

DIE ZUKUNFT DER INFEKTIONS-DIAGNOSTIK-KONTROLLE VON BAKTERIENKULTUREN DURCH MESSUNG VOLATILER MARKER AUS DEM HEADSPACE

WISSENSCHAFTLICHE KURZMITTEILUNG

**Gunther Becher, Roman Purkhart,
Rolf Graupner, Werner Schüler**

*Graupner medical solutions, Geyer, BecherConsult GmbH, Bernau,
IFU, Oberlichtenau, STEP Sensortechnik, Pockau, Germany*

ABSTRACT

Der kulturelle Nachweis eines bakteriellen Befalls ist nach wie vor die einzig beweisende Methode zur Infektionsdiagnostik. Andere Verfahren, wie PCR, können bei schon abgestorbenen Keimen oder nur geringem klinisch nicht relevantem Befall falsch positiv anzeigen und bedürfen oft der kulturellen Bestätigung. Speziell bei langsam wachsenden Keimen wie *Mycobacterium tuberculosis* und atypischen *Mycobacterien* (*Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP)) dauert eine Kultur 6 bis 8 Wochen zum sicheren Befund. Mit der Ionenbeweglichkeitsspektrometrie ist es möglich, flüchtige Produkte des durch Bakterien im Wirtsorganismus oder auf der Kultur ausgelösten Stoffwechsels sehr frühzeitig und sicher nachzuweisen. Am Beispiel einer MAP-Kultur wurde mit der Methode ein signifikanter Befall schon nach 3 Tagen nachgewiesen. Die Methode basiert auf der spektrometrischen Messung von volatilen Peaks und einer patentierten Auswertung zur Differenzierung der Stichproben nach dem Auftreten oder Fehlen von Peaks in den Messungen. Die tatsächliche chemische Identität der Peaks muss dazu nicht bekannt sein. Unbekannte Messungen konnten den vorher differenzierten Lernstichproben mit 100% iger Spezifität zugeordnet werden.

Die Methode ist auch geeignet, einen Keimnachweis aus Ausatemluft, Abstrichen aus Rachen und Nase, Sputum oder anderen biologischen Proben zu sichern (Becher; Buszewski). Andere schnellwachsende Keime wie *E. coli*, *Staphylococcus aureus* u. a. sind auch detektierbar (Steppert 2014). Für noch nicht validierte Erkennung von einem Keim ist eine spezifische Methode mit der selbstlernenden Software jederzeit beim Anwender selbst erstellbar.

EINFÜHRUNG

Die traditionellen Methoden der Infektionsdiagnostik, Bakterienkultur oder PCR, sind langwierig oder teuer. Zum anderen ist gerade die PCR nicht beweisend für eine floride Infektion und bedarf vielfach der kulturellen Bestätigung. Deshalb wird nach neuen, preiswerten und schnellen Verfahren zur Infektionsdiagnostik gesucht.

Es ist allgemein bekannt, dass Bakterien volatile Marker freisetzen (Lieuwe; Crespo; McNerney). Das wird teilweise schon genutzt, um in biotechnologischen Anwendungen Wachstum und Reinheit von Kulturen zu prüfen. Die dazu nutzbaren diagnostischen Methoden wie Gaschromatographie oder MALDI-TOF MS sind allerdings ebenfalls sehr aufwändig und teuer. Die Ionenbeweglichkeitsspektrometrie (IMS), die kombiniert werden kann mit unterschiedlichen Detektoren oder Vorsäulen zur chromatographischen Trennung, ist eine im Vergleich dazu preiswerte und gleich empfindliche Methode. Es könnten sich hier also neue Möglichkeiten einer Infektionsdiagnostik ergeben.

Auch nur für die Ionenbeweglichkeitsspektrometrie (IMS) sind Geräte verfügbar, die den großen Vorteil haben, transportabel zu sein. Sie sind ggf. auch mit Akkubetrieb ausgestattet und ihr Hauptcharakteristikum besteht darin, auch unbehandelte Proben ohne jede Präanalytik vermessen können. Der Einsatz einer geschlossenen Strahlenquelle zur Ionisation der Probe ist sicher und bedarf keiner Zulassung gemäß Strahlenschutzverordnung. Das Gerät selbst ist wartungsarm und benötigt im Betrieb keine Zusatzstoffe oder Chemikalien. Das ergibt erstmals auch die Möglichkeit für eine Point-of-Care-Anwendung.

Die prinzipielle Erkennbarkeit von spezifischen VOC in Ausatemluft oder Headspace von Bakterienkulturen ist mittels GC-MS, oder auch PTR-MS (Protonen-Transfer-Reaktion-MS) nachgewiesen worden. In verschiedenen Studien wurden Marker gefunden bei Tuberkulose (Phillips 2010) oder auch anderen Erkrankungen, wie Brustkrebs, M. Crohn, COPD u.a. (Crespo 2012, Filipiak 2012, Phillips 2010, Buszewski 2007, Lieuwe 2013).

Diese Befunde wurden in der vorliegenden Studie mittels GC-IMS überprüft.

METHODEN

Es wurden Kulturen von zwei verschiedenen Stämmen des *Mycobacterium avium paratuberculosis* (MAP: DSM 44133 [DSMZ, Braunschweig] und JII-1961 [Isolat vom Rind]) angelegt und gemäß den

Vorschriften über 6 Wochen verfolgt. Messpunkte für Volatile Marker (VOC) aus der Headspace der Kulturröhrchen waren 1, 2, 3, 4 und 6 Wochen nach Start der Kultur. Als Nährboden wurde Herrold's Egg Yolk Medium ausgewählt. Als Kontrollen dienten unbeeimpfter Nährboden, Nährboden mit Aufgabe von Sterilfiltrat und Aufgabe von hitzeinaktivierter Kultur. Es wurden zum Überprüfen störender Effekte des Probenhandling Proben mitgeführt, die nur einmal geöffnet wurden und Proben mit Messung zu jedem Messpunkt.

Die Messungen erfolgten mit einer differenziellen IMS (SIONEX™) mit vorgeschalteter Multikapillarsäule (MCC) bzw. einem Muster einer GC-IMS der Autoren. Die Probe wurde über einen Teflonschlauch aus dem Probenröhrchen abgesaugt, während der Druckausgleich über einen Filter erfolgte. Bei der Methode erfolgt nach der Massentrennung in der MCC eine Ionisation der Probe und Detektion der gebildeten Ionen in einem gepulsten elektrischen Feld. Die Differenzierung der Peaks und Zusammenfassung zu Clustern erfolgte in einem eigenen Programm beruhend auf Support-Vector-Machine Errechnung der Sign. mit U-Test. Bei dieser Methode ist es nicht notwendig, die gefundenen Peaks chemisch zu identifizieren (Purkhart).

ERGEBNISSE:

Es zeigte sich, dass je nach Geräteeinstellung bezüglich Empfindlichkeit und Rauschverhalten bis zu 182 unterschiedliche Cluster in den Messungen erkannt wurden.

In der folgenden Abb. 1 ist ein Screenshot der Auswertegrafik dargestellt. Sie zeigt exemplarisch Cluster 46 (rot markiert) von 182 dargestellt, mit welchem in Woche 1 eine Differenzierung zwischen Keimwachstum und Nährboden erfolgen konnte. Nach einer Woche sind beim langsam wachsenden MAP signifikante Unterschiede zum unbewachsenen Nährboden ersichtlich.

Andere Cluster gestatten eine Trennung der beiden MAP-Stämme voneinander. Die Hinzunahme weiterer Cluster in die Auswertung kann die Trennschärfe weiter erhöhen.

Weiter konnte gezeigt werden, dass ebenfalls aus Proben der Ausatemluft und Geruchsproben vom Kot erkrankter eine sichere Trennung zwischen gesund und krank möglich war. Man muss also nicht warten, bis eine Bakterienkultur angewachsen ist und die mikrobiologische Diskriminierung ein eindeutiges Diagnoseergebnis erlaubt.

Die Methode und die patentierte Auswertesoftware beruht darauf, dass in den gasförmigen Proben

eine Vielzahl spezifischer Peaks identifiziert werden können. Die Software ist selbstlernend und die Sicherheit der Aussage steigt mit der Anzahl der gemessenen Proben. Auch wenn die chemische Identität dieser Marker nicht bekannt ist, können im Vergleich zwischen Kontrollen und den erkrankten signifikante Unterschiede gefunden werden, die dann bei weiteren Messungen an unbekanntem Proben eine Zuordnung der Probe bzw. des Patienten zu den bekannten Kontrollgruppen (Lernstichprobe) gestatten. Die Trennschärfe krank-gesund wächst mit der Anzahl der positiven und negativen Befundungen. Mit Blick auf neue pathogene oder opportunistische Keime ist die Methode in der Konsequenz also geeignet, bakteriellen Befall auch in den Fällen zu detektieren, wenn das mikrobielle Taxon vorab nicht bekannt war.

Hervorzuheben ist, dass bei entsprechender Vorbereitung der Probennahme kein weiteres Handling der geschlossenen Kulturen oder von Nativproben notwendig ist. Das Ansaugen der Probenluft kann über geeignete Bakterienfilter erfolgen. Ein Infektionsgefährdung für das Personal kann somit ausgeschlossen werden.

Bei Vorliegen entsprechender Lernstichproben und Trainingsdatensätzen kann die Methode hochempfindlich und hochspezifisch sein. Weiterhin kann laborintern durch Mitführung eigener Kontrollproben die diagnostische Aussage überprüft werden und das Qualitätsmanagement sichergestellt.

In unseren Proben ergab sich eine Sensitivität zum Nachweis des MAP in der Kultur in der ersten Woche von 100%, obwohl die Kulturen üblicherweise erst nach 6 Wochen abgelesen werden sollen.

FAZIT

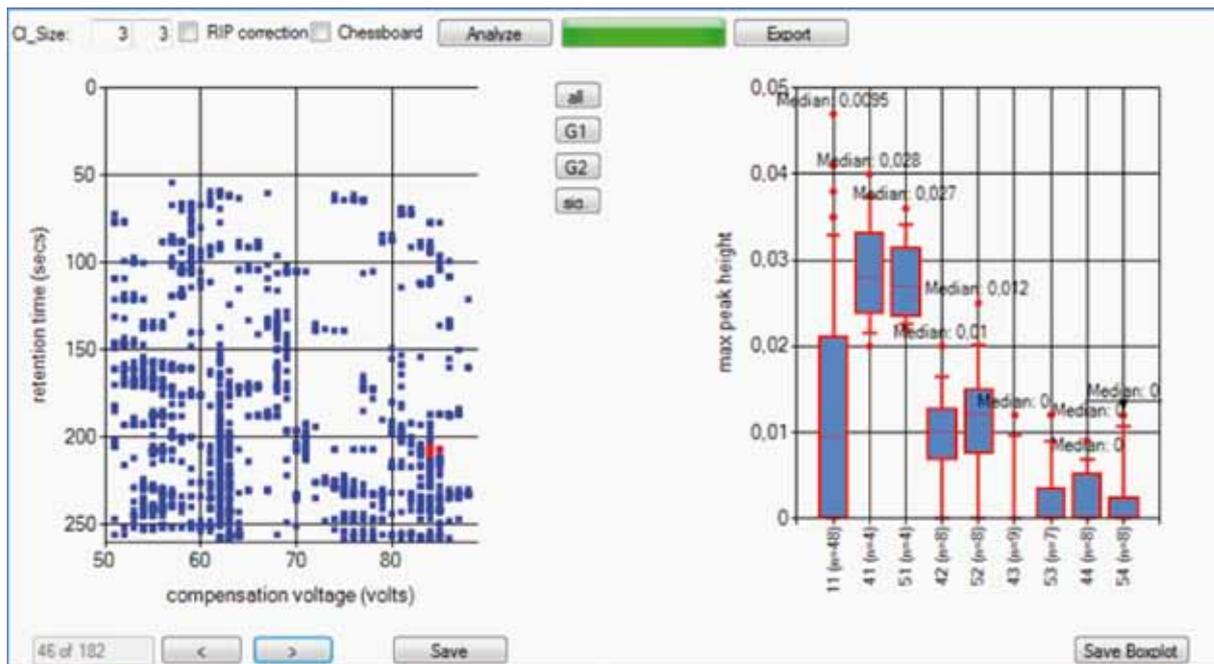
Die Methode ist geeignet, im bakteriologischen Labor einen Schnelltest für die Erkennung von Keimwachstum einzuführen, auch für andere Keime. Weiterhin besteht die Möglichkeit, auch in frischen Nativproben oder Ausatemluft eine Infektion zu erkennen.

Das sind beste Voraussetzungen für den Einsatz in der Point-of-Care Diagnostik.

LITERATURVERZEICHNIS

- BECHER, G.: Atemkondensat-Diagnostik (Exhalat-Diagnostik); In: „Spezielle Lungenfunktionsprüfung“, Hrsg.: Prof. K.-H. Rühle, München: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle, 2013, S. 105–124.
- BUSZEWSKI, B.; KESY, M.; LIGOR, T. AND AMANN, A.: Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. Biomed. Chromatogr. 21: 553–566 (2007)

Abb. 1:

**Legende:**

11: Kontrollen; 4 DSM 44133; 5: J11-1961; 41 und 51 / 42 und 52 / 43 und 53 / 44 und 54: jeweils Woche 1, 2, 3 oder 4.

CRESPO, E., ET AL., Potential biomarkers for identification of mycobacterial cultures by proton transfer reaction mass spectrometry analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012. 26(6): p. 679–85.

FILIPIAK, W., SPONRING, A., BAUR, MA., FILIPIAK, A., AGER, C., WIESENHOFER, H., NAGL, M., TROPPEMAYER, J., AMANN, A.: Molecular analysis of volatile metabolites released specifically by staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa. *BMC Microbiology* 2012, 12:113

LIEUWE D. J. BOS, PETER J. STERK, MARCUS J. SCHULTZ: Volatile Metabolites of Pathogens: A Systematic Review. *PLOS Pathogens*, 1 May 2013; Volume 9; Issue 5; e1003311: www.plospathogens.org

MCNERNEY, R., ET AL., Production of volatile organic compounds by mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 2012. 328(2): p. 150–6.

PHILLIPS, M., ET AL., Breath biomarkers of active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2010. 90(2): p. 145–51.

PURKHART, R., KÖHLER, H., LIEBLER-TENORIO, E., MEYER, M., BECHER, G., KIKOWATZ, A., REINHOLD, P., 2011. Chronic intestinal Mycobacteria infection: discrimination via VOC analysis in exhaled breath and headspace of feces using differential ion mobility spectrometry. *J. Breath Res.* 5, 027103 (10pp).

STEPPERT, ISABEL: Diskriminierung verschiedener Bakterienspezies mittels Ionenmobilitätsspektrometrie. Bachelorarbeit Hochschule Coburg 2013.