

Evbakterijski PCR – uporabnost molekularne metode v klinični praksi

Eubacterial PCR – the usefulness of a molecular method in clinical practice

Zala Lužnik,¹ Tjaša Cerar Kišek,² Eva Ružič-Sabljič,² Manica Müller Premru,² Tomaž Jurca,¹ Janez Tomažič¹

¹ *Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Japljeva 2, 1525 Ljubljana*

² *Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška 4, 1000 Ljubljana*

Korespondenca/ Correspondence:

prof. dr. Janez Tomažič, dr. med., Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, UKC Ljubljana, Japljeva 2, 1525 Ljubljana
e: janez.tomazic@kclj.si

Ključne besede:

bakterijske okužbe; kužnine; kultivacija in identifikacija; 16S rRNA PCR

Key words:

bacterial infections; specimens; cultivation and identification; 16S rRNA PCR

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2015; 84: 688–93

Prispelo: 29. dec. 2013,
Sprejeto: 17. sept. 2015

Izvleček

Izhodišča: Osamitev in identifikacija bakterij omogoča postavitve diagnoze bakterijske okužbe in s tem usmerjeno in racionalno rabo antibiotikov. V nekaterih primerih okužb v primarno sterilnih mestih, predvsem kadar se je bolnik pred odvzemom kužnine že zdravil z antibiotiki, lahko dajo rutinski mikrobiološki postopki kultivacije negativne rezultate. V teh primerih lahko dodatna uporaba molekularnih metod, kot je evbakterijski (širokospektralni 16S rRNA) PCR, iz istih kliničnih vzorcev, omogoči v prvi stopnji detekcijo bakterijske DNK in v drugi še identifikacijo bakterijske vrste. V članku predstavljamo priporočila za smiselno in racionalno izbiro preiskave.

Metode: V obdobju od februarja 2012 do aprila 2013 smo 35 bolnikom, ki so že prejeli antibiotik, odvzeli 42 kužnin in jih testirali hkrati z evbakterijskim PCR in s standardnimi postopki kultivacije.

Rezultati: Z evbakterijskim PCR smo dobili pozitiven rezultat iz 21/42 kužnin 17 bolnikov. S tem smo pri 15 bolnikih, pri katerih smo dobili dobro identifikacijo, ob hkratnem upoštevanju klinične slike, laboratorijskih in slikovnih preiskav vzročno opredelili bakterijsko okužbo, pri dveh bolnikih pa je nismo mogli opredeliti, ker smo dobili nejasno identifikacijo (mešana zaporedja). Le pri štirih osebah od vseh PCR – pozitivnih bolnikov so bile kužnine pozitivne tudi s kultivacijo. Pri ostalih 18 bolnikih pa so bile negativne z obema metodama.

Zaključki: Z evbakterijskim PCR smo v primarno sterilnih kužninah bolnikov, ki so že prejeli antibiotik, dokazali bakterije pogosteje kot s kultivacijo. Čeprav preiskava omogoča identifikacijo katerega koli bakterijskega povzročitelja v kužnini, ima nekaj omejitev: z njo ne moremo določiti več bakterijskih vrst v isti kužnini hkrati,

ne moremo določiti občutljivosti za antibiotike, ne moremo razlikovati med živimi in mrtvimi bakterijami, ne moremo ločiti kontaminantov od povzročiteljev. Slabost pa je tudi sorazmerno visoka cena preiskave.

Abstract

Background: Isolation and identification of bacterial pathogens enables accurate diagnosis of bacterial infection, allowing rational use of appropriate narrow-spectrum antibiotics. In some cases of infections in primary sterile sites, especially when patient is already treated with antimicrobials, the routine bacterial culture can give negative results. In those cases additional use of molecular techniques such as eubacterial (broad-range 16S rRNA) PCR may detect and identify bacterial genetic material. In the following article, recommendations for appropriate and rational use of eubacterial PCR are presented.

Methods: Between February 2012 and April 2013, 42 specimens from 35 patients, already treated with antimicrobials, were taken and tested by eubacterial PCR in addition to routine microbiological culture. Results: Eubacterial PCR yielded a positive result in 21/42 specimens from 17 patients. Therefore, in 15 patients the diagnosis of bacterial infection was obtained by DNA identification and the results were interpreted in accordance with patients' history, laboratory and image diagnostics, but in two patients the bacterial infection could not be identified because mixed sequences were obtained. Only in 4 of PCR-positive patients, specimens were culture-positive. In the remaining 18 patients, specimens were negative with both methods.

Conclusions: In patients already treated with antimicrobials, eubacterial PCR from primary sterile sites yielded a positive result more often than did routine microbiological culture. Although eubacterial PCR enables the identi-

fication of any bacterial DNA in clinical specimens, there are some limitations: no possibility of identifying more than one bacterial species in the same specimen, no information concerning antimicrobial susceptibility of the causative

agents, the problem of differentiating living from dead bacteria and the problem of differentiating between contaminants and pathogenic bacteria. Furthermore, the method is expensive.

Uvod

Za vzročno opredelitev bakterijske okužbe je ključnega pomena osamitev in identifikacija povzročitelja. Poznavanje povzročitelja omogoča najbolj smotrno zdravljenje. Usmerjeno zdravljenje je bolj učinkovito od empiričnega. S tem se izognemo pretiranemu in neustreznemu predpisovanju protimikrobnih učinkovin in zmanjšamo razvoj večkratno odpornih bakterij, zmanjšamo pa tudi nastanek neželenih učinkov zdravil.¹ S standardnimi mikrobiološkimi postopki včasih povzročitelja ne uspemo osamiti. Vzroki so različni; negativen rezultat kulture je najpogosteje posledica empirične uporabe antibiotikov pred odvzemom in napak pri izbiri, odvzemu in prenosu kužnine. Negativen rezultat dobimo tudi pri povzročiteljih, ki jih ni mogoče kultivirati ali je njihova osamitev otežena zaradi potrebnih posebnih pogojev gojenja (počasi rastoče bakterije, anaerobne bakterije, za kultivacijo zahtevne bakterije).² Z molekularnimi metodami, kot je verižna reakcija s polimerazo (*angl.* polymerase-chain reaction, PCR), lahko v različnih kužninah neposredno dokažemo bakterijsko DNK.³ Evbakterijski ali širokospektralni PCR je neselektivno odkrivanje bakterijske DNK, ki ji sledi v drugi stopnji identifikacija vrste na molekularni ravni. Omogoča nam dokaz DNK večine bakterijskih vrst neposredno iz kužnin in se kot tak vse bolj uveljavlja v klinični praksi.^{4,5} Metodo uporabljamo tudi za identifikacijo nepoznanih bakterij, osamljenih s standardnimi mikrobiološkimi postopki.^{3,6}

V izvirnem prispevku predstavljamo prednosti in pomanjkljivosti evbakterijskega PCR v primerjavi s kultivacijo na temelju naših enoletnih kliničnih izkušenj uporabe te metode na kužninah iz primarno sterilnih mest pri bolnikih, ki so pred odvzemom kužnin že prejeli antibiotik.

Metode

Evbakterijski PCR je molekularna metoda, ki se je v 70. letih prejšnjega stoletja začela uveljavljati za potrebe taksonomije oz. filogenetskega razvrščanja bakterij. Bakterije razvršča na osnovi podobnosti v genskem zapisu za 16S rRNK (velikost cca 1500 bp), ki je del male podenote prokariotskih ribosomov.⁷ Bakterijska 16S rRNK je sestavljena iz izmenjujočih se delov zelo ohranjenih (konzervativnih) in spremenljivih (variabilnih) področij. Konzervativno nukleotidno zaporedje gena je enako pri vseh vrstah oz. rodovih bakterij (evbakterijskega kraljestva), variabilna področja pa so vrstno specifična.^{2,3} Z oblikovanjem in uporabo univerzalnih PCR oligonukleotidnih začetnikov (*angl.* primers), ki se vežejo na konzervativno področje gena, se omogoči pomnožitev vmesnega variabilnega predela gena, kar nam da pozitiven rezultat (prva stopnja reakcije). Za identifikacijo bakterije je potrebna še druga stopnja reakcije, ko pomnoženemu specifičnemu tarčnemu odseku bakterijske DNK določimo nukleotidno zaporedje in ga primerjamo z različnimi genskimi bankami (GenBank, Ribosomal Database projekt).²

Metoda se največ uporablja pri diagnosticiranju okužb primarno sterilnih mest, pri katerih pričakujemo enega povzročitelja: bakterijski endokarditis, meningitis, endoftalmitis, okužba plevralne, perikardne in peritonejske votline, artritis in osteomielitis ter okužbe vsadkov, okužbe globokih tkiv predvsem, kadar se je bolnik pred odvzemom kužnine že zdravil z antibiotiki. Primerne kužnine za evbakterijski PCR so kri, likvor, steklovina, plevralna in perikardialna tekočina, ascites, sklepna tekočina in različna tkiva (npr. srčna zaklopka, žila, kost, del jeter, pljuč, bezgavka itd.).⁵

Ker z evbakterijskim PCR dokažemo prisotnost DNK bakterij, metoda ne loči med

živimi in neživimi bakterijami, kar lahko oteži odločitev o zdravljenju ali o trajanju (nadaljnega) antibiotičnega zdravljenja.

Metoda je zaradi neselektivnosti oligonukleotidnih začetnikov in velike občutljivosti dovzetna za zunanjo kontaminacijo kužnine z okoljskimi bakterijami ali z bakterijami normalne kožne flore pri odvzemu kužnin. Lažno pozitiven rezultat lahko dobimo tudi zaradi kontaminacije PCR reagentov, kar skoraj ni možno, ker so za izvedbo evbakterijskega PCR potrebni ustrezni laboratorijski pogoji in številni specifični reagenti.⁸ Pri omenjenih bakterijah, ki jih lahko dobi-

mo pri evbakterijskem PCR, se včasih težko odločimo, ali gre za pravega povzročitelja okužbe ali za kontaminante.⁹ Vrstnospecifični PCR nam za razliko od evbakterijskega PCR natančno določi le bakterijo, ki jo pričakujemo v kužnini ob določeni klinični sliki in je manj podvržen kontaminaciji.⁸ Za razlago rezultatov so pri evbakterijskem PCR težavna tudi mešana zaporedja dobljenih produktov PCR, kar bi sicer lahko predstavljalo polimikrobno okužbo, lahko pa gre za kontaminacijo vzorca. Tudi tukaj nam bi bil v pomoč vrstnospecifični PCR. Za pozitiven rezultat evbakterijskega PCR je navadno

Tabela 1: Prikaz rezultatov evbakterijskega PCR v 42 kužninah 35 bolnikov.

Kužnina	Št. bolnikov (št. pozitivnih bolnikov)	Št. kužnin (vzorcev)	Rezultat PCR		
			Neg.	Poz.	Molekularna identifikacija bakterije
Kri	11 (1)	11	10	1	koagulazno negativen stafilokok
Likvor	9 (5)	10	4	6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
					<i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> [#]
					<i>Hemophilus influenzae</i> [#]
					<i>Listeria monocytogenes</i>
					mešano zaporedje
Sklepni punktati	3 (3)	3	0	3	<i>Streptococcus agalactiae</i> (skupina B) – kolk*
					<i>Neisseria gonorrhoeae</i> – kolk*
					<i>Neisseria meningitidis</i> – koleno
Kost	1 (1)	2	0	2	mešano zaporedje <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Bezgavke	2 (1)	2	1	1	<i>Streptococcus pyogenes</i> (skupina A)
Plevralni punktati	4 (2)	4	2	2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
					<i>Streptococcus pyogenes</i> (skupina A)
Jetra	1 (0)	1	1	0	-
Punktati ascitesa	1 (1)	1	0	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i> *
Vsebina abscesa	1 (1)	2	0	2	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Steklovina, prekatna vodka	1 (1)	4	3	1	<i>Streptococcus pyogenes</i> (skupina A)*
Perikardna tekočina, cista mediastinuma	1 (1)	2	0	2	<i>Actinomyces</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp.
Skupaj	35 (17)	42	21	21	

Legenda: Neg. – negativni; Poz. – pozitivni; * – pozitivno tudi s kulturo; # – bolnica z likvorsko fistulo.

potrebna tudi nekoliko večja količina bakterij (od 10 do 100 CFU, v povprečju 30 CFU) kot za vrstno specifični PCR, kar dosežemo z zadostno količino (velikostjo) kliničnega vzorca ter njegovo primarno obdelavo (npr. centrifugiranje telesnih tekočin in dokaz bakterijske DNK v sedimentu).² Največja pomanjkljivost evbakterijskega PCR v primerjavi s kulturo in biokemično identifikacijo bakterij je, da je nekajkrat dražji od standardne kulture in osamitve, obenem pa ne more določiti občutljivosti bakterije za antibiotike (ni antibiograma).

Rezultati

V obdobju od februarja 2012 do aprila 2013 smo retrospektivno primerjali evbakterijski PCR in kultivacijo pri 35 bolnikih (42 kužnin), ki so bili v tem obdobju hospitalizirani na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, vsi pa so pred odvzemom kužnin že prejeli antibiotik. S pomočjo evbakterijskega PCR smo dobili pozitiven rezultat iz 21 kužnin; v 18/21 kužninah 15 bolnikov smo dobili čista zaporedja (pri enem od teh pa v eni kužnini čisto in v drugi mešano) in in ob upoštevanju klinične slike, laboratorijskih in slikovnih preiskav, vzročno opredelili bakterijsko okužbo, pri dveh pozitivnih bolnikih pa smo dobili samo mešana zaporedja evbakterijskega PCR produkta, kar smo ob poznavanju klinične slike interpretirali kot kontaminacijo vzorca. Le pri 4 od 17 s PCR pozitivnih bolnikov so bile kužnine pozitivne tudi s kultivacijo (Tabela 1). Kužnine ostalih 18 bolnikov so bile

negativne z obema metodama. Najpogosteje identificirani bakteriji sta bili *Streptococcus pyogenes* in *Streptococcus pneumoniae*, vsaka v po treh kužninah (Tabela 1).

Razpravljanje

V štirinajstmesečni raziskavi smo retrospektivno primerjali evbakterijski PCR s kultivacijo pri 35 bolnikih (42 kužnin), ki so pred odvzemom kužnin že prejeli antibiotik. Z raziskavo smo želeli ugotoviti uporabnost molekularne metode v tistih kliničnih primerih, ko je tveganje za lažno negativen rezultat klasične kulture največje in bi bila uporaba dodatne molekularne metode najbolj učinkovita. Ker klinik najbolj pozna klinično sliko in verjetnost bakterijske okužbe, predlagamo, da že ob pošiljanju kužnine označi na spremnem listu, kadar v primeru negativne kulture želi še dokaz bakterij z evbakterijskim PCR.

Jensen in sod.⁵ so v šestletni raziskavi (2003–2009) z uporabo evbakterijskega PCR dobili pozitiven rezultat v 26 % od več kot 2600 različnih s kultivacijo negativnih kužnin bolnikov, ki so že prejeli antibiotik, in sicer v: 45 % preiskanih srčnih zaklopk, 45 % plevralnih tekočin, 42 % bezgavk, 21 % sklepnih tekočin oz. kostnih tkiv, 19 % vzorcev likvorja, 26 % vzorcev krvi in 24 % vzorcev ascitesa ter jeter. Skoraj polovica vseh kužnin je bila iz kosti oz. punktatov sklepov, drugi najpogostejši kužnini sta bili likvor oz. možgani. Po detekciji s to metodo so bakterije v 80 % pozitivnih kužnin v drugi stopnji reakcije tudi identificirali, v 15 % pa

Tabela 2: Priporočila za smotrno uporabo evbakterijskega PCR iz kužnin* ob sumu na bakterijsko okužbo.

1. Pri zelo prizadetem bolniku, še posebej, kadar je bolnik imunsko oslabiljen; ko etiologija zelo verjetne bakterijske okužbe ni opredeljena s standardnimi mikrobiološkimi postopki.**
2. Pri bolniku, ki sicer ni prizadet, je pa zaradi predvidenega dolgotrajnega antibiotičnega zdravljenja zelo pomembna vzročna opredelitev bakterijske okužbe in zato uvedba smotrnega zdravljenja (npr. infekcijski endokarditis, osteomielitis/spondilodiscitis, pljučni/možganski empiem/absces, endoftalmitis, mikotična anevrizma itd.).
3. Pri bolniku, pri katerem sumimo na povzročitelje, ki jih z običajnimi mikrobiološkimi metodami ne moremo dokazati (npr. *Tropheryma whippelii* itd.) oz. jih težko dokažemo (npr. anaerobi, za kultivacijo zahtevne bakterije).

Legenda: * – s primarno sterilnih mest; ** – klinik naj bi že ob pošiljanju take kužnine na spremnem listu označil, da v primeru negativne kulture želi še evbakterijski PCR.

so dobili mešana zaporedja, pri preostalih 5 % pa identifikacija ni bila mogoča.⁵

V naši raziskavi, kot je razvidno iz Tabele 1, pa smo s pomočjo evbakterijskega PCR dobili pozitiven rezultat v kar 50 % (21/42) kužnin pri 17 bolnikih; v 18/21 kužninah (86 %) pri 15 od teh bolnikov smo v drugi stopnji reakcije bakterijo tudi identificirali, v 14 % pa smo dobili mešana zaporedja, zato pri dveh bolnikih okužbe nismo mogli opredeliti. Najpogosteje identificirani bakteriji sta bili *Streptococcus pyogenes* in *Streptococcus pneumoniae*, ki sta običajno dobro občutljivi na najpogostejše izkustveno izbrane antibiotike (npr. aminopeniciline, amoksisicilin-klavulansko kislino, protistafilokokni penicilin, makrolide, tretjo generacijo kinolonov), hkrati pa zaradi avtolitičnih lastnosti hitro propadeta v kužnini,² kar je lahko vzrok za neuspešno kultivacijo. Najpogostejši kužnini v naši populaciji bolnikov sta bili likvor in kri.

Z evbakterijskim PCR so drugi avtorji dokazali tudi bakterije, ki so bile sicer v kužnini vidne pod svetlobnim mikroskopom, osamitev pa ni bila uspešna, npr. *Tropheryma whippeli* (Whipplova bolezen) in *Bartonella henselae* (bacilarna angiomatoza).¹⁰ To velja tudi za bakterije, ki propadejo zaradi neustreznega prenosa kužnine do laboratorija. Z identifikacijo patogenih bakterij, ki jih pri določenem bolniku glede na klinično sliko ne pričakujemo, pa metoda spreminja tudi epidemiološke vidike. Opisan je npr. primer infekcijskega endokarditisa, povzročene s *T. whippeli*,¹¹ pri čemer pa bolnik ni imel črevesne simptomatike, in primer osteomielitisa, povzročene s *Helicobacter* spp.⁴ V prihodnosti pričakujemo več podobnih kliničnih poročil.

V naši raziskavi se je molekularna metoda še posebej izkazala pri diagnostiki akutnega gnojnega meningitisa, ko zaradi nevarne okužbe in burne klinične slike vzorec likvorja pogosto odvzamejo po že izkustveno uvedeni antibiotični terapiji,^{5,12} kulture pa tako pogosto ostanejo negativne. V naši raziskavi smo iz likvorja z evbakterijskim PCR pri šestih od devetih bolnikov, pri katerih bakterij nismo uspeli osamiti, dokazali bakterijsko DNK in bakterije identificirali: pri enem *Listeria monocytogenes*, pri bolnici

z likvorsko fistulo prvič *Moraxella catarrhalis* in drugič *Haemophilus influenzae*, pri enem bolniku *Pseudomonas aeruginosa*, pri dveh pa smo dobili mešana zaporedja, zato identifikacija ni bila mogoča (Tabela 1).

Evbakterijski PCR se vse bolj uveljavlja tudi v diagnostiki okužb sklepov/kosti, še posebej v diagnostiki okužb umetnih sklepov, pri katerih je klinična slika pogosto manj izrazita in okužba že kronična, bolniki že prejemajo antibiotike, ko se ugotovi okužba, pa je pogosto potreben tudi kirurški poseg.⁵ Rosey s sodelavci je potrdil diagnozo septičnega artritisa v 23 % s kultivacijo negativnih kužnin.¹³ Ker je pogosto kot povzročitelje našel anaerobne bakterije in glede na rezultate primerjalnih raziskav (evbakterijski PCR s kulturami), številni menijo, da se pri okužbah sklepov in kosti prisotnost anaerobnih povzročiteljev podcenjuje.^{4,5}

Pri 18-letni bolnici smo iz punktata vnetega kolenskega sklepa identificirali *Neisseria meningitidis* (možno je, da je šlo za septični artritis po asimptomatski meningokokcemiji brez simptomov), pri 24-letnem bolniku smo iz kolčnega sklepa dokazali *Neisseria gonorrhoeae* (Tabela 1). Pri tem bolniku je bila kultura sklepne tekočine ob prvem odvzemu negativna najverjetneje zaradi predolgega prenosa kužnine ob neustreznih temperaturi. Po rezultatu evbakterijskega PCR in ponovnem pravilnem odvzemu in prenosu kužnine pa je bila tudi kultura sklepne tekočine pozitivna, saj se je bolnik do identifikacije povzročitelja zdravil z neustreznim antibiotikom (protistafilokokni penicilin). Pri tretjem bolniku smo iz kostnine iz ene kužnine dobili mešana zaporedja, iz druge pa smo identificirali *Acinetobacter calcoaceticus*, ki ga sicer lahko najdemo tudi na koži, vendar smo ob preučitvi kliničnih, laboratorijskih in radioloških podatkov sklepali, da ta bakterija povzroča okužbo kostnine, bolnico usmerjeno antibiotično zdravili.

Zanimiv je tudi primer bolnika, pri katerem smo iz tekočine osrčnika in ciste v mediastinumu dokazali *Actinomyces* spp., katere identifikacija je ključno vplivala na odločitev o izbiri in trajanju zdravljenja aktinomikoznega perikarditisa (Tabela 1).

Najslabše rezultate smo dosegli pri odkrivanju bakterijske DNK iz venske krvi, saj

ima metoda slabo občutljivost v primerjavi s hemokulturami, o čemer je poročal že Ammann s sodelavci.¹⁴ V primerjavi s hemokulturo je namreč količina odvzete krvi manjša, kri pa pogosto tudi ni odvzeta ob pravem času, ko so bakterije v krvi. V našem primeru smo dobili pozitiven rezultat le v enem od enajstih vzorcev krvi (Tabela 1) in sicer pri bolniku z endokarditisom. Iz krvi smo identificirali koagulazno negativni stafilokok, ki smo ga opredelili kot povzročitelja infekcijskega endokarditisa in bolnika ustrezno zdravili.

V našo raziskavo nismo vključili testiranja zaklopk, odstranjenih pri operaciji bolnikov z infekcijskim endokarditisom, in steklovine pri bolnikih z endoftalmitisom, kar bomo naredili v prihodnosti. Evbakterijski PCR obeta veliko prav pri teh bolnikih. Nekateri raziskovalci so mnenja, da bi bilo molekularno metodo smiselno vključiti med Dukova merila za infekcijski endokarditis.¹¹ Zaradi pogoste predhodne (npr. pred operacijo) uporabe antibiotikov pri bolnikih z

infekcijskim endokarditisom so standardne kužnine, kot so zaklopke, pogosto ostale s kultivacijo negativne. V raziskavi Bossharda in sod. je evbakterijski PCR tako prispeval k identifikaciji povzročiteljev kar v 23 % primerov postavljenega suma na endokarditis, ko so bile hemokulture še negativne.¹¹

Pri 15 bolnikih smo ob upoštevanju klinične slike z evbakterijskim PCR prišli do vzročne opredelitve bakterijske okužbe, kar je odločilno vplivalo na usmerjeno antibiotično zdravljenje, včasih pa tudi na trajanje zdravljenja.

Zaključek

Glede na navedbe v tuji literaturi in glede na naše rezultate je uporaba evbakterijskega PCR najbolj smiselna pri okužbah v primarno sterilnih mestih, če s kultiviranjem bakterij ne uspemo osamiti, predvsem pri bolnikih, ki že prejemajo antibiotike, ali ko gre za povzročitelje, ki jih ni mogoče kultivirati ali je njihova osamitev zapletena.

Literatura

- Pulcini C, Gyssens IC. How to educate prescribers in antimicrobial stewardship practices. *Virulence* 2013; 4: 192–202.
- Harris KA in Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol* 2003; 52: 685–91.
- Sibley CD, Peirano G, Church DL. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect Genet Evol* 2012; 12: 505–21.
- Sontakke S, Cadenas MB, Maggi RG, Diniz PP, Breitschwerdt EB. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 2009; 76: 217–25.
- Jensen KH, Dargis R, Christensen JJ, Kemp M. Ribosomal PCR and DNA sequencing for detection and identification of bacteria: experience from 6 years of routine analyses of patient samples. *APMIS* 2014; 122: 248–55.
- Mignard S, Flandrois JP. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods* 2006; 67: 574–81.
- Doolittle WF. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* 1999; 284: 2124–8.
- Döring G, Unertl K, Heining A. Validation criteria for nucleic acid amplification techniques for bacterial infections. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 909–18.
- Kommedal O, Lekang K, Langeland N, Wiker HG. Characterization of polybacterial clinical samples using a set of group-specific broad-range primers targeting the 16S rRNA gene followed by DNA sequencing and RipSeq analysis. *J Med Microbiol* 2011; 60: 927–36.
- Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 32–9.
- Bosshard PP, Kronenberg A, Zbinden R, Ruef C, Böttger EC in Altwegg M. Etiologic Diagnosis of Infective Endocarditis by Broad-Range Polymerase Chain Reaction: A 3-Year Experience. *Clin Infect Dis* 2003; 37:167–72.
- Welinder-Olsson C, Dotevall L, Hogeveik H, Jungnelius R, Trollfors B, Wahl M, et al. Comparison of broad-range bacterial PCR and culture of cerebrospinal fluid for diagnosis of community-acquired bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 879–86.
- Rosey AL, Abachin E, Quesnes G, Cadilhac C, Pejin Z, Glorion C, et al. Development of a broad-range 16S rDNA real-time PCR for the diagnosis of septic arthritis in children. *J Microbiol Methods* 2007; 68: 88–93.
- Ammann RA, Zucol F, Aebi C, Niggli FK, Kühne T, Nadal D. Real-time broad-range PCR versus blood culture. A prospective pilot study in pediatric cancer patients with fever and neutropenia. *Support Care Cancer* 2007; 15: 637–41.