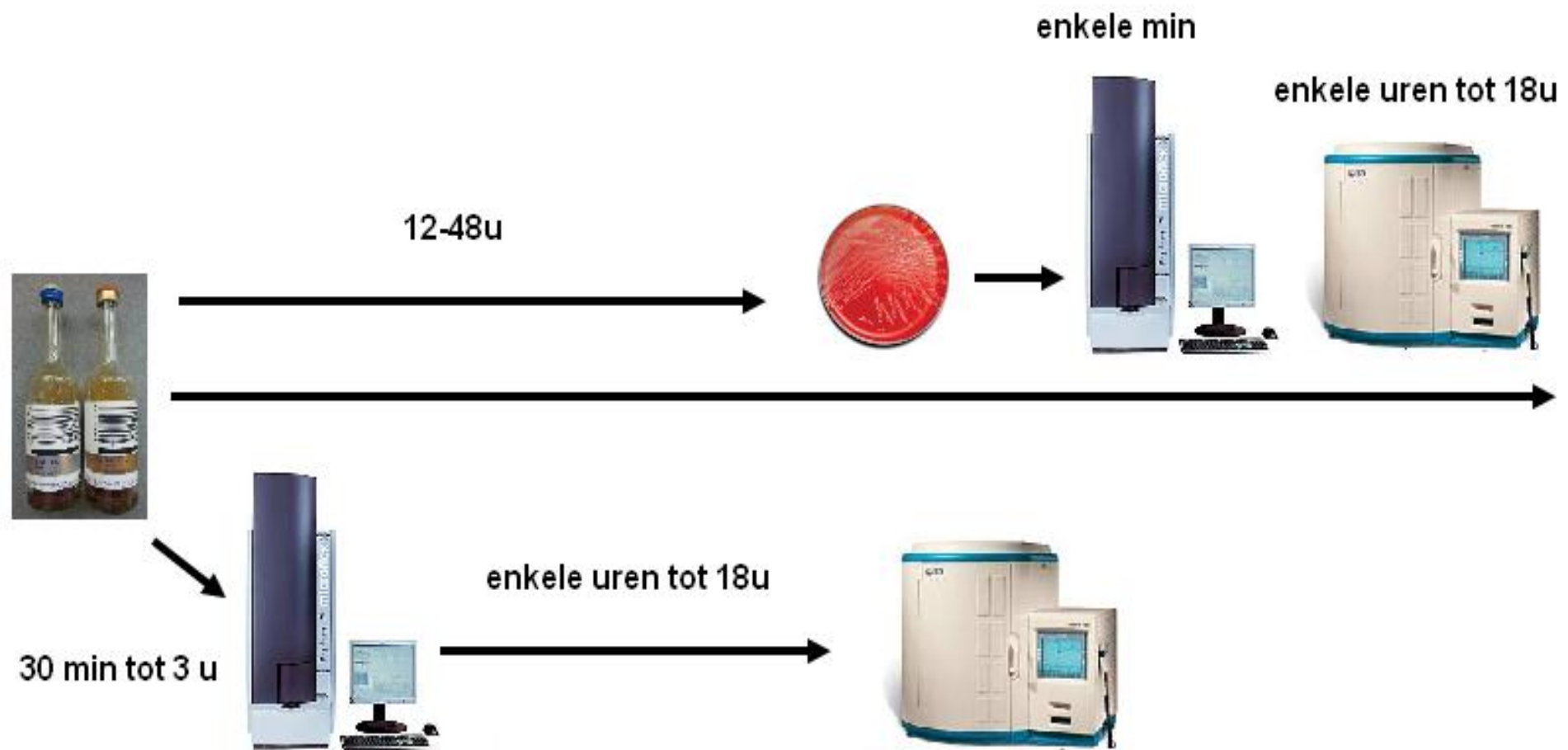


Directe identificatie en gevoeligheidsbepaling van
micro-organismen uit positieve hemoculturen
met behulp van
MALDI-TOF MS en het BD Phoenix Systeem

An Joosten



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

1. Methodes?

2. Welke micro-organismen?

**3. Opstellen van een eigen methode
in het Jessa Ziekenhuis Hasselt**

Methodes in de literatuur

BD Phoenix System

- Funke G et al. J Clin Microbiol 2004
- Lupetti A et al. Clin Microbiol Infect 2010
- Beuving J et al. BMC Microbiol 2011.
- Yonetani S et al. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012.

MALDI-TOF MS

- La Scola B et al. PLoS One 2009
- Christner M et al. J Clin Microbiol 2010
- Drancourt M et al. Clin Microbiol Infect 2010
- Ferroni A et al. J Clin Microbiol 2010
- Marinach-Patrice C. PLoS One 2010
- Moussaoui W et al. Clin Microbiol Infect 2010
- Prod'hom G et al. J Clin Microbiol 2010
- Stevenson LG et al. J Clin Microbiol 2010
- Ferreira L et al. Clin Microbiol Infect 2011
- Juiz PM et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011
- Kok J et al. PLoS One 2011
- Kroumova V et al. Rapid Commun Mass Spectrom 2011
- Loonen AJ et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011
- Szabados F et al. Clin Microbiol Infect 2011
- Yan Y et al. Clin Microbiol 2011
- Buchan BW et al. J Clin Microbiol 2012
- Klein S et al. J Med Microbiol 2012
- Schmidt V et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012
- Spanu T et al. J Clin Microbiol 2012

BD Phoenix Systeem



- (Saponine)
- Serum Separator Tube (SST)
- 5mL, 7mL, 8.5mL, 12 mL inhoud positieve hemocultuurfles
- Centrifugatie
 - 2000 x g gedurende 10 min
 - 2620 x g gedurende 15 min
- Supernatans verwijderen
- Bacteriën in suspensie brengen in Phoenix Systeem ID Broth

MALDI-TOF MS

- BACTEC - BacT/Alert systeem
- 200µL tot 10mL
- Steriele buis of SST
- Verwijderen rode bloedcellen
 - Cel lyse
 - Centrifugatie aan lage snelheid
 - Steriel water
 - Ammonium chloride
 - Wassen
 - SST
- (Eiwitextractie)
 - 70% ethanol
 - Mierenzuur
 - Trifluoroacetic acid
 - Acetonitrile

Welke micro-organismen?

- Enkel Gram-negatieve staven
- Enkel Gram-positieve kokken
- Beiden

- Mono-microbieel

- Gram-negatieve staven – Gram-positieve kokken

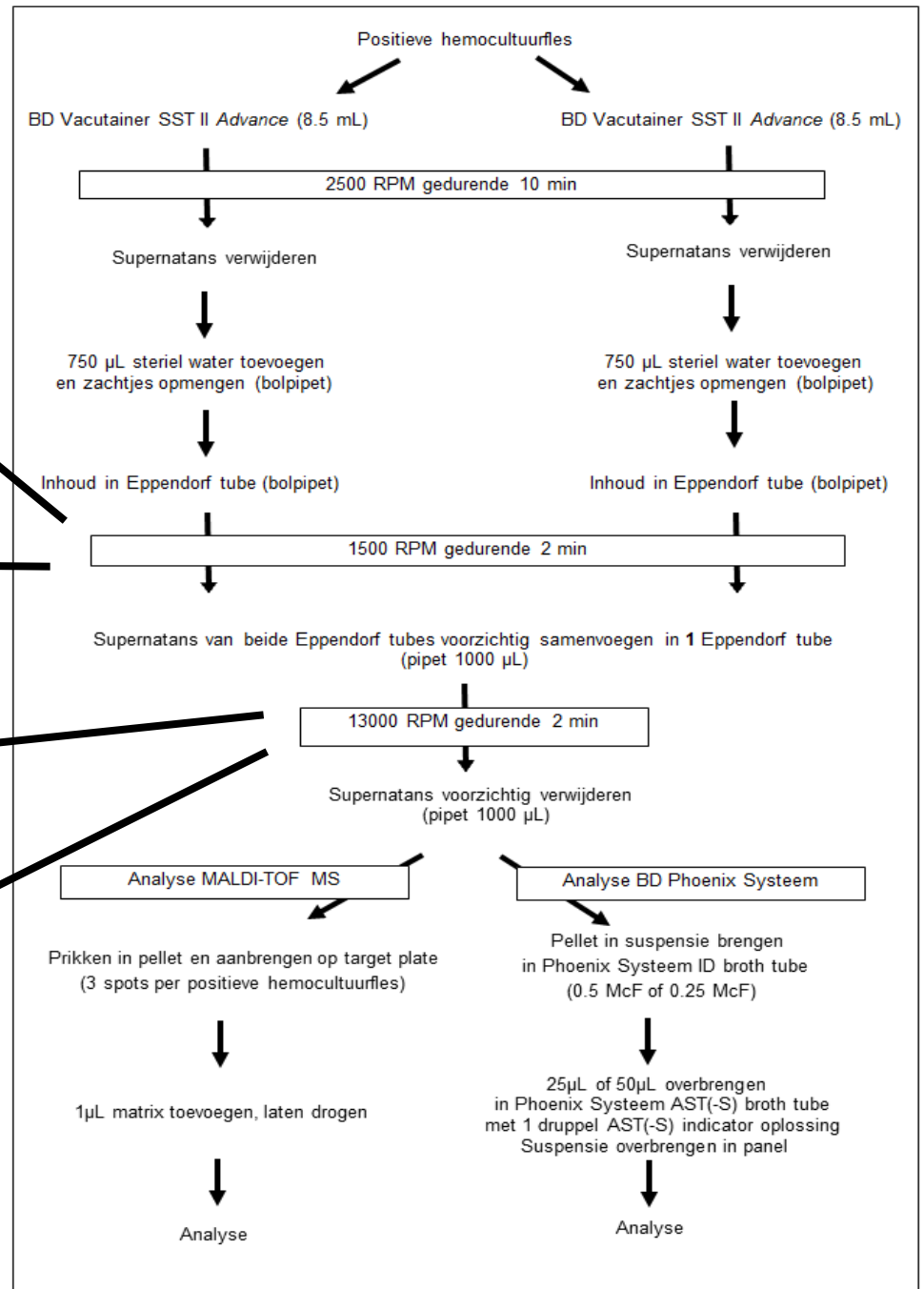
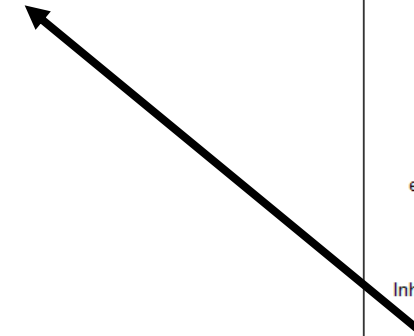
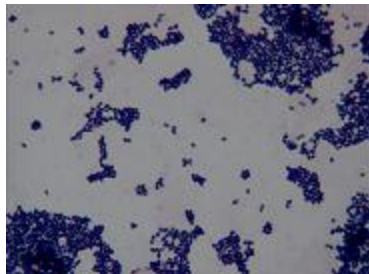
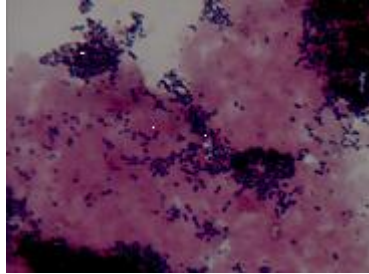
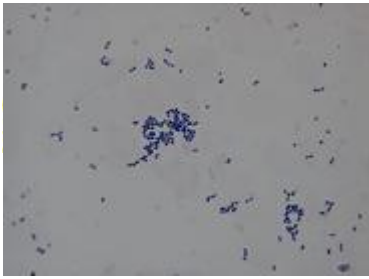
- Fermenterende bacteriën / niet-fermenterende bacteriën

- Gram-negatieve bacteriën
- Gram-positieve bacteriën
- Gisten

- Gram-negatieve bacteriën > Gram-positieve bacteriën
- (Viridans) streptokokken en coagulase-negatieve stafylokokken
- *Streptococcus oralis/mitis* – *Streptococcus pneumoniae*

- Mono-microbieel – Poly-microbieel

Opstellen van een eigen methode in het Jessa Ziekenhuis Hasselt



- 74 hemocultuurflessen
 - 41 aeroob
 - 26 anaeroob
 - 7 pediatrisch
- 1 hemocultuurfles per patiënt
- Mono-microbiële stalen
- Bacteriën

Gram-negatieve bacteriën	Aantal (n=)
<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
Totaal	23
Gram-positieve bacteriën	Aantal (n=)
<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
Totaal	51

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

- Eerst analyse MALDI-TOF MS -> BD Phoenix Systeem
- MALDI-TOF MS
 - 23 Gram-negatieve bacteriën
 - 51 Gram-positieve bacteriën
 - 3 spots op een "target plate"
 - Automatische analyse -> manuele analyse
 - Gram-negatieve bacteriën > Gram-positieve bacteriën
- BD Phoenix Systeem
 - 23 Gram-negatieve bacteriën
 - Exclusie *Prevotella buccae*
 - 51 Gram-positieve bacteriën
 - (3 stafylokokken)
 - (7 streptokokken)
 - Gram-negatieve bacteriën > Gram-positieve bacteriën

		Identificatie MALDI-TOF MS		Identificatie BD Phoenix Systeem		
		Score = 2 (%)	Score = 1.7 (%)	Correcte ID	Foutieve ID	Geen ID
Gram-negatieve bacteriën	Aantal					
<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%)	(**)	(**)	(**)
Totaal	23	18/23 (78%)	21/23 (91%)	21/22 (95%)	1/22 (5%)	

(*) Resultaten van de verschillende spots waren zowel *Pseudomonas geniculata* als *Stenotrophomonas geniculata* met score = 2
(**) Voor de identificatie met het BD Phoenix Systeem werd *Prevotella buccae* geëxcludeerd

		Identificatie MALDI-TOF MS		Identificatie BD Phoenix System		
		Score = 2 (%)	Score = 1.7 (%)	Correcte ID	Foutieve ID	Geen ID
Gram-positieve bacteriën	Aantal					
<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%)
Totaal	51	12/51 (24%)	20/51 (39%)	21/51 (41%)	8/51 (16%)	22/51 (43%)

(*) 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 juiste panel niet kon ingezet worden

(***) *Streptococcus lutetiensis*

- **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

Directe gevoeligheidsbepaling met het BD Phoenix Systeem

- Eerst analyse MALDI-TOF MS -> BD Phoenix Systeem
- LIS
- Routine methode - directe methode
- EUCAST richtlijnen
- 23 Gram-negatieve bacteriën
 - Exclusie *Prevotella buccae*
- 51 Gram-positieve bacteriën
 - 3 stafylokokken
 - 7 streptokokken
 - 4 *Micrococcus luteus*
 - 8 stafylokokken
 - 4 stafylokokken en 1 streptokok
 - 3 stafylokokken en 4 streptokokken
 - 6 streptokokken, 10 stafylokokken en 1 enterokok

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%			
Totaal	330	99%	0.3%	0.3%	0.6%

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

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%			
Ciprofloxacin	14	93%			7%
Clindamycine	23	96%			4%
Erytromycine	23	100%			
Fosfomycine	1	100%			
Fusidinezuur	13	100%			
Gentamicine	13	100%			
Gentamicine-Syn	1	100%			
Levofloxacin	9	67%		22%	11%
Linezolid	23	100%			
Meropenem	8	100%			
Moxifloxacin	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%
Trimetoprim-sulfamethoxazole	20	95%			5%
Vancomycine	24	100%			
Totaal	338	95%	0%	2%	3%

(*) 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.

Methode Jessa Ziekenhuis Hasselt

- Gelijktijdig directe identificatie en gevoeligheidsbepaling voor Gram-negatieve bacteriën uit positieve hemocultuurflessen waardoor sneller een optimale therapie opgestart kan worden
- Gram-positieve bacteriën?

To Do

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