

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification of Mycobacteria in Routine Clinical Practice

Amel El Khéchine, Carine Couderc, Christophe Flaudrops, Didier Raoult, Michel Drancourt

2011. PLoS ONE 6(9): e24720. doi:10.1371/journal.pone.0024720

Einleitung

- In Entwicklungsländern mehr als 1.3 Mio. neue Fälle von Tuberkulose jährlich
- Auftreten und Ausbreitung von multiresistenten Tuberkulose-Erreger
- Unterscheidung tuberkulöse und nicht-tuberkulöse Mykobakterien

Daher rasche, kostengünstige und verlässliche Labordiagnose essentiell

Konventionelle Identifikation von Mykobakterien extrem zeitaufwändig
Heute in entwickelten Ländern ersetzt durch molekulare Identifikationssysteme (teuer, technisch anspruchsvoll)

Alternative Identifikationsmethode: MALDI-TOF MS

- Sehr rasch durchführbar
- kostengünstig

Bisher relativ wenig Daten vorhanden, um eine verlässliche Identifikation von *Mycobacterium* sp. mit MALDI-TOF zu erhalten und Einsatz für Routinediagnostik kaum validiert.

Material und Methoden

1 *Mycobacterium* spp. Referenz Stämme (Tabelle 1, n=43) zur Erarbeitung der MALDI TOF Datenbank
11 *M. tuberculosis* Komplex Stämme
12 *M. avium* Komplex Stämme
20 nicht-tuberkulöse *Mycobacterium* spp.

2 Von Februar 2010 bis Mai 2011 wurden alle *Mycobacterium* spp. Isolate mit MALDI TOF prospektiv untersucht.

Kultur: MGIT Röhren (Becton Dickinson) sowie 5% Schafblutagar

Identifikation: *rpoB* Sequenzierung der atypischen Mykobakterien und exact tandem repeat D (ETR-D) Sequenzierung der *M. tuberculosis*-Komplex Isolate

Inaktivierung der Mykobakterien:

2 Protokolle

- in Wasserbad 95°C während 1 Std.
- 70% Ethanol während 10 Min.

Überprüfung der Inaktivierung mit:

- *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG und *M. fortuitum* : Inaktivierung und anschliessend 45 Tage bei 37°C bebrüten.

Aufarbeitung der Isolate für MALDI TOF

8 verschiedene Protokolle zur Freisetzung der Proteine evaluiert (Tabelle 2)

Sensitivität von MALDI TOF

10-er Verdünnungsreihen 10^8 – 10^3 Mykobakterien/ml

Stämme: *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG und *M. fortuitum*

Mykobakterien MALDI-TOF Datenbank

1 MALDI TOF Analyse der 43 Referenz-Stämme nach Hitzeinaktivierung und Extraktion mit 70% Ameisensäure mit Bruker Daltonics-Gerät

2 Eingabe der erhaltenen MALDI TOF Spektren in lokale Datenbank und anschliessend Einschluss dieser Daten in die Bruker Daltonics Datenbank (Juni 2010)

Resultate

MALDI-TOF Protokolle

1 Inaktivierung

Kein Wachstum nach 45 Tagen mit beiden Protokollen. Das Ethanol Protokoll zeigte jedoch ein noch sichtbares Proteinprofil. Daher Verwendung der 1-stündigen Hitzeinaktivierung als Routineprotokoll.

2 Protein-Extraktion (Abbildung 1)

Einsatz von 70% Ameisensäure mit 100% Acetonitril als Routineverfahren

Etabliertes Routineverfahren:

1 Ueberführen von Bakterienmaterial in Eppendorf Schraubröhrchen mit 500µl deionisiertem H₂O und 0.5% Tween-20 und Hitzeinaktivierung während 1 Std. bei 95°C

2 Zweimal Waschen der Bakteriensuspension mit 500 µl H₂O und zentrifugieren während 10 Min. bei 13000xg

3 0.3 g Glaskugeln (≤106 µm, Sigma) und 500 µl H₂O zu Pellet geben und 3 Min. vortexen

4 Zentrifugieren 10 Min. bei 13000xg

5 Resuspendieren des Pellets in 70% Ameisensäure und 100% Acetonitril und zentrifugieren 1 Min. bei 13000xg

6 1.5 µl des Ueberstandes auf MALDI Platte auftragen mit 4-facher Bestimmung. Anschliessend mit 1.5 µl Matrixlösung überschichten

7 Messung mit Bruker Daltonics MALDI TOF Gerät

Nachweisgrenze mit optimiertem Protokoll beträgt ca. 10⁵ KBE/ml; entspricht 10³ Mykobakterien auf MALDI Platte

Von Februar 2010 bis Mai 2011 wurden 124 klinische Isolate untersucht: 87 *M. tuberculosis*-Komplex, 17 *M. avium*, 7 *M. intracellulare*, 7 *M. chelonae*, 2 *M. abscessus*, 2 *M. kansasii*, 1 *M. fortuitum*, 1 *M. massiliense*. In allen Fällen wurde eine Uebereinstimmung mit den molekularen Identifikationssystemen gefunden.

Diskussion

- Spektren der Referenzstämme und der klinischen Isolate korrekt und spezifisch, 100% Uebereinstimmung mit molekularer Identifikation
- Biosicherheit: Hitzeinaktivierung sicher unter Vermeidung von Zentrifugationsschritten
- Zusammensetzung des Nährmediums hatte keinen Einfluss auf MALDI-TOF Resultate
- Einsatz von Tween-20 und physikalischer Aufschluss der Mykobakterien Zellwand mit Glaskugeln erlaubte eine Reduktion des Inokulums bis zu 10⁵/ml.
- Aufbau einer lokalen Datenbank von Mykobakterien (62 Spezies) und Vervollständigung der Bruker Datenbank
- Erfolgreiche Evaluation der MALDI TOF Methode für den Routineeinsatz

Bemerkungen

- MALDI TOF vermag die verschiedenen Spezies innerhalb des *M. tuberculosis*-Komplexes nicht zu unterscheiden
- Nahe verwandte *Mycobacterium spec.*, z.B. *M. abscessus* / *M. massiliense* oder *M. chimaera* / *M. intracellulare* sind ebenfalls nicht unterscheidbar (ähnlich wie bei 16S Sequenzierung). Saleeb PG et al. 2011. J Clin Microbiol 49:1790-1794.

10.7.2012/DG