

Laborautomation in der Mikrobiologie

Zu einer schnelleren und besseren individualisierten Diagnostik

IRENE BURCKHARDT

MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE, ZENTRUM FÜR INFEKTILOGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM HEIDELBERG

Total lab automation automates inoculation, incubation and analysis of human specimens. It enables the laboratory to shorten incubation times and significantly reduce the time to report. It improves the quality of microbiologic analysis by increasing the number of grown organisms. In the future it will enable automatic reading and fully automated identification and susceptibility testing of bacteria.

DOI: 10.1007/s12268-019-0204-1
© Die Autorin 2019

Open Access

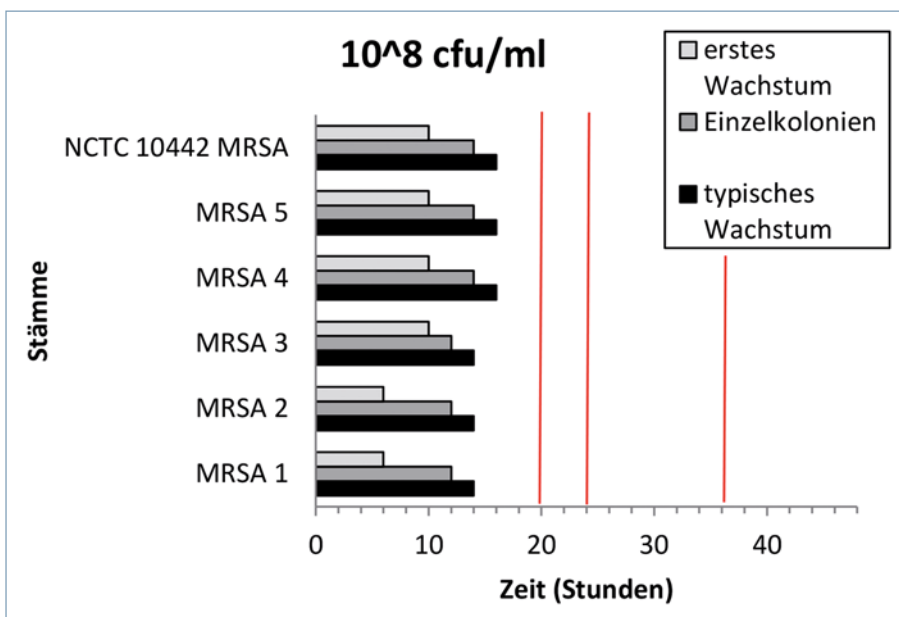
„Automatisierung bezeichnet Technologie, die es ermöglicht, Arbeitsschritte und -abläufe ohne menschliches Zutun durchzuführen“ [1]. Im medizinischen Bereich wird vor allem in der Labormedizin bereits seit Jahrzehnten automatisiert gearbeitet. Die Mikrobiologie galt über lange Zeit als „nicht automatisier-

bar“, da sie durch ein hohes Maß an Variabilität bei Untersuchungsmaterialien und Arbeitsabläufen charakterisiert ist. In der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Zentrums für Infektiologie an der Universitätsklinik Heidelberg fiel im Jahr 2014 die Entscheidung, die kulturelle Dia-

gnostik auf ein automatisiertes System umzustellen. Im Jahr 2015 wurde eine *Total Lab Automation* (TLA) der Firma BD Kiestra gestellt und im Januar 2016 in den Routinebetrieb genommen. Das System besteht aus mehreren Einzelkomponenten (Plattenreservoir, Beimpfungsautomat, Brutschränke, Werkbänke zur weiteren Verarbeitung von Proben und Kulturen), die durch ein Transportband miteinander verbunden sind. Unsere Anlage verfügt derzeit über eine Bebrütungskapazität von 4.600 Platten. Die Anlage hat Ausmaße von ca. 7,5 × 12 Meter. Derzeit werden werktäglich mehr als 500 Proben neu angelegt. Die Anlage kann nicht nur Agarplatten beimpfen und austreichen, sondern auch Bouillons beimpfen und Objektträger mit Material beschicken. Geeignete Proben sind flüssig. Angelegte Agarplatten werden bebrütet und nach einer definierten Zeit fotografiert (z. B. 20 Stunden). Abgelesen werden die Bilder der Platten am Bildschirm und die entsprechenden Kolonien zur Weiterverarbeitung elektronisch gekennzeichnet. Derzeit werden Urine, Proben zum Screening auf multiresistente Erreger (MRE) und positive Blutkulturen über die Anlage prozessiert.

Eine neue Form der Präzision in der mikrobiologischen Diagnostik

In der klassischen manuellen Mikrobiologie werden Proben am Tag der Ankunft erfasst, angelegt und inkubiert (Tag 0), am nächsten Tag (Tag 1) zum ersten Mal abgelesen und je nach Material und Kulturergebnis abschließend beurteilt oder weiter inkubiert. Die klassische Mikrobiologie rechnet in Tagen. Das bedeutet, dass die reale Inkubationszeit um bis zu acht Stunden schwanken kann. In der automatisierten Mikrobiologie wird die Inkubationszeit von der Ablesung entkoppelt, da die Platten rund um die Uhr nach der definierten Inkubationszeit (z. B. 20 Stunden) fotografiert werden. Abgelesen werden die Bilder zu einem späteren Zeitpunkt. Diese Form der präzisen Festlegung, Vereinheitlichung und auch Überwachung der Inkubationszeit ist in der klassischen Mikrobiologie, wenn überhaupt, nur mit einem erheb-



▲ Abb. 1: Wachstumskinetik verschiedener klinischer MRSA-Stämme (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) und des Referenzstamms NCTC 10442 (Inokulum: 10^8 colony forming units (cfu) pro Milliliter). *Erstes Wachstum*: erstes sicheres Wachstum von Bakterien, *Einzelkolonien*: Einzelkoloniewachstum, geeignet zur weiteren Verarbeitung, *Typisches Wachstum*: typisches Wachstum auf der Platte.

lichen Dokumentationsaufwand leistbar. Allerdings müssen vor Inbetriebnahme der Automatisierung die Fotografierzeitpunkte präzise festgelegt werden. Daten zu Wachstumskinetiken einzelner bakterieller Spezies waren so in der Literatur nicht vorhanden. Die Beipackzettel einzelner Agarmedien enthalten entweder nur Angaben in Tagen (z. B. zwei Tage) oder breite Stundenintervalle (z. B. 18–24 Stunden). Mit der TLA ergab sich erstmals die Notwendigkeit zur präzisen Definition von Inkubationszeiten (in Stunden und Minuten). Gleichzeitig bot die TLA erstmals die technischen Möglichkeiten, Studien zu Wachstumszeiten von Bakterien auf unterschiedlichen (vor allem selektiven) Medien durchzuführen.

Verbesserungen bei Screening-Untersuchungen (MRE)

Eingehende Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA; **Abb. 1**), Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) und multiresistenten Gram-negativen Erregern

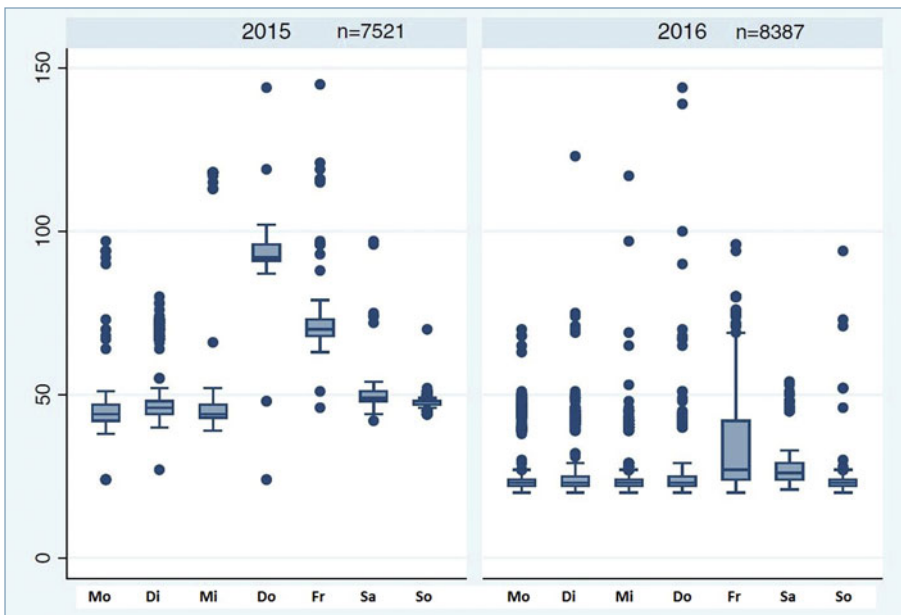
(3-MRGN, 4-MRGN) erbrachten unerwartete Ergebnisse. Sowohl Untersuchungen mit verschiedenen Stämmen MRSA (**Abb. 1**), VRE und MRGN als auch Untersuchungen mit Patientenproben konnten zeigen, dass für die Suche nach MRSA und MRGN eine Inkubationszeit von 20 Stunden ausreichend ist. Für den Nachweis von VRE reicht das leider nicht. Hier ist eine Bebrütungszeit von 36 Stunden notwendig [2].

Die Umsetzung dieser Ergebnisse in die tägliche Routine führte zu einer deutlich verkürzten Befundzeit für das kulturelle MRSA-Screening (*time to report*, TTR). In der klassischen Mikrobiologie müssen die Agarplatten für das Screening auf MRSA zwei Tage inkubiert werden, da ansonsten eine Mindestinkubationszeit von 18–24 Stunden (wie im Beipackzettel der Selektivplatte angegeben) nicht sichergestellt werden kann. Das führt zu einer mittleren Befundzeit von 48 Stunden. Durch die Umsetzung der Untersuchung auf die automatisierte Anlage konnte die mittlere Befundzeit auf 24 Stunden gesenkt werden (**Abb. 2**). Praktisch gespro-

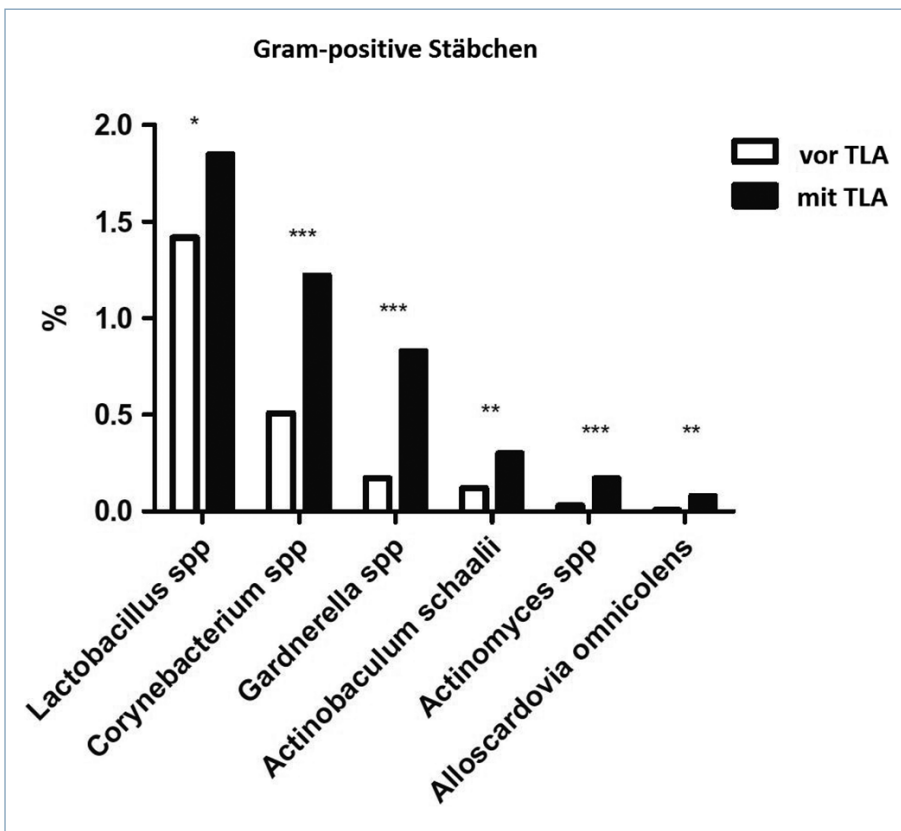
chen kommt der Befund dadurch einen ganzen Tag früher [3].

Verbesserungen bei Urinuntersuchungen

Mikrobiologische Urinuntersuchungen gehören sowohl im Krankenhaus als auch im ambulanten Bereich zu den häufigsten Untersuchungen. Neben der Bestimmung der Leukozyten ermöglicht der Kulturbefund die Diagnose und auch die gezielte Therapie von Harnwegsinfekten. Klassischerweise werden Urine an Tag 1 abgelesen, und wenn der Kulturbefund einen Harnwegsinfekt möglich erscheinen lässt, erfolgen Quantifizierung, Identifizierung und Resistenztestung. Im automatisierten System werden Kulturplatten von Urinen einmal nach 20 Stunden fotografiert. Eine bis dato unveröffentlichte Studie mit mehr als 700 Urinen ergab, dass eine Verlängerung der Inkubation von Kultur-negativen Urinen um weitere 20 Stunden keine weitere Erhöhung der Anzahl der positiven Befunde bewirkt. Allerdings zeigte sich, dass mit dem Beginn der Prozessierung von



▲ **Abb. 2:** Befundzeit von MRSA-Screening-Untersuchungen (Nasenabstriche, negatives Ergebnis); 2015: vor der Automatisierung, 2016: nach der Automatisierung. Die Befundzeiten sind aufgeschlüsselt nach Wochentagen; dargestellt sind der Median, ±25 % der Befunde (Box); Ausreißer: Punkte (nach [3]).



▲ **Abb. 3:** Zunahme an Nachweisen von Gram-positiven Stäbchen in der Urinkultur durch Total Lab Automation (TLA). Statistische Signifikanz: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ (nach [4]).

omnicolens, *Actinotignum schaalii* und *Gardnerella vaginalis* bedingt [4].

Verbesserungen bei Blutkulturuntersuchungen

Die Blutkulturdiagnostik gehört zur klassischen kulturbasierten mikrobiologischen Diagnostik. Die positiven Effekte auf die individualisierte Patientenversorgung sind unbestritten und gewinnen mit der Zunahme von multiresistenten Erregern noch weiter an Bedeutung. Sobald Blutkulturflaschen Hinweise auf bakterielles Wachstum geben, werden sie klassischerweise auf Agarmedien subkultiviert. Eine Resistenztestung erfolgt, sobald auf den Agarplatten Wachstum zu verzeichnen ist. Ein erstes Wachstum ist frühestens nach vier bis sechs Stunden sichtbar und erlaubt eine Resistenztestung. Klassischerweise wird eine Resistenztestung mittels Agardiffusion nach weiteren 18 Stunden Bebrütungszeit abgelesen. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) benötigt je nach Erreger auch zwischen 12 und 24 Stunden Inkubationszeit. Mit der Veröffentlichung von Grenzwerten zur Ablesung direkter Agardiffusionsresistenztestungen aus positiven Blutkulturflaschen (RAST) nach vier, sechs oder acht Stunden durch das Netzwerk EUCAST im November 2018 (www.eucast.org) war die Grundlage für eine rasche Resistenztestung unter Zuhilfenahme der Laborautomatisierung gegeben. Derzeit werden alle positiven Blutkulturflaschen einer direkten Testung unterzogen und die Ergebnisse auch zeitnah der Station mitgeteilt, und es ist eine zuverlässige Diagnose von MRSA, VRE oder MRGN direkt aus positiven Blutkulturflaschen innerhalb von sechs bis sieben Stunden möglich. In der Praxis muss allerdings berücksichtigt werden, dass mikrobiologische Labore nicht 24/7, sondern in der Regel 12/7 arbeiten, das heißt, mikrobiologische Labore sind nicht rund um die Uhr besetzt. Deshalb können nicht alle Ergebnisse unmittelbar mitgeteilt werden, sondern nur während der Präsenzzeiten. Ein Vergleich der Dauer bis zum Befund zwischen der direkten Agardiffusion aus der positiven Blutkulturflasche und der Resistenztestung von der Kultur aus der positiven Blutkulturflasche ergab einen mittleren Unterschied von 17 Stunden. Das heißt, der RAST erreicht die Station fast einen ganzen Tag früher.

Zusammenfassung und Ausblick

Die Total Lab Automation von BD Kiestra automatisiert die Anlage von flüssigen Patienten-

Urinproben mit der Laborautomatisierung die Anzahl von Nachweisen bestimmter anspruchsvoller Bakterien bei einer Bebrütungszeit von 20 Stunden deutlich zunahm (Abb. 3). Dies war vor allem durch einen Anstieg der Nachweise von *Alloscardovia*

tenmaterialien. Sie erlaubt die Anlage und den Ausstrich von Platten, Bouillons sowie die Beschickung von Präparaten. Die Ablesung von Agarplatten erfolgt anhand von Bildern, die nach einer genau definierten Zeit durch die Kameraeinheiten der Brutschränke aufgenommen werden. Validationen von Funktionsparametern waren notwendig und führten zu einer deutlichen Verkürzung der Befundzeiten (MRSA-Screening und Blutkulturreisistenztestung). Die veränderten, sehr standardisierten Bebrütungsbedingungen wurden belohnt durch eine erhöhte Sensitivität der kulturellen Anzucht bei Urinen.

Sowohl die gezeigte Verkürzung der Befundzeit als auch die erhöhte Sensitivität der kulturellen Anzucht sind Effekte, die auch bei anderen Probenarten wünschenswert sind. Es bleibt abzuwarten, welche positiven Effekte sich ergeben, z. B. bei der Bebrütung von Gewebe wie Herzklappen oder bei Verdacht auf peri-prothetische Infektion.

Technische Verbesserungen, die in den nächsten Monaten bzw. Jahren zu erwarten sind, sind Algorithmen zur Auswertung von Plattenbildern und eine Vollautomatisierung von Identifizierung und Resistenztestung. Algorithmen zur Ableitung und Bewertung von unbewachsenen Platten sind gerade in der Erprobung. Diese Algorithmen ermöglichen es, das technische Personal vom Ablesen unbewachsener Platten zu entlasten, sodass die Mitarbeiter sich auf die Abarbeitung Kulturpositiver Proben konzentrieren können.

Außerdem ist gegenwärtig der erste Prototyp für eine automatisierte Identifizierung und Resistenztestung von bakteriellen Kolonien in der Erprobung. Dieses Zusatzmodul ist in der Lage, markierte Kolonien für die Identifizierung mittels MALDI-TOF aufzubereiten und die entstandene Suspension zur Resistenztestung zu verwenden. Es bleibt abzuwar-

ten, wie gut die mechanische Stabilität dieses komplexen Moduls sein wird. Erst dann lässt sich dessen Mehrwert abschätzen. ■

Literatur

- [1] Groover PM (2010) Fundamentals of Modern Manufacturing: Materials, Processes and Systems. 4. Aufl. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken
- [2] Burckhardt I, Last K, Zimmermann S (2019) Shorter incubation times for detecting multi-drug resistant bacteria in patient samples: defining early imaging time points using growth kinetics and total laboratory automation. *Ann Lab Med* 39:43–49
- [3] Burckhardt I, Horner S, Burckhardt F et al. (2018) Detection of MRSA in nasal swabs-marked reduction of time to report for negative reports by substituting classical manual workflow with total lab automation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37:1745–1751
- [4] Klein S, Nurjadi D, Horner S et al. (2018) Significant increase in cultivation of *Gardnerella vaginalis*, *Alloscardovia omnicolens*, *Actinotignum schaalii*, and *Actinomyces* spp. in urine samples with total laboratory automation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37:1305–1311

Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution

4.0 International License

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaption, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Open access funding provided by Department of Infectious Diseases, Medical Microbiology and Hygiene, Heidelberg University Hospital.

Korrespondenzadresse:

Prof. (apl.) Dr. med. Irene Burckhardt
Zentrum für Infektiologie
Med. Mikrobiologie und Hygiene
Bereich Bakteriologie
Universitätsklinikum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 324
D-69120 Heidelberg
Tel.: 06221-5637795
irene.burckhardt@med.uni-heidelberg.de

AUTORIN



Irene Burckhardt

Jahrgang 1972. Medizinstudium im München. 2000 Promotion. 2005 Fachärztin für Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie. 2015 Venia legendi, Universität Heidelberg. 2019 außerplanmäßige Professorin, Universität Heidelberg.