

MALDI Sepsityper Kit

Direkte oprensning og identifikation af bakterier i blodet

Introduktion

Bakteriæmi kan udvikle svær akut sygdom som sepsis og septisk chok, som er de hyppigste dødsårsager blandt patienter på hospitaler. I Danmark udvikler ca. 12.000 danskere sepsis hvert år, 2.000 af disse dør af sygdommen, og 5% af indlagte patienter på hospitaler har bakteriæmi. I USA er sepsis konsekvent omtalt som en af de 10 hyppigste dødsårsager og tegnede sig for 35.587 dødsfald i 2009. I Australien varierer dødeligheden på hospitaler for patienter med septisk chok fra 23,1 til 27,6%. Denne sygdom har længe været et meget alvorligt sundhedsproblem.^{1,2}

De hyppigste årsager til sepsis skyldes de bakterielle infektioner fulgt af virus, svampe eller parasitter. Typisk er det bakterierne *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* og *Escherichia coli*, der er skyld i udviklingen af sepsis. Andre bakterier kan være Koagulase-negative stafylokokker (KNS), Enterokokker, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Legionella* spp. og *P. aeruginosa*.³

På Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Hvidovre Hospital (KMA, Hvidovre Hospital), anvendes den konventionelle metode, hvilket bl.a. består i mikroskopering af grampræparater, udsåning og efterfølgende biokemiske test og PNA-Fish. Til sidst identificeres de fremdyrkede bakterier på agar-pladerne bl.a. på MALDI-TOF-MS, Vitek 2, PNA-Fish-forgæring. Nogle af disse konventionelle metoder kan tage op til 5 døgn, før man efterfølgende kan identificere bakteriernes (patogene) artsniveau.

Bruger Daltonik har fremstillet en ny metode, "MALDI Sepsityper Kit", hvilket er en oprensningssprocedure, som gør det muligt at identificere både gramnegative bakterier, grampositive bakterier og svampe til artsniveau direkte fra positive bloddyrkningskolber inden for ca. 1 time. MALDI Sepsityper Kit betegner prøvebehandling, oprensning og ekstraktion. Efter oprensningssproceduren identificeres prøvematerialet på MALDI-TOF-MS.⁴

Formålet med studiet er at undersøge, hvor høj den diagnostiske sensitivitet for hhv. MALDI Sepsityper Kit med og uden BHI-opformeringsmedie er i forhold til den konventionelle rutinediagnostik som referencemetode til påvisning af bakterier og svampe i blodet.

I dette studie anvendes to metoder:

Metode 1 er almindelig MALDI Sepsityper Kit uden opformeringsmedie, hvilket tager ca. 1 time.

Metode 2 er MALDI Sepsityper Kit med BHI-opformeringsmedie (*Brain Heart Infusion*), hvilket tager ca. 4 timer.

Materialer og metoder

Metode 1 – MALDI Sepsityper Kit uden opformeringsmedie

Først overføres der 1 ml prøvemateriale i et eppendorfrør, hvor 200 µl Lysis Buffer tilsættes. Prøven blandes med Vortexmixer i 10 sekunder. Der overføres 800 µl af denne mikstur til et Sig-

ma-Filter og centrifugeres i 2 min. ved 2.000 rpm. Eppendorfrørsfiltret smides ud, og filtratet centrifugeres i 2 min. ved 13.000 rpm. Supernatanten fjernes ved afpipettering, og pellet opløses i 1 ml Washing Buffer ved at pipettere op og ned, hvorefter der centrifugeres i 1 minut ved 13.000 rpm. Derefter fjernes supernatanten ved afpipettering, og der tilsættes 300 µl deioniseret vand. Dernæst udføres ekstrahering.⁵

Metode 2 – MALDI Sepsityper Kit med opformeringsmedie

2 ml prøvemateriale afpipetteres i opformeringsmedie (BHI-bouillon) og blandes. Derefter inkuberes opformeringsmediet i 3 timer i CO₂-skab (35 °C). Opformeringsmediet tages ud fra CO₂-skab og rystes. 1 ml prøvemateriale afpipetteres i et eppendorfrør, derefter gentages den samme procedure som fra metode 1.

Ekstrahering

900 µl 99% ethanol tilsættes til opløsningen og mikses. Der-

efter centrifugeres prøven i 2 min ved

13.000 rpm, og supernatanten fjernes. Prøven centrifugeres igen i 2 min

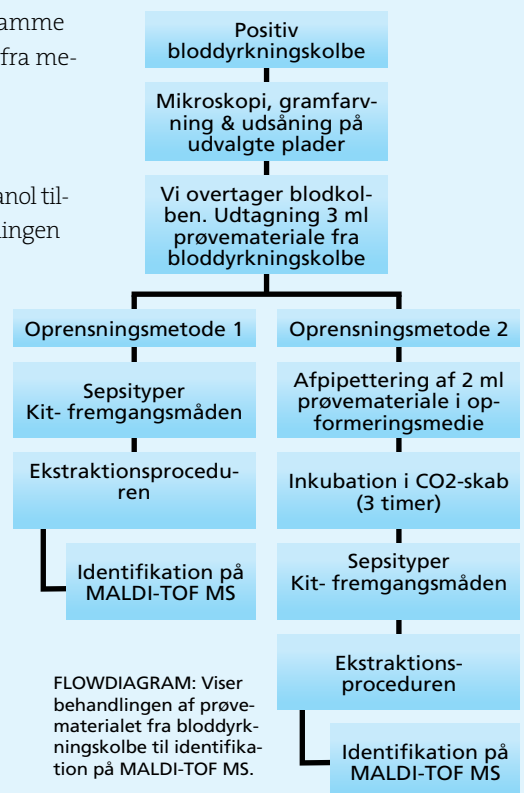
ved 13.000 rpm, hvor supernatant afpipetteres, så

der kun er pellet tilbage, og som skal tørre helt ud. 2-50 µl

70% myresyre (FA) tilsættes, opløsning mikses. Derefter tilsættes 2-50 µl 100% acetonitril (ACN), opløsning mikses. Til sidst centrifugeres prøven i 2 min. ved 13.000 rpm.

Kriterier for datavurdering

MALDI-TOF MS identificerer bakterier ved at udgive en scoreværdi, hvilket afgør, om de bliver identificeret ved artsniveau, slægtsniveau eller ingen identifikation. For MALDI Sepsityper Kit og efterfølgende identifikation på MALDI-TOF MS på Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Hvidovre Hospital, godkendes scoreværdier $\geq 1,9$, og alt $< 1,9$ godkendes ikke.



Resultater

Metode 1						
Bakterienavn	Antal identificerede bakterier – konventionel metode	Antal identificeret bakterier – Metode 1	Identifikation til scoreværdi $\geq 1,9$	Identifikation til scoreværdi $< 1,9$ (rigtig identifikation af artsnavn)	Identifikation til scoreværdi $< 1,9$ (forkert identifikation i forhold til den konventionelle metode)	Sensitivitet (bakterier med scoreværdi $\geq 1,9$)
Gramnegative stave:						
<i>Escherichia coli</i>	34	34/34	33/34	1/34	0/34	97%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	8/8	7/8	1/8	0/8	88%
<i>Citrobacter sp.</i>	3	3/3	2/3	1/3	0/3	67%
<i>Hæmophilus influenzae</i>	4	3/4	0/4	1/4	2/4	0%
<i>Bacteriodes Fragilis</i>	1	1/1	0/1	0/1	1/1	0%
I alt:	50	98%	84%	8%	6%	
Grampositive stave:						
<i>Propionibacterium acnes</i>	5	4/5	1/5	1/5	2/5	20%
<i>Clostridium perfringens</i>	1	1/1	1/1	0/1	0/1	100%
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	2	1/2	0/2	1/2	0/2	0%
<i>Corynebacterium sp.</i>	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0%
I alt:	9	67%	22%	22%	22%	
Grampositive kokker i hobe:						
Koagulase negativ Stafylokokker	22	19/22	10/22	6/22	3/22	45%
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	14/14	10/14	4/14	0/14	71%
I alt:	36	92%	56%	28%	8%	
Grampositive kokker i kæde:						
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4	3/4	0/4	2/4	1/4	0%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2/2	1/2	1/2	0/2	50%
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	1/1	0/1	1/1	0/1	0%
<i>Streptococcus sanguinis</i>	2	2/2	0/2	2/2	0/2	0%
I alt:	9	89%	11%	67%	11%	
Gærsvampe:						
<i>Candida albicans</i>	1	1/1	0/1	0/1	1/1	0%
I alt:	1	100%	0%	0%	100%	
Antal i alt	105	92%	62%	21%	10%	

Metode 2						
Bakterienavn	Antal identificerede bakterier – konventionel metode	Antal identificeret bakterier – Metode 2	Identifikation til scoreværdi $\geq 1,9$	Identifikation til scoreværdi $< 1,9$ (rigtig identifikation af artsnavn)	Identifikation til scoreværdi $< 1,9$ (forkert identifikation i forhold til den konventionelle metode)	Sensitivitet (bakterier med scoreværdi $\geq 1,9$)
Gramnegative stave:						
<i>Escherichia coli</i>	34	34/34	34/34	0/34	0/34	100%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	8/8	8/8	0/8	0/8	100%
<i>Citrobacter sp.</i>	3	3/3	3/3	0/3	0/3	100%
<i>Hæmophilus influenzae</i>	4	2/4	0/4	0/4	2/4	0%
<i>Bacteriodes Fragilis</i>	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0%
I alt:	50	94%	90%	0%	4%	
Grampositive stave:						
<i>Propionibacterium acnes</i>	5	3/5	2/5	0/5	1/5	40%
<i>Clostridium perfringens</i>	1	1/1	1/1	0/1	0/1	100%
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	2	1/2	0/2	1/2	0/2	0%
<i>Corynebacterium sp.</i>	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0%
I alt:	9	56%	33%	11%	11%	
Grampositive kokker i hobe:						
Koagulase negativ Stafylokokker	22	19/22	13/22	4/22	2/22	59%
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	14/14	13/14	1/14	0/14	93%
I alt:	36	92%	72%	14%	6%	
Grampositive kokker i kæde:						
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4	3/4	1/4	2/4	0/4	25%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2/2	2/2	0/2	0/2	100%
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	1/1	0/1	1/1	0/1	0%
<i>Streptococcus sanguinis</i>	2	2/2	1/2	1/2	0/2	50%
I alt:	9	89%	44%	44%	0%	
Gærsvampe:						
<i>Candida albicans</i>	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0%
I alt:	1	0%	0%	0%	0%	
Antal i alt	105	89%	74%	10%	5%	

Diskussion

Ved brug af MALDI Sepsityper Kit blev i alt 92% bloddyrkningskolber identificeret ved metode 1, hvor i alt 62% af bakterierne opnåede en scoreværdi på ffl 1,9. Ved metode 2 blev 89% identificeret, hvor 74% opnåede en scoreværdi på ffl 1,9 (se tabel 1 og 2).

I resultaterne fra begge oprensningsmetoder ses, at MALDI-TOF MS opnår højere scoreværdier ved identificering af gramnegative i forhold til grampositive bakterier. Det kan måske skyldes cellevægsstrukturens opbygning, idet gramnegative bakteriers cellevæg er omgivet af et tyndt lag *peptidglycan*, som vha. lipoproteiner er hæftet til *peptidoglycan*lagte. Desuden har gramnegative bakterier en ekstra membran, som indeholder *lipopolysakkarid*, dette gør det lettere at ekstrahere proteinerne fra bakterieceller.

Sammenlignet med gramnegative bakterier er grampositive bakterier omgivet af et tykkere lag *peptidoglycan* med celledspecifikke *polysakkarider* og *lipoteichonsyre* og ingen ydre membran, som gør det vanskeligere at ekstrahere proteinerne. Derfor kunne man vælge at anvende en anden slags syrer til ekstraktion i håb om en forbedret nedbrydning af cellevæggen.

De lave scoreværdier kan også skyldes oprensningsmetoden, altså isolering af bakterier fra prøvematerialet. Der er mange parametre under oprensnings- og ekstraktionsmetoden, som kan være afgørende for de lave scoreværdier eller ingen identifikationer. Først og fremmest er problemet, at man skal anvende myresyre ud fra et skøn (mellem 2-50 µl). Myresyre anvendes til ekstraktion, og det kan tænkes, at for meget eller for lidt kan have betydning for scoreværdien. I punkt 6 i ekstraktionsproceduren skal man tilsætte myresyre ud fra en vurdering af, hvor meget materiale der er at arbejde med.

I nogle tilfælde var det svært at få øje på pellet (bundfald) og at se, hvor mange bakterier der var i eppendorfrøret efter en oprensningsmetode. Det var vanskeligt at fjerne alt det, som ikke var bakterielt materiale, da man ikke har et øjemål for det.

Man kan overveje, om det er oprensningsmetoden, der er dårlig, eller om det er ekstraktionsprocessen, som skal optimeres for de grampositive bakterier. Det kan også være, at MALDI-TOF MS har den svaghed, at den er dårlig til grampositive bakterier. Der er nogle begrænsninger ved MALDI-TOF MS-identifikationer, idet MALDI-TOF MS-database ikke omfatter alle de mikroorganismer, som er i prøverne, og dermed ikke kan identificeres. Dette ses ved laboratorieinstruks for KMA, Hvidovre hospital (MALDI-TOF MS-restriktioner). Her ses, at MALDI-TOF MS har svært ved at give ID-navn på nogle grampositive bakterier, f.eks. *Propionibacterium* og *Corynebakterier*, og hvis der opnås identifikation på MALDI-TOF MS, så må disse bakteriesvar ikke udgives.

Ifølge Prod'hom et al., 2010, kunne 78,7% positive bloddyrkninger identificeres på MALDI-TOF MS. 83% var gramnegative bakterier, og 42% var grampositive bakterier, som blev identificeret til scoreværdi på ffl 2,0. Artiklen har brugt en helt anden metode til isolering af bakterier, lysning af blodceller. Artiklen beskriver nogle vigtige punkter, som siger noget om, hvorfor MALDI-TOF MS har svært ved at identificere nogle grampositi-

ve bakterier.⁶ I deres artikel beskriver de, at forskellen i MALDI-TOF MS-spektre ikke er ret store mellem nogle bakterier (forskellige arter af *Streptokokker* (*S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. oralis*), *Stafylokokker* og andre arter af *Koagulase-negative Stafylokokker*), derfor kan MALDI-TOF MS ikke kende forskel og ikke foretage identifikationer. En anden faktor, som gør, at grampositive bakterier er vanskeligere at identificere, kan være cellevæggen sammensætning ved de grampositive bakterier, som giver øget resistens mod lysning. Her bekræftes problematikken med identificering af *Streptokokker* og *stafylokokker*, dette stemmer overens med vores resultater.

Konklusion

Ud fra de 105 positive bloddyrkningskolber opnåede metode 1 43% identificerede grampositive bakterier og 84% gramnegative bakterier. Metode 2 identificerede 61% grampositive bakterier og 90% gramnegative, dvs. at metode 2 identificerede flest bakterier korrekt til artsniveau.

Metode 1 viste en høj sensitivitet på 88% for *Klebsiella pneumoniae* og 97% for *Escherichia coli*, hvor metode 2 viste en høj sensitivitet på 100% for *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* og *Citrobacter sp.*

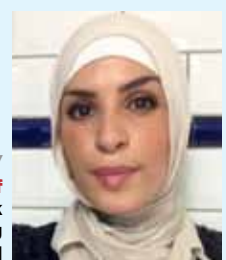
Begge metoder opnåede en høj diagnostisk sensitivitet for MALDI Sepsityper Kit hvad angår de gramnegative bakterier i forhold til de grampositive bakterier analyseret på MALDI-TOF-MS sammenlignet med den konventionelle rutinediagnostik. Derimod var der en undtagelse for *Staphylococcus aureus*, som viste en høj sensitivitet på 93% for metode 2. ▣

Referenceliste

1. Jen Kok, Lee C. Thomas, Thomas Olma, Sharon C.A. Chen, Jonathan R. Iredell (2011): *Identification of Bacteria in Blood Culture Broths Using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Sepsityper™ and Time of Flight Mass Spectrometry*. *PLoS ONE*; 6(8):e23285.
2. Jensen, Dorthe, Nibro, Helle (10. september 2010): "Tidlig opsporing af sepsis redder liv" (på dansk). *Fagbladet Sygeplejersken* (15/2010).
3. Kjeldsen K., Nielsen L.P., Peterslund N.A., Tvede M. (2006): *Infektionssygdomme og mikrobiologi*. Akademisk Forlag.
4. Bruker Daltonik GmbH, MALDI Sepsityper Kit.
5. KMA 445, Hvidovre Hospital, MALDI-TOF, laboratorieinstruks.
6. Prod'hom G., Bizzini A., Durussel C., Bille J., Greub G. (2010): *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets*. *J Clin Microbiol*; 48:1481-3.



Af bioanalytiker //
Atyaf Hamza
Klinisk Biokemisk
Afdeling
Herlev Hospital



Af bioanalytiker //
Farah Zarif
Klinisk Biokemisk
Afdeling
Hvidovre Hospital