

Differenzierung von Bakterien und Pilzen mittels MALDI-TOF

Dr. med. Wolfgang Reiter

Ich muss gestehen, als ich vor wenigen Jahren auf einer mikrobiologischen Tagung das erste Mal mit dem Begriff „Malditof“ konfrontiert wurde, dachte ich einen kurzen Moment zunächst an einen russischen Mikrobiologen, nur um kurz danach zu erfahren, dass es sich um ein Massenspektrometer handelt, mit dem man jetzt Bakterien differenzieren könne.

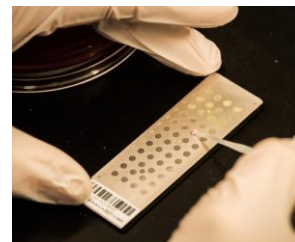
So lernte ich, dass die griffige Bezeichnung „MALDI-TOF“ eine elegante Abkürzung für „matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry“ ist.

Massenspektrometer sind an sich nichts Neues im Labor und werden schon seit längerem in der chemischen Analytik, der Toxikologie, der Proteinanalytik und anderen Bereichen eingesetzt. Nur in mikrobiologischen Laboren fand man sie bis vor ca. 5 Jahren nicht.

Dies hat sich in der Zwischenzeit gründlich geändert.

Die Funktionsweise einer MALDI-TOF ist wie folgt:

Reinkulturen von Bakterien oder Pilzen werden auf einen Probenträger (Target) aufgebracht und mit einer sogenannten Matrix überschichtet. Durch Laserbeschuss in einem Vakuum werden die mikrobiellen Moleküle zusammen mit den Matrixmolekülen in die Gasphase übergeführt, in der es zu einer Ionisierung der mikrobiellen Moleküle durch Elektronenübertragung von den Matrixmolekülen kommt.

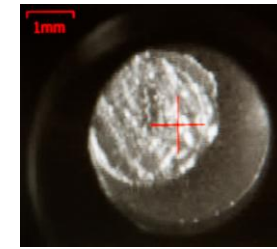


Bestücken des Targets

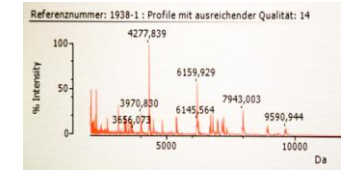


Beladen der MALDI-TOF

Die ionisierten Moleküle werden über elektrische Felder durch eine Vakuumröhre beschleunigt an deren Ende sich ein Detektor befindet. Aus der Passagezeit wird die Masse der Moleküle bestimmt. So wird von jedem eingesetzten Keim ein Massenspektrum der Proteine von ca. 2000 bis 20000 Dalton ermittelt. Es handelt sich um die Massensignale kleiner, konservierter Strukturproteine, die weitgehend unbeeinflusst von den Kulturbedingungen in hoher Konzentration vorliegen, wahrscheinlich vor allem um ribosomale Proteine. Die gemessenen Spektren werden mit einer Datenbank abgeglichen und erlauben die genaue Differenzierung der eingesetzten Bakterien oder Pilze.



Zielen des Lasers



Massenspektrum

In die zugrundeliegende Datenbank gehen immer mehr Keime ein, so dass die Qualität der Differenzierung stetig steigt.

Bisher wurden überwiegend biochemische Differenzierungen eingesetzt, die sogenannten „bunte Reihen“, wie sie vielleicht der eine oder andere Leser noch aus dem Mikrobiologie-Kurs in Erinnerung hat (auch wenn unsere „bunten Reihen“ nicht mehr bunt waren und in einem Automaten bebrütet und ausgewertet wurden).

Die Differenzierung mittels MALDI-TOF ist der biochemischen in vielen Bereichen ebenbürtig (z.B. Enterobacteriaceae), in anderen deutlich überlegen (z.B. Anaerobier oder Sprosspilze) und in manchen leider ähnlich unbefriedigend (z.B. vergrünende Streptokokken), im Mittel auf einem höheren Niveau.

Der Arbeitsaufwand im Labor lässt sich mit den gegenwärtigen Geräten leider noch nicht verringern.

Der wesentliche Vorteil der MALDI-TOF ist der Zeitvorteil: Während eine biochemische Differenzierung mindestens mehrere Stunden benötigt und meistens über Nacht inkubiert werden muss, erledigt dies die MALDI-TOF innerhalb kürzester Zeit. Der Zeitbedarf für ein vollbesetztes „Target“ mit 48 Keimen liegt bei ca. 50 Minuten.

Hierdurch kann die Information, welcher Erreger angezüchtet wurde, meist schon einen Tag früher an den Einsender weitergegeben werden. Somit kann auch einen Tag früher die Antibiose an die zu erwartenden Resistenz des Erregers angepasst werden.

Leider kann die MALDI-TOF (bisher) nur differenzieren und keine Resistenztestung durchführen, so dass auf das Antibiogramm nach wie vor gewartet werden muss. Jedoch wird die schnellere Spezies-Differenzierung der Erreger in Kombination mit unserer jährlichen Resistenz-Statistik (im Klick: Medizin-Institute-KCI-Informationen-Resistenzstatistik) in vielen Fällen eine gezieltere Antibiose ermöglichen.

Nach wie vor benötigt die MALDI-TOF das Vorliegen von Reinkulturen. An der konventionellen Anzucht der Erreger aus den verschiedenen Untersuchungsmaterialien hat sich also vorerst nichts geändert. Alle mikrobiologischen Untersuchungsmaterialien müssen erst einmal über Nacht bebrütet werden und manche sogar deutlich länger, damit auch langsam wachsende Keime genügend Zeit zur Kolonienbildung bekommen.

LabTOPs

Wissenswertes aus der Laboratoriumsmedizin

15. Ausgabe – Januar 2014

Differenzierung von Bakterien und Pilzen

Dr. med. Wolfgang Reiter

Probenversand mittels Rohrpost

Dr. rer. nat. Thomas Plecko,
Prof. Dr. med. Eberhard Wieland
Dr. med. Beate Luz

Allerdings ist es möglich, mittels MALDI-TOF direkt aus positiven Blutkulturen den Erreger zu bestimmen, um hier noch einmal einen Tag schneller zu sein. (Auch hier muss die Blutkultur erst bebrütet werden, bis ein Keimwachstum in der Blutkulturflasche vorliegt). Diese Technik wollen wir im kommenden Jahr etablieren.

Auch die Ökonomen lassen sich gut von der neuen Technik überzeugen, was die stetig wachsende Zahl von MALDI-TOFs in mikrobiologischen Laboratorien zeigt. Zwar kostet ein Massenspektrometer deutlich mehr als ein Gerät für die biochemische Differenzierung, zum Ausgleich verbraucht es aber so gut wie keine Reagenzien.

Zusammengefasst bietet die MALDI-TOF zum gegenwärtigen Stand der Technik

- eine insgesamt genauere Differenzierung von Bakterien und Sprossspitzen
- einen Zeitvorteil von in der Regel einem Tag für die Differenzierung
- bei vergleichbaren Kosten

Probenversand mittels Rohrpost

Dr. rer. nat. Thomas Plecko, Prof. Dr.med. Eberhard Wieland

Ein möglichst schneller Transport von Untersuchungsmaterial zum Labor, ohne Beeinträchtigung der Probenqualität, ist von entscheidender Bedeutung für eine zeitnahe und korrekte Erstellung eines labormedizinischen Befundes. Die Beförderung von Blutproben per Rohrpost ist die modernste und schnellste Möglichkeit des Transports. Am Standort Mitte des Klinikums (Katharinenhospital, Olgahospital) und in der Sana Herzchirurgie wird im Moment eine Rohpostanlage installiert, die ab Januar 2014 schrittweise in Betrieb genommen wird.

Bei Rohposttransport werden die Blutproben allerdings durch Beschleunigung, Abbremsen und Kurvenfahrten im dreidimensionalen Raum Kräften ausgesetzt, die vor allem zu einer Hämolyse der Probe führen können [1]. Je nach Streckenführung zwischen Sender und dem Labor kann es zu einer mehr oder weniger ausgeprägten physikalischen Beanspruchung der Zellmembranen von Erythrozyten, aber auch von Leukozyten und Thrombozyten kommen. Die Zerstörung der hier zahlenmäßig weit überlegenen Erythrozyten kann durch das freigesetzte Hämoglobin die klinisch chemische Analytik insgesamt stören. Der Übergang von erythrozyteneigenen Analyten ins Plasma/Serum fällt allerdings nur bei einem hohen Konzentrationsgradienten zwischen Erythrozyt und Plasma/Serum ins Gewicht [2].

Analyt	Konz. Erythrozyt/Konz. Plasma
LDH	160
Kalium	23
ALT	7
AST	40
NSE	100 (Thrombozyt 1000)
Hämoglobin	-

Aber auch Leukozyten und Thrombozyten können zerstört werden, was eine exakte Zählung und deren morphologische Beurteilung verfälschen kann. Besonders betroffen ist Probenmaterial mit Zellen von besonderer Labilität (herzchirurgische Patienten, hämatoonkologische Patienten, Patienten unter Chemotherapie). Bei eigenen Untersuchungen mit Probenmaterial aus der Herzchirurgie kam es durch den Rohrposttransport im Mittel zu einer absoluten Erhöhung der LDH um 57 U/l. Bei den Parametern Kalium, Phosphat, AST, aPTT, Quick, Blutbild kam es zu keinen signifikanten Veränderungen.

Um das Auftreten einer Hämolyse so gering wie möglich zu halten, müssen die Proben unbedingt sachgerecht verpackt werden, um ein unkontrolliertes Hin- und Herschleudern im Rohrpostbehälter zu vermeiden:

- Monovetten in Cellophanbeutel legen
- Cellophanbeutel in Luftpolsterbeutel packen
- Luftpolsterbeutel einwickeln und in Rohrpostbehälter packen.

Hierbei ist auch zu beachten: Je geringer die Monovetten gefüllt sind, desto größer ist die Gefahr der Zellschädigung und damit auch der Hämolyse.

Einen großen Einfluss hat auch die Transportgeschwindigkeit, die allerdings auf der Strecke zum Labor automatisch auf 3 m/s eingestellt sein wird (Langsamfahrt).

Nachfolgend genannte Proben dürfen nicht mit der Rohrpost an das Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (KCI) versendet werden:

- Knochenmark- und Liquorpunktate für morphologische Untersuchungen
- Proben für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik
- Proben zur Bestimmung von NSE
- Proben zur Bestimmung des freien Hämoglobins
- Offene Kapillaren
- Spritzen mit Stempel
- Urinbecher

Die Zielkodierungen für das Labor sind:

34835 Routineproben

34823 Notfall

Die Rohrpostbehälter sind farblich markiert:

Labordiagnostik: blau

Blutzentrale: rot

Die Rohrpostanlage kann bei einem Stromausfall zurzeit nicht über das Notstromsystem mit versorgt werden. Bei einem Stromausfall steht das System. Beim Wiederanfahren werden dann alle Behälter automatisch an ihr ursprüngliches Ziel verteilt.

Bei längerem Stillstand sind die Proben unerreichbar, weshalb in einem solchen Fall dringende Notfalluntersuchungen noch einmal abgenommen und zu Fuß ins Labor gebracht werden müssen.

Ausführliche Informationen und genaue Vorschriften zur Verpackung der Laborproben in den Rohrpostbehälter finden Sie im KLIK unter Medizin/Institute/KCI.

[1] Streicher T et al, Clin Chem 57:10, 1390-1397 (2011)

[2] Delbrück A, Z klin Chem u klin Biochem 6:3, 211-216 (1968)

Versand von Blutprodukten mit Rohrpost

Dr. med. Beate Luz

Alle Blutproben dürfen mit der Rohrpost ins Zentralinstitut für Transfusionsmedizin und Blutspendedienst geschickt werden. Auch auf dieser Strecke ist die Langsamfahrt fest voreingestellt. Die Verpackung der Blutproben erfolgt gleich wie für das KCI.

Blutprodukte dürfen **ausschließlich mit den roten** Rohrpostbehältern (Langsamfahrt fest eingestellt!) und spezieller Verpackung transportiert werden. Wegen der erhöhten Gefahr der Hämolyse und der Unterbrechung der Kühlkette ist für jedes Blutprodukt nur eine Fahrt mit der Rohrpost zulässig. Zukünftig soll der Großteil der Blutprodukte im Zentralinstitut für Transfusionsmedizin und Blutspendedienst verbleiben und direkt zur Transfusion abgerufen werden.

Eine ausführliche Anleitung zum Vorgehen finden Sie im KLIK unter Medizin/QM-Handbücher/Transfusionsmedizin.

Die Zusammenstellung aller Inhalte wurde mit Sorgfalt vorgenommen. Eine Haftung, auch für eventuelle Fehler kann nicht übernommen werden.

Kontakt:

Redaktion: Dr. med. Maria Shipkova

Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin mit Laborpraxis,
 Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. Eberhard Wieland
 Zentrum für Klinische Pathologie, Pharmazie und Hygiene
 Klinikum Stuttgart
 Kriegsbergstraße 60
 70174 Stuttgart
 Tel. 0711 278-34801
 E-Mail: e.wieland@klinikum-stuttgart.de

www.klinikum-stuttgart.de
www.labor-wieland.de