

ABACUS Diagnostica

Molekulaariset testit tulevaisuuden mikrobiologisessa laboratoriossa

Piia von Lode

Tutkimusjohtaja, FT

piia.vonlode@abacusdiagnostica.com

Laboratoriolääketiedepäivät 6-7.10.2011

Marina Congress Center, Helsinki

SISÄLTÖ

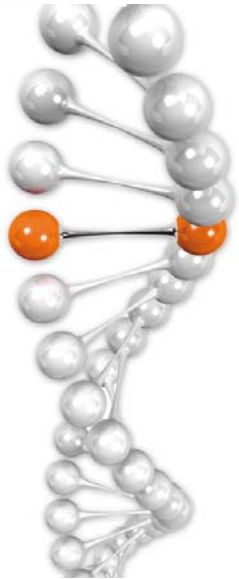
- **PCR klinisen mikrobiologian laboratoriossa**
- **Käyttökohteiden valinta testinkehittäjän näkökulmasta**
- **Millaisia testejä tulevaisuuden laboratoriossa?**
- **PCR veriviljelyanalytiikassa**
- **GenomEra MRSA/SA Blood Culture**
- **Teknologia yksinkertaisen PCR-testauksen takana**
- **Tulevaisuuden testivaihtoehdot**

PCR-analytiikka kliinisen mikrobiologian laboratoriossa



- DNA-pohjainen testaus yleistynyt hitaasti, kuten immunomääritykset aikanaan
 - Suuria vaatimuksia tiloille (puhdastilat), käyttäjille (tuloksentulkinta) ja toimintatavoille (kontaminaatiot)
- Teknologian kehittyessä näihin kehitetty ratkaisuja
 - homogeenisuus, automaattinen tulostentulkinta, umpinaiset reaktioastiat
- Jäljelle jääneet haasteet kohdistuvat
 - näytteenkäsittelyyn (inhibiittorit, DNA-eristys)
 - kapasiteettiin (robotiikka vs. yksittäistestit)
 - hintaan (reagenssit, monimutkaiset määrityskasetit, näytteenkäsittely)
- CT/NG analytiikka suunnannäyttävä
 - CT:n kasvatusta hankalaa; suurivolyyminen analyysi → tarve
 - robotiikka kuitenkin vain suurimpien laboratorioiden saavutettavissa
- Mitä mahdollista tehdä pienen/keskisuuren laboratorion rutiinissa?

Käyttökohteiden valinta testinkehittäjän näkökulmasta



- Yksittäistestit, kuivakemia ja homogeeninen mittaus parantaneet käytettävyyttä huomasti
- PCR-analytiikka kuitenkin kallista valmistaa
 - reagenssit (oligonukleotidit, entsyymit, leimat), puhtausvaatimukset, yksittäistestit, IP ja lisenssit
- Käytettävyyden ja hinnan lisäksi käyttöasteeseen vaikuttaa
 - halvempien menetelmien olemassaolo ja toimivuus
 - kansalliset suositukset (milloin tehdään geneettinen varmistus)
 - testin kiireellisyys/saavutettava ajansäästö
 - potilaan eristyksessä?
 - potilas vakavasti sairas?

Millaisia testejä (lähi)tulevaisuuden mikrobiologisessa laboratoriossa?

- Uusien menetelmien ja toimintatapojen käyttöönotto hidasta silloin, kun päätös vaikuttaa koko ketjuun
 - mikrobin metsästys suoraan kokoverestä (ikuinen tavoite)
 - suorat testit erikseen kerätystä näytteestä (esim. MRSA-seulonta)
 - ketkä valitaan kohderyhmään ja missä tilanteessa
 - miten erillisen näytteen ottaminen järjestetään
 - milloin testin tulos käytössä (laboratorio auki vain päivisin?)
- Suoraan laboratorion rutiiniin sopivat testit helpompi ottaa käyttöön
 - laboratorion sisäinen päätös
 - ei erillistä näytteenottoa tai uutta näytteenottovälinettä
 - ei potilasryhmien erittelyä
 - tavoitteena nopeampi vastaus, ei aivan uudenlaista informaatiota
- PCR-testeillä kuitenkin kiistattomat edut
 - herkkyys!
 - spesifisyys!



PCR veriviljelyanalytiikassa: vaikutus diagnoosi-aikaan?

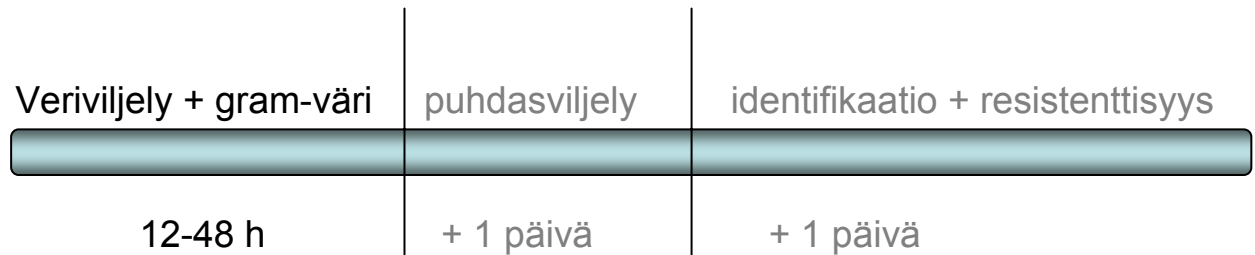
- Veriviljelytulos aina kiireellinen
 - nopea tulos
 - parantaa potilaan ennustetta
 - vähentää laajakirjoisten antibioottien turhaa käyttöä
 - vähentää antibiooteille resistenttien kantojen syntyä ja leviämistä
 - lyhentää sairaalassaoloaikaa

Veriviljely + gram-väri	puhdasviljely	identifikaatio + resistenttisyys
12-48 h	+ 1 päivä	+ 1 päivä



PCR veriviljelyanalytiikassa: vaikutus diagnoosiin?

- Veriviljelytulos aina kiireellinen
 - nopea tulos
 - parantaa potilaan ennustetta
 - vähentää laajakirjoisten antibioottien turhaa käyttöä
 - vähentää antibiooteille resistenttien kantojen syntyä ja leviämistä
 - lyhentää sairaalassaoloaikaa



PCR-testi 1h
PNA-FISH 1,5-3h
MALDI-TOF (1-2 krt/pv?)

PCR tarjoaa parhaiten tietoa resistenssistä!



PCR veriviljelyanalytiikassa: eksperttiosaaminen vs. rutiinikäyttö

Positiivinen näyte



Inhibiittorien poisto/ DNA eristys

- uutto, kaupalliset kitit, laitteistot
- poistetaan hiili, hemoglobiini, plasmaproteiinit, antikoagulantit, kasvatusmediumi jne.
- konsentroidaan DNA

Osaaminen
Tilat
Lisäkustannukset
Yksittäin vai erinä
Aika ja työ
Kontaminaatiot



PCR-reaktioiden valmistelu

- reagenssien käsittely ja jakaminen
- puhdastilat
- molekyylibiologian asiantuntemus
- PCR-laitteiston käyttö

Osaaminen
Tilat
Henkilöressurssit
Yksittäin vai erinä
Reaktioiden hävitys
Kontaminaatiot



(Heterogeeniset analysointivaiheet)

(Nykyisin homogeeninen)



Tuloksen tulkinta

- monistuskäyräanalyysi/tarkistus
- molekyylibiologian asiantuntemus

Osaaminen!
Asiantuntemus!
Riskit



Tulos/Diagnoosi



PCR veriviljelyanalytiikassa: eksperttiosaaminen vs. rutiinikäyttö

Positiivinen näyte

Inhibiittorien poisto/ DNA eristys

- uutto, kaupalliset kitit, laitteistot
- poistetaan hiili, hemoglobiini, plasmaproteiinit, antikoagulantit, kasvatusmediumi jne.
- konsentroidaan DNA

PCR-reaktioiden valmistelu

- reagenssien käsittely ja jakaminen
- puhdistilat
- molekyylibiologian asiantuntemus
- PCR-laitteiston käyttö

(Heterogeeniset analysointivaiheet)

Tulkinta

- monistuskäyräanalyysi/tarkistus
- molekyylibiologian asiantuntemus

Tulos/Diagnoosi

**Pudota pisara puskuriin
Pipetoi PCR-lastuun
Laita ajo päälle**



Positiivisen veriviljelynäytteen käsittely

GenomEra MRSA/SA Blood Culture

ABACUS Diagnostica

1



Laita näytepuskuriin 1 pisara (20 μ L) positiivista veriviljelynäytettä

2



Pipetoi PCR-lastuun (35 μ L)

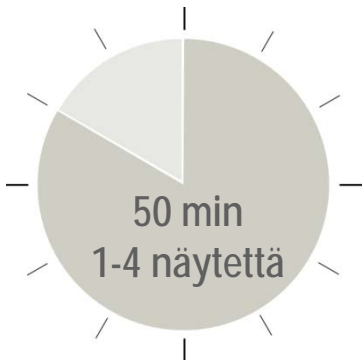
3



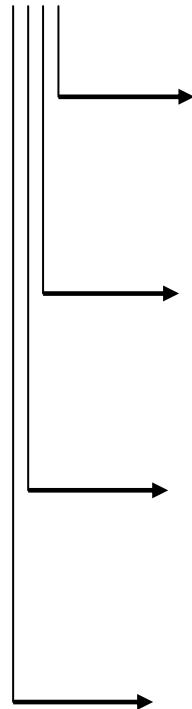
Laita lastut laitteeseen ja paina 'Run'-nappia

... protokollaa ei kehitetty pajalla vaan Vaasan keskussairaalan kliinisen mikrobiologian laboratoriossa (Jari Hirvonen) aidon kliinisen tarpeen hetkellä!

Ennakkoluulottomuus ja vuorovaikutus testikehityksessä äärimmäisen tärkeää, jotta testit vastaavat oikeisiin kysymyksiin



GENOMERA MRSA/SA TUOTEPERHE



MRSA / SA Diagnose

- 100% accuracy of MRSA detection, diagnostic test
- Sample prep: dilution of a *colony*



MRSA / SA Multi Swab

- 100% sensitivity for MRSA
- Sample prep: 2 x centrifugation step, 2 x vortex step of nasal swab (< 10 min)



MRSA / SA Nasal Swab

- 100% sensitivity for MRSA
- Sample prep: 2 x centrifugation step, 2 x vortex step of pooled swabs (< 10 min)



MRSA / SA Blood culture

- Detection of SA or MRSA
- Sample prep: dilution of *blood culture*
- **100% sensitivity and 99.8% specificity for SA and MRSA**



Kaikista tulokset tunnissa

BC evaluaatiotulokset

- BD BACTEC
- BacT/Alert



SITE 1 (BD BACTEC), n = 470		Routine methods		
All positive cultures analyzed		MRSA +	SA + (mecA -)	Negative
GenomEra MRSA/SA Blood Culture Assay	MRSA +	-	-	1*
	SA + (mecA -)	-	57	-
	Negative	-	-	410

MRSA Sensitivity: N/A Specificity: 467/468 = 99.8%
 SA Sensitivity: 57/57 = 100% Specificity: 411/411 = 100%
 Unresolved rate** 2/470 = 0.43%
 PCR-inhibition rate 4/470 = 0.85%***

* False-positive result due to *Serratia marcescens* and **two borderline results due to *S. marcescens* and *Streptococcus pyogenes*. The extracellular DNA nucleases of *S. marcescens* and *S. pyogenes* are able cleave the oligonucleotide probes during PCR and cause interference in the assay.

*** Resolved by re-analysis

SITE 2 (bioMérieux BacT/ALERT), n =102		Routine methods		
Pre-selection performed using Gram stain		MRSA +	SA + (mecA -)	Negative
GenomEra MRSA/SA Blood Culture Assay	MRSA +	9	-	-
	SA + (mecA -)	-	42	-
	Negative	-	-	51

MRSA Sensitivity: 9/9 = 100% Specificity: 93/93 = 100%
 SA Sensitivity: 42/42 = 100% Specificity: 60/60 = 100%
 Unresolved rate 0%
 PCR-inhibition rate 0%

SITE 3 (bioMérieux BacT/ALERT), n = 84		Routine methods		
Pre-selection performed using Gram stain		MRSA +	SA + (mecA -)	Negative
GenomEra MRSA/SA Blood Culture Assay	MRSA +	2	-	-
	SA + (mecA -)	-	28	-
	Negative	-	-	54

MRSA Sensitivity: 2/2 = 100% Specificity: 82/82 = 100%
 SA Sensitivity: 28/28 = 100% Specificity: 56/56 = 100%
 Unresolved rate 0%
 PCR-inhibition rate 0%

TOTAL, n = 656		Routine methods		
		MRSA +	SA + (mecA -)	Negative
GenomEra MRSA/SA Blood Culture Assay	MRSA +	11	-	1
	SA + (mecA -)	-	127	-
	Negative	-	-	515

MRSA Sensitivity: 11/11 = 100% Specificity: 642/643 = 99.8%
 SA Sensitivity: 127/127 = 100% Specificity: 527/527 = 100%
 Unresolved rate 2/656 = 0.3%
 PCR-inhibition rate 4/656 = 0.6% (resolved by re-analysis)

TEKNOLOGIA YKSINKERTAISUUDEN TAKANA?

ABACUS Diagnostica

- KUIVAKEMIA – ei reagenssien käsittelyä/puhdastiloja
- NOPEUS – laitteen ja testilastun design
- HOMOGEENISUUS – koetinkemia, ei putkien avaamista
- AIKAEROTTEISET LEIMAT – ei taustafluoresenssia
- TULOKSENTULKINTA – ei monistuskäyräanalyysiä rutiiniin!
- SULJETUT ASTIAT – ei kontaminaatioita



GENOMERA™ TESTILASTUT



- Kuivakemia (kaikki PCR-reagenssit)
- Ei vaadi DNA-eristystä
- Turvallinen käsitellä ja hävittää
- Vähäinen jätemäärä
- Helppokäyttöinen litistetty "putki"

GENOMERA CDX™ LAITTEISTO



- Ajaa 4 näytettä 50 minuutissa
- Sinetöi testilastut pysyvästi umpeen
- Homogeeninen mittaus
- Selkeä automaattinen tuloksentulkinta

KUIIVAKEMIA

- **PCR-monistus ilman erillisiä puhdastiloja ja molekyylibiologian koulutusta**
 - nestemäisten reagenssien kanssa puljaaminen ei sovi kaikkialle
- **GenomEra-testeissä patentoitu 2-pisarainen kuivakemia**
 - entsyymi ja muut reagenssit eri pisaroissa
 - säilyvyys 11 kk (reaaliaikaiset kokeet)



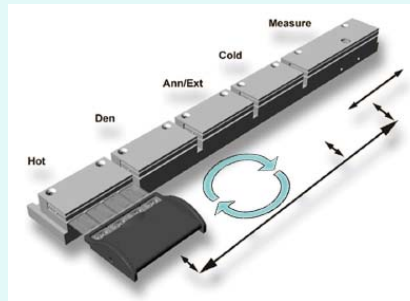
- > Ei lainkaan reagenssien käsittelyä
- > Ei myöskään nesteen siirtelyä lastun sisällä

NOPEUS

Hitaat peltier-perusteiset lämpösyklerit jäämässä tutkimuskäyttöön

Uudet designit reaktioastioissa ja laitteissa

- GenomEra-laitteessa
 - eri lämpöisiä blokkeja stabiileissa lämpötiloissa
 - ääriämpötilablokkeja (kuuma, kylmä)
 - lastut liikkuvat, ei lämpötila

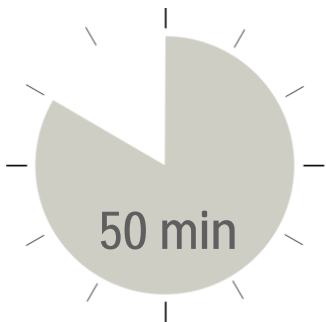


...vauhdikas
kuumennus- ja
jäähdytysprofiili

- Litteät reaktioastiat joissa alumiininen tausta
 - suuri pinta-alan ja tilavuuden suhde



... ja nopea
lämmönsiirto
metallia pitkin
reaktiokammioon



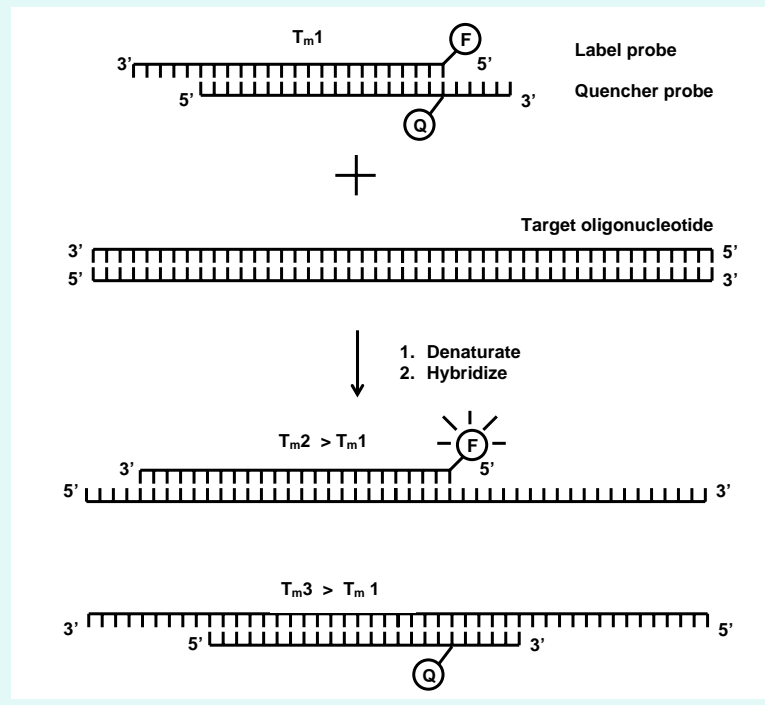
HOMOGEENINEN MITTAUS

Koettiin perustuva mittauskemia

- Reaktioastioita ei avata missään vaiheessa
- Mittaus samassa laitteessa kuin syklaus
- Mittaus suoraan reaktiokammioista ilman erotteluvaiheita

Tehostettu kilpaileva hybridisaatio

- Herkkä myös hyvin pienillä määrillä kohde-DNA:ta

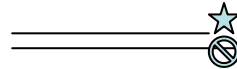


KILPAILEVA HYBRIDISAATIO (yleisesti)

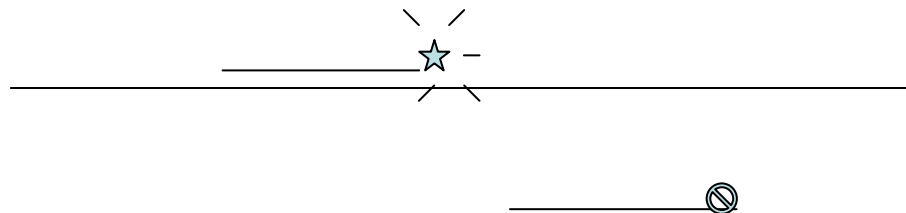
- Leimakoetin and vaimentajakoetin (komplementaariset sekvenssit)



- Jos kohde-DNA:ta ei ole läsnä, hybridisoituvat toistensa kanssa, jolloin leimakoettimen fluoresenssi vaimenee (vaimentaja absorboi sen tuottaman valon)



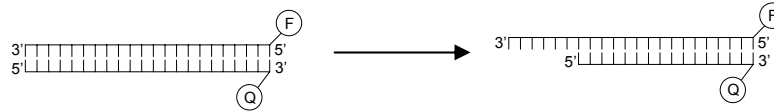
- Jos kohde-DNA:ta on läsnä**, se kilpailee hybridisoitumisesta koettimien kanssa -> pienempi osuus leimakoetinta vaimenee -> signaali kasvaa



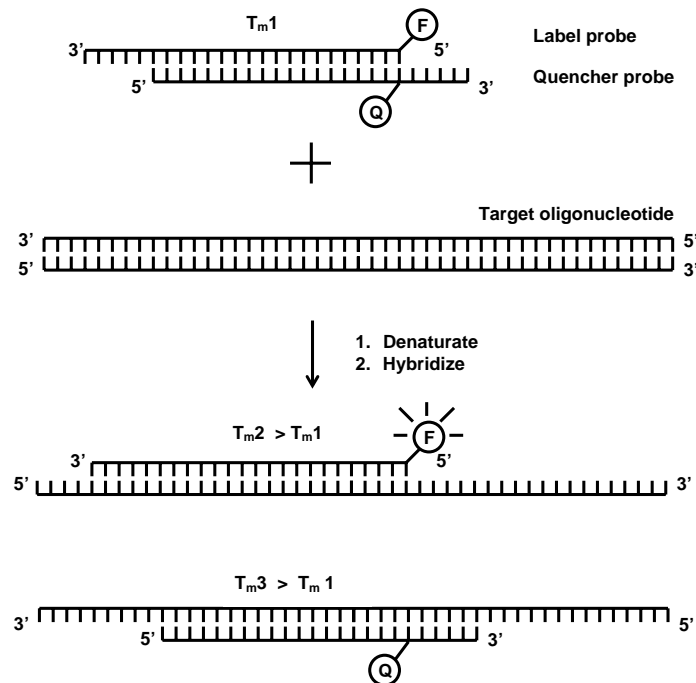
Mitä enemmän kohde-DNA:ta läsnä, sitä isompi osuus leimakoetinta sitoutuu siihen -> sitä enemmän fluoresenssia voidaan mitata

TEHOSTETTU KILPAILEVA HYBRIDISAATIO

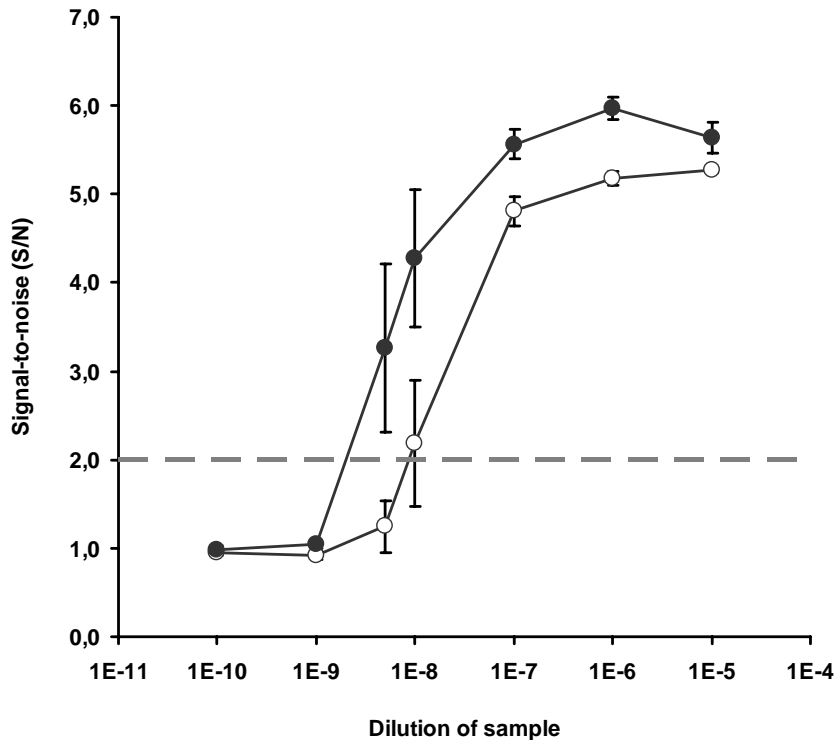
- Aiemmin jo huomattiin, että **pidentämällä** leimakoetinta vaimentajakoettimeen nähden saadaan isompi osuus leimakoetimesta kiinnittymään kohde-DNA:han (energiataloudellisesti suositumpi reaktio)



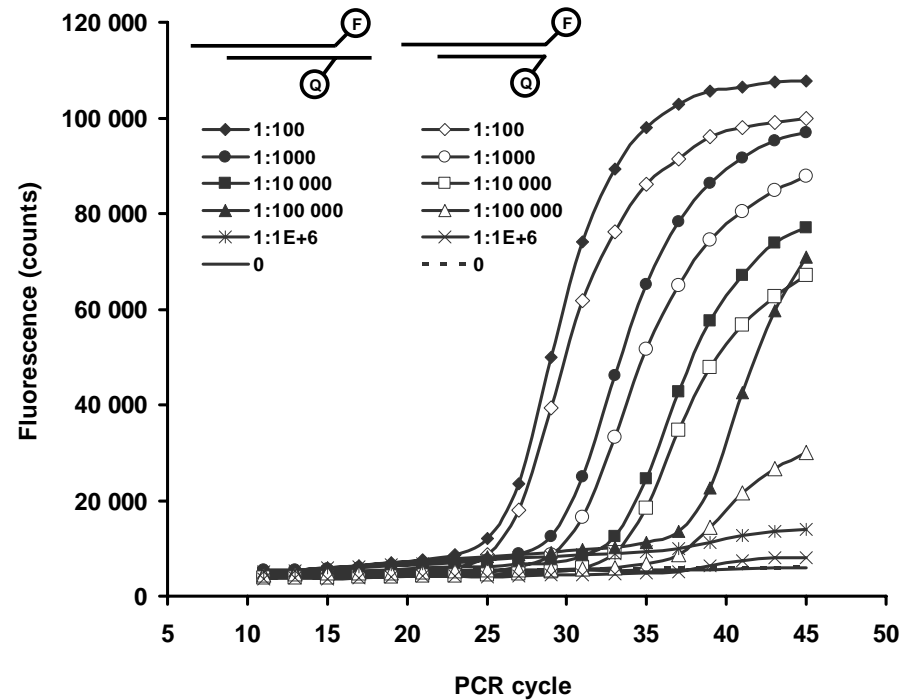
- GenomEra määrittelyksissä SEKÄ leima- ETTÄ vaimentajakoettiin on lisätty ylimääräisiä nukleotideja -> **molemmat** mieluummin kiinnittyvät kohde-DNA:han kuin toisiinsa



- Tämän menetelmän etu on se, että myös vaimentajakoetin voidaan “vetää pois” reaktiosta kilpailemasta leimakoettimesta! (Kohde-DNAssahan on kaksi nauhaa!)
- Näin ollen kohde-DNA voittaa AINA kilpailun leimakoettimesta jos sitä on läsnä vähäisiäkin määriä -> signaali lähtee nousuu normaalia nopeammin
- Huomattava vaikutus testin analyttiseen herkkyyteen:



SIGNAL-TO-NOISE –suhteen vertailu eri solumäärillä



Sama reaaliaikaisella mittauksella havainnollistettuna

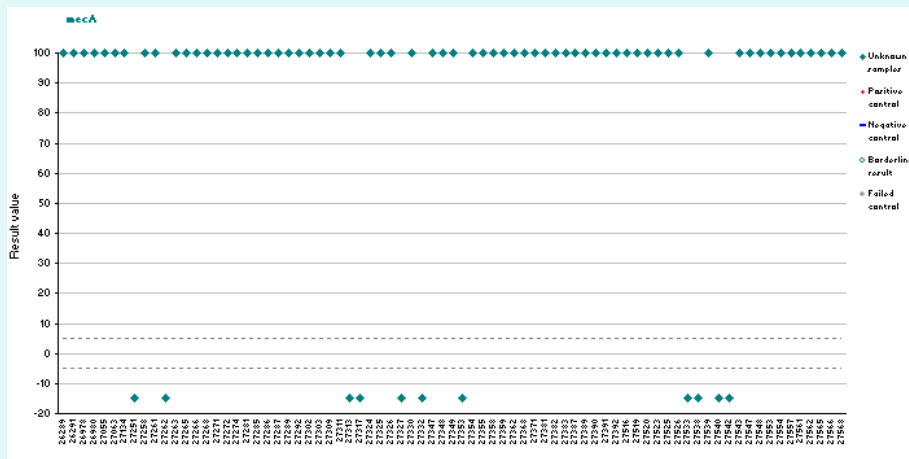
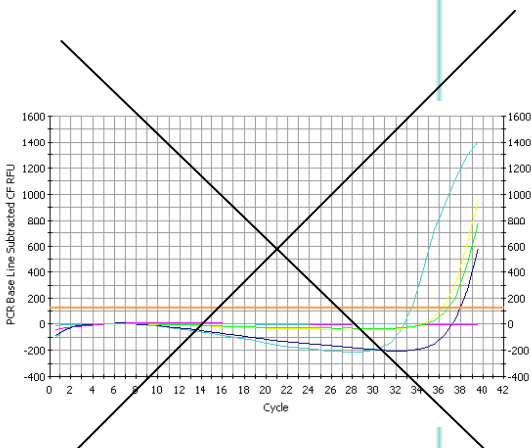
TULOSTEN TULKINTA

Tulosten tulkinnan täytyy soveltua rutiinikäyttöön

- Hyvä teknologia menee hukkaan jos tuloksesta ei ota selvää
- Monistuskäyrien tulkinta ei sovellu rutiiniin kaikkialla, vaatii kokemusta ja koulutusta
 - Etenkin viimeisten syklien nousut ja epätyypilliset käyrien muodot viheliäisiä tulkita
 - Softa-algoritmit eivät ole tässä sen viisaampia

Rutiinikäyttöön omat leimat ja mittaustavat, tutkimus- ja asiantuntijakäyttöön toiset

- Kvalitatiivinen tulkinta riittävä klinisen mikrobiologian analyyteille
- Monistuskäyräanalyysin voi jättää tutkimushankkeille ja molekyylibiologeille



MITÄ MONISTUSKÄYRÄANALYYSIN TILALLE?

- Modernit end-point mittaustavat mahdollistavat selkeän tulostulokinnan
 - Mittaus tehdään viimeisenä vaiheena monistusreaktion jälkeen
 - Tässä vaiheessa näytteen värinmuutokset, plasmaproteiinien sakkautuminen ja muut muutokset jo tapahtuneet
 - **Myös sameampi ja värikkäämpi näyte kelpaa!**
 - **Ei seurata näytteen ominaisuuksien (värin/sameuden) muutosta vaan PCR-monistuksen tehokkuutta**
- Sekä taustasignaali (N) että spesifinen signaali (S) mitataan silti samasta reaktiosta:

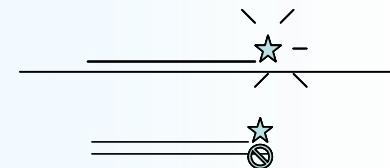
MITTAUSPERIAATE

1. Mitataan tausta (N) kun koettimet ovat kokonaan denaturoituneet (korkea lämpötila)

2. Hybridisoidaan (madaltamalla lämpötilaa)

3. Mitataan spesifinen signaali (S) (koettimet hybridisoituneet toisiinsa TAI kohteeseensa)

Huomaa että tässä (N) onkin saatavissa oleva maksimisignaali!



Kun verrataan spesifistä signaalia (S) kyseisestä reaktiosta mitattavissa olevaan maksimisignaaliin (N), saadaan yksinkertainen kaava: montako % koettimesta fluoresoi eli on sitoutunut kohteeseen!

→ ***AINA NÄYTEKOHTAINEN TULOS***
→ ***SAMA INFORMAATIO KUIN REAALIAIKAISESSA PCR:SSÄ mutta ilman näytteen tuomaa vaihtelua***

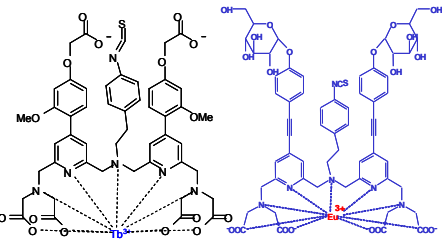
Helppo määrittää yleispätevät cut-off arvot jotka pätevät kaikkiin näytteisiin!

*Esim. $N = 120\ 000$ $S = 90\ 000$ $S/N = 75\%$
 $N = 60\ 000$ $S = 45\ 000$ $S/N = \text{samat } 75\%$*

Jos negatiivisissa näytteissä $S/N = 5\%$, cut-off voidaan laskea esim. keskiarvo + 3 STDEV

Yksinkertaisuus parantaa luotettavuutta!

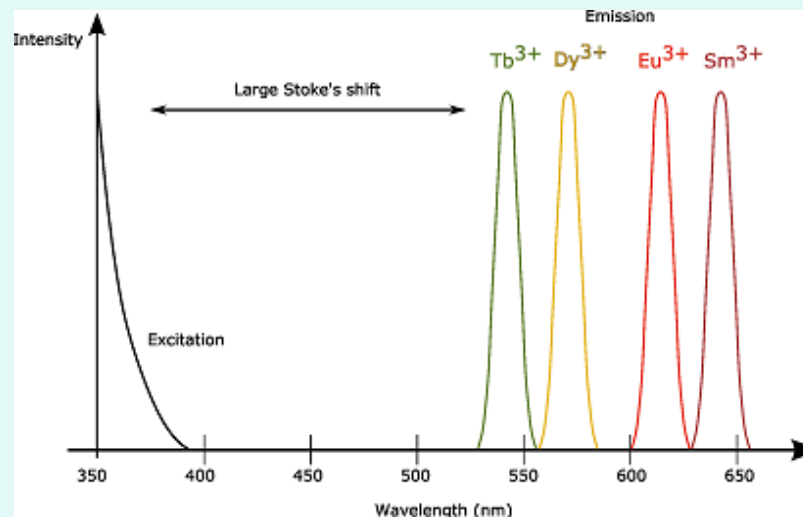
LEIMAKEMIA



Tavalliset fluoroforit häiriöherkkiä, sopivat parhaiten heterogeenisiin määrittäksiin (näytematriisit pestään pois)

Aikaerotteiset fluoroforit

- Tuttuja esim. DELFIA-kemiasta
- Suoraan fluoresoivat, stabiilit TRF-kelaatit kuin tehtyjä homogeeniseen PCR:ään
- Ei taustasignaalia, ei häiriötä näytteen proteiineista, hemoglobiinista tai väristä
- Erittäin herkkiä mitata myös tummista näytteistä
- Leimojen signaalit eivät sekaannu keskenään, mahdollista multipleksata
- Tuovat huomattavaa luotettavuutta mittaukseen



AIKAEROTTEINEN MITTAUS

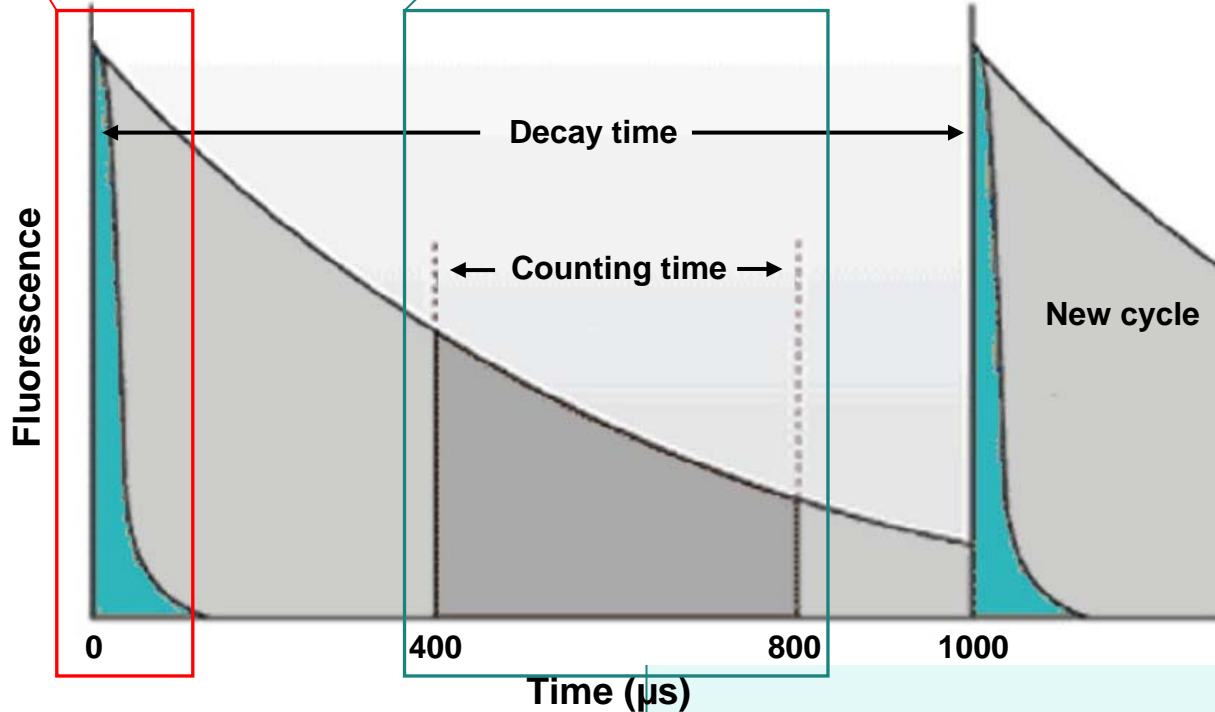
PROMPTILEIMAT

- Mitataan samalla veren, proteiinien, värien, reagenssien ja muovin fluoressensi!

AIKAEROTTEISET LEIMAT

- Odotellaan että taustafluoresenssi katoaa
- Ei tule mitattua näytettä eikä muuta taustafluoresenssia
- Värilliset näytteet ja biologiset komponentit ok!
- Yksi tärkeä syy miksei puhdistusvaiheita tarvita

Excitation pulse



Mitä seuraavaksi?

- Teknologia valmiina monistettavaksi, mutta mitkä ovat oikeat kysymykset joihin vastata?
- Gram-värin jälkeiset kysymykset voivat olla jo hyvinkin tarkkoja, kun indikaatio mahdollisesta mikrobista jo on
 - broad-range analytiikka ei kustannustehokasta enää tässä vaiheessa
 - alussa valtava määrä mikrobivaihtoehtoja
 - vaativat kokoelman reagensseja, mm. kalliita leimakoettimia
 - morfologialtaan samankaltaisten bakteerien erottelu
 - resistenssin määrittäminen
- Polttavimmat, diagnoosia hidastavat kysymykset tämän hetkisessä veriviljelyanalytikassa?
 - kommentit ja ehdotukset erittäin lämpimästi tervetulleita
piia.vonlode@abacusdiagnostica.com
- Kiinnostusta kokeilla BC testiä?
antti.valanne@triolab.fi



Vaihtoehtoja muun muassa

S.aureus + mecA (existing)

S. epidermidis/S. haemolyticus

Listeria monocytogenes

Salmonella spp.

E. coli

E. coli + CTX-M

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas spp/Enterobacter spp.

Pseudomonas spp/Acinetobacter spp.

Enterococcus spp

Enterococcus spp/Streptococcus spp.

E. faecalis/E. faecium

Streptococcus pneumoniae

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella spp

CTX-M

CTX-M + SHV

Klebsiella spp + CTX-M

KPC

VRE

C. albicans/C. tropicalis

C. crusei/C. glabrata

C. albicans/C. crusei

C. albicans/C. glabrata



ABACUS Diagnostica

Piia von Lode
piia.vonlode@abacusdiagnostica.com



Antti Valanne
antti.valanne@triolab.fi

