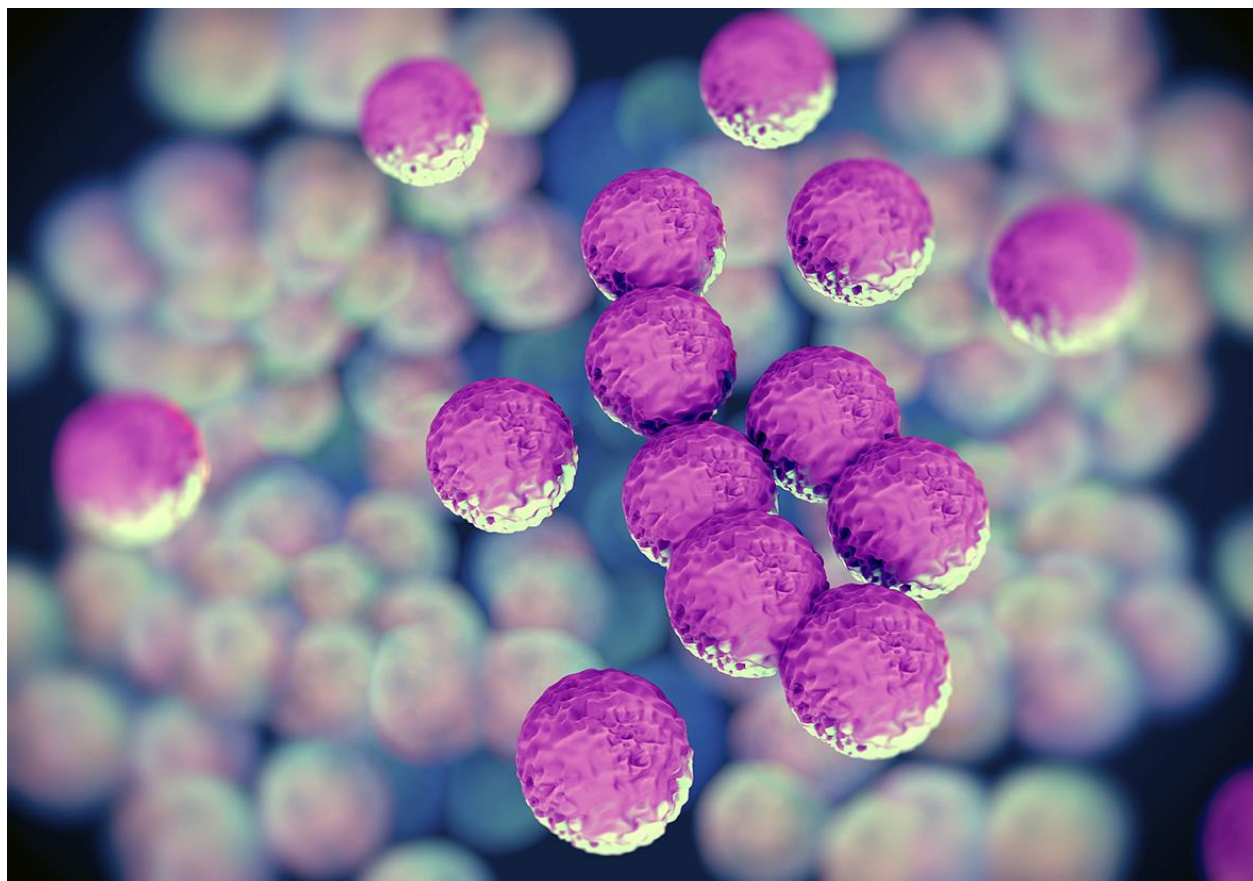


Kampen mod multiresistente bakterier

Screeningssystemer til detektion af MRSA



Indhold

Resume	3
Baggrund	4
Prøveforberedelse.....	6
PCR procedure i praksis	8
Kortlægning af smitteveje.....	9



Yderligere eksemplarer af rapporten kan rekvireres
hos DELTA på mail delta@delta.dk

Resume

Screeningssystemer til detektion af MRSA



Bakterielle infektioner fra antibiotika resistente bakterier udgør i dag en kraftigt stigende trussel mod folkesundheden. En medvirkende årsag til dette, er udfordringen i at stille en tidlig og præcis diagnose, og de deraf følgende lange sygdoms og behandlingsforløb. Den oftest forekommende resistente bakterie i Danmark er methicillin resistente stafylokokker, der populært også går under navnet MRSA.

I dette TEK'notat vil vi introducere en teknologi, der kan udgøre en vigtig del af dette forsvarsværk. I DELTA har vi udviklet et screeningssystem til at screene personer for tilstedeværelsen af MRSA.

Screeningssystemet er baseret på prøve-tagning med en standard næse pødepind, som allerede benyttes på nuværende tidspunkt. I stedet for at sende prøven til dyrkning i laboratoriet og vente længe på svar, har vi

udviklet et prøveforberedelses system, hvor bakterierne bliver fanget og opkoncentreret i en biochip og efterfølgende analyseret med molekylær diagnostik. Det er muligt at få et svar indenfor 30-40 minutter.

Screeningssystemet, hvis det benyttes ved alle indlæggelser på hospitalerne, kan være med til at begrænse den nuværende spredning af MRSA, i håb om at undgå en situation som i USA hvor flere stater har givet op over for denne bakterie (CDC).

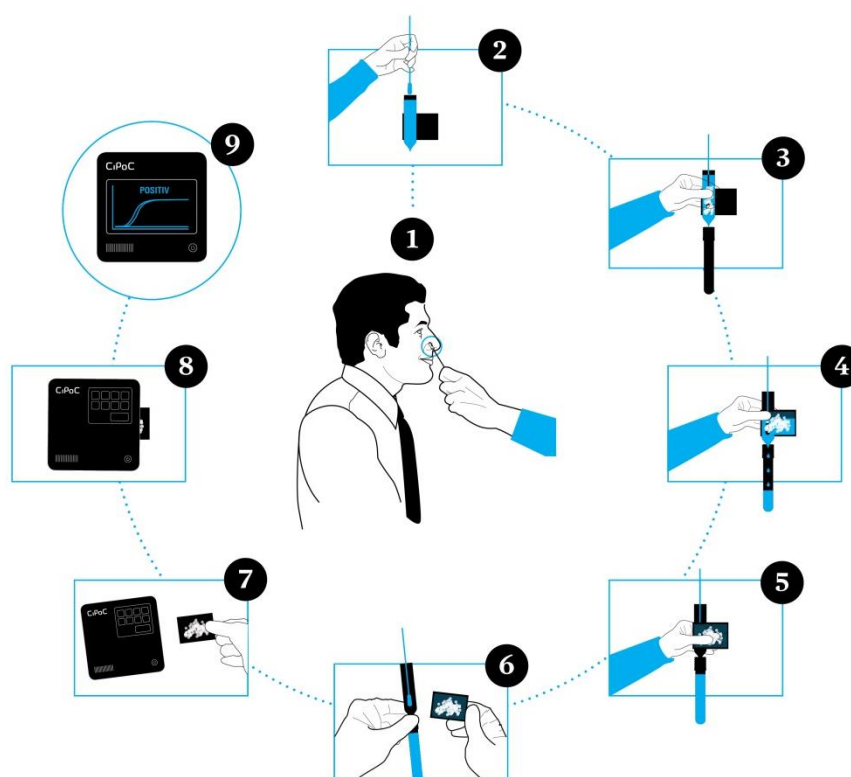


Julia skov,
Afdelingschef, Point of Care
DELTA

Baggrund

Bakterielle infektioner fra antibiotika resistente bakterier udgør i dag en kraftigt stigende trussel mod folkesundheden. En medvirkende årsag til dette er udfordringen i at stille en tidlig og præcis diagnose og de deraf følgende lange sygdoms- og behandlingsforløb. Den oftest forekommende resistente bakterie i Danmark er methicillin resistente stafylokokker, som populært også går under navnet MRSA (kort for det engelske navn: *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus*). Stafylokok infektioner er skyld i ca. 350 dødsfald årligt i Danmark alene (kilde: Sundhedsstyrelsen). Infektioner med MRSA kan behandles, men da disse bakterier er resistente over for de mest almindelige antibiotika, kræver behandling en fokuseret indsats med specielle antibiotika. En tidlig diagnose af tilstedeværelsen af de resistente bakterier er helt central i denne behandling.

Figur 1
Illustration af en MRSA screeningsprocedure i forbindelse med indlæggelse på hospitaler. I første skridt podes patienten i næsen med en vatpind (1), hvis formål er at fange eventuelle MRSA bakterier. Denne vatpind indsættes i prøveforberedelselementet (2) som igen indsættes i en vacutainer (3). Prøven indeholdende bakterierne vil blive skyllet igennem chippen og alle bakterier i prøven vil blive tilbageholdt (4-5). Efter denne procedure bliver detektionschipsen indsat i det diagnostiske system (6-7) som analyserer for tilstedeværelse af resistente bakterier (8-9).



For omkring halvdelen befolkningen er stafylokokker en naturlig del af bakteriefloraen på huden eller i næsegangen. Så længe disse bakterier befinder sig uden på kroppen, udgør de ikke nogen særlig fare for bærerne, selv i de tilfælde hvor der er resistente stafylokokker iblandt denne flora. Udfordringen med disse bakterier sker i forbindelse med indlæggelse på hospitaler og ikke kun for den enkelte bærer. MRSA infektioner opstår typisk i forbindelse med åbne sår, når de resistente bakterier fra den naturlige hudflora får mulighed for at inficere blodbanerne hos patienter, som muligvis allerede har et svækket immunforsvar. Dette kan gælde bæreren selv, såvel som dennes medpatienter.

Et helt centralt forsvarsværk i kampen mod de multiresistente bakterier er derfor at mindske disse bakteriers adgang til åbne sår. I dette TEK'notat vil vi introducere en teknologi, som kan udgøre en vigtig del af dette forsvarsværk. I DELTA har vi udviklet et screeningssystem til at screene personer for tilstedeværelsen af MRSA. Brugen af apparatet er illustreret på figur 1. Screeningssystemet, hvis det benyttes ved alle indlæggelser på hospitalerne, kan være med til at begrænse den nuværende

spredning af MRSA, i håb om at undgå en situation som i USA, hvor flere stater simpelthen har givet op over for denne bakterie (CDC).

Screening af MRSA i dag

Personer mistænkt for at være inficeret med MRSA, testes i dag ved hjælp af en såkaldt opformering af de tilstedeværende bakterier samt en detektion af en eventuel resistens i disse kolonier. Denne test foregår typisk i et centrallaboratorium og kan tage op til et par dage. Der er udviklet nogle få Point of Care systemer baseret på DNA tests, som er i stand til at screene for MRSA på stedet. Disse systemer er dog meget dyre pr. test, og svartid kan tage op til 4 timer.

Hvis vi ønsker at bekæmpe spredningen af disse bakterier på vores hospitaler, er det nødvendigt at udvikle et system, som er i stand til at udføre hurtig screening for tilstedeværelsen af MRSA til en sammenlignelig pris med nuværende tests. Et sådant system vil muliggøre, at samtlige patienter, som indlægges eller opereres, kan screenes for tilstedeværelsen af MRSA, inden infektionen får mulighed for at brede sig internt på hospitalet. Screeningssystemet, udviklet på DELTA, er et Point of Care system baseret på en DNA testprocedure kendt under navnet polymerase chain reaction.

Polymerase chain reaction – kort fortalt

Polymerase chain reaction (PCR) er basalt set en kopimaskine af det target, som man leder efter. Et eller flere specifikke DNA sekvenser opformeres igennem en kopieringsproces. Et DNA molekyle består af to komplementære enkeltstrengede sekvenser, som binder til hinanden via hydrogen bindinger (figur 2a). For at udvælge hvilke specifikke sekvenser, som skal kopieres, benyttes såkaldte primers, som er korte stykker enkeltstrengede DNA fragmenter, som er komplementære til target DNA molekylet.

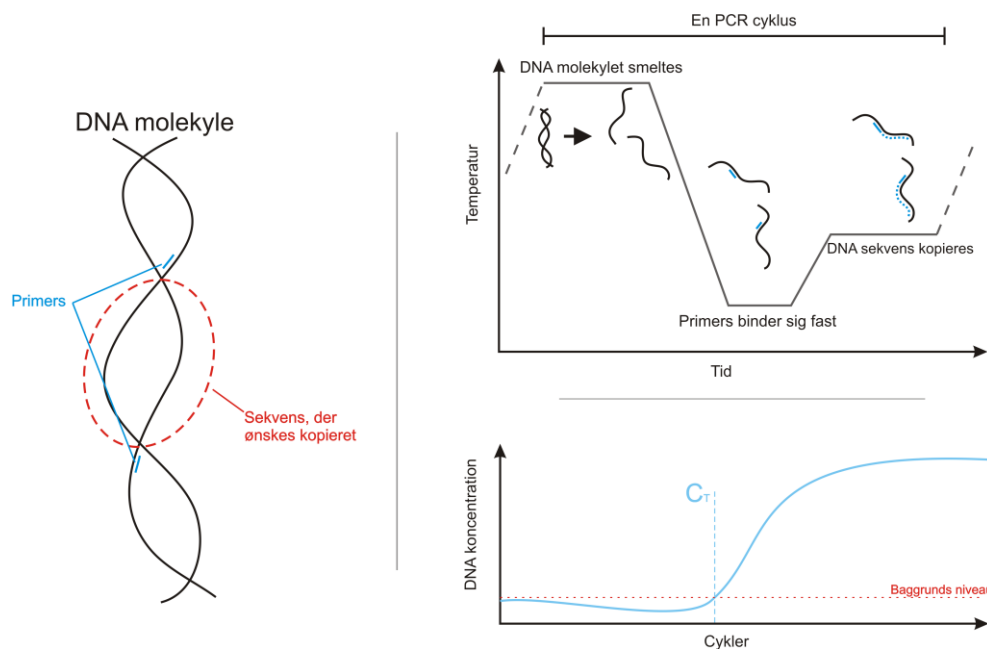
Der findes flere forskellige metoder ved hvilken en DNA sekvens kan kopieres, såsom isotherm PCR, hvor der benyttes en konstant temperatur; cykliske PCR procedurer, hvor temperaturen af prøven skiftes mellem tre niveauer i en cyklisk proces samt revers transcriptase PCR processer, som er designet til at kopiere viralt DNA. I dette TEK'notat fokuseres udelukkende på cykliske PCR processer.

Cykliske PCR procedurer

I en cyklisk PCR procedure benyttes tre forskellige temperaturer, som hver aktiverer forskellige trin i DNA kopieringen. I figur 2b er processerne, som foregår i en sådan temperaturcyklus, illustreret. De to strenger af et DNA molekyle bliver først separeret ved en høj temperatur, dette refereres ofte til, at DNA molekylet denaturerer og sker typisk ved 90–95 °C. Derefter sænkes temperaturen til omkring 50–60 °C, hvor de såkaldte primere sætter sig på de modsvarende segmenter på target DNA. Måden hvorpå disse primers udvælges vil blive beskrevet senere. Når temperaturen i sidste skridt øges til 72 °C starter enzymer i opløsningen med at indsætte enkelte nukleotider, matchende de specifikke gensekvenser, indtil hele sekvensen er kopieret. Ved gentagelse af denne procedure vil koncentrationen af den specifikke gensekvens i teorien blive fordoblet gennem hver cyklus. På den måde kan selv små koncentrationer af DNA formeres op til at kunne detekteres gennem en PCR proces.

Figur 2

Illustration af elementerne i en typisk PCR proces. Venstre) ses et dobbeltstrengt DNA molekyle, hvor primernes position i forhold til den region, som ønskes kopieret er vist. Højre øverst) er trinene involveret i en typisk PCR cyklus illustreret. Først smeltes DNA molekylet, hvilket separerer de to strenge i det dobbeltstrengede DNA molekyle. Derefter sænkes temperaturen, hvilket gør det muligt for primere at binde til de rigtige områder af DNA molekylet. Sidste trin i en sådan cyklus er selve kopieringen, som foregår ved hjælp af specifikke enzymer, som kaldes polymeraser. Ved mange gentagelser af en sådan cyklus vil koncentrationen af den specifikke DNA sekvens mangedobles over tid. Ved at måle mængden af dobbeltstrengt DNA efter kopieringsfasen i hver cyklus, er det muligt at følge denne forøgelse af koncentrationen, også kaldet real time PCR. Højre nederst) ses et typisk resultat fra real time PCR. Den cyklus, hvor signalet fra det dobbeltstrengede DNA overstiger baggrundssignalet, kaldes for C_T værdien.



Prøveforberedelse

Indledende overvejelser

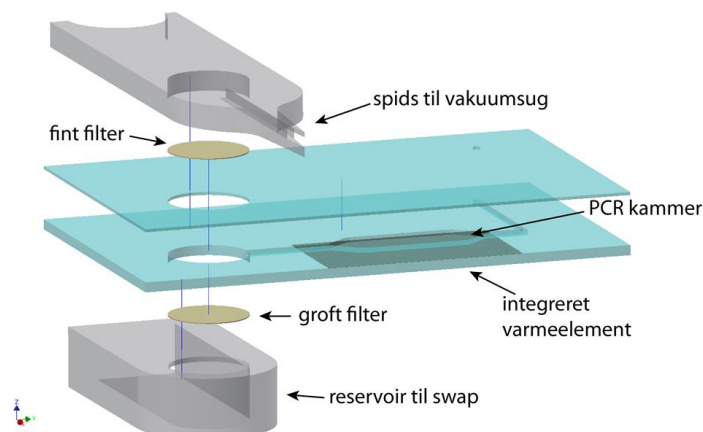
Første element i en screeningsproces er at overføre eventuelle bakterier fra en podningspind til et prøvekommer. Termen prøveforberedelse dækker netop over denne øvelse; at overføre relevante bakterier fra podningspinden til prøvekommer, hvor den eventuelle tilstedeværelse af resistensgenet kan verificeres. Denne helt centrale udfordring i screeningsprocessen vil blive adresseret i dette kapitel.

Da systemet er designet til at screene patienter og borgere umiddelbart inden en operation eller indlæggelse på et hospital, er tidsfaktoren selvfølgelig en kritisk parameter. Systemet skal håndtere humane prøver fra hvilke, der er en reel smitterisiko, derfor er håndteringen af prøven (inklusive opbevaring og bortskaffelse af eventuelle restprodukter) et andet helt centralt fokusområde.

Tilstedeværelsen af det resistente gen vil, som tidligere nævnt, blive verificeret ved hjælp af en PCR proces, hvor specifikke DNA sekvenser duplikeres mange gange. Produktet af denne proces detekteres enten optisk eller elektrisk. En PCR proces er en meget selektiv screeningsmetode, og derved er selektiviteten af prøveforberedelsen af mindre betydning sammenlignet med tidsforbrug samt foranstaltninger for at undgå smittespredning fra eventuelle positive prøver.

Figur 3

Illustration af den udviklede prøveforberedelsesplatform. Denne prøveforberedelsesplatform har vist sig i stand til at fange samtlige bakterier i prøverne. Ingen bakterier er fundet i restprøven indeholdt i vacutaineren igennem samtlige forsøg.



Prøveforberedelsessystem

Overførslen af bakterier fra næsegangen til en podningspind og derfra til et transportmedie (med en volumen på omkring 1 ml.) i hvilken bakterierne kan overleve i kortere tidsrum (1-2 dage) er en veldokumenteret procedure, som i dag benyttes i forbindelse med traditionel screening for MRSA og kan foretages inden for et minut. I det udviklede screeningssystem udnyttes denne velafprøvede metode, hvorved den resterende del af prøveforberedelsen reduceres til en øvelse i at fange eventuelle bakterier fra prøven og overføre disse til en væske, i hvilken detektion af resistensgenet kan realiseres.

Platformdesign

I figur 3 er en illustration af den udviklede prøveforberedelsesplatform vist. Platformen er designet med henblik på, at alle biologiske prøver holdes inde i PCR kammeret i chippen, og overskydende væske fra prøven fanges i et lukket system, hvorved risikoen for smittespredning minimeres. Første trin i prøveforberedelsen er, som beskrevet ovenfor, at få overført bakterierne fanget på podningspinden til en væske. Denne overførsel sker ved, at podningspinden indsættes i det på figur 3 markerede reservoir og roteres nogle få gange. I denne proces frigives bakterierne fra pinden og resuspenderes i væsken. Kraften, som skal flytte denne væske gennem indfangningssystemet i forbindelse med prøvekammeret, opnås ved hjælp af undertryk fra en såkaldt Vacutainer®. Vacutainers er små rør med et veldefineret undertryk, som kan suge en prædefineret volumen (mellem 3 og 20 ml.) når en gummimembran punkteres. De benyttes oftest ved blodprøver på hospitalerne.

Reservoiret, som efter indsættelse af podningspinden, indeholder bakterierne fra næsegangen er forbundet via mikrofluide kanaler gennem chippen til den spidse del af platformen. Når gummidelen af en vacutainer gennemtrænges af den spidse prøveforberedelsesplatform, vil undertrykket suge væsken indeholdende bakterierne gennem chippen og ind i røret, hvor det vil være forsejlet fra omgivelserne. Denne forsejling sikrer, at en eventuel smittefare fra patientprøven ikke spredes yderligere. To filtre, på hver sin side af PCR chippen, tilbageholder de relevante bakterier i systemet, hvor den endelige detektion af DNA fragmenterne foregår. Samtidig reduceres mængden af uønskede komponenter, som kan inhibere (forhindre) PCR processen. Ved at ændre på filterenes porestørrelser kan man i større eller mindre grad styre hvilke komponenter, som tilbageholdes i prøvekammeret. Formålet med det første filter er at holde større elementer tilbage men tillade, at bakterier har fri adgang. Til dette formål bør filtre med en porestørrelse større end den gennemsnitlige MRSA diameter på omkring 1 μm vælges. Det andet filter tilbageholder eventuelle bakterier inde i chippen, men lader mindre elementer og den overskydende væske passere frit ud i vacutaineren. Her benyttes typisk et filter med en porestørrelse på 0.45 μm .

Hele processen - fra pødepinden indsættes i reservoiret til bakterierne er fanget i chippen og klar til start af PCR processen - kan foretages på under 1 minut. Dette betyder, at de indledende øvelser i screeningsproceduren (indtil chippen indsættes i analyseinstrumentet) fra patienten kommer ind på hospitalet, kan realiseres på under 2 minutter.

PCR procedure i praksis

Design af et PCR kammer

En PCR proces er en følsom procedure, og der skal ved design af PCR kammeret tages flere parametre i betragtning. Mange materialer kan inhibere PCR processen, så materialevalget er et af de primære fokusområder.

En PCR proces er en termoaktiveret kemisk proces, dvs. den kræver skift mellem bestemte temperaturniveauer som illustreret i figur 2. Deraf følger, at en vigtig optimeringsfaktor er varme- og køletider. At tilføre varme er oftest ikke et problem, da det er en aktiv proces hvor man, populært sagt, kan tilføre så meget energi, som systemet kan holde til. Der hvor man skal optimere geometrien er ved kølingen. Hvor hurtigt systemet kan køles, afhænger af forholdet mellem volumen og overflade. Med andre ord; jo tyndere system desto kortere vej skal varmen ledes væk.

Men da man oftest (og også i dette tilfælde) udlæser produktet af processen optisk, skal man stadig sikre sig, at kammeret er dybt nok til at give tilstrækkelig signal fra prøven, når denne udlæses. Den endelige dybde af kammeret er en afvejning af disse to modsatrettede interesser. Resultaterne vist i dette TEK'notat er realiseret i et 350 μm dybt kammer.

For at minimere den termiske masse yderligere, kan varmeelementet inkluderes i chippen, hvilket typisk omtales som integreret varmeelement. Det simpleste varmeelement består af et ledende materiale over hvilket der påtrykkes en spænding, som driver en strøm gennem lederbanerne, hvorved der afsættes energi i chippen i form af varme. Ved at måle modstandsændringen gennem lederbanerne, kan temperaturen af varmeelementet bestemmes, hvilket kan relateres til temperaturen af væsken i prøvekompartimentet. Temperaturen i kammeret vil være 'forsinket' i forhold til den målte temperatur af varmeelementet. Yderligere optimering kan opnås ved at lade disse 'skyde over målet' (overshoot) og derved forcere kammeret hurtigere op til arbejdstemperatur. En måde at beregne det korrekte overshoot på er ved at have en simpel termisk model af systemet integreret i temperaturreguleringen.

Når reaktionsvolumen spredes i et tyndt lag over en overflade, skal man også tage højde for den rumlige temperaturfordeling: Kanten af varmeelementerne vil have en lavere temperatur end midten. Et fejldesignet system vil have en temperaturgradient, som måske gør systemet ubrugeligt, eller i værste fald gør, at det opfører sig som om det 'virker', men hvor temperaturgradienten afstedkommer uspecifikke PCR produkter, hvilket kan resultere i falske positive/negative prøver. Der er flere måder at afhjælpe det problem: En simpel løsning er at bruge geometri og designe varmeelementet markant større end kammeret. En mere optimeret version kan bruge et mindre varmeelement, som er gennemtænkt således, at der afsættes relativt mere energi langs kanten end i midten. Derudover kan man benytte materialer med god varmeledningsevne til at fordele varmen. At kombinere løsningerne er ideelt, da specielt den sidste vil være begrænset af brugbare materialer. I alle tilfælde skal man afveje det mod, at større termisk masse vil gøre systemet trægt og energikrævende. Det sidste er specielt en udfordring, hvis enheden som designes imod, skal være batteridrevet.

På samme måde som en blæser i en computer bidrager med aktiv køling af processoren, kan man også inkludere aktiv køling i form af blæsere i udstyr til PCR målinger. I figur 4 til venstre kan man se forskellen i cyklingsperiode med og uden aktiv køling. I dette tilfælde sparer blæseren brugeren for 20s pr. cykle, hvilket næsten er en halvering af tiden, som hver cyklus kræver. En PCR procedure består typisk af 40 cykler, hvilket betyder at aktiv køling hurtigt giver en besparelse på over 10 minutter pr. test.

Valg af PCR Primers

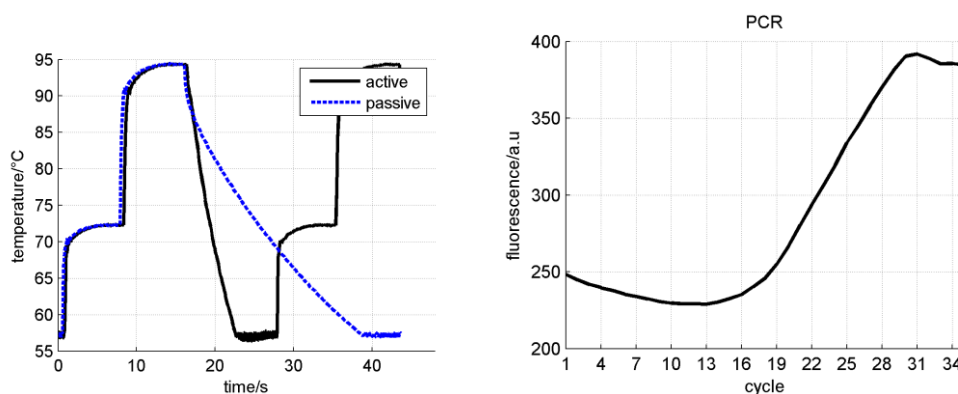
Et af de vigtigste parametre i udviklingen af et PCR screeningssystem er udvælgelsen af de rigtige primers, da disse bestemmer, hvilket gen som opformeres i PCR processen. I bakterielt DNA, såvel som i humant DNA, er der regioner i hvilke der ikke sker en særlig stor ændring mellem de forskellige individer, og der er regioner, som er meget variable. For at ramme så mange grene af de resistente bakterier som muligt, gælder det selvfølgelig om at fokusere på de områder af genet, som ikke muterer over tid. I udviklingen af dette specifikke udstyr, er udvælgelsen af primerne og derved også den DNA sekvens der testes for, foretaget i et samarbejde med Statens Serum Institut. De valgte primers sikrer, at der blandt andet testes for resistensgenet *mecA*. (Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. A. Petersen *et al.* Clin Microbiol Infect 2013; 19: E16–E22).

Screening for MRSA

Ved hjælp af det oven for beskrevne PCR kammer, er det muligt at køre en PCR proces uden brug af eksterne varmelegemer, da chippens integrerede varmeelementer er i stand til at levere en tilstrækkelig effekt til hurtigt at varme kammeret op til de givne temperaturer. Ved at eliminere brugen af eksterne varmeelementer er det muligt at holde den termiske masse på et minimum, hvilket er vigtigt, særligt i forbindelse med afkølingsprocessen. Specificiteten i proceduren kommer fra et velovervejet valg af primers som beskrevet herover. Figur 4 viser en test for påvisning af resistensgenet fra MRSA celler ved anvendelse af prøveforberedelsesplatformen og PCR chippen. Chippen er analyseret i det udviklede instrument til real time PCR med optisk detektion (her med en C_T værdi på 19).

Figur 4

Målinger fra PCR chippen med integrerede varmeelementer. I plottet til venstre ses effekten af aktiv køling af PCR chippen. Ved at benytte aktiv luftkøling spares 20 sekunder pr. cyklus, hvilket svarer omtrent til en halvering af tidsforbruget. Til højre ses fluorescenssignalet fra en PCR procedure foretaget i PCR kammeret ved brug af primers og prøveforberedelses-systemet fra en MRSA screening med påvisning af *mecA* genet. I dette tilfælde med en C_T værdi på 19, hvilket betyder at signalet overstiger baggrunds niveauet efter 19 cyklusser.



Kortlægning af smitteveje

Dette TEK'notat har været fokuseret på screening af MRSA infektioner hos mennesker i forbindelse med indlæggelse på hospitaler. En sådan screeningsprocedure vil selvfølgelig hjælpe med at minimere spredningen af de multiresistente bakterier mellem mennesker. Problemet med multiresistente bakterier vil dog aldrig blive løst fuldstændigt, hvis smittevejene for disse bakterier ikke kortlægges. I de seneste år har mistanken rettet sig mod svinebesætninger som en potentiel

smittekilde. Det vil dog være en meget omfattende opgave (grænsende til det uladsiggørlige) at pode samtlige svin i Danmark for at kortlægge en eventuel smittekilde. For at denne opgave kan udføres på et tilfredsstillende niveau, er det derfor en nødvendighed at udvikle en metode, som muliggør en hurtig screening af hele eller eventuelt større dele af besætningen på én gang. På DELTA er der udviklet et unikt luftprøvetagningsystem (AeroCollect®). Dette er et håndholdt system, som kan ses i figur 5. Ved hjælp af elektrostatiske kræfter fanges alle partikler, som suges gennem chippen. De elektrostatiske kræfter opnås ved at påtrykke et højspændingsfelt mellem to elektroder i prøvetagningschippen. Fremadrettet er det vores vision at bidrage i kampen mod de multiresistente bakterier ved de mulige kilder på en måde, som både tager hensyn og bidrager til det meget anderkendte stærke danske landbrug i tæt samarbejde med interesseorganisationer og producenter, så vi sammen kan beskytte dansk landbrug fra de udefrakommende trusler, som kan opstå som en konsekvens af den øgede globale handel. Det er vores mål at bekæmpe de trusler, som allerede er i landet og måske endnu vigtigere bidrage til indsatsen for ikke at importere sygdomme og infektioner, som i dag ikke findes i landet.

Figur 5
AeroCollect® systemet til indfangning af mulige patogener fra luften i veterinære miljøer. Til venstre ses selve systemet, som er et håndholdt udstyr, som ved hjælp af elektrostatiske kræfter fanger luftbårne/støvbårne patogener i chippen, som ses i toppen af udstyret. Til højre ses en illustration af brugen af AeroCollect® i brug i en hønsefarm.



Om TEK'notat

DELTA udgiver regelmæssigt rapporter i TEK'notat-serien for at kommunikere den nyeste internationale viden inden for vores fagområder. Formålet er at understøtte en fremrykning af tidspunktet, hvor nye teknologiske landvindinger giver et forretningsmæssigt afkast til danske virksomheder.

Om DELTA

DELTA hjælper sine kunder med effektiv anvendelse af avancerede teknologier, som skal opnå kommerciel succes i en kompleks verden. Vi varetager design, udvikling, test, certificering og rådgivning inden for elektronik, mikroelektronik, softwareteknologi, lys, optik, akustik, vibration og sensorsystemer.

DELTA er ét af Europas førende udviklingshuse samt ét af de ni Godkendte Teknologiske Serviceinstitutter (GTS) i Danmark. Vores 270 medarbejdere i Danmark, Sverige og Storbritannien samarbejder med kunder i over 50 lande.