

Eva Rheinheimer

Dr. med. dent.

Identifikation medizinisch relevanter *Pasteurellaceae*-Stämme mittels Matrix-assistierter Laser-Desorptions-/Ionisations-Time-Of-Flight-Massenspektrometrie

Fach/Einrichtung: Infektiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Klaus Heeg

Die Matrix-assistierte Laser-Desorptions-/Ionisations-Time-of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) wurde von Karas und Hillenkamp im Jahr 1987 entwickelt und wird seit einigen Jahren auch in der medizinischen Mikrobiologie angewendet. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wertigkeit der MALDI-TOF-MS für die Identifizierung der medizinisch relevanten *Pasteurellaceae*-Stämme zu untersuchen. Insbesondere sollte überprüft werden, inwieweit eine Verbesserung und Erweiterung der bisher in den Datenbanken vorliegenden Spektren zu höheren Identifikationswahrscheinlichkeiten mit der MALDI-TOF-MS führt. Darüber hinaus sollte durch Modifikation des von Burckhardt und Zimmermann beschriebenen Carbapenemase-Protokolls untersucht werden, ob sich mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie auch die Ampicillinaseaktivität eines Bakteriums darstellen lässt.

Die verwendeten Methoden waren die Kultur und Stammservierung der lyophilisierten Stämme, die Herstellung von auftragungsfähigen Extrakten sowie die Schmierpräparation aus den vorhandenen Stämmen. Außerdem kamen die Messung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie, die 16S-rDNA-Sequenzierung und enzymatische und biochemische Untersuchungsverfahren (Katalase-Reaktion, Oxidase-Reaktion, API NH®) der Stämme mit fraglichen Ergebnissen sowie der Vergleich mit den üblichen herkömmlichen Verfahren zur Identifikation von *Pasteurellaceae*-Stämmen zur Anwendung (Vitek 2®, API NH®, mikroskopische Diagnostik nach Einfach- und Differentialfärbung).

Die durchgeführten Vorversuche ergaben für die Untersuchung von *Pasteurellaceae*, dass die alleinige Durchführung einer Schmierpräparation in der Regel ausreichend ist. Desweiteren ist eine Empfehlung zur generellen Anzucht dieser Erreger auf Kochblutagar bei einer kurzen Bebrütungszeit von weniger als 24 Stunden auszusprechen.

Betrachtet man alle korrekten Identifikationen auf Genus- und Speziesebene ohne Berücksichtigung des jeweiligen Scores, so lagen bei der ersten Messung im Jahr 2010 35 von 44 (79,5 %) richtige Ergebnisse vor. Für die zweite Messung 2012 nach einem Update der Datenbank waren es 38 von 43 korrekt erkannte Proben (88,4 %). Die dritte Messung im Jahr 2012 nach einem weiteren Update und dem Einlesen der Referenzspektren der vorliegenden Arbeit ergab 37 von 44 korrekt identifizierte *Pasteurellaceae*-Stämme (84,1 %).

Nimmt man für die richtigen Ergebnisse alle Werte $\geq 1,700$ als korrekte Identifikationen an, so ergeben sich auf Speziesebene für die anfängliche Messung 20 richtig erkannte Bakterienstämme (45,5 %). Für die zweite Messung 2012 liegen 27 richtige Speziesidentifikationen (62,8 %) vor. Nach dem Einlesen von weiteren Referenzspektren in die Datenbank ergeben sich 30 korrekte Resultate auf Speziesebene (68,2 %). Nimmt man zusätzlich die auf Genusebene richtig identifizierten Bakterienstämme mit einem Score ab 1,700 als korrekte Identifikationen hinzu, liegt bei der ersten Messung ein Gesamtwert von 27 korrekten Resultaten (61,4 %) vor, bei der zweiten Messung von 35 von 43 richtig identifizierten Bakterienstämmen (81,4 %) und bei der dritten Messung von 35 von 44 korrekt erkannten Keimen (79,5 %).

Durch das Generieren mehrerer zuverlässiger *Pasteurellaceae*-Referenzspektren und deren Einpflegen in die etablierte Bruker-Datenbank konnte die Diagnostik dieser hochanspruchsvollen Spezies nachweislich verbessert werden. Damit zeigt die vorliegende Arbeit eine effiziente und zuverlässige Nachweismethode für *Pasteurellaceae*-Stämme auf, die sich mit wenig Aufwand in die mikrobiologische Routine integrieren lässt. Hervorzuheben ist hierbei die Ersparnis von Zeit und Kosten.

Darüber hinaus gelang es, ein dem oben aufgeführten Carbapenemase-Protokoll entsprechend modifiziertes Protokoll für den Wirkstoff Ampicillin zu erarbeiten, welches anhand ampicillinspezifischer Peaks und der Hydrolyse des β -Laktamrings durch vorhandene β -Laktamasen die Resistenzlage der untersuchten Keime in weniger als 24 Stunden (inkl. Anzucht) darzustellen vermag und somit einen weiteren Fortschritt im Einsatz der MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Routine darstellt. Es gilt, weitere Verfahren und effiziente Versuchsprotokolle zu erarbeiten, um das testbare Antibiotikaspektrum zu erweitern und durch Schnelligkeit in der Diagnostik und Übermittlung der Ergebnisse einen möglichst raschen Therapiebeginn zu erreichen.

Insgesamt dürften die Kosteneffizienz der MALDI-TOF-Massenspektrometrie, die Vielseitigkeit in ihren Einsatzgebieten und ihre Geschwindigkeit in der Erregeridentifizierung dazu beitragen, auch den klinischen Einsatz der Methode weiter zu etablieren.