

Rapid identification of health care-associated infections with an integrated fluorescence anisotropy system

李朝阳

2016317110014



Time involved

- 20 minutes



Healthcare-Associated Infections (HAIs)

- **Definition:** Infections that patients acquire during the course of receiving treatment for other conditions within a healthcare setting
- **Healthcare settings:**
 - **Hospitals:** acute care facilities, critical access hospitals
 - **Long term care facilities (LTCF)**
 - **Outpatient settings:** dialysis centers, ambulatory surgical centers, physician's offices



Modes of Transmission

- Droplet Transmission
- Contact Transmission
- Common Vehicle
Transmission
- Vector-borne Transmission



医疗感染现状

- 平均在25个住院患者中，有一个被致病菌感染，住院患者中最终有4.4‰的概率死亡。
- 越来越多的致病菌出现抗药性，由此引发的医疗感染造成的“长期住院”，以及对更新型的抗生素的需求越来越大，医疗卫生每年给美国带来1k~1.5k亿美元的沉重负担。
- 因此，无论在任何地方，都可以快速而灵敏地检测出感染的病原菌，是尽早发现并抑制疾病加重、扩散的关键。

B. Allegranzi etc. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries. **Lancet** 377, 228–241 (2011).

Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team **N. Engl. J. Med.** 370, 1198–1208 (2014).



传统细菌培养

- 长达数天的细菌培养时间。
- 高昂的人工成本。
- 专业的检测仪器。
- 不同菌种有不同的检测流程。



现行核酸检测

- 针对每一个核酸靶标设计独特探针。
- PCR扩增产物引起交叉污染——产生假阳性。（因此需针对每个菌种单独设置扩增前后的操作区域）
- 核酸检测对实验环境、器材、人员要求高，使得实验只能在医院实验室进行。



Method

Polarization anisotropy diagnostics(PAD)

原理： 当PAD系统中探针检测到目标细菌核酸时，系统测量到的荧光各向异性会发生改变。

鲁棒性： 系统是检测荧光强度独立的比率，使PAD系统具有对抗环境因素的鲁棒性。

系统特色：

1. 结构紧凑，使用一次性圆管作为样品准备和多孔检测。（无需清洗。减少在扩增、检测中的污染。）
2. 建立序列特异性探针库，用来评估细菌负荷、病原体类型、耐药性和毒性。

系统测试： 使用临床常见医疗感染病原体进行测试。

1. 革兰氏阳性菌：葡萄球菌。
2. 革兰氏阴性菌：埃希氏菌、克雷伯氏菌、鲍氏不动杆菌、绿脓假单胞菌。

系统优点：

1. 与传统细菌培养相比，具有相似的识别准确度。
2. 体积小，携带方便。
3. 检测总时间在~2小时。（远比传统数天时间短）



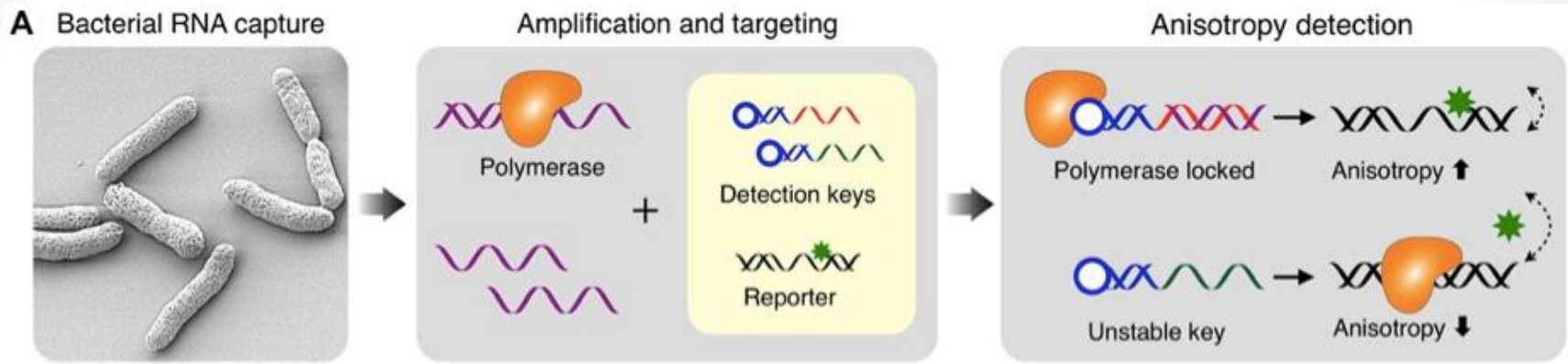
PAD荧光各向异性检测

实验流程:

1. 溶解细菌。
2. 通过不对称反转录PCR对靶标核酸进行扩增(16s核糖体RNA、mRNA)。
3. 加入混合试剂:
 - 3.1. 源于适配子aptamer的“检测key”。(对DNA聚合酶有特异性,与靶序列互补)
 - 3.2. 带有荧光基因的报告DNA(reporter DNA)。
4. “检测key”通过和靶序列杂交变的稳定,它与DNA聚合酶结合,使酶失活。而报告DNA保持原有结构,并且由于缓慢的扩散运动,展现出高强度的荧光各向异性。相反,在靶序列不存在时,由于DNA聚合酶没有结合靶序列(有活性),在扩增时DNA聚合酶会切开报告DNA上的荧光基因,于是导致各向异性(r)很低。



Method



PAD 系统示意图

- 测定程序：溶解细菌，提取总RNA。在RT-PCR扩增后，将含有扩增子和DNA聚合酶样品与具有“检测key”和报告DNA的一体化主混合物一起温育。然后测量所得样品的荧光各向异性。



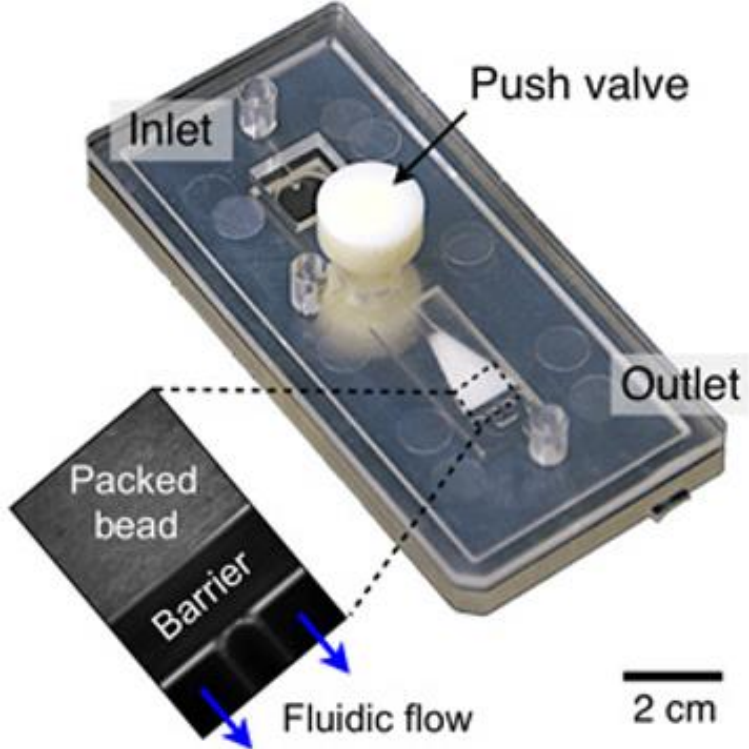
PAD系统结构

- 为了进行现场医疗感染检测，制作了一个紧凑的PAD系统。

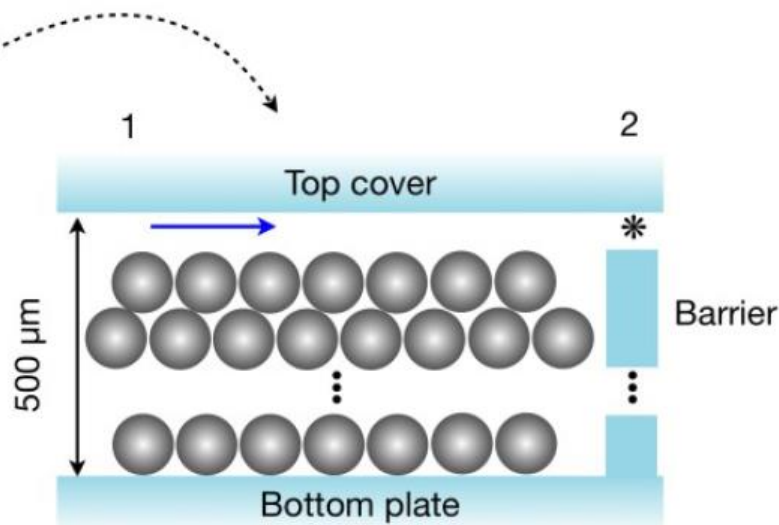
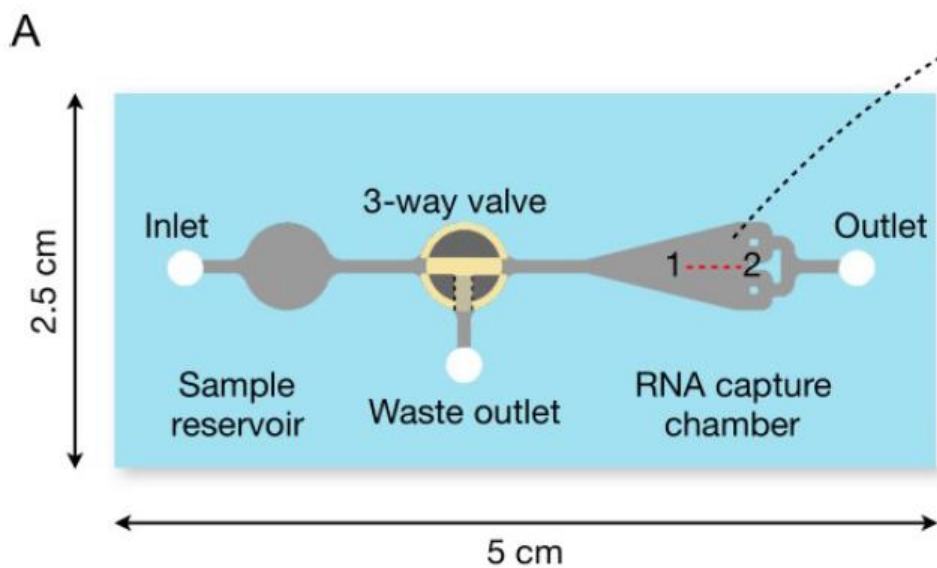
PAD系统包括两个主要部分：

样品处理管+荧光各向异性检测解码器。

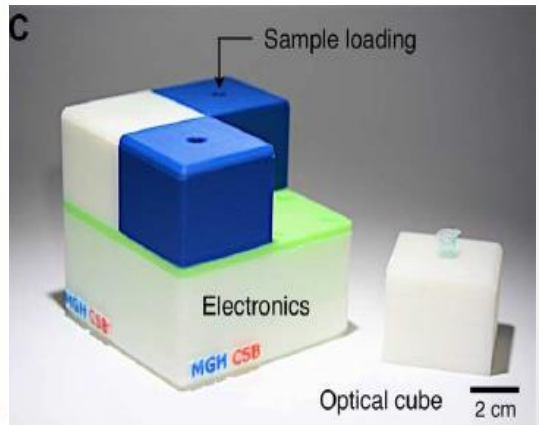
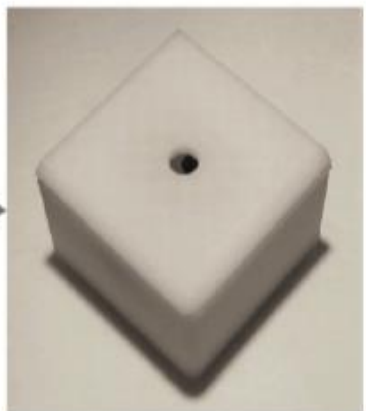
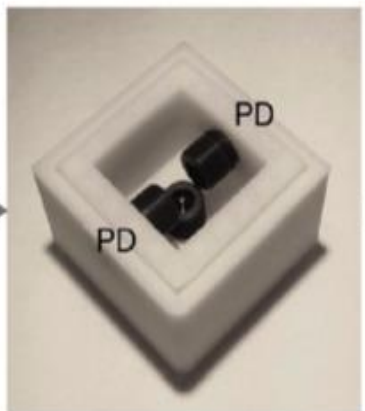
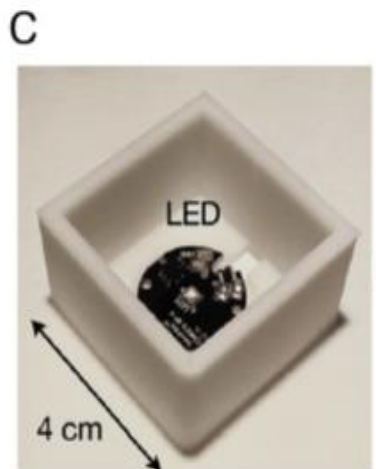
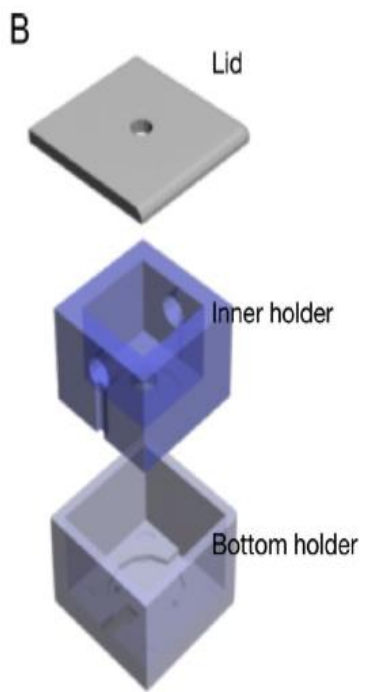
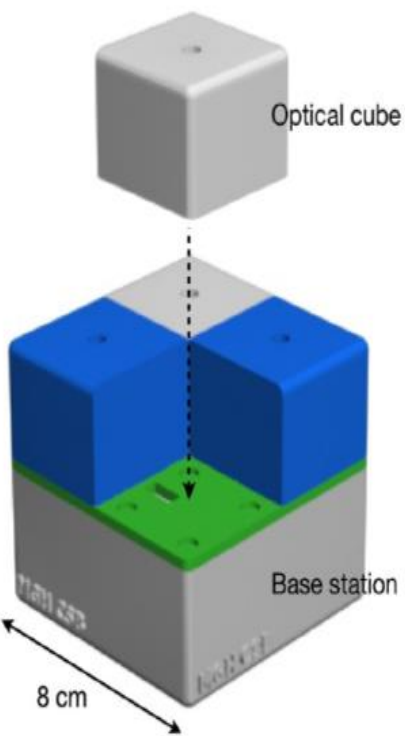


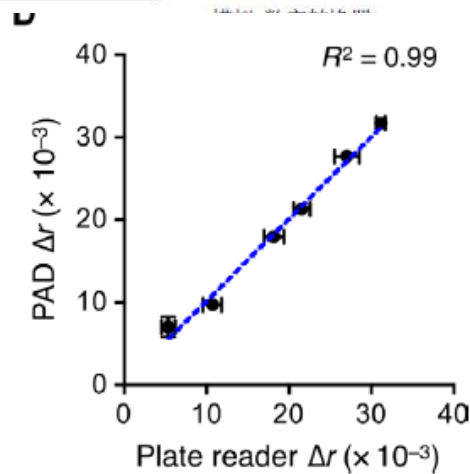
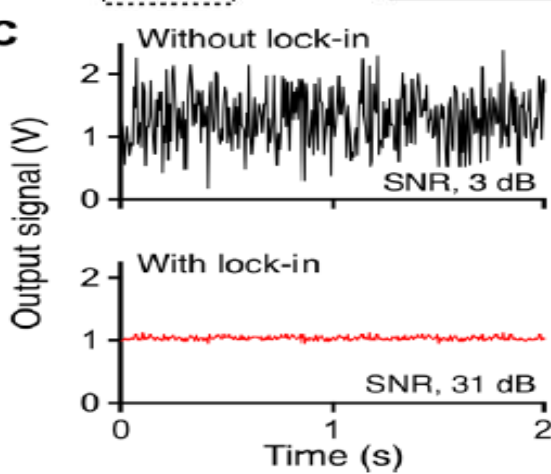
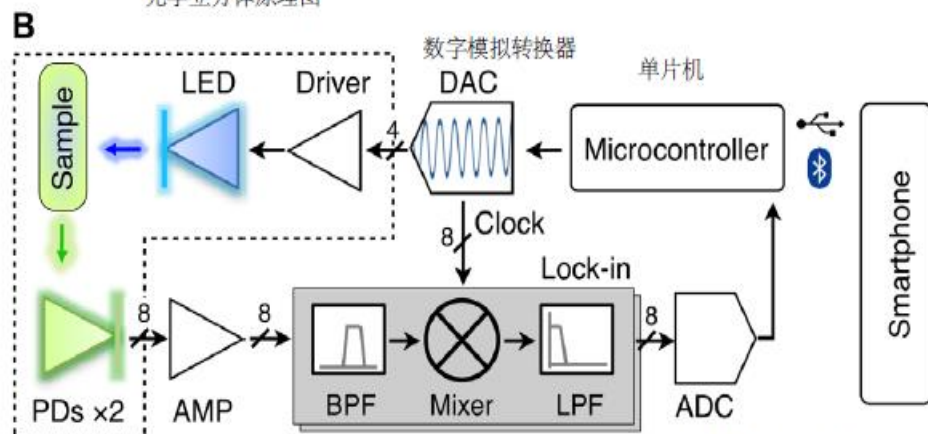
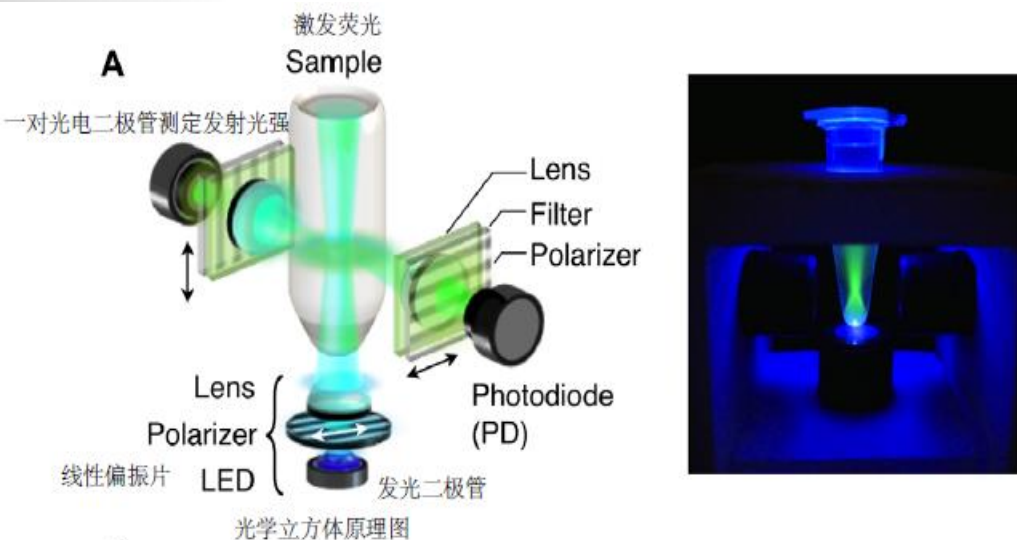


- 样品管处理细菌核酸：过滤，提取得到细菌RNA（与商业过滤器相比，提取出的RNA质量可相媲美。）
- 使用样品管可以免去洗脱步骤。



- 荧光各向异性检测解码器：是模块化结构，由基本信号处理单元+4块光学管组成。
- 光学立方体可以定制使用，因此可以适应不同大小的样品存储器和荧光。





- 使用发光二极管LED作为光源，先通过偏振片再打到样品上，从而激发出荧光。
- 使用一对光电二极管测得荧光光强。（平行光 I_x 和垂直光 I_y ）
- 荧光各向异性计算公式： $r = (I_x - I_y) / (I_x + 2I_y)$
- 为了系统鲁棒性，将carrier处的激发光强调制成1kHz，通过同步检波锁定发射信号的频率。
- 为了在可见光下操作，系统增加了信噪比， $>28\text{dB}$ ，输出结果平稳度显著提高。
- 收集到的信号通过扩增，使用各种数字、模拟转换器，最后送到单片机中进行数据处理。结果通过蓝牙连接Android手机，在app上可视化显示。

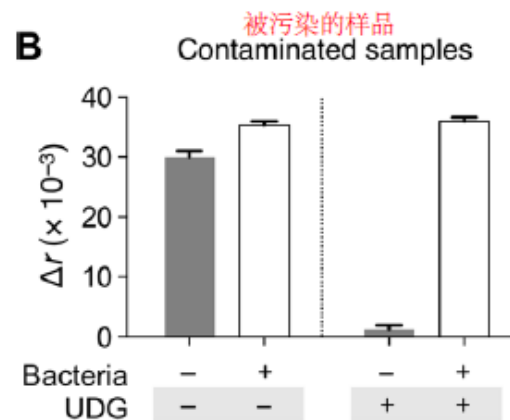
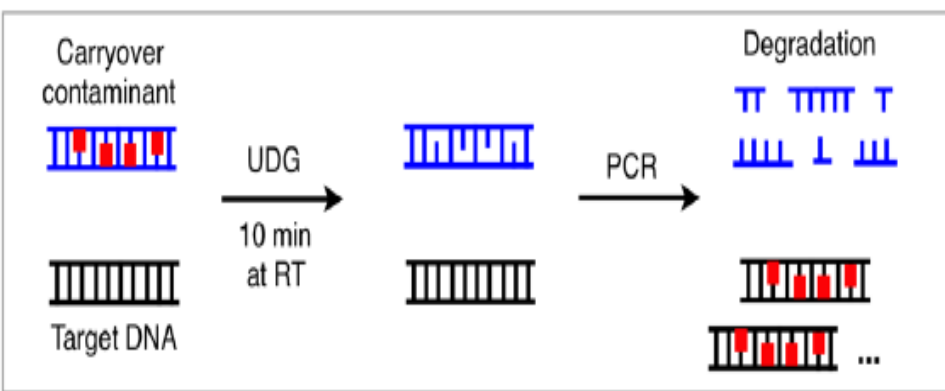
此处理流程得到的结果与商业化的大型设备得到的结果 $R^2 > 99\%$



Method

系统优化

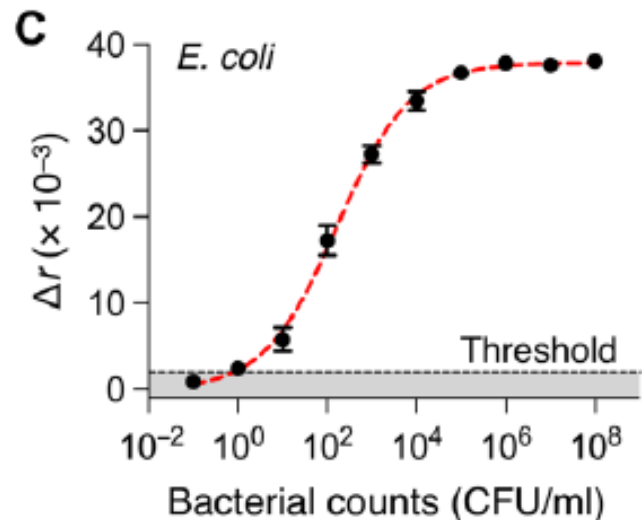
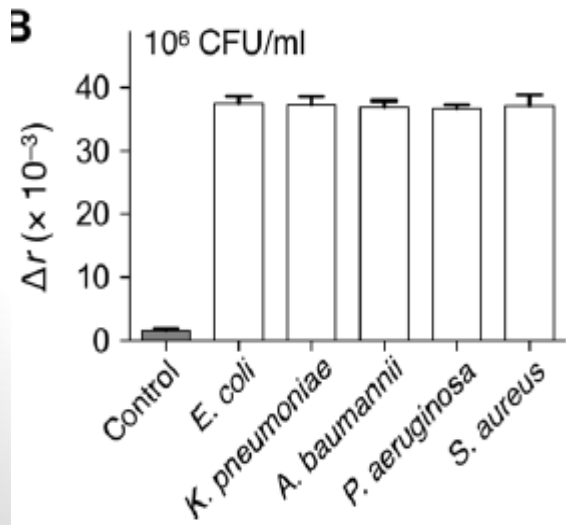
- 为了便利床边操作，进行试验系统优化。
- 主攻问题：由PCR带来的样本污染造成的假阳性。（这是个外来的污染）
- 解决方法：使用尿嘧啶DNA糖苷酶UDG。
- 具体步骤：在PCR时，用脱氧三磷酸尿苷dUTP代替脱氧三磷酸胸苷dTTP，扩增后外来污染DNA骨架T→U，再使用尿嘧啶DNA糖苷酶降解这些外来污染DNA。
- 为增加系统的便携性，将miniPCR加入到PAD系统中。并且经测试，与传统大型机器效力相似。
- 为增加系统各种试剂（检测key或reporters）运输储存安全性，将试剂进行冻干处理。经比较，冻干处理与新鲜试剂具有相同的使用表现。



Result

通用“检测key”测定细菌负荷

- UNI key的靶标：不同细菌16S rRNA的一块儿保守区域。
- 对照组：（不含荧光团标记的DNA，引物，模版，DNA聚合酶）。
- 先使用PAD系统测定对照组的荧光各向异性结果 r_0 ，样品测量结果为 r ，则最终结果 $\Delta r = r - r_0$ 。
- 测试：使用最具有代表性的医疗感染细菌：大肠杆菌，肺炎克雷伯氏菌，鲍曼不动杆菌，铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌。只要细菌浓度相同，在这些不同中菌液的 Δr 相同。
- 最后对细菌样本进行梯度稀释滴定实验，得到系统的测定能力：单菌落 $\sim 10k$ CFU/ml



Result

不同的keys进行细菌分类

- 为区分不同临床上易染菌种，制作一套检测keys。每个key靶标为不同菌种16S rRNA的高可变区。每个物种的序列同源性保持在<50%，从而使非特异性结合最小化。
- 测试结果表明，分类keys具有极小的串扰性。
- 电泳带位移分析证实，在存在互补靶标扩增子的情况下，检测keys可以与DNA聚合酶结合，并抑制其催化活性。
- 接下来做了使用抗生素抗性和毒性探针，对细菌进行进一步的表型分型。
（靶标为病原体耐抗生素基因或高毒性基因）选择了mecA, PVL, nuc, femB这四个基因。其中mecA是一种常见的多重耐药的基因。后三个基因是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌高毒性基因。PAD系统结论与定量实时PCR (qPCR相一致)



Result

PAD系统临床实战

- 溶解细菌后使用塑料管收集细菌核酸，通过自带miniPCR扩增，先使用UNI key进行总细菌负荷检测，HAI病原体分类检测，耐药性、毒性检测。
- 全部检测总时间<2hours。
- 所需临床感染诊断样本 $\sim 40 \mu\text{l}$ 。
- 同时使用传统细菌培养进行检测。除了一种细菌（普罗维登斯菌）没有在PAD系统中检测出来外（HAI-PAD系统中没有靶向），其余五种细菌感染均与PAD系统结论相同。



Result

结论

- 控制流行病的一个关键任务是为当地医院和社区中心配备更有效的监测系统。这里介绍的PAD平台可以在这些设置中进行快速HAI检测。检测系统紧凑，用户友好，操作复杂性最小。测定可以全面的，评估总细菌负荷，病原体类型，抗生素抗性和毒力因子。
- 首先，检测方案（荧光各向异性）对于环境噪声是固有鲁棒的。进一步结合光学锁定技术以显著增强灵敏度。第二，测定流程复杂性低和实际操作时间短。一次性塑料芯片用于样品收集，并且剩余的过程在单个管中进行而没有洗涤步骤，从而使假阳性最小化。三，平台价格实惠。PAD模块化器件，可以容易地扩展用于并行检测。注塑成型优点包括高的性能再现性，更少的样品之间的交叉污染，以及更低的成本。我们已经设计了>35个靶的检测探针；其他目标的增量测定成本约为\$0.01。
- 在临床试验中，PAD精确度与细菌培养相当。但PAD测定快速（~2小时），多路复用和成本有效（每次测定<2美元）。



Discussion

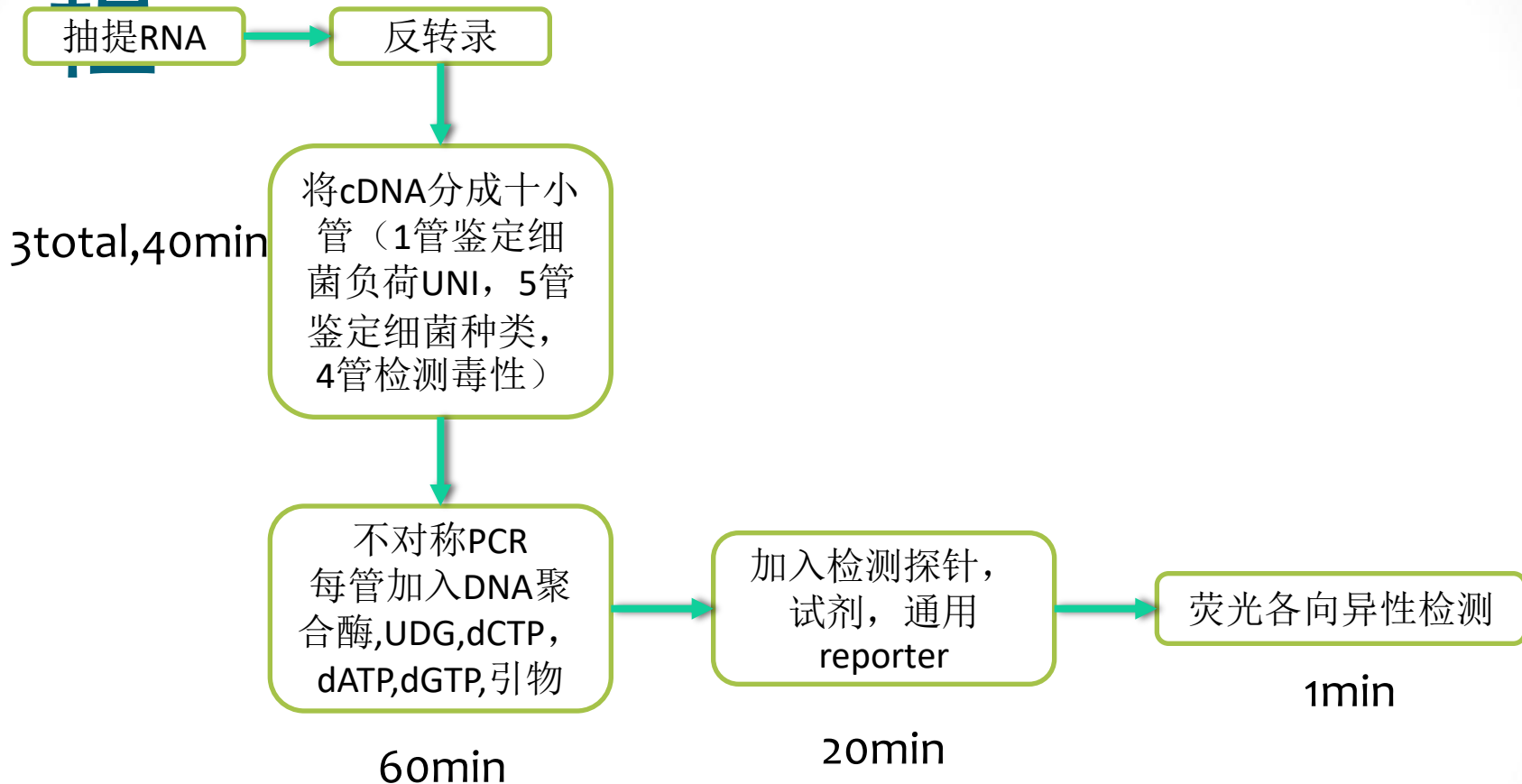
反思

- 本研究中的以下限制。首先，没有发现临床样品含有耐药菌株。需要对更大的队列进行进一步研究以验证PAD的耐药性筛选能力。第二，当目标NA重叠时，PAD可能存在不明确的结果。比如细菌中的基因AB发生突变等。这种不完全分类是基于NA的测试的固有问题。这个问题要通过全基因组测序得到更多的细菌基因组数据。



临床样本检测总试验流程

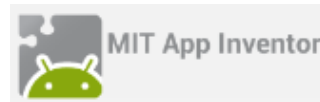
程



For me

三个问题

- **创新点：**使用“物种指纹”对不同种致病菌进行分类检测评估，类似于化学信息学的分子指纹。
- **对我的启发：**
 - 1、发现了一个“傻瓜式”制作Android application的网址：[MIT App Inventor](#)
 - 2、“零部件”整合在一起，不是简单的堆叠，需要内部逻辑的优化。
- **需改进的地方：**
 - 1、没有告知一次性样品管使用后如何处理。（如果未经生物灭活销毁处理，是否有可能造成二次污染）
 - 2、如文中所述，某些非常见医疗致病菌PAD系统并没有检测出。所以这个系统局限在医疗场合使用，不能扩展用于出入境口岸等存在新型致病菌输入的地区进行检验。





App Inventor is now in **Brazilian Portuguese!**

Google Custom Search input field with a search button.

Florida Middle Schoolers Create App to Combat Concussions



Get Involved with MIT App Inventor

Tweets by @MITAppInventor

MIT App Inventor Retweeted
 Andrea WilsonVazquez @wilsandrea
 Educator app challenge in process!!
 #mncodes @MITAppInventor



Active Users This Month: **371.3K** Active Users This Week: **184.4K**

Registered Users: **5.5M** Countries: **195** Apps Built: **18.1M**

App Inventor code is **open source**

Teach



Teachers, find out about curriculum and teaching resources.

Teach

Forums











Join community forums to get answers to your questions.

Forums






Blocks

Built-in

-  Control
-  Logic
-  Math
-  Text
-  Lists
-  Colors
-  Variables
-  Procedures

Screen1

-  Label1
-  Image1
-  Label2
- CheckBox1
- CheckBox2
- CheckBox3
- CheckBox4

Any component

Rename Delete

Media

114.jpg

Upload File ...

Viewer

```

if  if  CheckBox4 . Changed
then
  set  CheckBox4 . BackgroundColor to 
  for each number from 1 to 5 by 1
  do
  for each item in list
  do
  while test
  do
  if
  then
  else
  do
  result
  evaluate but ignore result
  open another screen screenName
  open another screen with start value screenName
  startValue
  Show Warnings
  get start value

```



percent to

pick a random item list



"not found"



App开发 其实也不是很难！



Thanks for all your time ;)