

Bacterial and fungal infections: evolving towards molecular pathogen diagnostics

Citation for published version (APA):

Hansen, W. L. J. (2012). *Bacterial and fungal infections: evolving towards molecular pathogen diagnostics*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20120620wh>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120620wh](https://doi.org/10.26481/dis.20120620wh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

Een grote verscheidenheid aan bacteriën, virussen, schimmels en parasieten is verantwoordelijk voor de naar schatting 15 miljoen sterfgevallen per jaar als gevolg van infectieziekten. Infectieziekten gaan gepaard met een hoge morbiditeit en mortaliteit en vormen bijgevolg een hoge sociaal-economische last voor de maatschappij. De bestrijding van infectieziekten is complex en afhankelijk van verschillende aspecten, waaronder preventie, diagnose en behandeling.

Het slagingspercentage van de behandeling wordt beïnvloed door diverse factoren, waaronder de snelheid en de precisie van de diagnose en daarom zijn snelle en gevoelige methoden voor de diagnose van infectieziekten essentieel. Nieuwe diagnostische technieken moeten bijdragen tot het voorkomen van sterfgevallen en tot het verbeteren van de kwaliteit van leven. Bovendien is een snelle interventie cruciaal om verspreiding van de ziekte te voorkomen en om de ontwikkeling van resistente stammen van bepaalde ziekteverwekkers te vermijden. Hoewel de op kweek gebaseerde methoden algemeen beschouwd worden als de gouden standaard voor de detectie en identificatie van ziekteverwekkers, dragen deze ook nadelen zoals het (relatief) lange tijdsbestek tussen de afname van een patiëntstaal en het verkrijgen van de uitslag van het microbiologisch onderzoek van moeilijk groeiende micro-organismen met zich mee. Moleculaire methoden bieden een alternatieve strategie, waarbij er zowel op niveau van eiwitten als nucleïnezuren wordt gezocht naar onderscheid tussen de verschillende soorten micro-organismen. Studies hebben aangetoond dat deze alternatieve methoden een verhoogde sensitiviteit en specificiteit bezitten, en daarnaast kunnen ze ook een aanzienlijke winst in tijd opleveren. Toch zijn er verdere studies en ontwikkelingen nodig om onder meer het gebrek aan onderscheid tussen dode en levende micro-organismen, en het gebrek aan een snelle bepaling van het antimicrobiële resistentie profiel te elimineren.

De studies uitgevoerd en beschreven in deze thesis zijn gericht op het ontwikkelen van moleculaire methoden voor de snelle diagnose van potentieel pathogene bacteriën en schimmels. Verschillende technieken, gaande van extractie tot detectie en identificatie van het bacteriële of fungale DNA, werden ontwikkeld, geoptimaliseerd en gevalideerd op verschillende klinische patiëntstalen.

De extractie van bacterieel en fungaal DNA uit verschillende lichaamsvloeistoffen

In de eerste studies werd er ingegaan op het belang van preanalytische methoden voor de selectieve extractie van microbiële DNA uit volbloed (**hoofdstuk 2a, 2b**). De implementatie van een snelle, moleculaire test biedt

immers een aanzienlijke winst in tijd wanneer deze rechtstreeks toepasbaar is op volbloed. De detectiegrens van de meest optimale DNA extractie methode bedroeg 50 kolonievormende eenheden (kve) per ml volbloed. Zowel het elimineren van remmende substanties aanwezig in bloed, als het gebruiken van grotere volumes zorgden voor een toename van de sensitiviteit. Om na te gaan of deze detectiegrens geschikt is voor klinische stalen, werd de bacteriële concentratie onderzocht in pediatrie stalen. Voorheen werd er gesuggereerd dat de concentratie micro-organismen in het bloed hoger was bij kinderen dan bij volwassenen. Maar er bestaan echter ook tegenstrijdige bevindingen die wijzen op het voorkomen van zeer lage aantallen van micro-organismen bij kinderen. Dit kan problematisch zijn omdat de diagnostische opbrengst direct gerelateerd is aan de hoeveelheid bloed die afgenomen wordt. Bij volwassenen is het aanbevolen om 20 tot 30 ml bloed per bloedkweekfles af te nemen, maar bij kinderen bedraagt dit minder dan 10ml. Tijdens ons onderzoek werden er lage aantallen bacteriën gevonden in bloedstalen van kinderen. In 85% van de stalen waren er minder dan 50 kve per ml bloed aanwezig, wat erop wijst dat onze geoptimaliseerde DNA extractie methode in deze gevallen geen ziekteverwekker zou aantonen. In conclusie, de combinatie van verschillende factoren d.w.z. groter bloed volume, het elimineren van remmende substanties (m.n. humaan DNA) en de verrijking van bacterieel DNA heeft geresulteerd in het verbeteren van de detectiegrens van bestaande DNA extractie methoden die worden aangewend voor de diagnose van ziekteverwekkers. Daarnaast hebben we aangetoond dat de bacteriële concentratie in kinderen net zoals bij volwassenen eveneens laag kan zijn, wat het gebruik van deze methoden voor de rechtstreekse detectie van micro-organismen rechtstreeks uit volbloed belemmert.

De detectie en identificatie van bacteriële en fungale micro-organismen

Nadat het bacteriële of fungale DNA wordt geïsoleerd uit het patiëntstaal, kan het opgezuiverde materiaal gebruikt worden voor de volgende stap in de analyse, namelijk de precieze identificatie van de ziekteverwekker. Hiervoor worden moleculaire technieken zoals de polymerase ketting reactie (PCR) toegepast. Deze is gebaseerd op het vermenigvuldigen van het aanwezige DNA tot een analyseerbare concentratie. Deze methode is uitermate snel, en kan binnen enkele uren resultaten genereren, waardoor een snelle detectie van pathogenen mogelijk is. In een van onze studies werd er een PCR methode ontwikkeld om de meest voorkomende bacteriële ziekteverwekkers op te sporen in bloedkweken (**Hoofdstuk 3a**). De test was bestemd om in de eerste plaats een bacteriële infectie te diagnosticeren. Daarnaast is het mogelijk om met deze test de volgende micro-organismen te identificeren: *Staphylococcus*

species, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* species, *Streptococcus* species, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* species en *Pseudomonas aeruginosa*. Er werden 248 bloedkweken onderzocht op aanwezigheid van bacteriën, en in 97% konden de resultaten van de referentiemethode (kweekgebaseerde identificatie) bevestigd worden met onze nieuwe identificatietest. De analyse met behulp van deze nieuwe methode neemt in totaal 2 uur in beslag, hetgeen een drastische verbetering betekent ten opzichte van de huidige bacteriële diagnostiek die 18 - 24 uur in beslag neemt. Een soortgelijke test werd er ontwikkeld voor de diagnose van relevante schimmelinfecties, veroorzaakt door *Candida* species (**Hoofdstuk 3b**). Invasieve infecties met *Candida* species zijn geassocieerd met hoge sterftecijfers, variërend van 38% tot 74%. In onze experimenten werden alle *Candida*-positieve bloedkweken correct geïdentificeerd op species niveau. Daarbij zijn we er met onze nieuwe methode in geslaagd om *Candida albicans* te identificeren in bloedkweken die als negatief werden beschouwd met de referentiemethode. Het is alom bekend dat schimmels vaak traag en moeilijk te kweken micro-organismen zijn, waardoor onze alternatieve, moleculaire methode een belangrijk voordeel oplevert ten opzichte van de kweekgebaseerde methode. Ook moleculaire methoden hebben in de loop der jaren een grondige evolutie doorstaan. In het verleden werd de PCR techniek voornamelijk gecombineerd met een tijdrovende sequentieanalyse van het bacteriële 16S rDNA gebied. Hier kwam recent verandering in door het op de markt brengen van commerciële kits zoals *SeptiFast* (Roche Diagnostics) en *SepsiTest* (Molzym) voor de analyse van bloedstalen. Deze methoden zijn bestemd voor de detectie van 25 tot 40 sepsis-gerelateerde pathogenen, en kunnen worden afgerond binnen de 6 tot 8 uur. *Prove-It Sepsis* (Mobidiag) is een gelijkaardig systeem voor de diagnose van 80 micro-organismen uit bloedkweken, en dit binnen de 3,5 uur. Hoewel deze veelbelovende technologieën een meer uitgebreid panel van micro-organismen aanbieden, en sommigen zelfs rechtstreeks kunnen worden toegepast op volbloedstalen, zullen studies hun mate van implementatie in routine diagnostiek nog moeten uitwijzen. Ondanks alle onderzoek is het duidelijk dat de huidige moleculaire technieken nog niet voldoende in staat zijn om de kweekgebaseerde referentiemethoden te vervangen.

Naast identificatie van de ziekteverwekker is het in bepaalde gevallen ook noodzakelijk om kennis te hebben over de mate van infectie, met andere woorden de hoeveelheid micro-organismen aanwezig in het patiëntstaal. In een studie waarbij we gekeken hebben naar urineweginfecties, hebben we getracht om zowel identificatie als kwantificatie van het micro-organisme te bewerkstelligen (**Hoofdstuk 4**). De bepaling van de hoeveelheid micro-organismen is essentieel omdat verschillende afkappunten ($>10^3$ of 10^5 kve/ml) worden gebruikt in combinatie met klinische symptomen als diagnose van

urine­weginfecties in verschillende bevolkings­groepen. Het toepassen van de nieuwe moleculaire methode gebruik makende van de PCR laat ons toe om te categoriseren in: normale urine ($< 10^3$ kve/ml), bacteriurie (10^3 - 10^4 kve/ml) en significante bacteriurie ($\geq 10^5$ kve/ml). Bovendien zou deze snellere screening van urinestalen ervoor zorgen dat identificatie met behulp van kweek gereduceerd wordt met 47%.

In conclusie, de ontwikkeling van een snelle, sensitieve en specifieke real-time PCR methode heeft de identificatie en semi-kwantificatie van klinisch relevante bacteriën en schimmels uit bloedkweken en urine mogelijk gemaakt, en dit binnen de 2 uur. Er is echter nog wel behoefte aan klinische studies die de waarde (impact van m.n. reductie in tijd tot diagnose en versnelde bijstelling van therapie, hospitalisatieduur, complicaties,...) en rol van moleculaire methoden in het verbeteren en versnellen van zowel diagnose als behandeling van patiënten aantonen.

De genotypische detectie van antibiotica resistentie in *Staphylococcus* species

Veel studies in het verleden hebben zich toegeleegd op het ontwikkelen van een snelle methode voor de identificatie van bacteriële en fungale infecties uit verschillende patiëntstalen. Toch is steeds de rol van de kweekgebaseerde referentiemethode prominent aanwezig gebleven, ten gevolge van het gebrek aan een alternatieve methode voor het bepalen van een antibiogram. Het ontwikkelen van een alomvattende genotypische test voor antibioticaresistentie wordt bemoeilijkt door het voorkomen van de grote hoeveelheid genen die betrokken zijn in de verschillende resistentiemechanismen. Eerdere studies gebruik makende van micro-arrays hebben laten zien dat deze technologie geschikt is voor dergelijke toepassingen. Het feit ook dat deze technologie een hoge capaciteit heeft, maakt hem aantrekkelijk voor dit type onderzoek. Vaak is deze micro-array technologie echter niet geschikt in termen van kosten, benodigde laboratoriumapparatuur en gebruiksvriendelijkheid.

In het laatste experimentele hoofdstuk hebben we getracht een PCR methode te ontwikkelen voor de bepaling van antibioticaresistentie in staphylococ­cen (**Hoofdstuk 5**). Een panel van de meest gevraagde en klinisch relevante antibiotica werden zowel genotypisch als fenotypisch bepaald. De resultaten voldeden aan de selectiecriteria ($> 90\%$ categorische overeenkomst tussen referentiemethode en nieuwe test) opgesteld door Jorgensen, en waren beschikbaar binnen de 2 uur nadat een bloedkweek positief bevonden was. Het aanbieden van zowel identificatie van het micro-organisme als bepaling van resistentie kan de analyse sterk versnellen en stelt de aanvrager in staat de keuze van de juiste therapie te starten op een eerder tijdstip dan verkregen na de conventionele kweekgebaseerde methode. We moeten ons echter bewust

zijn dat het onderzoek naar moleculaire methoden voor antibiotica resistentie bepaling zich in een beginstadium bevindt en dat nog meer studies vereist zijn wat betreft resistentiemechanismen en antibiotica resistentie determinanten. Toch bestaan er reeds enkele voorbeelden van genotypische testen die reeds in de kliniek toegepast worden zoals de detectie van het *mecA* gen, karakteristiek voor methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). De verwachting is dan ook dat dit in de toekomst voor meerdere resistente micro-organismen het geval zal zijn.

Conclusie

Samenvattend hebben onze bevindingen aangetoond dat moleculaire methoden voor wat betreft snelheid, sensitiviteit en specificiteit de huidige referentiemethoden kunnen overtreffen en zeker kunnen aangewend worden voor de detectie en identificatie van bacteriële en fungale micro-organismen. We hebben kunnen aantonen dat bepaalde elementen in het DNA extractie proces, met name grotere bloedvolumes, en het elimineren van humaan DNA, de detectiegrens van moleculaire testen drastisch kan verlagen. Daarnaast heeft de ontwikkeling van een identificatietest voor zowel klinisch relevante bacteriën als schimmels een snelle analyse (binnen één werkdag) van patiëntstalen zoals bloedkweken mogelijk gemaakt. Al deze verbeteringen moeten er op termijn toe leiden dat zowel de diagnose als de behandeling van patiënten met verdenking op infectie sneller verlopen, waardoor ook de morbiditeit en mortaliteit zal afnemen. Er zullen echter meer studies moeten uitgevoerd worden waarbij de implementatie van deze testen onderzocht wordt, en of het op termijn mogelijk zal zijn om patiëntstalen rechtstreeks te analyseren, zonder voorafgaande kweek.

