



Bild. Übersicht der zwei erarbeiteten Analyseverfahren zur Identifizierung von Bakterien mit der MALDI-TOF-MS. Grafik: Autorin

Einsatz der MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur Identifizierung von Bakterien im Arbeitsschutz

1 Einleitung

Die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation gekoppelt mit einem Flugzeitmassenanalysator (MALDI-TOF) hat sich in den letzten Jahrzehnten als Methode zur schnellen und präzisen Identifizierung von Bakterien etabliert. Die Entwicklung begann 1985, als Michael Karas et al. die Grundlagen für die MALDI schufen [1, 2]. In den folgenden Jahren fand die Methode vor allem Eingang in die medizinische Mikrobiologie, die Lebensmittelüberwachung und die Umweltanalytik [3]. Die Vorteile der Methode liegen, neben der schnellen Identifizierung und hohen Genauigkeit, bei ihrem breiten Anwendungsspektrum und dem geringen Aufwand bei der Probenvorbereitung. Zudem kann sie als kultivierungsunabhängige Methode angewendet werden [4, 5].

Die Anwendbarkeit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) zur Identifizierung von Mikroorganismen für Fragestellungen des Arbeitsschutzes zeigte Anne Mette Madsen

vom National Research Center for the Working Environment in Kopenhagen [6, 7]. Die Erprobung der Methode am Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA) bestätigte die hohe Sensitivität und Spezifität des Identifizierungsverfahrens auch bei Arbeitsplatzmessungen der Unfallversicherungsträger. MALDI-TOF-MS erlaubt eine differenzierte Bewertung biologischer Gefährdungen durch die zuverlässige Erkennung potenziell gesundheitsgefährdender Bakterien. Sie bildet damit eine fundierte Grundlage für zielgerichtete Schutzmaßnahmen am Arbeitsplatz und der Expositionsbewertung im Rahmen der Ermittlung bei Berufskrankheit (BK).

2 Etablierung der MALDI-TOF-MS im mikrobiologischen Labor des IFA

Seit 2020 besitzt das IFA ein MALDI-TOF-Massenspektrometer in seinem mikrobiologischen Labor. Mittlerweile konnte die Analy-

senmethode als Standardverfahren zur Bakterienanalytik etabliert werden. Hierfür wurden Proben von unterschiedlichen Arbeitsplätzen – unter anderem Luft- und Materialproben aus Betriebsarten wie der Humananatomie, der Tapeten- und Kartonagenfertigung, der Metallverarbeitung, Autowaschanlagen und Fotostudios – qualitativ auf Bakterien mittels MALDI-TOF-MS untersucht. Ein Teil der Proben wurde zusätzlich mit molekularbiologischen und biochemischen Methoden untersucht, um die MALDI-Ergebnisse zu verifizieren. Mit diesem Vorgehen konnten zwei spezifische Analyseverfahren ausgearbeitet werden: MALDI-preliminary screening (MALDI-PS) und insbesondere für Untersuchungen im Rahmen von Berufskrankheitsermittlungsverfahren die MALDI-extended procedure (MALDI-ExtPro). Beide Verfahren basieren auf der massenspektrometrischen Analyse mikrobieller Proteine, unterscheiden sich jedoch erheblich in ihrer methodischen Ausgestaltung und ihrem jeweiligen Anwendungsbereich (**Bild**).

3 MALDI-ExtPro und MALDI-PS

Das MALDI-ExtPro-Verfahren dient sowohl der Beweissicherung als auch dem Aufbau einer validierten Referenzdatenbank. Es liefert valide und reproduzierbare Ergebnisse, insbesondere beim Nachweis medizinisch relevanter Infektionserreger. Um den Anforderungen an die Probenreinheit gerecht zu werden, erfolgt die Analyse im MALDI-ExtPro-Verfahren ausschließlich mit möglichst reinen Bakterienkolonien. Hierzu werden die Kolonien maximal zehnmal ausgestrichen und ihre Reinheit anschließend visuell, mikroskopisch sowie hinsichtlich ihres Gram-Färbeverhaltens beurteilt. Erst nach Bestätigung einer als rein eingestuften Kultur erfolgt die eigentliche MALDI-Analyse. Es hat sich gezeigt, dass das sogenannte Direkttransferverfahren bei den meisten, aus Arbeitsplatzproben isolierten Bakterien zu weniger aussagekräftigen Massenspektren und damit zu eingeschränkter Identifizierbarkeit führt. Daher wird in der Regel mit dem erweiterten Direkttransferverfahren oder – meist bei grampositiven Bakterien – mit dem Extraktionsverfahren gearbeitet. Weitere Schritte zur Probenaufarbeitung, wie sie beispielsweise für die Identifizierung von Actinomyceten erforderlich sein könnten, werden am IFA derzeit hinsichtlich ihrer Praxistauglichkeit geprüft. Die Identifikation der Organismen erfolgt differenziert auf Gattungs- und Artebene und wird anhand des erzielten Score-Werts bewertet. Er quantifiziert die Ähnlichkeit zwischen dem gemessenen Spektrum und den Datenbankeinträgen und liefert somit eine objektive Einschätzung zur Sicherheit der Zuordnung. Ein Score $\geq 2,0$ ermöglicht eine sichere Identifikation auf Artebene, ein Score zwischen 1,7 und 1,99 erlaubt eine Zuordnung auf Gattungsebene. Liegt der Score unter 1,7, ist keine zuverlässige Identifikation möglich.

Das MALDI-PS ist auf eine schnellere Bearbeitung und einen reduzierten Analyseaufwand ausgelegt. Die Identifikation von Mikroorganismen erfolgt auf Basis der Übereinstimmung zwischen dem experimentell erfassten Massenspektrum einer Probe und den entsprechenden Referenzspektren in der Datenbank. Entsprechend der „Ori-Methode“ werden die Kolonien direkt von der Ursprungsplatte entnommen und ohne vorherige Reinkulturerstellung analysiert. Ab einem Score ≥ 2 wird das Ergebnis als hinreichend zuverlässig eingestuft und für die weitere Bewertung im Arbeitsschutz herangezogen. Erzielt eine Kolonie einen Score unterhalb dieses Schwellenwerts, erfolgt die weitere Bearbeitung nach dem MALDI-ExtPro-Verfahren, bei dem dann Reinkulturen gezielt hergestellt und erneut analysiert werden. Bakterien, die

mit der MALDI-PS-Analyse nicht identifiziert werden können, im BK-Verfahren aber für die Beweissicherung von Bedeutung sind, werden in einer Stammsammlung konserviert. Darüber hinaus werden Isolate mit einem Score $< 1,7$ zur Erweiterung der IFA-eigenen MALDI-Datenbank herangezogen (siehe IFA-Projekt 2109).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Verfahren gezielt auf ihre jeweiligen Einsatzzwecke abgestimmt sind: MALDI-ExtPro verfolgt höchstmögliche methodische Präzision, während MALDI-PS durch Schnelligkeit und gute Anwendbarkeit bei hohen Probenzahlen im betrieblichen Alltag punktet.

4 Diskussionspunkte zur Anwendung der MALDI-TOF-MS-Verfahren am IFA

MALDI-ExtPro und MALDI-PS sind methodisch klar voneinander abgegrenzt und jeweils gezielt auf die Anforderungen von Beweissicherung beziehungsweise Prävention zugeschnitten. In der praktischen Anwendung ergeben sich jedoch verschiedene Diskussionspunkte. So ist die strikte Anforderung an Reinkulturen zwar aus Gründen der rechtlichen Belastbarkeit nachvollziehbar, stellt jedoch bei komplexen Umwelt- oder Mischproben eine große Herausforderung dar. Demgegenüber bietet die Ori-Methode eine ressourcenschonende Alternative. Es stellt sich aber die Frage, ob ein Score-Wert ≥ 2 eine verlässliche Identifikation und Gefährdungsbewertung gewährleistet. Eine fortlaufende Evaluierung ihrer praktischen Umsetzung bleibt notwendig, um Qualität, Effizienz und Aussagekraft im Arbeitsschutz dauerhaft sicherzustellen.

5 Ausblick

Die weitere Arbeit konzentriert sich auf die Validierung einzelner Verfahrensschritte der Analytik mittels MALDI-TOF-MS. Im Fokus steht dabei die Bewertung der Aussagekraft der Ori-Methode im MALDI-PS-Verfahren. Hierzu werden Kolonien direkt von der Ursprungsplatte sowohl mittels MALDI-TOF-MS als auch molekularbiologisch untersucht und die Übereinstimmung der Ergebnisse geprüft. Zudem wird analysiert, wie sich eine Reduktion der Reinkulturschritte auf die Ergebnisqualität auswirkt. Das Ziel dieser Untersuchungen ist es, die derzeit bis zu rund 28-tägige Bearbeitungsdauer im ExtPro-Verfahren schrittweise zu verkürzen. Zudem wird die Einführung quantitativer Auswertungen mittels Poisson-Verteilung erprobt, um – analog zur VDI-Richtlinie 3492 – belastbare Konzentrationsangaben zu den identifizierten Mikroorganismen zu ermöglichen. Die hohe Zahl analysierbarer Kolonien im MALDI-Verfahren bietet hierfür eine solide Grundlage.

Für die Weiterentwicklung der MALDI-TOF-MS-Analytik am IFA soll die Anwendung auf weitere mikrobiologische Zielgruppen wie Actinomyceten, Hefen und Schimmelpilze untersucht werden. Hierfür sollen bestehende Protokolle validiert und bei Bedarf angepasst werden. Darüber hinaus soll ein semiquantitatives, kultivierungsunabhängiges Bewertungsverfahren für Kühlschmierstoffe (KSS) entwickelt werden. KSS-Proben aus arbeitsmedizinisch auffälligen Fällen sollen per MALDI-TOF-MS analysiert und mit unauffälligen Proben verglichen werden. Ziel ist es, reproduzierbare Unterschiede im mikrobiellen Fingerprint zu identifizieren, die eine schnelle Einschätzung des mikrobiologischen Risikoprofils ermöglichen. Langfristig soll daraus ein Früherkennungstool für auffällige KSS-Proben entstehen.

6 Fazit

Das neue MALDI-Analyseverfahren am IFA ermöglicht es, mikrobiologische Belastungen am Arbeitsplatz schneller, präziser und praxisnäher bewerten zu können. Die geplante quantitative Auswertung mittels Poisson-Verteilung wird eine verbesserte Konzentrationsabschätzungen ermöglichen. Besonders vielversprechend ist die Entwicklung eines semiquantitativen Verfahrens für KSS, das auf charakteristischen mikrobiellen Fingerprints basiert und als kultivierungsunabhängiges Frühwarnsystem dienen könnte. Insgesamt stärken diese Ansätze die präventive Gefährdungsbeurteilung im betrieblichen Gesundheitsschutz, die arbeitsmedizinische Diagnostik sowie die Expositionsbeurteilung für Biostoffe.

DANKSAGUNG

Besonderer Dank gilt M. Eryilmaz-Hessler, C. Fink, M. Schumacher und D. Range, deren engagierter Einsatz maßgeblich zum erfolgreichen Aufbau und zur Etablierung der MALDI-Analyseverfahren beigetragen hat. Ohne ihre Arbeit wäre der erreichte Fortschritt in diesem Bereich nicht möglich gewesen.

LITERATUR

- [1] Karas, M., D. Bachmann, F. Hillenkamp: Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical chemistry*, 1985. 57(14): p. 2935-2939.
- [2] Tanaka, K. et al.: Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. in *Proceedings of the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry*. 1987.
- [3] Singhal, N. et al.: MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*, 2015. 6: p. 791.
- [4] Druckenmüller, K. et al.: Development of a methodological approach for the characterization of bioaerosols in exhaust air from pig fattening farms with MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Hyg Environ Health*, 2017. 220(6): p. 974-983.
- [5] Wieser, A. et al.: MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012. 93(3): p. 965-974.
- [6] Madsen, A.M. et al.: A cohort study of cucumber greenhouse workers' exposure to microorganisms as measured using NGS and MALDI-TOF MS and biomarkers of systemic inflammation. *Environ Res*, 2021. 192: p. 110325.
- [7] Madsen, A.M. et al.: Microbial diversity in bioaerosol samples causing ODS compared to reference bioaerosol samples as measured using Illumina sequencing and MALDI-TOF. *Environ Res*, 2015. 140: p. 255-67.

Katharina Druckenmüller,

Dr. rer. nat. Annette Kolk

Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), Sankt Augustin.