Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/83323

File ID	83323
Filename	CHAPTER 9 Summary - Samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Molecular diagnosis and epidemiology of Mycoplasma Pneumoniae
Author	J.W. Dorigo-Zetsma
Faculty	Faculty of Medicine
Year	2000
Pages	139
ISBN	90-901427-2X

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/86494

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

CHAPTER 9

Summary - Samenvatting

SUMMARY

The studies presented in this thesis describe the development and validation of molecular techniques for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Molecular techniques are subsequently applied to increase insight into epidemiological patterns of *M. pneumoniae*.

Most people infected with *M. pneumoniae* display a mild respiratory infection and the disease usually does not lead to a doctor's visit. Therefore, confirmed diagnosis is often not accomplished in daily practice. The available data from regular sources on morbidity and mortality due to *M. pneumoniae* infection are derived mainly from hospitalised patients and thus will reveal a minor part of actually occurring *M. pneumoniae* infections only. In **chapter 1** data on *M. pneumoniae* infection from Laboratory Reporting Systems in 5 Northern European Countries were analysed. These data show that *M. pneumoniae* is most prevalent during winter months but that epidemic outbreaks occur on a regular basis every 4 to 5 years. *M. pneumoniae* infection occurs slightly more frequent in male patients, with an exception for the 16 to 40 years age group in which more females were diagnosed. The data show a peak incidence of *M. pneumoniae* infection in young children and a smaller peak in adults of 30 to 40 years old.

Diagnosis of *M. pneumoniae* infection relies mainly on laboratory tests, as discrimination of *M. pneumoniae* from other, mostly viral, respiratory pathogens on the basis of clinical parameters only, is difficult. *M. pneumoniae* is a fastidious bacterium, growing relatively slow on specific media. Therefore, in clinical practice, diagnosis is usually accomplished by detection of antibodies in serum. With the advent of the polymerase chain reaction (PCR), diagnosis can be established rapidly. This enables administration of appropriate antibiotics to treat the infection in an early phase. In **chapter 2** a prospective study among children with respiratory tract infection and controls is described, in which different laboratory techniques for diagnosis of *M. pneumoniae* infection were compared. From the results obtained in this study, we concluded that only a combination of PCR on throat swab samples and the complement fixation test on paired sera allows both fast and reliable diagnosis of *M. pneumoniae* infection.

Subsequently, the PCR was applied for detection of *M. pneumoniae* in respiratory specimens obtained from adults admitted to the hospital with community-acquired pneumonia (**chapter 3**). In addition, antibody detection was performed in all patients. The infection was diagnosed in 12% of the patients, in 83% of them by PCR and in 55% by serology. The mean age of the patients with positive *M. pneumoniae* PCR and negative serology was significantly higher than that of the patients with positive serology. These findings suggested that elderly patients might be deficient in an antibody response to a *M. pneumoniae* infection, implying that the diagnosis is not established in case only serology is performed for these patients.

In **chapter 4** the development of a semiquantitative nested PCR protocol to detect *M. pneumoniae* DNA and the construction of an amplification control (AC) is described. The method was applied on throat samples from hospitalised and non-hospitalised subjects. It was shown that the mean *M. pneumoniae* load in samples from the hospitalised patients was significantly higher than that in samples from the non-hospitalised subjects, implying a relationship between load of *M. pneumoniae* in the throat samples and severity of disease due to *M. pneumoniae*.

Chapter 5 describes a prospective study in the Netherlands among general practitioner (GP) patients with acute respiratory infections (ARI). Among these patients the distribution of *M. pneumoniae* and respiratory viruses was studied. Household contacts of *M. pneumoniae* positive patients were also enrolled, to study the transmission of *M. pneumoniae* within families. *M. pneumoniae* was present in 3.3% of the GP patients with ARI and in 12% of their household contacts. High proportions (75%) of the *M. pneumoniae* positive contacts were children. Half of these *M. pneumoniae*-positive children did however not develop ARI. From these results we concluded that children apparently are a reservoir for *M. pneumoniae*. Based on our data and data on the incidence of ARI among GP patients, we calculated an incidence of nearly 600 *M. pneumoniae* infections in ARI GP patients per 100,000 population per year.

Molecular epidemiology of *M. pneumoniae* is hampered by its apparently highly conserved genome. Based on variation in the P1 gene, *M. pneumoniae* clinical isolates have been divided into two types only. In order to refine molecular typing, we subjected *M. pneumoniae* clinical isolates to three different genotyping methods (**chapter 6**). The strains could be divided into two genomic groups, based on sequencing of the 16S-23S spacer region and on amplification of large interrepeat fragments by long PCR, followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The third method however, PCR RFLP analysis of the P1 cytadhesin gene using an extended set of restriction enzymes revealed 8 subtypes among 23 *M. pneumoniae* isolates. Thus the existence of two genomic groups among *M. pneumoniae* clinical isolates was confirmed, but possibilities for strain differentiation based on variation in the P1 gene were extended.

Subsequently, we selected a set of strains with unique P1 PCR RFLP patterns for sequence analysis of their P1 genes (**chapter 7**). The sequence data revealed nucleotide variations within the P1 type 1 and 2 strains, sequence motifs of P1 type 1 genes in P1 type 2 genes and vice versa, and a long stretch of variation in one of the strains. Variable regions as detected in the P1 genes of our strains, were present in several repetitive regions outside the P1 gene locus in the genome of strain M129, an *M. pneumoniae* strain which has been completely sequenced. These findings suggest that intragenomic recombination may well be the basis for generation of the P1 gene variation.

Finally, in **chapter 8** the findings from our studies are discussed in perspective of existent knowledge on aetiology of community-acquired pneumonia and respiratory infections in the

hospital-, general practitioner-, and community setting. The application of molecular techniques for diagnosis and epidemiology of *M. pneumoniae* is placed in the context of classical diagnostic methods and currently known genomic variation of *M. pneumoniae* clinical isolates.

The use of PCR in addition to serological assays is recommended for fast diagnosis of *M. pneumoniae* infection. Development and application of P1 gene primers for direct sequencing- based genotyping on clinical specimens will facilitate molecular epidemiology of *M. pneumoniae*. The data thus generated can also be used to further elucidate the mechanisms responsible for P1 gene variability, and the potential role of this variation in the pathogenesis of *M. pneumoniae*.

SAMENVATTING

De studies uitgevoerd in het kader van dit proefschrift, beschrijven de ontwikkeling en validatie van moleculaire technieken voor de diagnostiek van een *Mycoplasma pneumoniae* infectie. Moleculaire technieken zijn vervolgens toegepast om het inzicht in de verspreiding van *M. pneumoniae* te vergroten.

De meeste mensen die een *M. pneumoniae* infectie doormaken, hebben een milde luchtweginfectie die doorgaans geen aanleiding geeft de huisarts te raadplegen. Daarom wordt in de dagelijkse praktijk de diagnose meestal niet gesteld. De meeste gegevens over ziektelast en sterfte ten gevolge van een *M. pneumoniae* infectie zijn afkomstig uit reguliere bronnen en betreffen meestal mensen die in een ziekenhuis opgenomen zijn geweest. De aantallen die uit deze bronnen afkomstig zijn, betreffen dus maar een klein percentage van het daadwerkelijke aantal voorkomende *M. pneumoniae* infecties. In **hoofdstuk 1** zijn de registratie gegevens van Laboratorium Rapportage Systemen uit 5 Noord Europese landen geanalyseerd. Deze gegevens laten zien dat *M. pneumoniae* vooral gedurende de wintermaanden voorkomt, maar dat epidemische verheffingen iedere 4 tot 5 jaar gedurende anderhalf jaar plaatsvinden. *M. pneumoniae* wordt iets vaker aangetroffen bij mannelijke patiënten, behalve in de leeftijdscategorie van 16 tot 40 jaar, waarin meer vrouwen met de infectie worden gediagnosticeerd. Er komt een piek voor bij jonge kinderen en een tweede, minder hoge piek bij volwassenen in de leeftijd van 30 tot 40 jaar.

De diagnostiek van een infectie met *M. pneumoniae* berust voornamelijk op laboratorium testen, aangezien het onderscheid van andere, meestal virale, luchtweg pathogenen op klinische gronden alleen, moeilijk is. *M. pneumoniae* is een lastige bacterie, die slechts moeizaam groeit op voedingsbodems met een speciale samenstelling. Daarom wordt in de praktijk de diagnose meestal gesteld op het aantonen van antistoffen in het bloed tegen de bacterie. Voor een betrouwbare diagnose moeten twee bloedmonsters, afgenomen met een tussenpoos van tenminste 10 dagen, getest worden, waardoor de diagnose pas ongeveer 14 dagen na het begin van de ziekte gesteld kan worden. Door middel van het toepassen van de polymerase ketting reactie (PCR), een techniek waarbij DNA van de bacterie aangetoond wordt, kan een snelle diagnose verkregen worden. Dit maakt het geven van specifiek tegen Mycoplasma gerichte antibiotische therapie in een vroeg stadium van de infectie mogelijk. In **hoofdstuk 2** wordt een prospectieve studie onder kinderen met een luchtweginfectie en een controle groep beschreven, waarin verschillende diagnostische laboratorium technieken met elkaar werden vergeleken. De resultaten uit deze studie leidden tot de conclusie dat alleen de combinatie van PCR op keeluitstrijken en het testen van gepaarde sera zowel een snelle als ook een betrouwbare diagnose van een *M. pneumoniae* infectie geeft.

Vervolgens werd de PCR voor *M. pneumoniae* toegepast op monsters uit de luchtwegen van volwassenen, opgenomen in het ziekenhuis vanwege een thuis opgelopen longontsteking

(**hoofdstuk 3**). Ook bij deze patiënten werden de antistoffen in het bloed bepaald. De infectie werd bij 12% van de patiënten gediagnosticeerd, in 83% van hen met behulp van de PCR en in 55% door middel van serologie. De gemiddelde leeftijd van de patiënten met een positieve PCR, en negatieve serologie was hoger dan die van de patiënten met positieve serologie. Deze bevindingen leidden tot de conclusie dat oudere patiënten mogelijk minder goed in staat zijn antistoffen tegen *M. pneumoniae* aan te maken, waardoor de diagnose niet gesteld zou worden indien alleen serologische testen worden uitgevoerd bij deze patiënten.

In **hoofdstuk 4** wordt de ontwikkeling van een semi-kwantitatieve, nested PCR beschreven en de constructie van een amplificatie controle. De methode werd toegepast op keel monsters van gehospitaliseerde en niet-gehospitaliseerde personen met een *M. pneumoniae* infectie. Het gemiddelde aantal Mycoplasma deeltjes in de monsters van de gehospitaliseerde patiënten was significant hoger dan dat in de monsters van de personen die niet in het ziekenhuis waren opgenomen, wat een relatie tussen ernst van de ziekte (gehospitaliseerd of niet) en de hoeveelheid Mycoplasma in de keel waarschijnlijk maakt.

Hoofdstuk 5 beschrijft een prospectieve studie onder huisarts patiënten met een acute luchtweginfectie in Nederland. Bij deze patiënten werd het voorkomen van luchtweg virussen en *M. pneumoniae* bestudeerd. Contact personen in het huishouden van *M. pneumoniae* positieve patiënten werden ook in de studie betrokken, om de overdracht van *M. pneumoniae* in families te bestuderen. *M. pneumoniae* was aanwezig in 3.3% van de huisarts patiënten en in 12% van hun huishoudcontacten. Onder de *M. pneumoniae*-positieve huishoudcontacten waren significant meer kinderen, waarvan ongeveer de helft zonder symptomen was. Hieruit concludeerden wij dat kinderen klaarblijkelijk een reservoir voor *M. pneumoniae* zijn. Wij berekenden, op basis van onze gegevens en gegevens over het voorkomen van acute luchtweg infecties bij huisarts patiënten, dat per jaar bijna 600 *M. pneumoniae* infecties onder huisarts patiënten met een luchtweginfectie per 100.000 inwoners voorkomen.

Epidemiologie op basis van moleculaire technieken voor *M. pneumoniae* wordt bemoeilijkt doordat het genoom van deze bacterie weinig variatie vertoont. Op basis van variatie die in het P1 gen bestaat, kunnen isolaten van *M. pneumoniae* worden ingedeeld in slechts twee types. Om de moleculaire mogelijkheden tot typeren te verfijnen, hebben wij drie verschillende typeertechnieken op klinische *M. pneumoniae* isolaten toegepast (**hoofdstuk 6**). De stammen konden worden ingedeeld in twee groepen, gebaseerd op sequentie-analyse van genomisch DNA tussen het 16S-23S gen en op basis van amplificatie van grote stukken DNA die tussen bepaalde repeterende regio's van het genoom liggen. Een derde methode, de analyse van het P1 gen, waarbij na amplificatie gebruik werd gemaakt van een uitgebreide set restrictie enzymen, liet 8 subtypen zien onder 23 *M. pneumoniae* stammen. Hiermee werd het bestaan van twee genomische groepen bij *M. pneumoniae* stammen bevestigd, maar werden mogelijkheden om stammen op basis van variatie in hun P1 gen te onderscheiden uitgebreid.

Vervolgens hebben we stammen met een uniek patroon in de P1 typering geselecteerd voor sequentie analyse van hun P1 gen (**hoofdstuk 7**). De sequentie data die we aldus verkregen, lieten veranderingen in de nucleotide volgorde binnen P1 type 1 en 2 stammen zien, sequentie motieven van P1 type 1 genen in P1 type 2 genen en vice versa en een lang variabel stuk in één van de stammen. De variabele gebieden, zoals we in de P1 genen van onze stammen vonden, waren aanwezig in diverse repeterende gebieden buiten het P1 gen van de M129 stam, een *M. pneumoniae* stam waarvan de sequentie in zijn geheel bekend is. Deze bevinding houdt in dat recombinatie binnen het genoom van één stam heel goed de basis voor het ontstaan van variatie in het P1 gen kan zijn.

In **hoofdstuk 8** tenslotte, worden de bevindingen van onze studies bediscussieerd in het perspectief van de bestaande kennis over de etiologie van de thuis opgelopen longontsteking en andere luchtweginfecties op ziekenhuis-, huisartsen- en populatie niveau. Het toepassen van moleculaire technieken voor de diagnostiek en epidemiologie van *M. pneumoniae* wordt in de context van klassieke diagnostische methodes en bestaande kennis over de genoomvariatie van *M. pneumoniae* geplaatst.

Het gebruik van de PCR, naast serologische bepalingen, wordt aanbevolen voor de snelle diagnose van een *M. pneumoniae* infectie. Het ontwikkelen en toepassen van P1 primers voor directe genotypering op klinische materialen zal de moleculaire epidemiologie van *M. pneumoniae* vergemakkelijken. De gegevens die hierdoor beschikbaar komen, kunnen ook worden gebruikt om de mechanismen die ten grondslag liggen aan P1 gen variatie verder te verhelderen, alsmede om de mogelijke rol van deze variatie in het ontstaan van ziekte door *M. pneumoniae* te verklaren.