



Foto: Iuchschen iStock

INTERVIEW: MOLEKULARE DIAGNOSTIK

Binnen Stunden den Erreger finden

Zum Nachweis von Infektionserregern werden in der klinischen Mikrobiologie zunehmend molekulare Diagnoseverfahren eingesetzt, mit denen Pathogene zeitnah identifiziert und Resistenzmechanismen aufgedeckt werden können.

Um Infektionsketten zu durchbrechen, ist eine zeitnahe und adäquate Diagnostik zwingender denn je“, sagte Prof. Dr. med. Uwe Groß anlässlich der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), die in Göttingen stattfand. Der Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Göttingen erläuterte den Wandel in der Diagnostik – weg von der klassischen Erregeranzucht hin zum genomischen und proteomischen Profiling.

Mit molekularen Verfahren lassen sich nicht nur Nukleinsäuren nachweisen, sondern auch andere Erregerbestandteile wie zum Beispiel Proteine. Groß geht davon aus, dass diese Methoden die bisherige Diagnostik vorerst nicht vollständig ablösen. Sie sind

jedoch je nach Fragestellung eine sinnvolle Ergänzung. Ein grundlegender Vorteil molekularer Methoden ist, dass mit ihnen auch nicht kultivierbare Erreger nachgewiesen werden können. Das gilt zwar prinzipiell auch für die simple und an Schnelligkeit kaum zu übertreffende Mikroskopie nach Gram-Färbung; allerdings ist damit nur eine sehr grobe Differenzierung von Bakterien möglich.

Welche Tendenzen bestimmen die diagnostische Mikrobiologie?

Groß: Mit Metagenom- und Transkriptomanalysen lässt sich die Diagnostik weiter verfeinern. Auf diese Weise kann die Gesamtheit des Mikrobioms und –

bei Bedarf – auch die immunologische Reaktion des Patienten abgebildet werden. Eine derartig individualisierte Infektionsdiagnostik ist zwar noch Zukunftsmusik, wird aber voraussichtlich innerhalb der nächsten 10 Jahre die Entscheidung hinsichtlich antiinfektöser Therapieentscheidungen maßgeblich beeinflussen.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist mittlerweile überall verfügbar und wird zunehmend durch sogenannte Multiplex-Ansätze ergänzt, wodurch der simultane Nachweis verschiedener Erreger aus einem Patientenmaterial möglich wird. Wichtiger Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass durch die Verwendung von maßgeschneiderten Primern nur nach bestimmten Erregern gesucht werden kann.

Sogenannte universelle PCR-Methoden ermöglichen durch Amplifikation der bakteriellen 16S-rDNA mit anschließender DNA-Sequenzierung zwar den ungezielten Bakteriennachweis, sie können in der Regel aber nur bei primär sterilen Körpermaterialien eingesetzt werden. Die Analyse basiert auf dem 16S-rRNA-Gen, das in allen Bakterien vorkommt und neben konservierten auch variable Sequenzen exprimiert, über die sich die Bakterien identifizieren lassen.

Ganzgenomsequenzierungen werden aktuell vor allem für die Aufklärung von Infektionsketten – also im Rahmen krankenhaushygienischer Untersuchungen – benötigt. Der Preisverfall der notwendigen Sequenzierungsplattformen lässt aber erwarten, dass diese Methode zunehmend Eingang in die reguläre mikrobiologische Diagnostik finden wird.

Welche spezifischen Entwicklungen gibt es bei PCR, FISH und Massenspektrometrie?

Groß: Bei der PCR sehe ich als derzeit wichtigste Neuerung die Multiplex-PCR. Es gibt inzwischen kommerzielle Systeme zum Beispiel für gastrointestinale oder respiratorische Infektionen. Dabei werden nicht nur die typischen Bakterien, sondern auch Viren, Pilze und Parasiten nachgewiesen. Darüber hinaus ist bei der PCR vielfach eine Verkürzung der diagnostischen Laufzeit auf nur noch wenige Minuten möglich.

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) basiert auf dem mikroskopischen Nachweis fluoreszenzmarkierter Nukleinsäuren. Gerade bei nichtkultivierbaren Erregern kann eine FISH sinnvoll sein, kommt aber oft in ihrer Sensitivität nicht an die PCR heran.

Mit der Entwicklung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MS) für den direkten Nachweis von Bakterien und Pilzen haben wir vor ungefähr 10 Jahren eine Revolution der mikrobiologischen Diagnostik erlebt. Damit gelingt die Speziesidentifikation aus kulturell angezüchteten Bakterien heute so schnell, dass meistens ein ganzer Tag in der Diagnostik eingespart werden kann. Und in einigen Fällen gelingt die Bakterienidentifikation sogar schon direkt aus dem Nativmaterial.

Die MALDI-TOF-MS wird mittlerweile auch für die Subtypisierung von Bakterien und Pilzen eingesetzt und ermöglicht deren phylogenetische Zuordnung. Sind definierte Antibiotikaresistenzen phylogenetisch begründet, erlaubt diese Methode konsequenterweise auch direkt aus den gemessenen Massenprofilen eine Resistenzbestimmung.

Was bringt das Next Generation Sequencing (NGS) für die Diagnostik?

Groß: Der Nachweis von Resistenz- und Virulenzgenen durch NGS ist heute schon vielfach möglich. Wenn Resistenz und Virulenz jedoch durch posttranslationale beziehungsweise epigenetische Proteinmodifikationen bedingt sind, stößt das Verfahren an seine Grenze. Nichtsdestotrotz rechne ich damit, dass NGS die Diagnostik voranbringen wird, weil durch entsprechende Resistenz- und Virulenzinformationen letztendlich auch Antibiotika zielgerichteter verordnet werden können.

Der Einsatz von NGS in der Routinediagnostik wird mangels bioinformatischer Expertise in vielen Laboren noch behindert. Sobald entsprechende bioinformatische Algorithmen die Auswertung der Sequenzinformationen signifikant erleichtern und womöglich sogar automatisieren, werden viele Labortüren für diese Technologie offenstehen.

Nicht zuletzt erwarte ich einen nicht zu unterschätzenden Vorteil molekularer Verfahren darin, dass sie auch für den Nachweis bisher nicht kultivierbarer Erreger eingesetzt werden können.

Kann die Sequenzierung mikrobieller Genome dabei helfen, prognostische Biomarker zu identifizieren?

Groß: Ja, das ist bereits für einige Beispiele gezeigt worden. So konnte durch Bakteriensequenzierung in Verbindung mit Metadaten infizierter Patienten gezeigt werden, dass die Mortalität bei *Pseudomonas-aeruginosa*-Sepsis höher ist, wenn die *Pseudomonas*-Bakterien das Gen für eine DE-AD-box-Helikase aufweisen. Es ist zu erwarten, dass neben Erregergenen weitere prognostische Biomarker identifiziert werden – zum Beispiel Expressionsmuster von Patientengenomen im Sinne von Meta-Transkriptomics, die eine individualisierte Infektionsdiagnostik ermöglichen. So könnte es bald möglich sein, anhand ausgewählter wirtsspezifischer Transkripte die 30-Tage-Letalität bei definierten Infektionen vorauszusagen.

Wie weit ist die Automatisierung vorangeschritten, können da nur noch Großlabore mithalten?

Groß: In der medizinischen Mikrobiologie ist eine Automatisierung mikroskopischer, kultureller und massenspektrometrischer Verfahren bereits möglich. Vielfach steht jedoch noch das „nice to have“ als Kaufargument weit oben. Ich wage aber vorauszusagen,

**Prof. Dr. med.
Uwe Groß,**
Direktor des
Instituts für Medi-
zinerische Mikrobi-
ologie an der Uni-
versitätsmedizin
Göttingen



Foto: Pfluet

gen, dass die Automatisierung für viele mikrobiologische Labore schon bald ein „must have“ wird.

Der Grund ist banal: Nicht nur bei den Pflegekräften, sondern auch beim Laborpersonal erleben wir in Deutschland einen verschärften Fachkräftemangel: Mehr als die Hälfte der universitären mikrobiologischen Institute klagen über nicht besetzbare MTLA-Stellen. Doch das ist nur ein Argument für eine Automatisierung.

Darüber hinaus ist die Automatisierung sinnvoll, weil die Patientenproben standardisiert und unabhängig von Peak- und Regelarbeitszeiten verarbeitet werden können. Es ist davon auszugehen, dass die ohnehin durch MALDI-TOF-MS bereits verkürzte Zeit bis zum Ergebnis (Time-to-result) durch die Automatisierung noch weiter reduziert wird.

Wie sollte die Automatisierung erfolgen?

Groß: Der Aufbau totaler Laborautomatisierungssysteme (TLA) für die mikrobiologische Diagnostik kann modular erfolgen und zum Beispiel mit der Anschaffung eines Ausstreichautomaten beginnen. Mit ihm lassen sich im Vergleich zum manuellen Ausstreichen mehr Einzelkolonien gewinnen, die dann sofort der Massenspektrometrie zugeführt werden können.

Eine Automatisierung ist bereits ab 250 Proben/Tag sinnvoll, bei einer Vollautomatisierung beträgt die Durchsatzkapazität für eine TLA-Plattform sogar bis zu 1 500 Proben/Tag, die sich bei Einsatz mehrerer Plattformen entsprechend erweitern lässt.

In Deutschland finden sich derzeit TLA-Plattformen in einigen Großlaboren und in einigen wenigen Universitätsinstituten. Wie eine eigene Erhebung gezeigt hat, streben aber die meisten Institute eine Automatisierung innerhalb der nächsten Jahre an.

Spielen die klassischen kulturbasierten Verfahren überhaupt noch eine Rolle?

Groß: Natürlich, denn bei allen Genomdaten können Virulenzfaktoren, vor allem aber auch Antibioti-

karesistenzen unter Umständen auf Mechanismen beruhen, die durch Genomsequenzierungen nicht erfasst werden, wie zum Beispiel posttranslationale beziehungsweise epigenetische Proteinmodifikationen. In diesen Fällen sind wir weiterhin auf die phänotypische Resistenztestung angewiesen.

Aber ein anderer Aspekt ist ein noch stärkeres Argument für die Beibehaltung kultureller Verfahren: Antibiotogramme werden oft (semi)quantitativ erstellt, ein rein qualitativ bestimmtes „resistent“ versus „sensibel“ ist nicht immer möglich. Das spiegelt sich auch bei der neuen EUCAST-Einteilung „intermediär“ wider, die angibt, dass für die adäquate Therapie des Patienten eine Dosiserhöhung der entsprechenden Antibiotika notwendig ist.

Wo sehen Sie die medizinische Mikrobiologie in 10 Jahren?

Groß: Früher spielte sich die medizinische Mikrobiologie nahezu ausschließlich im Labor ab. Dann führten die ersten Institute Infektionsvisiten ein. Diese sehe ich als Vorläufer der heutigen standardisierten Prozesse, die als Diagnostic Stewardship und übergreifend als Antibiotic Stewardship bezeichnet werden.

Die Beratungs- beziehungsweise Konsiliartätigkeit des ärztlich ausgebildeten medizinischen Mikrobiologen ist schon heute eine Aufgabe, die ihn zum Partner auf Augenhöhe für die Kollegen der direkten Patientenversorgung macht. Die hier nur ansatzweise erwähnten Innovationen der mikrobiologischen Diagnostik werden neue diagnostische Algorithmen, aber vor allem auch eine Flut von Daten erzeugen, deren Interpretation die Aufgabe des Mikrobiologen sein wird. Das schließt auch eine individualisierte und zielführende Stufendiagnostik mit ein, um bei vermehrten diagnostischen Möglichkeiten einen verantwortlichen Umgang mit endlichen Ressourcen zu garantieren.

Eine schnelle Diagnostik und zeitnahe Ergebnismitteilung durch noch bessere digitale Verfahren werden selbstverständlich sein, um die Behandlung des Patienten ohne große Zeitverzögerung zu gewährleisten. In Zeiten alarmierender Resistenzentwicklungen wird hierbei die kompetente infektiologische Beratung durch den medizinischen Mikrobiologen zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Der zu erwartende vermehrte Einsatz von Point-of-Care-Testing (POCT) im klinischen und vor allem auch im privaten Bereich wird eine weitere Herausforderung sein, die durch den medizinischen Mikrobiologen patientenorientiert begleitet werden muss und kann. ■

DOI: 10.3238/PersInfek.2019.07.22.08

Das Interview führte Dr. Beate Grübler