

# Maldi-ToF, Einsatz in der Routinediagnostik der Zukunft?

D. Geier-Dömling<sup>1</sup>, S. Hom<sup>1</sup>, M. Erhard<sup>2</sup>, J. Kemmner<sup>3</sup>, E. Müller<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboklin, Bad Kissingen, Deutschland

<sup>2</sup> Anagnostec, Potsdam, Deutschland

<sup>3</sup> Shimadzu, Neufahrn, Deutschland

\*Kontakt: geier@laboklin.de

## Einleitung

Mit der **Matrix-Assistent-Laser-Desorption-Ionisation-Time of Flight (MALDI-ToF)** wurde in den letzten 3 Jahren eine Methode entwickelt, um Bakterien, Hefen und Pilze mittels Massenspektrometrie zuverlässig, schnell und kostengünstig zu identifizieren.

## Zielsetzung

Die vorliegenden Untersuchungen sollten klären, ob und welche veterinärmedizinisch relevanten Keime mit Hilfe der MALDI-ToF Technik heute zuverlässig diagnostiziert werden können. Hierfür wurden Proben sowohl von Nähragarplatten als auch aus verschiedenen flüssigen Untersuchungsmaterialien (Harn, Thioglykolat-Anreicherung, Punktate) mit den Ergebnissen der Routinediagnostik verglichen.

## MALDI-ToF-Technik

Eine geringe Menge Keimmateriale ( $10^4$  KBE) wird von einer Nährbodenplatte auf eine Metallplatte (target) aufgetragen und in eine organische Kristallisationsmatrix eingebettet. Mittels Lasertechnologie erfolgt die Ionisierung von (ribosomalen) Proteinen der Probe, die im elektrischen Feld zunächst gebündelt und durch ein Flugrohr geleitet werden. Nach entsprechender Flugzeit treffen die ionisierten Proteine auf einen Detektor. So erzeugt man für jeden Mikroorganismus einen charakteristischen, molekularen Fingerabdruck auf Proteombasis im Massenspektrumbereich von 2 – 20 kDa. Durch Abgleich des Massenspektrums der Probe mit Super- und Referenzspektren einer Datenbank lassen sich Keime auf Spezies- und teilweise auf Subspeziesebene identifizieren.

## Untersuchungen

Es wurden mit der MALDI-ToF Technik der Firmen Shimadzu/Anagnostec 2718 Stämme untersucht, die vorher mit Hilfe der Routinediagnostik (Gramfärbungen, diversen Enzymtests, biochemischer Differenzierung, BioMerieux, Nürtingen) identifiziert worden waren.

Darüber hinaus wurden Harnproben und Punktate vergleichend kulturell und direkt mittels MALDI-ToF Technik untersucht.

In einem dritten Ansatz wurden Flüssigkulturen (Thioglykolat) parallel direkt über MALDI-ToF Technik und kulturell (Schädler KV Nähragarplatten, Biochemie mittels kommerzieller Tests, BioMerieux, Nürtingen) auf Vorhandensein von Clostridien untersucht.

## Ergebnisse

### 1. Keimidentifizierung

Von den insgesamt 2718 untersuchten Bakterienisolaten wurden mittels MALDI-ToF 384 nicht korrekt isoliert, das entspricht einer Trefferquote von 85,9% bzw. einer Fehlerquote von 14,1%. Größtenteils waren die Fehler damit begründet, dass die vorliegenden Keimspezies im Datenpool der Saramis Software nicht hinterlegt worden waren, so dass zu erwarten ist, dass die Trefferquote bei Aktualisierung der Software weiter zunimmt.

### 2. Direkter Keimnachweis ohne kulturelle Anzucht

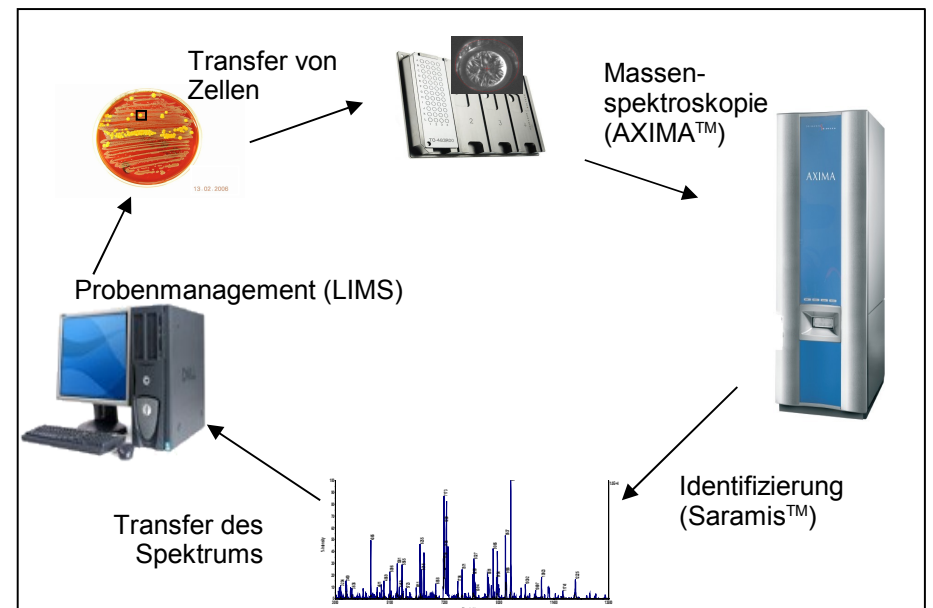
Die Fehlerquote der MALDI-ToF Untersuchungen lag bei Untersuchung von Sekreten mit 28% deutlich höher. Der größte Teil der Fehler ist hier darin begründet, dass aufgrund geringer Sensitivität der MALDI-ToF Technik Flüssigkeiten mit geringen Keimkonzentrationen in der Massenspektrometrie als ohne Keimnachweis befundet wurden (zu geringes ionisiertes Proteinspektrum, um ein validiertes Ergebnis zu erzielen). Kulturell negative Ergebnisse ließen sich in allen Fällen als negativ mittels Massenspektrometer bestätigen (Abbildung 2). Die im Vergleich zur kulturellen Anzucht niedrigere Sensitivität wurde bei vergleichender quantitativer Untersuchung von Harnproben mit *E.coli* bzw. mit *Proteus mirabilis* bestätigt. Die Nachweisgrenze für Harnproben mit beiden Keimspezies lag bei  $10^5$ /ml, wenn Harn direkt mittels Massenspektroskopie untersucht wurde. Bei kultureller Untersuchung ist eine Nachweisgrenze von  $10^3$ /ml ohne Anreicherung gegeben (Abbildung 4 und 5). Der Unterschied ist klinisch relevant.

### 3. Nachweis von Clostridien

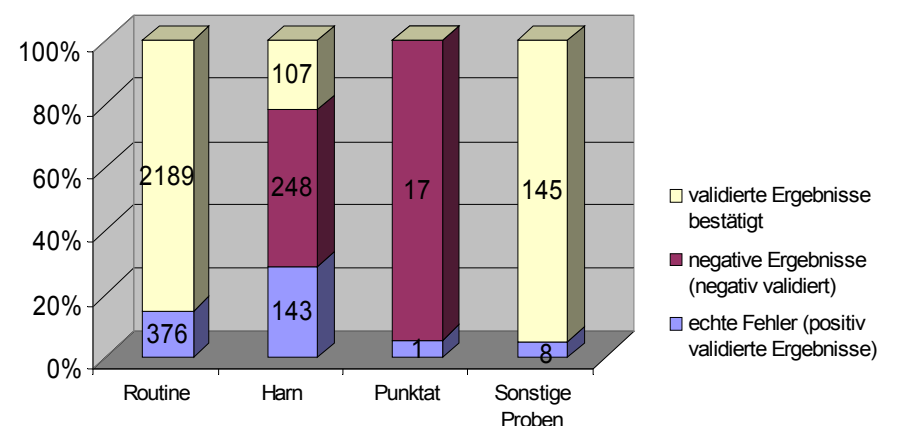
Der Nachweis von Clostridien, insbesondere der von *Cl. perfringens*, ist mittels MALDI-ToF Technik möglich, wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen. Die im Vergleich zur konventionellen Differenzierung niedrigere Nachweisrate (8,7% gegenüber 17,1% positive) lässt eine Umstellung von konventioneller Methode zu alleinigem Nachweis über Flüssigkultur mittels MALDI-ToF Technik derzeit nicht zu (Abbildung 3). Weitere Untersuchungen zur Steigerung der Sensitivität der Methode müssen folgen.

Clostridien-Diagnostik	Routinediagnostik	MALDI-ToF
<i>Clostridium perfringens</i>	12/113	8/113
<i>Clostridium sordellii</i>	2/113	0/113
<i>Clostridium tertium</i>	1/113	0/113
<i>Clostridium beijerinckii</i>	1/113	0/113

**Abbildung 3:** Clostridien-Diagnostik nach Anreicherungen von Variaproben in Thioglykolat-Bouillon.



**Abbildung 1:** Arbeitsablauf der MALDI-ToF Technik



**Abbildung 2:**

KBE/ml Urin	KBE/Auftragstelle	Probenanzahl mit erfolgreicher Identifizierung
$> 10^6$	$> 10^4$	12/22 (54%)
$10^5$	$10^3$	0/3 (0%)

**Abbildung 4:** Identifizierung von *Escherichia coli* aus Harnproben nach Eliminierung von Leukozyten und Zellaufschluß mit Ameisensäure und Acetonitril<sup>1</sup>.

KBE/ml Urin	KBE/Auftragstelle	Probenanzahl mit erfolgreicher Identifizierung
$> 10^6$	$> 10^4$	2/5 (40%)
$10^5$	$10^3$	0/1 (0%)

**Abbildung 5:** Identifizierung von *Proteus mirabilis* aus Harnproben nach Eliminierung von Leukozyten und Zellaufschluß mit Ameisensäure und Acetonitril<sup>1</sup>.

## Literatur

- Characterization of microorganisms by MALDI mass spectrometry. Petersen CE, Valentine NB, Wahl KL, Methods mol Biol. 2009; 367-79.

- Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry

- Identifying myxococci strains by Matrix assisted Laser Desorption ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and comparison with gene sequence polygenies, Stakebrand E. Päufer O. and Erhard M. Curr. Microbiol. Volume 50, Number 2, Date: february 2005; pages: 71-77

- <sup>1</sup>Rapid Identification of Bacteria Causing Urinary Tract Infections by MALDI-TOF MS. G. Schwarz et. al.