



Christian Gehringer^{1,2,3} und Adrian Egli^{1,2}

Weiterentwicklung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie in der Klinischen Mikrobiologie

Die rasche Identifikation von Bakterien und Pilzen führt zu einem deutlich verbesserten Patientenmanagement, da antibiotische und antifungale Therapien schneller angepasst werden können [1]. Die Erstellung von charakteristischen Massenspektren zur Keimidentifikation mittels der Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization – Time-of-Flight-Massenspektrometrie (kurz MALDI-TOF-MS) hat die klinische Mikrobiologie revolutioniert und viele Prozesse beschleunigt. Gegenüber der biochemischen oder molekular-diagnostischen Identifikation ist diese deutlich schneller, zuverlässiger und günstiger [2]. Als Methode im mikrobiologischen Labor hat sie sich als Standard innert weniger Jahre durchgesetzt und ist nicht mehr wegzudenken [3]. Die MALDI-TOF-MS Technologie zur Identifikation ist in vielen Laboratorien sogar ein kritisches Element geworden, und Defekte am Massenspektrometer können deshalb zu kritischen Verzögerungen im klinischen Alltag führen. **Abbildung 1** zeigt den typischen Arbeitsablauf der MALDI-TOF-MS Identifikationsmethodik.

Für die zuverlässige Identifikation von Isolaten werden die erhaltenen Massenspektren innerhalb von Sekunden mit Datenbanken verglichen, welche tausende von Spezies-spezifischen Spektren enthalten. Wichtige Herausforderungen sind im Moment vor allem im Bereich dieser Datenbanken und der Bioinformatik zu erkennen: Bei bestimmten Komplexen, z.B. dem *Enterobacter cloacae*-Komplex, kann eine Spezies-Identifikation nicht zuverlässig durchgeführt werden, vermutlich da zu wenige Spektren der einzelnen Keime abgebildet sind [4]. Methodische Herausforderungen an die Probenaufbereitung stellen sich z. B.

bei *Mykobakterium* spp. in Bezug auf die Biosicherheit [5] oder z.B. bei *Candida* spp. aufgrund der robusten Wand-eigenschaften [6]. Schliesslich führt die Abhängigkeit einer kulturellen Anreicherung zu den grössten Verzögerungen im diagnostischen Prozess mit MALDI-TOF-MS. In den letzten Jahren wurde jedoch eine Vielzahl an Materialien und Methoden entwickelt, um diese Schwächen zu überwinden. So sind z.B. nicht-kommerzielle Datenbanken und Softwaretools zur Analyse verfügbar [7]. Ebenfalls wurden technische Protokolle zur Probenvorbereitung publiziert: Die Identifikation direkt aus positiven Blutkulturen wird in vielen Laboratorien bereits in der Routine durchgeführt. Ebenfalls ist eine Identifikation direkt aus dem Urin [8] oder Liquor [9] möglich. Die Proteinprofile – zum grössten Teil ribosomale Proteine – werden vorwiegend für die Identifikation verwendet, aber in diesen Profilen liegen weitere funktionelle Informationen verborgen, welche sich uns langsam erschliessen.

Identifikation direkt aus positiven Blutkulturen

Die direkte Identifikation von Bakterien aus positiven Blutkulturen ist zirka 24 h schneller als traditionelle kulturbasierte Methoden [10] mit anschliessendem MALDI-TOF-MS zur Identifikation. Falls eine biochemische Identifikation verwendet wird, vergehen von der Probenabnahme bis zur Keimidentifikation rund 72 h. Eine Reihe von Methoden steht zur Verfügung um aus der positiven Blutkultur – und den darin enthaltenen angereicherten Bakterien – eine genügende Menge für die zuverlässige Identifikation zu sammeln [2]. Die Identifikationsrate ist meist für Gram-positive Erreger etwas tiefer, was möglicherweise an den Eigenschaften der Zellwand liegt. Durch die zunehmende Standardisierung gelingt eine Identifikation heute jedoch in >90% der Proben [11]. Erste Studien konnten zahlreiche Vor-

teile der MALDI-TOF-MS basierten Identifikation von positiven Blutkulturen im Gegensatz zur konventionellen Identifikation aufzeigen [2, 12, 13].

Identifikation direkt aus dem Urin

Ähnlich wie bei Blutkulturen stehen für Urinproben unterschiedliche Protokolle zur Aufarbeitung und anschliessenden Identifikation mittels MALDI-TOF-MS zur Verfügung [14]. Eine Keimzahl von 10^5 /ml Urin ist für eine Identifikation in zirka 90 % der Fälle genügend [8]. Eine Kombination mit der Durchflusszytometrie scheint sinnvoll, um die Chancen einer Keimbestimmung zu erhöhen [8]. Besondere Herausforderungen bei Urinproben sind Defensine, welche die Identifikation stören können [15], und Mischinfektionen, welche neuartige bioinformatische Algorithmen benötigen.

Resistenzbestimmung

Bei der Resistenzbestimmung mittels MALDI-TOF-MS können vier grundlegende Methoden unterschieden werden: (i) Identifikation von resistenten Klönnen basierend auf typischen Massenspektren z.B. für Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* [16,17]; (ii) Spaltung von Betalaktamringen mit bakteriellen Enzymen und Messung des Spaltprodukts im Massenspektrometer [18]; (iii) Hemmung des Wachstums von Bakterien und entsprechende Reduktion des Spektrums [19]; und (iv) direkter Nachweis eines Resistenzmechanismus, z.B. Porenverlust oder Betalaktamasen im interplasmatischen Raum [20,21]. In Konkurrenz mit isothermalen Systemen, welche eine zunehmende Breite an Genen nachweisen können [22], wird sich die MALDI-TOF-MS Methodik durch relativ zeitaufwendige bzw. manuell intensive Protokolle zunächst wahrscheinlich nicht durchsetzen können. Vielversprechend scheint jedoch die Weiterentwicklung der direkten Detektion von mit Antibiotikaresistenzen assoziierten Proteinen aus Isolaten.

1 Klinische Mikrobiologie, Universitätsspital Basel, Basel

2 Applied Microbiology Research, Universität Basel, Basel

3 Innere Medizin, Universitätsspital Basel, Basel

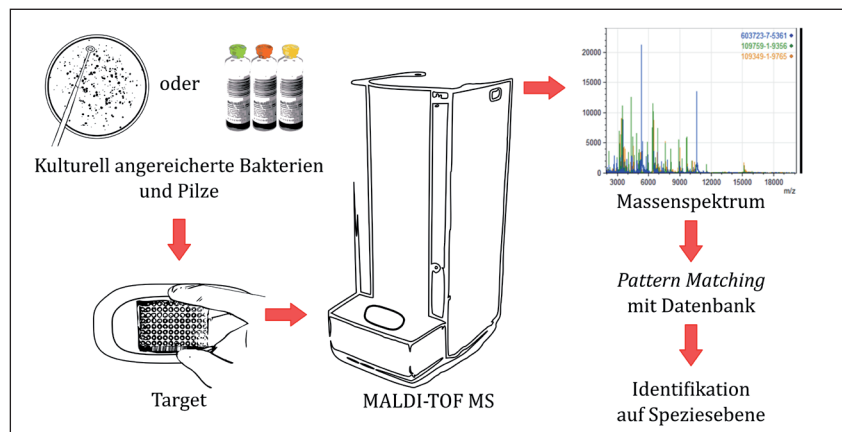


Abbildung 1: Arbeitsablauf der Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization – Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) Identifikation. Kulturell angereicherte Bakterien oder Pilze werden auf ein Target aufgebracht, zusammen mit einer Matrix-Lösung fixiert, und anschliessend wird die Fluggeschwindigkeit der ionisierten Proteinbestandteile gemessen. Die Flugzeit korreliert mit der Masse, und diese wird mit den Einträgen in einer Datenbank abgeglichen. Die Identifikation erfolgt innert Kürze.

Typisierung

Die Ähnlichkeitsanalyse mittels klassischer Methoden wie Puls-Feld-Gelelektrophorese und auch neuer Methoden wie des «whole genome sequencing» sind zeitaufwendig und teuer. Ein Vergleich der Massenspektren bei Isolaten gleicher Spezies erlaubt eine rasche Zuordnung von möglichen klonalen und nicht-klonalen Isolaten. Insbesondere bei unterschiedlichen Spektren kann eine Zugehörigkeit unter gleichen Kulturbedingungen praktisch ausgeschlossen werden [23, 24]. Neue Methoden sind auch hier in Entwicklung, z.B. der Phyloproteomics-Ansatz [25].

Zusammenfassend zeigt sich eine grosse Vielzahl an möglichen Anwendungen und Erweiterungen der MALDI-TOF-MS-Technologie, welche über die klassische Identifikation hinaus reicht. Die Harmonisierung der verschiedenen Protokolle wird in Zukunft wichtig sein, um den Qualitätsansprüchen gerecht zu werden. Die Detektion direkt aus Patientenmaterial wird entweder via Anreicherungsprotokolle oder sensitivere Geräte technisch bald zuverlässig möglich sein. Ebenfalls scheint die direkte Identifikation von Resistenzen mit neuen bioinformatischen Algorithmen greifbar.

Korrespondenz: PD Dr. med. Dr. phil. Adrian Egli
Adrian.Egli@usb.ch

Poursuite du développement de la spectrométrie de masse MALDI-TOF en microbiologie clinique

En cas de maladie infectieuse, l'identification rapide des bactéries et champignons permet une adaptation précoce de l'antibiothérapie. Les méthodes d'identification biochimiques sont coûteuses, chronophages et retardent ainsi l'identification.

Les méthodes d'identification relevant du diagnostic moléculaire sont certes plus rapides, mais elles possèdent un spectre diagnostique relativement limité. Il y a quelques années, l'identification au moyen de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization – Time-of-Flight*) a comblé ces importantes lacunes en matière de diagnostic microbiologique. Depuis lors, l'identification au moyen de la spectrométrie de masse MALDI-TOF est devenue la méthode standard en microbiologie moderne. De manière générale, cette technologie se trouve toutefois encore au début de son développement, et son potentiel est loin d'être épuisé: la mise en évidence de germes à partir d'hémocultures positives ou directement à partir d'échantillons urinaires, la détermination des résistances et le typage en cas de flambées sont d'autres applications en développement permanent. Cet article de revue a pour objectif de résumer et discuter les principales tendances en matière de spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Referenzen

Online unter: www.sulm.ch/d/pipette → Aktuelle Ausgabe (Nr. 5-2016).

Gilbert Greub et Katia Jaton¹

Diagnostic moléculaire: avantages des tests «home-made»

Le développement «home-made» des tests de diagnostic moléculaire permet d'accroître considérablement la flexibilité de ce type de diagnostic et ainsi de s'adapter rapidement aux nouvelles connaissances, aux pathogènes émergents, aux nouvelles souches (tel que le mutant suédois) et à d'éventuelles épidémies.

Les applications des tests de diagnostic moléculaire, pour la détection des bactéries à croissance fastidieuse, des bactéries intracellulaires, des virus, des levures, des champignons filamenteux et de divers parasites, ont

augmenté de manière drastique ces dernières années. Ces tests moléculaires, particulièrement la PCR, sont également utiles pour (i) la détection de toxines ou d'autres facteurs de virulence, ainsi que pour la détection rapide de gènes codant (ii) pour la résistance aux antibiotiques et/ou de mutations conférant une résistance aux

antimicrobiens (iii), pour le diagnostic lors de cultures négatives en raison d'antibiothérapies préalables par exemple et enfin (iv) pour le typage. Actuellement, malgré le développement de nombreux tests moléculaires commerciaux, et selon une étude effectuée par le groupe européen du diagnostic moléculaire (ESGM),

¹ Prof. Gilbert Greub et Dr Katia Jaton, Institut de microbiologie, Centre Hospitalier Vaudois (CHUV), Lausanne