirka 100 kronor per analys för Chlamydia trachomatis och gonorré. Att snabbt få relevant klinisk information kan spara flera vård dygn, med kostnader uppåt 10 000 kr/dygn. Mikrobiologisk PCR-diagnostik spås därför en lysande framtid, som en av de mer kostnadseffektiva åtgärderna inom en ekonomiskt alltmer pressad sjukvård.

Flera fördelar med snabb diagnostik

En snabb mikrobiologisk diagnostik är värdefull ur många aspekter. Riktad terapi kan sättas in omedelbart, vilket kan vara livräddande. Den ekologiska miljön sparas och risken för resistensutveckling minskar. Biverkningsfrekvensen bör också minska, till exempel hade ampicillin aldrig behövt sättas in i fall 1 och patienten hade nog sluppit kliande utslag. Med analys av resistensgener kan man undvika att sätta in överksamma medel.

Den kliniska nyttan av PCR är idag förhållandevis ringa [20] men kan bli genomgripande om dagens komplicerade och tidskrävande metoder för DNA-extraktion, PCR-analys och nukleinsyrasekvensning kan kortas ner till någon timme eller en halv dag, vilket är potentiellt möjligt. Vid snabbt insatt antibiotikaterapi med efterföljande fördröjd provtagning för odlingar är risken för negativt odlingsresultat stor, till exempel vid meningit där det är angeläget att sätta in terapi så tidigt som möjligt. Även om det är lätt att få blododlingar vid

sepsis är till exempel intensivvårdspatienter ofta redan under antibiotikabehandling, och odlingssvaret blir därför negativt. Vid odiagnostiserad endokardit, som ibland behandlas med perorala antibiotika i tron att det rör sig om annan infektion, krävs antibiotikafritt intervall på 1–2 veckor för positiv odling. I dessa lägen har PCR en fördel (eftersom avdödade bakterier kan detekteras), erbjuder tidsvinster och blir särskilt värdefullt om även antibiogram kan erhållas. Med så kallad multiplex teknik kan man detektera ett flertal relevanta mikrober, och deras resistensgener kan analyseras. Med qPCR kan mängden mikrober i provet bestämmas, vilket varit av värde till exempel vid HIV- och HCV-infektioner. Serologisk analys med hjälp av PCR (PIA) är på god väg och kan även göras kvantitativt (qPIA).

I framtiden står kanske en liten väl designad PCR-apparat med streckkodsteknik för olika provanalyser på läkarmottagningen och ger provsvar i patientens närvaro, för omedelbar diagnos och korrekt behandling (Figur 5).

*

Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Jan Fohlman samarbetade tidigare med Alphahelix i avsikt att få fram för akutsjukvården användbara PCR-kit.

Referenser

- Mullis K, Ferré F, Gibbs R. The polymerase chain reaction. Boston: Birkhäuser; 1994.
- Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-4.
- Fredricks D, Relman D. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999;29:475-88.
- Brown P, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 1999;21:33-7.
- Ramsay G. DNA chips: state-of-the-art. *Nat Biotechnol* 1998;16: 40-4.
- Tang YW, Li H, Griffin JP, Haas DW, D'Agata EM. Rapidly increasing prevalence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in middle Tennessee: a 10-year clinical and molecular analysis. *J Clin Microbiol* 2002;40:395-9.
- Kearns AM, Graham C, Burdett D, Heatherington J, Freeman R. Rapid real-time PCR for determination of penicillin susceptibility in pneumococcal meningitis, including culture-negative cases. *J Clin Microbiol* 2002;40:682-4.
- Millar B, Moore J, Mallon P, Xu J, Crowe M, McClurg R, et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis – a new Duke's criterion. *Scand J Infect Dis* 2001;33:673-80.
- Moore JE, Millar BC, Yongmin X, Woodford N, Vincent S, Goldsmith CE, et al. A rapid molecular assay for the detection of antibiotic resistance determinants in causal agents of infective endocarditis. *J Appl Microbiol* 2001;90:719-26.
- Lohman C, Linde H, Reischl U. Improved detection of microorganisms by polymerase chain reaction in delayed endophthalmitis after cataract surgery. *Ophthalmology* 2000;107:1047-51.
- Carroll NM, Jaeger EE, Choudhury S, Dunlop AA, Matheson MM, Adamson P, et al. Detection of and discrimination between gram-positive and gram-negative bacteria in intraocular samples by using nested PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:1753-7.
- Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AA, Towler HM, Matheson MM, et al. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:2902-8.
- Madhavan H. Laboratory investigations on viral and *Chlamydia trachomatis* infections of the eye: Sankara Nethralaya experiences. *Indian J Ophthalmol* 1999;47:241-6.
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J Med Microbiol* 2000;49:493-7.
- Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, Kuo CC, Cappuccino AL, Lee MJ, et al. Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am J Pathol* 1997;150:1785-90.
- Nyström-Rosander C, Thelin S, Hjelm E, Lindquist O, Pahlson C, Friman G. High incidence of *Chlamydia pneumoniae* in sclerotic heart valves of patients undergoing aortic valve replacement. *Scand J Infect Dis* 1997;29:361-5.
- Holmberg M, McGill S, Ehrenborg C, Wesslen L, Hjelm E, Darelid J, et al. Evaluation of human seroreactivity to *Bartonella* species in Sweden. *J Clin Microbiol* 1999;37:1381-4.
- Wesslen L, Ehrenborg C, Holmberg M, McGill S, Hjelm E, Lindquist O, et al. Subacute bartonella infection in Swedish orientees succumbing to sudden unexpected cardiac death or having malignant arrhythmias. *Scand J Infect Dis* 2001;33:429-38.
- Aspholm R, Zuo S, Fohlman J, Frisk G, Friman G, Blomberg J. A novel serological technique: polymerase chain reaction enhanced immunoassay. Application to enterovirus IgM diagnosis. *J Virol Methods* 1999;80:187-96.
- Check W. Nucleic acid-based tests move slowly into clinical labs. *ASM News* 2001;67:560-5.



= artikeln är referentgranskad

SUMMARY

PCR was introduced in 1985 by Mullis and was immediately recognized as a valuable tool in biomedical research and was awarded the Nobel Prize in 1993. Two culture-negative meningitis cases are described where *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis* were found by 16SRNA-PCR. The modern real time PCR technology using fluorescent probes (hybridization probes, lightup probes, molecular beacons etc) for detection of the PCR-product or on DNA microarray chips, is under development for routine use. Multiplex technology can be used to simultaneously detect multiple microorganisms as well as resistance genes. Using superconvection with ultracentrifugation high-speed PCR, results can be obtained in 10 minutes and the amplicate can also be analyzed by DNA-sequencing to achieve species identification as well as detection of resistance gene mutations. The technique has mainly been applied to viruses, but is now slowly adapted to bacteria, fungi, protozoa and helminths. PCR is especially well suited for slow growing bacteria like *Mycobacteria*, fastidious organisms like *Bartonella* and contagious agents like tularemia, but also for malaria and fungi, where the advantages in sensitivity and speed can be exploited. The limit for application to routine analysis will depend on the development of simple and fast procedures for nucleic acid extraction, as well as interpretation of the PCR analysis per se, since highly efficient thermocyclers now are on the market.

Jan Fohlman, Jonas Blomberg, Gunnar Fröman, Lars Engstrand, Anders Johansson, Göran Friman
Läkartidningen 2004;101:1488-92

Correspondence: Jan Fohlman, infektionskliniken, Akademiska sjukhuset, SE-751 85 Uppsala, Sweden
(jan.fohlman@ltkronoberg.se, jan.fohlman@academic.se)