



AF BIOANALYTIKER ULLA HOLST LARSEN, PATOLOGIAFDELINGEN, HERLEV HOSPITAL OG BIOANALYTIKER CAMILLA CHRISTENSEN, KLINISK FYSIOLOGISK/NUKLEARMEDICINSK AFDELING, FREDERIKSBERG HOSPITAL.

Detektion af bakterier i gelfyldninger

Bachelorprojekt viser, at Uni-Bact-FISH er den bedste metode til at diagnosticere bakterielle infektioner hos patienter, der har fået kosmetiske behandlinger i form af gelinjektioner i ansigtet

Abstract: Formålet med bachelorprojektet var dels at optimere metoden Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH) til detektion af bakterier, således at metoden kunne påvise bakterier mere sensitivt end GRAM-farvningen, dels at indkøre/implementere metoden på Bispebjerg Hospitals (BBH) Patologiafdeling til visualisering af bakterier i forbindelse med plastikkirurgiske implantater i hud. Udgangspunktet var en FISH-protokol fra Statens Serum Institut (SSI), og projektet viste, at det med en reduceret probemængde var muligt på BBH at visualisere bakterier i formalinfixeret paraffinindstøbt væv mere sensitivt end med GRAM og endda mere sensitivt end med PCR.

I dag er det blevet mere almindeligt at få foretaget kosmetiske behandlinger på private klinikker i form af injektion af gelfyldninger i ansigtet. I forbindelse med behandlingen kan der opstå komplikationer såsom inflammation(1, se billede 1). En overlæge på BBH arbejder med et projekt, hvor hun bl.a. ønsker at undersøge, om disse inflammationer er forårsaget af bakterielle infektioner. Det er i nogle tilfælde uvist, om inflammationen skyldes en bakteriel infektion eller en allergisk reaktion. Er inflammationen opstået pga. en bakteriel infektion, kan denne skyldes nonpatogene bakterier, som føres ind i den underliggende hud under injektionen. For at fin-

de den rette behandling er det vigtigt, at diagnosticeringen er korrekt.

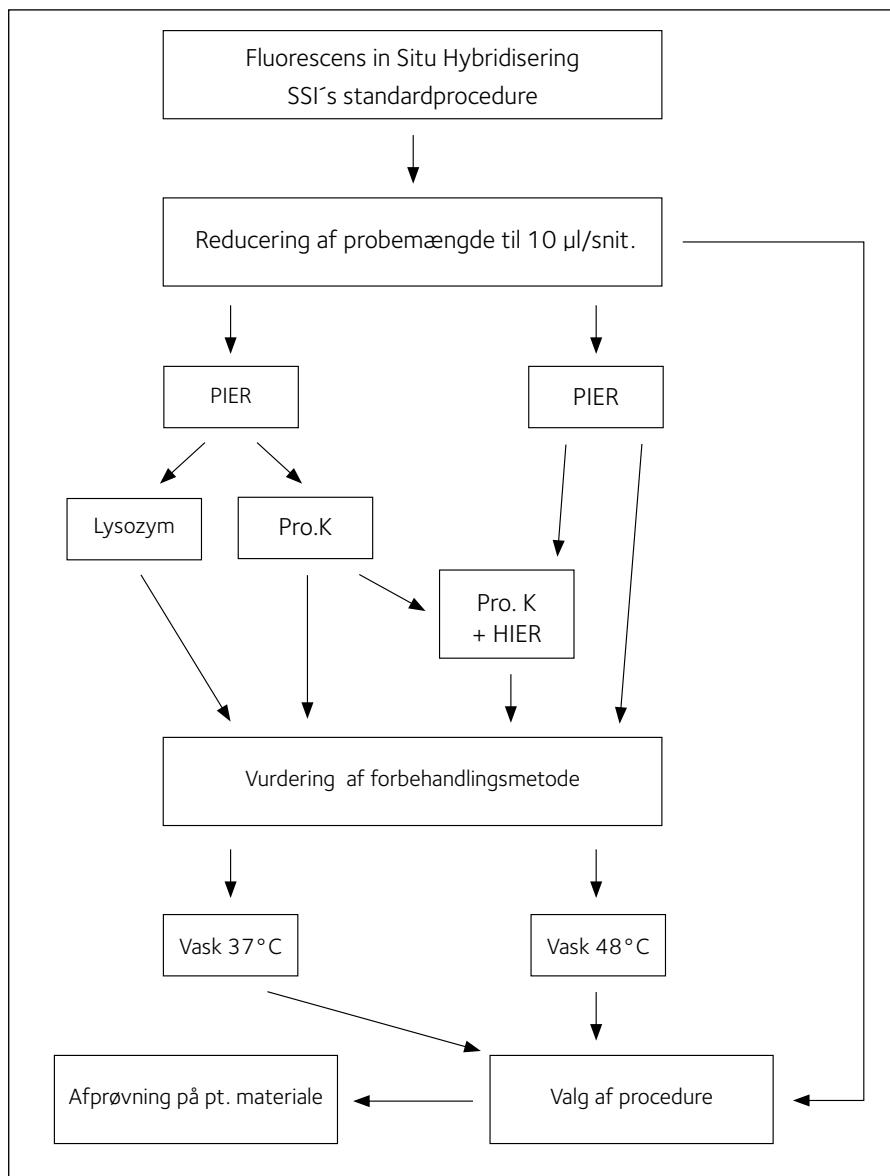
Nogle bakterier er vanskelige at dyrke(3), og man må derfor forsøge sig med andre metoder for at detektere bakterierne. GRAM er en meget udbredt farvning til påvisning af bakterier i væv, men en visualisering af de kun ca. 1 µm lange bakterier og deres morfologi blandt de andre vævskomponenter kan være vanskelig. FISH har vist sig at være en særdeles velegnet metode, da visualiseringen af bakterierne sker i form af et fluorescerende signal(4) på mørk baggrund. Dette gør det muligt at se størrelse, morfologi og antal(4).

FISH er en metode, som er baseret på In Situ Hybridiseringsteknikken (ISH), og ved detektion af bakterielt rRNA benyttes fluorochrom-mærkede prober. En probe er en bestemt rækkefølge af baser, som er komplementært til en sekvens i bakteriens rRNA (16S). Derved er det vha. fluorochromet muligt at påvise de fleste typer bakterier.

Da der på BBH's Patologiafdeling ikke fandtes en procedure for FISH til bakterier, tog vi udgangspunkt i en procedure fra SSI. Proceduren indeholder følgende fire trin: Afparaffinerings, hybridisering, stringensvask og montering. Efter afparaffineringen tilsættes proben, som under hybridiseringen binder sig til den komplementære sekvens på det bakterielle rRNA. Under stringensvasken skylles overskydende samt uspecifik bunden probe væk. Objektglassene monte-

res med et monteringsmiddel, som er specielt velegnet ved brug af fluorescerende prober.

Vi valgte at forsøge at optimere FISH-analysen m.h.p. at øge sensitiviteten og specificiteten ved dels at indføre forbedring før hybridiseringen med både PIER (Protease Induced Epitope Retrieval) og HIER (Heat Induced Epitope Retrieval), dels at minimere mængden af probeopløsning. Desuden afprøvede vi en temperaturstigning i stringensvasken fra 37°C til 48°C. Forbehandlingerne har til formål at gøre bakterielt rRNA mere tilgængeligt for proben, hvilket kan føre til en højere sensitivitet. Ved forbehandling med PIER anvendes Proteinase K, som spalter peptidbindinger og Lysozym, som spalter peptidoglycanlaget i de GRAM-positive bakterier. Ved HIER anvendte vi BBH's TEG-buffer med en pH på 9. Det menes, at forbehandling med HIER bryder methenbroer mellem proteinerne, som dannes under fikseringen(5,s.20). Hensigten med at øge temperaturen ved stringensvasken er et forsøg på at gøre metoden mere specifik dvs. mere stringent. En metodes stringens bestemmes ud fra, hvor mange af probens baser der hybridiserer komplementært til målsekvensens baser, samt hvor mange der ikke er komplementære (mismatches)(6). Dette betyder, at der ved højstringente forhold er få mismatches og omvendt ved lavstringente forhold.



Figur 1: Flowdiagram

Figuren viser en oversigt over de udførte forsøg. Først reduceres mængden af probeopløsningen, og derefter indføres de forskellige forbehandlinger, og resultaterne af disse sammenholdes med resultatet med standardproceduren i forhold til sensitiviteten. Ved en øget temperatur af stringensvasken fra 37°C til 48°C vurderes specificiteten i forhold til standardproceduren. Ud fra resultaterne vælges den optimale procedure, som afprøves på patientmateriale.

omkringliggende væv samt mængden af bakterier i forhold til GRAM af snit fra samme serie fra multiblokken. For hver parameter gav det mest optimale resultat højeste score, og for hvert præparat udregnede en samlet score, der blev brugt til at vurdere, hvilke procedurer der var mest sensitive og specifikke.

Vi mikroskoperede præparaterne på CVU Øresunds udviklingslaboratorium, hvor Olympus havde stillet et fluorescensmikroskop med kamera samt tilhørende software til rådighed, så vi havde mulighed for at tage billeder af snittene og dermed dokumentere vores resultater.

Resultater/diskussion

Mængde af probeopløsning:

I proceduren fra SSI anvendes en probemængde på 50 µl pr. snit. Ved første forsøg reducerede vi denne mængde til 10 µl pr. snit med dækglass. Det viste sig, at denne probemængde var tilstrækkelig, da det gav et tilsvarende resultat og ikke forringede sensitiviteten.

Forbehandling:

Forbehandling med PIER viste for begge enzymer ingen forbedring af sensitiviteten i forhold til resultaterne af standardproceduren. Vi mener, at grunden til dette resultat er, at proben Uni-bact med sine 18 baser er meget kort og derfor let kan trænge igennem proteinnettet i vævet samt peptidoglycanlaget i de GRAM-positive bakteriers cellevæg.

Forbehandlingen med HIER viste en nedsat sensitivitet i forhold til standardproceduren. For at vurdere om kogningen havde ført til en reduktion i mængden af bakterier, blev et snit fra multiblokken forbehandlet med HIER og derefter farvet med GRAM. Det viste sig, at mængden af bakterier var mindre, hvilket formentlig skyldes, at bakteriernes cellevæg er kogt i stykker, og bakterielt rRNA dermed er vasket ud. Denne forbehandling er derfor ikke velegnet til detektion af bakterier i formalinfixeret paraffinindstøbt væv.

Metode

Forsøgene blev udført på seriesnit af formalinfixeret paraffinindstøbt væv fra en konstrueret multiblok indeholdende vævsstykker med hhv. høj, middel, lav og ingen forekomst af bakterier. Hensigten med variationen af mængden af bakterier i multiblokken er at kunne vurdere metodens sensitivitet, dvs. hvor små bakteriemængder metoden kan påvise.

Til samtlige forsøg benyttedes en Cy3-mærket oligonukleotid probe 'Uni-bact' (fra MWG Oligo Synthesis), som valgtes ud fra det kriterium, at den skal være universel, dvs. at den kan detektere alle bakterier.

Første og sidste snit fra hver serie blev farvet med hhv. Hæmatoxylin Eosin (HE) og GRAM, og på de mellem-liggende to snit blev der udført FISH.

I figur 1 er skitseret et flowdiagram over optimeringsforsøgene. Ved første forsøg fandt vi frem til, at en mængde af probeopløsning på 10 µl pr. glas med en koncentration på 2,5 ng/µl var til-

strækkelig i forhold til de oprindelige 50 µl pr. glas. Denne mængde benyttes derfor ved alle forsøg. Ved forbehandlingerne tog vi udgangspunkt i eksisterende procedurer fra BBH's Patologiafdeling. Ved alle forsøg blev der hybridiseret i 23 timer ved 37°C, og der vaskes i hybridiserings- og vaskebuffer i hhv. 20 og 15 min. Efter vask blev glassene dyppet i MQ-vand, og efter lufttørring monteres de med vectashield monteringsmiddel.

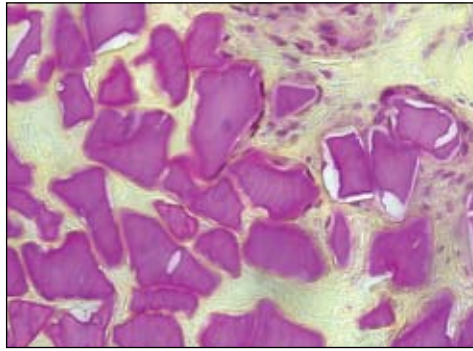
Den mest optimale procedure (Uni-bact-FISH) blev afprøvet på biopsier fra 10 patienter, hvor der var mistanke om bakteriel infektion opstået efter injektion af gelfyldninger. Samme patientprøver blev farvet med GRAM samt afprøvet med PCR på SSI. Dermed var det muligt at sammenligne Uni-bact-FISH med GRAM og PCR.

Vurderingsmetode

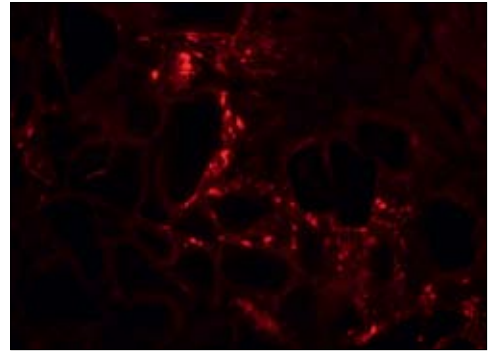
Den oprindelige SSI-protokol og alle optimeringsforsøgene blev vurderet i en skala fra 0-3 mht. lysintensiteten i det specifikke signal, lysintensiteten i det



Billede 1: Inflammation(2)
Billedet viser en patient med opstået inflammation omkring næse og mund efter injektion af gelfyldninger.



Billede 2: GRAM x 400
Gramfarvning af snit fra patient med opstået inflammation efter injektion af gelfyldninger. Gelfyldningerne fremstår som lyserøde plamager. Herudover ses cellekerner samt omkringliggende væv. Her er det ikke muligt at identificere bakterierne.



Billede 3: Uni-bact-FISH x 400
Uni-bact-FISH udført på snit fra samme patient fra samme område i vævet. Bakterierne fremstår som lysende prikker lejret rundt om gelfyldningerne, der ses som mørke plamager.

>>>

Stringensvask:

I forsøget hvor temperaturen i stringensvasken hæves fra 37°C til 48°C, viste resultatet en lavere sensitivitet, men en højere specificitet. Årsagen til resultatet er, at når temperaturen hæves, bliver metoden mere stringent og vil derfor mindske procentdelen af mismatches. Dette vil sige, at bakterier med et forholdsvis højt antal mismatches i målsekvensen ikke vil blive påvist ved en højere stringens. Dermed risikerer man, at bakterierne ikke detekteres i prøver med lav forekomst af bakterier, hvilket kan medføre fejldiagnosticering. Det er derfor ikke hensigtsmæssigt at gøre metoden mere stringent, da sensitiviteten prioriteres højere end specificiteten ved anvendelse af en universel probe.

Til sammenligning med GRAM er Uni-bact-FISH en mere velegnet metode til detektion af bakterier i formalinfikseret, paraffinindstøbt væv, idet den kan detektere flere bakterier. Endvidere er bakteriernes morfologi mere synlig ved FISH end ved GRAM. Dette er tilsammen en fordel ved detektion af bakterier i væv, som er inflammeret, og hvor forekomsten af bl.a. granulocytter er høj, hvilket gør bakterierne svære at se ved en GRAM (se billede 2 og 3).

FISH-proceduren er til gengæld mere tidskrævende, og det er nødvendigt, at mikroskoperingen foregår i mørke med et fluorescensmikroskop. Da fluorescensen aftager med tiden, er det derfor ikke muligt at arkivere resultaterne igennem længere tid.

Afprøvning på patientmateriale:

På samtlige prøver fra patienter var der udført GRAM, hvor det ikke havde været

muligt at identificere bakterier med tilstrækkelig sikkerhed. Uni-bact-FISH påviste bakterier i 8 ud af de 10 patientprøver. For at sikre, at Uni-bact-FISH giver et troværdigt resultat og kun påviser bakterier, anvendtes et snit fra multiblokken som kontrol.

Endvidere påviste PCR bakterier i 4 ud af de 10 patientprøver. Her er det dog ikke muligt at se, hvor i vævet bakterierne befinder sig i modsætning til FISH.

Konklusion

Uni-bact-FISH med 10 µl probeopløsning pr. snit viste sig at give det mest optimale resultat til detektion af bakterier i formalinfikseret paraffinindstøbt væv.

Ved anvendelse af en universel oligonukleotid probe har det vist sig at være unødvendigt at indføre en forbehandling. Derudover er det ikke hensigtsmæssigt at øge stringensen og dermed nedsætte sensitiviteten, da en lav stringens og en høj sensitivitet her er at foretrække.

FISH har vist sig at være en mere sensitiv metode end GRAM og PCR ved detektion af bakterier i formalinfikseret paraffinindstøbt væv og kan uden vanskeligheder implementeres på Bispebjerg Hospitals Patologiafdeling.



REFERENCELISTE

- 1: Narins R S, MD, Jeweel M, MD, Rubin M, MD, Cohen J, MD, Strobos J, MD. Clinical Conference: Management of Rare Events Following Dermal Fillers – Focal Necrosis and Angry Red Bumps. *Dermatol Surg* 2006; 32: 426-434.
- 2: Angus J.E., Affleck A.G., Leach I.H., Millard L.G. Two cases of delayed granulomatous reactions to the cosmetic filler Dermalive®, a hyaluronic acid and acrylic hydrogel: *British Journal of Dermatology* 2006; 154: 1074-1108.
- 3: Klitgaard K, Mølbak L, Jensen T K, Lindboe C F, Boye M. Laser capture microdissection of bacterial cells targeted by fluorescence in situ hybridization. *BioTechniques*. 2005 December; 39: 864-868.
- 4: Mörter A, Liest G, Rudolph R, Schrank K, Choi B K, Wagner M, Göbel U B. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions: *Microbiology* 1998; 144: 2459-2467.
- 5: Vyberg M. Anvendt histokemi. 6. udgave. Bioanalytikeruddannelsen København, 2005.
- 6: Schwarzbacher T, Heslop-Harrison P. Practical in situ Hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, 2000.

Hovedvejleder: Inger Lindebo Holm, Bioanalytikeruddannelsen København
Klinisk vejleder: Anette Lykke, tidligere underviser på Bispebjerg Hospitals patologiafdeling