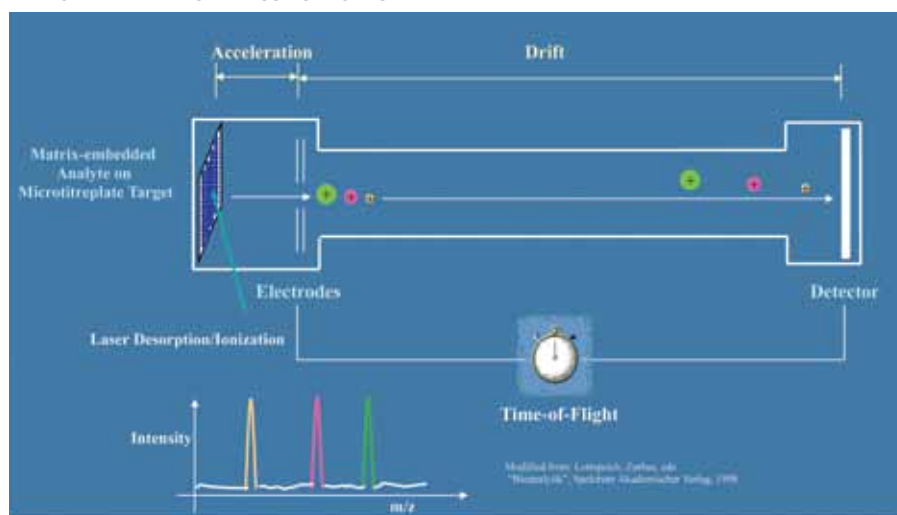


# MALDI-TOF: Diagnose samme dag.

MALDI-TOF MS, Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, er en hurtig metode til identifikation af mikroorganismer på det klinisk mikrobiologiske rutinelaboratorium.

## PRINCIP: MALDI-TOF MASSE SPECTROMETRI



Billedet illustrerer analyseprincippet i MALDI-TOF mht. sammenhængen imellem proteinernes størrelse og "flyvetid" samt deres forskellige spektre. Metalpladen kan tage 96 prøver ad gangen.

I rigtig mange år har man benyttet sig af de traditionelle forgeringsrækker eller biokemiske test til identifikation af bakterier i det klinisk mikrobiologiske rutinelaboratorium, og det tager fra 2-7 døgn, før der er en identifikation. Nye molekylærbiologiske metoder er forsøgt såsom PCR, Polymerase Chain Reaction, der er en meget sikker metode til identifikation af bakterier og svampe, men også dyr.

Således er der ikke rigtig sket noget revolutionerende i det mikrobiologiske laboratorium i årtier, og dette har medført, at de mikrobiologiske afdelinger har søgt efter en ny og hurtig diagnostik.

MALDI-TOF MS er den nye metode, som mange klinisk mikrobiologisk afdelinger i Danmark er begyndt at bruge til identifikation rutinemæssigt. Metoden er nem at anvende, og den er en rentabel måde til identifikation af aerobe og anaerobe bakterier samt svampe. MALDI-TOF instrumentet på Hillerød Klinisk Mikrobiologiske afdeling er valideret og implementeret til brug i rutinelaboratoriet i første halvdel af 2010.

### Direkte identifikation fra koloni

Identifikation kan udføres direkte fra en enkelt koloni, der er dyrket frem på en agarplade.

Der afsættes noget kolonimateriale med en tandstik direkte på stålpladen, kaldet targetpladen, som en tynd film. Herefter påsættes 1µl matrix, og når materialet er tørt, kan targetpladen indsættes til analysering i MALDI-TOF MS.

I maskinen bliver proteinerne frigjort i en ioniseret form fra overfladen ved beskydning af de krystalliserede proteiner med laser. De ioniserede proteiner accelereres gennem et vakuumrør via et elektrisk felt, og når for enden en detektor. Denne flyvetid/time of flight er afhængig af proteinernes masse, hvor små ioniserede proteiner når detektoren hurtigere end de tungere proteiner. Herved genereres en profil som en slags fingeraftryk for den enkelte bakterieart.

Proteinprofil-spektret består af et antal proteintoppe/peaks. Dette bliver kaldt for bakteriens protein profil, som sammenlignes med spektre i en database, der på nuværende tidspunkt indeholder en bred variation af mulige patogener på ca. 3700 proteinprofiler af bakterier og ca. 300 svampeproteinprofiler. Denne software gør laboratoriet i stand til at identificere mikroorganismer, som normalt ikke forbindes med sygdomsfremkaldende bakterier.

Identifikation ved denne metode varer ca. 10 min.



Uddannelseskoordinator // **Hanne Kofod**  
Bioanalytikerunderviser // **Lene Leerbeck**  
Biolog // **Bettina Nonnemann**

Klinisk Mikrobiologisk Afdeling  
Hillerød Sygehus



Tv: Opstillingen i laboratoriet. MALDI-TOF fylder ikke mere end et køleskab.

Th: Her ses udstyret med fronten afmonteret.

### Indirekte via proteinekstrahering

Bakterier og svampe, der ikke kan identificeres ved den direkte metode, bliver proteinekstraheret. Det gælder eksempelvis Streptococcer, Corynebakterier eller udvalgte Staphylococcer. Ekstrahering kræver lidt mere analysearbejde, men identifikation tager dog ikke mere end ca. 30 min.

### Identifikation af gramnegative stave

På Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Hillerød Hospital arbejdes der nu rutinemæssigt med identifikation af gramnegative stave direkte fra positive bloddyrkningskolber via MALDI-TOF MS.

Her udføres centrifugeringer af blod fra kolben, så blodlegemer m.m. fjernes, og der dannes et bakterieholdigt sediment, som herefter påsættes targetpladen og analyseres.

Denne proces afkorter identifikationen af de gramnegative stave med minimum en dag.

De grampositive bakterier og svampe identificeres med den mere tidskrævende og dyrere identifikations metode PNA-FISH®, fluorescens *in situ* hybridization probes. PNA-FISH kan give identifikation på 90 min. på udvalgte grampositive coccer og svampe.

Det vurderes på afdelingen, at kombinationen af identifikationsmetoderne er af stor værdi i forhold til hurtigt at kunne målrettet behandling af infektion. Grampositive bakterier er kendt for at være notorisk mere vanskelige at identificere, hvorimod Gram negative bakterier har vist sig at være lette at identificere direkte fra positive blodkolber via MALDI-TOF MS. Derfor kan det med fordel bestemmes ud fra en standard Gram farvning, hvilken af metoderne der vælges.

### Fordele

MALDI-TOF MS fra BRUKER DALTONICS indeholder et brugervenligt software, som er let at anvende i det mikrobiologiske rutinelaboratorium.

Den normale identifikation er tidsmæssigt blevet minimeret kraftigt, og prøvesvar kan svares ud samme dag.

Især kan identifikation af anaerobe bakterier være tidskrævende, idet anaerobe bakterier vokser langsomt under iltfattede forhold og dernæst skal opsættes i tidskrævende forgæringsrækker. Nu er det muligt at identificere bakterien, så snart kolonien er vokset frem på pladen.

Det er en fordel ved den sekundære prøvebehandling at have viden om bakteriens vækst- og resistensforhold, og dermed kunne udvælge de optimale substrater og antibiotika. Specielt ved den direkte identifikation fra positive bloddyrkningskolber.

### Ulemper

MALDI-TOF MS gør det mikrobiologiske laboratorium apparaturafhængigt, og viden og færdigheder inden for traditionel bakteriologi og mykologi vil dermed uundgåeligt gå tabt.

Med MALDI-TOF MS teknologien er det ikke muligt at identificere flere forskellige bakterier i den samme prøve. Prøven skal være en monokultur, dvs. kun én slags bakterie i prøven. Dette er dog også tilfældet ved traditionel identifikation.

### Perspektiver

Ved identifikation med MALDI-TOF MS vurderer vi, at det i fremtiden vil kræve udvikling og fastholdelse af den bakteriologiske læring med fokus på videreuddannelse inden for basal morfologi, indledende test samt resistensforhold for mikroorganismer.

Fuldautomatisering af det mikrobiologiske laboratorium er på vej, og her vil MALDI-TOF eller lignende identifikationsudstyr indgå som en naturlig del.

Som beskrevet her i artiklen bruger vi i dag MALDI-TOF MS rutinemæssigt til identifikation af bakterier i alle de mikrobiologiske prøver fra bakteriekolonier, som vokser på agarsubstrat. Hertil identificeres der rutinemæssigt Gram negative bakterier direkte fra positive blodkolber. Identifikation af Gram positive bakterier ved hjælp af MALDI-TOF-MS er under udvikling. Det bliver interessant at se den fremtidige brug af MALDI-TOF MS i mikrobiologien, herunder hurtig direkte identifikation fra forskellige prøvematerialer samt påvisning af resistensmekanismer ved brug af MALDI-TOF MS. ▣