

Molekulare Speziesdifferenzierung

MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik

SÖREN SCHUBERT, ANDREAS WIESER

MAX VON PETTENKOFER-INSTITUT FÜR HYGIENE UND MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE, LMU MÜNCHEN

In der jüngsten Vergangenheit hat ein vollkommen neuartiger Ansatz zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen die molekulare Diagnostik erweitert: die Identifikation von Keimen mittels MALDI-TOF-MS, die auf der Analyse ribosomaler Proteine beruht.

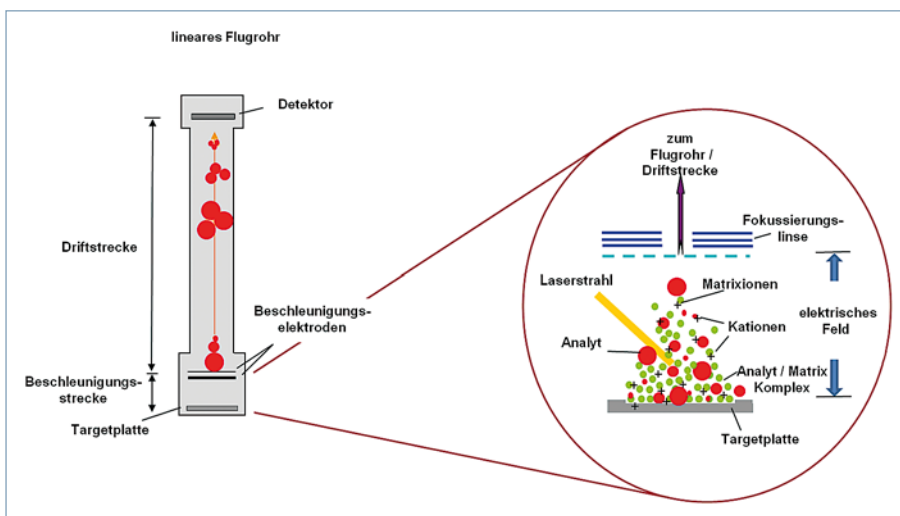
Very recently a novel method for differentiation of bacteria and fungi has entered the scene, the identification by means of MALDI-TOF. This differentiation relies on the exact measurement of species-specific protein spectra from ribosomal proteins.

Zwischen klassischen Kulturverfahren und Molekularbiologie

■ Ziel der mikrobiologischen Diagnostik ist es, in Patientenproben die für eine Erkrankung verantwortlichen Erreger (Bakterien, Pilze, Parasiten) zu identifizieren und – im Falle von Bakterien und Sprosspilzen – eine Resistenztestung für antimikrobielle Substanzen (Antibiogramm) zu bestimmen. Die klassische mikrobiologische Diagnostik

beruht dabei auf der Mikroskopie von Präparaten und der Kultivierung auf Nährmedien. Zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen werden vor allem biochemische Testverfahren eingesetzt. Wesentliche Nachteile dieses biochemischen Differenzierungsprinzips sind dabei die langen Inkubationszeiten für die biochemischen Reaktionen (sechs bis 12 Stunden) und die Variabilität einzelner Stoffwechseleigenschaften.

Die Fortschritte in der Molekulargenetik haben die mikrobiologische Diagnostik in den vergangenen 20 Jahren erheblich verbessert. Von besonderer Bedeutung sind schnelle Direktnachweise spezifischer Erreger-Nukleinsäuren aus Patientenproben, z. B. durch PCR-basierte Methoden, und die zuverlässige molekulargenetische Differenzierung kultivierter Bakterien und Pilze, vorwiegend durch Sequenzbestimmung ribosomaler DNA-Gene (16S-rDNA bei Bakterien, 18S- und 28S-rDNA bei Pilzen). Der Sequenzabgleich mit ständig wachsenden DNA-Datenbanken ermöglicht eine Zuordnung der Isolate zu den entsprechenden Gattungen und Spezies. Leider sind diese Nukleinsäure-basierenden Methoden oft kosten- und arbeitsintensiv, und der direkte DNA-Nachweis aus klinischen Proben ist anfällig für Verunreinigungen und teilweise schwer standardisierbar. Daher wird die PCR-basierte Diagnostik bislang bei nur ca. fünf Prozent der Proben angewendet. In den vergangenen zwei bis drei Jahren hat ein vollkommen neuartiger Ansatz zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen Praxis-tauglichkeit erlangt: die Identifikation von Keimen mittels MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, Matrix-unterstützte Laser-desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie; **Abb. 1**). Dieses massenspektrometrische Verfahren hat das Potenzial, die klassischen Differenzierungsverfahren in der mikrobiologischen Diagnostik abzulösen [1], da es wesentliche Vorteile, wie z. B. sehr kurze Analysenzeiten, einfache Bedienung und Automatisierbarkeit, sowie hohe Empfindlichkeit und Präzision bietet [2]. Die massenspektrometrische Technik MALDI-TOF-MS wird schon lange mit Erfolg in der Proteomforschung zur Bestimmung der Masse von Proteinen eingesetzt. Diese Möglichkeit kann auch im Routinelabor genutzt werden, um Mikroorganismen zu differenzieren. Dazu wird eine kleine Menge einer Kolonie (ca. 10^4 bis 10^6 Bakterien sind ausreichend) auf eine ca. sechs Millimeter durchmessende Analysenposition der MALDI-Probenplatte (Targetplatte) aufgebracht. Auf diese Probe wird

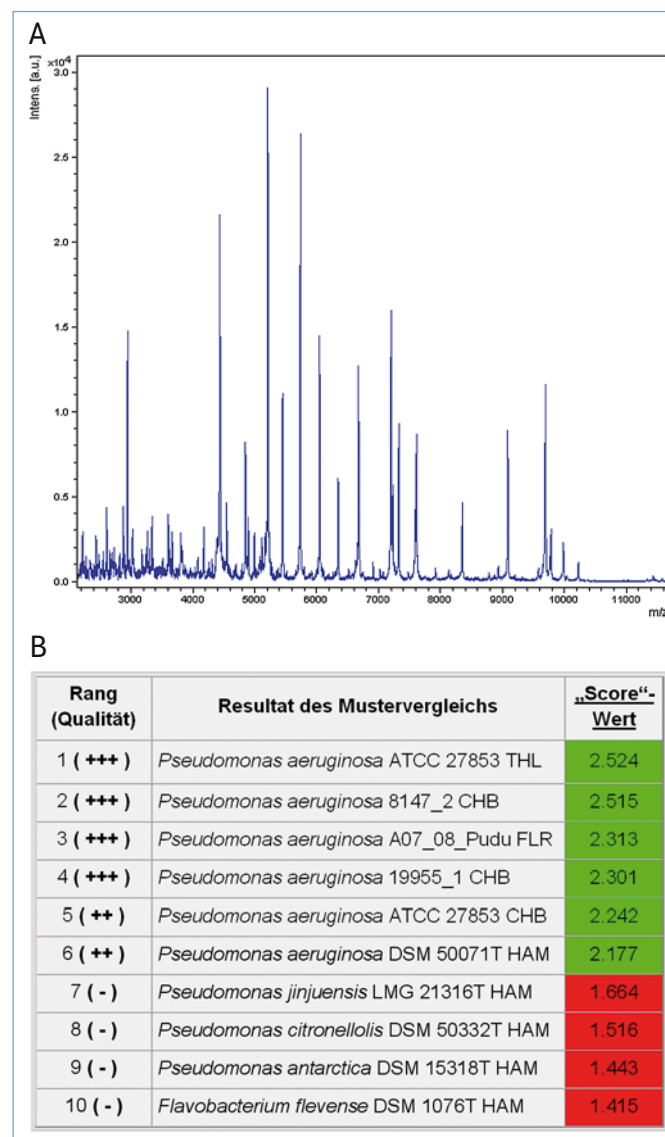


▲ **Abb. 1:** Prinzip der MALDI-TOF-MS-basierten Identifikation von Proteinen und Peptiden. Die ribosomalen Proteine der Bakterien- oder Pilzkultur werden mit der Matrix nach Beschuss mit dem Laser desorbiert, ionisiert und im elektrischen Feld beschleunigt. Dabei trennen sie sich im Flugrohr entsprechend ihrer Ladung und Masse auf, und speziespezifische Massenspektren werden erzeugt. Weitere Erläuterungen im Text.

sodann ca. ein Mikroliter einer Matrix-Lösung – meist ein Benzoesäurederivat wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) – pipettiert. Diese ko-kristallisiert mit der Erregerprobe auf der Targetplatte. Je nach Hersteller befinden sich darauf zwischen 96 und 160 Probenfelder, die pro Messung analysiert werden können. Die Targetplatte wird in das MALDI-TOF-MS-Gerät eingeführt, wo im Hochvakuum durch einen fokussierten Laserstrahl die Matrix mit den Bestandteilen der eingebetteten Mikroorganismen explosionsartig verdampft wird. Dabei kommt es zu einer Ionisierung der zu untersuchenden Analytmoleküle (Proteine) der Erreger. Die Ionen werden in einem starken elektrischen Feld beschleunigt, das von einer Hochspannungsquelle mit zehn bis 30 Kilovolt aufgebaut wird. Die Flugzeit der Analyten kann im Vakuum exakt gemessen werden, wobei sowohl die Masse als auch der Ionisierungsgrad der Proteine Einfluss nehmen. Dadurch lassen sich die unterschiedlichen Massen der einzelnen Analyten bestimmen und als Gesamtspektrum darstellen (**Abb. 2A**). Der größte Teil der im Messbereich befindlichen Analyten sind positiv geladene ribosomale Proteine. Ihre jeweiligen Spektren sind für einzelne Bakterien- oder Pilzspezies charakteristisch und stellen als „molekularer Fingerabdruck“ die Grundlage der MALDI-TOF-MS-Differenzierung dar [3–5]. Besondere Beachtung findet der Messbereich von zwei bis 12 Kilodalton, der sehr stabile und aussagekräftige Spektren aufweist. Die ermittelten Spektren werden mit einer im System integrierten Referenzdatenbank von Spektren einer großen Zahl an humanmedizinisch relevanten Bakterien und Pilzen verglichen (**Abb. 2B**). Der Software-basierte Abgleich kann dank neuer Algorithmen automatisiert ohne Zeitverlust erfolgen [6, 7]. So ist der Zeitaufwand vom Auftragen einer Probe auf die Targetplatte bis zum Vorliegen eines Differenzierungsergebnisses mit unter fünf Minuten sehr gering. Die automatisierte Auswertung der Daten erzeugt einen Zahlenwert (*score*), der Aufschluss über die Validität des Differenzierungsergebnisses gibt. Es können nur das beste Ergebnis (*best match*) oder auch weitere Ergebnisse dargestellt werden, um die Plausibilitätskontrolle zu unterstützen (**Abb. 2B**).

Vorteile und Nachteile der MALDI-TOF-MS-Diagnostik

Die MALDI-TOF-MS-Diagnostik beruht auf der Analyse des Proteinprofils mehrheitlich von ribosomalen Proteinen. Da deren Sequenz mit



◀ **Abb. 2:** Messung, Datenbankvergleich und Ergebnis der Datenbankanalyse eines *Pseudomonas aeruginosa*-Isolats. **A**, Massenspektrum einer *Pseudomonas aeruginosa*-Probe. Das Muster charakteristischer Massenspitzen (Peaks) des Spektrums wird mit entsprechenden Datenbankeinträgen verglichen. **B**, Die Ergebnisse des Datenbank-Vergleichs sind mit einem Zahlenwert für die Validität der Differenzierung (*score* > 2, korrekte Speziesdifferenzierung) versehen.

der für sie codierenden DNA korreliert, ähnelt sie eher einem 16S-rDNA-Sequenzvergleich. So wird verständlich, dass das MALDI-TOF-MS-System nicht in der Lage ist, sehr eng verwandte Mikroorganismen zu unterscheiden (z. B. *Shigella* sp. von *E. coli*). Andererseits ist die Massenspektrometrie nicht so anfällig gegen Verlust oder Zugewinn von Stoffwechseleigenschaften der Erreger, einer Einschränkung der herkömmlichen biochemischen Speziesdifferenzierung. Dies bedeutet, dass bei dem Vergleich von klassischer mit molekularer oder MALDI-TOF-basierter Differenzierung immer auch ein kleiner Teil nicht konkordanter Ergebnisse auftreten wird. In der täglichen Routinediagnostik hat die MALDI-TOF-MS-basierte Erregerdifferenzierung den Vorteil, dass eine einzige Maschine zur Differenzierung von Bakterien und Sprosspilzen genutzt werden kann [8–10]. Eine Vortestung kann somit entfallen, und

Ergebnisse können schon am ersten Tag der Materialablesung (12 bis 24 Stunden nach Probeneingang) dem Kliniker als Vorbefunde mitgeteilt werden. Ein weiterer großer Vorteil der MALDI-TOF-MS-Methode liegt darin, dass neue Protein-Referenzspektren jederzeit in die Datenbank eingelesen werden können. Dies kann entweder durch den Hersteller, den Nutzer selbst oder über eine öffentliche Plattform erfolgen. Für den klinischen Einsatz ist eine strenge Kontrolle dringend erforderlich, die sicherstellt, dass nur valide Datenbankeinträge erfolgen. Eine Limitierung der Methode ist, dass die Differenzierung direkt aus Patientenproben weitgehend unmöglich ist. Die Überlagerung von Spektren ribosomaler Proteine beim Vorhandensein mehrerer Bakterienarten sowie Spektren, die durch körpereigene Proteine entstehen, sind derzeit die Haupthindernisse für den Direktnachweis mittels MALDI-TOF-MS. Seit Kurzem sind

jedoch Protokolle zum Direktnachweis und zur Differenzierung von Erregern aus Urinproben oder aus positiven Blutkulturen verfügbar [11]. Bei beiden Materialien ist die Beeinträchtigung durch Fremdproteine entweder primär gering (Urin) oder durch Zellyse und Waschung relativ einfach zu reduzieren (Blutkultur). Die Analyse mittels MALDI-TOF-MS bietet bislang keine Möglichkeiten einer Identifizierung von Resistenzen gegen Antiinfektiva. Jedoch kann das MALDI-TOF-MS-System mit automatisierten Resistenzbestimmungsmethoden über eine Labor-EDV kombiniert werden und ermöglicht so eine speziesadaptierte Bewertung der ermittelten MHK-Werte.

Zukünftige Entwicklungen

Nach der rasanten Entwicklung der letzten Jahre hat die MALDI-TOF-MS-basierte Diagnostik große Bewegung in die molekulare mikrobiologische Diagnostik gebracht. Die meisten Entwicklungen konzentrieren sich heute auf eine Verbesserung der Datenanalyse. So wird versucht, die Technologie zur Bestimmung ausgewählter Antibiotika-Resistenzen einzusetzen (PBP2a bei MRSA oder β -Laktamasen bei *Enterobacteriaceae*) [12]. Andere Entwicklungsarbeiten sind auf den Direktnachweis der Erreger aus Patientenproben ausgerichtet oder auf die Beantwortung epidemiologischer Fragestellungen.

Danksagung

Unsere Arbeiten werden durch die Bayerische Forschungsstiftung unterstützt (Forschungsverbund FORPROTECT – Infektionsprotektion durch neue Diagnostikverfahren und Therapieansätze).

Literatur

- [1] Schubert S, Weig M (2009) MALDI-TOF-MS-basierte Verfahren zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun R, Kimmig P (Hrsg.) Mikrobiologische Diagnostik, 2. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart, 166–170
- [2] Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V et al. (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 14:1584–1586
- [3] Amiri-Eliasi B, Fenselau C (2001) Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Anal Chem* 73:5228–5231
- [4] Barbudde SB, Maier T, Schwarz G et al. (2008) Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74:5402–5407
- [5] Erhard M, Hipler UC, Burmester A et al. (2008) Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Exp Dermatol* 17:356–361
- [6] Jarman KH, Cebula ST, Saenz AJ et al. (2000) An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 72:1217–1223
- [7] Sauer S, Freiwald A, Maier T et al. (2008) Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE* 3:e2843
- [8] Marklein G, Josten M, Klanke U et al. (2009) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 47:2912–2917

- [9] Seng P, Drancourt M, Gouriet F et al. (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49:543–551
- [10] van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ (2010) High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 48:900–907
- [11] Christner M, Rohde H, Wolters M et al. (2010) Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol* 48:1584–1591
- [12] Jackson KA, Edwards-Jones V, Sutton CW et al. (2005) Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods* 62:273–284

Korrespondenzadresse:

PD Dr. Sören Schubert
Max von Pettenkofer-Institut
Ludwig-Maximilians-Universität München
Marchioninistraße 17
D-81377 München
Tel.: 089-2180-78202
Fax: 089-2180-78294
schubert@med.uni-muenchen.de

AUTOREN



Sören Schubert

Jahrgang 1966. 1985–1992 Medizinstudium an der Universität Hamburg. 1993–1995 Dissertation an der Universität Würzburg. Seit 1998 Arbeitsgruppenleiter am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der LMU München. 2006 Habilitation. Seit 2006 leitender Oberarzt der Diagnostik am Max von Pettenkofer-Institut.



Andreas Wieser

Jahrgang 1983. 2002–2009 Medizinstudium an der LMU München. 2005–2009 Dissertation am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der LMU München. Seit 2010 Postdoc in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Schubert am Max von Pettenkofer-Institut.