



AF BIOANALYTIKER, KHALED GHATHIAN
KLINISK MIKROBIOLOGISK AFDELING, HVIDOVRE HOSPITAL
BIOANALYTIKER, DENNIS LORD
KENNEDY INSTITUTET

Detektion af Methicillin-resistent *S. aureus* (MRSA)

Resumé

197 prøver bestående af 68 MRSA, 56 MSSA, 34 MSCNS, 31 MRCNS og 8 BORSA isolater fra Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Herlev Regionshospital, er blevet testet med *S. aureus*/MRSA EVIGENE™ (AdvanDx) og Multiplex endpoint-PCR (Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Hvidovre Hospital). Begge metoder har opnået specificitet og sensitivitet på 100 % for detektion af MRSA, hvoraf stammerne har været renkulturer på 5 % blodagar-plade. Metoderne har detekteret alle 68 MRSA-stammer fra renkultur, men har ikke kunnet detektere *mecA*-genet på 6 MRCNS-stammer. Alle non-MRSA prøver er blevet identificeret som sandt negative non-MRSA. *S. aureus*/MRSA EVIGENE™ er også testet på 196 nasal-podninger fra blandingskultur. Metodens sensitivitet og specificitet for detektionen af MRSA er hhv. 76,1 % og 97,7 % ved visuel aflæsning og 77,6 % og 96,9 % ved aflæsning med ELISA-reader. Ud af 196 prøver er blevet detekteret 51 sandt positive MRSA og 3 falsk positive MRSA ved visuel aflæsning, men 52 sandt positive MRSA og 4 falsk positive MRSA ved ELISA-reader. Den gennemsnitlige diagnosticeringstid for *S. aureus*/MRSA EVIGENE™ og Multiplex endpoint-PCR er blevet vurderet på en serie på 20-25 prøver til hhv. 4,3 og 5,4 time.

Bachelorprojekt viser, at diagnosticeringstiden for MRSA kan reduceres fra ca. en uge til 2-3 dage, hvis Klinisk Mikrobiologisk Afdeling på Herlev Regionshospital hjemtager analyserne og indfører enten multiplex endpoint-PCR eller *S. aureus*/MRSA EVIGENE™

I Danmark er der gennem de sidste år set et stigende antal infektioner forårsaget af MRSA. Ofte er der tale om nosokomielle infektioner, dvs. infektioner, der enten opstår eller erhverves på et sygehus. I Danmark er antallet af MRSA-tilfælde ca. fordoblet hvert år siden 2002 (4). Antallet af MRSA-isolater steg fra ca. 549 i 2004 til 856 i 2005 (2). Problemet med MRSA er, at den pga. sine resistensmekanismer er forbundet med forlænget hospitalsophold, isolation af patienten og behandling med dyre antibiotika, hvilket medfører forhøjede omkostninger.

For at begrænse stigningen i MRSA-infektioner kræver det en effektiv diagnosticering, således at patienten hurtigst muligt kan isoleres, så smitteveje kan blive afbrudt.

På Klinisk Mikrobiologisk Afdeling (KMA), Herlev Regionshospital, varer MRSA-diagnosticering ca. en uge, idet den konfirmatoriske *mecA*-påvisning udføres på Statens Serum Institut (SSI). I vores bachelorprojekt vil vi derfor afprøve forskellige metoder til at diagnosticere MRSA lokalt i KMA for at forkorte diagnosticeringstiden og samtidig sikre korrekt diagnose.

MATERIALER & METODER

Prøvematerialer

197 prøver opbevaret i KMA, Herlev Regionshospital. Prøver er opdelt i to kategorier, den ene er med renkulturer (isolater) og den anden med blandingskulturer, som er fremstillet af oprindelige patient-næsepodninger. Nogle af podningerne er simuleret positive ved at dyppe dem i MRSA-holdigt saltvand. Isolater er opbevaret i -80°C, og næsepodninger er opbevaret i Stuart's transportmedie i køleskab.

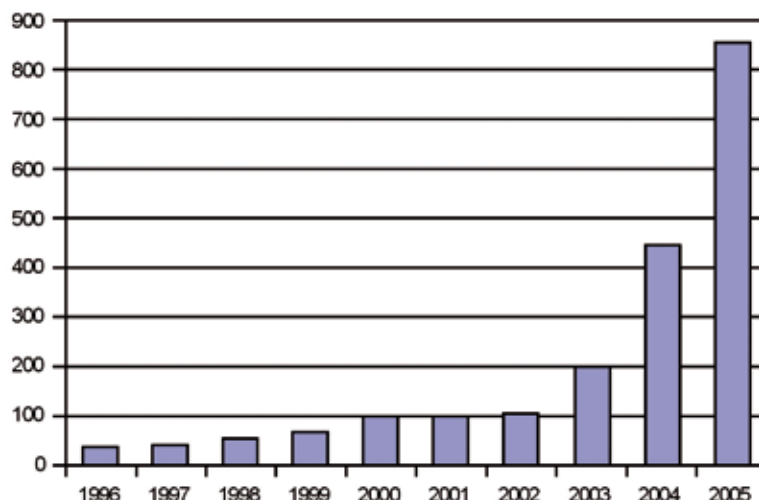
Metoder

Vi sammenligner resultater frembragt af *S. aureus*/MRSA EVIGENE™ (AdvanDx) og Multiplex end point-PCR (KMA, Hvidovre Hospital) med de svar, der på forhånd er på prøven fra KMA, Herlev Hospital.

På KMA, Herlev Hospital, screenes alle mistænkte MRSA-prøver med bl.a. cefoxiten og koagulase. Ved fund af cefoxitenresistente – og koagulase positive stafylokokker sendes prøven til Statens Serum Institut (SSI), hvor der konfirmeres med Multiplex PCR, der også giver *SCCmec*-typen (I-IV). Koagulase-test bruges også til at veri-

DEN ÅRLIGE FOREKOMST AF MRSA I DK

Figur1: Oversigt over stigning af MRSA tilfælde i Danmark.



RESULTATER

ficere, om stammen er en *S. aureus*.

Som alternativ benytter SSI multiplex PCR, derudover *mecA*-detekterer *nuc*-genet.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Analyseprincip

Ved denne metode mangedobles et defineret stykke DNA, der er specificeret af et primerpar. Primerne er små stykker DNA (18 – 25 nukleotider lange), der kan designes således, at de passer komplementært med startsekvensen på det genfragment, der ønskes opformet. Herved annealer de sig og tillader derved enzymet Taq-polymerase at binde sig og starte opformeringen af den ønskede DNA-sekvens (*template*-streng). Positiv MRSA repræsenteres ved 2 bånd: *mecA*-genet (162 bp) og *spa*-genet (200-500 bp).

EVIGENE™

Analyseprincip

EVIGENE er en kvalitativ genotypisk teknik baseret på en hybridisering af en mærket gen-probe og *target*-DNA. Reaktionen forgår i microtitter-brønd, som indeholder capture prober for *mecA*- eller *nuc*-genet. Hvis *mecA*- eller *nuc*-genet er til stede, vil capture og detektions-proben danne kompleksbinding (hybridisering). Derved dannes der binding mellem conjugatet Alkaline-phosphatase (AP) og detektionsproben. Dette kan visualiseres ved tilsætning af substrater med kromofor grupper.

Ved en række procedurer detekteres mål-DNA'et ved, at der sker en farveudvikling.

FORSØG 1		Renkultur på 5 % blodagar	
Parameter	Multiplex endpoint-PCR	EVIGENE(ELISA)	EVIGENE(VISUEL)
Sensitivitet	100 %	100 %	100 %
Specifitet	100 %	100 %	100 %
Diagnostisk tid	324 min.	263 min.	263 min.

FORSØG 2		Blandingskultur i SSI serum boullion	
Parameter	EVIGENE(ELISA)	EVIGENE(VISUEL)	
Sensitivitet	77,60 %	76,10 %	
Specifitet	96,90 %	97,70 %	

Positivt MRSA indikeres visuelt ved, at der dannes rød farve, men ved negativt resultat er der næsten ingen farveudvikling/ pink farve. Ved at måle med ELISA-reader (bølgelængden 490/492 nm) er positiv MRSA $\geq 0,5$ og det negative $< 0,5$.

FORSØGSOPSÆTNING

Projektet startede med at vi udførte reproducerbarhed for Multiplex endpoint PCR og *S. aureus*/MRSA EVIGENE™. Prøverne i forsøg 1 og 2 har været undersøgt blindet, dvs. uden at kende facitlisten. Prøvemateriale for multiplex endpoint-PCR og *S. aureus*/MRSA EVIGENE™ i forsøg 1 stammer fra samme 5 % blod agarplade.

DISKUSSION

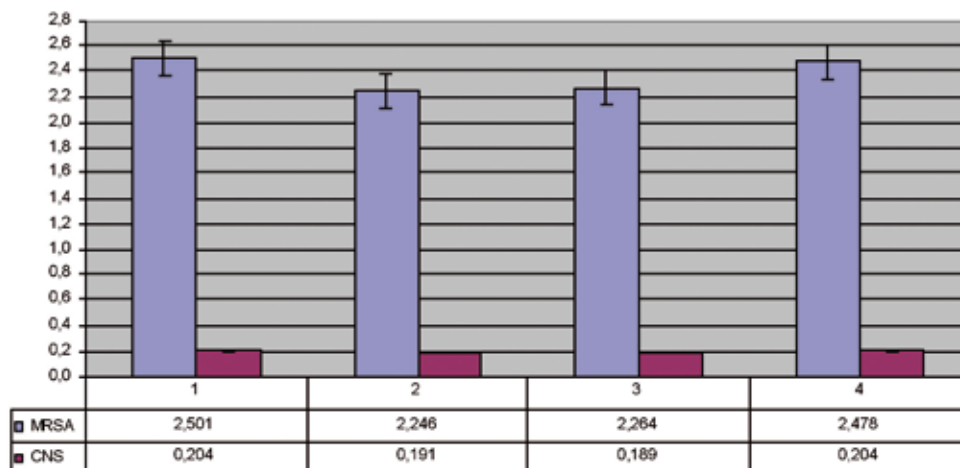
EVIGENE og PCR på renkultur

Diagnostisk sensitivitet

S. aureus/MRSA EVIGENE (Visuel- og ELISA aflæsning) og multiplex endpoint-PCR, udført på ren kultur fra 5 % blodagar, har vist at have en sensitivitet på 100 %. Metoderne har detekteret alle 68 MRSA-positive prøver inkl. alle sande negative prøver. Dette betyder, at metoderne er i stand til at detektere alle prøver, der indeholder MRSA, hvilket øger sandsynligheden for, at en person med MRSA kan blive klassificeret som MRSA-bærer. *S. aureus*/MRSA EVIGENE-teknikken er også blevet testet på renkultur-stammer fra blod, og testen har vist sig at have en sensitivitet på hhv. 96 % (AdvanDx) (6) og 100 % (SSI) (7).



REPRODUCERBARHED MRSA EVIGENE



MRSA EVIGENE aflæsning for mecA genen

>>>

Dette viser, at testen også giver en høj sensitivitet, selvom prøverne er fra blodkulturer. Det skal dog bemærkes, at vi benytter en anden procedure i vores projekt.

Prøver 46 og 128 har været falsk negative (MSSA) ved første kørsel med multiplex endpoint-PCR. Prøverne er blevet testet anden gang, og de har vist sig at være sandt positive for MRSA. Årsagen til det falsk negative resultat ved første kørsel kan skyldes, at *mecA*-primerne ikke har annealeret sig specifikt til mål-DNA-sekvensen. Annealing afhænger af forskellige faktorer bl.a. annealings-temperatur (T_a). En for lav annealings-temperatur vil medføre en fejl-priming og dermed afgive et falsk resultat.

Prøve nr. 144 har også været falsk negativ (MSSA) i *S. aureus*/MRSA EVIGENE ved første kørsel, men ved gentagelse var resultatet sand positiv (MRSA). Det falsk negative resultat kan bl.a. skyldes mængden af prøvemateriale. Et af de største problemer, der kan give anledning til fejklassificeringen af en prøve, kan relateres til inkulum-mængden. Falsk negative resultater vil som regel opstå, hvis der er utilstrækkeligt med prøvemateriale. For at få et kvalitativt/kvantitativt resultat af de dannede komplekser mellem bl.a. *mecA*-detektions-probe og mål-DNA-strengen kræves det, at der er ækvivalens mellem detektions-probe og mængden af mål-DNA-sekvensen. Ifølge producentens vejledning anbefales det, at der bruges en dråbe detektions-probe og 100 μ l fra en fremstillet lysis-buffer, der indeholder ca. 4 μ l bakteriesuspension. Underskud af reagenser

eller bakteriemængde vil ikke give anledning til kompleks-binding og dermed medføre et falsk resultat. Overskud af reagenser vil medføre fortynding af prøvematerialet og dermed lavere intensitet af farven og dermed lavere absorptions.

DIAGNOSTISK SPECIFICITET

Begge metoder udført på renkultur fra 5 % blodagar har vist at have samme specificitet på 100 %. Dette betyder, at metoderne er i stand til at klassificere med 100 % nøjagtighed, at en rask person (Non-MRSA bærer) er rask.

Prøve nr. 50 og 89 blev identificeret som falsk positiv-MRSA ved første kørsel med *S. aureus*/MRSA EVIGENE, men ved anden kørsel har det vist sig, at prøverne er hhv. MRCNS og MSSA. Årsagen til falsk positiv MRSA kunne bl.a. skyldes kontamination.

Med hensyn til prøve nr. 89 så viste det sig ved første gang, at prøven var falsk MRSA ved ELISA-aflæsning, men ved visuel aflæsning var den sand MSSA. Absorbans for *mecA*-genet var ved første gang 0,543, hvilket lå tæt på grænseværdi (Cut-off-værdi), men anden gang blev den til 0,160, hvilket var det forventede resultat. Årsagen til denne høje absorbans kan skyldes utilstrækkelig vask med vaskebuffer. Vaskeproceduren er vigtig for at fjerne løst bundne og ubundne komponenter.

Prøve nr. 56, som er MSSA, har givet et ukendt gen-bånd, der tangerer *mecA*-båndet på elektroforese-gelen. Prøven er blevet testet 4 gange, uden at det ændrer på resultatet. Det er ikke nødvendigvis et *mecA*-bånd, da det ikke ligger på 162 bp. Bakterien kan op-

rindeligt have været methicillin-resistent (*mecA* positiv), men på et tidspunkt har den mistet et lille stykke af *mecA* genen. Ud fra gelen kunne det tyde på, at den har mistet 20–30 basepar. PBP2a, som *mecA* koder for, er således defekt, og bakterien er derfor blevet methicillin-følsom. For at være helt sikker kunne man eventuelt lave en undertypning /sekvensering for det ukendte genbånd.

EVIGENE UNDERSØGT PÅ BLANDINGS-KULTUR

Diagnostisk sensitivitet

Formålet med at efterforske *S. aureus*/MRSA EVIGENE på blandingskultur er at se, om sensitiviteten og specificiteten er nogenlunde lige så høj som på renkultur for dermed at kunne minimere diagnosticeringstid til 24 timer. Metoden er stadig under udvikling i firmaet. Sensitivitet for metoden er efter vores beregninger hhv. 77,6 % for ELISA-aflæsning og 76,1 % for visuel aflæsning. Dette viser, at detektion fra blandingskulturer øger sandsynligheden for falsk negative resultater. Det er vanskeligt at udvikle en metode, der kan give et sikkert diagnostisk svar på baggrund af blandingskulturer, da det er nødvendigt at tage højde for bakteriernes indbyrdes konkurrence. Det er muligt at i de tilfælde, hvor vi fik falsk negative svar for MRSA, var MRSA-stammerne blevet udkonkurreret af de sensitive medlemmer af slægten.

Diagnostisk specificitet

Specificitet for *S. aureus*/MRSA EVIGENE

ORDFORKLARING

- BORSA: Borderline Resistent *Staphylococcus aureus*
- KNS/CNS: Koagulase negative stafylokokker (Kan være *mecA* pos (MRCNS) eller *mecA* neg. (MSCNS))
- MSSA: Methicillin Sensitiv *Staphylococcus aureus*.
- *MecA*-gen: DNA-fragment, der findes hos MRSA, som kommer til udtryk ved produktion af et penicillinbindende protein (PBP2a/ PBP2'), - et såkaldt peptidoglykan transpeptidase protein. Denne medfører resistens over for methicillin, didoxacillin og beslægtede β -laktamase stabile penicilliner og cephalosporiner.
- *Nuc*-gen: Koder for nuclease hos *S. aureus*. (artsspecifikt)
- *Spa*-gen: Koder for overfladisk protein A hos *S. aureus*. (artsspecifikt)
- bp: basepar.

NE ved ELISA og visuel aflæsning er hhv. 96,9 og 97,7 %. Ud af 129 negative prøver var der 3 falsk positive ved visuel aflæsning og 4 falsk positive ved ELISA-aflæsning. Årsagen til falsk positive resultater på blandingkulturer skyldes, at der kan findes mange forskellige typer af bakterier i patientprøver. En prøve indeholdende MRCNS og MSSA vil typisk give et MRSA-falsk positivt resultat. En anden forklaring på de falsk positive resultater kan være manglende centrifugering inden afpipettering af 100 μ l af lyserede bakterier. Det lyserede produkt vil altid indeholde en mængde af serum boullion (salt), der kan have indflydelse på resultatet. Derfor foreslår vi, at der centrifugeres på f.eks. 5000 g i 5 minutter, før der afpipetteres 100 μ l lyserede bakterie. Dette vil sikre en adskillelse af frit DNA og salt. Denne procedure anvendes i et forsøg af Robert Skov (8).

Diagnosticeringstid

Et af vores formål var at tage stilling til, om *S. aureus*/MRSA EVIGENE™ kunne reducere diagnosticeringstid i forhold til multiplex endpoint-PCR. Gennemsnitligt er en serie på 20-25 prøver, der er kørt på *S. aureus*/MRSA EVIGENE™ diagnosticeret efter 4,3 time. De samme prøver tager til sammenligning 5,4 time med multiplex endpoint-PCR. Den aktuelle arbejdstid for både *S. aureus*/MRSA EVIGENE™ og multiplex endpoint-PCR er hhv. 1,6 og 1,8 timer. I artiklen af Robert Skov (7) er diagnosticeringstid for *S. aureus*/MRSA EVIGENE™ blevet

beregnet til 4,5 time for 24 prøver.

Der, hvor EVIGENE virkelig har sin fordel, er, hvis der er behov for at teste mange patienter på en gang. Det er muligt at lave 2 *plates* samtidigt, således er det muligt at teste 94 prøver for MRSA på samme dag. Efter vores vurdering er det væsentligt sværere at køre 94 prøver på multiplex endpoint-PCR, end det er på *S. aureus*/MRSA.

Perspektivering

Vi forslår at KMA, Herlev Regionshospital, indfører enten multiplex endpoint-PCR eller *S. aureus*/MRSA OEVIENE™, dermed vil afdelingen reducere diagnosticeringstiden i stedet for at sende prøver til SSI.

Da KMA, Herlev Regionshospital, allerede har real-time PCR, vil det være en fordel at afprøve det til diagnostik af MRSA. Vi tror, at fordelene ved real-time PCR frem for endpoint-PCR er, at den er hurtigere og nemmere at aflæse.

1. Klinisk vejleder i KMA, Herlev Regionshospital: Overlæge Jette Bangsborg.
2. Hovedvejleder, bioanalytikerskolen: bioanalytikerunderviser Søren Frank Jørgensen.
3. KMA, Hvidovre Hospital: Seniorforsker Kit Boye.
4. AdvanDx Forskningsteam: Forsker Anne Rasmussen, Henrik Stender og Kit Madsen et. al.

LITTERATURLISTE

- 1: Berg, K. et.al. Ekstern kvalitetsvurdering I bakteriologi, mykologi og I parasitologi, side 41-42
J:Rapport fra strategimøde nr.14,2000
http://www.legeforeningen.no/as-set/24686/2/24686_2.pdf
- 2: Danmap 2005, Statens Serum Institut, july 2006.
http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2005.pdf
- 3: Skov Robert et.al. Epidemisk Stigning i antallet af methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) i Danmark – indgriben nødvendig nu, Ugeskrift for læger, 2005;167(12):1396
http://www.ugeskriftet.dk/portal/page/portal/LAEGERDK/UGESKRIFT_FOR_LAEGER/TIDLIGERE_NUMRE/2005/UFL_2005_12/UFL_2005_12_46716
- 4: MRSA-handlingsplanen for den kommende region hovedstaden H/S Aug.2005
[http://www.hosp.dk/direktion.nsf/pics/MRSA%20handlingsplan%20010905.pdf/\\$FILE/MRSA%20handlingsplan%20010905.pdf](http://www.hosp.dk/direktion.nsf/pics/MRSA%20handlingsplan%20010905.pdf/$FILE/MRSA%20handlingsplan%20010905.pdf)
- 5: A. Huletsky, V. Rossbach, F. Gagnon, K. Truchon, F. J. Picard1, M. G. Bergeron, Development of a Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Clinical Specimens Containing a Mixture of *Staphylococci*
www.cepheid.com/sites/cepheid/liitp-dfs/meth_resistant_s_aureus.pdf
- 6: Rasmussen, Anne et.al, Rapid identification of *S.aureus* and differentiation between MRSA and MSSA directly from positive blood culture bottles using *s. aureus* EVIGENE and MRSA EVIGENE. 31 05 2006
<http://www.advandx.com/uploads/documents/asm2006evigenebloodculturefinal.pdf>
- 7: Skov, Robert et.al, Evaluation of a new 3-h hybridization method for detecting the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* and comparison with existing genotypic and phenotypic susceptibility testing methods. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, volume 43 p. 467-475, 1999
<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/rapidprint/43/4/467>
- 8: Skov, Robert et.al, Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from stimulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, volume 51, p.419-421, 2003
<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/rapidprint/51/2/419>