



สมาคมโรคติดเชื้อ
แห่งประเทศไทย

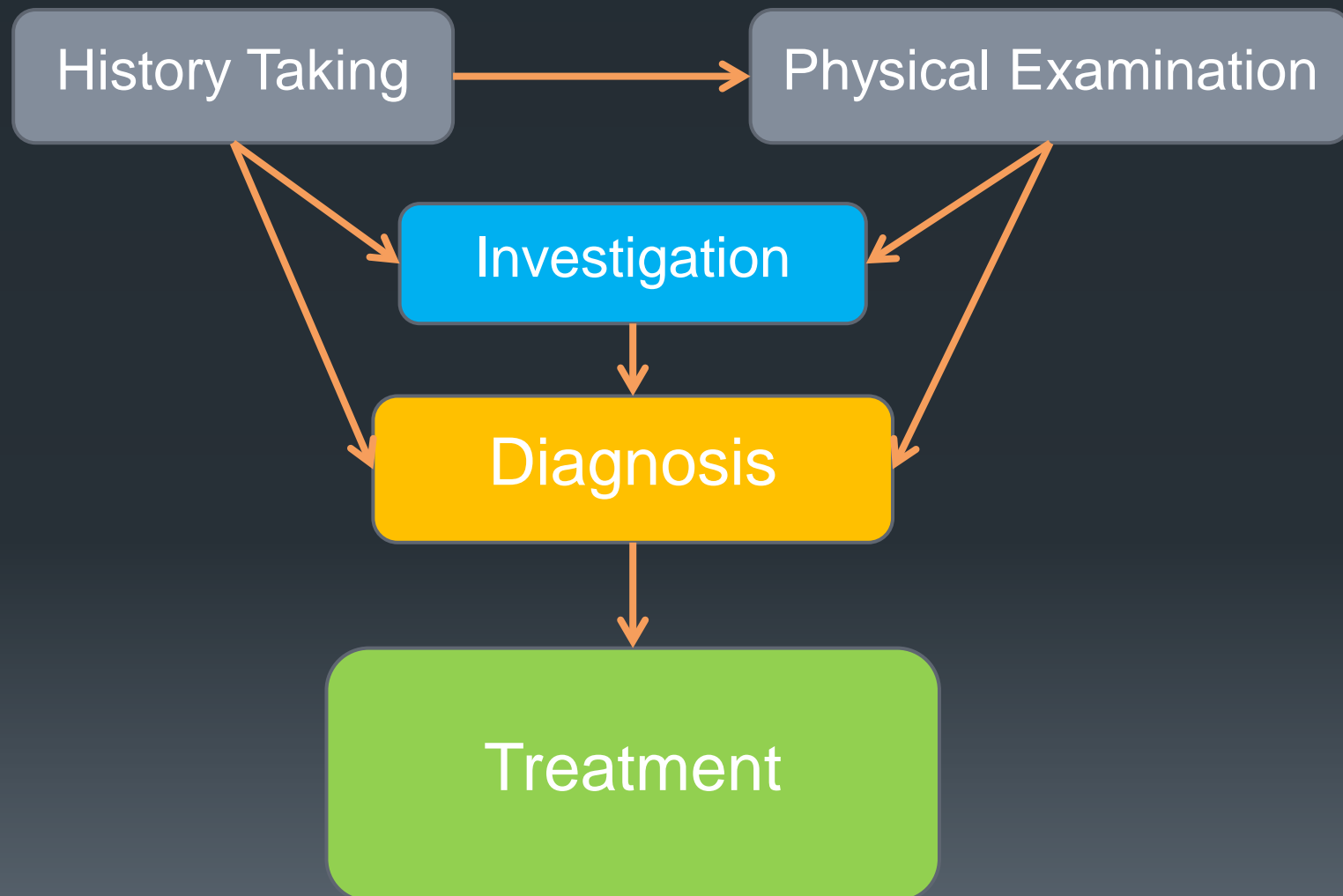
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

New Diagnostic Tests in Infectious Diseases

Sasinuch Rutjanawech, MD
Division of Infectious Diseases, Faculty of Medicine
Thammasat University



How Important Is the Diagnosis ?





Treatment of Infectious Diseases

- Antimicrobial agents
- Get rid source of infection
- Symptomatic/ Supportive treatment



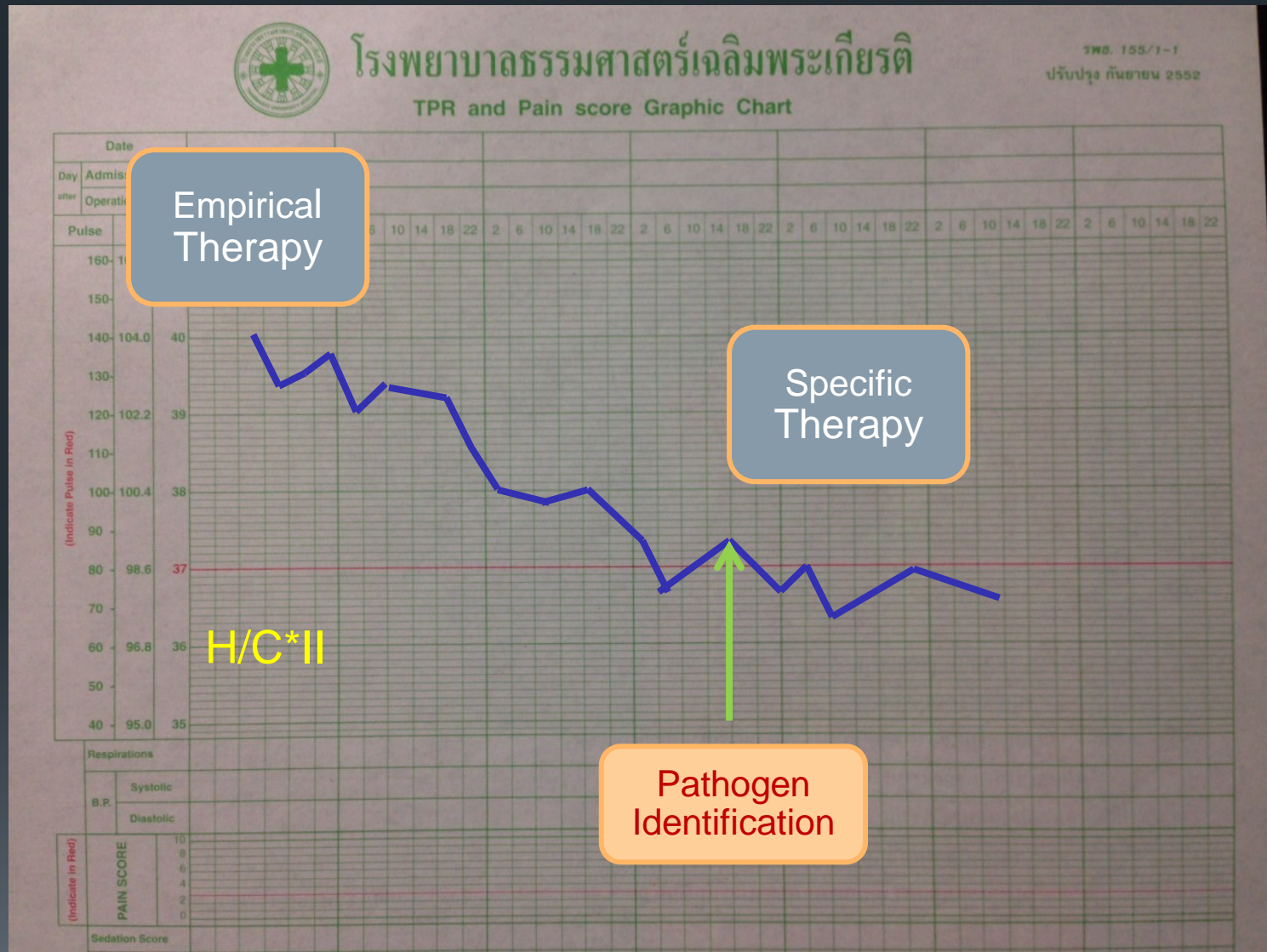
สมาคมโรคติดเชื้อ
แห่งประเทศไทย

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

Antimicrobial Agents

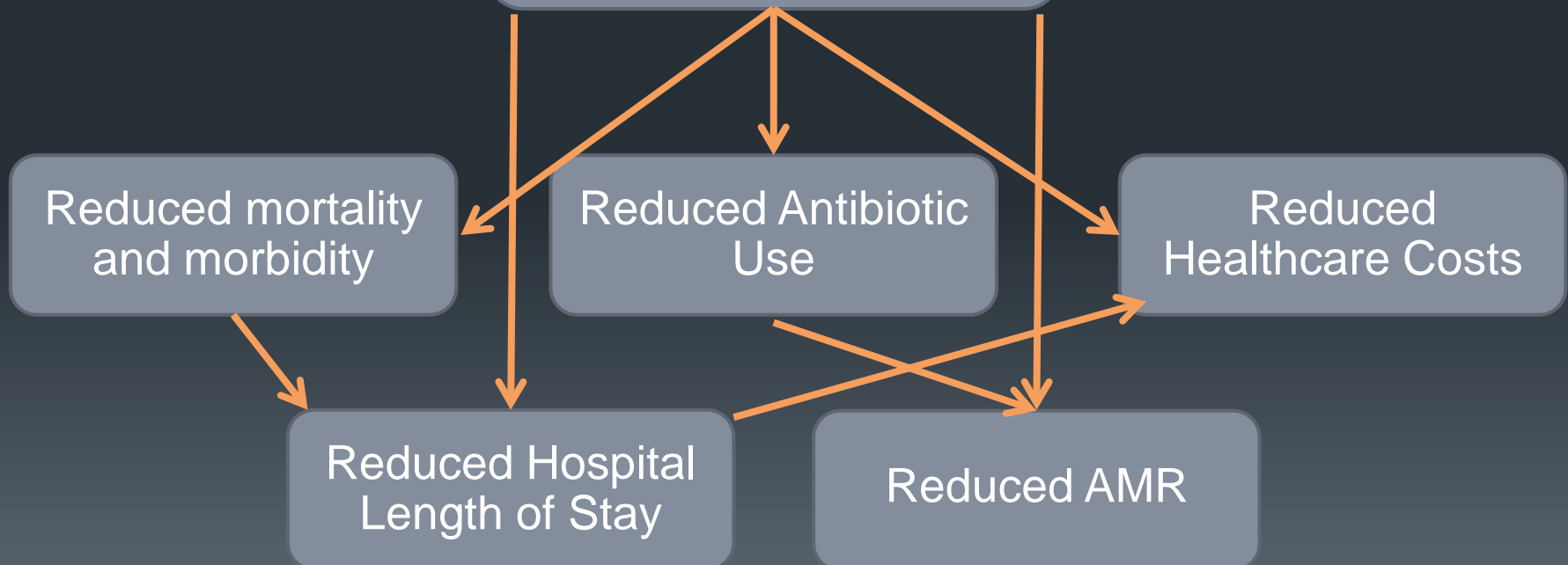




Rapid Pathogen Identification



Appropriate Antimicrobial Treatment

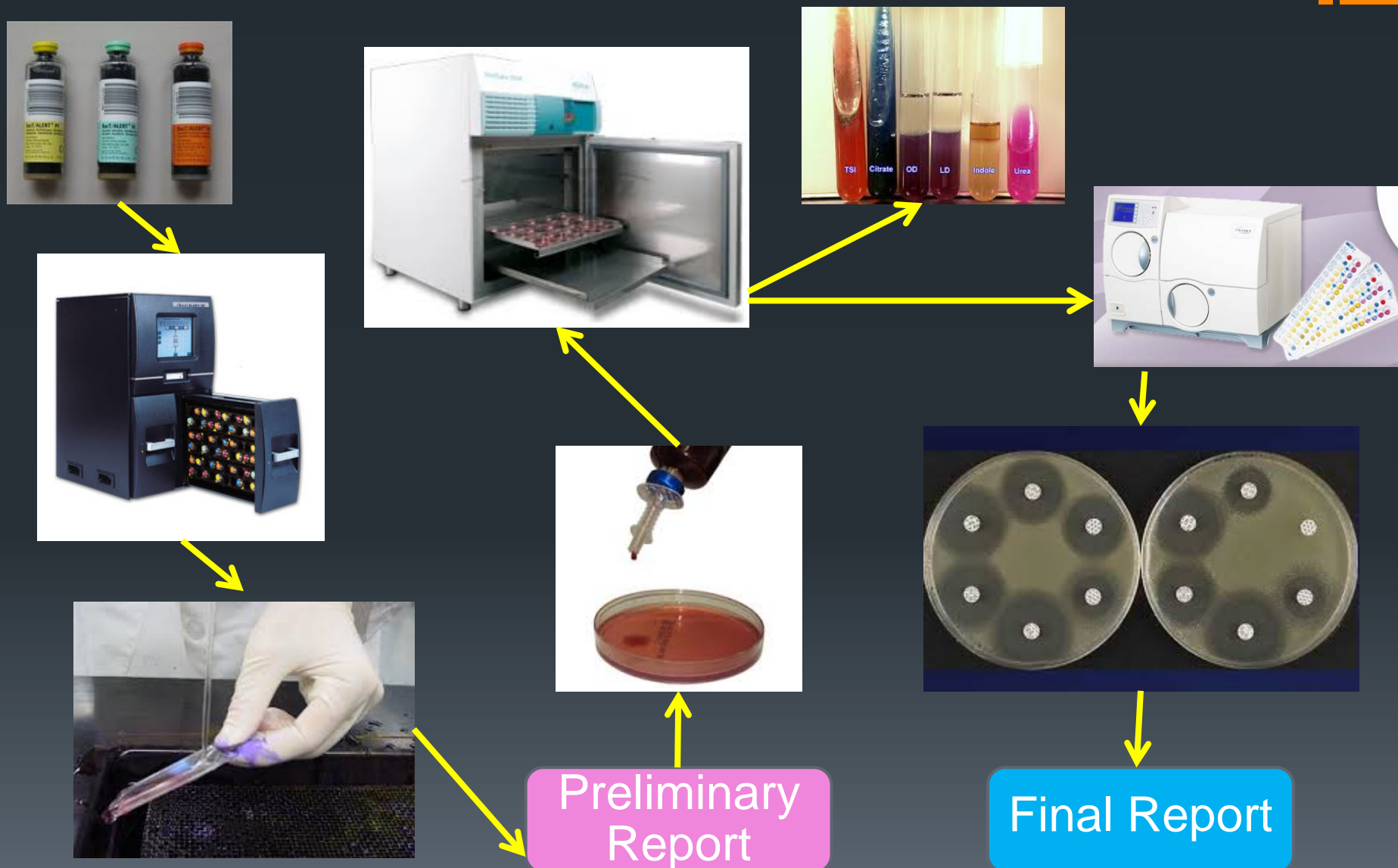




สมาคมโรคติดเชื้อ
แห่งประเทศไทย

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

Conventional Identification Method





Technologies for Rapid Identification of Bloodstream Pathogens

sample type

- Positive blood cultures
 - Nucleic acid-based test
 - Proteomic-based test
- Blood samples



สมาคมโรคติดเชื้อ
แห่งประเทศไทย

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

Nucleic Acid-Based Test



Peptide Nucleic Acid (PNA) Fluorescent in situ Hybridization Molecular Stains

- PNA-FISH® (AdvanDx)
- QuickFISH™ (AdvanDx)

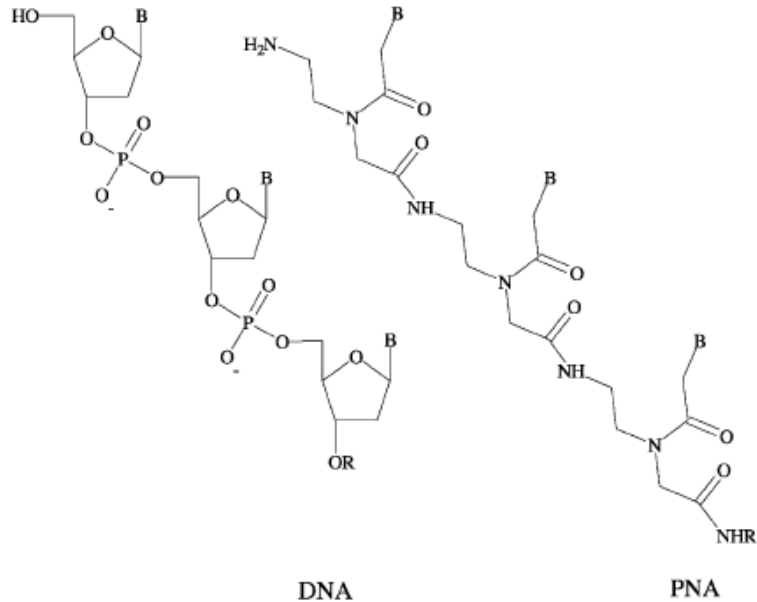
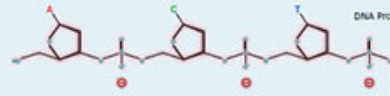
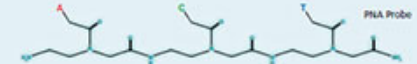


Fig. 1. Chemical structures of DNA and PNA. In PNA, the sugar phosphate backbone of DNA is replaced by a polyamide backbone, keeping the spacing between the nucleotide bases the same.



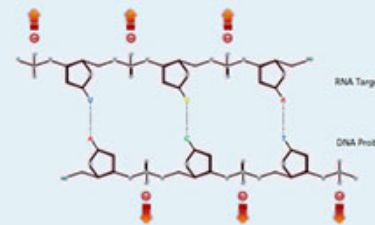
DNA Molecular Structure

DNA and RNA have a negatively charged sugar-phosphate backbone.



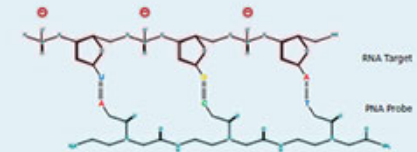
PNA Molecular Structure

PNA has a non-charged polyamide or "peptide" backbone.



DNA Probe Binding to RNA Target

DNA probes must overcome a destabilizing electrostatic repulsion during hybridization to complementary nucleic acid targets.

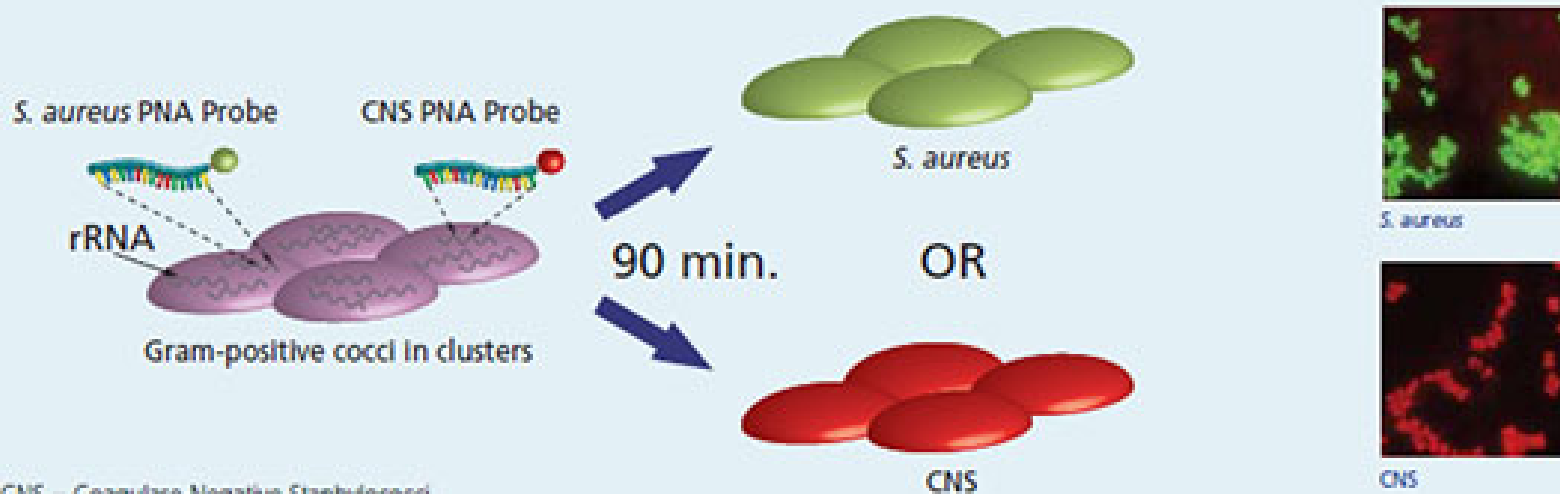


PNA Probe Binding to RNA Target

The non-charged backbone of PNA probes allow for tighter and more specific hybridization to nucleic acid targets.



S. aureus/CNS PNA FISH®





Pathogen Identified by PNA-FISH®

- *Staphylococcus aureus*/ Coagulase-negative staphylococci
- *Enterococcus faecalis*/ *Enterococcus faecium*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Candida* spp.



PNA-FISH®

- Turnaround time: 90 minutes
- Sensitivities and specificities 96-100%

CID 2014



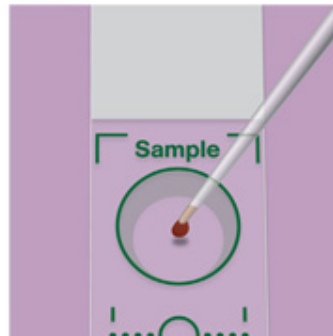
QuickFISH™



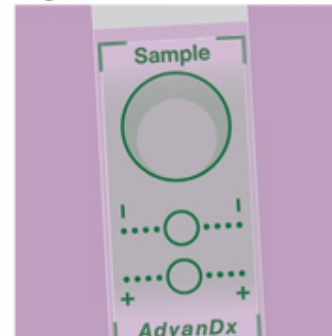
Quick and Easy *QuickFISH* Procedure

3 Easy Steps, 5 minutes hands on time, 20 minutes turn-around.

Fix



Hybridize



Examine



Step 1: Fix – Fix 10µL of blood culture sample to *QuickFISH* slide.

Step 2: Hybridise – Add PNA reagents and hybridise for 15 minutes at 55°C.

Step 3: Examine – View results on florescence microscope (60x or 100x Oil Objective).



Limitations

- Fluorescent microscope had to be used by experienced technician

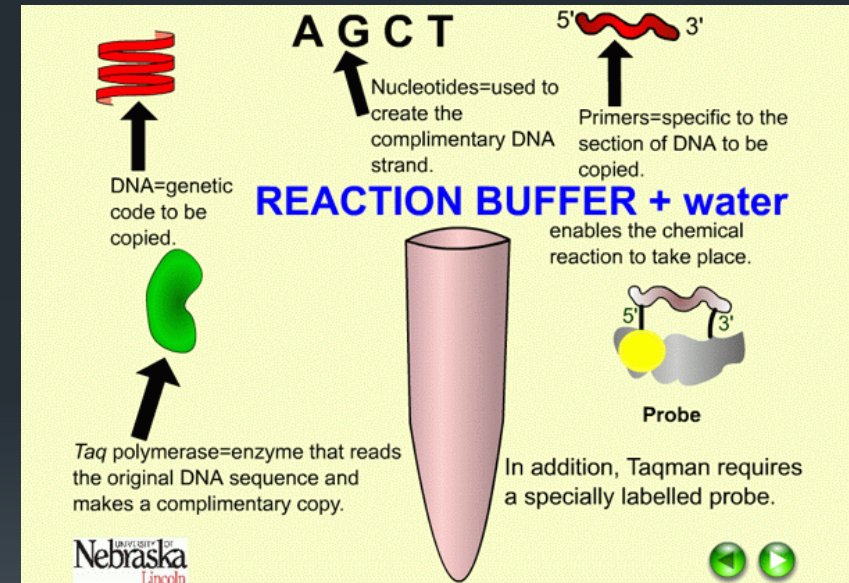
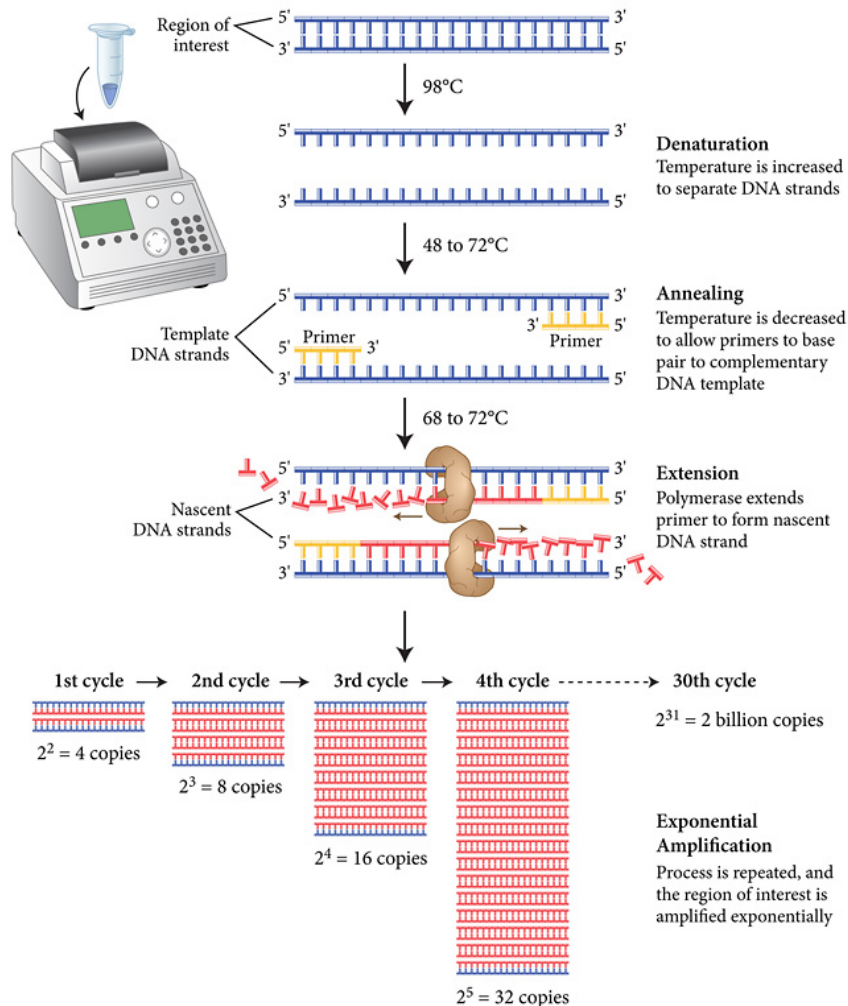


Polymerase Chain Reaction-Based Detection

- High sensitivity and specificity
- Very useful for detection of difficult to culture or uncultivable bacteria



PCR Principles





Single(Mono)plex Nucleic Acid Test

- Xpert® MRSA/ SA BC (Cepheid)
- BD GeneOhm™ Staph SR (BD)



Xpert® MRSA/ SA BC

- Target *spa*, the junction of *SCCmec-orfX* junction, and *mecA*
- Interpretation : all 3 targets detectable: interpreted as MRSA
- Turnaround time: 1 hour



Xpert® MRSA/ SA BC

1. Transfer one drop positive blood culture into elution reagent



2. Vortex and dispense Sample into port 5



3. Dispense Reagent 1 into port 1



4. Dispense Reagent 2 into port 2



Total hands-on time = 2 minutes





สมาคมโรคติดเชื้อ
แห่งประเทศไทย

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

BD GeneOhm™ Staph SR (BD)





BD GeneOhm™ Staph SR (BD)

- Target *Sccmec*
- Turnaround time: 2 hours



	Sensitivity	Specificity	Positive Predictive Value	Negative Predictive Value
Xpert®				
MRSA	98.3	99.4	96.6	99.7
MSSA	100	98.6	96.7	100
GeneOhm™				
MRSA	100	98.4	92.6	100
MSSA	98.9	96.7	93.6	99.5



Multiplex Nucleic Acid Test

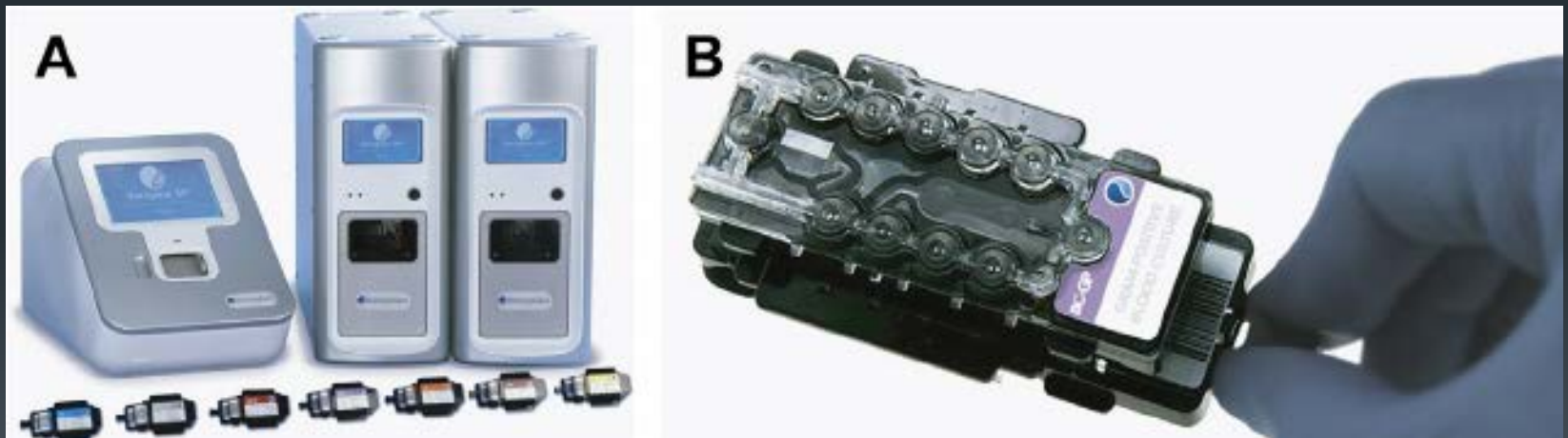
- Multiple sets of primer
- Very useful in source with nonspecific symptoms or more than one pathogen possible



สมาคมโรคติดเชื้อ
แห่งประเทศไทย

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

Verigene® Gram Positive Blood Culture Test (Nanosphere)





Pathogen Identified by Verigene® BC-GP

Gram-Positive Blood Culture (BC-GP) Test (CE-IVD)			
Genus	<i>Staphylococcus</i> spp.	Species	<ul style="list-style-type: none">• <i>Staphylococcus aureus</i>• <i>Staphylococcus epidermidis</i>• <i>Staphylococcus lugdunensis</i>
	<i>Streptococcus</i> spp.		
	<i>Micrococcus</i> spp.		
	<i>Listeria</i> spp.		
Resistance	<i>mecA</i>		<ul style="list-style-type: none">• <i>Streptococcus pneumoniae</i>• <i>Streptococcus anginosus</i> Group• <i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)• <i>Streptococcus pyogenes</i> (GAS)
	<i>vanA</i>		
	<i>vanB</i>		
			<ul style="list-style-type: none">• <i>Enterococcus faecalis</i>• <i>Enterococcus faecium</i>



Verigene® BC-GP

- Turnaround time 2.5 hours
- Sensitivity 92.6-100, specificity 95.4-100% for identification
- 98.6-100, 94.3-100% for resistance marker



Pathogen Identified by Verigene® BC-GN (non FDA-Approved)

Bacteria

- *E.coli*
- *K.pneumoniae*
- *K.oxytoca*
- *P.aeruginosa*
- *Serratia marcescens*
- *Acinetobacter* spp.
- *Proteus* spp.
- *Citrobacter* spp.
- *Enterobacter* spp.

Resistance Marker

- KPC
- NDM
- CTX-M
- VIM
- IMP
- OXA



สมาคมโรคติดเชื้อ
แห่งประเทศไทย

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

FilmArray® Blood Culture Identification Panel (Biofire® Diagnostic)

The FilmArray BCID Panel

Simultaneous detection of 27 targets:



Gram + Bacteria

- *Staphylococcus*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Enterococcus*
- *Listeria monocytogenes*



Gram - Bacteria

- *Klebsiella oxytoca*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Serratia*
- *Proteus*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Haemophilus influenzae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterobacteriaceae*
- *Escherichia coli*
- *Enterobacter cloacae* complex



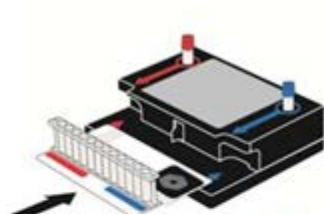
Fungi

- *Candida albicans*
- *Candida glabrata*
- *Candida krusei*
- *Candida parapsilosis*
- *Candida tropicalis*



Antibiotic Resistance

- *mecA*
- *vanA / vanB*
- *KPC*



Insert Pouch into
Loading Station



Inject Hydration
Solution



Inject Sample



Add Pouch to
FilmArray and Start Run

Simple:
Only 2 minutes of
hands-on time

Easy:
No precise
pipetting required

Fast:
Run time of
about 1 hour



สมาคมโรคติดเชื้อ
แห่งประเทศไทย

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

FilmArray® BCID

- Turnaround Time 1 hour
- Sensitivity > 90% or pathogen identification
- Accuracy for *mecA* and *van A/B* detection 94-100 and 100%



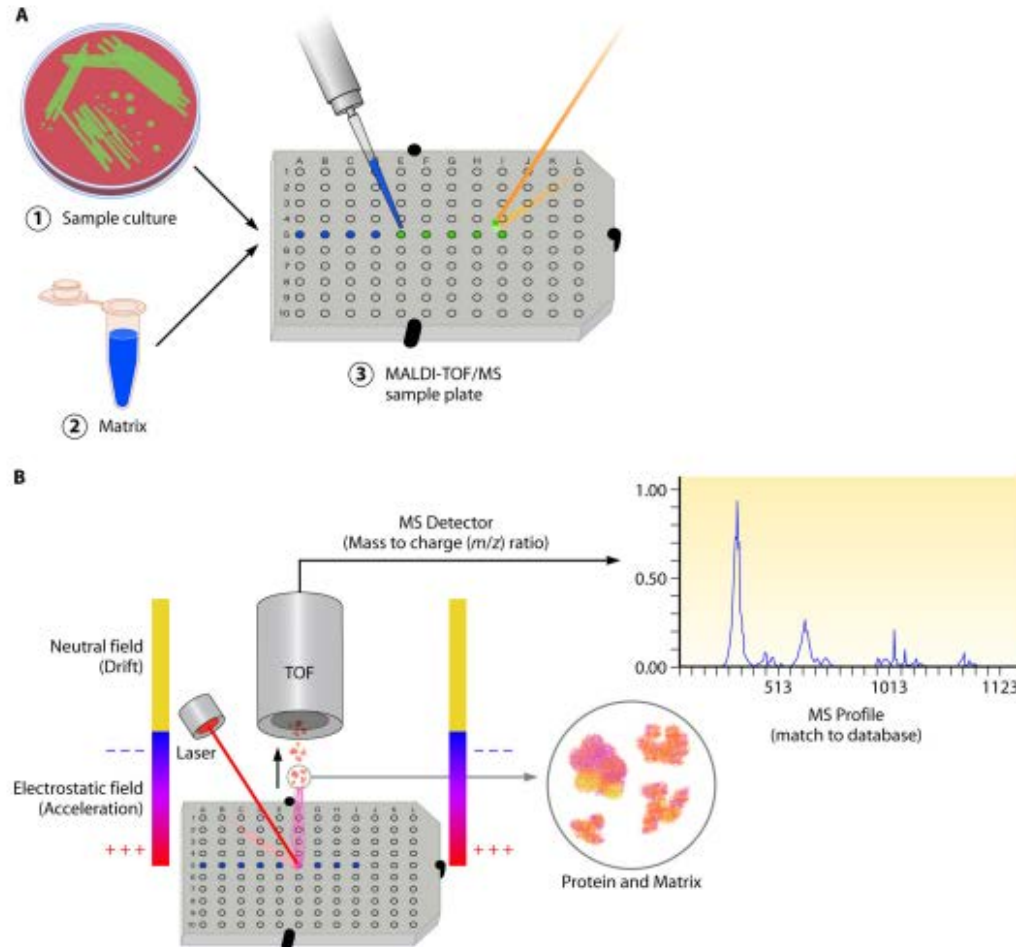
สมาคมโรคมะเร็ง
แห่งประเทศไทย

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

Proteomic-Based Test



Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)





MALDI-TOF MS

- Vitek® MS (Biomerieux)
- BD Bruker MALDI Biotyper ®



MALDI-TOF MS

- Turnaround time 10-30 minutes
- Sensitivity 76-98% depend on pathogen
- Specificity > 96%



MALDI-TOF MS

Advantage

- Less turnaround time
- Less expensive
- Wide range of pathogen detectable

Limitations

- Deprivation of database
- Can not distinguish some closely related pathogens



Robert A. Weinstein, Section Editor

Emerging Technologies for Rapid Identification of Bloodstream Pathogens

Atul Kothari,¹ Margie Morgan,² and David A. Haake^{1,3}

¹Division of Infectious Diseases, VA Greater Los Angeles Healthcare System, ²Department of Pathology and Laboratory Medicine, Cedars-Sinai Medical Center, and ³Departments of Medicine, Urology, and Microbiology, Immunology, and Molecular Genetics, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, California

Table 2. Studies Examining Impacts on Clinical Outcomes and Healthcare Costs

Intervention	Year of Publication	Antimicrobial Stewardship Intervention	Mortality Benefit	Change in LOS, d	Cost Saving Per Patient, \$	References
PNA-FISH	2006	Yes	Not studied	−2	4005	Forrest et al, 2006 [22]
PNA-FISH	2011	No	Not studied	+2.2	Not studied	Holtzman et al, 2011 [23]
PNA-FISH	2006	Yes	Not studies	Not studied	1729 ^a	Forrest et al, 2006 [24]
PNA-FISH	2008	No	Yes (16.8% vs 7.9%)	−2 ^a	19 441 ^a	Ly et al, 2008 [25]
Gene Xpert MRSA/SA	2010	Yes	Yes (18% vs 26%) ^a	−6.2	21 387	Bauer et al, 2010 [26]
MALDI-TOF	2013	Yes	Yes (5.6% vs 10.7%) ^a	−1.8	19 547 ^a	Perez et al, 2013 [27]
MALDI-TOF	2013	Yes	Yes (12.7% vs 20.3%)	−2.8 ^a	Not studied	Huang et al, 2013 [28]
Verigene BC-GP	2013	Yes	No	−21.7	60 729	Sango et al, 2013 [29]

Abbreviations: BC-GP, gram-positive blood culture; LOS, length of stay; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption-ionization/time-of-flight mass spectroscopy; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; PNA-FISH, peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization.

^a Difference not statistically significant.



Rapid Identification of Bloodstream Pathogen from Blood Samples

- Lightcycler ® Septifast TM (Roche)
- Septifast ® (Molzym)
- VYOO® (SIRS-Lab)
- Magicplex TM sepsis real-time test (Seegene)
- T2MR (T2 Biosystems)



ตารางที่ 1 นวัตกรรมในการระบุเชื้อก่อโรคในกระแสเลือดที่อาศัยหลักการตรวจหากรดนิวคลีอิกของเชื้อ ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา



วิธีการตรวจ (ผลิตภัณฑ์)	เชื้อที่ตรวจได้	การตรวจที่ตรวจได้	ความแม่นยำ (%)	ความไว (%)	ความจำเพาะ (%)	ระยะเวลาในการตรวจ (ชั่วโมง)
FNA FISH (AdvanDx)	<i>Staphylococcus aureus</i> / Coagulase negative Staphylococci <i>Enterococcus faecalis</i> / other enterococci <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i>	-	97	96-100	96-100	1.5-2.5
QuickFISH (AdvanDx)	<i>S. aureus</i> / CoNS <i>E. faecalis</i> / other enterococci <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	-	NA	98.8-99.5	89.5	20 นาที
Xpert MRSA/SA (Cepheid)	<i>S. aureus</i>	<i>mecA</i>	>97	98.3-100	98.6-99.4	1
GeneOhm (BD)	<i>S. aureus</i>	<i>SCCmec</i>	>97	98.9-100	96.7-98.4	2
Verigene (Nanosphere)						
Gram-positive blood culture test (BC-GP)	<i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus lugdunensis</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> Group, <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i>	<i>mecA</i> <i>vanA</i> <i>vanB</i>	95	92.6-100	95.4-100	2.5
Filmarray (Biofire)	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Koxtoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Calbicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	<i>mecA</i> <i>vanA</i> <i>vanB</i>	94-100	>90	98-100	1
T2MR (T2 Biosystems)	<i>Calbicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>	-	97	91	>99	3-5

* ความแม่นยำเมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเชื้อ

* ระยะเวลาตั้งแต่นำส่งส่งตรวจที่ผ่านกระบวนการเตรียมแล้วเข้าสู่เครื่อง (turnaround time)

NA ไม่มีข้อมูล





สมาคมโรคติดเชื้อ
แห่งประเทศไทย

การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559
การอบรมระยะสั้นประจำปี 2559

Thank You For Your Attention