

Diagnostik vid bakteriella infektioner

Christian G. Giske

Påvisande av bakterier

För diagnostik av bakteriella infektioner använder mikrobiologiska laboratorier olika metoder

- odling av bakterier
- ljusmikroskopi
- antigenpåvisning
- polymeraskedjereaktion (PCR), nukleinsyrapåvisande
- masspektrometri för påvisande av proteiner som är karakteristiska för olika bakterier
- serologi

Bakterienamn och förkortningar

Vedertagna förkortningar för kliniskt viktiga bakterier samt sjukdomspanorama som de orsakar redovisas i Tabell 1. Ett bakterienamn som inte förekommer i tabellen är *Enterobacteriaceae*, eftersom detta är ett familjenamn som betecknar alla tarmbakterier, inklusive *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*. Beteckningen "spp." som ibland förekommer betecknar "species" och används när det finns flera varianter inom en och samma art. Till exempel betecknar "*Klebsiella species*" *Klebsiella pneumoniae* och *Klebsiella oxytoca*.

Tabell 1. Vedertagna förkortningar för bakterier och deras sjukdomspanorama.

Bakterie	Förkortning	Exempel på infektioner
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	<i>A. haemolyticum</i>	Halsinfektion
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>B. fragilis</i>	Bukinfektioner
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>B. pertussis</i>	Kikhosta
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>C. trachomatis</i>	Genital klamydia
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	<i>C. pneumoniae</i>	Luftvägsinfektion
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>C. freundii</i>	Nosokomiala infektioner
<i>Clostridium difficile</i>	<i>C. difficile</i>	Tarminfektion
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>	Nosokomiala infektioner
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	Nosokomiala infektioner
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	Urinvägsinfektion, bukinfektion
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Urinvägsinfektion, bukinfektion
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>	Urinvägsinfektion, tarminfektion, sepsis

<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>	Pneumoni, otit
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Urinvägsinfektion, pneumoni, sepsis
Koagulasnegativa stafylokocker (framför allt <i>Staphylococcus epidermidis</i>)	KNS	Kateterinfektioner, sepsis hos nyfödda
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i>	Pneumoni
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Meningit
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>M. catarrhalis</i>	Luftvägsinfektion
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i>	Meningit
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	Gonorré
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>	Urinvägsinfektion
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Nosokomiala infektioner
<i>Serratia marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>	Nosokomiala infektioner
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Sårinfektioner, sepsis
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>	Infektioner vid immunsvikt
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i> (pneumokocker)	Pneumoni, sepsis, meningit
<i>Streptococcus agalactiae</i> (grupp B streptokocker)	<i>S. agalactiae</i> (GBS)	Sepsis hos nyfödda, ibland sårinfektioner
<i>Streptococcus pyogenes</i> (grupp A streptokocker)	<i>S. pyogenes</i> (GAS)	Sårinfektioner, inklusive erysipelas och nekrotiserande fasceit
<i>Treponema pallidum</i>	<i>T. pallidum</i>	Syfilis

Odling

Odling av bakterier har använts som diagnostisk metod sedan 1800-talet och är fortfarande standardmetoden vid alla bakteriologiska laboratorier. Odlingmetoder är i allmänhet relativt snabba, de flesta patogena bakterier växer ut till synliga kolonier på agarplattor eller i buljong på 18-48 timmar. Viktiga fördelar med odling jämfört med andra tekniker är följande:

- Möjlighet att hitta bakterier man inte primärt väntat sig. Med andra metoder är man ofta begränsad av sina PCR-prober eller antikroppar som riktar sig mot ett begränsat antal patogener.
- Möjlighet att göra resistensbestämning, se nedan.
- Möjlighet att avgöra om bakterier är besläktade, så kallad epidemiologisk typning, till exempel vid misstanke om utbrott.
- De senaste åren har artbestämning börjat gå avsevärt snabbare (oftast ett dygn snabbare), eftersom masspektrometri i stor grad har ersatt klassiska biokemiska metoder.

Vissa bakterier är svårödlade

- Mykobakterier har lång generationstid och behöver ofta flera veckor för att växa fram.
- Obligat intracellulära bakterier, till exempel klamydia, kan inte odlas på vanliga medier utan kräver cellkulturer (oftast ersatt av molekylära metoder numera).



- Några viktiga bakterier, som till exempel *Treponema pallidum* som orsakar syfilis har man inte lyckats odla, varken på agarmedier eller i cellkulturer. För att kunna studera dessa bakterier har man odlat dem i olika försöksdjur.

Bakterier odlas fram från olika ställen

Odlingar som sänds in till de bakteriologiska laboratorierna kommer från

- normalt sterila lokaler som blod, likvor, ledvätska och biopsier från vävnader
- lokaler med normalflora som svalg och faeces
- lokaler med begränsad mängd normalflora, men som ofta förorenas av ovidkommande flora, till exempel nedre luftvägsprover och då framför allt sputum samt sår- och urinprover.

Bedömning av odlingar

Sterila lokaler

Alla fynd av bakterier, förutom uppenbara provtagningsföroreningar, är att betrakta som patologiska. Prover från sterila lokaler odlas vanligen aerobt och anaerobt på rika agarmedier eller i buljonger. *Vid fynd av bakterier i blod eller likvor tar laboratoriet alltid telefonkontakt med insändande avdelning för diskussion av odlingsfynd och behandling.*

Lokaler med normalflora

Här gäller det att påvisa bakterier som kan vara patogena vilket kan göras på flera sätt.

- Selektiva odlingsmedier kan vara till hjälp för att få fram signifikanta bakterier och laboratoriet kan också använda
- Kvantitativ odlingsteknik som stöd i bedömning av signifikans.

Kvantitativ odling görs rutinmässigt, till exempel på nedre luftvägsprover, urinprover och kateterspetsar. Kvantiteten av bakterier kan påverkas av insatt behandling innan provtagning, varför det är av stor vikt att information om antibiotikabehandling finns med på remissen.

Klinisk information är nödvändig för att laboratoriet på bästa sätt skall kunna bedöma den kliniska relevansen av ett bakteriefynd. Denna information kan med fördel vara kortfattad och bör omfatta exakt information om provart samt om typ av infektion. I en sårodling är det till exempel av stor vikt att veta ifall det rör sig om ett ytligt bensår eller ett postoperativt djupt sår. I det senare fallet kommer laboratoriet ofta att göra typning och resistensbestämning av bakterier som bedöms sakna klinisk relevans i det första fallet.

Lokaler med rikliga mängder normalflora

Trots att laboratoriet använder selektiva medier och kvantitativ odlingsteknik kan det ofta vara svårt att bedöma odlingar som innehåller och/eller koloniserande flora. Ett klassiskt exempel är sårodlingar.

Kroniska sår tenderar att bli ytligt koloniserade av tarmbakterier. Om noggrann rengöring inte utförs innan provtagning, observerar ofta laboratoriet överväxt av tarmbakterier i provet. Adekvat provtagningsteknik med rengöring och provtagning i övergången mellan frisk och skadad hud kan reducera mängden av koloniserande bakterier som växer i sårodlingen och därigenom förenkla processen med att hitta

patogena bakterier. Antibiotikabehandling av koloniserande tarmbakterier i sår utgör sannolikt dessutom en riskfaktor för selektion av resistenta bakterier.

Epidemiologisk typning

Förutom resistensbestämning, görs ibland så kallad epidemiologisk typning av framodlade bakterier med vissa typer av antibiotikaresistens för att kunna påvisa eventuell spridning av bakterier inom sjukvårdsinrättningar. Epidemiologisk typning görs idag nästan uteslutande med genotypiska metoder. Vid tecken på spridning av bakterier inom en enhet kan det vara aktuellt att ta prover från patienter som har varit i direkt eller indirekt kontakt med indexpatienten. Laboratorierna har specialmetoder för att selektivt kunna odla fram resistenta bakterier i dessa fall.

Mikroskopi

Ljutmikroskopering av gramfärgade bakterier görs rutinmässigt på grumliga likvorprov samt på positiva blododlingar. Fördelen är en snabb bedömning av bakteriers gramfärg och morfologi, vilket kan ge vägledning för antibiotikabehandling samt att ljutmikroskopisk undersökning kan begäras av andra provmaterial (måste särskilt anges på remissen).

Dessutom är ljutmikroskopi viktig för att påvisa smittsam lungtuberkulos, till exempel syrafasta stavar i sputumprov. Metoden används för bedömning av sputumprovers representativitet och vid diagnostik av till exempel Angina Vincentii.

Antigenpåvisning

Antigenpåvisning används i stor utsträckning av laboratorierna för bland annat artbestämning av framodlade bakterier. Metoden används för att påvisa bakterieantigener utan föregående odling, till exempel urinantigentester för pneumokocker och *Legionella pneumophila* serogrupp 1, samt pneumokocker i blododlingar.

Påvisande av nukleinsyror (PCR)

PCR har blivit standardmetodik på de flesta svenska laboratorier under de senaste åren. Med PCR påvisas DNA med mycket hög känslighet, även från döda bakterier. Exempel på agens som påvisas med PCR på många laboratorier är:

- Mykobakterier
- *Chlamydia trachomatis* (genital klamydia)
- *Mycoplasma pneumoniae* och *Chlamydophila pneumoniae* (TWAR)
- *Legionella pneumophila* och andra *Legionella* species
- Tarmpatogena *E. coli* (EHEC, ETEC, EPEC och EIEC)
- Pneumokocker, *Haemophilus influenzae* och *Moraxella catarrhalis* från luftvägsprover, som utförs med kvantitativ PCR
- Bakteriella meningitager, till exempel pneumokocker, *H. influenzae*, *Neisseria meningitidis* samt *Listeria monocytogenes*

PCR används även för verifikation av vissa typer av resistens som meticillinresistenta *Staphylococcus aureus* (MRSA) och vankomycinresistenta enterokocker (VRE). Även i diagnostiken av ESBL- och ESBL_{CARBA}-producerande tarmbakterier används ofta PCR eller liknande genotypiska tekniker.

PCR följt av DNA-sekvensering av en gen som kodar för ett ribosomalt RNA (16S rDNA) kan användas för identifiering av ovanliga bakterier. PCR kan även användas för att påvisa DNA från döda/icke-odlingsbara bakterier, varför 16S rDNA-sekvensering är

en användbar metod när bakteriell agens misstänks men odlingar är negativa, i dessa fall alltså DNA-sekvensering utförd direkt på provmaterialet.

Serologi

Serologi – påvisande av antikroppar mot bakterier – används för att påvisa infektioner med icke-odlingsbara eller svårödlade bakterier, till exempel *Treponema pallidum* eller *Borrelia*, eller där odlingsprov inte har tagits eller utfallit negativt.

Följande nackdelar finns:

- Antikropps bildning kan inte påvisas förrän efter en till två veckors sjukdom, vilket gör metoden långsam.
- Många människor som kommit i kontakt med smittämnet kan ha haft en subklinisk infektion som gett ett kvarstående antikroppssvar. Till exempel har antikroppar i låga titrar mot *Borrelia* påvisats hos 5 % av friska blodgivare och upp till 25 % av den bofasta befolkningen på vissa öar i Stockholms län. Liknande förhållanden gäller för serologi mot *C. pneumoniae*, betahemolytiska streptokocker grupp A eller *S. aureus*. Om däremot antikroppar mot *T. pallidum* påvisas med en specifik metod (TPPA eller syfilis IgM) bör detta alltid utredas, eftersom syfilis kan ligga latent i många år för att senare aktiveras och orsaka svåra skador med bland annat olika neurologiska restsymtom.
- Serologi är i allmänhet inte användbar som terapikontroll eftersom antikroppar kan finnas kvar i årtal efter en utläkt infektion. Ett undantag är behandling av primär syfilis, där VDRL-titern sjunker efter några månader.

För bedömning av all serologi krävs en remiss där frågeställning och/eller de viktigaste symtom samt insjukningsdatum är angivna.

Rekommenderad provtagning vid olika infektionsfrågeställningar

Tabell 2. Rekommendationer för provtagning vid vissa vanliga infektionsfrågeställningar.

Infektionstyp	Provtagning	Relevanta fynd (exempel)	Normalflora/tveksam signifikans
Nedre urinvägsinfektion	Urinprov (inte rutinmässigt vid okomplicerad urinvägsinfektion hos kvinnor)	<i>E. coli</i> Övriga <i>Enterobacteriaceae</i> <i>S. saprophyticus</i> Enterokocker	<i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp. Övriga stafylokocker
Övre urinvägsinfektion	Urinprov Blododling (alltid två flaskpar)	<i>E. coli</i> Övriga <i>Enterobacteriaceae</i>	
Luftvägsinfektion förutom pneumoni	Inte rutinmässigt		
Samhällsförvärd pneumoni	Sputumodling samt eventuellt PCR för atypiska agens Blododling, alltid två flaskpar Urinantigen (<i>S. pneumoniae</i> och <i>L. pneumophila</i>) Nasofarynxodling om sputumodling inte går att genomföra	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>M. pneumoniae</i> <i>M. catarrhalis</i> <i>S. aureus</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>L. pneumophila</i>	Alfastreptokocker Koagulasnegativa stafylokocker Enterokocker <i>Candida</i> spp. Låga mängder av kliniskt relevanta bakterier
Nosokomial pneumoni	Sputum Bronkoskopiska prover	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>S. aureus</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	Alfastreptokocker Koagulasnegativa stafylokocker Enterokocker



		<i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Candida</i> spp. Låga mängder av kliniskt relevanta bakterier
Bukinfektion	Peroperativ odling	Enterobacteriaceae Enterokocker Anaerober	
Sårinfektion	Sårödling som tas vid övergång mot frisk hud före noggrann rengöring	<i>S. aureus</i> Betahemolytiska streptokocker	<i>Enterobacteriaceae</i> Enterokocker Övriga gramnegativa bakterier
Osteit	Biopsi/djup odling	Stafylokocker <i>Enterobacteriaceae</i> <i>P. aeruginosa</i>	
Tarminfektion	Fecesodling Feces-PCR för tarmpatogena <i>E. coli</i> Odling och toxinpåvisning för <i>C. difficile</i>	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Yersinia</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp. Tarmpatogena <i>E. coli</i> (t ex EHEC) <i>C. difficile</i>	
Sepsis	Blododling, alltid två flaskpar	De flesta patogena bakterier	Koagulasnegativa stafylokocker, alfastreptokocker eller <i>Bacillus</i> spp. i enstaka flaskor

Resistensbestämning av bakterier

Indikationer för resistensbestämning

När laboratoriet påvisat en patogen bakterie i ett odlingsprov görs i allmänhet en resistensbestämning för att ge den behandlande läkaren förslag på lämpliga antibiotika som kan vara aktuella för behandling. Alla bakterier från blod eller andra sterila lokaler resistensbestäms, utom uppenbara föroreningar. I övriga odlingsprov resistensbestäms i första hand bakterier som anses ha klinisk betydelse.

Betahemolytiska streptokocker i svalgprov är ett exempel på kliniskt relevanta bakterier som normalt inte resistensbestäms. Skälet är att resistensutveckling mot förstahandsmedlet fenoxymetylpencillin saknas. Om remissen visar att patienten är allergisk mot penicilliner görs resistensbestämning mot alternativa medel som erytromycin och klindamycin.

Normalflora eller bakterier som räknas som koloniserande flora, till exempel tarmbakterier och enterokocker i bensår, resistensbestäms normalt inte.

Det är mycket viktigt att på remissen ange särskilda faktorer som motiverar resistensbestämning av bakterier som annars normalt inte resistensbestäms.

För vissa bakterietyper, som *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* och *L. pneumophila* görs ingen resistensbestämning, dels för att resistensutveckling saknas och dels för att resistensbestämning är teknisk komplicerad eller att internationell standard saknas. Vilka antibiotika laboratoriet testar beror på bakterietyp och i viss mån också på insändande avdelning. För primärvården är perorala medel viktigast. Specialpreparat eller parenterala medel reserveras för multiresistenta bakteriestammar eller invasiva



bakterieisolat.

Metoder för resistensbestämning

MIC

Bakteriers känslighet mot antibiotika bestäms som den lägsta antibiotikakoncentration som hämmar bakterieväxt (minimum inhibitory concentration= MIC). Klassiska metoder för MIC-bestämning är buljongspädning i mikrotiterplatta eller i rör, och agarspädning, vilket innebär ingjutning av antibiotika i agarplattor. En nyare metod baserar sig på en plastremsa med en koncentrationsgradient av antibiotika (gradienttest), som ger en inhibitionsellips. De flesta svenska laboratorier använder gradienttester för MIC-bestämningar, även om buljongspädning i mikrotiterplatta till viss del är på väg tillbaka, till följd av att metodiken har anpassats mer till rutinlaboratorier och att buljong MIC är referensmetodik.

För att kunna översätta ett MIC-värde till en känslighetskategori krävs kunskap om farmakokinetik och -dynamik för det testade antibiotikapreparatet. Det behövs även kunskap om normalfördelningen av MIC-värden bland bakterieisolat som saknar resistensmekanismer mot preparatet. Gränserna mellan känslighetskategorierna kallas brytpunkter och fastställs för Sveriges del i ett europeiskt samarbete.

Känslighetskategorierna är

- känslig (S= susceptible), hög sannolikhet för terapeutisk effekt
- intermediärt känslig (I= intermediate), osäker terapeutisk effekt, kan fungera till exempel om lokal antibiotikakoncentration är hög eller om medlet ges i högre dos
- resistent (R= resistant), hög sannolikhet för terapivikt.

Lappdiffusion

I dagligt arbete på laboratorierna är MIC-bestämning en relativt dyr och arbetskrävande metod jämfört med så kallad lappdiffusion. Den senare metodiken baserar sig på diffusion av antibiotika från en papperslapp, vilket ger en hämning av bakterieväxt i en zon runt lappen.

Förutsättningen för att kunna använda lappdiffusionsmetoden för resistensbestämning är att bakterieisolatet måste kunna växa fram under loppet av 24 timmar. För att kunna översätta hämningszoner till känslighetskategorier behövs zonkorrelat till MIC-brytpunkten. Zonbrytpunkt tas, liksom MIC-brytpunkt, fram i europeiskt samarbete. De flesta resistensbesked som ges av svenska laboratorier baserar sig på lappdiffusionsmetoden.

De senare åren har dock även automatiserad maskinell resistensbestämning tillkommit som ytterligare en metod. I korta drag är denna metod en variant av MIC-bestämning i buljong, och tolkningen sker automatisk i maskinvaran, beroende på inprogrammerade MIC-brytpunkter. Det finns dock exempel på vissa antibiotika som är svåra att resistensbestämma med automatiserad resistensbestämning.

För dagligt kliniskt bruk ger svaren S, I eller R oftast tillräckligt underlag för val av antibiotikabehandling.

Indikation för MIC-bestämning

MIC-bestämning kan behövas vid:



- Stammar isolerade från patienter med kroniska infektioner, som endokardit eller osteit, i synnerhet vid terapivikt
- Resistensbestämning av gonokocker och även för alla långsamväxande bakterier, det vill säga bakterier som inte växer fram på ett dygn
- Vid svåra infektioner för optimering av antibiotikaval och dosering.
- Sällsynta bakterier där brytpunkter saknas. Laboratoriet måste i sådana fall göra en särskild bedömning av MIC-värdet i relation till kliniskt uppnåbara serumkoncentrationer av det aktuella antibiotikapreparatet.
- Ökad precision i känslighetskategorisering av multiresistenta isolat.

Utebliven behandlingseffekt

Resistensbestämning är en laboratoriemetod, som inte alltid avspeglar de förhållanden som råder i infekterad vävnad. Trots att en bakteriestam kan vara känslig på agarplattan, kan klinisk förbättring vid antibiotikaterapi utebli. Förklaringarna kan vara:

- Brist på följsamhet hos patienten eller felaktig dosering
- För låg antibiotikakoncentrationen i infektionshärden, vilket framför allt gäller abscesser
- Att vissa bakterier uppehåller sig intracellulärt i makrofager eller andra celler. Penicillin och liknande medel når inte in i makrofager, vilket resulterar i dålig effekt mot bakterier som *L. pneumophila* och *Salmonella Typhi*.