

FISHseq zur Diagnostik von kardiovaskulären Infektionen

Molekular-Mikroskopie ermöglicht als Brückentechnologie zwischen Molekularbiologie, Mikrobiologie und Pathologie eine deutlich schnellere und sensitivere Diagnostik für kritisch Kranke.

Prof. Dr. Annette Moter und Dr. Judith Kikhney, Institut für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, Biofilmzentrum, Charité – Universitätsmedizin Berlin, MoKi Analytics GmbH, Berlin



Prof. Dr. Annette Moter



Dr. Judith Kikhney

Kardiovaskuläre Infektionen wie die infektiöse Endokarditis, die Infektion von Herzklappen-Prothesen oder von Herz-Unterstützungssystemen, gehören zu den großen Herausforderungen der modernen Medizin. Immer mehr und immer ältere Patienten profitieren von den oft lebensrettenden medizinischen Implantaten. Damit steigt jedoch auch die Komplikationsrate durch Infektionen, welche mit einer äußerst hohen Letalität einhergeht. Eine schnelle Erregerdiagnostik ist bei dieser lebensbedrohlichen Infektion für die Wahl der Antibiotikatherapie und somit die Prognose des Patienten von größter Wichtigkeit.

Molekularbiologischer Erregerachweis

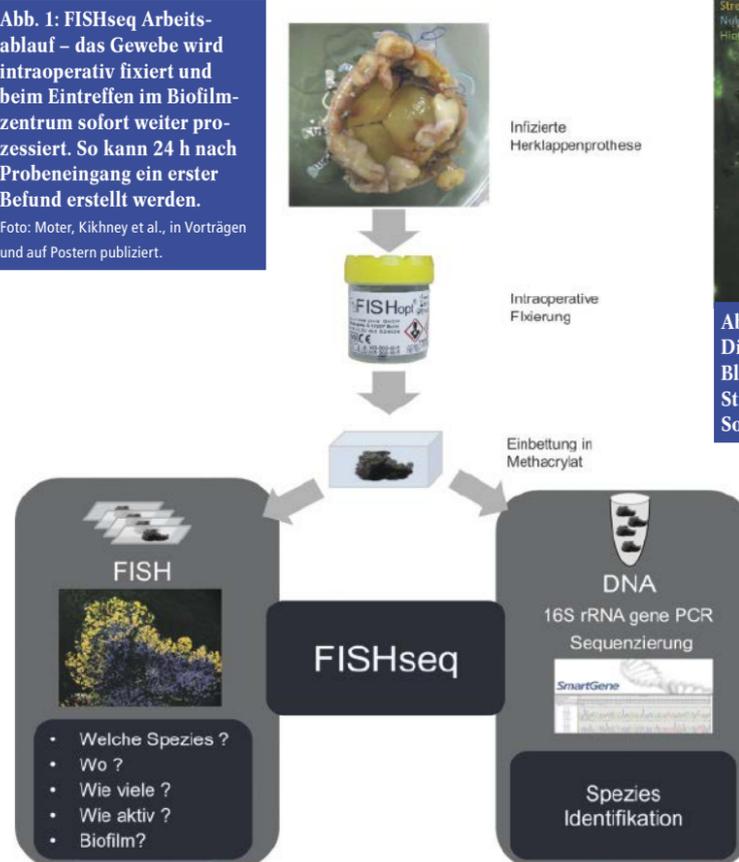
Der Goldstandard der mikrobiellen Diagnostik ist bisher die kulturelle Anzucht der Erreger in Blutkulturen oder aus Herzklappenmaterial. Allerdings ist der dringend notwendige Erregerachweis durch die konventionelle mikrobielle Diagnostik häufig nicht möglich, da die Mikroorganismen sich dem Nachweis entziehen. Gründe hierfür sind vorausgegangene Antibiotikatherapie, schwer kultivierbare Erreger oder die Organisation der Bakterien in Biofilmen. Biofilme sind mikrobielle Lebensgemeinschaften, welche in Kultur eingeschränkt nachweisbar und durch Antibiotikatherapie schwer zu eradizieren sind. Dies führt zu einer hohen Morbidität und Mortalität, denn in diesem Fall muss die Antibiotika-Therapie eine kalkulierte, langwierige Breitband-Antibiotikabehandlung (bis zu 6 Wochen) bleiben mit allen negativen Konsequenzen. Oft ist der chirurgische Ersatz die einzige Lösung. Während dieses Eingriffs wird erneut eine Herzklappenprothese eingesetzt, die sich jedoch auch wiederum infizieren

kann und daher durch eine Antibiotika-Therapie geschützt werden muss. Insbesondere künstliche Herzklappen besitzen ein hohes Risikopotential für eine schwer behandelbare Biofilm-Infektion. Daher bedarf es dringend innovativer Laborverfahren zum schnellen, präzisen Erregerachweis. Zunehmend mehr werden molekularbiologische Methoden eingesetzt wie Nukleinsäureamplifikation und Sequenzierung, entweder durch PCR mit Sanger-Sequenzierung oder durch Mikrobiom-Analysen (Next Generation Sequencing – NGS). Allerdings unterliegen diese Methoden bisher einer hohen Kontaminationsgefahr und können nicht zwischen lebenden und toten Bakterien unterscheiden. Auch eine räumliche Auflösung der Pathogene ist durch Sequenzierungsmethoden nicht möglich, sodass z.B. der Nachweis eines Biofilms nicht möglich ist.

FISHseq zur doppelten Nachweissicherheit

Dieses Problem hat das Biofilmzentrum der Charité durch die FISHseq gelöst – der Kombination von molekularer Bildgebung (Fluoreszenz in situ Hybridisierung = FISH) mit Sequenzierung des 16S rRNA-Gens. Bei der FISHseq handelt es sich um eine mikroskopische Methode, die die Vorteile von Molekularbiologie, Pathologie und Mikrobiologie miteinander vereint. Für die FISH werden die Patientenproben eingebettet und histologische Schnitte angefertigt (Abb. 1). Fluoreszenz-markierte Sonden binden Sequenz-spezifisch an die Ribosomen der Mikroorganismen, die somit kultur-unabhängig identifiziert werden. Durch die FISH werden die Mikroorganismen mikroskopisch im Gewebeszusammenhang der Probe räumlich sichtbar und gleichzeitig identifiziert. Mithilfe der FISH gelingt der Nachweis auch von schwer-kultivierbaren oder Biofilm-assoziierten Erregern, die mit den Routine-Methoden verpasst werden würden. Die FISH ermöglicht nicht nur

Abb. 1: FISHseq Arbeitsablauf – das Gewebe wird intraoperativ fixiert und beim Eintreffen im Biofilmzentrum sofort weiterprozessiert. So kann 24 h nach Probeneingang ein erster Befund erstellt werden. Foto: Moter, Kikhney et al., in Vorträgen und auf Postern publiziert.



die Identifikation der Pathogene in einer klinischen Probe, sondern auch Aussagen zu deren Lokalisation, Formation (Biofilm ja/nein?) sowie zum Aktivitätszustand der Mikroorganismen basierend auf deren Ribosomengehalt. Parallel zur FISH werden die konsekutiven Schnitte der DNA-Extraktion, pan-bakteriellen PCR und Sequenzierung zugeführt (Abb. 1). So wird die Erregeridentifikation durch eine zweite Methode bestätigt und auch die Fälle eindeutig geklärt, bei der Ribosomengehalt nicht für eine positive FISH ausreicht und die Mikroorganismen nur in der Nukleinsäure-Färbung durch DAPI sichtbar werden. So können auch Aussagen über den bisherigen Therapieerfolg getroffen werden.

Visualisierung ermöglicht tieferen „Einblick“

Die FISHseq kann überall dort in der klinischen Mikrobiologie eingesetzt werden, wo die üblichen mikrobiologischen Nachweisverfahren versagen, wie hier am Beispiel bei der Kultur-negativen infektiösen Endokarditis (Abb. 2). Mithilfe der FISHseq werden am Biofilmzentrum Herzklappengewebe und Prothesenmaterialien molekular-mikroskopisch untersucht – so können auch bisher nicht diagnostizierte Fälle aufgeklärt werden (Abb. 2). Dies kann bedeuten, dass ein Erreger eindeutig bestimmt und sein Biofilm-Status nachgewiesen werden kann, oder aber eine Herzklappenprobe als negativ diagnostiziert und somit eine infektiöse

Bakterien in der FISH können so völlig neue ‚Einblicke‘ in diese Infektionen (bezüglich Invasivität, Lokalisation am oder im Gewebe intrazellulär, Biofilm-Potential) gewonnen werden.

Sichere und sensitivere Erregerdiagnostik

In den bisherigen Arbeiten am Institut konnte gezeigt werden, dass die FISHseq (FISH in Kombination mit der 16S rRNA-Gensequenzierung) eine sichere und sensitivere Erregeridentifikation erlaubt als die Kultur oder konventionelle PCR-Diagnostik (Eichinger et al. 2019). Beim routinemäßigen Einsatz der FISHseq für die Diagnostik kardiovaskulärer Infekti-

Situation und Schweregrad der Endokarditis. Klarer Vorteil der FISHseq ist, dass durch die räumliche Auflösung der molekularen Bildgebung die Formation der Mikroorganismen bewertet werden kann (Biofilm-Staging: Biofilm ja/nein). Zudem ist über die FISH-Signalintensität eine Abschätzung des bisherigen Therapieerfolgs möglich und es kann zwischen Kontamination und Infektion unterschieden werden. Der Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Infektion und dem klinischen Bild wird aktuell in einer Studie untersucht, die im Ergebnis eine Klassifizierung der kardiovaskulären Infektionen mit Risikostratifizierung der Patienten und entsprechender Therapieempfehlung zum Ziel hat (BMBF gefördertes interdisziplinäres

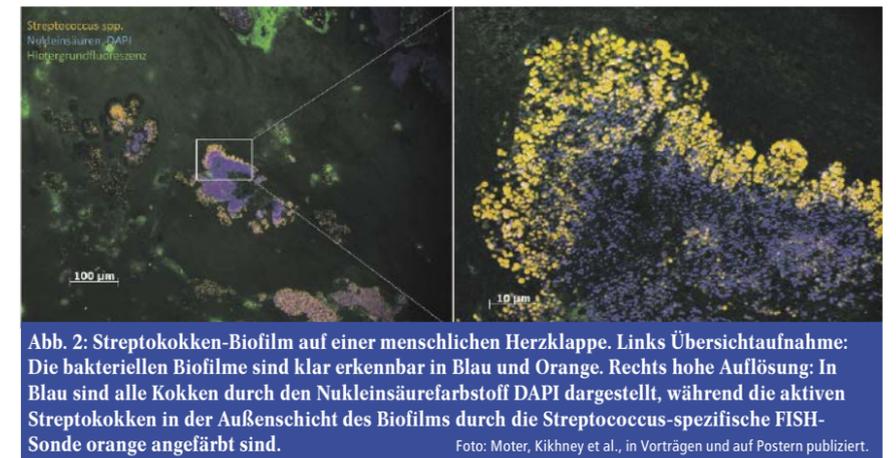


Abb. 2: Streptokokken-Biofilm auf einer menschlichen Herzklappe. Links Übersichtsaufnahme: Die bakteriellen Biofilme sind klar erkennbar in Blau und Orange. Rechts hohe Auflösung: In Blau sind alle Kokken durch den Nukleinsäurefarbstoff DAPI dargestellt, während die aktiven Streptokokken in der Außenschicht des Biofilms durch die Streptococcus-spezifische FISH-Sonde orange angefärbt sind. Foto: Moter, Kikhney et al., in Vorträgen und auf Postern publiziert.

onen stellte sich in der Mikroskopie heraus, dass es eine große Variabilität in der Ausprägung der Infektion gab. So zeigten sich Fälle, bei denen die Verdachtsdiagnose Endokarditis bestätigt wurde, die Mikroorganismen jedoch einzeln verteilt und teils degradiert im Gewebe sichtbar waren, andere Fälle, bei denen sich Mikrokolonien fanden, und Extremfälle, bei denen ausgedehnte, reife Biofilme zur Darstellung kamen. Interessanterweise entsprach dieses Bild häufig der klinischen Situation.

Konsequenzen personalisiert steuerbar

Die Antibiotikaregime werden bislang lediglich hinsichtlich der Erregerspezies und Resistenz angepasst. Dies kann zu einer unzulänglichen Therapie führen, da bei einer kultur-negativen Endokarditis kalkuliert therapiert werden muss, ohne Kenntnis des Erregers und oft auch mit der Unsicherheit, ob überhaupt eine Endokarditis vorliegt. Häufiger führt dies jedoch auch zu einer hochdosierten intravenösen Dreifach-Therapie über sechs Wochen, mit allen negativen Konsequenzen für Nebenwirkungen, Resistenzentwicklung, langem Krankenhausaufenthalt, Lebensqualität und Kostenentwicklung. Hier hat die FISHseq ein großes Potential, denn sie informiert über die intra-operative

näres Forschungskonsortium TEAM FKZ 13N15820). So soll in Zukunft mithilfe der FISHseq die Antibiotika-Therapie gezielt eskaliert oder de-eskaliert und somit personalisiert gesteuert werden (Abb. 3).

Diagnostischer Mehrwert bei MRE wichtig

Die FISHseq hat sich als vielversprechende Methode erwiesen, die bereits in verschiedenen klinischen Anwendungsbeispielen einen klaren diagnostischen Mehrwert liefern konnte. Insbesondere in den kommenden Jahren, in denen wir mehr und mehr mit multiresistenten Erregern konfrontiert werden, ist eine schnelle und sensitive mikrobiologische Diagnostik Voraussetzung für die erfolgreiche Therapie der Patienten. Hier steht die FISHseq als Brückentechnologie zwischen Molekularbiologie, Mikrobiologie und Pathologie an einer Schlüsselposition zur erfolgreichen Interpretation der diagnostischen Daten, die zu einer Therapieentscheidung führen und neue Therapiealgorithmen ermöglichen.

| www.charite-mikrobiologie.de/moter-laboratory |
| www.moki-analytics.com |