

Auch die Bakteriologie erlebt eine technologische Revolution

G. Praz, L. Tissières Lovey, Spital Wallis (GNW) - Zentralinstitut (ZIWS), Sitten

Einleitung

Die mikrobiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten hat in den letzten Jahren eine beachtliche Entwicklung vollzogen. Dank des technischen Fortschritts hat die Molekularbiologie seit einigen Jahren Einzug in die Routine erhalten. Die Molekularbiologie leistet einen wertvollen Beitrag, denn mit ihrer Hilfe lassen sich nicht kultivierbare Mikroorganismen oder Mikroorganismen mit sehr langsamem Wachstum rasch nachweisen.

Mit wenigen Ausnahmen konnte die Bakteriologie kaum von diesen kostspieligen Entwicklungen profitieren, die zudem schlecht an die grosse Mehrzahl der in der Routine eines Mikrobiologielabors durchgeführten Untersuchungen angepasst waren.

Der erste Schritt besteht stets darin, eine Kultur anzulegen, um in verschiedenen Milieus die Bakterienkolonien zu erhalten. Diese nicht zu verkürzende Phase dauert einen Tag.

Erst danach beginnt die Identifikation, die von wenigen Ausnahmen abgesehen, 6 bis 36 Stunden dauert, oder bei polymikrobiellen Infektionen sogar deutlich länger.

Trotz dieser Zwänge lassen sich mit den jüngsten technologischen Innovationen diese Wartezeiten eindrucksvoll verkürzen.

Hier ein Beispiel, das eindrucksvoll diese wirkliche technologische Revolution zeigt:

Bei einem Patienten mit Diabetes, der wegen einer schweren Infektion des Fusses eingeliefert wird, wird am selben Tag ein chirurgisches Debridement vorgenommen. Der Abstrich geht am Ende des Tags im Labor ein. Die Direktuntersuchung zeigt eine gemischte Flora. Bereits am nächsten Morgen gegen 11 Uhr bestätigt das Labor eine polymikrobielle Infektion mit *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* und *Serratia marcescens*.

Gewöhnlich sind bei einer solchen Probe ein oder mehrere Subkulturen notwendig, um die verschiedenen Kolonien zu isolieren und die verschiedenen Spezies zu identifizieren. Mit den traditionellen Methoden liegt die Zeit, die erforderlich ist, um ein solches Ergebnis zu erhalten, bei 48 bis 96 Stunden.

Ein solcher Zeitgewinn ist dank der **automatischen Beimpfung** der klinischen Proben und der **Identifikation von Mikroorganismen** durch eine Kolonie auf einem Agar in wenigen Minuten mittels **Massenspektrometrie** möglich.

1. Automatische Beimpfung der klinischen Proben

Diese Technik wurde natürlich wegen ihrer Schnelligkeit entwickelt. Sie erlaubt theoretisch die Beimpfung von etwa 180 Platten pro Stunde. Sie verbessert ausserdem deutlich die Qualität der Beimpfung [1]. Die nachstehende Abbildung (Abb. 1) zeigt zwei Platten, eine von Hand beimpft (rechts), die andere vom Automaten (links), nach Inkubation über Nacht. Auf der vom Automaten beimpften Platte zeigen sich die Kolonien individualisiert und können unmittelbar für eine Identifikation mittels Massenspektrometrie entnommen werden.

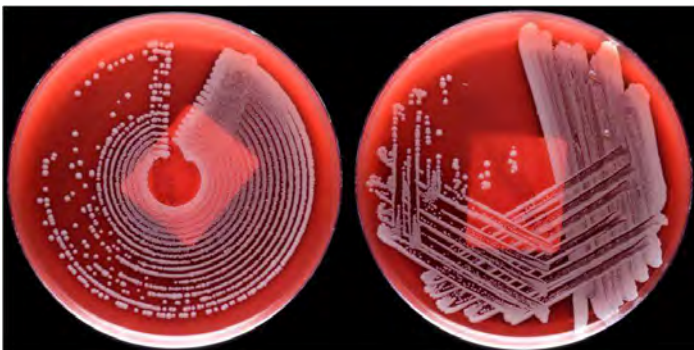


Abb. 1: Beimpfte Platten : von Hand (rechts) und durch den Automaten (links)

2. Identifikation der Mikroorganismen mittels Massenspektrometrie

Diese Technologie namens "MALDI-TOF MS" (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry) basiert auf der Tatsache, dass die Vielzahl der Komponenten eines Mikroorganismus speziesspezifisch ist [2]. Das Prinzip besteht also darin, die Mikroorganismen aufzuspalten und ihre verschiedenen Bestandteile in Form eines Spektrums zu sammeln, das aus einer Art von digitalem Fingerabdruck des Mikroorganismus besteht (Abb. 2). Dieses Spektrum wird mittels Vergleich mit verschiedensten Spezies, die in einer Datenbank vorliegen, identifiziert. Der

gesamte Prozess erfolgt in wenigen Minuten mit einer beeindruckenden Zuverlässigkeit [3].

Wir haben diese Technik anhand von fast 1000 Stämmen mit der traditionellen Methode verglichen. Über 90 % der am häufigsten isolierten Mikroorganismen werden auf diese Weise korrekt identifiziert.

Kosten

Im Gegensatz zu allen eingesetzten neuen Technologien, erhöht MALDI-TOF nicht die Kosten. Im Gegenteil, diese Methode senkt sie sogar. Man schätzt, dass ein Nachweis mit dieser Methode ca. 10 Mal weniger kostet als mit den traditionellen Methoden (Fr. 1 vs. 10) bei einer Basisinvestition in vergleichbarer Grössenordnung und einer deutlich höheren Kapazität wegen der Geschwindigkeit des Nachweises (einige Minuten gegenüber 5 bis 24 Stunden). Theoretisch können an die hundert Nachweise innerhalb von 3 Stunden erfolgen.

Diese zuverlässige, kostengünstige und leicht anzuwendende Methode stellt eine wahre Revolution für die mikrobiologische Diagnostik dar.

Sie wird ausserdem zur Identifikation von Mykobakterien, Pilzen und Dermatophyten verwendet. Schliesslich bietet sie interessante Entwicklungsperspektiven für die rasche Bestimmung von Antibiotikaresistenzen, den Nachweis von Virulenzfaktoren und die Epidemiologie.

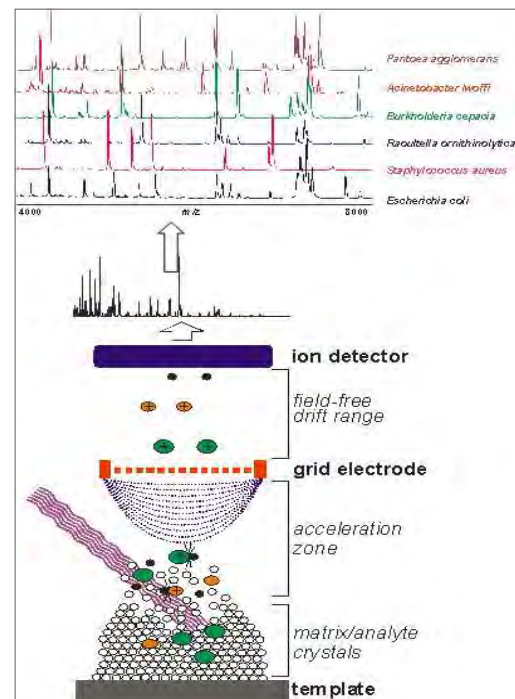


Abb. 2 : Prinzip des MALDI-TOF : Auflösung - Ionisierung, Beschleunigung, Abtrennung, Nachweis, Identifikation

Schlussfolgerungen

Diese zwei neuen Technologien, die sich harmonisch in den globalen Kontext der mikrobiologischen Diagnostik einfügen, erlauben einen erheblichen Zeitgewinn für die Identifikation von Mikroorganismen, die für Infektionen verantwortlich sind. Dieser Gewinn erleichtert in vielen Fällen die Versorgung von bestimmten ernsthaften Infektionen. Selbst ohne Antibiotogramm kann nämlich die Antibiotikabehandlung je nach nachgewiesener Spezies optimiert werden.

Literatur

- [1] Rice F, Baruch A, Microbiology Department et al. Evaluation of bioMérieux's PREVI™ Isola... an Automated Microbiology Specimen Processor : Improving Efficiency and Quality of Results. ASM General Meeting 2009; C-06-4.
- [2] Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin Microbiol Infect 2010; 16:1614-1619.
- [3] Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet St et al. Comparison of two Matrix-Assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification of routine identification of bacteria to the species level. Journal of Clinical Microbiology, Apr. 2010; 1169-1175.

Kontaktpersonen

Dr. med. Gérard Praz
Lysiane Tissières Lovey

gerard.praz@hopitalvs.ch
lysiane.tissieres@hopitalvs.ch

www.hopitalvs.ch
www.spitalvs.ch