

Nukleinsyrediagnostikk i medisinsk mikrobiologi

Sammendrag

Bakgrunn. Påvisning av nukleinsyrer fra mikrober er blitt en viktig del av mikrobiologisk diagnostikk. I denne artikkelen presenteres en oppdatering innen feltet.

Materiale og metode. Oversiktsartikkelen er basert på egne erfaringer og søk i Medline, med gjennomgang av relevant litteratur.

Resultater og diskusjon. Amplifikasjonsteknikker for nukleinsyre står sentralt i denne utviklingen. Sekvensering, hybridisering og elektroforetiske separasjonsmetoder anvendes også ved ulike problemstillinger. I de senere år har instrumentutvikling for automatisk nukleinsyrenesing og sanntids-PCR gitt nye fremskritt. Analysetiden er kortet ned, kapasiteten er økt og sårbarheten for prøveforbytting er redusert. Et økende repertoar av nukleinsyreanalyser er tilgjengelig for påvisning av mikrobiologiske agenser og virulensgener i tillegg til genotyping og monitorering av medikamentresistens og behandlingsrespons.

I Tidsskriftet nr. 21–23/2005 publiseres en serie artikler om diagnostisk molekylærbiologi. Serien er initiert av Jens Bjørheim og Jahn M. Nesland.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

Karl-Henning Kalland

kalland@gades.uib.no
Avdeling for mikrobiologi og immunologi
Gades Institutt
Bygg for biologiske basalfag
Universitetet i Bergen
Jonas Lies vei 91
5009 Bergen
og
Haukeland Universitetssjukehus

Helge Myrmed

Avdeling for mikrobiologi og immunologi
Gades Institutt
og
Haukeland Universitetssjukehus

Svein Arne Nordbø

Avdeling for medisinsk mikrobiologi
St. Olavs Hospital

Påvisning av nukleinsyrer i mikrobiologisk diagnostikk ble første gang omtalt i Tidsskriftet i 1987 (1). Aktuelle metoder og diagnostikk er presentert flere ganger, senest i 1999 i en temaserie (2, 3).

I denne perioden har genteknologiske metoder som hybridisering, nukleinsyreamplifikasjon og DNA-sekvensering utviklet seg fra å være spennende fremtidsviser til å utgjøre en stor del av den daglige diagnostikken.

Nukleinsyrediagnostikk, påvisning eller karakterisering av arvestoffet til mikrobiologiske agenser, er i stadig utvikling – med konsekvenser for rask diagnostikk, behandlingsindikasjon og monitorering av behandlingsrespons eller tilbakefall, spesifikk påvisning av virulensfaktorer og medikamentresistens. En tabellarisk oversikt over alle mikrobiologiske nukleinsyretester er blitt vanskelig innenfor formatet av en oversiktsartikkel. I ramme 1 er i stedet listet Internettadresser som gir oversikt over nukleinsyretester som i dag utføres ved ulike norske mikrobiologiske laboratorier. Tabell 1 viser eksempler på undersøkelser som er aktuelle ved utvalgte kliniske problemstillinger.

Prøvetaking og nukleinsyreekstraksjon

Undersøkelse med henblikk på DNA eller RNA fra et spesifikt agens kan utføres i en rekke forskjellige prøvematerialer, som blod, serum, spinalvæske, ekspektorat, urin, feces, amnionvæske, biopsi, sårsekret eller laboratoriekulturer. Den nukleinsyren som skal påvises, kan være labil RNA eller mer stabil DNA. Nukleinsyren kan være beskyt-

tet av cellevegg og kapsel i bakterier. I enkelte tilfeller finnes det spesielle prøvetakingssett som preserverer arvestoffet. Ellers bør man under prøvetaking følge anvisningen fra det mikrobiologiske laboratorium, og prøven bør sikres rask transport.

Både mekaniske og enzymatiske rensetrinn kan være nødvendig for å sikre intakt nukleinsyre som er fri for hemmere av den påfølgende amplifikasjonsprosessen. Noen prøvematerialer trenger lite forbehandling dersom de skal undersøkes for DNA-virus. En bakteriekultur som skal undersøkes for et virulensgen, kan slemmes opp i vann og kokes og bunnfall sedimenteres før PCR (polymerasekjedereaksjon) utføres i supernatanten. Men for DNA-undersøkelser i de fleste prøvematerialer, og alltid når RNA skal påvises, er en skikkelig ekstraksjonsprosedyre for nukleinsyrer nødvendig. Det er spesielt viktig med enzymatisk forbehandling for påvisning av DNA fra små mengder av grampositive bakterier, hvor celleveggen kan være vanskelig å ødelegge (4).

Amplifikasjonsteknikker for nukleinsyre

Den tidligste nukleinsyrediagnostikk var basert på hybridisering med spesifikke genprober, noe som for pasientmateriale medførte lav sensitivitet og dermed begrenset anvendelse (1). PCR er prototypen på den nukleinsyre-amplifikasjon som er blitt fundamentet for praktisk nukleinsyrediagnostikk. TMA (transkripsjonsmediert amplifikasjon), NASBA (nucleic acid sequence-based amplification), LCR (ligasekjedereaksjon) og SDA (strand displacement amplification) er andre varianter av målampifikasjonsteknikker (5). Også signalampifikasjonsteknikker som bDNA (branched DNA) er utviklet (5), men i det videre blir kun PCR omtalt.

Hovedbudskap

- Mikrobiologisk nukleinsyrediagnostikk er i løpet av de siste årene blitt meget omfattende og kvalitativt betydelig forbedret
- Viktige årsaker til dette er innføring av økt automatisering og sanntids-PCR
- Nukleinsyrediagnostikken er i rask utvikling og vil spille en stadig viktigere rolle i diagnostikk, overvåking og behandling av infeksjonssykdommer

Ut fra nukleinsyresekvensen til et agens kan mindre områder av arvestoffet oppføres fra ett molekyl til millioner av kopier som visualiseres indirekte. Et par korte oligonukleotider (såkalte primere) som flankerer en avgrenset kjent gensekvens, blir konstruert og kan leveres i løpet av noen dager etter bestilling. Det er den eksakte oligonukleotidsekvens av primerparet som bestemmer spesifisiteten ved PCR. Dataprogrammer kan gjennomse databanker for alle kjente gensekvenser for å bekrefte at et primerpar spesifikt vil amplifisere DNA fra kun det aktuelle agens. Teknikkens store fordel er at når spesifisiteten er sikret gjennom oligonukleotidsyntesen, er reagenser og metodologi for øvrig nokså like for alle agenser man ønsker å påvise. Dette er noe av bakgrunnen for at SARS-coronavirus (SARS-CoV) kunne påvises med PCR i de fleste vestlige land bare få måneder etter at den nye sykdommen ble oppdaget. Den viktigste årsaken er imidlertid at virusgenomet raskt ble klonet og sekvensert (6).

Selv om metodene egner seg for maskinell automatisering, har manuell pipettering og arbeid med enkeltrør gjennom mange trinn karakterisert mikrobiologisk nukleinsyrediagnostikk frem til nylig. Trass i den tilsynelatende enkelheten har PCR-proseduren derfor i praksis likevel vært arbeidskrevende og sårbar for menneskelige feil. Det er her det nå skjer avgjørende forandringer.

Automatisering, strekkoding, seriekobling og datastyring

En rekke automatiserte instrumenter for ekstraksjon av RNA og DNA er nå tilgjengelige. Prøvematerialet forsynes med en strekkode som følger prøven gjennom rensetrinnene. Koden følger den videre gjennom serien av PCR-amplifikasjon, visualisering og digital registrering i et dataprogram. Dette eliminerer faren for prøveforbytting ved manuelle prosedyrer. Metodikken blir mer robust og standardisert.

Kvantitativ sanntids-PCR

Prinsippet for kvantitativ sanntids-PCR er det samme som for konvensjonell PCR (7, 8). Også vanlig PCR kan automatiseres. Den store forskjell mellom PCR og sanntids-PCR er at det i tillegg til oligonukleotidprimere blir konstruert en genprobe som er spesifikk for sekvensen mellom primerne. Ved ulike prinsipper – som TaqMan, molekylære nebb, FRET – blir det produsert økende fluorescens i prøven jo mer spesifikk DNA-sekvens det blir dannet (9). Kontinuerlig eksitasjon og samtidig registrering av fluorescenssignalet indikerer derfor spesifikk amplifikasjon i sanntid.

Ved konvensjonell PCR er det sluttproduktet som detekteres etter at amplifikasjonen har nådd en platåfase. Ved sanntids-PCR blir amplifikasjonen registrert ved terskelverdien for deteksjon og gjennom den påfølgende lineære del av amplifikasjonen. Ved

Ramme 1

Internett-adresser til noen sentrale mikrobiologiske laboratorier som utfører mikrobiologisk nukleinsyrediagnostikk

www.stolav.no/mikrobiologi – St. Olavs Hospital

www.unn.no/fagfolk/handbok/labhandbok/mikrobiologisk – Universitetssykehuset Nord-Norge

www.rikshospitalet.no/content/res_bibl/3529.pdf – Rikshospitalet

www.ullevaal.no/default.asp?file=mikro.xml – Ullevål universitetssykehus

www.helse-bergen.no/avd/ami/ – Haukeland Universitetssjukehus

www.fhi.no/ – Folkehelseinstituttet

www.ahus.no/index.asp – Akershus universitetssykehus

www.telelab.no – Telelab, Skien

hjelp av standardkurver og kontroller kan mengden spesifikk nukleinsyre i utgangsmaterialet bli kalkulert i et dataprogram. Genproben som er rettet mot den amplifiserte sekvensen mellom de to primerne, øker analysens spesifisitet betydelig. Konvensjonell PCR må, for å nærme seg tilsvarende sensitivitet og spesifisitet, kjøres som en flettet PCR (nested PCR) i to trinn, eller amplifikasjonsproduktet må detekteres i en påfølgende separat undersøkelse med en «capture-probe» og enzymkatalysert fargereaksjon. Flettet PCR er inntil 1 000 ganger mer sensitiv og langt mer spesifikk enn konvensjonell PCR (10). Sanntids-PCR kvantiterer i tillegg mengden arvestoffsekvens i utgangsmaterialet og foregår meget raskt (ca. 30–90 minutter) i ett trinn. Dermed unngås i stor grad prøveforbytting eller krysskontaminering, som kan være problemer ved flettet PCR i separate trinn.

Kvantitative metoder basert på sanntids-PCR har mange fordeler fremfor de konvensjonelle PCR-metodene. De er raskere, enklere å utføre, har et større dynamisk måleområde og bedre presisjon i det øvre måleområdet (10).

Verdien av kvantitative bestemmelser

Det kan være tvil om klinisk relevans selv om en mikrobiell sekvens er sikkert påvist i en pasientprøve ved hjelp av kvalitativ PCR. Ett eksempel er infeksjon med cytomegalovirus (CMV). Dette viruset persisterer, som andre herpesvirus, vanligvis livet ut etter gjennomgått primærinfeksjon. Intermitterende reaktiveringer av latent virus med lavgradig replikasjon i endotelceller og leukocytter forløper vanligvis asymptomatisk hos immunfriske personer. Hos immunsvekkede pasienter, prematurt fødte og transplantasjonspasienter kan cytomegalovirusinfeksjon imidlertid være alvorlig. En kvantitativ bestemmelse av CMV-DNA i plasma, leukocytter eller fullblod kan da gi indikasjon for behandling. Samtidig er kvantitering nyttig for monitorering av behandlingsrespons (11).

Påvisning av transkribert RNA ved hjelp av cDNA-syntese i et uavhengig første trinn

fulgt av nukleinsyreampifikasjon er et alternativt kriterium for aktiv infeksjon (12).

Medikamentell behandling av HIV-infeksjon, hepatitt C (13, 14) og hepatitt B (15) er basert på tilsvarende kvantitering og monitorering av virus.

Invasive soppinfeksjoner er en fryktet komplikasjon ved leukemi og beinmargstransplantasjon. In vivo-bildeteknikker og antigenester har her gitt diagnostiske fremskritt. DNA-påvisning må være kvantitativ for å gi sikre holdepunkter for diagnose og behandling, ettersom minimale mengder nukleinsyre fra ikke-invasiv sopp lett kan kontaminere prøven (16).

Kommersiell tilgjengelige kvantitative tester til bestemmelse av virusmengde baseres på en kompetitiv amplifikasjon av virusstemplat sammen med en kjent mengde syntetisert DNA (standard) som tilsettes hvert reaksjonsrør. Til slutt detekteres den relative mengde av virus- og standardampikon, og resultatet leses fra en standardkurve som etableres parallelt i samme oppsett. Ved vurdering av virusmengde på grunnlag av slike undersøkelser er det viktig å være fortlølig med egenkapene til den metoden som benyttes og begrensninger i metodens reproducerbarhet.

Inntil nylig har kvantiteringsenhetene som benyttes ved de forskjellige metodene ikke uttrykt samme mengde virusnukleinsyre i prøvematerialet, fordi hver metode har hatt sin egen standard av varierende lengde og sekvenser utviklet av produsenten. Resultatene av de forskjellige metoder utført på samme prøve er derfor ikke sammenliknbare, men angis oftest likevel med samme benevnning, kopier eller ekvivalenter per milliliter. Denne mangelen på standardisering har begrenset nytteverdien og gjort det vanskelig å sammenlikne resultater fra ulike metoder (17). For å løse dette problemet har WHO utarbeidet internasjonale standarder for hepatitt C-virus (HCV) (18), hepatitt B-virus (HBV) (15) og parvovirus B19 (19) til metodekalibrering som gir sammenliknbare resultater i internasjonale enheter (International Units per milliliter – IU/ml).

Metodenes presisjonsnivå og reproducerbarhet bedres stadig, men fortsatt er det slik

Tabell 1 Nukleinsyrediagnostikk ved enkelte kliniske problemstillinger i Norge i 2005

Problemstilling	Agenspåvisning (tilleggsundersøkelse)
Encefalitt – meningitt	Enterovirus (genotyping) Epstein-Barr-virus (kvantitering) Herpes simplex-virus 1 og 2 Humant herpesvirus 6 Varicella-zoster-virus Listeria monocytogenes Neisseria meningitidis Toxoplasma gondii
Øyeinfeksjon	Adenovirus (genotyping) Herpes simplex-virus 1 og 2 Chlamydia trachomatis
Nedre luftveisinfeksjon	Adenovirus (genotyping) Influenza A-virus Influenza B-virus Metapneumovirus Respiratorisk syncytialt virus Rhinovirus SARS-coronavirus Bordetella pertussis Chlamydia pneumoniae Legionella pneumophila Mycoplasma pneumoniae Mycobacterium tuberculosis Andre mykobakterier Streptococcus pneumoniae
Peri- og myokarditt	Adenovirus Enterovirus (genotyping)
Hepatitt	Hepatitt A-virus Hepatitt B-virus (kvantitering, genotyping, resistens) Hepatitt C-virus ((kvantitering, genotyping)
Gastroenteritt, diaré	Adenovirus Norovirus Enterohemoragisk E coli (EHEC) Enteroinvasiv E coli (EIEC) Enteropatogen E coli (EPEC) Enterotoksigen E coli (ETEC)
Urogenital infeksjon	Chlamydia trachomatis Mycoplasma genitalium Neisseria gonorrhoeae
Cancer cervicis uteri, kondylomer	Humane papillomavirus (genotyping)
Immunsvikt	HIV (kvantitering, resistens)
Antibiotikaresistens	Enterokokker (vanA, -B, -C1/2) Gule stafylokokker (mecA) Mycobacterium tuberculosis (katG)
Abort, kongenitt/perinatal infeksjon	Enterovirus Cytomegalovirus Herpes simplex-virus 1 og 2 Parvovirus B19 Toxoplasma gondii

at variasjoner i resultat med en og samme metode på $< 0,5 \log_{10}$ ikke kan anses som signifikante endringer (14). Et måleresultat på for eksempel 500 000 IU/ml vil med en måleusikkerhet på $\pm 0,5 \log_{10}$ innebære at sann verdi kan ligge på fra 160 000 IU/ml til 1 600 000 IU/ml.

DNA sekvensbestemmelse og genotyping

PCR-amplifisert DNA brukes for påvisning og kvantitering av mikrobiologiske agenser

i et pasientmateriale. Det amplifiserte DNA kan også benyttes til sekvensundersøkelser, som ofte gir tilleggsopplysninger (20). Moderne medikamentell behandling av HIV-infeksjon har drastisk forbedret prognosen for pasientene. Resistens mot ett eller flere medikamenter er assosiert med typiske mutasjoner i HIV-RNA. Påvisning av slike mutasjoner er i dag helt nødvendig for å kunne skreddersy kombinasjonsbehandling og for å skille mellom resistensutvikling og dårlig etterlevelse når virusmengden i plasma sti-

ger under behandlingen (21). Ved behandling av kronisk aktiv hepatitt B med lamivudin er resistensutvikling et notorisk problem som også er assosiert med typiske mutasjoner i HBV-genomet (22). Andre former for DNA-sekvensering som blir gjort i Norge inkluderer typebestemmelser av enterovirus og adenovirus. DNA-sekvensbestemmelse er fortsatt en metodikk med begrenset kapasitet. Dersom det dreier seg om påvisning av en definert sekvensvariant som en genotype, er strategier med høyere kapasitet utviklet – for eksempel differensiell hybridisering eller «line probe assays». Hepatitt C-virus forekommer som flere genotyper. Både prognose og varighet av PEG-interferon- α /ribavirinbehandling avhenger av genotypen (14). Rundt 120 ulike typer humane papillomavirus (HPV) er påvist. Definisjonen av en ny type er $< 90\%$ DNA-sekvenshomologi i bestemte områder av det strukturelle L1-genet og de regulatoriske og potensielt onkogene E6- og E7-gener. Lavrisikotyper forårsaker kun vorter og aldri kreft, som f.eks. HPV-6 og HPV-11 i kjønnsvorter. Vel 15 høyrisikotyper, inkludert HPV-16 og HPV-18, er vanligvis en nødvendig, men ikke tilstrekkelig årsak til livmorhalskreft (23). Strategier for å supplere cervixcytologiscreening med deteksjon av HPV-høyrisikotyper for kvinner over 30 år og ved oppfølging av dysplasi er under utarbeiding og evaluering (24).

Bakterielle undersøkelser

Nukleinsyrebaserte metoder er i dag blitt et viktig redskap også innen bakteriologisk diagnostikk (25). Amplifikasjonsmetoder egner seg godt til påvisning av bakterier som er vanskelige å dyrke (f.eks. Chlamydia pneumoniae og Mycoplasma pneumoniae) eller som ikke lar seg dyrke (Tropheryma whipplei) (5). Disse metodene kan også benyttes til rask påvisning av bakterier i prøvematerialer ved mistanke om alvorlige infeksjoner, som for eksempel blod/blodkultur og spinalvæske, og kan dessuten detektere bakterier som er døde eller antibiotikapåvirket slik at de ikke lar seg dyrke eller påvise ved klassiske bakteriologiske metoder (25). Det kan imidlertid ta flere uker før DNA fra døde bakterier blir eliminert, og dette kan vanskeliggjøre tolkingen av positive PCR-resultater (se omtale av vurderingen av kontrollprøver etter behandling for Chlamydia trachomatis nedenfor).

Nukleinsyrediagnostikk egner seg også godt for påvisning av mykobakterier og andre bakterier som vokser svært langsomt. Sekvensering av genet som koder for 16S ribosomalt RNA er mye brukt for identifikasjon av bakterier som er vanskelige å klassifisere med tradisjonelle biokjemiske og immunologiske metoder. Dette har gitt ny genetisk innsikt, som igjen har fått konsekvenser for den taksonomiske inndelingen av enkelte bakterier.

I bakteriologien blir PCR brukt til på-

visning av meticillinresistens (*mecA*) i *Staphylococcus aureus*, vancomycinresistens (*vanA*, *vanB*, *vanC*) i enterokokker og rifampicin- og isoniazidresistens (*katG*) i *Mycobacterium tuberculosis*. Ved siden av påvisning av gener for antibiotikaresistens er deteksjon av virulensgener (EHEC, EPEC, skarlatinatoksin, stafylokokktoksin) viktig i bakteriologisk diagnostikk. Nukleinsyrebaserte metoder er også viktige redskaper for epidemiologisk kartlegging av utbruddsstammer (MRSA, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* m.fl.). En rekke spesialteknikker er utviklet til dette formål, f.eks. PFGE (pulsed field gel electrophoresis), AFLP (amplified fragment-length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), MLST (multi locus sequence typing) og DNA-fingerprinting (26, 27).

Nukleinsyrediagnostikk i allmennpraksis

Primærlegen rekvirerer alt i dag et stort volum *Chlamydia trachomatis*-undersøkelser (mer enn 250 000 prøver/år i Norge) fra cervix og urethra. Metoder for nukleinsyreampifikasjon har forbedret muligheten for overvåking av urogenital *C. trachomatis*-infeksjon. Sensitiviteten er så høy at nukleinsyre fra denne intracellulære bakterien kan påvises i epitel lenge etter adekvat antibiotikabehandling, og dersom det er ønskelig med kontroll etter behandling, må prøve tidligst tas etter en måned. Bruken av amplifikasjonstester har også åpnet for bruk av andre prøvematerialer, for eksempel urin og vaginalpensel (28, 29). Undersøkelse for HCV-RNA i plasma eller serum rekvireres også hyppig av primærlegen.

Immunfluorescensundersøkelse av nasopharynxaspirat for påvisning av antigen fra respiratorisk syncytialt virus, parainfluenzavirus, influensavirus og adenovirus er nyttig når småbarn blir hospitalisert med stridor. Men PCR-påvisning er også tilgjengelig for disse virus og andre virus som kan gi luftveisinfeksjon og influensaliknende sykdom, inkludert metapneumovirus og SARS-CoV. Ved alvorlig nedre luftveisinfeksjon finnes det også tilbud om PCR for *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* og *Bordetella pertussis* fra samme prøve.

Serologiske undersøkelser basert på komplekteringsreaksjonen har ofte begrenset sensitivitet for mange luftveisagenser. På den annen side er over 50 % av alle øvre luftveisinfeksjoner forårsaket av rhinovirus og coronavirus, og mikrobiologisk diagnostikk er vanligvis ikke påkrevd. Dersom luftveisinfeksjoner i hovedsak skal bli gjenstand for nukleinsyrediagnostikk med dagens teknologi, vil belastningen på helsebudsjettet øke betydelig, uten at det er åpenbart at dette vil gjenspeiles i en tilsvarende helsegevinst.

Kvalitetskontroll og sikkerhetskrav

Egenutviklede varianter av nukleinsyretester er i utstrakt bruk, også i Norge. Dette har

medført viktig kompetansebygging og muligheter til å utvikle diagnostiske metoder for nye agenser før kommersielle tester er tilgjengelige (20, 30). Egenutviklede tester kan også gi innsparinger i forhold til innkjøp av kommersielle tester, men stiller samtidig store krav til standardisering og kontrollerbarhet. Ofte vil kommersielt tilgjengelige analyser derfor bli foretrukket. En ulempe ved at multinasjonale selskaper med ressurser til utvikling og kvalitetssikring overtar markedet, er at reagenskostnadene oftest blir betydelig høyere. Spørsmålet blir ikke bare hva som rent teknisk kan påvises og hvor raskt, men hva den samfunnsøkonomiske belastningen vil bli.

Erfaringene med å inkludere nukleinsyretestene i de nasjonale ringtester er svært gode. Dette representerer verdifull kvalitets-sikring som bør opprettholdes og utvikles. Det finnes også gode og relativt rimelige europeiske ringtestordninger, for eksempel det EU-baserte Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD).

Fremtidsutsikter

Det er grunn til å være kritisk både til kostnadene forbundet med de ulike metodene og til deres anvendelsesområder. I mange sammenhenger er tradisjonell diagnostikk med immunologiske teknikker fremdeles å foretrekke, mens nukleinsyrebaserte metoder kan være et nyttig og nødvendig supplement. På andre områder er nukleinsyrediagnostikk helt nødvendig og en forutsetning for å sikre store pasientgrupper nødvendig diagnostikk og behandling og for å kunne møte nye utfordringer. Det er nok å nevne SARS, trusselen om en forestående influensapandemi og det økende problem med antibiotikaresistens for å illustrere viktigheten av nukleinsyrediagnostikken. Det er derfor avgjørende at norske mikrobiologiske laboratorier rustes til å møte kravene til moderne diagnostikk, både ved vedlikehold og bygging av kompetanse og ved å sikres tilgang til tekniske løsninger.

Den viktigste nyvinning i mikrobiologisk nukleinsyrediagnostikk de siste fem årene er automatisert nukleinsyreekstraksjon og kvantitativ sanntids-PCR. Strekkoding og robotisert seriekobling av rensetrinn – sanntids-PCR-dataregistrering – gir fortsatt stort rom for forbedring av nukleinsyrediagnostikken.

Til undersøkelse av genespresjon for forskningsformål finnes i dag kort i såkalt LDA-format (low density array). Dette er kort med 384 småbrønner som inneholder primere og probe for en TaqMan-sanntids-PCR. I dette formatet kan kvantitativ sanntids-PCR kjøres på inntil 381 forskjellige sekvenser samtidig i 2 µl reaksjonsvolum. Det virker fristende å utvikle et liknende format for mikrobiologisk diagnostikk.

DNA-mikromatriseteknologien har enda større kapasitet enn LDA-PCR. I dag kan oligonukleotider som representerer spesifik-

ke sekvenser, avsettes på inntil 50 000 ulike punkter i et vanlig objektglassformat. Alternativt kan noen tusen sekvenser repeteres i for eksempel ti identiske felter, slik at ti ulike pasientprøver kan undersøkes på ett objektglass. Mikromatriseteknologien vil imidlertid kreve en uspesifikk foramplifikasjon av nukleinsyre i pasientprøven, er beheftet med uspesifikk krysshybridisering og har et langt smalere dynamisk signalområde enn sanntids-PCR.

Det er vanskelig å anslå hvilken plass disse nyere teknologiene vil få i fremtidig diagnostikk. Det som imidlertid synes klart, er at nukleinsyrediagnostikken i det kommende tiåret vil fortsette å utvikle seg med henblikk på repertoar, kapasitet, sensitivitet og spesifisitet og dermed fortsette å revolusjonere mikrobiologisk diagnostikk.

Manuskriptet ble godkjent 23.6. 2005.

Litteratur

1. Kalland KH, Havarstein LS, Sommerfelt H. Genprober. Et nytt diagnostisk hjelpemiddel. Tidsskr Nor Lægeforen 1987; 107: 2510–2, 2543.
2. Kalland KH, Haukenes G. Nukleinsyrebasert diagnostikk i medisinsk mikrobiologi. Tidsskr Nor Lægeforen 1999; 119: 802–9.
3. Bukholm G, Rollag H. Revolusjon innen mikrobiologisk diagnostikk. Behov, drivkrefter og konsekvenser. Tidsskr Nor Lægeforen 1995; 115: 3387–9.
4. Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Smid AM et al. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. J Clin Microbiol 2004; 42: 734–40.
5. Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. Clin Chem 1997; 43: 2021–38.
6. Drosten C, Preiser W, Gunther S et al. Severe acute respiratory syndrome: identification of the etiological agent. Trends Mol Med 2003; 9: 325–7.
7. Cockerill FR. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. Arch Pathol Lab Med 2003; 127: 1112–20.
8. Watzinger F, Suda M, Preuner S et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. J Clin Microbiol 2004; 42: 5189–98.
9. Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 190–212.
10. Ikewaki J, Ohtsuka E, Kawano R et al. Real-time PCR assay compared to nested PCR and antigenemia assays for detecting cytomegalovirus reactivation in adult T-cell leukemia-lymphoma patients. J Clin Microbiol 2003; 41: 4382–7.
11. van Esser JW, Niesters HG, Thijsen SF et al. Molecular quantification of viral load in plasma allows for fast and accurate prediction of response to therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation. Br J Haematol 2001; 113: 814–21.
12. Blank BS, Meenhorst PL, Pauw W et al. Detection of late pp67-mRNA by NASBA in peripheral blood for the diagnosis of human cytomegalovirus disease in AIDS patients. J Clin Virol 2002; 25: 29–38.
13. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2002; 347: 975–82.
14. Myrnel H, Kursetgjerde T. Genotyping and RNA-quantitering av hepatitt C-virus. Tidsskr Nor Lægeforen 2003; 123: 2448.

>>>

15. Servoss JC, Friedman LS. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 267–81.
16. Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J Appl Genet* 2004; 45: 3–15.
17. Niesters HG, Puchhammer-Stockl E. Standardisation and controls, why can't we overcome the hurdles? *J Clin Virol* 2004; 31: 81–3.
18. Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Vox Sang* 1999; 76: 149–58.
19. Corcoran A, Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. *J Med Microbiol* 2004; 53: 459–75.
20. Nordbø SA, Krokstad S, Winge P et al. Prevalence of GB virus C (also called hepatitis G virus) markers in Norwegian blood donors. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2584–90.
21. Hanna GJ, D'Aquila RT. Clinical use of genotypic and phenotypic drug resistance testing to monitor antiretroviral chemotherapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 774–82.
22. Aberle SW, Kletzmayer J, Watschinger B et al. Comparison of sequence analysis and the INNO-LiPA HBV DR line probe assay for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus strains in patients under various clinical conditions. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1972–4.
23. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 342–50.
24. Wright TC, Jr., Schiffman M, Solomon D et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 304–9.
25. Millar BC, Moore JE. Molecular diagnostics: current options. *Methods Mol Biol* 2004; 266: 139–66.
26. Kristiansen BE, Tveten Y, Jenkins A. Which contacts of patients with meningococcal disease carry the pathogenic strain of *Neisseria meningitidis*? A population based study. *BMJ* 1998; 317: 621–5.
27. Sloan LM, Hopkins MK, Mitchell PS et al. Multiplex LightCycler PCR assay for detection and differentiation of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 96–100.
28. Strand RH, Skjeldestad FE, Øvreneess T et al. Chlamydia trachomatis – prøvetakingsmønster og prevalens blant unge kvinner. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2004; 124: 1636–7.
29. Bakken IJ, Skjeldestad FE, Nordbø SA. Chlamydia trachomatis blant abortsøkende kvinner i Trondheim 1985–2000. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2004; 124: 1638–40.
30. Christensen A, Nordbø SA, Jeansson S et al. Lower respiratory tract infection caused by human metapneumovirus in two children: the first report of human metapneumovirus infection in Norway. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 772–4.