

Spektrometrische Identifikation bakterieller Keime mittels MALDI TOF¹

Sensitiv, spezifisch und schnell – die MALDI-TOF-Methodik hält Einzug in den diagnostischen Alltag der Mikrobiologen

Darko Radjenovic, Urs Nydegger,
Monica Wydler, Martin Risch, Lorenz Risch

Summary

The MALDI TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry) can be used for species identification according to the manufacturer's recommendations for microflex measurement and MALDI BioTyper software (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany), i.e. by using a mass range of 2000 to 20000 Da and a pattern-matching algorithm. The electronic match between sample analysis and database allows for identifying patterns within minutes and helps the microbiologist in establishing expedite diagnostic information to the treating physician who suspects bacterial invasion.

Zusammenfassung

Die MALDI-TOF-Methodik (s. Abk. im englischsprachigen Summary), und die dank damit mögliche Protein-Ionisation des Proteoms bakterieller Keime, ist im Begriff die mikrobiologische Diagnostik durch ein wichtiges Kapitel zu ergänzen. Der vorliegende Beitrag setzt sich zum Ziel, (1.) die Proteom-Konstitution von Bakterien auf den neuesten Stand aufzudatieren und (2.) die auf die Proteom-Analyse abgestützte MALDI-TOF-Technik als neues Kapitel bei der raschen Identifikation bakterieller Keime darzustellen.

Einleitung

Dank der hohen Empfindlichkeit und Anwendbarkeit auch auf grosse Moleküle hat sich MALDI-MS zur Ausführung chemischer Analysen und in der Biologie einen wichtigen Stellenwert verschafft. Anatomen und Pathologen verwenden die MALDI-Methodik zur

Identifikation von Molekülen und deren Verteilung in Gewebsschnitten. Biomoleküle wie Proteine, Peptide, Lipide und Xenobiotika können kurzfristig analysiert werden und sogar ältere, formolfixierte Gewebsschnitte in Parafin bleiben analysierbar [1]. Zentrales Ereignis bei dieser Methode ist der Laserbeschuss der Analysenprobe, wodurch es zur Freisetzung (Desorption) einzelner Ionen kommt. Physikochemische Eigenheiten dieser Ionen lassen auf ihren Ursprung schliessen, was im Falle bakterieller Proteine diagnostische Rückschlüsse auf den Bakterienstamm erlaubt.

Wird MALDI mit der TOF-Anordnung ergänzt, so können im Massenanalysegerät einzelne Ionen beschleunigt durch einen röhrenförmigen Bezirk fliegen und werden so an dessen Ende auf einem Detektor in Abhängigkeit der Trägersubstanz-Quelle nach Art einer Chromatogramm-ähnlichen Spektrenbibliothek aufgetrennt. Dies ist dank des individuellen Masse/Ladung (m/z)-Verhältnisses der Ionen möglich. Auf diese Art entsteht eine hochspezifische Information über die Substanz, von welcher die Ionen ausgegangen sind.

Mit Laser-Abtastung eines Gewebeschnittes oder einer bakteriellen Probe können deren Daten auf einem Computerchip gespeichert und mit der nunmehr klassisch gewordenen BLAST-MSP(basic local alignment search tool und maximal segment pair)-Software die Übereinstimmungs-Analytik mit bekannten Standards verglichen werden [2]. Der vorliegende Text berichtet über die bisherige Erfahrung mit MALDI-TOF an einem grösseren in der Schweiz und Liechtenstein tätigen medizinischen Analyselabor. Weil sich die MALDI-TOF-Technik auf den Proteingehalt der Bakterien stützt, beginnen wir mit einem Update über die Proteinkonstitution von Bakterien, um dann die Technik und deren Einsatz in der Routineanalytik zu beschreiben.

Protein-Spektrum von Bakterien (Proteom)

Die standardmässig eingeführten Identifikationsmethoden für bakterielle Keime gründen auf deren Wachstum auf Nährböden unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen. Die Bildung von Kolonien bzw. das Wachstum in Kulturflaschen wird je nach Isolat ermöglicht respektive unterdrückt. Ferner stehen verschiedene Substrate und Enzyme zur Verfügung, welche bestimmte Bakterienstämme aufnehmen und verstoffwechseln, andere hingegen nicht, was im Endeffekt eine Identifikation auf biochemischem Niveau erlaubt und letztendlich die Basis der Identifikation im medizinischen Mikrobiologielabor ermöglicht. Serologische sowie molekulare PCR-Methoden sind weitere Möglichkeiten, die die klassische biochemische Identifikation in nützlicher Weise ergänzen, insbesondere wenn klinische Isolate über eine ungenügende Stoffwechselaktivität verfügen oder kulturell nicht angezüchtet werden können.

Das Eiweiss-Inventar einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter exakt definierten Randbedingungen nennen wir Proteom. Trotz ihrer scheinbaren Schlichtheit verfügen Bakterien über hochentwickelte Strukturen, welche für ihre einzigartigen biologischen Funktionen verantwortlich sind. Einige dieser Strukturen finden sich sogar ausschliesslich auf Bakterien und sind weder auf Archaea noch auf Eukaryoten vorhanden. Dank der relativ einfachen experimentellen Manipulierbarkeit kennen wir heute die Zellmembranstruktur der Bakterien recht umfassend. Einige der mit Bakterien erworbenen Kenntnisse wurden auf andere lebendige

¹ Die Abkürzung MALDI-TOF-MS bedeutet: Matrix-Assistierte Laser Desorption Ionisierungszeit der Time-of-Flight Massenspektrometrie. Website: www.bdal.de

Organismen übertragen um dort bestätigt oder als für das Bakterium einzigartig erkannt zu werden.

Die bakterielle Zellmembran, im Zusammenhang mit der MALDI-TOF-Methodik von zentralem Interesse, dient dem Keim zur Aufrechterhaltung seiner strukturellen Integrität. Der Prokaryote schützt sich mittels der Zellwand gegen die Umgebung und hält den intrazellulären Turgor aufrecht. Dieser wird durch diverse osmotisch aktive Moleküle intrazellulär aufgebaut. Die Zellwand unterscheidet sich von den Membranen sämtlicher anderer Zelltypen durch ihren Gehalt an Peptidoglykanen (Poly-N-Acetylglucosamine und N-Acetylmuraminsäure) welche unmittelbar als nächste Schicht die Zytoplasma-Membran umhüllt. Die Zellwand gibt der bakteriellen Zelle eine stabile Form und zwar trotz ihrer Durchlässigkeit auch für kleinere Moleküle.

Man unterscheidet zwei Haupttypen von Bakterienzellwänden, jene die sich in der Gramfärbung positiv verhalten, und die gram-negativen. Dies mag für die MALDI-TOF-Analyse auch von Belang sein, denn erstere hat einen dicken Mantel aus Peptidoglykan (Murein) und Teichonsäuren, welcher für den Rückbehalt des Gentianaviolett-Farbstoffs verantwortlich ist. Die in einem zweiten Schritt applizierte Lugol-Lösung bildet mit dem Farbstoff so grosse Komplexe, dass diese die Zelle anfärben, was beim gram-negativen Keim nicht der Fall ist.

Der zytoplasmatische Anteil der bakteriellen Zellwand, das «Unterhemd», besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht, genau so wie sie auf allen anderen Zellen vorhanden ist. Tatsächlich dienen prokaryotische Zellmembranen überdies dem Durchtritt von Metaboliten und der Bewahrung des Energiestoffwechsels, dort wo auch Protonen-Pumpen ansetzen. Bakterielle Membranen beinhalten keine Sterole, deren Funktion die Stabilisierung, mit wenigen Ausnahmen, durch Hopanoide gewährleistet wird. Der Fettsäuregehalt von Bakterienmembranen ist weit gefächert, sowohl an gesättigten wie ungesättigten Fettsäuren, und Bakterien können ihren Fettsäuren Methyl-, Hydroxy- und zyklische Molekularbeine anhängen. Die äussere Lipidschicht der Membran ist für Moleküle mit elektrischer Ladung nicht permeabel, diese Funktion nehmen die Porine

der äusseren Membran wahr, welche Ionen, Kohlehydrate und Aminosäuren durchlassen. Im Periplasma finden sich diese Moleküle dann wieder und manch ein Proteintyp ist dort verantwortlich für Substratbindungen, Hydrolyse und/oder Aufnahme von Signalen aus der Zellumgebung. Transport- und Signalproteine sind also im Periplasma reichlich vorhanden.

Das Zellinnere von Bakterien ist verglichen mit Eukaryoten sehr einfach konzipiert, ohne Zellorganellen, sondern nur mit Chromosomen, Plasmiden und fakultativ mit Ribosomen. Dieser Raum ist für die auf konstante Proteinmuster eines bestimmten Bakterientypus ausgelegte MALDI-TOF-Technologie deshalb wenig interessant, ganz anders als sie für die PCR-Diagnostik von zentraler Bedeutung ist.

Das bakterielle Proteinmuster

Dank Computer-gesteuerten Rechenmethoden kann die Faltstruktur von Proteinen und deren Interaktion mit Liganden vorausgerechnet werden. Bisher sind ungefähr 800 bakterielle Genome vollständig sequenziert [3, Website: www.genengnews.com] und dank der Bioinformatik können die Wege der intrazellulären metabolischen Vorgänge, welche zur Proteinkonstitution gewisser Bakterien so typisch sind, erfasst werden (Karimpour-Fard 2008; Gall WE: Using Metabolomics in Biomarker Discovery, Website: www.genengnews.com). Mittels NMR gelingt es der Gruppe um James Hoch an der Scripps Clinic, bis zu 2500 verschiedene bakterielle Proteine auf deren mögliche Bindung an ausgewählte Strukturen zu prüfen [4]. Einem Teil von bakteriellen Proteinen beginnt man in neuerer Zeit Funktionen zuzuordnen. Man weiss, dass die Protein-Zusammensetzung der äusseren Bakterienmembran das bakterielle Ansprechen gegenüber gewissen Antibiotika bzw. ihre Resistenz gegenüber diesen mitbestimmt [5]. Membranfusions-Proteine (MFP) haben Transporter-Funktion bei gram-positiven und -negativen Keimen. Peptid-Sequenzstudien ergaben eine deutliche Grösensvarianz (200 bis 650 Aminosäure-Unterschiede), wovon einige die sonst typische Alpha-Helix vermissen liessen [6].

Bereits vor 20 Jahren versuchten wir die Bakterienadhäsion an definierte Oberflächen Fibronectin-bindenden

Proteinen zuzuordnen [7], wobei *Staphylococcus aureus* Cowan I am stärksten an Katheteroberflächen adhären, eine Eigenschaft, welche dem Fibronectin-bindenden Protein A (FnBPA) zugeordnet wird [8]. Auch das Staphylococcal-Oberflächen-Protein G (SasG) bzw. eine seiner Mutanten, welche eine Oktamer-Homooligomerstruktur bildet, begünstigt die Bildung von Biofilmen auf künstlichen Oberflächen, wie auf Endoprothesen oder Dauerkathetern [9].

Andere Membranproteine von Bakterien sind nunmehr als Superantigene identifiziert und bestimmen damit die Virulenz des Keimtypus mit [10]. Insbesondere gram-positiv Keime wie *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* lösen durch massive Freisetzung von T-Zell-Zytokinen in die Blutstrombahn ein Toxisches Schocksyndrom aus und dies wohl wegen ihrer Superantigene, welche hier die Eigenschaft als Proteintoxine annehmen, mit Bindungskapazität an die Histokompatibilitätskomplexe der Klasse II und T-Zellrezeptoren [10]. In diesem Zusammenhang müssen auch die bakteriellen Membranpolysaccharide erwähnt werden, welche vor allem für die pädiatrische Infektiologie von Belang sind [11].

Wie das MALDI-TOF-System funktioniert

Massenspektrometrie ist eine Analysetechnik um mittels eines Spektrometers die Molekularmasse freier Ionen im Vakuummilieu zu messen. Ausgangspunkt im Gerät ist die Ionenquelle bei welcher der Analyt einen Strahl gasförmiger Ionen liefert. Der Massenanalyser trennt die Ionen dann gemäss ihrem m/z-Verhältnis auf und der Detektor erstellt in der Folge ein Massenspektrum.

LDI-MS und MALDI-TOF

Schon in den 1970er Jahren gab es Lasergeräte zur Massenspektrometrie um aus einer kondensierten Gasphase eine Desorption intakter Ionen zu bewirken, wozu eine wirkungsvolle Primärexzitation eingesetzt wurde. Zu diesem Zweck trägt man dünne Schichten mit der Untersuchungsprobe auf eine Metallplatte auf, um die Probe dann mit einem gepulsten Laser zu bestrahlen. Die Anfänge dieser Technologie erlauben es dem Laser, Moleküle zu fragmentieren. Die Unfähigkeit

kleinere Moleküle <1000 Dalton nachzuweisen hat aber den klinischen Einsatz solcher Geräte verhindert. Dieser Entwicklungsstand wurde entscheidend verbessert, als M. Karas und

F. Hillenkamp (Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Deutschland) die Entdeckung machten, dass die Einbettung der Analysenprobe in eine aus kleinen organischen Molekülen beste-

hende Matrix zu einer besseren Absorption des Laser-Lichts führt. So werden höhere Intensitäten der Ionen-Desorption vom Analyten möglich und die Fragmentation wird reduziert. Das nunmehr MALDI-MS, **Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation**, genannte Vorgehen erlaubt es, grössere Moleküle, wie Membranproteine und kleinere, wie Peptide von Bakterien zu analysieren und aufgrund ihres Proteom-Musters einem bestimmten Bakterienstamm zuzuordnen.

Einsatz von MALDI-TOF im mikrobiologischen Routinelabor

MALDI-TOF nimmt im Dispositiv der mikrobiologischen Diagnostik einen gut definierbaren Platz ein. Ab einem Volumen von durchschnittlich 50 Identifikationen/Arbeitstag ist die Wirtschaftlichkeit sicher gegeben. Im zeitlichen Ablauf (Abbildung 1) wird ersichtlich, dass sogleich nach der Beobachtung eines Kulturwachstums die MALDI-TOF-Analytik zum Einsatz kommt, indem der Untersucher einen Teil der Kultur auf der Metallplatte abstreicht (Abbildung 2). Nun wird die Metallplatte in das Gerät geschoben und die Analyse beginnt. Innerhalb von fünf Minuten erscheint das Diagnoseblatt (Abbildung 3) auf dem Monitor. Die rasche Verfügbarkeit verkürzt die mikrobiologische Resultierung spürbar. Insbesondere können Blutkulturen oftmals bereits innerhalb von 24 h dem Kliniker als Endbefund berichtet werden und somit teilweise unwirksame empirische Therapien unverzüglich durch eine gezielte resistenzgerechte Therapie angepasst werden. Als Beispiel sei an dieser Stelle eine systemische *Enterobacter cloacae*-Infektion, die empirisch mit Amoxicillin/Calvulan-säure behandelt wurde, erwähnt. Eine solche Adaptation der Antibiotikatherapie wäre ohne MALDI-TOF wohl mit einem Zeitverzug von ~24 Stunden schliesslich auch erfolgt; Geschwindigkeit ist auch in der Bakteriologie von zentraler Bedeutung. Eine Antibiotika-Resistenzbestimmung lässt sich allerdings auch mit MALDI-TOF nicht durchführen.

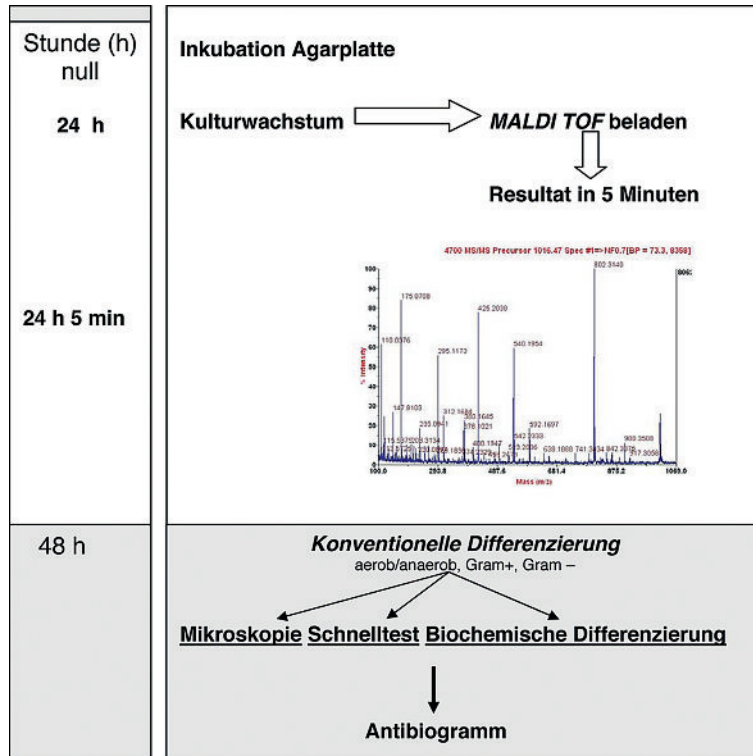


Abbildung 1. Algorithmus. Der zeitliche Verlauf nach Eingang des Untersuchungsauftrags ist schematisch dargestellt. Beachte: sogleich nach Wachstum auf Agar oder in Kulturflasche kann eine Fraktion der Kultur auf die Metallplatte des MALDI-TOF-Gerätes übertragen werden. Linke Spalte: von oben nach unten: Zeitverlauf

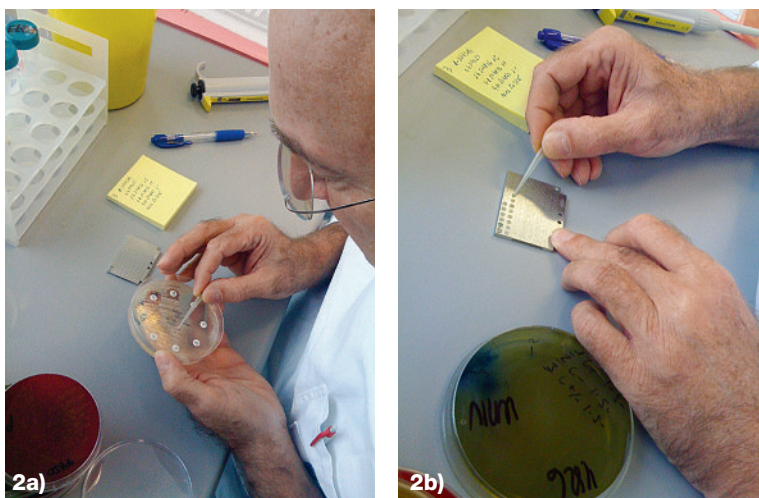


Abbildung 2. Probenbeschickung. Die Übertragung einer Proben-Fraktion ist photographisch dargestellt. a) Konventionelle Agarplatte in der Hand des Untersuchers mit Probenaufnahme. b) Auf dem Tisch liegt die Metallplatte des Gerätes auf welche die Probe übertragen wird. Man beachte die Möglichkeit, in einem einzigen Durchlauf mehrere Proben gleichzeitig zu analysieren.

Fallbericht einer Pneumokokkengonarthritis

Bei einem 83-jährigen Patienten besteht eine Gonarthrose beidseits, welche sich zu einer eitrigen Gonarthritis entwickelt. In einem Gelenkpunktat

findet man am Tag 1 Pneumokokken mit MALDI-TOF, wobei von einem auswärtigen Referenzlabor lediglich die Interpretation vergrünender Streptokokken vorliegt. Augmentin und Rocephin werden unverzüglich verschrieben und zwei Wochen später geht es dem Patienten nach intensiver Lokal-Therapie mittels arthroskopischer Spülung und Synovektomie besser. Das Kontrollpunktat ergibt kein Pneumokokken-Wachstum mehr, wobei die PCR auf Pneumokokken immer noch reaktiv ist. Dieser Befund wird nicht als Therapieversagen interpretiert, da die bakterielle Erbsubstanz trotz erfolgreicher Therapie relativ lange nachweisbar bleiben kann. In diesem Zusammenhang bleibt aber bemerkenswert, dass die PCR-Diagnostik den Erstbefund von Pneumokokken bestätigen konnte.

Kommentar

Seit der Einführung des MALDI-TOF-Gerätes vor vier Monaten hat das labormedizinische Zentrum Dr. Risch mehrere tausend Untersuchungen durchgeführt, davon ~500 mittels MALDI-TOF, und kann über gute Bedienbarkeit berichten. Ein Methodenvergleich zeigte bei 95% der Analysen eine Übereinstimmung mit konventionellen Methoden nachdem mehrere Isolate durch konventionelle Methodik (Vitek, Api) identifiziert wurden. Inwiefern Probleme/Nachteile durch einen allzu umfassenden Einsatz des MALDI-TOF entstehen, wird sich erst noch weisen müssen. Ein Studie zur statistisch analysierten Übereinstimmungsrate MALDI-TOF/konventionelle Diagnostik läuft. Die MALDI-TOF-Technologie ist eine sehr präzise Diagnostik, die stark von der Qualität der

Datenbank (black box) abhängig ist. Oftmals wird der Kliniker mit einer genaueren Isolatschreibung unterstützt als er das von der konventionellen biochemischen Identifikation gewohnt ist. Diesem Umstand ist insbesondere in der täglichen Zusammenarbeit mit dem behandelnden Arzt Rechnung zu tragen, siehe Fallbeschreibung.

Verdankung

Die Autoren bedanken sich bei Prof. M. Opravil, Zentrum für Innere Medizin, Hirslanden Klinik Aarau um die Überlassung der Angaben zum Fallbericht

Conflict of Interest

Die Autoren erklären keine persönlichen Verbindungen zur Firma Bruker.

Korrespondenz

Prof. Dr. med. Urs Nydegger
Transfusion Therapy Consultancy
Postfach 784
CH-3000 Bern 9


Analyte1				
				
Analyte Name:	F1			
Analyte Description:				
Analyte ID:	9032055			
Analyte Creation Date/Time:	2009-01-15 09:07:26.984			
Applied MSP Library(ies):				
Applied Taxonomy Tree:	Bruker Taxonomy			
Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier	
1 (++)	Streptococcus pneumoniae besSt29_THL	2.203	1313	
2 (++)	Streptococcus pneumoniae ATCC 49619_THL	2.148	1313	
3 (+)	Streptococcus sp DSM 20393_DSM	1.981	1301	
4 (+)	Streptococcus pseudopneumoniae DSM 18670_DSM	1.7	257758	
5 (-)	Streptococcus oralis DSM 20379_DSM	1.587	1303	
6 (-)	Streptococcus oralis DSM 20395_DSM	1.568	1303	
7 (-)	Streptococcus cristatus DSM 8249_DSM	1.556	45634	
8 (-)	Streptococcus pneumoniae DSM 20566_DSM	1.522	1313	
9 (-)	Streptococcus gordonii DSM 6777_DSM	1.488	1302	
10 (-)	Streptococcus constellatus ssp constellatus DSM 20575_DSM	1.421	184246	

Abbildung 3. Diagnoseblatt. Das Gerät hat soeben das Ionogramm der Analyse mit den Ionogrammen dem Gerät vertrauter Keime verglichen und listet die übereinstimmenden Reaktionsmuster mit abnehmender Wahrscheinlichkeit auf (Score Value); in der linken Spalte die Rangliste der Wahrscheinlichkeiten mit 1 der grössten Wahrscheinlichkeit.

Referenzen

- Seely EH, Caprioli RM. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(4):18126–31.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403–10.
- Karimpour-Fard A, Leach SM, Gill RT, Hunter LE. Predicting protein linkages in bacteria: which method is best depends on task. *Bioinformatics*. 2008;24(9):397.
- Weight M, White RA, Szurmant H, Hoch JA, Hwa T. Identification of direct residue contacts in protein-protein interaction by message passing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(1):67–72.
- Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794(5):808–16.
- Zgurskaya HI, Yamada Y, Tikhonova EB, Ge Q, Krishnamoorthy G. Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794(5):723–4.
- Vaudaux P, Pittet D, Haeblerli A, Huggler E, Nydegger UE, Lew DP, Waldvogel FA. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J Infect Dis*. 1989;160(5):865–75.
- Schröder A, Schroder B, Roppenser B, Linder S, Sinha B, Fässler R, Aepfelbacher M. Staphylococcus aureus fibronectin binding protein-A induces motile attachment sites and complex actin remodeling in living endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 2006;17(12):5198–210.
- Kuroda M, Ito R, Tanaka Y, Ayo M, Matoba K, Saito S, Tanaka I, Ohta T. Staphylococcus aureus surface protein SasG contributes to intercellular autoaggregation of Staphylococcus aureus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(4):1102–6.
- Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev*. 2008;225:226–43.
- Klein Klouwenberg P, Bont L. Neonatal and infantile immune responses to encapsulate bacteria and conjugate vaccines. *Clin Dev Immunol*. 2008;2008:628963.

Empfohlene Lektüre zum Thema für die Leserin oder den Leser der «pipette»: Vogeser M, Kobold U, Seidel D. Massenspektrometrie in der Medizin – Stellenwert der molekularen Analytik. *Deutsches Ärzteblatt*. 2007;104(31–32):2194–200.