



UPPSALA
UNIVERSITET

“Asiaten” 1957-58:
En journalstudie kring hur influensapandemin
drabbade Uppsala

Samt försök att detektera cytotoxinet

Panton Valentine Leukocidin
hos
Staphylococcus aureus

i lungbiopsier från
samma pandemi

Åsa Möller

Läkarprogrammet, 30 hp

Handledare: Björn Olsen och Josef Järhult

Institutionen för medicinska vetenskaper

Klinisk mikrobiologi och

Infektionsmedicin

Innehållsförteckning

1. Abstract	3
2. Sammanfattning	4
3. Bakgrund	6
3.1 Influensapandemier	6
3.2 ”Asiaten” 1957-58	6
3.3 Sekundära bakteriella pneumonier och virulensfaktorn PVL	7
3.4 DNA-extraktion från paraffininbäddad vävnad	8
3.5 Studiens syfte	8
4. Metod	9
4.1 Journalstudie	9
4.2 Insamling av representativa influensafall från remissarkivet för analys av PVL	9
4.3 Snittning och DNA-extraktion	10
4.3.1 Modifieringar av extraktionsprotokollet	10
4.3.2 Extraktion av DNA från lungvävnadsprover	11
4.3.3 Kontroll av erhållen nukleinsyrakoncentration	11
4.4 PCR	11
4.5 Etiskt tillstånd	11
5. Resultat av journaldelen	12
5.1 Statistik från ”Asiaten” i Uppsala	12
6. Resultat av PVLdelen	20
6.1 Modifiering av DNA-extraktionsprotokoll	20
6.1.1 Tiden i xylol	20
6.1.2 Inkubationstiden i 56 grader samt mängden tillsatt proteinas K	20
6.2 DNA-extraktion från lungvävnadsprover	20
6.3 PCR	21
7. Diskussion	22
7.1 Journaldelen	22
7.2 PVLdelen	23
8. Referenser	25
9. Bilagor	27

1. Abstract

The first part of this study is an epidemiological compilation of how the influenza pandemic in 1957-58 affected the region of Uppsala, Sweden. The archive of patient journals from the Central Epidemic Hospital in Uppsala in 1957-58 was searched for influenza cases. In summary, the healthcare was burdened heavily even by such a relatively mild pandemic as the Asian flu. The availability of vaccination and antibiotic treatment may have been important factors to reduce mortality.

Severe pneumonia associated with outbreaks of new influenza is often due to secondary bacterial infections. In the second part of this study samples of formalin fixed paraffin embedded (FFPE) lung tissue from nine patients who died from pneumonia during the influenzapandemic, were analyzed for PVL (Panton-Valentine Leukocidin), a cytotoxine carried by *Staphylococcus aureus*, common in necrotizing pneumonia today. There were difficulties in the method since bacterial DNA is degraded in FFPE. PCR was used to detect the staphylococcal genes PVL, *mecA* and *nuc*. There were no findings, probably due to degradation of DNA in the samples. Therefore the conclusion of this part of the study is that further refining of the method is needed to conduct searches for bacterial genes in old FFPE tissue.

2. Sammanfattning

Under historiens gång har många svåra influensapandemier drabbat världens befolkning. Stora pandemier uppstår när ett virus som normalt finns hos en viss djurart kombineras genetiskt med ett humant virus, varefter det via ett djur lyckas smitta tillbaka till människa, och även får kapacitet att smitta mellan människor. För detta nya virus har vårt immunförsvar inte någon beredskap, och det kan därför ge upphov till allvarliga, ibland dödliga infektioner. Ett exempel som ofta omnämns är Spanska sjukans härjningar under åren 1918-20, då man beräknar att mellan 50- och 100 miljoner människor dog.

Sedan dess har ytterligare två stora influensapandemier passerat, om än i något mindre omfattning än Spanska sjukan, nämligen "Asiaten" år 1957-58, och "Hongkonginfluensan" år 1968-69. Dessa båda var mycket mildare än Spanska sjukan, och det var framför allt äldre, kroniskt sjuka och barn som blev svårt sjuka och avled, även om stora delar av Sveriges befolkning insjuknade i en lindrigare variant av den mycket smittsamma influensan.

Nya influensavirus verkar uppkomma med jämna mellanrum, och efter 1968 har vi haft den s.k. "svininfluensan" A/H1N1 år 2009, vilken dessbättre inte blev särskilt aggressiv. Idag har vi allt mer tätbefolkade urbana regioner och intensiv djuruppfödning där stora populationer med dålig genetisk spridning har nära kontakt med människor, vilket innebär överhängande risk att nya influensavirus ska uppkomma i vår närtid. Dessutom bygger mycket av samhället på fungerande transporter mellan världsdelar och snabba förflyttningar av resande över världen är möjligt, vilket gör systemet mycket sårbart för smittspridning. Man kan även tänka sig att en allvarlig pandemi skulle ge en större utslagning av vitala funktioner i dagens högspecialiserade samhälle än t.ex. under Spanska sjukan för snart hundra år sedan. Om man dessutom beaktar det snabbt ökande problemet med antibiotikaresistenta bakterier kan man konstatera att vi står inför både en stor risk att nya influensapandemier ska uppstå, och att dessa i så fall kan få stor påverkan på samhället.

I denna studie har journaler från de patienter som var inlagda för influensa på Centralepidemisjukhuset i Uppsala under pandemin 1957-58 granskats för att få en bild av hur pandemin tedde sig i en del av landet och hur man inom sjukvården hanterade situationen. Detta resulterade i en sammanställning av vilka grupper som blev sjukast, hur patienterna behandlades, vilka resurser sjukvården hade att tillgå och i förlängningen hur pandemin drabbade Uppsala. Man kan konstatera att väldigt många i befolkningen insjuknade, även om långt ifrån alla lades in på sjukhus. Via journalerna förstår man indirekt att skolor, arbetsplatser och myndigheter stod tomma eftersom en stor del av befolkningen låg hemma med feber och hosta. På epidemisjukhuset tredubblades antalet inläggningar på grund av luftvägssymptom jämfört med samma period åren före och efter. De som blev svårast sjuka återfanns i alla åldersgrupper, med en viss övervikt mot äldre och små barn. De som hade kroniska sjukdomar, i synnerhet hjärtbesvär, blev i allra störst utsträckning allvarligt sjuka och avled, men bland de avlidna återfanns också ett antal tidigare friska yngre individer.

I spåren av influensan sågs även en ökning av antalet hjärnhinneinflammationer, och framför allt belastades vården av ett ökat antal utredningar av misstänkt sådan.

Sjukvården hade en del diagnostiska hjälpmedel att tillgå, men i de allra flesta fall var diagnosen endast grundad på klinik. Lungröntgen var annars den metod som användes mest. Över hälften av patienterna antibiotikabehandlades, de allra flesta utan föregående odling. Vårdtiderna var med dagens mått mätt långa, och patienterna låg i allmänhet kvar flera dagar för observation efter att de tillfrisknat. Anmärkningsvärt många inläggningar gjordes av sociala skäl, då många levde under dåliga sanitära förhållanden och därför inte orkade sköta sig själva när de blev sjuka. Äldre- och barnomsorgen verkade i många fall ha varit beroende av friska vårdande anhöriga.

Sammanfattningsvis kan man konstatera att sjukvården belastades hårt även av en i sammanhanget så lindrig pandemi som Asiaten. Trots att man vid den här tiden inte kunde erbjuda den intensivvård som tillämpas idag, hade man större möjligheter än under Spanska sjukan att behandla de svårast

sjuka och förebygga smittspridning genom vaccinationer. Man kan spekulera i om detta möjligen kan ha varit en av anledningarna till att pandemin aldrig fick så stora konsekvenser som den fyrtio år tidigare. Tillgången på vaccinationer för riskgrupper och nyckelpersoner, samt antibiotikabehandling av dem som insjuknade i svåra sekundära pneumonier kan ha varit en viktig faktor för att begränsa dödligheten. Sett i det perspektivet, och med insikten om att nya pandemier kan förväntas uppkomma i vår närtid där vi även brottas med en lavinartat ökande antibiotikaresistens blir frågan om att snabbt kunna administrera vaccin till stora delar av befolkningen åter mycket viktig.

En annan del av projektet syftade till att söka efter en av orsakerna till att människor blir så sjuka vid utbrott av nya influensavirus. Många forskningsrön tyder på att det är bakterier som skapar de svåra lunginflammationerna i virusinfektionens spår. Under Spanska sjukan hittade man företrädesvis streptokocker hos dem som avlidit, medan man under de senare pandemierna haft en dominans av stafylokocker i lungvävnaden hos de svårast sjuka.

I dag har man inom sjukvården växande problem med mycket aggressiva stammar av antibiotikaresistenta stafylokocker som bland annat ger vävnadsnedbrytande lunginflammationer vilka i mycket liknar bilden av de svåra infektioner man sett under tidigare influensapandemier. En av de gener som gör dessa stammar så aggressiva ger bakterien förmåga producera ett toxin kallat Panton Valentin Leukocidin (PVL). Detta verkar genom att borra hål i de vita blodkropparnas cellmembran, varvid stora mängder av immunförsvarets eget toxiska innehåll läcker ut och bryter ned omkringliggande vävnad.

Det forskas mycket kring PVLs roll i dagens svåra infektioner, men ingen har hittills tagit reda på om denna gen fanns hos de stafylokocker som orsakade de allvarliga lunginflammationerna under tidigare influensapandemier.

I den andra delen av detta projekt har därför lungvävnadsprover från influensapandemin 1957-58 analyserats i syfte att ta reda på om PVL förekom hos de stafylokocker som fanns då. Remisser till patologiska institutionen i Uppsala från tiden för "Asiaten" letades igenom hos Landstingsarkivet, och de tio mest typiska fallen valdes ut. Typiska ansågs de fall vara där man insjuknat i övre luftvägssymptom, följt av dramatiskt sjukdomsförlopp med lunginflammation, hög feber och dödlig utgång. Den mikroskopiska bilden av vävnaden skulle så mycket som möjligt likna det typiska vid stafylokockinfektion. Allra helst skulle positiv odling för *Staphylococcus aureus* föreligga.

Av de tio valda fallen återfanns endast nio i patologens klossarkiv. Stansar togs från de nio paraffinbäddade vävnadsklossarna, och ur dessa extraherades sedan DNA med hjälp av ett färdigt extraktionskit på HPA-gruppens (Human Protein Atlas) laboratorium, patologiska institutionen i Uppsala. Det finns kända problem att utvinna DNA av god kvalitet ur paraffinbäddad vävnad, eftersom nukleinsyrorna tenderar att korsbindas och gå sönder i små bitar under behandling med formalin och inbäddning i paraffin. Dessa problem gäller i synnerhet bakteriellt DNA, är extra tydligt i lungvävnad, och blir värre ju längre provet har lagrats. Eftersom många faktorer alltså talade emot att försöken skulle lyckas valde man att förfina extraktionsmetoden enligt råd från tidigare forskning, för att ändå kunna genomföra projektet. DNA i tillräcklig mängd för att kunna utföra PCR extraherades, och därefter analyserades proverna med gelbaserad PCR på mikrobiologiska laboratoriet i Uppsala.

Vid PCR-analys fick man inte utslag för PVL i något av fallen. Det negativa resultatet beror med största sannolikhet på att DNA i provet var för sönderdelat för att kunna mätas. Dock kan ett negativt resultat i en så liten studie som denna oavsett om det är sant negativt eller ej inte utesluta att PVL förekom hos andra patienter under influensapandemin.

3. Bakgrund

3.1 Influensapandemier

Under historiens gång har flertalet svåra influensapandemier drabbat världens befolkning. Stora pandemier uppstår när ett virus som normalt finns hos en viss djurart kombineras genetiskt med ett humant virus, varefter det via ett djur sedan lyckas smitta tillbaka till människa, och även får kapacitet att smitta mellan människor. Det rör sig i dessa fall om ett influensa A virus som normalt finns hos sjöfågel, men då och då muteras så att det även infekterar tamdjur, vilka sedan sprider smittan vidare till människor. (1,2) För detta nya virus har vårt immunförsvar inte har någon beredskap, och det kan därför ge upphov till allvarliga, ibland dödliga infektioner. (3) Ett exempel som ofta omnämns är Spanska sjukans härjningar under åren 1918-20, då mellan 50- och 100 miljoner människor dog. Istället för att främst drabba barn och gamla, som vid vanliga influensautbrott, insjuknade här framför allt unga friska vuxna, vilket förstas fick stora konsekvenser för samhället. (4-6)

Sedan dess har ytterligare två stora influensapandemier passerat, om än i något mindre omfattning än Spanska sjukans, nämligen "Asiaten" år 1957, och "Hongkonginfluensan" år 1968. Även vid dessa drabbades unga friska individer, men till skillnad från tidigare drabbades i högre grad också äldre, barn och immunsupprimerade. (7)

Nya influensavirus verkar uppkomma med jämna mellanrum, och efter 1968 har vi haft den s.k. "svininfluensan" A/H1N1 år 2009, vilken dessbättre inte blev särskilt aggressiv. Idag har vi allt mer tätbefolkade urbana regioner och intensiv djuruppfödning där stora populationer med dålig genetisk spridning har nära kontakt med människor, vilket innebär överhängande risk att nya influensavirus ska uppkomma i vår närtid. Dessutom bygger mycket av samhället på fungerande transporter mellan världsdelar och snabba förflyttningar av resande över världen är möjligt, vilket gör systemet mycket sårbart för smittspridning. Man kan även tänka sig att en allvarlig pandemi skulle ge en större utslagning av vitala funktioner i dagens högspecialiserade samhälle än t.ex. under Spanska sjukans för snart hundra år sedan. Om man dessutom beaktar det snabbt ökande problemet med antibiotikaresistenta bakterier kan man konstatera att vi står inför både en stor risk att nya influensapandemier ska uppstå, och att dessa i så fall kan få stor påverkan på samhället. (8)

3.2 "Asiaten", 1957-58

De första rapporterna om att en ny, mycket smittsam influensa A-stam hade uppkommit i norra Kina och nu isolerats i trakten kring Hongkong kom under våren 1957. (9) Man hade då Spanska sjukans färdigt minne, och Världshälsoorganisationen höll därför den nya pandemin under noggrann uppsikt och rapporteringen kring dess spridning var intensiv i media. I Sverige satsade man även tidigt på vaccinering av känsliga grupper i samhället, något man inte haft möjlighet till 40 år tidigare. Under våren och sommaren spred sig det nya viruset över Asien och Afrika, och i september nådde influensan Europa. De första fallen kom till de Skandinaviska länderna i slutet av augusti, som importsmitta med bl.a. festivalbesökare från Ryssland, samt ungdomar som återvände från ett scoutläger i Storbritannien, enligt SBL (Statens Bakteriologiska Laboratorium) som noggrant provtog alla utlandsresenärer. Tack vare ordentliga smittskyddsåtgärder blev det vid denna tidpunkt ingen vidare spridning av influensan i Sverige. Istället slog den till på bred front en dryg månad senare, i början av oktober, och spred sig då som en löpeld över landet. En stor andel av befolkningen insjuknade i hosta, feber och snuva, i så stor utsträckning att skolor och arbetsplatser stod tomma, och samhället gick på halvfart under flera veckor. Pandemin nådde sin kulmen under november, och klingade sedan sakta av framåt jultid, med en del eftersläpande fall under senvintern 1958. Under denna pandemi, som i folkmun kom att kallas "Asiaten", drabbades unga vuxna i mindre utsträckning än under den fruktade Spanska sjukans. Istället var det framför allt äldre, tidigare sjuka och barn som blev svårt sjuka och avled, även om stora delar av Sveriges befolkning

insjuknade i en lindrigare variant av influensan. (10) Det är mycket svårt att hitta siffror på hur många som drabbades av influensapandemin 1957-58 i världen, men dödstalet har av WHO uppskattats till ca fyra miljoner. Totalt insjuknade i Sverige 276 000 personer under Asiaten, jämfört med vanliga säsongsinfluensor där någon stans mellan tiotusen och femtiotusen personer brukar drabbas. Den verkliga siffran kan dessutom ha varit ännu mycket högre då många fall inte inrapporterades till förste provinsialläkare som ansvarade för statistiken; det kan ha rört sig om närmare en miljon enligt reviderade siffror från medicinalstyrelsen senare under 1958. (11) Detta innebar förstås stora konsekvenser för samhället. Dock hade man långt mycket större resurser att bromsa och lindra effekterna av pandemin på 50-talet än man haft 40 år tidigare under Spanska sjukan, eftersom man nu kunde vaccinera riskgrupper och nyckelpersoner i samhället, även om tillgången på vaccin var knapp. Dessutom, och kanske viktigast, kunde man behandla de svårast sjuka med antibiotika och därmed rädda det stora flertalet av dem som drabbades av sekundära pneumonier. (10) Trots att Asiaten alltså inte medförde på långa vägar lika många dödsfall som Spanska sjukan innebar den ändå en stor belastning för samhället. Man beräknar att letaliteten var ca 0,25%, men med tanke på det stora antalet sjuka blir detta ändå en relativt hög siffra. (12)

3.3 Sekundära bakteriella pneumonier och virulensfaktorn PVL

På senare år har mycket forskning lagts på att identifiera orsaken till de svåra lunginflammationer som utbrott av nya influensavirus ställer till med, och man har funnit att mycket förklaras av att sekundära nekrotiserande bakterieinfektioner kommer i viruspneumonitens spår. Under Spanska sjukan orsakades de flesta sekundära pneumonierna av streptokocker, och endast en liten andel av stafylokocker, men under alla de senare pandemierna har stafylokocker stått för den övervägande delen av antalet svåra sekundära pneumonier (4).

Det är intressant att fundera över vad det är som gör att relativt beskedliga stammar av vår normalflora plötsligt får fäste och orsakar så våldsamma dödliga infektioner, just i kombination med nya influensavirus. Teorin är att ett aggressivt influensavirus skadar epitelet längs med hela bronkträdet och skapar därför goda förutsättningar i de annars sterila luftvägarna för bakterierna att få fäste.

En av de virulensfaktorer som kan vara viktig i sammanhanget är cytotoxinet Panton Valentine Leukocidin (PVL) som i dag är vanlig hos vissa stammar av *Staphylococcus aureus*. PVL är associerat med nekrotiserande infektioner i hud och mjukdelar, men även typisk vid nekrotiserande pneumoni, en åkomma som i mycket liknar bilden som beskrivits i journaler från Spanska sjukan och pandemierna 1957 och 1968. (6,13–16) Man har på senare år noterat en tydlig ökning av antalet svåra infektioner kopplade till PVL-bärande stafylokocker, framför allt i stammar av både samhällsförvärd och sjukhusburen Meticillinresistent *Staphylococcus aureus* (MRSA). Den snabbt ökande resistensen mot betalaktamantibiotika världen över gör problemen med dessa aggressiva stammar ännu större. (15–19)

PVL är ett exotoxin som överförs horisontellt mellan bakterier via bakteriofager, men även via klonal expansion. Det kodar för två gener; lukF-PV och lukS-PV. Dessa bärs av många MRSA-stammar i dag, och finns även hos en del stammar av MSSA (Meticillin sensitive *Staphylococcus aureus*).

PVL verkar genom att skapa porer i cellmembranet hos leukocyter med följden att dessa lyserar. Det massiva sönderfallet av immunceller med cytotoxiskt innehåll skapar inflammation och nekros i omkringliggande vävnad. Den här effekten skulle kunna bli extra dramatisk i kombination med ett aggressivt influensavirus som ger en kraftig inflammation i luftvägsepitelet och därmed drar till sig stora mängder leukocyter vilka kan bli attackerade av PVL. Vävnaden blir därmed ännu mer utsatt för okontrollerat läckage av cytotoxiska proteaser. Det är visat att det finns effektiva antikroppar mot PVL i humant serum, vilket kan förklara varför dessa superinfektioner så gott som alltid uppträder på serumfria platser som i lungavleoler och, vid mjukdelsinfektioner, i t.ex. talgkörtlar. (13) Inom forskarvärlden har det funnits delade meningar om hur mycket PVL egentligen bidrar till

stafylokockernas virulens, då vissa djurstudier pekat på att det istället är andra faktorer som är betydelsefulla. Senare forskning styrker dock PVLs roll som viktig för virulensen då man visat att denna gen slår mycket specifikt mot mänskliga leukocyter och att studier på möss därför är intetsägande. (13, 17, 18)

En jämförande studie mellan två grupper av patienter med pneumoni där en grupp var positiv för PVL, visade att i de fall PVL förekom var patienterna oftast barn eller unga vuxna, medan äldre och immunsupprimerade oftare fick en vanlig PVL-negativ pneumoni. Vidare hade de PVL-positiva oftare en episod av influensa före insjuknandet i lunginflammation. De hade högre feber och ett mer dramatiskt sjukdomsförlopp, med hemoptys, pleuravätska och leukopeni. Överlevnaden var, trots optimal antibiotikabehandling dramatiskt lägre i den PVL-positiva gruppen. Histologiskt kunde man iaktta extensiv nekros och massiva blödningar i lungvävnaden hos denna grupp, till skillnad från den mer beskedliga bilden hos de PVL-negativa. (17)

Det forskas alltså mycket på PVL roll i aggressiva nekrotiserande pneumonier i dag, och på en annan front forskas det på vad som orsakade de svåra pneumonierna under tidigare influensapandemier, men ingen har hittills tagit reda på om PVL faktiskt förekom hos stammarna av stafylokokker som var inblandade då. (17)

3.4 DNA extraktion från paraffinbäddad vävnad

Paraffinbäddning av formalinfixerad vävnad har länge varit en vanlig metod för att kunna bevara provmaterial i rumstemperatur under lång tid. (20, 21) På senare år har det med hjälp av DNA-extraktion och känslig PCR-metodik öppnats många intressanta möjligheter att göra retrospektiva studier på det stora material av sparad vävnad som finns bevarad i biobanker runt om i världen.

Dock har det i många fall visat sig vara svårt att extrahera DNA av hög kvalitet, då detta lätt skadas i fixeringsprocessen. (22) Det finns risk att DNAs nukleinsyror korsbinds till andra vävnadsproteiner, och då fragmenteras till kortare sekvenser som kan vara svåra att detektera med PCR. I sämsta fall degraderas DNA helt, och kan då inte påvisas alls. (23) Det finns även en risk att formalinrester stör den känsliga PCR-reaktionen. (22) Dessutom finns en korrelation mellan hur länge proverna varit fixerade och hur stor inverkan formalinet har på resultatet. (21)

Dock finns flera studier som beskriver metoder att optimera extraktionsprocessen, och trots problemen få ut så mycket DNA som möjligt. Avparafinering där provet t.ex. tvättas i flera koncentrationer av etanol är en metod som verkar ha viss effekt. (20)

Värmebehandling för att bryta korsbindningar, lysering med proteinkinasa K under längre tid, samt inkubering med Taq-polymeras efter extraktion är andra åtgärder som möjligen kan förbättra resultatet. (24) Behandling med phenol-chloroform efter lyseringen kan också fungera. (22)

3.5 Studiens syfte

Samhället står inför ett ständigt hot att nya allvarliga influensapandemier ska uppstå. För att skaffa en bra beredskap att hantera dessa eventuella situationer kan det vara relevant att fundera över hur tidigare pandemier har hanterats av samhället och sjukvården. En del denna examensuppsats syftar till att sammanställa epidemiologiska data från de patientjournaler som fördes under influensapandemin 1957-58 på Centralepidemisjukhuset i Uppsala, för att få en bild av hur pandemin drabbade befolkningen i regionen samt hur sjukvården hanterade situationen.

Den andra delen av studien syftar till att ta reda på om PVL fanns hos de stammar av stafylokokker som orsakade de svåra sekundära pneumonierna under influensapandemin 1957-58.

Att kunna förstå de svåra pneumonierna bättre, och att kunna sätta in en tidigare och mer riktad behandling mot de faktorer som bidrar till att göra individen så sjuk skulle förstås kunna vara mycket viktigt. Fynd av cytotoxinet PVL i lungvävnadsprover från tidigare influensapandemier skulle kunna hjälpa till att förklara bilden av de svåra nekrotiserande pneumonier vi ser vid utbrott av nya influensor idag.

4. Metod

4.1 Journalstudie

Den första delen av projektet var att sammanställa epidemiologiska data ur journaler från samtliga av de patienter som var inlagda för influensa vid Centralepidemisjukhuset under tiden för influensapandemin 1957-58. Centralepidemisjukhuset använde vi den här tiden en liggare där diagnoserna framgick. Via denna kunde de journaler där diagnosen var influensa, luftvägsviros, pneumoni eller andra relaterade åkommor väljas ut för granskning, varefter de som hade en tydlig anamnes på influensa togs med i sammanställningen. Totalt granskades 124 journaler, med fokus på anamnes, sjukdomsförlopp, vårdtid, utredningar, behandling, komplikationer och utfall. Under arbetet med att identifiera lämpliga patientfall för studiens andra del gällande analys av PVL granskades remisser till patologiska kliniken angående personer som avlidit i influensapneumoni. Även dessa, mer knapphändiga dokument togs med i journalstudiens sammanställningen av patientdata.

4.2 Insamling av representativa influensafall från remissarkivet för analys av PVL

Projektets andra del lades upp som en retrospektiv tvärsnittsstudie där ett antal representativa fall valdes ut bland de patienter som avlidit under influensapandemin 1957-58. Patologens remissarkiv från tiden för "Asiaten" har nyligen flyttats till Landstingsarkivets lokaler, där katalogisering nu pågår. Fram till oktober 1957 finns ett system med liggare där diagnos framgår. Från oktober 1957 fram till årsskiftet 1957-58 finns inget sorteringsystem bevarat, utan remisserna ligger ordnade i lådor efter löpnummer, s.k. FG-nummer för vävnadsprover, alternativt obduktionsjournalnummer. Från 1958 och framåt används ett system med diagnoskoder, där koden 24.10 står för pneumoni. Den Asiatiska influensan nådde de skandinaviska länderna i början på oktober 1957, kulminerade i november och klingade av under januari 1958.

Således letades samtliga remisser som kommit till patologiska institutionen i Uppsala från september 1957 fram till årsskiftet igenom för hand efter representativa fall. Från januari till april 1958 hittades remisser via diagnoskod. Remisserna var skickade både från Akademiska sjukhuset, Ulleråker samt sjukhus ute i regionen. Fall valdes ut efter följande inklusionskriterier:

Insjuknande i övre luftvägssymptom, följt av dramatiskt sjukdomsförlopp med bronkopneumoni, hög feber och dödlig utgång. Histologin skulle så mycket som möjligt likna den typiska bilden vid stafylokockpneumoni, med kraftigt variga, hårdformiga bronkopneumonier, blödningar och deskvamemat epitel. Allra helst skulle positiv odling för staphylococcus aureus föreligga. I en första sällning valdes fall ut där patienterna var unga och tidigare friska, för att så säkert som möjligt utesluta pneumonier av annan genes än sekundärt till influensa. Då dessa fall var relativt få togs i en andra sällning även med barn, äldre och personer med komplicerande sjukdomar, vilket visade sig vara många fler, och också stämmer bra överens med rapporteringen av vilka som insjuknade under Asiaten.

Exkluderades gjordes fall som innefattade långdraget sjukdomsförlopp och som inte föregåtts av typiska influensasymptom, samt fall som hade en mildare histologisk bild vilken inte påminde om stafylokockinfektion, d.v.s. avsaknad av pus och blödningar.

Totalt samlades 61 remisser in, och därefter valdes de tio mest typiska fallen ut. Av dessa tio hade fyra fall odlingsverifierad växt av staphylococcus aureus enligt följande:

Obduktionsnummer 38, 81 samt 612- riklig växt, samt nr 577- växt. I de sex övriga fallen som valdes hade ingen odling gjorts, men de var mycket typiska i anamnes och obduktionsfynd:

FG-nr:

15067- Våldigt mycket pus, dramatiskt förlopp

15010- Varig bronchit med utbredda blödningar

1403- Hårdformiga, smältande bronkopneumonier

13671-Spridda härdar. Bronkgrenar utfyllda med pus

OBD. Nr:

621- Deskvamerat epitel.

59- Bronchopneumoniska härdar. Mucopurulent slem.

Det visade sig att FG-nr 1403 inte fanns kvar i patologens klossarkiv, varför slutligen nio fall togs med i studien.

4.3 Snittning och DNA-extraktion

Arbetet med snittning och DNA-extraktion utfördes under handledning av biomedicinsk analytiker på HPA-gruppens (Human Protein Atlas) laboratorium, patologiska institutionen i Uppsala.

Den paraffiniserade lungvävnaden, som förvarats i papperspåsar i patologens arkiv sedan 50- talet letades fram och snittades, varefter en HE-infärgad TMA (Tissue Micro Array) tillverkades, så att proverna kunde inspekteras och den histologiska bilden bedömas i mikroskop.

Stansar med 1mm i dm togs från lungvävnadsproverna, under så rena former som möjligt, och förvarades i väntan på DNA-extraktion i sterila eppendorfrör.

DNA extraherades sedan med hjälp av QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50), ett speciellt extraktionskit för paraffininbäddad vävnad, framtaget av företaget QIAGEN i Düsseldorf, Tyskland. Då det finns kända problem med att utvinna DNA av god kvalitet ur paraffininbäddad vävnad p.g.a. degradering, korsbindning etc., och dessa problem blir större ju längre tid provet lagrats gjordes ett antal försök att förfina extraktionsprotokollet för att få ut större mängd DNA innan de riktiga lungvävnadsproverna behandlades. Till modifieringsförsöken användes paraffininbäddad lymfkörtelvävnad av yngre datum. Lymfkörtel valdes då denna vävnad är mycket cellrik.

4.3.1 Modifieringar av extraktionsprotokollet:

Tiden för provets exponering för Xylen ökades från 10 sekunder till 5 minuter samt 15 minuter, för att bättre lösa upp paraffinet. Proverna inkuberades lösta i ATE-buffer samt proteinas K i 56 grader en timme, men även över natt, samt i 24 timmar, då längre tid i värme enligt flera studier skulle vara en möjlig väg att frigöra mer DNA. Tillsats av mer proteinas K prövades, för att ytterligare rena provet från störande proteiner.

Tabell 1. Modifiering av DNA-extraktionsprotokoll

Prov nr	Modifiering
Lymfkörtel nr 1	Inkubering över natt
Lymfkörtel nr 1	Inkubering över natt, + 5 min. i xylen
Lymfkörtel nr 2	Enligt protokoll
Lymfkörtel nr 2	Inkubering över natt
Lymfkörtel nr 2	Inkubering över natt, + 5 min. i xylen
Lymfkörtel nr 2	Inkubering över natt, + 15 min. i xylen
Lymfkörtel nr 3	Inkubering över natt
Lymfkörtel nr 3	Inkubering 24 h + 10µl extra proteinas K

4.3.2 Extraktion av DNA från lungvävnadsprover

Efter försöken att förfina extraktionsprotokollet beslutades att samtliga lungvävnadsprover skulle exponeras för xylen i 5 minuter, och därefter inkuberas under 24 timmar i skakvärmeblock i 56 grader Celsius. Efter 20 timmar tillsattes 10µl extra proteinas K.

I övrigt följdes protokollet för QIAGENs QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50), se bilaga.

4.3.3 Kontroll av erhållen nukleinsyrekoncentration

Nukleinsyrekoncentrationen i proverna kontrollerades efter extraktionsproceduren med fotospektrometer, Thermo Scientific Nanodrop 1000 3.7.1.

4.4 PCR

En gelbaserad PCR utfördes hos Klinisk mikrobiologi i Uppsala, en metod som där används för rutinanalys av PVL i prover från kliniken. Se bilaga 2 för utförligt analysprotokoll. Vid all hantering av proverna iakttoogs här noggrann hygien i dragskåp. Då den första delen av protokollet som innefattar DNA-extraktion redan var avklarad på patologens laboratorium kom studiens prover in i protokollet vid punkt 4, d.v.s. vid tillredandet av en sk. mastermix bestående av de ingredienser som behövs för att amplifieringsprocessen ska fungera. Därefter tillsattes själva provmaterialet, och amplifieringen startades. Primers från företaget Thermo Bio Sences för genen lukS-PV-lukF-PV, (d.v.s. PVL) användes. Som positiv kontroll hade man en stam av PVL-bärande bakterier från mikrobiologens stamförråd. När amplifieringen var färdig avlästes resultatet på agarosgel, där ett band på 433 baspar motsvarar ett PVL-positivt prov.

Vidare gjordes PCR-analys för att detektera genen mecA hos MRSA, samt den stafylokockspecifika genen nuc för att avgöra om stafylokocker alls var närvarande i provet.

4.5 Etiskt tillstånd

Forskningsprojektet är godkänt av regionala etikprövningsnämnden i Uppsala enligt ett beslut taget 2012-11-21. Dnr 2012/425.

5. Resultat av journaldelen

5.1 Statistik Asiaten, Uppsala

Centralepidemisjukhuset okt. 1957-jan 1958:

Antal inlagda totalt	334
Antal av dessa inlagda för influensa:	134
Varav granskade journaler:	124
Saknade journaler:	10

Granskade influensajournaler på Centralepidemisjukhuset okt 1957-jan 1958:

Kvinnor:	72	58%
Män:	52	42%
Barn <15 år:	48	38%
varav <5 år:	22	18%
Äldre (>60 år):	33	27%
Medelålders och unga vuxna:	44	35%
Svårt sjuka barn <5 år	3	
Svårt sjuka barn 5-15 år	9	
Svårt sjuka 15-60 år	12	
Svårt sjuka äldre >60 år	18	
Tot. ”svårt sjuka”	42	34%
Influensautlöst bronchopneumoni (rtg-verifierad):	28	22,5%
Övriga svåra komplikationer:		
- Purulent/ serös meningit	5	
- Långdraget förlopp med hög feber	3	
- Svår obstruktivitet/ bronchit (barn)	1	
- Livshotande andningsbesvär (tid. Poliomyelit)	1	
- Svår hjärtsvikt	3	
Övriga behandlings/ utredningskrävande komplikationer:		
- Meningism	10	
- Vestibulär lesion/ inneröreskada	2	
- Otit	6	
- Sinuit	2	
- Cystit/ pyelit	2	
Antal antibiotikabehandlade:	80	64,5%
Antal fall med terapivikt- byte av antibiotika:	12	15%

Antal fall där man odlat:	23
Blod	1
Svalg	6
NPH	1
Liquor	7
Sputum	1
Öron	2
Urin	3
TBC, Löwensteiner	2
Antistreptolysintiter	2
Influensakomplementbindning	1
Viruisolering (liquor)	1
Antal vårddygn	1366
Genomsnitt antal vårddygn per pat.	11
Vaccinerade mot influensa	1 (1:a sprutan av tre)
Antal avlidna	7
Varav:	
Dramatiskt förlopp 1-3 dygn	3
< 60 år, tid. frisk	1
>60 år	6
Komplicerande sjukdomar:	
Hjärtsvikt	4
TBC	1
Grav demens	1

Medicinkliniken UAS

Antal inlagda med influensaanamnes 17

Patologiremisser med influensaanamnes från regionen till UAS

Totalt med influensaanamnes	24
varav:	
Barn	8
varav <5	6
Äldre, >60 år	10
Medelålders/unga vuxna, tidigare friska	3
Medelålders/ unga vuxna, kroniskt sjuka	3
Barn tidigare friska	6
Barn med kronisk sjd:	
Muskelsjukdom	1
Hjärtfel, VOC	1

Obduktionsremisser med influensaanamnes från UAS samt Ulleråker

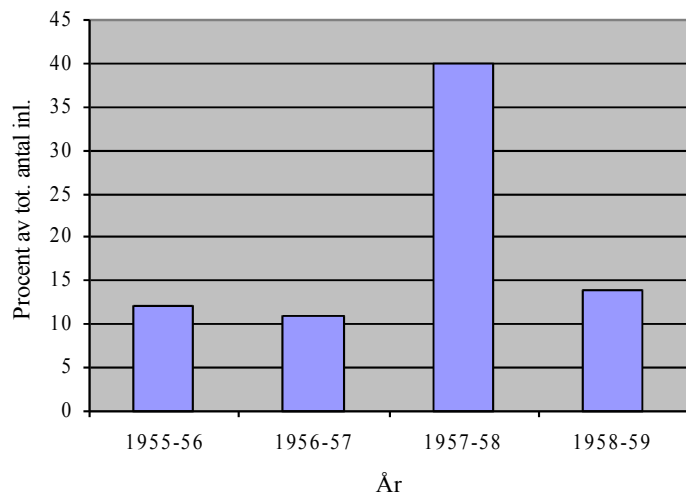
Totalt med influensaanamnes	37
varav:	
> 60 år	22
Barn	3
varav <5 år	2
Samtliga tre barn med tid. sjd:	
Hjärtsvikt, aortastenosis	1
VOC	1
Pseudokrupp- sek. anoxisk hjärnskada	1
Medelålders/unga vuxna, tid. friska	7
Medelålders/unga vuxna tid.sjd:	5
Hjärtsvikt	2
Astma	1
Prostatacancer	1
Hemiplegi	1

Antal avlidna i influensa enligt dödsorsaksregistret, okt. 1957-jan. 1958:

Uppsala	9
Sverige	567

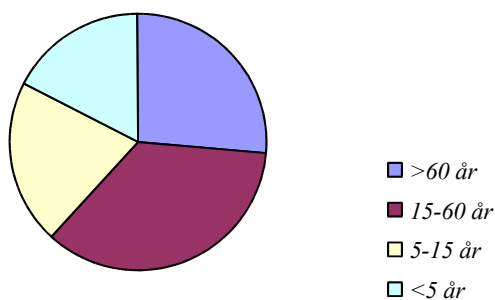
Uppskattat antal avlidna i influensa i världen 1957-58 4 miljoner

Man kan konstatera att under tiden för influensapandemin 1957-58 var sjukvården hårt belastad. Perioden mellan oktober -57 och januari -58 var ca 40 procent av Centralepidemisjukhusets patienter inlagda för influensa samt influensarelaterad bronchopneumoni. Detta kan jämföras med året innan pandemin, när elva procent låg inne för symptom från övre luftvägarna/bronchopneumoni under samma period. Ytterligare ett år tidigare var det tolv procent, och året efter Asiaten fjorton procent som var inlagda för influensa/rhinopharyngit eller bronchopneumoni.

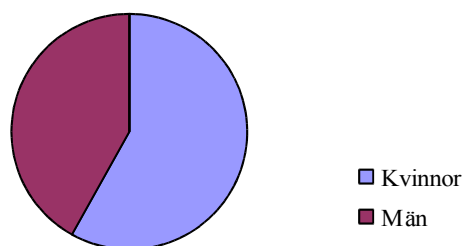


Figur 1. Inläggningar pga. influensa/ ÖLI/ pneumoni på Centralepidemisjukhuset i Uppsala

Det har visat sig svårt att hitta några exakta siffror på det totala antalet influensasjuka i Uppsala under perioden för Asiaten. I Sverige registrerades 276 000 fall, vilket mycket väl i verkligheten kan ha varit närmare en miljon. Med tanke på pandemins relativt milda karaktär får man anta att det bara var en bråkdel av det stora antalet insjuknade som blev så dåliga att de måste läggas in på sjukhus. Bland de 124 patienter vars journaler från epidemisjukhuset granskats var det något fler kvinnor, och åldersfördelningen var relativt jämn.



Figur 2. Åldersfördelning bland influensapatienterna på Centralepidemisjukhuset i Uppsala under Asiaten



Figur 3. Könsfördelning bland influensapatienterna på Centralepidemisjukhuset i Uppsala under Asiaten

Av det stora flertalet inlagda var de flesta relativt lindrigt sjuka. I det typiska fallet hade man varit hängig, snuvig och haft ont i halsen något dygn, varefter en besvärande rethosta startade. Man

drabbades efter ytterligare något dygn av hög feber och huvudvärk. Flertalet hade haft besök av läkare i hemmet och kom på remiss till centralepidemisjukhuset, men många sökte även på eget bevåg. I genomsnitt var vårdtiden elva dygn. De flesta låg kvar för observation flera dagar efter feberfrihet. Märkbart många patienter lades in med motiveringen *causa socialis*, då man t.ex. bodde omodernt under dåliga sanitära förhållanden och inte kunde klara sig själv hemma under sjukdomsperioden. En relativt vanlig anledning att lägga in barn var att modern var ensamstående och förvärvsarbetande, varför hon inte kunde vara hemma och vårda barnet. Ibland låg hela familjer inne, då modern var för sjuk för att sköta barnen, och fadern av en eller annan orsak var frånvarande. Flera inläggningar gjordes av oro för smittspridning, t.ex. det stora antal sjuksköterskeelever som insjuknade då de gjorde sin praktik på epidemisjukhuset och spred smittan mellan sig på elevhemmet, eller de barn som överfördes från ortopediska kliniken där de vårdats när de insjuknade. Man kan notera flera instanser som drabbades hårt av influensan. Journalerna vittnar om kontor, restaurangkök och andra arbetsplatser som stod näst intill tomma. Många skolbarn berättade när de lades in att endast några få klasskamrater var friska. Av en remiss från läkaren på ungdomsfängelset förstod man att ett stort antal interner och vakter var sjuka och att situationen var besvärlig. Ulleråkers mentalsjukhus drabbades mycket hårt av pandemin, och där inträffade ett stort antal av de dödsfall som influensan medförde i Uppsala.



Bild 1: Lärarinnan och den enda friska eleven i en skola i Örebro, 1957 (Wikimedia commons)

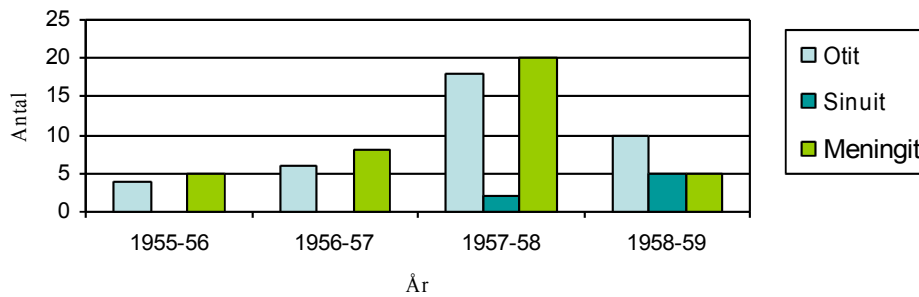


Bild 2. Värnpliktiga vårdas i en gymnastiksal i Luleå, 1957. (Wikimedia commons)

Av det stora antalet inlagda blev alltså en relativt begränsad andel allvarligt sjuka. Fyrtiotvå av de patienter som var inlagda för influensa på epidemisjukhuset drabbades av ett svårare sjukdomsförlopp, och av dessa avled sju personer. Tjugoåtta av de svårast sjuka hade röntgenverifierad pneumoni, och många drabbades av andra komplikationer till influensan, framför allt i form av förvärrad grundsjukdom, t.ex. svår hjärtsvikt. Flera hade ett komplicerat och långdraget sjukdomsförlopp där den höga febern inte ville ge med sig, en del barn drabbades av kraftig obstruktivitet, och några patienter fick livshotande andningsbesvär på grund av en svår grundsjukdom, t.ex. sequele efter poliomyelit.

En allvarlig, relativt vanlig komplikation till influensan var meningit. En jämförelse av incidensen för året innan och året efter Asiaten visade att förekomsten ökade från åtta respektive fem svåra fall till tjugo under den aktuella perioden och sedan åter fem fall året efter. Om man jämför med det totala antalet inlagda som inte hade meningit under de aktuella åren, nämligen 314 personer under Asiaten och totalt 934 under de andra tre åren, får man ett P-värde på 0.0005 enligt Fishers exact test, vilket i så fall skulle vara signifikant. Dessutom var ytterligare många patienter inremitterade med frågeställningen meningit på grund av svår huvudvärk, ljuskänslighet och positiv Lasegue, något som senare avskrevs vid inläggning efter negativt liquorprov, men i journalerna förklarades med att influensa ofta ger meningism. Ett ökat antal utredningar på meningitmisstanke måste således ha belastat sjukvården, även om patientens influensa i sig inte var inläggningskrävande. Hypotesen att även andra åkommor såsom otit och sinuit skulle öka i spåren av influensan prövades genom att jämföra incidensen åren före och efter influensapandemin. För otiter hittades en signifikant ökning med ett P-värde på 0.003 enligt Fishers exact test, då antalet patienter utan otit

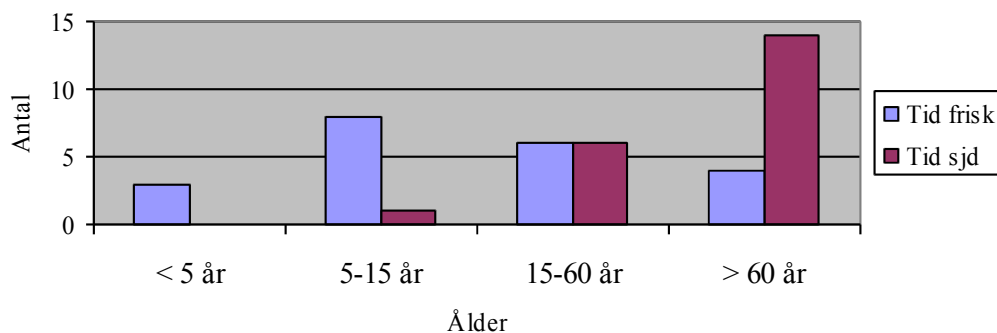
under året för Asiaten var 316 och de andra åren sammanlagt 933. För sinuiter kunde ingen tydlig ökning iakttagas.



Figur 4. Antal inläggningar pga otit, sinuit och meningit under perioden okt-jan på Centralepidemisjukhuset i Uppsala

Vad gäller åldersfördelningen bland dem som blev svårt sjuka var det, som väntat, gruppen över sextio år som drabbades hårdast. Här var det många som hade tidigare sjukdomar och mindre marginaler, även om många upplevt sig fullt friska fram till insjuknandet i influensa. Andelen med tidigare sjukdomar minskade ju lägre ned i åldrarna man kom.

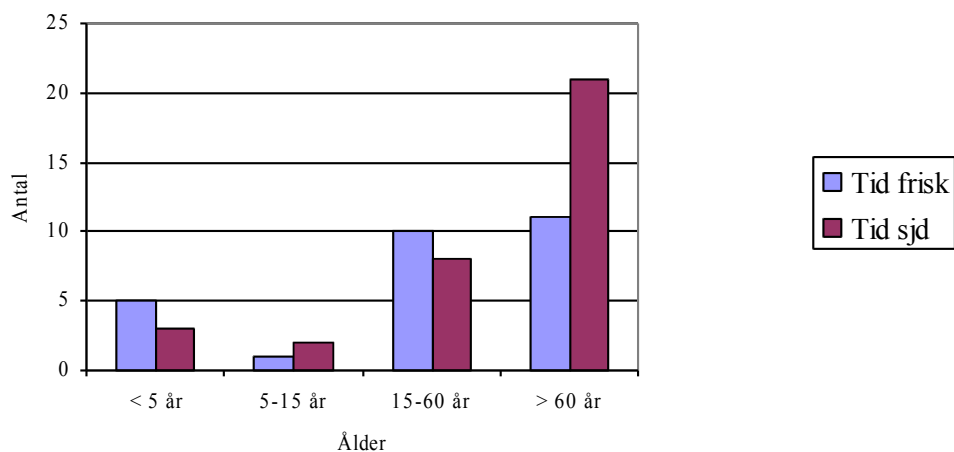
Bland de yngre patienterna var sjukdomsförloppet oftast dramatiskt med snabbt insjuknande och hög feber, men i de allra flesta fall även snabbt tillfrisknande. Hos de äldre såg man oftare ett långdraget sjukdomsförlopp, med flera dagars krasslighet innan insjuknandet i allvarlig pneumoni, samt även ett mer långsamt tillfrisknande.



Figur 5. Andel med tidigare sjukdom bland de svårt influensasjuka på Centralepidemisjukhuset 1957-58

Av de sju patienter som avled på epidemisjukhuset till följd av influensan var det endast tre som hade det typiskt dramatiska sjukdomsförlopp som är fruktat i samband med nya influensavirus. De övriga hade en mer långdragen sjukhistoria där hjärtsvikt och andra komplicerande sjukdomar spelade in. Om man däremot även studerar de obduktions- och patologiremisser som skickats till patologiska kliniken i Uppsala från sjukhus ute i regionen blir det många fler typiska fall.

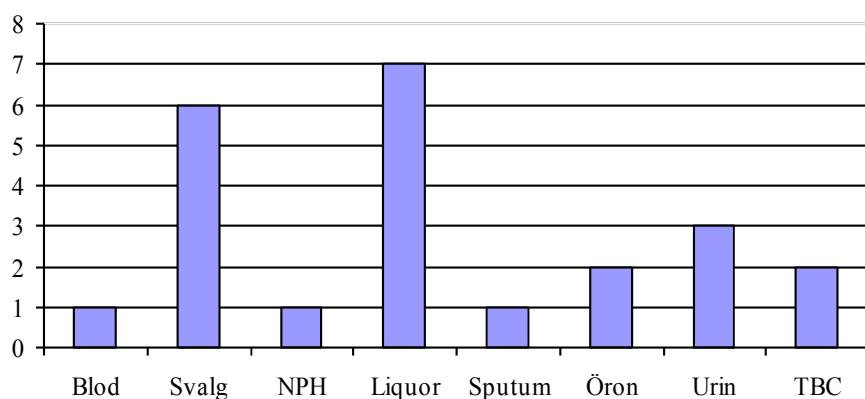
Sammanlagt kom sextiofem remisser in gällande dödsfall hos patienter med anamnes på asiatisk influensa i regionen samt på Ulleråkers mentalsjukhus.



Figur 6. Avlidna till följd av influensapandemin 1957-58 i Uppsalaregionen

Då endast en kortfattad remiss kunnat granskas i dessa fall är informationen mycket mer knapphändig än i fallen från epidemisjukhuset där hela journalen kunde läsas. Dock kan man av remisserna utläsa att sexton personer under 60 år var tidigare helt friska när de plötsligt insjuknade i influensa och efter något till några dygn avled i svår bronchopneumoni. Av dessa sexton var sex barn. Trettiotvå personer av dem som avled var över 60 år och ibland dessa hade många någon komplicerande sjukdom såsom t.ex. hjärtbesvär, tuberkulos, astma, cancer eller tidigare stroke. Hjärtsvikt och cardioscleros var överlägset vanligast bland de komplicerande sjukdomarna. Fem av de elva barn som avled hade tidigare sjukdomar, där tre hade medfödda hjärtfel, en led av en muskelsjukdom och en hade anoxiska hjärnskador sedan födseln. Åtta av de elva barnen var under fem år.

Hur handlades då de influensasjuka patienterna på Centralepidemisjukhuset? Man hade en del diagnostiska metoder att luta sig emot, men de allra flesta beslut fattades ändå på klinisk basis. I de 124 granskade patientjournalerna återfinns endast 23 odlingar, vilka fördelade sig enligt figur 7.



Figur 7. Antal odlingar i på patienter med influensa vid Centralepidemisjukhuset under perioden för Asiaten

Utöver bakteriella odlingar kunde man även mäta influensakomplementbindning. Detta gjordes endast i ett av fallen, och då med negativt resultat, varvid man ändå bestämde sig för att det rörde sig om influensa eftersom kliniken var så typisk. Vidare gjordes virusisolering i liquor i ett av fallen. I två fall mättes antistreptolysintiter för att hitta streptokocker.

Lungröntgen var det diagnostiska hjälpmedel som användes mest. Man röntgade 46 av de 124 patienterna, och hos 28 av dessa kunde man konstatera pneumoni. Många av de svårast sjuka röntgades aldrig, kanske för att deras tillstånd inte medgav transport, eller för att man kliniskt kände sig säker på att det rörde sig om en pneumoni.

Sextiofem procent av influensapatienterna antibiotikabehandlades. Som standardbehandling började man med Seclomycin; en kombination av bencylpenicillin och streptomycin, den första generationens aminoglykosid. Detta fick i stort sett alla som antibiotikabehandlades. Blev patienten trots detta inte bättre bytte man preparat, oftast till kloramfenikol, Chloromycetin. Vid meningitmisstanke gavs ett annat penicillin, Leo-penicillin.

Den vanligaste orsaken till terapibyte var en ny febertopp, vilket sågs som ett allvarligt tecken. I ett fåtal fall gjordes resistensbestämning efter positiv odling, och endast i ett fall hittades en stam av pneumokocker som krävde dosjustering. Man var alltså frikostig med antibiotika, och intrycket är att många av dem som behandlades antagligen bara hade en virusinfektion.

Utöver antibiotikabehandling gavs mycket Magnecyl och Sedisonal, det senare ett paracetamolpreparat. Dessutom var man frikostig med slemlösande och hostmedicin i form av Coccilana etylmorfin och Expigen. Man ordinerade även stora mängder av något som i journalerna rätt och slätt kallades för ”hallonsaft” i doseringen 1 msk tre gånger dagligen. Denna ”hallonsaft” innehöll även efedrin samt jod, och torde ha varit någon typ av luftrörsvidgande, eftersom man före inhalationernas tid ofta använde efedrin till detta.

6. Resultat av PVLdelen

6.1 Modifiering av DNA-extraktionsprotokoll

6.1.1 Tiden i xylene

Lymfkörtelprov 1 ökade sin nukleinsyrekoncentrationen med ca 24 % när tiden i xylene förlängdes med 5 minuter jämfört med tiden i originalprotokollet.

I lymfkörtelprov 2 ökade koncentrationen med 12% när provet exponerades för xylene i 5 minuter, och ca 50% när tiden förlängdes med 15 minuter jämfört med protokollet.

6.1.2 Inkubationstiden i 56 grader samt mängden tillsatt proteinas K

Extraktionsprotokollet anger en inkubationstid på en timme eller tills provet är fullständigt upplöst. Lymfkörtel nr 2 inkuberades först enligt protokollet i en timme, och sedan över natt. Den erhållna nukleinsyrekoncentrationen blev vid inkubering över natt 63 % högre än då provet inkuberades enligt protokollet.

Lymfkörtelprov nr 3 inkuberades först över natt, och därefter i 24 timmar, varvid koncentrationen ökade med 53 %. Under inkubationen i 24 timmar tillsattes dessutom 10 µl extra proteinas K efter 20 timmar.

Tabell 2. Resultat av modifierat extraktionsprotokoll

<i>Prov nr</i>	<i>Modifiering</i>	<i>Nukleinsyrekonc ng/µl</i>
Lymfkörtel nr 1	Inkubering över natt	46.8
Lymfkörtel nr 1	Inkubering över natt, + 5 min. i xylene	57.9
Lymfkörtel nr 2	Enligt protokoll	11,2
Lymfkörtel nr 2	Inkubering över natt	29.9
Lymfkörtel nr 2	Inkubering över natt, + 5 min. i xylene	33.5
Lymfkörtel nr 2	Inkubering över natt, + 15 min. i xylene	44.9
Lymfkörtel nr 3 ,	Inkubering över natt	207.8
Lymfkörtel nr 3	24 h inkubation + 10µl extra proteinas K	444.6

6.2 DNA extraktion från lungvävnadsprover

Då det efter de små försöken med modifiering av protokollet föreföll rimligt att en förlängd exponering för xylene, samt framför allt en längre inkubering i värme och tillsats av extra proteinas K kunde gynna extraktionsprocessen valdes att behandla proverna med xylene i 5 minuter, och därefter inkubera dem under 24 timmar i skakvärmeblock i 56 grader Celsius. Efter 20 timmar tillsattes dessutom 10µl extra proteinas K. Resultatet blev enligt tabell 3.

Tabell 3. Nukleinsyrekoncentration från lungvävnadsprover

<i>Nr</i>	<i>ng/μl</i>
38 (-58)	45.5
59 (1)	87.3
59(2)	112.3
81	75.4
577	56.3
612	21.3
621	14.1
13671	96.4
15010	15.1
15067	56.5

6.3 PCR

I de nio proverna återfanns varken PVL, eller generna för nuc eller mecA.

7. Diskussion

7.1 Journaldelen

Man konstatera att väldigt många i befolkningen insjuknade under influensapandemin 1957-58, även om långt ifrån alla lades in på sjukhus. Via journalerna förstår man indirekt att skolor, arbetsplatser och myndigheter stod tomma eftersom en stor del av befolkningen låg hemma med feber och hosta. På epidemisjukhuset tredubblades antalet inläggningar på grund av luftvägssymptom jämfört med samma period åren före och efter. De som blev svårast sjuka återfanns i alla åldersgrupper, med en viss övervikt mot äldre och små barn. De som hade kroniska sjukdomar, i synnerhet hjärtbesvär, blev i allra störst utsträckning allvarligt sjuka och avled, men bland de avlidna återfanns också ett antal tidigare friska yngre individer.

I spåren av influensan sågs även en viss ökning av antalet meningiter, och framför allt belastades vården av ett ökat antal utredningar av misstänkt sådan.

Sjukvården hade en del diagnostiska hjälpmedel att tillgå, men i de allra flesta fall var diagnosen endast grundad på klinik. Lungröntgen var annars den metod som användes mest. Över hälften av patienterna antibiotikabehandlades, de allra flesta utan föregående odling. De preparat som användes hade brett spektrum och många biverkningar. Seclomycin, som var det mest använda, kunde bl.a. ge hörselskador då preparatet var ototoxiskt. Chloromycetin medför risk för apalstisk anemi. Dessa antibiotika är idag avregistrerade (25).

Vårdtiderna var med dagens mått mätt långa, och patienterna låg i allmänhet kvar flera dagar för observation efter att de tillfrisknat. Man lade in patienter på vida indikationer, även de som inte var i speciellt dåligt skick. Möjligen hade man Spanska sjukan i färskt minne och ville vara på den säkra sidan, varför man generöst lade in patienter för observation. Resurser och platsläget torde även ha varit bättre på femtiotalet. Anmärkningsvärt många inläggningar gjordes av sociala skäl, då många levde under dåliga sanitära förhållanden och därför inte orkade sköta sig själva när de blev sjuka. Äldre- och barnomsorgen verkade i många fall ha varit beroende av friska vårdande anhöriga.

Dödsorsaksregistret har mycket lägre siffror på antal avlidna i influensa än de fall som diskuterats i journalstudien. Detta kan motiveras med att många patienter som var inlagda under diagnosen influensa även hade andra svåra åkommor, och den slutliga dödsorsaken kan ha registrerats som t.ex. hjärtinfarkt eller pneumoni. Då man ändå kan argumentera för att influensan var det som utlöste problemen som ledde till döden ansågs det intressant att även räkna med dessa fall i statistiken. Detta eftersom ett av journalstudiens syften var att kartlägga situationen som uppstår kring en influensapandemi, t.ex. i form av sekundära infektioner, svåra komplikationer och förvärrade kroniska tillstånd, vilka alla innebär risker för patienterna och stor belastning för sjukvården.

Sammanfattningsvis kan man konstatera att sjukvården belastades hårt även av en i sammanhanget så lindrig pandemi som Asiaten. Vid den här tiden var platsläget generellt bättre än vad det är idag, och vårdtiderna var ofta mycket längre än i dagens sjukvård. Trots det upplevdes pandemin som mycket besvärlig, och infektionsavdelningarna var överbelagda. Om man har detta i åtanke blir bilden av hur en ny stor influensapandemi skulle slå mot dagens redan hårt pressade sjukvård oroande. Under 1950-talet hade man större möjligheter än under Spanska sjukan att behandla de svårast sjuka och förebygga smittspridning genom vaccinationer, även om man inte kunde erbjuda den intensivvård som tillämpas idag. Man kan spekulera i om detta möjligen kan ha varit en av anledningarna till att pandemin aldrig fick så stora konsekvenser som den fyrtio år tidigare.

Tillgången på vaccin för riskgrupper och nyckelpersoner, samt antibiotikabehandling av dem som insjuknade i svåra sekundära pneumonier kan ha varit en viktig faktor för att begränsa dödligheten. Sett i det perspektivet, och med insikten om att nya pandemier kan förväntas uppkomma i vår närtid där vi även brottas med en lavinartat ökande antibiotikaresistens blir frågan om att snabbt kunna administrera vaccin till stora delar av befolkningen, samt att ha tillgång till fungerande antivirala läkemedel åter mycket viktig.

7.2 PVLdelen

I den andra delen av studien fann man varken PVL, mecA eller nuc i något av proverna. Att inte något band bildades när PCR gjordes för den stafylokockspecifika nuc-genen ens i de prover som hade kraftig odlingsverifierad växt av stafylokocker talar starkt för att DNA i provet var alltför fragmenterat av formalin, paraffin och tidens tand för att kunna analyseras. Slutsatsen av denna del av studien måste därför bli att metoden inte fungerade, och att man utifrån denna studie inte kan dra några slutsatser alls vad beträffar PVLs närvaro i proverna.

Andra felkällor, utöver dålig DNA-kvalitet, kan t.ex. vara risken att stansarna med provmaterial tagits från ett område med liten eller ingen växt av bakterier, ett känt problem i cellfattig lungvävnad där det mesta av materialet består av luft. Bakterier är dessutom väldigt små jämfört med den stora massa av övriga celler i provet, att det ofta är ett problem att identifiera de mycket minimala mängder bakteriellt DNA som eventuellt finns närvarande. Att det är erkänt svårt att lysa just grampositiva bakteriers cellvägg ansågs när försöken lades upp som mindre bekymmersamt, eftersom cellväggen efter så lång tid i paraffin troligen ändå var skör, eller förstörd, och därför gjordes inga försök med extra lyseringsbuffert som annars är brukligt. Man kan dock inte utesluta att även detta var en faktor bakom det uteblivna resultatet.

Vad gäller metoden att extrahera DNA från gammal paraffininbäddad vävnad och sedan med hjälp av PCR försöka identifiera närvaron av en viss gen finns alltså mycket att säga. Det finns som tidigare nämnts i bakgrund och metod många kända problem med att extrahera bakteriellt DNA av god kvalitet då behandlingen med formalin och sedan paraffin skapar korsbindningar, och gör att DNAt fragmenteras. Dessutom kan rester av etanol, formalin och paraffin störa analysprocessen. (22, 23) Dessa problem blir värre ju längre vävnaden lagrats, och i dessa sammanhang anses tio år av patologerna som mycket gamla prover. Studiens 56-åriga vävnadsprover var därför exceptionellt gamla, och ingen erfarenhet av att använda metoden på något liknande fanns på laboratoriet. Det var även mycket svårt att hitta erfarenheter av dylika situationer i litteraturen. För att trots detta ha så goda chanser som möjligt att ändå pröva studiens frågeställning gjordes några mindre försök att förfina extraktionsprotokollet, enligt metoder som i vissa studier haft effekt (20, 24). Försöken var mycket begränsade, och om man verkligen skulle kunna säga något om hur förändringarna i protokollet påverkade resultatet skulle mer omfattande kontrollförsök behövas. Dock ansågs det som gjordes, med de resurser och den tid som var avsatt för projektet vara det bästa som kunde åstadkommas. Vad gäller resultatet av DNA-extraktionen säger nukleinsyrekoncentrationen egentligen ingenting om kvaliteten på det utvunna DNAt, endast om mängden, och mängden i relation till proteiner och annat önskat innehåll. Att inga nuc-gener återfanns i de odlingspositiva proverna talar dock som sagt starkt för att DNA-kvaliteten var för dålig.

DNA-extraktionskitet som användes var ursprungligen designat för tunna vävnadssnitt från paraffinklossar. I det aktuella fallet användes istället stansar på 1 millimeter i diameter, eftersom det skulle innebära för mycket arbete att bädda om de 56 år gamla paraffinklossarna från arkivet till modern snittningsbar form. Stansar av samma mått används rutinmässigt till det aktuella kitet av laboratoriet i Örebro med bra resultat, varför metoden ansågs tillräckligt beprövad för att användas även i denna studie.

Då stansar togs från vävnadsbitarna försökte man lokalisera de områden som för blotta ögat såg mest infekterade ut, vilket förstås var svårt på gammal intorkad vävnad. För att så ordentligt som möjligt kontrollera att provet tagits från ett område med pneumoni tillverkades en TMA och vävnaden inspekterades i mikroskop. Hos de flesta av proverna förelåg en typisk bild med igensatta alveoler, blödningar och mycket inflammatoriska celler. Risken finns dock, som tidigare nämnts, att man tagit prover från områden där inga eller ett fåtal bakterier befann sig.

Eftersom studien gick ut på att söka efter historiska stammar av stafylokocker var det förstås mycket viktigt att inte kontaminera proverna med dagens bakterier som mycket väl kan bära på PVL. Laborationerna utfördes därför i så ren miljö som möjligt, i dragskåp, med spritade ytor och sterila provrör. Dock har proverna förvarats i papperspåsar i arkivet i över femtio års tid, och vilken hantering de utsatts för där kan man förstås inte veta. Möjligheten finns att proverna kontaminerats under lagring och hantering, och därmed finns det risk att man vid ett hypotetiskt positivt resultat kunde ha hittat bakterier från någon av dagens stafylokockstammar.

Ett problem när man gör ett urval av patientfall utifrån journaltexter är att det alltid blir en tolkningsfråga huruvida en sjukhistoria passar in i inklusionskriterierna eller inte. Eftersom influensa var en klinisk diagnos kan en del av de fall som tagits med i studien i själva verket haft en pneumoni av annan genes. Detta problem försökte man komma runt genom att välja fall som var så typiska för influensa som möjligt.

Det är alltid mycket svårare att negera en hypotes, än att verifiera ett positivt resultat. Studien bygger på ett mycket litet material med endast nio patientfall. Av tids och resursskäl valdes att göra ett litet stickprov bland de mest typiska fallen. Nu visade det sig att metoden inte fungerade, eftersom inget DNA kunde identifieras i proverna, men det kan ändå vara på sin plats att diskutera hur man kunde ha resonerat om metoden fungerat. Ett negativt resultat i en så liten studie som denna kan oavsett om det är sant negativt eller ej inte utesluta att PVL förekom hos andra influensapatienter. För att mer säkert kunna uttala sig om huruvida PVL var inblandat under influensapandemin 1957-58 skulle således en betydligt större studie behövas. Man skulle vid ett positivt svar även behöva en kontrollgrupp med pneumonipatienter från ett år då inte någon influensapandemi förelåg, för att kunna avgöra om närvaron av PVL var kopplad just till influensautlösta pneumonier.

7. Referenser

1. Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe*. 25 Juni 2010;7(6):440–51.
2. Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet. Res.* April 2007;38(2):243–60.
3. Juozapaitis M, Antoniukas L. [Influenza virus]. *Medicina (Kaunas)*. 2007;43(12):919–29.
4. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* 01 Oktober 2008;198(7):962–70.
5. Morens DM, Taubenberger JK, Harvey HA, Memoli MJ. The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. *Crit. Care Med.* April 2010;38(4 Suppl):e10–20.
6. Johnson NPAS, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med.* 2002;76(1):105–15.
7. Hsieh Y-C, Wu T-Z, Liu D-P, Shao P-L, Chang L-Y, Lu C-Y, m.fl. Influenza pandemics: past, present and future. *J. Formos. Med. Assoc.* Januari 2006;105(1):1–6.
8. Olsen B. Pandemi. Myterna, fakta, hoten. Norstedts, Stockholm, 2008.
9. Olin G. Asiatiska influensan. *Nytt och Nyttigt* 1957;4:15-19
10. Elgh F. [The effect of pandemics on society. Historical experience necessary for today's preparedness]. *Lakartidningen*. 21 Februari 2007;104(8):615–9. _When? Volff J-N, redaktör. *PLoS ONE*. 20 Juni 2007;2(6):e537.
11. Medicinalstyrelsen. Allmän hälso och sjukvård. Stockholm, 1958:54
12. Ohela K, Kaipainen WJ. Influensadödligheten i Finland. *Nordisk medicin* 1958;60:1700-1701
13. Niemann S, Ehrhardt C, Medina E, Warnking K, Tuscherr L, Heitmann V, m.fl. Combined action of influenza virus and *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin provokes severe lung epithelium damage. *J. Infect. Dis.* 01 Oktober 2012;206(7):1138–48.
14. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Brück M, Holzinger D, Varga G, m.fl. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* Januari 2010;6(1):e1000715.
15. Shanks GD, Brundage JF. Pathogenic responses among young adults during the 1918 influenza pandemic. *Emerging Infect. Dis.* Februari 2012;18(2):201–7.
16. Diep BA, Chan L, Tattavin P, Kajikawa O, Martin TR, Basuino L, m.fl. Polymorphonuclear leukocytes mediate *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin-induced lung inflammation and injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 23 Mars 2010;107(12):5587–92.
17. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet J-C, Lina G, Bes M, m.fl. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal

necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 02 Mars 2002;359(9308):753–9.

18. Watkins RR, David MZ, Salata RA. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* September 2012;61(Pt 9):1179–93.
19. Obando I, Valderrabanos ES, Millan JA, Neth OW. Necrotising pneumonia due to influenza A (H1N1) and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300: successful management of the first documented paediatric case. *Arch. Dis. Child.* April 2010;95(4):305–6.
20. Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.* Augusti 2005;58(8):894–5.
21. Miething F, Hering S, Hanschke B, Dressler J. Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *J. Histochem. Cytochem.* Mars 2006;54(3):371–4.
22. Farrugia A, Keyser C, Ludes B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Sci. Int.* 30 Januari 2010;194(1-3):e25–28.
23. Dedhia P, Tarale S, Dhongde G, Khadapkar R, Das B. Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* Mars 2007;8(1):55–9.
24. Gilbert MTP, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, m.fl. The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues—Which Methods Are Useful When? Volf J-N, redaktör. *PLoS ONE*. 20 Juni 2007;2(6):e537.
25. www.FASS.se

Bilaga 1:

QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook 10/2007

Protocol: Isolation of Genomic DNA from FFPE Tissue Sections

Important point before starting

Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).

Things to do before starting

Equilibrate all buffers to room temperature.

Set a thermomixer or heated orbital incubator to 56°C for use in step 11. If a thermomixer or heated orbital incubator is not available, a heating block or water bath can be used instead.

If Buffer AL or Buffer ATL contain precipitates, dissolve by heating to 70°C with gentle agitation.

Ensure that Buffer AW1 and Buffer AW2 have been prepared according to the instructions on page 13.

Procedure

1. Using a scalpel, trim excess paraffin off the sample block.
2. Cut sections 5–10 µm thick.
If the sample surface has been exposed to air, discard the first 2–3 sections.
3. Immediately place the sections in a 1.5 or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied), and add 1 ml xylene to the sample. Close the lid and vortex vigorously for 10 s.
4. Centrifuge at full speed for 2 min at room temperature.
5. Remove the supernatant by pipetting. Do not remove any of the pellet.
6. Add 1 ml ethanol (96–100%) to the pellet, and mix by vortexing.
The ethanol extracts residual xylene from the sample.
7. Centrifuge at full speed for 2 min at room temperature.
8. Remove the supernatant by pipetting. Do not remove any of the pellet.
Carefully remove any residual ethanol using a fine pipet tip.
9. Open the tube and incubate at room temperature (15–25°C) or up to 37°C.
Incubate for 10 min or until all residual ethanol has evaporated.
10. Resuspend the pellet in 180 µl Buffer ATL. Add 20 µl proteinase K, and mix by vortexing.
11. Incubate at 56°C for 1 h (or until the sample has been completely lysed).
Protocol
12. Incubate at 90°C for 1 h.
The incubation at 90°C in Buffer ATL partially reverses formaldehyde modification of nucleic acids. Longer incubation times or higher incubation temperatures may result in more fragmented DNA.
If using only one heating block, leave the sample at room temperature after the 56°C incubation until the heating block has reached 90°C.
13. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.
If RNA-free genomic DNA is required, add 2 µl RNase A (100 mg/ml) and incubate for 2 min at room temperature before continuing with step 14. Allow the sample to cool to room temperature before adding RNase A.
14. Add 200 µl Buffer AL to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Then add 200 µl ethanol (96–100%), and mix again thoroughly by vortexing.
It is essential that the sample, Buffer AL, and ethanol are mixed immediately and thoroughly by vortexing or pipetting to yield a homogeneous solution. Buffer AL

and ethanol can be premixed and added together in one step to save time when processing multiple samples.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL and ethanol. This precipitate does not interfere with the QIAamp procedure.

15. Briefly centrifuge the 1.5 ml tube to remove drops from the inside of the lid.
16. Carefully transfer the entire lysate to the QIAamp MinElute column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim, close the lid, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.
If the lysate has not completely passed through the membrane after centrifugation, centrifuge again at a higher speed until the QIAamp MinElute column is empty.
17. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.
18. Carefully open the QIAamp MinElute column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the lid and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp MinElute column in a clean 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the flow-through.
Contact between the QIAamp MinElute column and the flow-through should be avoided. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains ethanol, coming into contact with the QIAamp MinElute column. Take care when removing the QIAamp MinElute column and collection tube from the rotor, so that flow-through does not come into contact with the QIAamp MinElute column.
19. Centrifuge at full speed (20,000 x g ; 14,000 rpm) for 3 min to dry the membrane completely.
This step is necessary, since ethanol carryover into the eluate may interfere with some downstream applications.
20. Place the QIAamp MinElute column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the flow-through. Carefully open the lid of the QIAamp MinElute column and apply 20–100 µl Buffer ATE to the center of the membrane.
Important: Ensure that Buffer ATE is equilibrated to room temperature. If using small elution volumes (<50 µl), dispense Buffer ATE onto the center of the membrane to ensure complete elution of bound DNA.
QIAamp MinElute columns provide flexibility in the choice of elution volume. Choose a volume according to the requirements of the downstream application. The volume of eluate will be up to 5 µl less than the volume of elution solution applied to the column.
21. Close the lid and incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min. Centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 1 min. Incubating the QIAamp MinElute column loaded with Buffer ATE for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield.

Bilaga 2

Kvalitetstatus: Ackrediterad

Medicinskt ansvarig: Åsa Melhus

Metodansvarig: Kristina Vincentsson

Driftansvarig: Kristina Vincentsson

Provserie

Samtliga där fynd av S.aureus kan förekomma.

Provmaterial

Typ av provmaterial

Kolonier av S.aureus med misstänkt PVL-produktion.

Typ av provrör och tillsatser

Vid transport från externt laboratorium skall transportrör för bakterier användas.

Provberedning och förvaring

Prov som skall analyseras lämnas, tillsammans med ifylld typningsremiss [AL5126](#), till processområdet bakteriell molekylärbiologi för analys. Vid längre förvaring läggs plattan i kylskåp. Provet behåller det labnr. det fått vid primärodlingen.

Säkerhetsaspekter

Arbetet utförs till stor del i särskilda rum för PCR-verksamhet. Följ noga de rutiner som gäller för denna verksamhet. Se: **Förhållningsorder vid PCR verksamhet ??**

Utförande

Förberedande åtgärder

1. Kontrollstam sprids från stamförråd.
2. Skriv protokoll "PCR analys PVL, loggboksblad" [AL7137](#) över hur prov/kontroller skall sättas.
Räkna ut mängderna till master-mixen enligt följande:

Taq polymeras kit	12,5 µL
PVL-sense primer	0,5 µL
PVL- antisens primer	0,5 µL
PCR-vatten	8,5 µL
Prov	3 µL
Slutvolym per rör :	25 µL

Analysutförande

1. Med steril ögla slammas 1-2 kolonier av prov samt kontroller från odlingsplattorna till märkta Eppendorfrör med 25 µL Lysis Reagent från Amplicor Respiratory Specimen Kit.
2. Inkubera i värmeblock 45 minuter i 60 °C ± 2 °C .
3. Tillsätt 25 µL Neutralisation Reagent, vortexa.
4. Ta fram PCR-reagens ur frysen i renrummet, låt tina och blanda sedan mastermixen enligt ovan.
5. Ställ i ordning det antal tomma rör som behövs för analys i provsättningshuven.
6. I huv i preparationsrummet pipetteras 22 µL mastermix till de PCR-rör som behövs för analystillfället, d v s ett rör per patientprov, ett för positiv kontroll och ett för negativ kontroll samt rör till blankprover. Tillsätt 3 µL av resp. prov.
7. Placera proverna i PCR-apparaten och välj följande program (tar ca 2,5 timmar) 95°C 15 min (94°C 30s / 55°C 30s / 72 °C 30s) x 35, 72 °C 5 min, 4 °C oändligt.
8. Gjutning av agarosgel se [AL893](#)

Avläsning och bedömning

Studera banden på gelen och jämför med storleksmarkören.

Finns band som är 433 bp är isolatet PVL-positivt, vilket innebär att isolatet kan producera Pantone-Valentine leukocidin.

Resultaten noteras på typningsremissen, som signeras.

Svarsrutiner

Isolat för vilket ett band som är 433 bp har påvisats räknas som PVL-positivt Utsvaras: Gen kodande för toxinet Pantone-Valentine leukocidin (PVL) är påvisad med PCR-teknik.

Instrument

[Inkubatorrum 35 °C AL802](#)

[Kylskåp / Frysskåp AL784](#)

Inkubator 30°C +/-2°C

Kylskåp

Frys

Ljusbord [AL768](#)

Sterilbänk [AL793](#)

Elektroforesutrustning [AL813](#), [AL810](#)

Kamerautrustning [AL772](#), [AL788](#), [AL801](#), [AL768](#) [AL9977](#)

Gene Amp PCR-system [AL7514](#)

[Elektronisk snabbvåg Mettler PB 303, PB3002 AL779](#)

[Sterilbänk Herasafe typ HS 12, klass II AL837](#)

Material

Provhantering och PCR

Sterila öglor Vortexskak

Engångshandskar

Eppendorffrör 1,5 ml
PCR-rör 0,2 ml
Proppade spetsar: 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl
Finnpipett 5 - 40 µl
Finnpipett 10 - 300 µl
Finnpipett 200 - 1000 µl
Pasteurpipetter

Referensstammar:

S.aureus CCUG 47167.

Reagens

Kemikalier / Kit

Amplicor Respiratory Specimen (Roche) preparation Kit , förvaras i 2-8 °C

Primer PVL-sense 5'- ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A - 3' (Thermo BioSciences)

Primer PVL-anti sens 5'- GCA TCA AST GTA TTG GAT AGC AAA AGC -3' (Thermo BioSciences)

PCR FRO-vatten [AL490](#)
HotStar mastermix (Qiagen)
Agaros (CLP)
Etidiumbromid 0,625 mg/µl (CLP)
6x orange DNA loading dye (Fermentas)
Express DNA ladder, ready to use 0,1µg/µl (Fermentas)
5 x TEB [AL128](#)
Filterrenat-vatten, sterilt [AL490](#)

Reagensberedning

5 x TEB [AL128](#)

Reagensberedning

Följ instruktioner i utförandebeskrivning: Beställning och kontroll av oligonukleotider [AL348](#)

Kalibrering

Kalibrator

S.aureus CCUG 47167 som positiv kontroll
Vatten som negativ kontroll

Kvalitetskontroll

Internkontroll

Studera banden på gelen och jämför med storleksmarkören.
Finns band som är 433 bp är isolatet PVL positivt

Varje preparation måste testas för förekomst av *nuc*-gen (se separat metodbeskrivning). Nuc genen skall vara positiv i ett *S.aureus* isolat. Utfaller *nuc*-analysen med negativt resultat måste isolatet prepareras på nytt och andra verifieringstester göras på nytt.

Indikation/Medicinsk betydelse/Användningsområde

Panton-Valentine leukocidin (PVL) är involverad vid furunkulos, abscesser och nekrotiska hudinfektioner/pneumonier.

PVL-genen är vanligt förekommande hos MRSA.

Metodprincip

Översikt

I en polymeras chain reaktion (PCR) påvisa förekomst av *luk S-PV-lukF-PV* genen (PVL).

Mätintervall

Kvalitativ

Referenser

1. Lina G. et. al. Involvement of Panton-Valentin Leukocidin-Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. Clin. Inf. Dis. 29:1128-1132, 1999.

Valideringar

Se dokument: [AL4899](#)