

MALDI-TOF MS: En mikrobiologisk revolusjon

BRUK AV massespektrometri har ført til store endringer i bakteriologisk og mykologisk diagnostikk; på få minutter avdekkes mikrobenes unike proteinspekter. Det er imidlertid viktig å kjenne til metodens begrensninger. Denne artikkelen presenterer en retrospektiv gjennomgang av resultater fra MALDI-TOF MS ved St. Olavs hospital, og gir et godt innblikk i bruksområdene for MALDI-TOF MS.

Av **ELISE NYBERG**¹, **KRISTINE NYBORG**²,
ANN MAGRITT LIBERG³, **ARSALAN**
MOGHEN⁴

E-post: elisenyb@gmail.com

I løpet av de senere årene har det i større grad blitt tatt i bruk automatiserte identifikasjonsmetoder på mikrobiologiske laboratorier. Metoder for identifisering av bakterier og gjærsopp har ført til en drastisk nedgang i analysetiden.

Et eksempel på en slik analysemetode er Matrix Assisted Laser Desorp-

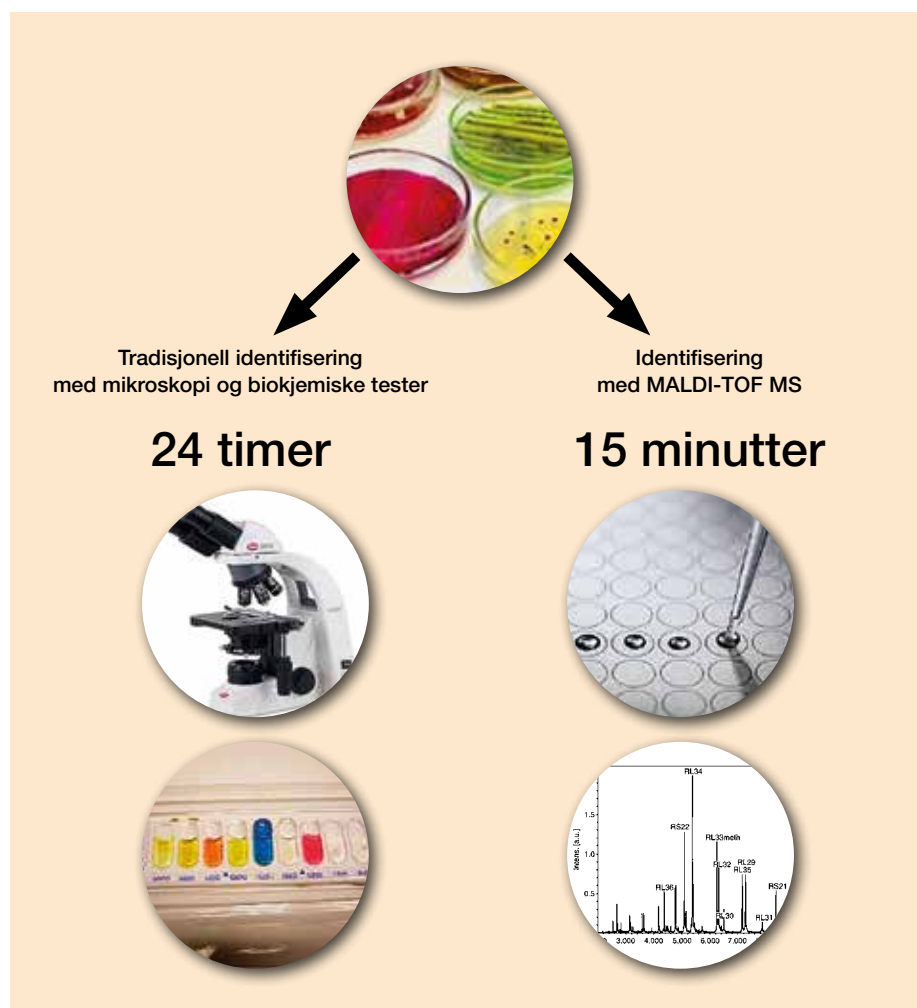
Artikkelen er basert på en bacheloroppgave utført ved Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi ved St. Olavs Hospital (AMM).

1. Bioingeniør, Avdeling for laboratoriemedisin, St. Olavs hospital.

2. Bioingeniør, Avdeling for laboratoriemedisin, Sykehuset Levanger.

3. Bioingeniør og MSc-student, Institutt for laboratoriemedisin, barne- og kvinnesykdommer, NTNU.

4. Bioingeniør, MSc, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs hospital



FIGUR 1. Etter introduksjon av MALDI-TOF MS innenfor mikrobiologi kan nå bakterie- eller soppisolater identifiseres på rekordtid.

tion Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (figur 1). MALDI-TOF MS benytter massespektrometri til å detektere molekylmassen til proteinfragmenter hos mikroorganismene. Mikrobenes proteiner fragmenteres og ioniseres, og molekylmassen til frie ioner detekteres i et vakuumkammer (1-3). Deretter sammenliknes mikrobens spektrale proteinmønster med en samling av kjente mikroorganismer med etablerte

proteinmønstre i en database. Resultater vurderes ut fra likheten mellom bakterieisolatets spektrale proteinmønster og referansespektra i instrumentets database – og angis som en tallverdi (score). Dette muliggjør rask identifikasjon av bakterie- og soppisolater (1, 4).

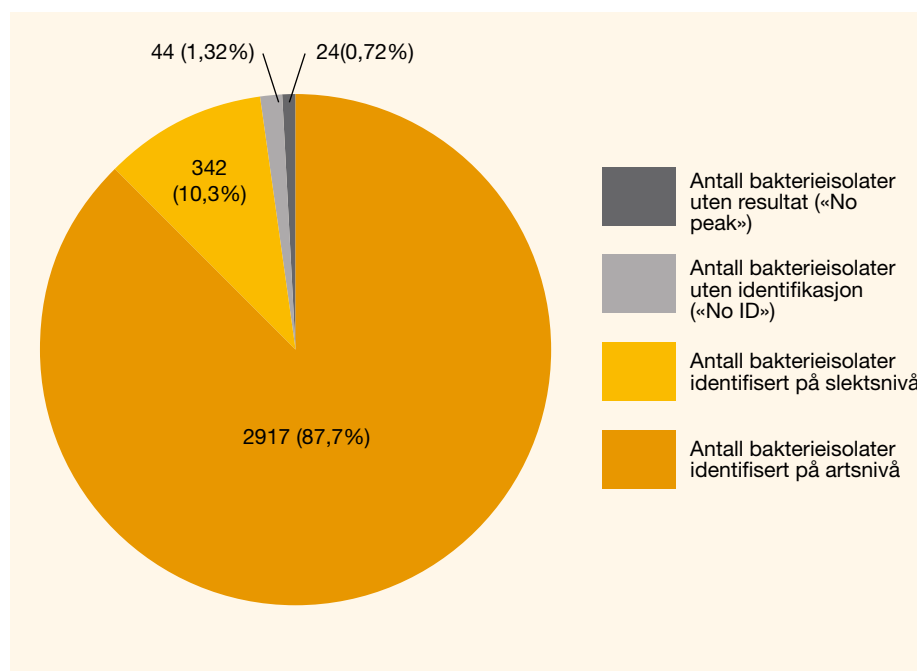
Det finnes to metoder for opparbeidelse av materiale til identifikasjon ved bruk av MALDI-TOF MS: «Direct Transfer» og proteinekstraksjon (vanligvis maursyre-

ekstraksjon). Metoden «Direct Transfer» innebærer at deler av den aktuelle bakteriekolonien høstes og deponeres på en rustfri stålplate direkte fra en agarskål uten annen forbehandling. Proteinekstraksjon benyttes i de tilfellene man ikke får identifisert ved «Direct Transfer», for eksempel bakterier som har ekstra tykt peptidoglykanlag. Metoden brukes dessuten rutinemessig når gjærsopp skal identifiseres ved bruk av MALDI-TOF MS (5).

Denne studien er en retrospektiv gjennomgang av resultater fra MALDI-TOF MS over en periode på fire måneder ved Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi ved St. Olavs Hospital (AMM). Avdelingen hadde siden anskaffelsen av MALDI-TOF MS, hatt mistanke om at identifiseringsresultatene for bakterieisolater ikke var så gode som diverse studier hadde antydnet. Metodene «Direct Transfer» og maursyreekstraksjon ble benyttet for å undersøke om mistanken var begrunnet.

Materiale og metode

Resultater fra alle prøver analysert med MALDI-TOF MS i løpet av en periode på fire måneder, ble hentet ut fra dataarkiverte rekvisisjoner og systematisert i Microsoft Office Excel. Totalt ble det hentet ut informasjon fra 3588 resultater, på henholdsvis 3327 bakterieisolater og 261 gjærsopp. Det ble samlet informasjon om type prøvemateriale, navn på bakterie- eller gjærsoppisolat, scoreverdi, samt



FIGUR 2. Antall og prosentvis fordeling av arts- og slektsidentifiserte bakterieisolater utført på MALDI-TOF MS ved «Direct transfer». N = 3327.

eventuelle tilleggstester utført for identifikasjon. Tre kategorier av scoreverdier ble etablert og isolatene ble plassert i aktuell kategori. Et resultat med scoreverdi $> 2,0$, ble vurdert som sikker identifikasjon på artsnivå, som er høyeste grad av identifikasjon. Isolater med scoreverdi $< 2,0$ og $\geq 1,7$, ble godkjent som identifikasjon på slektsnivå, men dette resultatet måtte bekreftes enten ved hjelp av cellemorfolo-

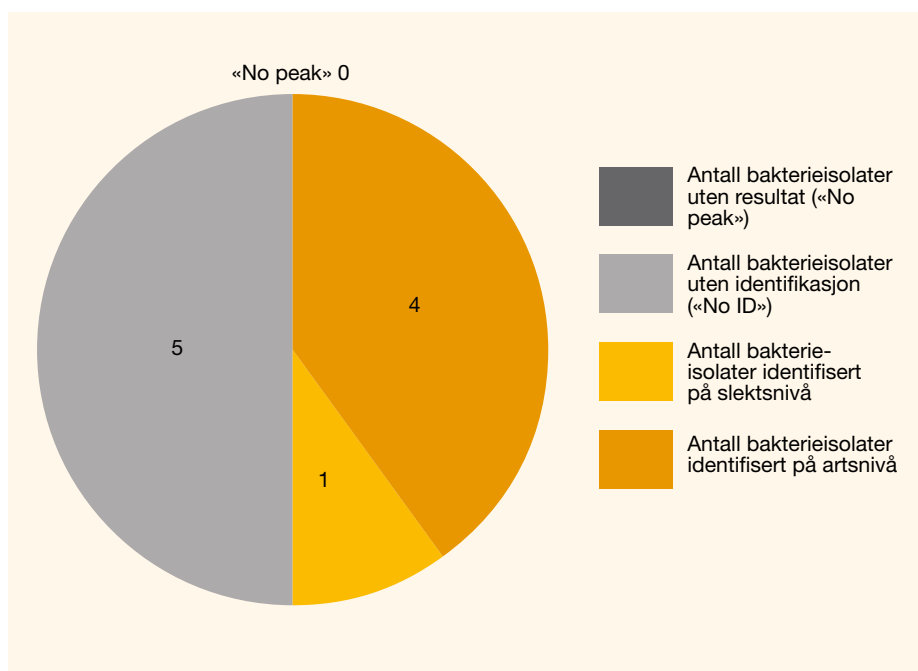
giske studier eller ved fenotypiske tester av isolatet. Bakterieisolater med scoreverdi $< 1,7$ ble ikke godkjent for svarutgivelse, og det var i disse tilfellene aktuelt med maursyreekstraksjon og påfølgende reanalyse på MALDI-TOF MS (5).

MALDI biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Tyskland) ble benyttet for analyse. Databasen som ble brukt i studien (Biotyper database, version3.0) var opp-

TABELL 1. Oversikt over antall arts- og slektsidentifiserte isolater innenfor de ulike bakteriegruppene og gruppen gjærsopp.

Bakteriegrupper	Totalt antall	Identifisert til artsnivå		Identifisert til slektsnivå	
		Antall	%	Antall	%
Anaerobe bakterier	160	136	85	24	15
Enterobacteriaceae	1216	1169	96	47	4
Enterokokker	153	145	95	8	5
Gjærsopp	256	234	91	22	9
Gram positiv kokker/staver	127	89	70	38	30
HACEK	456	433	95	23	5
Ikke fermentative gram negative bakterier	469	411	88	58	12
Stafylokokker	403	310	77	93	23
Streptokokker	200	157	79	43	21
Tarmpatogene	85	75	88	10	12
Uidentifiserte isolater	63	-	-	-	-
Totalt antall	3525	3159	-	366	-

Fem bakterieisolater av det totale antallet er identifisert etter ekstraksjon. De fem bakterieisolatene tilhører henholdsvis anaerobe bakterier, HACEK, ikke fermentative gram negative bakterier og streptokokker. 63 isolater forble uidentifisert etter «metoden «Direct Transfer» og ekstraksjon med reanalyse på MALDI-TOF MS.



FIGUR 3. Fordeling av arts- og slektsidentifiserte bakterieisolater etter maursyreekstraksjon og reanalyse på MALDI-TOF MS. N = 10.

datert 27. februar 2013 og inneholdt en samling av litt over 4300 referansespektra i henhold til MALDI-TOF MS loggbok og PC-logg på instrumentet.

Resultater

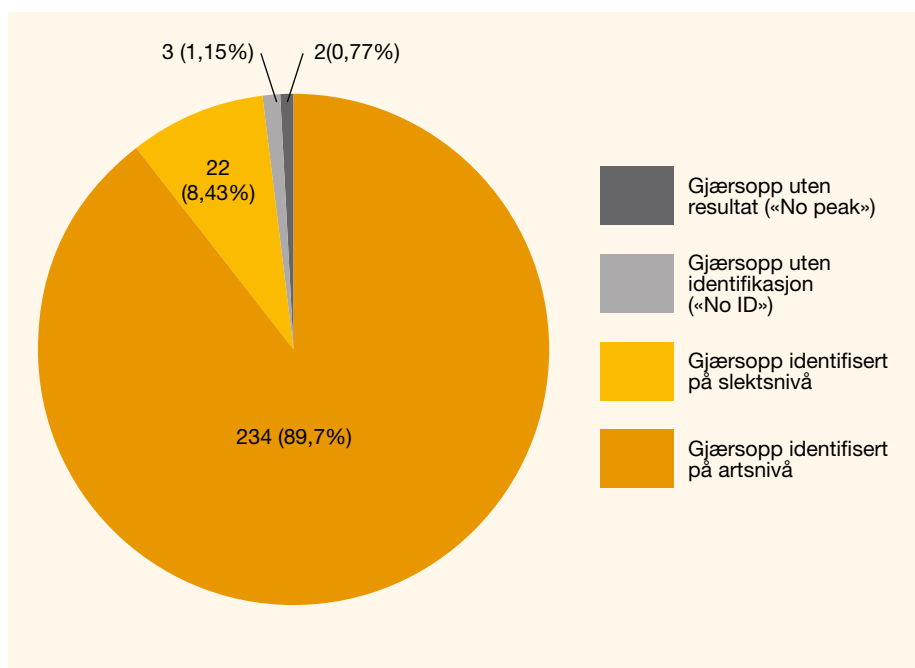
Resultatene fra 3327 bakterieisolater analysert med «Direct transfer» viste at 87,7 % av bakterieisolatene ble identifisert til artsnivå og 10,3 % til slektsnivå, mens 2 % av bakterieisolatene ikke ble identifisert, herunder gruppene «No peak» og «No ID» (figur 2). Gruppene stafylokokker, streptokokker og andre gram positive kokker og staver utgjorde den største andelen (> 70%) av isolater som kun ble identifisert til slektsnivå og ikke artsnivå (tabell 1).

Av de 68 uidentifiserte isolatene som var analysert med «Direct Transfer» (figur 2), ble ti isolater maursyreekstrahert og reanalysert på MALDI-TOF MS. Resultatene viste at metoden identifiserte fire av de ti bakterieisolatene til artsnivå, én til slektsnivå, mens de resterende fem fortsatt ikke ble identifisert (figur 3). I tillegg viste resultatene at alle bakterieisolatene som ble ekstrahert med maursyre fikk topper i massespekteret, da ingen fikk resultatet «No peak».

Totalt ble 87,8 % av bakterieisolatene identifisert til artsnivå og 10,3 % til

slektsnivå. 1,9 % fikk ingen identifikasjon, selv etter maursyreekstraksjon og påfølgende reanalyse på MALDI-TOF MS.

Resultatene av de 261 isolatene innenfor gruppen gjærsopp viste at 89,7 % ble identifisert til artsnivå; 8,4 % til slektsnivå mens 1,9 % ikke ble identifisert (figur 4).



FIGUR 4. Antall og prosentvis fordeling av arts- og slektsidentifiserte gjærsoppisolater som rutinemessig er maursyreekstrahert før analyse på MALDI-TOF MS. N = 261.

Diskusjon

Denne studien har retrospektivt analysert MALDI-TOF MS score-verdier av bakterie- og soppisolater fra en periode på fire måneder. 87,8 % av bakterieisolatene ble artsidentifisert, 10,3% slektsidentifisert mens 1,9 % fikk ingen identifikasjon. En av årsakene til at 1,9 % av bakterieisolatene ikke ble identifisert kan skyldes at databasen ikke inneholdt referansespektra som samsvarte med bakterie- eller soppisolatenes spektrale mønstre. En annen årsak kan være forbehandlingsfeil av isolatene, som for eksempel at for lite eller for mye prøvemateriale ble avsatt på den rustfrie stålplaten. Feilkilder og tilfældige feil ved maursyreekstraksjon kan også være en årsak.

Resultatene fra studien er i godt samsvar med liknende studier. I en studie utført av Seng og medarbeidere (6) ble 1660 bakterieisolater analysert med MALDI-TOF MS. Av disse ble 84,1 % identifisert til artsnivå, 11,3 % til slektsnivå og 2,8 % ikke identifisert. Sistnevnte ble forklart med inadekvat databaseoppdatering. I en lignende studie utført av Bizini A og medarbeidere (7) ble det analysert 1371 bakterieisolater hvor 93,2 % ble identifisert til artsnivå, 5,3 % til slektsnivå mens 1,5 % av bakterieisolatene ikke oppnådde identifikasjon. I den sistnevnte studien var det nødvendig å ekstrahere

25,6 % av de artsidentifiserte bakterieisolatene for å oppnå identifikasjon. I vår studie var det 68 isolater som etter «Direct transfer» ikke ble identifisert, kun ti av disse ble valgt ut for ekstraksjon. Av disse ble fire identifisert til artsnivå etter reanalyse (figur 3). Til sammen ga dette 2921 artsidentifiserte bakterieisolater hvor kun fire var ekstrahert (figur 2 og 3). Selv om denne andelen kunne økt noe dersom alle de 68 uidentifiserte isolatene var blitt ekstrahert, så viser tallene at AMM ikke hadde like stort behov for ekstraksjon for å identifisere isolatene til artsnivå. Dersom AMM hadde rutiner for å ekstrahere bakterier som kun var identifisert til slektsnivå, kunne kanskje andelen av artsidentifiserte bakterieisolater økt ytterligere. Resultatene avkrefte AMMs mistanke om dårlig identifiseringsresultat på MALDI-TOF MS.

Årsaken til at kun ti av 68 bakterieisolater ble sendt til maursyreekstraksjon kan være at AMM heller valgte å sette opp andre identifikasjonstester i stedet for maursyreekstraksjon. Da studien ble utført, fantes det ikke klare retningslinjer i laboratoriets prosedyrer i tilfeller uten resultat etter «Direct Transfer». I slike

tilfeller kan det derfor ha blitt et personlig valg av videre identifikasjonsmetode. Dette kan være årsaken til at maursyreekstraksjon ble valgt bort til fordel for tradisjonelle metoder som de ansatte er godt kjent med. Maursyreekstraksjon, som er en relativt tidskrevende prosess, kan også ha blitt valgt bort til fordel for mer tidsbesparende metoder, som for eksempel API (bioMérieux, Frankrike). I denne sammenhengen er tidsbesparelsen sett i forhold til tiden det tar for laboratoriepersonale å utføre metoden, og ikke tiden det tar å oppnå et resultat. Som vist i figur 3 ble kun 50 % av de maursyreekstraherte bakterieisolatene arts- og slektsidentifisert etter reanalyse, men figuren viser også at alle isolater fikk topper i massespektret etter ekstraksjon (ingen med resultatet «No peak»). Det indikerer at maursyreekstraksjon har ført til ekstraksjon av proteiner, men at det ikke fantes referansespektra i databasen som samsvarte med isolatets spektrale mønster. Ufullstendig maursyreekstraksjon hvor bakteriens cellevegg bare delvis er ødelagt, kan ha gitt en sammensetning av proteiner som ikke er representativ i forhold til bakteriens forventede proteinsammensetning.

Konklusjon

Studien har vist at AMM ved hjelp av MALDI-TOF MS oppnår en høy prosentandel artsidentifiserte bakterieisolater ved bruk av «Direct-Transfer», sammenlignet med liknende studier. Maursyreekstraksjon er en viktig del av identifisering av bakterieisolater som ikke identifiseres ved «Direct-Transfer», og ved identifisering av gjærsopp.

Instrumentet som benyttes til MALDI-TOF MS er kostbart i innkjøp, men reagenskostnadene er svært lave. Dette, sammen med den raske og sikre deteksjonen, gjør MALDI-TOF MS til en meget velegnet analysemetode for rutinediagnostikk i medisinsk mikrobiologi.

Takk

Vi ønsker å rette en stor takk til fagveilederne, overlege Aleksandra Jakovljevic og overlege Kåre Bergh ved Avdeling for Medisinsk Mikrobiologi, St. Olavs Hospital, samt de ansatte ved samme avdeling for bistand og hjelp ved utarbeidelse og gjennomføring av bacheloroppgave og artikkel. ■

Referanser

1. Bremen BD. Maldi Theory Mass Spectrometry. Bremen: Bruker Daltonic GmbH; 2004.
2. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Sawyer BG. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 6 ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2008. p. 128-32.
3. Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. Nat Prot. 2009;4(5):732-42.
4. Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat Rev Microbiol. 2010;8:74-82.
5. Wieser A SL, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics – Identification of microorganisms and beyond (mini review). Springer-Verlag. 2011;93(3):965-74.
6. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 2009;49(4):543-51.
7. Bizzini A, Durussel C, Billie J, Greub G, Prod'homme G. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for identification of Bacterial Strains Routinely Isolated in a Clinical Microbiology Laboratory. J Clin Microbiol. 2010;48(5):1549-54.

Følg oss i sosiale medier!

• Siste nytt • Fag og vitenskap • Ledige stillinger



twitter.com/Bioingenioren



facebook.com/Bioingenioren



www.bioingeniøren.no

