

MALDI-TOF Massenspektrometrie

Eine molekulare Identifizierungsmethode im GMP-Umfeld

Elvira Engelmann und Frank Kugler • Labor L+S AG, Bad Bocklet

Korrespondenz Frank Kugler, Labor L+S AG, Mangelsfeld 4, 97708 Bad Bocklet;
e-mail: Frank.Kugler@Labor-LS.de

Hygienemonitoring – Identifizierungen

Für die Herstellung und Prüfung steriler Erzeugnisse wie z. B. Arzneimittel gelten besondere Anforderungen, um das Risiko einer Kontamination mit Mikroorganismen möglichst gering zu halten. Zum Nachweis dieses Hygienestandards sind umfassende mikrobiologische Kontrollen der Umgebung (Luft, Oberflächen) sowie des Personals erforderlich. Werden im Rahmen eines Monitorings Keime nachgewiesen, muss überprüft werden, ob diese hygienisch relevant sind. Dazu ist deren eindeutige und möglichst rasche Identifizierung erforderlich. Gilt es doch, gegebenenfalls über zeitnah eingeleitete Hygienemaßnahmen Verschleppungen der Keime auf bzw. in das Produkt zu verhindern.

Hier bietet die MALDI-TOF Massenspektrometrie mit schnellen Identifizierungsergebnissen einen großen zeitlichen Vorteil gegenüber herkömmlichen biochemischen und molekularbiologischen Methoden.

Prinzip der MALDI-TOF-Methode

Bei der MALDI-TOF-Methode (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight) handelt es sich um eine besondere Art der Massenspektrometrie. Dabei wird die Probe in eine niedermolekulare Matrix gegeben. Diese Mischung wird mit einem Laser beschossen. Über die Absorption der Laserstrahlung werden in der Matrix energiereiche Ionen ge-

Autoren



Dipl. Ing. (FH) Elvira Engelmann

Dipl. Ing. (FH) Elvira Engelmann studierte an der Hochschule Fulda Lebensmitteltechnologie und ist seit 2010 als wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der Labor L+S AG tätig. Hier ist Frau Engelmann u. a. für die Qualifizierung und Etablierung des MALDI-TOF MS in der Identifizierung von Mikroorganismen zuständig.



Frank Kugler

Frank Kugler ist seit seiner Ausbildung zum Biogelaboranten 1983 bei der Labor L+S AG beschäftigt. Frank Kugler ist Leiter der Bereiche Keimidentifizierung, Stammhaltung, interne und externe Betriebshygiene und Nährbodenherstellung. Zusätzlich ist Herr Kugler Sicherheitsfachkraft, Ausbilder und seit 2008 Prokurist.

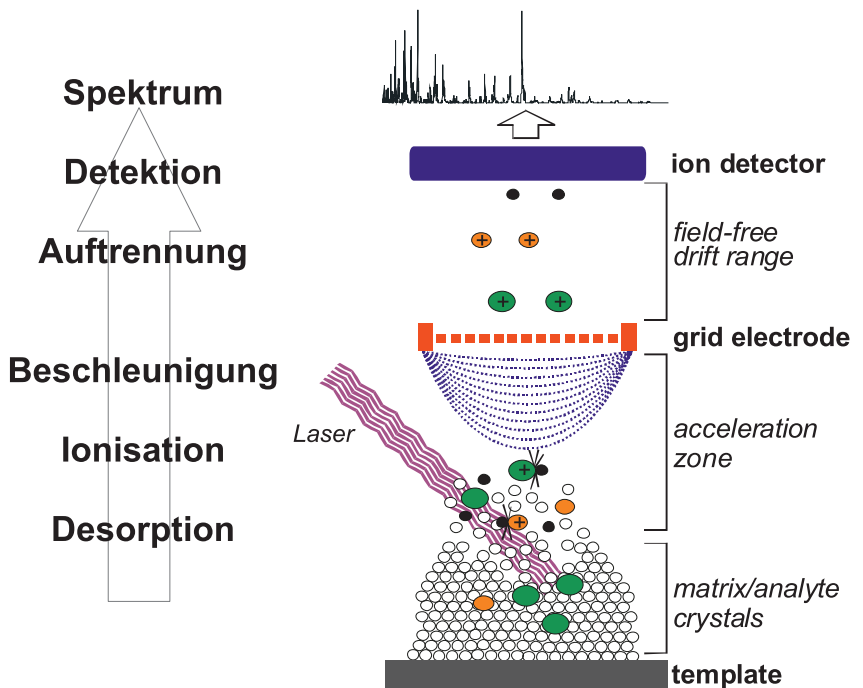


Abb. 1: Prinzip der MALDI-TOF-Methode (Quelle alle Bilder: L+S AG).

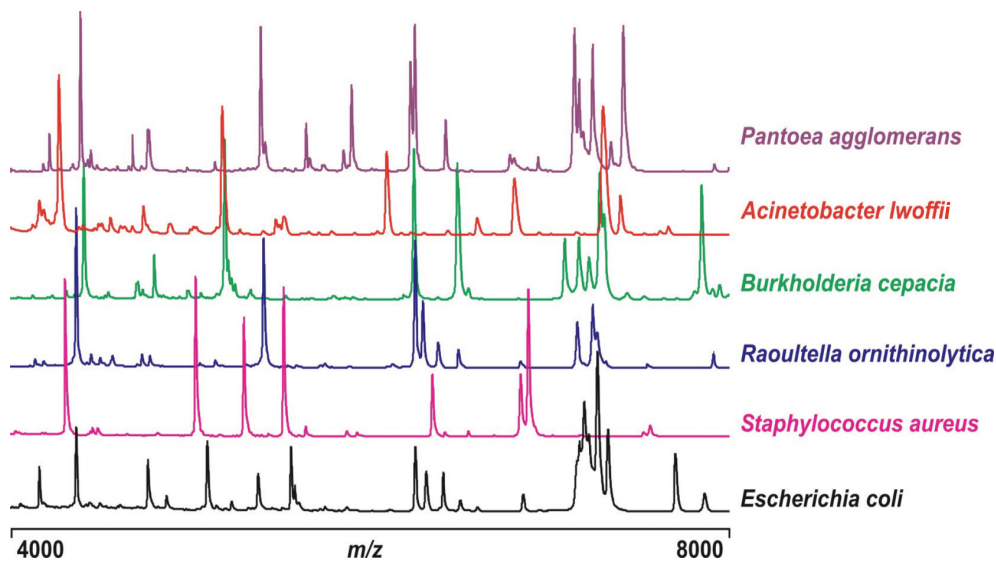


Abb. 2: Massenspektren von verschiedenen Mikroorganismen.

bildet. Diese geben ihre Energie an die eigentliche Probe ab, die in Fragment-Ionen zerfällt. Letztere werden desorbiert, über ein elektromagnetisches Feld beschleunigt und in einem feldfreien Flugrohr definierter Länge dem Detektor zugeführt. Es erfolgt eine Auftrennung des Ionengemisches, wobei kleinere, leichtere Ionen schneller am Detektor auftreffen. Die ankommenden Signale werden in Abhängigkeit ihrer Flugzeit (Time of Flight) zu einem Fingerprint-Massenspektrum umgeschrieben (Abb. 1). Die Flugzeit ist damit eine direkte Funktion der Beschleunigungsspannung und der Ladung sowie eine indirekte Funktion der Molekularmasse. Da sich Mikroorganismen in ihren Massenspektren unterscheiden, bietet dies die Grundlage für eine Keimidentifizierung (Abb. 2).

Geräte und Materialien

Bei der Labor L+S AG wird die molekulare Identifizierung mit dem Massenspektrometer AXIMA-Assurance-MALDI-TOF durchgeführt und die erhaltenen Spektren mit Hilfe der SARAMIS-Software und -Datenbank automatisch ausgewertet. Bei der verwendeten Methode

werden u. a. ribosomalen Proteine detektiert und als ein Musterabdruck von 150–200 Massen typischerweise im Bereich von 2-20 kDa dargestellt.

Als Matrix wird für die Identifizierung von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen eine gesättigte Lösung von Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic-Acid (CHCA) – einem Zimtsäurederivat – verwendet. Die Proben werden auf Probenplatten, sogenannten „Targets“, vorbereitet. Diese sind objektträgergroß und mit 48 Reaktionsflächen („Wells“) versehen. Zwei „Wells“ sind für die Kalibrierung mit einem *E. coli*-Standard reserviert, die restlichen 46 können mit verschiedenen Isolaten bestückt werden. Insgesamt können pro Lauf vier dieser Targets gleichzeitig in das Gerät eingeschoben werden.

SuperSpektren-Konzept

Das AXIMA-Assurance-Gerät arbeitet mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer und der Software SARAMIS (Spectral Archiving And Microbial Identification System). SARAMIS (Fa. bioMerieux) ist ein Software- und Datenbanktool zur schnellen automatischen Identifizierung von Mikroorganismen basierend auf ihren charakte-

ristischen MALDI-TOF-Fingerprint-Massenspektren. Die Grundlage für die Identifizierung bilden dabei die SuperSpektren und Referenzspektren der SARAMIS-Datenbank. Hierbei werden in der ersten Identifizierungsebene die erzielten Resultate mit den hinterlegten SuperSpektren verglichen. Liefert dies kein zufriedenstellendes Ergebnis, wird in zweiter Ebene direkt gegen Referenzspektren geprüft.

Bei einem SuperSpektrum handelt es sich um ein Spektrum mit einer reduzierten Anzahl von Massensignalen, die sowohl im Vergleich zwischen individuellen Isolaten eines Taxons als auch unter variablen Anzuchtbedingungen stabil sind. Die Intensitäten dieser Massensignale werden dabei gemittelt und durch zusätzliche Gewichtung aller Massen entsprechend ihrer Spezifität wird das SuperSpektrum erstellt.

Ein Referenzspektrum ist ein MALDI-TOF-Fingerprint-Massenspektrum eines Isolates mit gesicherter Identifizierung durch eine alternative Methode.

Durchführung der MALDI-TOF-MS-Identifizierung

Die zu identifizierenden Isolate werden auf einem geeigneten Medium kultiviert. Die 24h-Reinkultur dient dann als Grundlage für die Identifizierung der Keime mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer.

Etwas Koloniematerial wird z. B. mit einer Pipettenspitze aufgenommen und auf eine Probenposition des Targets übertragen. Danach wird die Probe sofort mit der Matrixlösung homogen verrieben. Das Gemisch muss trocknen und zeigt

Tabelle 1:**Identifizierungsergebnisse mittels MALDI-TOF MS
im Vergleich zu den Ergebnissen der Sequenzierung (Quelle: alle Labor L+S AG).**

Gattung	Anzahl gesamt	Ergebnis entspricht bis zur Spezies (%)	Ergebnis entspricht bis zur Gattung	Ergebnis mit Aus- wahl meh- rerer Keime	kein Ergebnis	Ergebnis entspricht nicht
Aerobe Sporenbildner	8	6 (75)		1	1	
Anaerobier	4	4 (100)				
Coryneforme Bakterien	2	2 (100)				
Enterobakterien	8	8 (100)				
Hefen	7	7 (100)				
Listerien	1	1 (100)				
Pseudomonaden	7	6 (86)	1			
Schimmelpilze	2	1 (50)	1			
Staphylokokken	5	5 (100)				
Streptokokken/ Enterokokken	6	4 (66)		1	1	
Σ	50	44 (88)	2	2	2	0

dann die typische Kristallbildung der Matrix, die nun die Probe umschließt. Hefen werden vor der Zugabe der Matrix direkt auf dem Target mit 25-%iger Ameisensäure aufgeschlossen. Nach Eingabe der Targets in das Gerät wird die Probe automatisch gemessen und das Fingerprint-Massenspektrum erstellt. Das Spektrum wird gegen die in der Datenbank hinterlegten Massenspektren abgeglichen und das Ergebnis angezeigt.

Allgemeines zur Ergebnisauswertung

In SARAMIS wird die Übereinstimmung der gemessenen Massenspektren zu den in der Datenbank hinterlegten Spektren in Prozent angegeben.

Ergebnisse von 99,9–70,0 % werden mit SuperSpektren erhalten und vom System mit entsprechender

farblicher Darstellung sofort angezeigt. Die Prozentangabe ist dabei der Wert für die Güte der Identifizierung, welcher durch die Punktzahlen der SuperSpektren gebildet wird.

Ergebnisse kleiner 70,0 % werden mit den Referenzspektren erhalten und können erst mit einer zusätzlichen Funktionstaste („compare“) angesehen werden. Daraufhin wird eine Liste der 30 besten Ergebnisse bis 30,0 % angezeigt. In diesem Modus kann ein Ergebnis bis 50,0 % akzeptiert werden, sofern es plausibel ist. Ergebnisse bis 30,0 % müssen durch weitere Zusatztests bestätigt werden. In diesem Fall gibt die Prozentangabe den Wert der identischen Messsignale aus dem gemessenen und dem Referenzspektrum wieder.

Keinesfalls dürfen die Ergebnisse der MALDI-TOF MS isoliert betrachtet werden. Die Plausibilitätskontrolle, die die Übereinstimmung des Identifizierungsergebnisses mit den

Beurteilungen aus Mikroskopie, Kulturmorphologie und den Ergebnissen der verschiedenen Zusatztests (z. B. KOH-, Katalase-, Koagulase-Test) bewertet, ist und bleibt ein wichtiges Instrument bei der Identifizierung von Mikroorganismen durch automatisierte Verfahren.

Beurteilung der Ergebnisse aus dem Monitoring

Die Ergebnisse in der Tab. 1 stammen aus der Qualifizierungsphase des Gerätes. In einem Projekt wurden 50 Feldisolate aus einem Hygienemonitoring stichprobenartig ausgewählt und mittels MALDI-TOF MS identifiziert. Alle Proben wurden im Doppelansatz vorbereitet und gemessen. Das Ergebnis musste mit einer Wahrscheinlichkeit von $\geq 70,0\%$ in mind. einem Ansatz identifiziert und im zweiten Ansatz durfte keine

Tabelle 2:

Vor- und Nachteile der aktuellen Identifizierungsmethoden im Überblick.

Methoden	Vorteile	Nachteile
MALDI-TOF MS	<ul style="list-style-type: none"> • schnelle Identifizierung • keine falschen Ergebnisse • weniger Verbrauchs- und Verpackungsmaterial • ständig wachsende Datenbank • Datenbank mit Hauskeimen erweiterbar • medienunabhängig • unabhängig vom Alter der Kultur (Messung dauert evtl. länger) 	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Anschaffungs- und Wartungskosten • Datenbank stark erweiterungsfähig
Biochemie	<ul style="list-style-type: none"> • bewährte Methode • Feindiagnostik für diffizile Mikroorganismen durch Einsatz von biochemischen Zusatztests 	<ul style="list-style-type: none"> • zeitaufwändig • falsche Voruntersuchung → falscher Streifen • teilweise Handling mit Gefahrstoffen • medien- und zeitgebunden • sehr träge Aktualisierung der Datenbank hinsichtlich Taxonomie und neuer Taxa
Molekularbiologie	<ul style="list-style-type: none"> • größere Datenbank, die ständig erweitert wird 	<ul style="list-style-type: none"> • teuer • aufwändige Probenvorbereitung • dauert länger

abweichende Identifizierung erhalten werden. Zur Überprüfung der Messergebnisse wurde parallel eine partielle Sequenzierung der 16S rDNA bei Bakterien bzw. 28S rDNA bei Hefen und Schimmelpilzen mitgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung waren bei der Auswertung ausschlaggebend.

Die Messergebnisse zeigen beispielhaft, dass mit der MALDI-TOF-Methode generell eine zuverlässige Identifizierung bis zur Spezies möglich ist. Lediglich zwei Mikroorganismen – jeweils ein Keim aus der Gruppe der Pseudomonaden bzw. Schimmelpilze – konnte in diesem Beispiel nur bis zur Gattung richtig

bestimmt werden. Bei jeweils einem Keim aus der Gruppe der aeroben Sporenbildner bzw. Streptokokken/Enterokokken wurde kein Ergebnis angezeigt. Dabei handelt es sich um Keime, die noch nicht in der Datenbank hinterlegt sind. Es wurden auch zwei Ergebnisse mit Auswahl mehrerer Keime erhalten. In diesem Fall handelt es sich um Bakterien, die in der Datenbank zu einer Gruppe zusammengefasst wurden, da sie allgemein nur sehr schwer zu unterscheiden sind. Beispielsweise wird der Keim *Bacillus cereus* aus der Gruppe der aeroben Sporenbildner als „*Bacillus cereus group*“ angegeben.

Fazit

Die MALDI-TOF-Methode birgt großes Potential bei der Identifizierung von Mikroorganismen in der Laborroutine. Neben dem schon erwähnten zeitlichen Vorteil ist diese Methode außerdem mit weniger Materialverbrauch verbunden, wobei jedoch die hohen Anschaffungs- und Wartungskosten (z.B. Detektor-, Laseraustausch, etc.) zu berücksichtigen sind. Die einfache Handhabung spricht weiterhin sehr für die neue Identifizierungsmethode. So ist keine vorausgehende Gattungsdiagnose wie bei den biochemischen Methoden notwendig, da jede Probe auf die gleiche Weise vorbereitet und gemessen wird. Allerdings bedarf die Probenvorbereitung auf dem Target anfangs intensiven Trainings, um das „Feeling“ für das richtige Verhältnis zwischen Keimmenge und Matrix zu bekommen. Mit zunehmender Erfahrung bei der Anwendung der MALDI-TOF-Methode in der Laborroutine erkennt man aber auch, dass die allgemein schwierigen Bakterien wie beispielsweise schleimige Bazillusarten oder einige Coryneforme Bakterien schon allein durch ihre Wachstumseigenschaften schwierig zu bearbeiten sind. Wenn das Koloniematerial zu „wässrig“ ist, kann dadurch weniger des für die Messung essentiellen „Proteinmaterials“ auf das Target aufgebracht werden. Ein geeignetes Aufschlussverfahren als Zwischenschritt wäre zwar zeitaufwändiger, könnte aber bessere Resultate mit sich bringen. Vorteilhaft gegenüber anderen Methoden ist weiterhin die Tatsache, dass sowohl das Anzuchtmedium als auch eine „überschrittene“ Inkubationszeit keinen Einfluss auf das Identifizierungsergebnis haben. Bei älteren Kulturen verlängert sich allerdings die Messzeit. Zu bemängeln ist die im Hinblick auf Umweltkeime stark zu erweiternde Datenbank. So sind keine Referenzspektren für *Micrococcus lysae*, *Brevibacillus choshinensis* oder *Kocuria varians*, um nur ein paar Beispiele zu nennen, in der

Datenbank hinterlegt. Hier bietet die SARAMIS-Software zusätzlich die Möglichkeit z.B. Hauskeime eigenständig in die Datenbank aufzunehmen und gezielt zu identifizieren (Tab. 2).

Abschließend muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der MALDI-TOF Massenspektrometrie lediglich um eine weitere apparative Identifizierungsmethode handelt, bei der sich – wie bereits schon erwähnt – eine Plausibilitätskon-

trolle durch geschultes Personal mit dem nötigen mikrobiologischen Know-how weiterhin empfiehlt. Zum einen, um sich selbst zu überprüfen und Verwechslungen oder andere Fehlerquellen, wie z.B. vertauschte Isolate bei der Vorbereitung, auszuschließen. Zum anderen müssen eventuell unklare Resultate hinterfragt werden. Handelt es sich ggf. um eine neue Spezies? Hat eine Mutation des Bakteriums stattgefunden, das zwar das typische Finger-

print-Massenspektrum, jedoch eine andere Kulturmorphologie, wie z.B. eine Pigmentierung, aufweist? Mikrobiologie ist eine dynamische Angelegenheit. Der Identifizierungsapparat ist letztendlich immer nur so gut wie seine Datenbank bzw. die Menschen, die sie füttern ...

Fachliteratur

bioMerieux, 2011