

Kommersiella molekyläriä metoder för MRSA-Screening

NordicAST WS 3.5.2016

Kaisu Rantakokko-Jalava

Åbo Universitetssjukhus, Finland



TYKS | MIKROBIOLOGIA
JA GENETIIKKA



Från Finlands nya rekommendation

Bacterium	Detection of colonization			
	Enrichment culture followed by culture on a chromogenic medium (16h-24h)	Direct culture on a chromogenic medium (16h-24h incubation)	Direct culture on a chromogenic medium (42h-48h incubation)	Direct PCR
CPE	no	yes	no	when rapid result is required***
ESBL	no	yes	no	no*
MRSA	yes	no	yes**	when rapid result is required***
VRE	yes	no	no	no*
MDR-Pseud	no	yes****	no	no
MDR-Aci	no	yes****	no	no

* Information on the performance and correct use of direct molecular methods is insufficient

** Specificity impaired, thus ID is always needed after a prolonged incubation.

*** Culture required, final decision on colonization is based on culture only

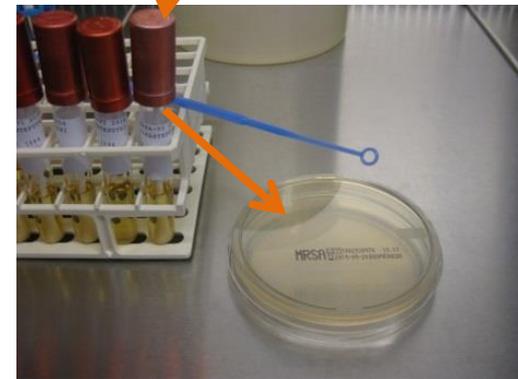
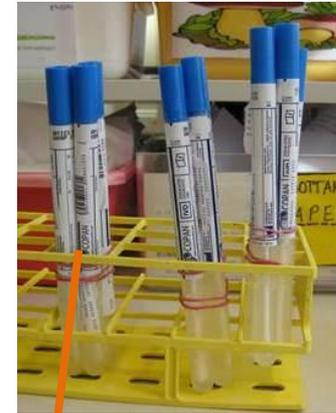
**** culture may be done on a chromogenic agar, but there is no specific color reaction.

Frågor till val av direkt MRSA-PCR

- Finns det någon patientgrupp, vars vård skulle influeras av snabb utslutning/bekräftelse av MRSA-bärarskap?
 - Sjukhushygieniska åtgärder/placering, ab-terapi eller profylax?
- Finns det någon test, som i praktiken uppfyller kraven?
 - Mängden av prov, tiden till resultat, tillgång
- Omfattar testet alla MRSA stammar som finns i området och kan den pålitligt utsluta bärarskap?

MRSA-screeningprov på ÅUCS (2009-)

- näsa
 - svalg
 - perineum
 - armhålor och ljumskar
- } poolas
- sår, hudlesioner, urinkateter, trakeakanylens rot
 - 2 gånger med ≥ 1 dygns intervall



MRSA-PCR från koloni



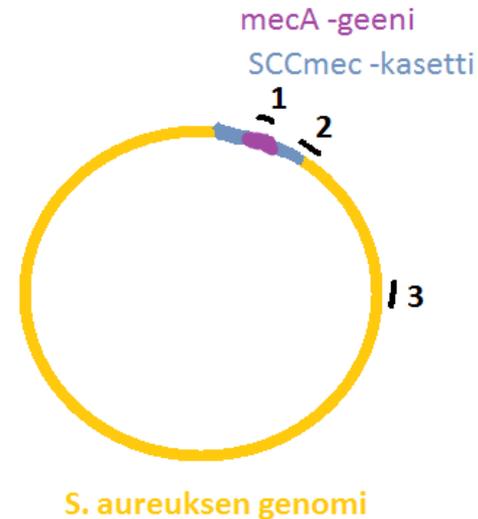
- Koloni på chromagar är MRSA om man kan visa att den bär
 - mecA/mecC och
 - S. aureus-specifik gen
- Och att det inte finns färglös KNS under..

Problem med "direkt" MRSA-PCR

- Hur skilja på
 1. Det finns MRSA i provet (näsa, sår...)
 2. Det finns MSSA **och** koagulasnegativ stafylokock med mec-gen

Problem med "direkt" MRSA-PCR

- Hur att skilja på
 1. Det finns MRSA i provet (näsa, sår...)
 2. Det finns MSSA och koagulasnegativ stafylokock med mec-gen



JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 2004, p. 5578-5581
0095-1137/04/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.42.12.5578-5581.2004
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 42, No. 12

Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Nasal Swab Specimens by a Real-Time PCR Assay

David K. Warren,^{1*} Robert S. Liao,² Liana R. Merz,¹ Michael Eveland,³ and W. Michael Dunne, Jr.²

Division of Infectious Diseases, Department of Medicine,¹ and Division of Laboratory Medicine, Department of Pathology and Immunology,² Washington University School of Medicine, and Barnes-Jewish Hospital,³ Saint Louis, Missouri

MRSA-PCR-tester vi har provat

Test	År	Gener som amplifieras				
		SCC-insättningspunkt	mecA	mecC	S. aur	S. epid.
Light-Cycler Advanced MRSA	2009	x				
Geneohm MRSA	2009	x				
Xpert MRSA, Xpert SSTI	2009	x				
Xpert MRSA/SA.... Nasal (mm)	2009	x	x		x	
Xpert MRSA Gen 3	2014-	x	x	x		
Genomera MRSA	2011-12		x		x	
BD Max MRSA XT	2014	x	x	x		
Eazyplex MRSA	2016		x	x	x	x

Patientprov (2009)

**Odling: turbobuljong 1 dygn → ChromID MRSA
(→ snabbkoagulas, Vitek ID&AST, MRSAscreen,
Evigene, AccuProbe)**



Copan eSwab

Geneohm MRSA



Xpert MRSA (näsa) Xpert SSTI (andra)



(LC Advanced MRSA)



Resultat

				PCR vs odling				
	Pt	Prov	Odling+	Sensit	Spesif	PPV	NPV	Inh%
GeneOhm	47	218	29	93 %	98 %	88 %	99 %	0.5%
Xpert MRSA	48	110	33	91%	98 %	97 %	96 %	0
Xpert MRSA SSTI	31	92	2	0	100 %	0	98 %	7 %

- En patients svalgprov var positiv med båda PCR, ursprungligen negativ i odling, men positiv i omtagning. Det var patientens enda MRSA-positiv prov.
- Stammar som isolerades från PCR-negativa/odlings-positiva prov blev positiva i PCR
- LightCycler-test gjordes med 40 prov, varav 23 gav resultat. Testen missade Fin-10 (spa t040).

Testning med stammar 2008

Olika PFGE-typer som hade isolerats under senaste åren

- KTL/THL spa-typade alla
- För några fick vi också ST och typ av SCCMEC-kassetten
- Vi skaffade GeneXpert för att bekräfta MRSA på stammar som isolerats i odling
- Xpert MRSA/SA –kit med
 - mecA,
 - spa (Protein A)
 - SSC-joint

PFGE	ST	SCC-mec	spa	Xpert MRSA	Xpert SSTI mec, ssc,spa	BD Genohm MRSA
Fin-3 st	ST5	II	t002	pos	pos,pos,pos	neg
Fin-3B möjlig st			t002	pos	pos,neg,pos	neg
Fin-4	ST375	IV	t172	pos	pos,pos,pos	pos
Fin-4 st	ST375	IV	t172	pos	pos,pos,pos	neg
Fin-5 möjlig st	ST30	IV	t018	pos	pos,pos,pos	pos
Fin-5B	ST30	IV	t019	pos	pos,pos,pos	pos
Fin-7	ST8	IV	t008	pos	pos,pos,pos	pos
Fin-9 möjlig st	ST239	IIIA	t030	pos	pos,pos,pos	neg
Fin-10 st	ST45	IV	t040	pos	pos,pos,pos	neg
Fin-11 st	ST 80	IV	t044	pos	pos,pos,pos	neg
Fin-12	ST22	IV	t022	pos	pos,pos,pos	pos
Fin-16	ST125	IA	t067	pos	pos,pos,pos	pos
Fin-18 st	ST8	IV	t008	pos	pos,pos,pos	neg
Fin-19 möjlig st	ST1	IV	t127	pos	pos,pos,pos	pos
Fin-21			t041	pos	pos,pos,pos	pos
Fin-23	ST228	IV	t001	pos	pos,pos,pos	pos
Fin-25	ST8	IV	t008	pos	pos,pos,pos	pos
Fin-26 st	ST5	V	t088	pos	pos, pos,pos	neg
Fin-34	ST93	IV	t1811	pos	pos,pos,pos	neg
Fin-36 st	ST338	V	t437	pos		pos
Fin-40	ST 5	IV	t002	pos	pos,neg,pos	neg
Fin-40	ST 5	IV	t010	pos	pos,pos,pos	pos
Sporadisk			t1081	pos	pos,pos,pos	pos
Sporadisk			t223	pos	pos,pos,pos	neg
Sporadisk			t2380	pos	pos,pos,pos	neg
Sporadisk			t037	pos	pos,pos,pos	pos
Sporadisk			t242	pos	pos,pos,pos	pos

A Common Variant of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type IVa in Isolates from Copenhagen, Denmark, Is Not Detected by the BD GeneOhm Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Assay[∇]

Mette Damkjaer Bartels,^{1*} Kit Boye,¹ Susanne Mie Rohde,¹ Anders Rhod Larsen,² Herbert Torfs,³ Peggy Bouchy,⁴ Robert Skov,² and Henrik Westh^{1,5}

*Department of Clinical Microbiology, Hvidovre Hospital, Hvidovre, Denmark*¹; *Staphylococcus Laboratory, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark*²; *Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium*³; *Becton Dickinson, Quebec, Canada*⁴; and *Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark*⁵

Received 10 November 2008/Returned for modification 20 February 2009/Accepted 9 March 2009

Xpert MRSA Nasal med MRSA-stammar

- 132 stammar, misstänkta MRSA (FOX/OX screen)
- 92 MRSA
- 38 olika spa-typer
- 5 MRSA stammar var SCC negativa
- 6 stammar, SCC hade sen Ct (vs spa och mecA)

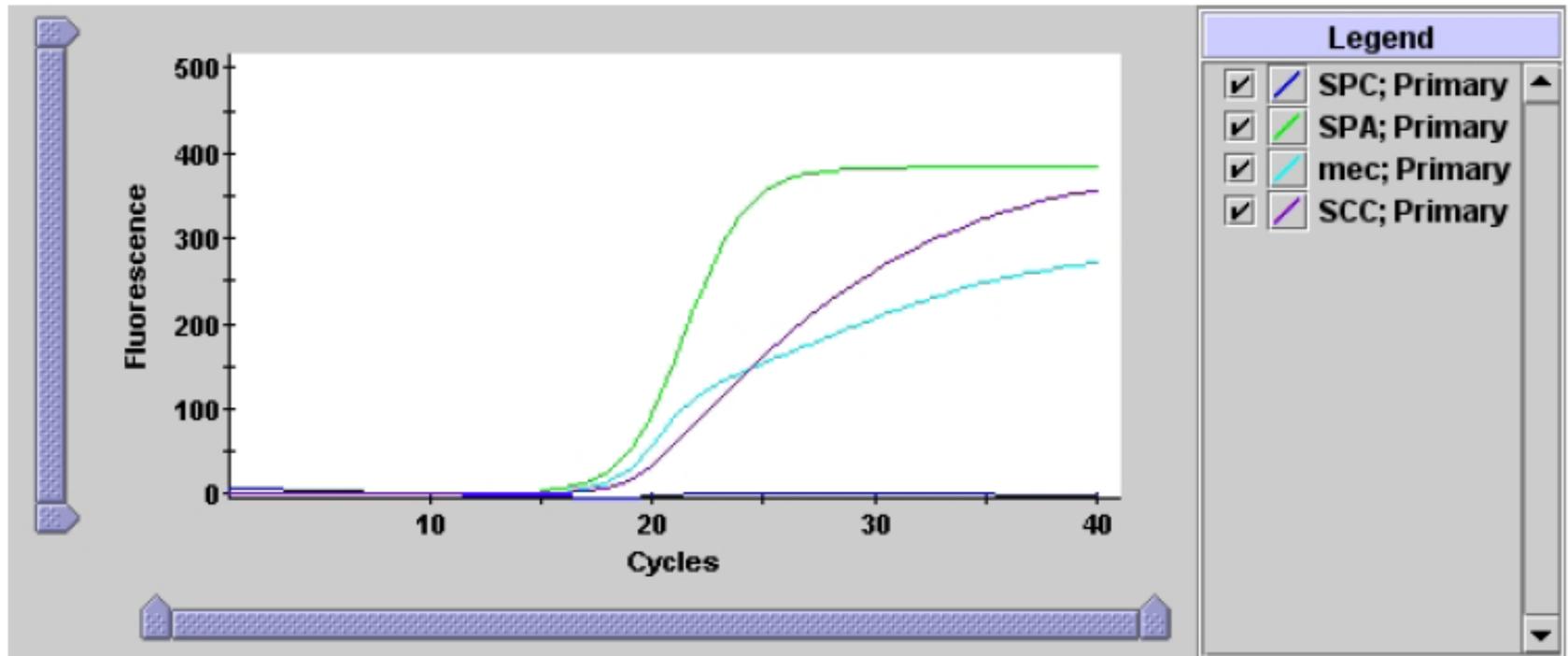
MRSA, spa-typ	n	SCC neg	SCC Ct>35
t002	13	2	3
t008	5		
t040	5		
t108	3		
t172	16	1	
t223	7		
t688	4	2*	1
t1642	1	1*	
t5755	1		1
annat	32		
Inte typad	10		

t002: olika PFGE-typer, negat var FIN-40; t688 FIN-38

**Test Result: MRSA POSITIVE;
SA POSITIVE**

Test and Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	0	-3	NA	PASS
SPA	17.5	385	POS	PASS
mec	18.4	271	POS	PASS
SCC	19.3	357	POS	PASS



Direkt MRSA-PCR

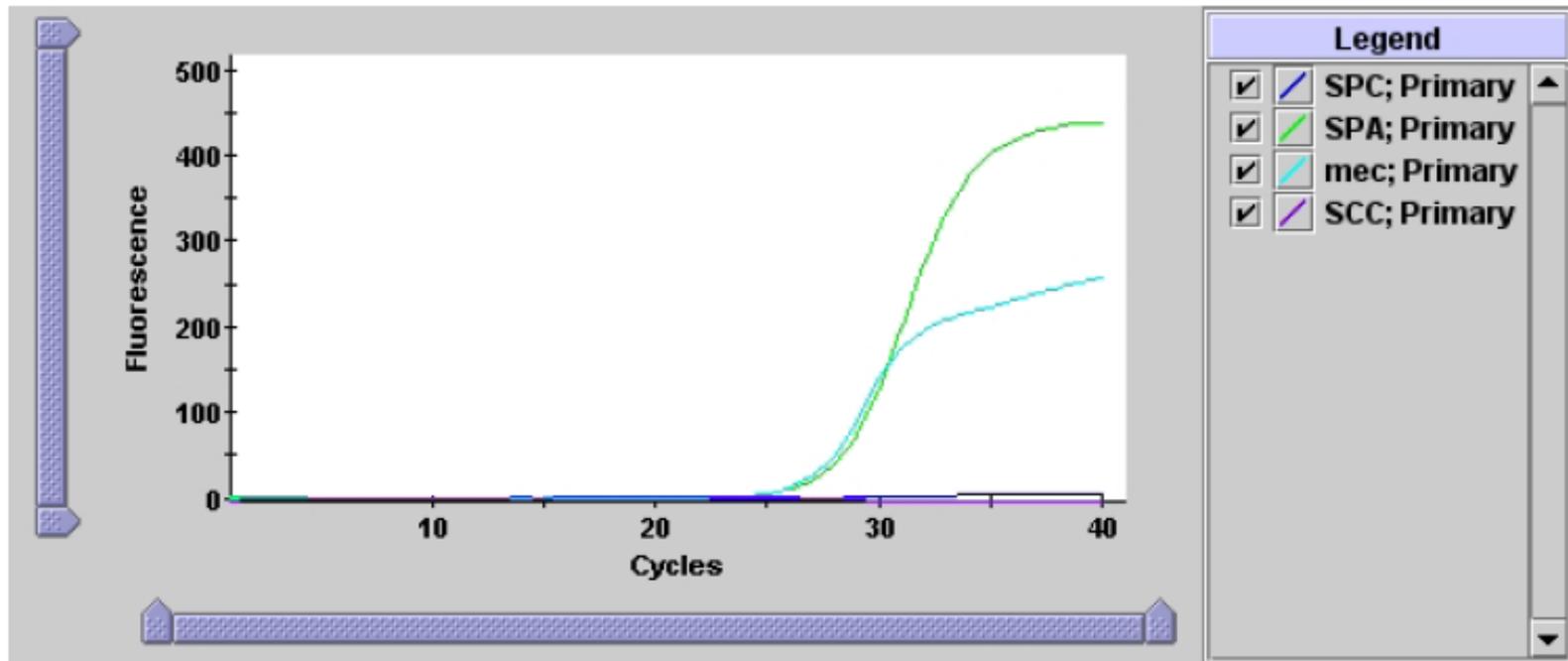
- I rutin 8/2010-
- För att snabbt utesluta MRSA-bärarskap vid
 - Exponering för MRSA (men inte VRE, ESBL)
 - MRSA utbrott i närliggande sjukvårdsdistrikt
 - Förebyggande kontaktisolering
 - Akut vård på ICU eller akut operation
- Också odling x2



- ca 1% av exponerade var bärare

Alltid kan man inte uteslå MRSA-bärarskap

- SPA och mecA pos, SCC neg
 - MRSA-stam med SCC-kassett som är "osynlig" i PCR?
 - Sensitiv *S. aureus* (spa+) och koagulasnegativa stafyloocker (mecA+) i lika mängd (1:1)?
 - På basis av stammar $[Ct_{mec} - Ct_{spa}] \leq 3$ suspekt



Prov från MRSA-bärare

- 14 bärare, proven testade både separat och som pool
- 2 PCR (Xpert MRSA Nasal, Genomera MRSA) och odling

Xpert MRSA/SA Nasal

- 10 pooler var MRSA-pos enligt instrumenten och 1 spa+/mec+/scc- (t040). Alla var också odlingspositiva.
- Separat analys av alla prov gav en ytterligare PCR-positiv patient (svalg, Ct>30), odling positiv först i omtagning. Hans sår var också positivt.
- 2 bärare var PCR-neg/odlings-neg i alla prov
- $[Ct_{mec} - Ct_{spa}]$ i odlingspositiva prov ≤ 1.4
 - Ett undantag (MRSA+SA?)



Tolkning av direkt MRSA-PCR med MRSA/SA Xpert Nasal -kit

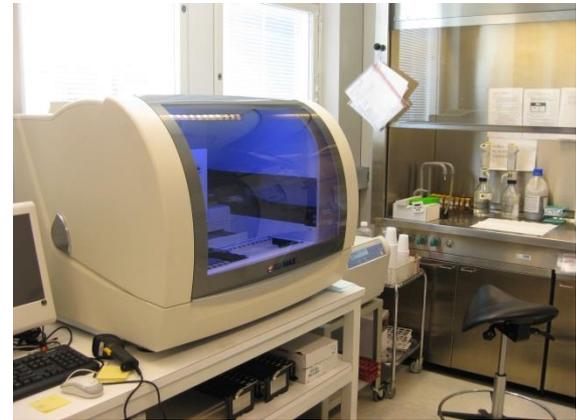
GeneXpert tolkning	Tröskelcyklerna	Svaras
MRSA positiv	spa+, mec+, scc+	MRSA positiv
MRSA negativ, SA positiv	spa+, mec+, scc– Skillnaden mellan spa och mec –tröskelcykler ≤ 2	+/- med kommentar: man kan inte utesluta MRSA med PCR. Odlingresultat avgör.
	spa+, mec+, scc– Skillnaden mellan spa och mec –tröskelcykler > 2	MRSA negativ
MRSA negativ, SA negativ	Ingen betydelse	

”Svåra stammar” vs Xpert MRSA Gen3

T-nummer	PFGE	Spa-typ	obs	Ctmec	Ctsc
57246	Fin-3B möjlig st	t002		17	24,1
57104	Fin-40	t002		17,6	24
59067		t5755		17,8	17,7
59225		t688		18,4	18,4
59382	Fin-16	t002		17,5	24,6
59874		t688		16,7	16,8
59918		t1642		15,8	33,2
60043		t688		16,5	16,4
60246	Fin-40 at	t002		16,8	16,7
18780			mecC	18,1	18,2
26134			mecC	15,7	15,9
26167			Missade EQA	16,5	15,8

BD Max MRSA XT

- 2 block à 12 prov, ca 2.5 h
- Testades 108 stammar (48 spa-typer)
 - 73 screening
 - 28 infektion
 - 7 från EQA
 - 10 µl 0.5 McF 1:100,
omtest vid behov 0.5 McF
- 99 stammar var positiva, 9 neg (alla från screening)
- Ett litet antal kliniska prov var negativa



”Svåra stammar” vs MRSA XT

T-nummer	PFGE	Spa-typ		0.5 McF 10 ⁻²	0.5 McF
57246	Fin-3B möjlig st	t002		neg	pos
57104	Fin-40	t002		neg	pos
59067		t5755		neg	neg
59225		t688		neg	neg
59382	Fin-16	t002		neg	pos
59874		t688		neg	neg
59918		t1642		neg	pos
60043		t688		neg	neg
60246	Fin-40 at	t002		neg	neg
18780			mecC	pos	-
26134			mecC	pos	-
26167			missade EQA	pos	-

Genomera MRSA/SA



- Abacus Diagnostica, Åbo
- PCR-reagenser torkade i kassetterna, TR-FIA –märkta kompetitiva prober
- *S. aureus* –specifik gen och *mecA*
- MRSA/SA Diagnose, Blood Culture & Screen -tester
- Förbehandling 2-20 min, PCR-tid <1h
- Hittar alla stammar
- Falskt positiv om patienten har MSSA och KNS

Eazyplex MRSA



- Från koloni 15 min, direkt 30 min
- Isotermisk LAMP-teknologi
- *mecA*, *mecC*, *S. aureus* o. *S. epidermidis*
- Algoritmen beaktar när kurvorna stiger i förhållande till varandra
- Hittade alla testade stammar
- Inte testat hur metoden fungerar i direkt PCR

Sammandrag

- Man kan snabba upp MRSA-screening med direkt PCR, speciellt jämfört med anrikningsodling eller om PCR är on-demand
- Sensitivitet hos PCR är \approx anrikning
- Vissa stammar är svåra för många tester. Deras betydelse beror på lokal epidemiologi.
- De tester som bäst täcker stammarna i (Egentliga) Finland, passar för snabb analys av enstaka prov
 - Xpert Gen 3-testen var användbar också i jourlabben, men patientunderlaget minskade
- I extensivt bruk skulle PCR hitta fler sanna positiva

Tack!

