

IDENTIFIKASJON AV ANAEROBER MED MASSESPEKTROMETRI

Forfatter: Tore Taksdal Stubhaug, overlege, mikrobiologisk avdeling, Sykehuset i Vestfold

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

ANBEFALING 1 – BRUK AV MALDI-TOF TIL IDENTIFISERING AV ANAEROBER

MALDI-TOF MS er godt egnet som hovedmetode for identifikasjon av klinisk relevante anaerober. Den viktigste enkeltfaktoren med betydning for graden av vellykket identifikasjon er kvaliteten på referansedatabasen. Bruk av «on plate» ekstraksjon med maursyre anbefales, spesielt for gram positive anaerober, fusobakterier og saktevoksende arter. For disse artene anbefales det videre å inokulere minst 2 spot. Identifikasjon med score $\geq 1,8$ kan regnes som sikker til artsnivå forutsatt at øvrige konsistenskrav er tilfredsstillt. Anaerober kan identifiseres med MALDI-TOF direkte fra positive blodkulturflasker og laboratoriet bør da validere en tilpasset cut-off for godkjent identifikasjon.

ANBEFALING 2 – HÅNDTERING AV TAKSONOMIENDRINGER OG SPESIELLE FORHOLD I SLEKTEN *BACTEROIDES*

Laboratoriene bør holde seg oppdatert på taksonomiendringer. Ved oppdatering av databaser må følgeskrivet gjennomgås for å se etter endringer som kan påvirke bruken av MALDI-TOF i rutinen. Arter som er kjent å være vanskelige å skille med MALDI-TOF bør besvares konsistent; herunder noen arter fra slekten *Bacteroides*. Arten *Bacteroides fragilis* vil i fremtiden trolig bli skilt i to forskjellige arter.

ANBEFALING 3 – IDENTIFIKASJON AV *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

MALDI-TOF MS i standard bruk kan ikke sikkert identifisere *Clostridium botulinum*. Ved reell mistanke om *C. botulinum* må det gjøres PCR for botulinumtoksingen, alternativt helgenomsekvensering.

AVGRENSNINGER RELEVANTE PROBLEMSTILLINGER

Innlegget omfatter bruk av MALDI-TOF MS til identifikasjon av anaerobe bakterier, herunder gjennomføring og spesielle forhold knyttet til tolkning som er spesifikke for anaerobe bakterier.

Alternative identifikasjonsmetoder til MALDI-TOF MS beskrives ikke inngående.

Forhold knyttet til håndtering av taksonomiendringer og arter som skilles ut eller endrer navn vil bli tatt opp i et eget foredrag, og bare problemstillinger som er spesifikke for anaerobe bakterier tas opp her.

Anbefalingene knyttet til scoreverdier, antall spot som inokuleres og identifikasjon direkte fra blodkulturflasker må om nødvendig samordnes med tilsvarende anbefalinger for aerobe bakterier.

PROBLEMOMRÅDE 1 – BRUK AV MALDI-TOF TIL RUTINEIDENTIFIKASJON AV ANAEROBER

Medisinsk-mikrobiologiske laboratorier bør kunne identifisere de viktigste gruppene anaerobe bakterier som gir sykdom (1). Anaerobe infeksjoner er ofte polymikrobielle og behandles ofte empirisk. Det blir derfor spesielt viktig å identifisere arter som kan ha uforutsigbart resistensmønster og bør resistensbestemmes (2). Disse sammenfaller i stor grad med artene som har kliniske brytningspunkter fra EUCAST (*Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Clostridium perfringens*, *Cutibacterium acnes* og *Clostridioides difficile*). Arter med iboende metronidazolresistens, som f.eks. *Actinomyces*, samt fakultativt anaerobe arter som vokser best anaerobt (f.eks. *Lactobacillus*, *Actinotignum* m.fl.) er også viktige å identifisere ettersom empirisk behandling med metronidazol da ikke vil være egnet. For øvrige anaerobier er det også ønskelig med identifikasjon til artsnivå, spesielt ved alvorlige infeksjoner, funn i renkultur eller fra normalt sterile områder eller ved manglende effekt av empirisk behandling (2). Identifikasjon til slektsnivå eller grovidentifikasjon (f.eks. anaerobe gram positive kokker) kan være tilstrekkelig i noen tilfeller.

MALDI-TOF massespektrometri gir generelt en svært god identifikasjon av anaerobe isolater, og er egnet som hovedidentifikasjonsmetode for anaerobier i rutinen (3-5). Et alternativ er biokjemiske systemer som f.eks. Vitek, som også fungerer brukbart (6), men MALDI-TOF MS gir vesentlig sikrere identifikasjon til artsnivå av mange arter (7), og det er mer krevende å holde biokjemiske systemer oppdatert med nye arter enn det er med MALDI-TOF MS, slik at de biokjemiske systemene vil ha manglende dekning av nye klinisk relevante anaerobier som oppdages (8). I de tilfellene man ikke kommer i mål med MALDI-TOF eller biokjemiske systemer, vil man måtte gjøre en avveining av om det er behov for sikker artsidentifikasjon med sekvensering, eller om det kan gjøres en enkel grovidentifikasjon til slekts-/gruppenivå.

Det er gjort studier på både Maldi Biotyper (Bruker) og VITEK MS (BioMérieux). En metaanalyse konkluderte med at begge systemene var likeverdige (5), mens en studie fra 2024 fant at Maldi Biotyper identifiserte en større andel isolater enn VITEK MS, men begge systemene ga tilfredsstillende identifikasjon av de hyppig forekommende artene (4). Ved å øke antall referansespektra i databasen oppnår man større andel vellykket identifiserte isolater (3, 8), og for sjeldent forekommende arter var denne effekten mest uttalt for VITEK MS (9). Bruk av in house databaser med egenproduserte spektra i tillegg til dem fra produsenten gir betydelig bedre identifikasjon av sjelden forekommende arter (8, 10). Dette tyder på at det er kvaliteten på databasen (antall referansespektra) som er begrensende faktor, og at løpende forbedring av databasene vil øke prestasjonen til MALDI-TOF-identifikasjon. Gjennom ENRIA-prosjektet er det gjort et systematisk arbeid for å generere referansespektra for et stort antall anaerobe arter (8, 10).

«On plate» ekstraksjon med 100 % maursyre gir signifikant økt sannsynlighet for sikker artsidentifikasjon, spesielt for gram positive arter (9, 11, 12), og anbefales. Eventuelt kan man avstå fra dette hvis man forventer arter hvor ekstraksjon erfaringsmessig ikke er nødvendig. Fullekstraksjon gir ytterligere noe økt sannsynlighet for sikker identifikasjon, men gevinsten står neppe i forhold til arbeidsmengden (11, 12).

Grenseverdiene for sikker identifikasjon ved bruk av MALDI-TOF MS settes vanligvis til logscore $\geq 2,0$ for identifikasjon til artsnivå og logscore $1,7 - < 2,0$ for identifikasjon til slektsnivå. For anaerobe bakterier har studier vist at å senke kriteriet for identifikasjon til artsnivå til 1,7 (12) eller 1,8 (3, 7) øker andelen identifiserte isolat betraktelig uten å føre til flere feilidentifikasjoner. Laboratoriene kan derfor vurdere å gi ut identifikasjoner med score $\geq 1,8$ til artsnivå, forutsatt at øvrige konsistenskrav er oppfylt.

Hvilket dyrkningsmedium koloniene plukkes fra har ingen nevneverdig betydning (12), heller ikke tiden skålene har vært inkubert (13). Langvarig eksponering for romluft reduserer sannsynligheten for identifikasjon noe, men effekten er mest fremtredende etter flere dager og avhenger av art, hvor gram positive kokker og fusobakterier påvirkes mest (12, 13). Ved vanlig laboratoriepraksis har denne effekten trolig liten betydning.

For arter med små, uregelmessige eller harde kolonier, herunder anaerobe gram positive kokker og fusobakterier, er det større variabilitet i hvilken score som oppnås ved gjentatt inokulering på MALDI-TOF-platen (13). For disse artene kan det være gunstig å inokulere flere spots (f.eks. to) for å gi større sannsynlighet

for at ett av resultatene gir tilfredsstillende score. For hurtigvoksende arter med glatte kolonier er variabiliteten mindre (13), og inokulering av kun én spot kan være tilstrekkelig.

Anaerobe bakterier kan identifiseres med MALDI-TOF direkte fra positive blodkulturflasker (14-16). Dette gir som regel lavere score enn ved identifikasjon fra koloni, og kriteriene for godkjent identifikasjon må derfor justeres. Foreslåtte justeringer er en grense på logscore 1,7 for identifikasjon til artsnivå og 1,4 for slektsnivå (16), eller identifikasjon til artsnivå når de tre beste forslagene er samme art, uavhengig av logscore (15).

PROBLEMOMRÅDE 2 – TAKSONOMISKE FORHOLD I SLEKTEN *BACTEROIDES*

Over de siste tiårene har taksonomien til en del viktige anaerobe slekter blitt revidert på bakgrunn av helgenomdata. For *Bacteroides* ble det gjort en større opprydning i 1989, og slekten *Bacteroides* er nå begrenset til det som omtales som *B. fragilis*-gruppen (17). I nyere tid har også noen arter blitt skilt ut i slekten *Parabacteroides* og *Phocaeicola*, men disse regnes fortsatt å tilhøre *B. fragilis*-gruppen.

Noen arter i *B. fragilis*-gruppen er nært beslektet og kan ikke sikkert skilles med MALDI-TOF. Dette gjelder hovedsakelig *B. thetaiotaomicron* som er nært beslektet med *B. faecis*, samt *B. ovatus* som er nært beslektet med *B. xylanisolvens* (8). Laboratoriene bør være oppmerksom på denne mulige begrensningen og vurdere å slå sammen besvarelsen av disse artsparene. Samtidig må man være forberedt på at forbedringer i databasene kan føre til at disse artene kan skilles bedre i fremtiden. Ved databaseoppdateringer bør man lese leverandørens følgeskriv og vurdere om det kan gjøres endringer i håndteringen av slike «problemarter».

Arten *Bacteroides fragilis* er inndelt i to grupper som betegnes divisjon I og divisjon II, der sistnevnte har et kromosomalt karbapenemasegen (*cfiA*) som kan komme til uttrykk i varierende grad, og gi nedsatt følsomhet eller resistens for meropenem og/eller piperacillin-tazobactam. Maldi Biotyper (Bruker) har en tilleggsfunksjon for å skille disse, som krever at man har kjøpt en ekstra subtypingsmodul. I realiteten oppfyller divisjon I og divisjon II kravene til å regnes som forskjellige arter (18). Et forslag om å skille ut divisjon II som en ny art med navnet *B. hominis* er publisert (19, 20), men endringen er ikke gjennomført i praksis. Det å identifisere et isolat som divisjon II kan være nyttig ettersom det kan gi en forklaring på observert nedsatt følsomhet for meropenem og piperacillin-tazobactam, men er ikke strengt nødvendig, da brytningspunktene for resistensbestemmelse er fastsatt etter vanlige prinsipper for kliniske brytningspunkter (21) og S/I/R-kategorisering av *Bacteroides* spp. skal rapporteres som testet uavhengig av artsidentifikasjon eller identifikasjon som divisjon I eller II (22). Laboratoriene bør være oppmerksomme på at *B. fragilis* sannsynligvis kommer til å bli splittet i to arter i en fremtidig oppdatering av databasene.

PROBLEMOMRÅDE 3 – IDENTIFIKASJON AV *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Fylogenen i slekten *Clostridium* er også blitt fortløpende revidert. Et problem som fortsatt gjenstår er at arten *C. botulinum* i realiteten er polyfyletisk, og består av flere metabolske grupper med ulik optimal veksttemperatur, som ideelt sett skulle vært klassifisert som ulike arter (23).

Botulisme er en problemstilling som bare sjelden dukker opp i medisinsk-mikrobiologiske laboratorier, da bakteriologisk dyrkning vanligvis ikke inngår i diagnostikken. Det kan imidlertid forekomme at man får vevsprøver fra pasienter med sårbotulisme, og det vil da være biogruppe I, med optimal veksttemperatur rundt 37 grader, som er mest aktuell (23). Denne er nært beslektet med *C. sporogenes* og kan ikke sikkert skilles med MALDI-TOF. Artene er også vanskelige å skille med 16S rDNA-sekvensering (24). Maldi Biotyper (Bruker) har en egen database for høypatogene agens (SR-taksonomi), men erfaringsmessig er det til lite hjelp å benytte denne når to arter i hver sin database er nært beslektet, da de ulike databasene gir ulik score-verdi og det derfor er

vanskelig å sammenlikne treff fra forskjellige databaser (25). Det er mulig å identifisere *C. botulinum* med MALDI-TOF ved bruk av spesielle statistiske analyser (26, 27), men dette er ikke implementert i databasene for rutinebruk. For sikkert å identifisere *C. botulinum* er man derfor avhengig av å påvise gen for botulinumtoksin med PCR eller helgenomsekvensering. Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) ved Mattrygghetslab er referanselaboratorium for botulinumtoksin, og kan ta imot isolater for PCR dersom laboratoriene ikke har dette tilgjengelig selv (Marina Aspholm, personlig meddelelse). Innsending av isolat bør avtales på forhånd med NMBU i hvert tilfelle.

Da også andre *Clostridium*-arter som f.eks. *C. baratii*, *C. buryticum*, *C. argentinense* og *C. subterminale* også kan ha gener for botulinumtoksin (28, 29), bør man ved reell klinisk mistanke om sårbotulisme vurdere også å utføre PCR-undersøkelse på andre *Clostridium*-arter.

C. sporogenes og de andre nevnte *Clostridium* er vanlig forekommende i miljøet og påvises minst like ofte i mikrobiologiske prøver som *C. botulinum*. Det er derfor mest hensiktsmessig at isolat bare sendes til undersøkelse for botulinumtoksingenener i de tilfellene hvor man har en reell klinisk mistanke om botulisme.

REFERANSER

1. Nagy E, Boyanova L, Justesen US. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. Clin Microbiol Infect. 2018;24(11):1139-48.
2. Gajdacs M, Spengler G, Urbán E. Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology? Antibiotics (Basel). 2017 Nov 7;6(4):25. doi: 10.3390/antibiotics6040025.
3. Alcalá L, Marín M, Ruiz A, Quiroga L, Zamora-Cintas M, Fernández-Chico MA, et al. Identifying Anaerobic Bacteria Using MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Four-Year Experience. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:521014.
4. Litterio M, Castello L, Venuta ME, Abel S, Fernández-Canigia L, Legaria MC, et al. Comparison of two MALDI-TOF MS systems for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in Argentina. Rev Argent Microbiol. 2024;56(1):33-61.
5. Li Y, Shan M, Zhu Z, Mao X, Yan M, Chen Y, et al. Application of MALDI-TOF MS to rapid identification of anaerobic bacteria. BMC Infect Dis. 2019;19(1):941.
6. Lee EHL, Degener JE, Welling GW, Veloo ACM. Evaluation of the Vitek 2 ANC card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol. 2011;49(5):1745-9.
7. Rodriguez-Sanchez B, Alcalá L, Marín M, Ruiz A, Alonso E, Bouza E. Evaluation of MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria. Anaerobe. 2016 Dec;42:101-107.
8. Veloo ACM, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, Urban E, Wybo I, et al. Validation of MALDI-TOF MS Biotyper database optimized for anaerobic bacteria: The ENRIA project. Anaerobe. 2018;54:224-30.
9. Ferrand J, Bonnet I, Alauzet C, Lozniewski A. Evaluation of the Vitek MS and the MALDI Biotyper systems for the identification of less commonly isolated but clinically relevant anaerobes and facultative anaerobes. Anaerobe. 2018 Dec;54:210-216.
10. Boiten K. The European network for the rapid identification of anaerobes part two: continuing the optimisation of the MALDI-TOF MS database. Muntlig presentasjon på ESCMID Global 2024. Del av: Reinventing MALDI-TOF applications in clinical microbiology (O0949).
11. Bächli P, Baars S, Simmler A, Zbinden R, Schulthess B. Impact of MALDI-TOF MS identification on anaerobic species and genus diversity in routine diagnostics. Anaerobe. 2022;75:102554. doi: 10.1016/j.anaerobe.2022.102554.
12. Hsu YMS, Burnham CAD. MALDI-TOF MS identification of anaerobic bacteria: assessment of pre-analytical variables and specimen preparation techniques. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79:144-8.
13. Veloo ACM, Elgersma PE, Friedrich AW, Nagy E, van Winkelhoff AJ. The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria. Clin Microbiol Infect. 2014;20(12):O1091-7.
14. Yuan Y, Wang J, Zhang J, Ma B, Gao S, Li Y, et al. Evaluation of an optimized method to directly identify bacteria from positive blood cultures using MALDI-TOF mass spectrometry. J Clin Lab Anal. 2020;34(4):e23119.

doi: 10.1002/jcla.23119.

15. Meex C, Neuville F, Descy J, Huynen P, Hayette MP, De Mol P, et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 11):1511-1516.
16. Almuhayawi M, Altun O, Abdulmajeed AD, Ullberg M, Özenci V. The Performance of the Four Anaerobic Blood Culture Bottles BacT/ALERT-FN, -FN Plus, BACTEC-Plus and -Lytic in Detection of Anaerobic Bacteria and Identification by Direct MALDI-TOF MS. *PLoS One.* 2015; 10: e0142398. doi: 10.1371/journal.pone.0142398.
17. Shah HN, Collins MD. Proposal To Restrict the Genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and Closely Related Species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 1989;39(1):85-7.
18. Wallace MJ, Jean S, Wallace MA, Burnham CD, Dantas G. Comparative Genomics of *Bacteroides fragilis* Group Isolates Reveals Species-Dependent Resistance Mechanisms and Validates Clinical Tools for Resistance Prediction. *mBio.* 2022;13(1):e0360321.
19. Liu C, Du MX, Abuduaini R, Yu HY, Li DH, Wang YJ, et al. Enlightening the taxonomy darkness of human gut microbiomes with a cultured biobank. *Microbiome.* 2021;9(1):119.
20. Oren A, Garrity G. Valid publication of new names and new combinations effectively published outside the IJSEM. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2022;72(5).
21. Bavelaar H, Justesen US, Morris TE, Anderson B, Copsey-Mawer S, Stubhaug TT, et al. Development of a EUCAST disk diffusion method for the susceptibility testing of rapidly growing anaerobic bacteria using Fastidious Anaerobe Agar (FAA): a development study using *Bacteroides* species. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(11):1695.e1-.e6.
22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0. Tilgjengelig fra: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
23. Collins MD, East AK. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J Appl Microbiol.* 1998;84(1):5-17.
24. Weigand MR, Pena-Gonzalez A, Shirey TB, Broeker RG, Ishaq MK, Konstantinidis KT, Raphael BH. Implications of Genome-Based Discrimination between *Clostridium botulinum* Group I and *Clostridium sporogenes* Strains for Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(16):5420-9.
25. Stubhaug TT. Et tilfelle av spedbarnsbotulisme sett fra primærlaboratoriet. Muntlig innlegg på Årskonferansen 2016 (Folkehelseinstituttet).
26. Weigand MR, Pena-Gonzalez A, Shirey TB, Broeker RG, Ishaq MK, Konstantinidis KT, et al. Implications of Genome-Based Discrimination between *Clostridium botulinum* Group I and *Clostridium sporogenes* Strains for Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(16):5420-9.
27. Schaumann R, Dallacker-Losensky K, Rosenkranz C, Genzel GH, Stîngu CS, Schellenberger W, et al. Discrimination of Human Pathogen *Clostridium* Species Especially of the Heterogeneous *C. sporogenes* and *C. botulinum* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Curr Microbiol.* 2018;75(11):1506-15.
28. Horowitz BZ. Botulinum toxin. *Crit Care Clin.* 2005;21(4):825-39, viii.
29. Cook PA, Mishler A, Quan D, Parrish-Garcia A. Wound botulism caused by *Clostridium subterminale* after a heroin injection. *Infect Dis Rep.* 2018;10(2):7654.