

BIO-/LABSIKKERHET VED IDENTIFIKASJONSARBEID PÅ LAB - MALDITOF

Forfatter: Truls Leegaard, Avdeling for Mikrobiologi og smittevern, Akershus universitetssykehus

FORSLAG TIL ANBEFALINGER (**RØD** SKRIFT = TIL DISKUSJON KONTROVERSIELLE)

ANBEFALING 1 – VED IDENTIFIKASJON MED MALDITOF BØR LABORATORIENE GJØRE EN NØYE RISIKOVURDERING OM ARBEID MED UKJENTE MIKROBER OG MIKROBER DER MAN MISTENKER AT DE KAN TILHØRE RISIKOKLASSE 3 ELLER ANDRE HØYRISIKOMIKROBER (F.EKS. MENINGOKOKKER) BØR GJØRES I SIKKERHETSKABINETT. KLASSE 2 TIL ETANOL ER TILSATT. FOR MIKROBER MAN ER GANSKE SIKRE PÅ HVILKEN GRUPPE DE TILHØRER KAN ARBEIDET GJØRES PÅ BENK (F.EKS. ENTEROBACTERALES, STAFYLOKOKKER, STREPTOKOKKER, MM).

ANBEFALING 2 – EKSTRAKSJON MED ETANOL OG MAURSYRE BØR BENYTTES PÅ ISOLATER MAN MISTENKER KAN TILHØRE RISIKOKLASSE 3 ELLER ANDRE HØYRISIKOMIKROBER.

ANBEFALING 3 – MAN BØR VURDERE BRUK AV BESKYTTELSESUTSTYR.

ANBEFALING 4 - LOKAL RISIKOVURDERING ER ALLTID VIKTIG, OG LABORATORIENES BØR HA EN PLAN FOR NÅR DET KAN VÆRE BEHOV FOR PROFYLAKSE VED EKSPONERING.

ANBEFALING 5 - ALLE LABORATORIER BØR HA TILGANG TIL BIOTERROR-DATABASEN (SR-DATABASEN).

AVGRENSNINGER RELEVANTE PROBLEMSTILLINGER

Bakgrunn

Arbeidstilsynet definerer laboratorier som risikofylte arbeidsplasser som krever tiltak for å beskytte arbeidstakerne. Risiko på mikrobiologiske laboratorier er knyttet til både eksponering mot kjemikaler og mikroorganismer. Menneskelige faktorer som manglende bruk av personlig beskyttelsesutstyr, manglende prosedyrer og risikoevalueringer, prosedyrer som ikke følges og manglende opplæring av personalet er antatt å være årsak til flest laboratorieassosierte infeksjoner (CDC/NIH, 2009).

Laboratorieassosiert infeksjon er definert som en infeksjon som følge av smitte via laboratoriet eller laboratorierelatert arbeid. Risikoen for utvikling av sykdom ved eksponering er avhengig av:

1. **Biologisk agens** (smitterisikogruppe, infeksjons dose, smitemåte, evne til å gi alvorlig sykdom og død hos den infiserte, tilgjengelig behandling).

2. **Form for eksponering** (Aerosoldannende prosedyrer, skarpe gjenstander og risiko for perkutan eksponering).
3. **Den som eksponeres** (Helsestatus til laboratoriepersonell, immunitet, tilgjengelig vaksinasjon).

Tabell med bakterier og sopp tilhørende **risikoklasse 3**.

(<https://www.arbeidstilsynet.no/regelverk/forskrifter/forskrift-om-tiltaks--og-grenseverdier/vedlegg/2/>)

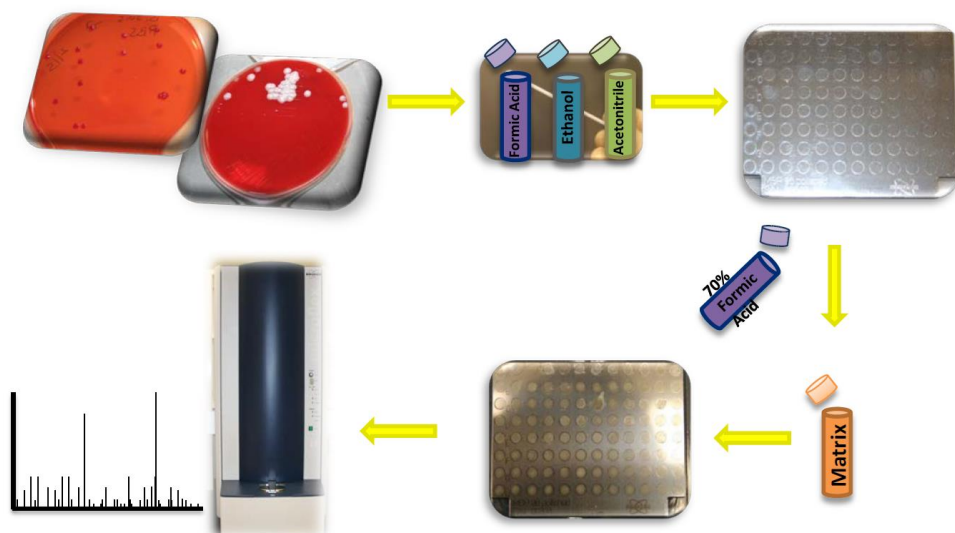
<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Brucella</i> spp.
<i>Burkholderia mallei</i> og <i>pseudomallei</i>
<i>Coxiella burnetii</i>
Dimorfe sopp – med noen unntak
Enkelte muggsopp – bl.a. <i>Rhinoctadiella mackenzii</i> og <i>Cladophialophora bantiana</i>
<i>E. coli</i> , vero-(shiga-) cytotoksiske stammer (VTEC/EHEC)
<i>Francisella tularensis</i> subspecies <i>tularensis</i>
<i>Mykobacterium tuberculosis</i> complex
Rickettsia spp.
<i>Salmonella</i> Typhi
<i>Shigella dysenteriae</i> (type 1)
<i>Yersinia pestis</i>

Ansatte ved norske mikrobiologiske laboratorier har gjennom gode prosedyrer og opplæring av personalet innarbeidet risikovurdering. Risikovurdering utføres basert på kliniske opplysninger og prøvemateriale. Fullstendige kliniske opplysninger og risiko oppgis ikke alltid på rekvisisjonene, slik at man må ta høyde for at det kan være høyrisikomikrober til stede som man ikke kan forutse.

Det er foreløpig ikke mye data på sikkerhet i forbindelse med nye metoder for identifisering. Det gjelder også for MaldiToF. Man baserer seg på risikovurderinger og erfaringer med høyrisikomikrober man har fra tidligere. Ofte er det avhengig av at noen reagerer på kliniske opplysninger eller sykdomsbilde, dvs. en svært subjektiv vurdering.

Ulike laboratorier har ulike forutsetninger. Laboratorier uten tilgang til BSL3-laboratorium må rigge seg slik at man kan arbeide godt, trygt og effektivt ved ulike laboratorier. I dag foregår mye av arbeidet med å sette mikrobene på identifikasjonsplatene på benk. I alle fall dersom man ikke har mistanke om høyrisikomikrober.

Illustrasjon av arbeidsflyten ved identifikasjon av mikrober med MaldiToF



Uttrekk fra egen prosedyre, kun delen om HMS – som bakgrunn for diskusjon:

Alle prøver og stammer skal behandles som infeksiosøst materiale, og håndteres deretter.

Prøvepreparering av **bakterier** og **gjærsopp** kan som hovedregel foregå på benk.

Prøvepreparering av **muggsopp** og **dermatofytter** utføres i sikkerhetskabinett klasse 2 for å unngå spredning av soppsporer i laboratoriet. Se eget punkt for detaljer.

Benytt de sikkerhetsforanstaltninger man vanligvis benytter- f.eks. bør arbeid med **meningokokker** eller med uavklarte blodkulturisolat foregå i sikkerhetskabinett klasse 2.

MALDI-TOF skal IKKE gjøres ved mistanke om sporedannende bakterier som krever BSL3, det vil si ikke-hemolytisk bacillus, *Bacillus anthracis*.

Ved **direkte MALDI på blodkulturflaske** skal arbeidet foregå i sikkerhetskabinett klasse 2 til etanol er tilsatt.

Dersom MALDI-TOF ønskes på **mistenkte patogene mikrober fra fæces- eller BSL3 laboratoriet**, gjøres alltid ekstraksjon. Arbeidet foregår på fæces- eller BSL3 laboratoriet til etanol er tilsatt.

Reagenser som brukes ved analyseringen er helseskadelige. Unngå søl på hud og i øynene.

Ved arbeid med maursyre (formic acid) skal hansker og briller/vernebriller benyttes.

Ved håndtering av trifluoroacetic syre skal vernebriller benyttes (i tillegg til hansker) eller så må heveluken være nedtrukket slik at ansiktet er beskyttet for eventuell sprut.

Reagensfremstilling og vasking av plater foregår i kjemisk avtrekk. Det finnes hansker med lange mansjetter som kan brukes ved vask av plater. Se eget punkt.

Gravide skal ikke utføre arbeid i kjemisk avtrekk der fargevæskene står.

PROBLEMOMRÅDER

Spørsmål:

- Eksponering for kjemikaler?
- Eksponering og aerosoldannelse – bør alle prøver håndteres i sikkerhetskabinett?
- Dersom man ikke tar alle prøver i kabinett – bør man da bruke personlig sikkerhetsutstyr?
- Blir agens inaktivert? Hva inaktiverer hva og hvor godt?
- Bør alle laboratorier ha tilgang til bioterror-databasen (SR-databasen)?
- Profylakse ved eksponering?
- Nullprøve serologi ved eksponering?

Diskusjon

Laboratoriene har vurdert at kjemikaliene kan håndteres adekvat. Det bør tas hensyn til at gravide ikke kan utføre visse oppgaver.

Selv om det hittil ikke har vært noen kjente smittetilfeller ved arbeid på benk i forbindelse med MaldiToF er det mange usikkerhetsfaktorer når vi identifiserer mikrober ved hjelp av MaldiToF. Vi vet ofte ikke hva vi har med å gjøre. Ved identifikasjon med MaldiToF bør laboratoriene gjøre en nøye risikovurdering om arbeid med ukjente mikrober og mikrober der man mistenker at de kan tilhøre risikoklasse 3 eller andre høyrisikomikrober (f.eks. meningokokker) bør gjøres i sikkerhetskabinett klasse 2 til etanol er tilsatt. Etablert arbeidsrutiner i eget

laboratorium gjør forskjell på blodkulturisolater og andre isolater. Blodkulturisolater tilsettes etanol før direkte MaldiToF-identifikasjon. Dette gjøres i kabinett. Etter at blodkulturene er tatt ut av sikkerhetskabinettet tilsettes alle prøvene maursyre. For mikrober der man er ganske sikre på hvilken gruppe de tilhører gjøres arbeidet på benk (f.eks. Enterobacterales, stafylokokker, streptokokker, mm), selv uten tilsetning av etanol og/eller maursyre. Ved å flytte en del arbeid inn i sikkerhetskabinett kan laboratorier uten BSL3-laboratoriefasiliteter også kan arbeide risikofritt. MaldiToF bør ikke benyttes til identifikasjon ved mistanke om ikke-hemolytisk bacillus (*Bacillus anthracis*), men dersom man gjør direkte MaldiToF-identifikasjon er det mulig at enkelte høypatogene mikrober allikevel kan bli håndtert. Dersom man må vente til Gram er utført, vil det forsinke prøvehåndteringen. Hva er så risikoen ved det? Husk at kontaktsmitte ved f.eks. *F. tularensis* også er mulig (om man ikke bruker hansker ved håndtering av materiale før inaktivering med etanol og/eller maursyre)

Det vil sannsynligvis være ulik håndtering i labber med ulikt inneslutningsnivå. Lokal risikovurdering er alltid viktig, og bør være en del av egne prosedyrer.

Utpøringer har vist at direkte ekstraksjon ikke inaktiverer agens i alle tilfeller, mens etanol inaktivering med etterfølgende maursyre ekstraksjon inaktiverer agens som ikke er sporedannere (Lasch 2015, Cunningham, 2013). Til inaktivering av sporer anbefales Trifluoreddiksyre (TFA) (Lasch, 2008), og har vært benyttet med helle av flere (Pauker 2018).

Vi vet ofte ikke hva vi arbeider med før identifikasjon og er avhengige av at database gir rett identifikasjon. Flere laboratorier har tilgang på SR-databasen, og har erfaringer med at den gir god identifikasjon dersom det dreier seg om en høypatogen bakterie, f. eks en *Brucella* spp., *Francisella* spp. eller en *Burkholderia* spp, men at den ikke skiller godt mellom beslektede arter og underarter (inkludert de som er mindre patogene). Den kan altså fint brukes til å få indikasjon på genus, men videre identifikasjon bør gjøres på referanselaboratorium (f.eks. Beredskapslaboratoriet på FHI). Se også artiklene fra Lasch et al og Antonation et al. De viser at man får forskjellig resultat ved bruk av de forskjellige databasene som er tilgjengelige. I Brukers SR-bibliotek kan man velge mellom liste 1 og 2 (se under).

Fordelen ved ha lokal tilgang til bioterror (SR-databasen) databasen er at man kan få en rask diagnose. Det tar i mange tilfeller lang tid å få svar fra et region-/referanse-laboratorium som har en slik database. Vi mener kostnaden dersom noen blir smittet på laboratoriene er for høy og at man ikke kan ta den risikoen.

Dersom kliniske opplysninger og kolonimorfologi gir sterk mistanke om høyrisiko patogen mikrobe bør man fortsatt ta kontakt med beredskapslaboratoriet ved FHI for analyse. De kan utføre rask analyse ved behov.

Lokal risikovurdering er alltid viktig, og laboratorienes bør ha en plan/ prosedyre for når det kan være behov for profylakse ved eksponering, og bør også si noe om hvem som skal skrive resept og følge opp den ansatte (bør journalføres). Man bør også sørge for serologisk nullprøve ved eksponering, f.eks. ved *Francisella* og *Brucella*.

Release Notes
MBT Compass Library
Revision K (2022)



Table 1: List of species included in 'SR' Library. Bold font indicates the different genera.

No.	Species
1	Bacillus anthracis
2	Brucella melitensis
3	Burkholderia mallei
4	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
5	Clostridium botulinum
6	Francisella tularensis
7	Salmonella paratyphi
8	<i>Salmonella typhi</i>
9	Shigella dysenteriae
10	Vibrio cholerae
11	Xanthomonas albilineans
12	Yersinia pestis

Table 2: List of species included in 'SR_BBFV' Library. Bold font indicates the different genera.

No.	Species
1	Brucella melitensis
2	Burkholderia mallei
3	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
4	Francisella tularensis
5	Vibrio cholerae

Note: Without installation of BTyp2.0Sec.Library 1.0 the highly pathogenic microorganisms included in this library cannot be correctly identified.

Highly pathogenic microorganisms not included in the BTyp2.0Sec.Library 1.0 (e.g. *Bacillus anthracis*) cannot be identified or will be commented within the Matching Hints of closely related less pathogenic microorganisms included in the MBT Compass Library (e.g. *Bacillus cereus*).

Internasjonalt er det flere rapporter om laboratoriesmitte. De fleste av disse rapportene er gamle, men det finnes noen nyere (f.eks. Baron, 2008). Selv om vi kan håpe at laboratoriene er blitt flinkere til å håndtere risikomikrober, er det noen kjente tilfeller av laboratoriesmitte i Norge. De fleste assosiert med jobb på benk, uten beskyttelse. Her nevnes to tilfeller, som eksempler:

- Det har vært ett tilfelle av laboratoriesmitte med *Brucella* der to medarbeidere ble smittet. For den første av disse vet man ikke hva som er kilden, mens medarbeider nummer to hadde jobbet med blodkulturen til den første. Medarbeider nummer to fikk også positiv blodkultur. Etter det ble alle aerosoldannende prosedyrer flyttet i avtrekk. Det gikk bra med begge.
- Et annet tilfelle var med meningokokker, der en medarbeider «bare» skulle spre en skål før vedkommende gikk hjem for dagen, og ikke satte seg i avtrekket. Vedkommende ble syk neste dag, veldig syk, men ble reddet av en årvåken kollega som sende medarbeideren direkte til akuttmottaket. Blodkultur var positiv, men det gikk bra i dette tilfellet.

I det ene tilfellet var det snakk om en mikrobe som tilhører høyrisikoklasse 3. I det andre tilfellet *Neisseria meningitidis* som ikke er i klasse 3. Det er altså andre mikrober enn de i den høyeste risikoklassen som kan gi alvorlige infeksjoner og som man må ta høyde for når man arbeider med ukjente mikrober.

REFERANSER

Referanser

Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Eds. L. Casey Chosewood and Deborah E. Wilson, 5th Edition, 2009, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health, HHS Publication No. (CDC) 21-1112

Rudrik JT, Soehnen MK, Perry MJ, Sullivan MM, Reiter-Kintz W, Lee PA, Pettit D, Tran A, Swaney E. 2017. Safety and accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of highly pathogenic organisms. *J Clin Microbiol* 55:3513-29

Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, Kiland Granerud B, Drevinek M, Kokotovic B, Wittwer M, Pflüger V, Di Caro A, Stämmler M, Grunow R, Jacob D. Identification of Highly Pathogenic Microorganisms by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Results of an Interlaboratory Ring Trial. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2632-40

Manzulli V, Rondinone V, Buchicchio A, Serrecchia L, Cipolletta D, Fasanella A, Parisi A, Difato L, Iatarola M, Aceti A, Poppa E, Tolve F, Pace L, Petrucci F, Rovere ID, Raele DA, Del Sambro L, Giangrossi L, Galante D. Discrimination of *Bacillus cereus* Group Members by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Microorganisms* 2021; 9: 1202

Antonation KS, Tracz DM, Dreger AD, Corbett CR. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry-based identification of security-sensitive bacteria: Considerations for Canadian Bruker users. *Can Commun Dis Rep* 2020; 46: 333–8

Lasch P, Nattermann H, Erhard M, Stämmler M, Grunow R, Bannert N, Appel B, Naumann D. MALDI-TOF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. *Anal Chem* 2008; 80: 2026–34

Pauker VI, Thoma BR, Grass G, Bleichert P, Hanczaruk M, Zöller L, Zange S. Improved Discrimination of *Bacillus anthracis* from Closely Related Species in the *Bacillus cereus* Sensu Lato Group Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2018; 56: 10.1128/jcm.01900-17

Cunningham SA, Patel R. Importance of using Bruker's security-relevant library for Biotyper identification of *Burkholderia pseudomallei*, *Brucella* species, and *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1639-40

Ackelsberg J, Liddicoat A, Burke T, et al. *Brucella* Exposure Risk Events in 10 Clinical Laboratories, New York City, USA, 2015 to 2017. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e01096-19

Baron EJ, Miller JM. Bacterial and fungal infections among diagnostic laboratory workers: evaluating the risks. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 241-6