

## **CAT** **Critically Appraised Topic**

### **Directe identificatie en gevoeligheidsbepaling van micro-organismen uit positieve hemoculturen met behulp van MALDI-TOF MS en het BD Phoenix Systeem**

Author: An Joosten  
Supervisor: Dr. K. Magerman, PhD S. Nys  
Date: 15/05/2012

#### **CLINICAL BOTTOM LINE**

---

Bloedstroominfecties gaan gepaard met een hoge morbiditeit en mortaliteit. Een snelle identificatie en gevoeligheidsbepaling van het oorzakelijk micro-organisme is bijgevolg nodig voor het snel opstarten van een optimale therapie. In het Jessa Ziekenhuis in Hasselt werd een methode opgesteld voor de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling van micro-organismen uit positieve hemoculturen met behulp van MALDI-TOF MS en het BD Phoenix Systeem. De directe identificatie met MALDI-TOF MS leverde betere resultaten op voor Gram-negatieve bacteriën (78% indien score  $\geq 2$  en 91% indien score  $\geq 1.7$ ) dan voor Gram-positieve bacteriën (24% indien score  $\geq 2$  en 39% indien score  $\geq 1.7$ ). Dit was ook het geval voor de directe identificatie met het BD Phoenix Systeem waarmee van 95% van de Gram-negatieve bacteriën en 41% van de Gram-positieve bacteriën een correcte identificatie werd uitgevoerd. Voor de directe gevoeligheidsbepaling van Gram-negatieve bacteriën met het BD Phoenix Systeem werd een "categorical agreement" bekomen van 99% met 0.3% "very major errors", 0.3% "major errors" en 0.6% "minor errors". Voor de directe gevoeligheidsbepaling van Gram-positieve bacteriën met het BD Phoenix Systeem werd een "categorical agreement" bekomen van 96% met 2% "major errors" en 2% "minor errors", er waren geen "very major errors". Met deze methode is het mogelijk om voor Gram-negatieve bacteriën uit hemoculturen gelijktijdig een directe identificatie en gevoeligheidsbepaling uit te voeren waardoor men sneller een optimale therapie kan opstarten. Echter is het geen optimale methode voor de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling van Gram-positieve bacteriën uit hemoculturen.

#### **CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO**

---

Bloedstroominfecties (BSI) gaan gepaard met een hoge morbiditeit en mortaliteit (1). Een snelle identificatie en gevoeligheidsbepaling van het oorzakelijk micro-organisme is nodig voor het snel opstarten van een optimale therapie. Dit zorgt voor een verbetering van de outcome van de patiënt gezien de mortaliteit van gehospitaliseerde patiënten met een BSI die inadequate therapie krijgen, hoger ligt dan deze van patiënten die een adequate therapie toegediend krijgen (2-4).

Hemoculturen zijn essentieel voor de diagnose van een BSI (5-7). De huidige technieken in routine gebruikt in het klinisch laboratorium microbiologie berusten voor de uitwerking van positieve hemoculturen echter op groei van het oorzakelijk micro-organisme op geschikte vaste voedingsbodems vooraleer men een verdere identificatie en gevoeligheidsbepaling kan uitvoeren. Dit vertraagt het proces met gemiddeld 12-48u (of soms zelfs langer, afhankelijk van de kiem).

Het is bijgevolg een uitdaging om technieken te ontwikkelen voor de diagnose van een BSI waarbij deze initiële groei van het oorzakelijk micro-organisme niet nodig is.

Het Vitek-2 (bioMérieux) en Phoenix Systeem (BD Diagnostics) zijn geautomatiseerde systemen gebruikt in het klinisch laboratorium microbiologie voor het uitvoeren van de identificatie en gevoeligheidsbepaling van micro-organismen. Een nieuwe, zeer recent gebruikte techniek in routine voor de snelle identificatie van micro-organismen is matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS). Het is een snelle en accurate methode voor de identificatie van micro-organismen gebaseerd op eiwitspectra uitgaande van één enkele kolonie gegroeid op een vaste voedingsbodem (8).

Zowel voor een directe identificatie en gevoeligheidsbepaling van micro-organismen uit positieve hemoculturen met Vitek-2 Systeem en BD Phoenix Systeem (9-15) als voor een directe identificatie met MALDI-TOF MS (16-34) zijn methodes beschreven en geanalyseerd in de literatuur.

Met MALDI-TOF MS kan men echter sneller een identificatie bekomen (reeds enkele minuten na het laden van het target in het toestel) dan met het BD Phoenix Systeem of Vitek-2 Systeem (enkele uren tot 18u na het inladen van de panels op het toestel). Met de laatstgenoemde systemen is het wél mogelijk een directe gestandaardiseerde gevoeligheidsbepaling uit te voeren gebaseerd op MIC-waarden.

Op basis van een combinatie waarbij de snelst mogelijke identificatie bekomen kan worden met MALDI-TOF MS en het snelst mogelijk gestandaardiseerd antibiogram (MIC-waarden) met het BD Phoenix Systeem werd er in het Jessa Ziekenhuis in Hasselt een methode opgesteld die beide systemen tracht te combineren: één methode voor de voorbereiding van positieve hemoculturen waarmee een directe identificatie met MALDI-TOF MS en gelijktijdig een directe (identificatie en) gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem uitgevoerd kan worden.

Tijdens het opstellen en valideren van deze methode werd in het Jessa Ziekenhuis in Hasselt het BD Phoenix Systeem reeds in routine gebruikt voor de identificatie en gevoeligheidsbepaling van micro-organismen en de MALDI-TOF MS geïmplementeerd in routine voor de identificatie van micro-organismen. Voor het BD Phoenix Systeem werden bijgevolg nog gecombineerde panels (identificatie + gevoeligheidsbepaling) gebruikt waardoor de validatie voor de directe identificatie zowel met de MALDI-TOF MS als met het BD Phoenix Systeem werd uitgevoerd. Voor het BD Phoenix Systeem is er ook een mogelijkheid om panels te gebruiken enkel voor het uitvoeren van de gevoeligheidsbepaling van micro-organismen, echter deze waren op het moment van de validatie nog niet in gebruik.

### QUESTION(S)

---

- 1) Welke **methodes** zijn beschreven in de literatuur om positieve hemoculturen voor te bereiden voor de directe identificatie met MALDI-TOF MS en de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem?
- 2) Voor welke **micro-organismen** zijn er in de literatuur methodes beschikbaar voor de directe identificatie met MALDI-TOF MS en de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem?
- 3) **Opstellen van een methode** in het Jessa Ziekenhuis Hasselt voor de voorbereiding van positieve hemoculturen waarmee gelijktijdig een directe identificatie met MALDI-TOF MS en een directe (identificatie en) gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem kan uitgevoerd worden.

### SEARCH TERMS

---

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Blood culture" , "Bacteremia" , "Bloodstream infection" , "Direct identification" , "Rapid identification" , "Antimicrobial susceptibility testing" , "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS)" , "BD Phoenix system" , "Vitek-2 System"
- 2) PubMed Clinical Queries
- 3) UpToDate Online version 20.4 (2012)

### RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

1. Bearman GM, Wenzel RP. Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res* 2005; 36: 646-59.
2. Leibovici L, Shraga I, Drucker M, Konigsberger H, Samra Z, Pitlik SD. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med* 1998; 244: 379-86.
3. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000; 118(1): 146-55.
4. Retamar P, Portillo MM, López-Prieto MD et al. Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: a propensity score-based analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 472-8.
5. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(3): 444-65.
6. Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline. CLSI document M47-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007
7. UpToDate Online Version 20.4 (2012): Blood cultures for the detection of bacteremia.
8. Seng P, Drancourt M, Gouriet F 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.
9. Ling TK, Liu ZK, Cheng AF. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10): 4705-7.

10. Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJ, Wolffhagen MJ. Identification and susceptibility testing of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. *J Clin Microbiol* 2004; 42(1): 7-11.
11. de Cueto M, Ceballos E, Martinez-Martinez L, Perea EJ, Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3734-8.
12. Funke G, Funke-Kissling P. Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for direct identification and susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. *J Clin Microbiol* 2004; 42(4): 1466-70.
13. Lupetti A, Barnini S, Castagna B, Nibbering PH, Campa M. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-positive cocci in blood cultures by direct inoculation into the BD Phoenix system. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(7): 986-91.
14. Beuving J, van der Donk CF, Linssen CF, Wolffs PF, Verbon A. Evaluation of direct inoculation of the BD PHOENIX system from positive BACTEC blood cultures for both Gram-positive cocci and Gram-negative rods. *BMC Microbiol* 2011; 11:156.
15. Yonetani S, Okazaki M, Araki K et al. Direct inoculation method using BacT/ALERT 3D and BD Phoenix System allows rapid and accurate identification and susceptibility testing for both Gram-positive cocci and Gram-negative rods in aerobic blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012. (Epub ahead of print)
16. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2009; 4(11): e8041.
17. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5): 1584-91.
18. Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(11): 1620-5.
19. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010; 48(5): 1542-8.
20. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One* 2010; 5: e8862.
21. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(11): 1631-8.
22. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4): 1481-3.
23. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010; 48(2): 444-7.
24. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Porrás-Guerra I et al. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(4): 546-51.
25. Juiz PM, Almela M, Melción C et al. A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011. (Epub ahead of print)
26. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SC, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2011; 6(8): e23285.
27. Kroumova V, Gobbato E, Basso E, Mucedola L, Giani T, Fortina G. Direct identification of bacteria in blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new methodological approach. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011; 25(15): 2247-9.
28. Loonen AJ, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PF, van den Brule AJ. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011. (Epub ahead of print)

29. Szabados F, Michels M, Kaase M, Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT™ (bioMérieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(2):192–195.
30. Yan Y, He Y, Maier T et al. Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization Biotyper system. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2528-32.
31. Buchan BW, Riebe KM, Ledebouer NA. Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2012; 50(2): 346-52.
32. Klein S, Zimmermann S, Köhler C, Mischnick A, Alle W, Bode KA. Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. *J Med Microbiol* 2012; 61(Pt 3):323-31.
33. Schmidt V, Jarosch A, März P, Sander C, Vacata V, Kalka-Moll W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(3): 311-7.
34. Spanu T, Posteraro B, Fiori B et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 176-9.
35. Clinical microbiology procedures handbook, 3rd edition, Garcia. ASM press 2010. 5.17 Evaluating Antimicrobial Susceptibility Test Systems.
36. A. Simon, K. Camps, H. De Beenhouwer et al. Phoenix is overcalling the resistance of *Enterobacteriaceae* to temocillin – Poster D24. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Chicago 2007.

## APPRAISAL

---

### Vraag 1:

Welke methodes zijn beschreven in de literatuur om positieve hemoculturen voor te bereiden voor de directe identificatie met MALDI-TOF MS en de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem?

#### A. BD Phoenix Systeem

De methode opgesteld door de firma (Phoenix Systeem, BD Diagnostics) voor de directe gevoeligheidsbepaling van micro-organismen uit positieve hemoculturen met het BD Phoenix Systeem omvat het vullen van een BD Serum Separator Tube (SST) met 8.5mL inhoud van een positieve hemocultuurflles. Deze tube dient nadien gecentrifugeerd te worden aan 2000 x g gedurende 10 minuten waardoor de bacteriën een dunne wit-grijze laag vormen juist boven de gel-laag van de SST tube. De bloedcellen migreren doorheen de gel-laag naar de bodem van de tube. Op deze manier kunnen bacteriën afgezonderd worden van overige elementen van het staal om zo interferentie die kan optreden bij het gebruik van het BD Phoenix Systeem (fluorescentie) te beperken. Het supernatans wordt verwijderd en de bacteriën die zich op de gel-laag bevinden worden voorzichtig in suspensie gebracht in 0.5 mL Phoenix Systeem ID broth tube tot een 0.5 McF suspensie bekomen wordt. Daarna wordt 25µL van deze suspensie overgebracht in een Phoenix Systeem AST(-S) broth tube met 1 druppel AST(-S) indicator oplossing en worden de Phoenix panels geïnoculeerd.

Funke et al., Lupetti et al., Beuving et al. en Yonetani et al. voerden een directe identificatie en gevoeligheidsbepaling uit van micro-organismen uit positieve hemoculturen met het BD Phoenix Systeem (12-15). In 3 studies werd gebruik gemaakt van het BACTEC geautomatiseerde bloedkweekstelsel voor de monitoring van hemoculturen (12-14). In 1 studie werd het BacT/ALERT 3D systeem gebruikt (15). Na het positief afvlaggen van de hemoculturen door het bloedkweekstelsel werd in de bovenvermelde studies respectievelijk 8.5mL, 7mL, 5 mL en 12mL van de inhoud van de hemocultuur overgebracht in een SST tube. In de studie van Lupetti et al. werd voorafgaand aan het overbrengen in de SST tube saponine toegevoegd aan het staal en gedurende 15min geïncubeerd op kamertemperatuur. Saponine zorgt voor het vrijkomen van intracellulaire bacteriën uit bloedcellen wat voor een hogere opbrengst van bacteriën zorgt. Nadien werden in de verschillende studies deze SST tubes gecentrifugeerd aan 2000 x g gedurende 10 minuten (12-14) of 2620 x g gedurende 15 minuten (15) waardoor de bacteriën een dunne wit-grijze laag vormden juist boven de gel-laag van de SST tubes. De bloedcellen migreerden doorheen de gel-laag naar de bodem van de tubes. Het supernatans werd verwijderd en de bacteriën die zich op de gel-laag bevonden, werden in suspensie gebracht in een Phoenix Systeem ID broth tube tot een 0.5 McF suspensie bekomen werd. Voorafgaand aan deze stap voerden Yonetani et al. een extra centrifugatie uit met steriel gedestilleerd water. Funke et al., Lupetti et al. en Yonetani et al.

brachten 25µL van deze suspensie over in een Phoenix Systeem AST(-S) broth tube met 1 druppel AST(-S) indicator oplossing. Voor Gram-negatieve bacteriën werd in de studie van Beuving et al. 25µL van deze suspensie overgebracht in een Phoenix Systeem AST broth tube en voor Gram-positieve kokken 250µL ipv 25µL (12-15).

## B. MALDI-TOF MS

Verschillende studies zijn beschreven in de literatuur waarin een directe identificatie van micro-organismen uit positieve hemoculturen werd uitgevoerd met MALDI-TOF MS (16-34).

In de meerderheid van de studies werd gebruik gemaakt van het BACTEC geautomatiseerde bloedkweekstelsel voor de monitoring van hemoculturen (16-17, 20-27, 30-32, 34). Slechts in enkele studies werd het BacT/Alert systeem gebruikt (19, 28). In een studie van Schmidt et al. waar het effect van verschillende soorten hemocultuurflessen werd nagegaan op de directe identificatie met MALDI-TOF MS, bleek dat de directe identificatie met MALDI-TOF MS betere resultaten gaf met BD BACTEC™ Plus-Aerobic hemocultuurflessen dan met de “non-charcoal-containing” BacT/Alert SA en de “charcoal-containing” BacT/Alert FA hemocultuurflessen (33). Szabados et al. toonden een lage sensitiviteit aan voor de directe identificatie met MALDI-TOF MS gebruik makend van BacT/Alert hemocultuurflessen (29).

In de literatuur zijn verschillende methodes beschreven voor de verdere verwerking van positieve hemocultuurflessen voor de directe identificatie met MALDI-TOF MS (16-34). De hoeveelheid staal die nodig is, kan gaan van 200µL tot 10mL en kan worden opgevangen in een steriele buis of een SST. Gezien pieken van hemoglobine kunnen interfereren met de interpretatie van het eiwitspectrum van micro-organismen is het belangrijk om de rode bloedcellen te verwijderen uit het staal. Verwijderen van rode bloedcellen kan onder andere gebeuren door cel lyse, centrifugatie aan lage snelheid, steriel water, ammonium chloride, wassen en gebruik van SST. Er is een grote variatie in het aantal was- en centrifugatie stappen. Ferroni et al. voegden een detergent (saponine) toe waardoor intracellulaire bacteriën vrijkomen (19). Kroumova et al. zorgden voor een aanrijking van het staal door inoculatie in Brain Heart Infusion broth en incubatie op 37°C (27). Vervolgens kan men een eiwitextractie uitvoeren (70% ethanol, mierenzuur, trifluoroacetic acid, acetonitrile) of zonder eiwitextractie de procedure verderzetten (25). La Scola et al. zagen een verbetering van identificatie door mierenzuur te gebruiken ipv trifluoroacetic acid (16).

De verdere stappen in de verschillende methodes zijn in grote lijn gelijkaardig en omvatten het aanbrengen van het staal op het “target plate”, aanbrengen van matrix (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile and 2.5% trifluoroacetic acid), drogen en nadien analyse met massa spectrometry.

De tijd nodig voor de directe identificatie van micro-organismen uit positieve hemoculturen met de verschillende methodes beschreven in de literatuur varieert van 30 min tot 3uur (16-17, 21-23, 27) of zelfs minder dan 30 minuten (19-25).

Er is eveneens een commerciële kit beschikbaar voor de directe identificatie met MALDI-TOF MS (Sepsityper, Bruker Daltonics). Hiervoor dient 1 mL van een positieve hemocultuurfles overgebracht te worden in een Eppendorf tube. Hieraan wordt 200µL van oplossing 1 (“lysis buffer”) toegevoegd. Nadien volgt kort (10-15s) vortexen van het staal en centrifugatie gedurende 1 minuut aan 13000 rpm. Het supernatans wordt verwijderd en de pellet opnieuw in suspensie gebracht met 1 mL van oplossing 2 (“wash buffer”). Vervolgens dient men het staal opnieuw gedurende 1 min te centrifugereren aan 13000 rpm. Het supernatans wordt verwijderd en 300µL gedestilleerd water wordt toegevoegd. De pellet wordt opnieuw in suspensie gebracht en 900µL ethanol wordt toegevoegd. Nadien wordt de tube gecentrifugeerd gedurende 2 minuten aan 13000 rpm. Het supernatans wordt voorzichtig verwijderd en 50µL acetonitrile en 50µL mierenzuur worden toegevoegd, de tube wordt gecentrifugeerd gedurende 2 min aan 13000 rpm. Eén µL van het supernatans wordt aangebracht op de “target plate” gevolgd door 1 µL matrix. Na drogen kan de analyse gestart worden. Identificatie van micro-organismen van positieve hemoculturen duurt met deze methode ongeveer 20 minuten.

### Vraag 2:

Voor welke micro-organismen zijn er in de literatuur methodes beschikbaar voor de directe identificatie met MALDI-TOF MS en de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem?

## A. BD Phoenix Systeem

In de studies van Funke et al., Lupetti et al., Beuving et al. en Yonetani et al. voor de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling van micro-organismen met het BD Phoenix Systeem werden enkel Gram-negatieve staven (12), enkel Gram-positieve kokken (13) of beiden (14-15) geanalyseerd. In de studie van Beuving et al. werd

echter geen directe identificatie uitgevoerd voor Gram-positieve kokken (14). In alle studies werden monomicrobiële stalen geanalyseerd (12-15).

Voor de directe gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem worden hieronder volgende termen gebruikt (35):

- *Categorical agreement (CA)* : Category results are identical
- *Very major error (VME)* : Test results shows susceptibility, and reference result shows resistance
- *Major error (ME)*: Test result shows resistance, and reference result shows susceptibility
- *Minor error (MiE)*: Test result shows resistance or susceptibility and reference result shows intermediate, or test result shows intermediate and reference result shows resistance or susceptibility

Voor Gram-negatieve staven kon men in de studie van Funke et al. 92.9% correcte identificaties bekomen en zag men een verschil tussen fermenterende (93.7%) en niet-fermenterende bacteriën (81.0%) (12). Beuving et al. toonden een gelijkaardig verschil aan tussen de directe identificatie van *Enterobacteriaceae* (95.2%) en *Pseudomonas* spp (71.4%) (14). Yonetani et al. toonden een correcte identificatie aan van Gram-negatieve staven in 97% van de stalen (15).

Voor de directe gevoeligheidsbepaling van Gram-negatieve staven met het BD Phoenix Systeem zag men in de studie van Funke et al. een CA van 99.0% met 0.1% VME, 0.1% ME en 0.8% MiE (12). Beuving et al. vond eveneens een CA van 99.0% met 0.3% VME's, geen ME en 0.7% MiE (14). Voor *Enterobacteriaceae* zag men in de studie van Yonetani et al. een CA van 99.5% en voor non-fermenters een CA van 91.1% (15).

VMEs traden op bij trimethoprim-sulfamethoxazole (12, 14), ampicilline, cefuroxime, cefotaxime en piperacilline-(tazobactam)(12).

Voor Gram-positieve kokken werd in de studie van Lupetti et al. saponine aan het staal toegevoegd wat zorgt voor het vrijkomen van intracellulaire bacteriën uit bloedcellen waardoor een hogere opbrengst van bacteriën bekomen kan worden (13). Op deze manier kon 82% van de Gram-positieve kokken correct geïdentificeerd worden. Drie procent kon niet geïdentificeerd worden en 15% was foutief geïdentificeerd. Deze laatsten behoorden allemaal tot de stafylokokken (13). Yonetani et al. toonden een correcte identificatie aan van Gram-positieve kokken van 89.1% (15).

Voor de directe gevoeligheidsbepaling van Gram-positieve kokken met het BD Phoenix Systeem zag Lupetti et al. een CA van 98.1% met een algemene "error rate" van 1.9% waarvan 0.2% VMEs, 0.4% ME en 1.3% MiE (13). Beuving et al. zagen voor de directe gevoeligheidsbepaling een CA van 95.4% met 0.4% VME, 3.1% ME en 1.1% MiE (14). In de studie van Yonetani et al. was de CA 92.7% met 0.04% VME en 0.7% ME (15).

VME werden waargenomen bij erytromycine en ciprofloxacine (13), trimethoprim-sulfamethoxazole (14) en levofloxacine (15).

## B. MALDI-TOF MS

Er zijn studies beschreven voor de directe identificatie van Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën uit positieve hemoculturen met MALDI-TOF MS (16-17, 21-23, 25-28, 32) en studies waarin eveneens de directe identificatie van gisten geanalyseerd werd (19-20, 24, 30, 31, 34).

Bij het bespreken van deze studies dient echter vermeld te worden dat niet steeds dezelfde criteria gehanteerd worden in de verschillende studies voor de interpretatie van de resultaten. Volgens criteria van de firma kan men stellen dat scores  $\geq 2.0$  beschouwd kunnen worden als een correcte identificatie van het micro-organisme op species niveau, een score tussen 1.7 en 1.99 als correcte identificatie op genus niveau en scores  $< 1.7$  als onbetrouwbare identificatie. In sommige studies werden resultaten met lagere scores eveneens aanvaard mits voldaan aan andere criteria opgesteld door de onderzoekers (16, 21, 32, 34). Hierdoor is het niet eenvoudig om de resultaten van de verschillende studies te vergelijken.

In het algemeen kan men wel stellen dat de directe identificatie van Gram-negatieve bacteriën met MALDI-TOF MS betere resultaten oplevert dan deze van Gram-positieve bacteriën (16-17, 24, 28, 31).

Voor de identificatie van (viridans) streptokokken en *coagulase-negatieve stafylokokken* leverde in meerdere studies problemen op (16, 19, 22, 24, 26, 28). Zo werden in meerdere studies *Streptococcus oralis/mitis* verkeerd geïdentificeerd als *Streptococcus pneumoniae* (21, 23, 26, 31). Ferroni et al. toonden aan dat de combinatie van identificatie met MALDI-TOF MS bij *S. mitis/S. pneumoniae* en een positief agglutinatie resultaat met de Slidex pneumo-kit een onderscheid kon maken tussen beide species met 95% specificiteit en 100% sensitiviteit (19).

Wat betreft de directe identificatie van gisten uit positieve hemoculturen werden verschillende resultaten bekomen (20, 24, 30, 31, 34). Marinach-Patrice et al., Yan et al. en Spanu et al. toonden goede resultaten aan voor de directe identificatie van gisten uit hemoculturen (20, 30, 34). In studies van Buchan et al. en Ferreira et al. werd echter geen goede directe identificatie bekomen voor gisten uit hemoculturen (24, 31).

In sommige studies werden enkel mono-microbiële stalen geïncludeerd, andere studies analyseerden ook poly-microbiële stalen (16-17, 19, 21, 23, 24, 26, 27, 31).

Identificatie van meerdere micro-organismen in één hemocultuurfles blijft in het algemeen een probleem (16, 23, 26, 31). Ferroni et al. gebruikten een specifieke database om de identificatie van poly-microbiële stalen te verbeteren (19).

In een studie van Kroumova et al. werd in tegenstelling echter wel een goede overeenkomst bekomen in de identificatie van micro-organismen uit poly-microbiële stalen geanalyseerd met MALDI-TOF MS en andere methodes (27).

Vraag 3:

Opstellen van een methode in het Jessa Ziekenhuis Hasselt voor de voorbereiding van positieve hemoculturen waarmee gelijktijdig een directe identificatie met MALDI-TOF MS en een directe (identificatie en) gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem kan uitgevoerd worden.

### **A. Opstellen van een methode**

Op basis van methodes opgesteld door de firma's (Phoenix Systeem BD Diagnostics, MALDI-TOF MS Bruker), methodes beschreven in de literatuur (12-34) en eigen inbreng werd in het Jessa Ziekenhuis Hasselt een methode opgesteld waarmee gelijktijdig een directe identificatie met MALDI-TOF MS en een directe (identificatie en) gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem kan uitgevoerd worden. Verschillende aspecten werden hiervoor nagekeken en onderzocht:

#### *1. Hoeveelheid staal nodig van een positieve hemocultuurfles*

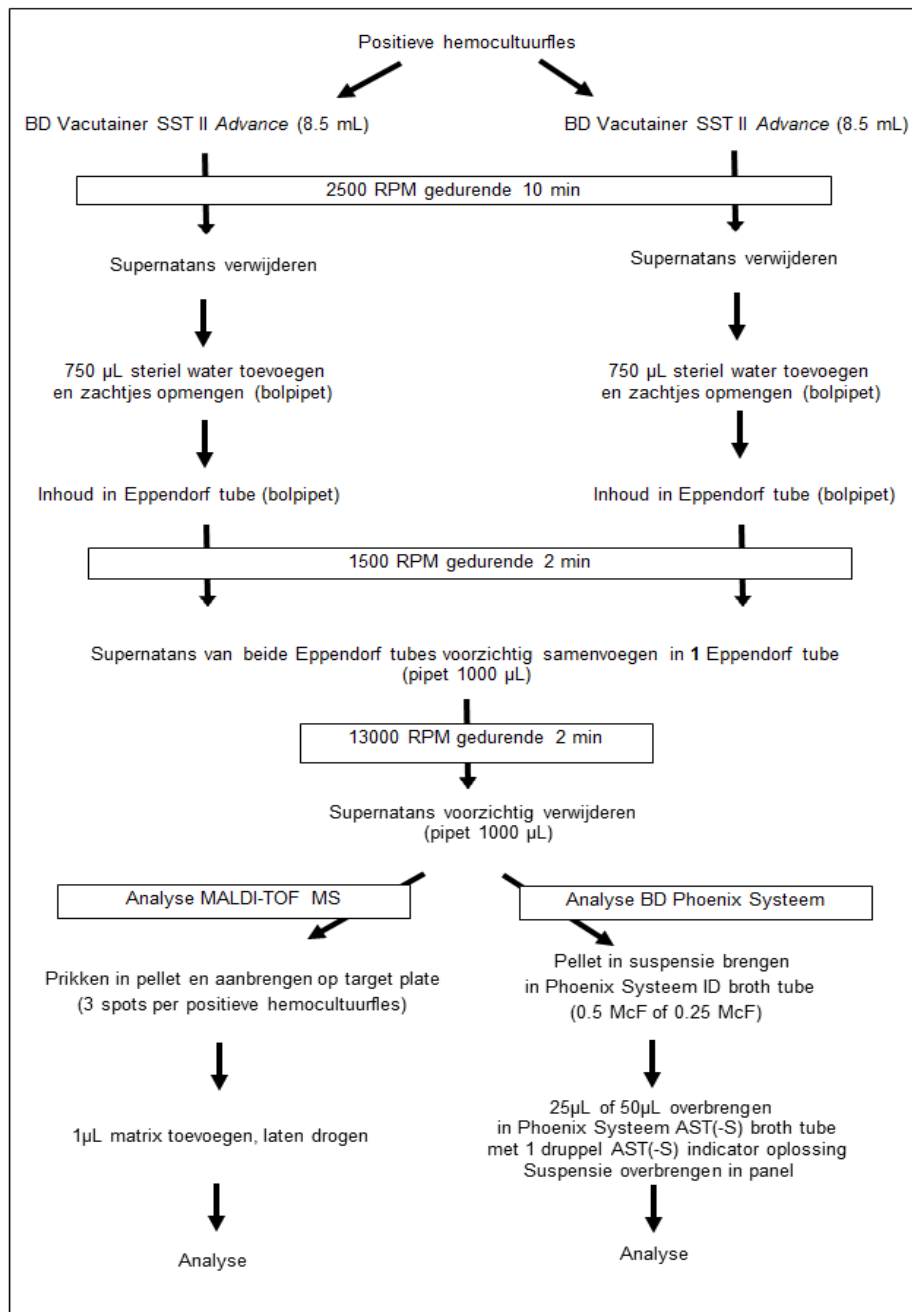
Er werd beslist om voor elke positieve hemocultuurfles 2 SST (BD Vacutainer Serum Separator Tube) van 8.5 mL te gebruiken. Door 2 SST van 8.5 mL te gebruiken, kan meer staal geanalyseerd worden en is het mogelijk een hogere opbrengst van bacteriën te bekomen.

#### *2. Verschillende stappen nodig in de analyse voor een geschikte voorbereiding van het staal*

Er werd getracht een eenvoudige methode op te stellen voor de voorbereiding van het staal zowel voor analyse met MALDI-TOF MS als met BD Phoenix Systeem. Rode bloedcellen en andere elementen dienden eerst verwijderd te worden (interferentie met eiwitspectrum MALDI-TOF MS en fluorescentie met het BD Phoenix Systeem) en bacteriën zo goed als mogelijk afgezonderd te worden. Hiervoor werd gebruik gemaakt van SST, centrifugatie aan lage snelheid en wassen met steriel water. De snelheid voor centrifugatie van de SST werd vastgelegd op 2500 rpm gedurende 10 minuten. Op deze manier vormden de bacteriën een dunne wit-grijze laag juist boven de gel-laag van de SST en migreerden de rode bloedcellen naar de bodem van de tubes. Vervolgens werd het supernatans verwijderd. Nu was het noodzakelijk om de bacteriën dusdanig voor te bereiden dat er zowel analyse met MALDI-TOF MS als met het BD Phoenix Systeem kon uitgevoerd worden. De bacteriën die zich op de gel-laag bevonden werden gewassen met steriel water. Aan elke SST werd 750 µL steriel water toegevoegd, de bacteriën werden voorzichtig in suspensie gebracht en vervolgens werd de inhoud in een Eppendorf tube (1 Eppendorf tube per SST) overgebracht. Opnieuw werd een centrifugatie aan lage snelheid (vastgelegd op 1500 rpm gedurende 2 min) uitgevoerd om achtergebleven rode bloedcellen en andere elementen (onderaan de Eppendorf tubes) te verwijderen. Het supernatans van beide Eppendorf tubes waarin de bacteriën zich bevonden werd samengevoegd in een derde Eppendorf tube (inhoud 1500 µL) gevolgd door een centrifugatie aan hoge snelheid (vastgelegd op 13000 rpm gedurende 2 min). Hierdoor vormden de bacteriën een pellet onderaan de Eppendorf tube en kon het supernatans verwijderd worden. Gezien er getracht werd om een eenvoudige methode op te stellen, werd er verder geen eiwitextractie uitgevoerd.

De pellet die op deze manier bekomen werd, werd voor de identificatie met MALDI-TOF MS rechtstreeks aangeprikt en aangebracht op een "target plate" (3 spots per bacteriële pellet) gevolgd door 1 µL matrix.

Diezelfde pellet werd nadien in suspensie gebracht in een Phoenix Systeem ID broth tube tot 0.5 McF of indien dit niet mogelijk was, 0.25 McF bekomen werd. Van een suspensie van 0.5 McF werd 25 µL overgebracht in een Phoenix Systeem AST(-S) broth tube met 1 druppel AST(-S) indicator oplossing, van een suspensie van 0.25 McF 50 µL. Nadien werden de suspensies in de juiste panels overgebracht en in het toestel geplaatst voor analyse (Figuur 1).



**Figuur 1.**  
**Methode Jessa Ziekenhuis Hasselt voor directe identificatie en gevoeligheidsbepaling van micro-organismen uit positieve hemoculturen met MALDI-TOF MS en het BD Phoenix Systeem**

## B. Evaluatie van de methode

Van 27 februari 2012 tem 30 april 2012 werden in het Jessa Ziekenhuis Hasselt 74 hemocultuurflessen (41 aerobe, 26 anaerobe en 7 pediatrische flessen) met deze methode geanalyseerd. De analyse werd enkel overdag en tijdens de week uitgevoerd. Indien van een patiënt meerdere hemocultuurflessen positief waren, werd slechts 1 hemocultuurfles geanalyseerd. Er werden enkel mono-microbiële stalen geïncludeerd met bacteriën.

Deze hemocultuurflessen werden gedurende 5 dagen geïncubeerd en gemonitord in een Bactec toestel. Indien deze de fles als positief aangaf, werd eerst een Gramkleuring uitgevoerd. Afhankelijk hiervan werden de geschikte vaste voedingsbodems geënt en geïncubeerd en eventueel bijkomende testen uitgevoerd voor de verdere uitwerking met behulp van routine methodes. De resultaten van de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling werden hiermee vergeleken. Deze routine methodes omvatten identificatie met MALDI-TOF MS op kolonies, BD Phoenix Systeem, API systeem (bioMérieux) en sequencing. Gevoeligheidsbepaling werd uitgevoerd met het BD Phoenix Systeem. Voor de gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem werden EUCAST richtlijnen gebruikt.



Nadien werden de hemocultuurflessen geanalyseerd met de directe methode (zie hierboven). Indien bij de Gramkleuring reeds gisten werden waargenomen, werd het staal niet geïncubeerd. Gezien het niet altijd mogelijk was om mengsels te onderscheiden op de Gramkleuring werden sommige hemocultuurflessen reeds geanalyseerd met de directe methode vooraleer er groei van meerdere bacteriën waargenomen werd op de vaste voedingsbodems. De resultaten van deze directe methode werden niet opgenomen voor de evaluatie gezien er enkel mono-microbiële stalen geïncubeerd werden.

In het totaal werden 74 positieve hemoculturen geanalyseerd met de directe methode. Deze hemoculturen werden eveneens geanalyseerd met de routine methode (identificatie en gevoeligheidsbepaling uitgaande van vaste voedingsbodems). De resultaten van de identificaties en gevoeligheidsbepaling bekomen met deze routine methode werden als referentie gebruikt. Tabel I toont de verschillende identificaties van de micro-organismen die geïsoleerd werden uit deze 74 hemoculturen en verder geïdentificeerd werden met de routine methode. Er werden 23 Gram-negatieve bacteriën en 51 Gram-positieve bacteriën geïsoleerd met de routine methode (tabel I).

<b>Gram-negatieve bacteriën</b>	<b>Aantal (n=)</b>
<i>Escherichia coli</i>	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
<i>Proteus mirabilis</i>	4
<i>Morganella morganii</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1
<i>Prevotella buccae</i>	1
<b>Totaal</b>	<b>23</b>
<b>Gram-positieve bacteriën</b>	<b>Aantal (n=)</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	5
<i>Staphylococcus hominis</i>	4
<i>Staphylococcus capitis</i>	3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	3
<i>Micrococcus luteus</i>	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1
<i>Streptococcus oralis</i>	1
<i>Streptococcus constellatus</i>	1
<i>Streptococcus mitis</i>	1
<i>Streptococcus intermedius</i>	1
<i>Streptococcus gallolyticus</i> (identificatie routine met sequencing)	1
<i>Streptococcus bovis</i> (identificatie routine met BD Phoenix Systeem)	1
<b>Totaal</b>	<b>51</b>

**Tabel I.**  
**Micro-organismen geanalyseerd met de routine methode.**  
**In het totaal werden 74 micro-organismen geanalyseerd, waarvan 23 Gram-negatieve bacteriën en 51 Gram-positieve bacteriën.**

### Directe identificatie met MALDI-TOF MS en het BD Phoenix Systeem

Voor de directe identificatie met MALDI-TOF MS en het BD Phoenix Systeem werd elke positieve hemocultuurfles eerst geanalyseerd met MALDI-TOF MS. Op basis van de resultaten hiermee bekomen, werd indien mogelijk het juiste Phoenix panel geïnoculeerd voor de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem:

- BD Phoenix™ NMIC/ID-84 voor Gram-negatieve bacteriën
- BD Phoenix™ PMIC/ID-72 voor Gram-positieve bacteriën (stafylokokken, enterokokken, micrococci)
- BD Phoenix™ SMIC/ID-11 voor streptokokken uitgezonderd enterokokken

Met MALDI-TOF MS werd de identificatie uitgevoerd voor alle positieve hemocultuurflessen (n=74). Voor elke positieve hemocultuurfles werden steeds 3 spots op een "target plate" aangebracht om de kans op een aanvaardbaar resultaat te verhogen. Indien na "automatische analyse" van het staal geen score  $\geq 2$  bekomen werd, werd enkel bijkomend een "manuele analyse" uitgevoerd.

Er werden 23 Gram-negatieve bacteriën en 51 Gram-positieve bacteriën geanalyseerd. Ook hier leverde de directe identificatie met MALDI-TOF MS betere resultaten op voor Gram-negatieve bacteriën (78% indien score  $\geq 2$  en 91% indien score  $\geq 1.7$ ) dan voor Gram-positieve bacteriën (24% indien score  $\geq 2$  en 39% indien score  $\geq 1.7$ ) (Tabel 2)(Tabel 3).

Het al dan niet uitvoeren van de directe identificatie met het BD Phoenix Systeem en de keuze van het Phoenix panel werd bepaald aan de hand van het resultaat van de directe identificatie bekomen met MALDI-TOF MS en op basis van de Gramkleuring en/of het resultaat van de Slidex pneumo-Kit (bioMérieux).

Tot de groep van de Gram-negatieve bacteriën (n=23) behoorde één anaërobe kiem (*Prevotella buccae*). Deze kiem werd op basis van de directe methode met MALDI-TOF MS reeds geïdentificeerd als *Prevotella buccae* met een score  $\geq 2$ . Gezien deze kiem niet opgenomen is in de lijst van kiemen waarvoor identificatie met het BD Phoenix Systeem kan uitgevoerd worden (BD Phoenix™ System User's Manual), werd deze kiem geëxcludeerd voor verdere directe identificatie met het BD Phoenix Systeem. Er werden bijgevolg 22 Gram-negatieve bacteriën geïncludeerd voor een directe identificatie met het BD Phoenix Systeem.

Alle Gram-positieve bacteriën (n=51) waren opgenomen in de lijst van kiemen waarvoor identificatie met het BD Phoenix Systeem kan uitgevoerd worden (BD Phoenix™ System User's Manual) en werden geïncludeerd voor directe identificatie met het BD Phoenix Systeem. Echter voor 3 Gram-positieve bacteriën (allemaal stafylokokken) kon geen Phoenix panel worden ingezet en was er geen resultaat voor de directe identificatie gezien er geen suspensie van minstens 0.25 McF bekomen kon worden. Ook kon er voor 7 streptokokken (*Enterococcus faecalis* (n=2), *Streptococcus pyogenes* (n=1), *Streptococcus oralis* (n=1), *Streptococcus intermedius* (n=1), *Streptococcus mitis* (n=1), *Streptococcus constellatus* (n=1)) geen directe identificatie met het BD Phoenix Systeem worden uitgevoerd, gezien het juiste Phoenix panel niet kon worden geïnoculeerd. Voor deze 7 streptokokken werden met de directe methode met MALDI-TOF MS enkel resultaten  $< 1.7$  bekomen en kon op basis hiervan niet bepaald worden welk Phoenix panel diende ingezet te worden (BD Phoenix™ PMIC/ID-72 voor enterokokken of BD Phoenix™ SMIC/ID-11 voor overige streptokokken). Dit probleem stelde zich niet voor de andere streptokokken, gezien op basis van directe identificatie met MALDI-TOF MS of op basis van de Slidex pneumo-Kit bepaald kon worden welk Phoenix panel diende ingezet te worden.

De directe identificatie met het BD Phoenix Systeem toonde eveneens betere resultaten aan voor Gram-negatieve bacteriën (95%) dan voor Gram-positieve bacteriën (41%) (Tabel 2)(Tabel 3).

Bijkomend dient vermeld te worden dat het verschil in nomenclatuur tussen MALDI-TOF MS en BD Phoenix Systeem soms problemen kan geven voor de evaluatie van de directe identificatie met MALDI-TOF MS en het BD Phoenix Systeem (bv. *Streptococcus bovis*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus lutetiensis*).

		Identificatie MALDI-TOF MS		Identificatie BD Phoenix Systeem		
		Score $\geq 2$ (%)	Score $\geq 1.7$ (%)	Correcte ID	Foutieve ID	Geen ID
<b>Gram-negatieve bacteriën</b>	<b>Aantal</b>					
<i>Escherichia coli</i>	10	7 (70%)	10 (100%)	10 (100%)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)		
<i>Proteus mirabilis</i>	4	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)		
<i>Morganella morganii</i>	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	(*)	(*)	1 (100%)		
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	0 (0%)	0 (0%)		1 (100%)	
<i>Prevotella buccae</i>	1	1 (100%)	1 (100%)	(**)	(**)	(**)
<b>Totaal</b>	<b>23</b>	<b>18/23 (78%)</b>	<b>21/23 (91%)</b>	<b>21/22 (95%)</b>	<b>1/22 (5%)</b>	
(*) Resultaten van de verschillende spots waren zowel <i>Pseudomonas geniculata</i> als <i>Stenotrophomonas geniculata</i> met score $\geq 2$						
(**) Voor de identificatie met het BD Phoenix Systeem werd <i>Prevotella buccae</i> geëxcludeerd						

Tabel 2. Directe identificatie van Gram-negatieve bacteriën met MALDI-TOF MS en het BD Phoenix Systeem

	Identificatie MALDI-TOF MS		Identificatie BD Phoenix Systeem			
	Aantal	Score ≥ 2 (%)	Score ≥ 1.7 (%)	Correcte ID	Foutieve ID	Geen ID
<b>Gram-positieve bacteriën</b>						
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	0 (0%)	2 (15%)	6 (46%)	3 (23%)	4 (31%) (*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	0 (0%)	2 (40%)	2 (40%)		3 (60%)(*)
<i>Staphylococcus hominis</i>	4	2 (50%)	2 (50%)	3 (75%)		1 (25%)
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	1 (33%)	3 (100%)	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	0 (0%)	0 (0%)			1 (100%)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	0 (0%)	0 (0%)		1 (100%)	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0 (0%)	0 (0%)			1 (100%) (*)
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	1 (33%)	1 (33%)	1 (33%)		2 (67%) (**)
<i>Micrococcus luteus</i>	4	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7	5 (71%)	6 (86%)	3 (43%)	1 (14%)	3 (43%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)		
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	0 (0%)	0 (0%)			1 (100%) (**)
<i>Streptococcus oralis</i>	1	0 (0%)	0 (0%)			1 (100%) (**)
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	0 (0%)	0 (0%)			1 (100%) (**)
<i>Streptococcus mitis</i>	1	0 (0%)	0 (0%)			1 (100%) (**)
<i>Streptococcus intermedius</i>	1	0 (0%)	0 (0%)			1 (100%) (**)
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)		
<i>Streptococcus bovis</i>	1	0 (0%)	1 (100%) (***)			1 (100%)
<b>Totaal</b>	<b>51</b>	<b>12/51 (24%)</b>	<b>20/51 (39%)</b>	<b>21/51 (41%)</b>	<b>8/51 (16%)</b>	<b>22/51 (43%)</b>

(\*) Waarvan 1 kiem niet geanalyseerd kon worden met het BD Phoenix Systeem gezien geen suspensie van minstens 0.25 McF bekomen kon worden  
(\*\*) Geen analyse met het BD Phoenix Systeem mogelijk gezien het juiste Phoenix panel niet ingezet kon worden  
(\*\*\*) *Streptococcus lutetiensis*

**Tabel 3. Directe identificatie van Gram-positieve bacteriën met MALDI-TOF MS en het BD Phoenix Systeem**

## Directe gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem

Voor de evaluatie van de directe gevoeligheidsbepaling van micro-organismen uit positieve hemoculturen met het BD Phoenix Systeem werd gebruik gemaakt van volgend document: "Clinical microbiology procedures handbook, 3rd edition, Garcia. ASM press 2010. 5.17 Evaluating Antimicrobial Susceptibility Test Systems" (35).

Volgende termen worden hierin vermeld:

- "Categorical agreement": category results are identical
- "Very major error": Test results shows susceptibility, and reference result shows resistance
- "Major error": Test result shows resistance, and reference result shows susceptibility
- "Minor error": Test result shows resistance or susceptibility and reference result shows intermediate, or test result shows intermediate and reference result shows resistance or susceptibility

Zoals voor de directe identificatie met het BD Phoenix Systeem werd ook het al dan niet uitvoeren van de directe gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem en de keuze van het Phoenix panel bepaald door het resultaat van de directe identificatie bekomen met MALDI-TOF MS en op basis van de Gramkleuring en/of het resultaat van de Slidex pneumo-Kit (bioMérieux). Voor de evaluatie van de directe gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem werden enkel de antibiotica die doorgestuurd werden naar het laboratorium informatie systeem (LIS) vergeleken met de referentiemethode. Echter met de routine methode was niet voor elk antibioticum een resultaat beschikbaar (éénmaal cefepime bij een *Klebsiella pneumoniae*, éénmaal levofloxacin bij een *Klebsiella pneumoniae* en éénmaal temocilline bij een *Morganella morganii*). Bijgevolg konden hiermee geen data vergeleken worden voor de evaluatie van de directe gevoeligheidsbepaling.

Omwille van dezelfde reden als bij de directe identificatie met het BD Phoenix Systeem werd één kiem (*Prevotella buccae*) geëxcludeerd in de groep van de Gram-negatieve bacteriën. Er werden bijgevolg 22 Gram-negatieve bacteriën geïncubeerd voor een directe gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem. Bij 1 kiem (*Brevundimonas vesicularis*) kon geen directe gevoeligheidsbepaling bekomen worden na incubatie met het BD Phoenix Systeem. Bij de overige 21 Gram-negatieve bacteriën kon slechts voor enkele antibiotica geen resultaat bekomen worden (éénmaal cefepime bij een *Klebsiella pneumoniae*, éénmaal levofloxacin bij een *Proteus mirabilis* en éénmaal temocilline bij een *Morganella morganii*).

Voor het berekenen van de "categorical agreement" (CA), "very major errors" (VME), "major errors" (ME) en de "minor errors" (MiE) werd enkel gekeken naar de antibiotica waarvoor zowel met de routine methode als met de directe methode een resultaat bekomen werd.

Voor de directe gevoeligheidsbepaling van Gram-negatieve bacteriën met het BD Phoenix Systeem werd een CA bekomen van 99% met 0.3% VME, 0.3% ME en 0.6% MiE. VME traden op bij temocilline (Tabel 4). Echter dient hier vermeld te worden dat men moet opletten met het vergelijken van gevoeligheidsbepalingen en bepalen van VME voor temocilline tussen de directe methode en de routine methode. Met behulp van de routine methode voor de gevoeligheidsbepaling van temocilline met het BD Phoenix Systeem zijn "resistente" resultaten niet steeds betrouwbaar (36).

Antibiotica	Aantal kiemen getest	% CA	% VME	% ME	% MiE
Amikacine	20	95%			5%
Amoxicilline-clavulaanzuur	19	95%		5%	
Ampicilline	19	100%			
Aztreonam	20	100%			
Cefazoline	19	100%			
Cefepime (*)	18	100%			
Ceftazidime	20	100%			
Ceftriaxone	19	95%			5%
Cefuroxime	19	100%			
Ciprofloxacine	21	100%			
Colistine	1	100%			
Ertapenem	19	100%			
Gentamicine	20	100%			
Levofloxacine (*)	18	100%			
Meropenem	20	100%			
Piperacilline-tazobactam	20	100%			
Temocilline (**)	18	94%	6%		
Trimethoprim-sulfamethoxazole	20	100%			
<b>Totaal</b>	<b>330</b>	<b>99%</b>	<b>0.3%</b>	<b>0.3%</b>	<b>0.6%</b>

(\*) Voor 2 kiemen werd éénmaal met de routine methode en éénmaal met de directe methode geen resultaat bekomen met het BD Phoenix Systeem. Bij het "aantal geteste kiemen" werden deze niet meegenomen voor de berekening van de CA.  
(\*\*) Voor 1 kiem werd zowel met de routine methode als met de directe methode geen resultaat bekomen met het BD Phoenix Systeem. Bij het "aantal geteste kiemen" werd deze niet meegenomen voor de berekening van de CA.

**Tabel 4.**

**Directe gevoeligheidsbepaling van Gram-negatieve bacteriën met het BD Phoenix Systeem. Resultaten voor "Categorical agreement" (CA), "Very major errors" (VME), "Major errors" (ME) en "Minor errors" (MiE).**

Voor Gram-positieve bacteriën kon voor de directe gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem zoals bij de directe identificatie met het BD Phoenix Systeem geen panel ingezet worden voor 3 stafylokokken gezien geen suspensie van 0.25 McF bekomen werd. Ook voor 7 streptokokken was geen gevoeligheidsbepaling beschikbaar gezien niet bepaald kon worden welk Phoenix panel gebruikt moest worden. Gezien *Micrococcus luteus* niet opgenomen is in de lijst van kiemen waarvoor een gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem kan uitgevoerd worden (BD Phoenix™ System User's Manual), werd ook hier geen gevoeligheidsbepaling voor bekomen. Voor 8 stafylokokken werd wel een Phoenix panel ingezet, maar kon geen directe gevoeligheidsbepaling uitgevoerd worden met het BD Phoenix Systeem. Voor 4 stafylokokken en 1 streptokok waarvoor een Phoenix panel werd ingezet, kon met het BD Phoenix Systeem wel een gevoeligheidsbepaling bekomen worden (MIC-waarden), maar konden deze waarden niet geïnterpreteerd worden (S, I, R) gezien er noch met MALDI-TOF MS noch met het BD Phoenix Systeem een directe identificatie uitgevoerd kon worden.

Voor 3 stafylokokken en 4 streptokokken werd een directe gevoeligheidsbepaling uitgevoerd (MIC-waarden) maar was de directe identificatie met het BD Phoenix Systeem foutief of was er geen directe identificatie beschikbaar. Echter met MALDI-TOF MS kon hiervoor wel een correcte identificatie bekomen worden. Aan de hand van deze identificatie konden deze MIC-waarden geïnterpreteerd worden. Voor 6 streptokokken, 10 stafylokokken en 1 enterokok was zowel een directe identificatie als een directe gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem beschikbaar en waren de MIC-waarden aan de hand van deze identificatie geïnterpreteerd. Hiervan kon éénmaal voor cefoxitine bij een *Staphylococcus hominis* geen resultaat bekomen worden.

Voor het berekenen van de "categorical agreement" (CA), "very major errors" (VME), "major errors" (ME) en de "minor errors" (MiE) werd enkel gekeken naar de antibiotica waarvoor zowel met de routine methode als met de directe methode een resultaat bekomen werd.

Voor de directe gevoeligheidsbepaling van Gram-positieve bacteriën met het BD Phoenix Systeem werd een CA bekomen van 95% met 2% ME en 3% MiE. Er waren geen VME (Tabel 5).

Antibiotica	Aantal kiemen getest	% CA	% VME	% ME	% MiE
Amikacine	13	92%			8%
Amoxicilline	1	100%			
Ampicilline	1	100%			
Cefepime	8	100%			
Cefotaxime	8	100%			
Cefoxitine (*)	12	100%			
Cefuroxime	8	100%			
Chloramphenicol	9	100%			
Ciprofloxacine	14	93%			7%
Clindamycine	23	96%			4%
Erytromycine	23	100%			
Fosfomycine	1	100%			
Fusidinezuur	13	100%			
Gentamicine	13	100%			
Gentamicine-Syn	1	100%			
Levofloxacine	9	67%		22%	11%
Linezolid	23	100%			
Meropenem	8	100%			
Moxifloxacine	22	86%		9%	5%
Mupirocine	13	100%			
Mupirocine High	13	100%			
Oxacilline	13	100%			
Penicilline G	10	100%			
Rifampicine	13	100%			
Tetracycline	22	77%		9%	14%
Trimetroprim-sulfamethoxazole	20	95%			5%
Vancomycine	24	100%			
<b>Totaal</b>	<b>338</b>	<b>95%</b>	<b>0%</b>	<b>2%</b>	<b>3%</b>

(\*) Voor 1 kiem werd met de directe methode geen resultaat bekomen met het BD Phoenix Systeem. Bij het "aantal geteste kiemen" werd deze niet meegenomen voor de berekening van de CA.

**Tabel 5.**  
**Directe gevoeligheidsbepaling van Gram-positieve bacteriën met het BD Phoenix Systeem.**  
**Resultaten voor "Categorical agreement" (CA), "Very major errors" (VME), "Major errors" (ME) en "Minor errors" (MiE).**

*Deze methode werd opgesteld in het Jessa Ziekenhuis in Hasselt voor de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling van micro-organismen uit positieve hemoculturen met behulp van MALDI-TOF MS en het BD Phoenix Systeem. Voor Gram-negatieve bacteriën werden betere resultaten bekomen dan voor Gram-positieve bacteriën en kan deze methode gebruikt worden om gelijktijdig een directe identificatie en gevoeligheidsbepaling uit te voeren waardoor men sneller een optimale therapie kan opstarten. Echter is het geen optimale methode voor de directe identificatie en gevoeligheidsbepaling van Gram-positieve bacteriën uit hemoculturen.*

#### **TO DO/ACTIONS**

Evalueren van andere methodes voor de directe identificatie / gevoeligheidsbepaling van micro-organismen uit positieve hemoculturen, voornamelijk van Gram-positieve bacteriën.