

MALDI-TOF MS snadný a rychlý způsob pro identifikaci bakterií izolovaných ze životního prostředí

MALDI-TOF MS SIMPLE AND RAPID TOOL FOR IDENTIFICATION OF BACTERIA ISOLATED FROM THE ENVIRONMENT

Petr Štursa¹, Petra Junková¹, Michal Strejček¹, Tomáš Macek^{1,2}, Martina Macková^{1,2}

¹Vysoká škola chemicko-technologická; ²Ústav organické chemie a biochemie AV ČR; Společná laboratoř UOCHB a VŠCHT

Lidé, zvířata i rostliny jsou během svého života neustále v kontaktu s různými bakteriemi, ať už se jedná o bakterie patogenní, neškodné či prospěšné. Identifikace těchto bakterií je jedním z hlavních úkolů mikrobiologie již od vzniku tohoto vědního oboru. Rychlá a přesná identifikace neznámých bakterií je důležitá zejména v případech bakteriální infekce lidí či zvířat, kdy lze na základě správné identifikace zvolit správnou a rychlou léčbu. Detekce a identifikace bakterií je však důležitá i v jiných oblastech lidského života jako je zjišťování kontaminací v potravinářském průmyslu či detekce kontaminace vody a půdy, ale i v zemědělství pro určování rostlinných patogenů, nebo naopak prospěšných druhů. V minulosti bylo vyvinuto velké množství metod, které jsou určeny k identifikaci mikroorganismů. Každá takováto metoda by měla splňovat několik základních kritérií: princip identifikace bakterií by měl být univerzální, bakterie ve vzorku by mělo jít stanovit kvantitativně, metoda musí být vhodná pro identifikaci i doposud neznámých bakterií a zároveň by tato metoda měla vyhledat co nejvíce příbuzných bakteriálních druhů. Dalšími výhodnými aspekty jsou flexibilita, rychlost a nízké náklady. Data, která jsou takovouto metodou získána, by měla být pravidelně přidávána do centrální databáze. Pro taxonomickou klasifikaci bakterií lze použít velké množství metod. V první řadě je nutné si uvědomit, zda se jedná o kultivovatelné nebo nekultivovatelné bakterie. Donedávna bylo možné zabývat se pouze těmi kultivovatelnými. Pro jejich identifikaci se používala řada validovaných metod, jejichž nevýhodou je však těžkopádnost a dlouhé provedení. Navíc velice často metoda obsahuje subjektivní hodnocení, jako je posouzení morfologie bakterií nebo evaluace biochemických testů. Identifikace bakterií podle fenotypových vlastností vykazuje také značné nepřesnosti z důvodů možných morfologických změn při růstu bakterií na různých mediích, nebo při skladování bakterií. V praxi se například ještě stále můžeme setkat s tzv. API (Analytical profile index) index, což je sada biochemických testů, podle nichž lze neznámou bakterii identifikovat. Výsledky jsou však nepřesné a stanovení je extrémně pomalé. Kromě biochemického stanovení existují metody, které jsou velice citlivé a přesné jako je metoda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Ta je založena na imunoenzymatické reakci a používá se nejčastěji v klinické praxi pro specifické potvrzení nebezpečných patogenů. Tato metoda je velice účinná, ale opět poměrně nákladná a pro bakterie izolované ze životního prostředí prakticky nepoužitelná, vzhledem k jejich diverzitě a množství. Řada výše uvedených nevýhod byla v posledních 20. letech překonána využitím molekulárně biologických metod, např. analýzou 16S rRNA genů.

Jedná se o metodu, která poskytuje velice přesné výsledky a její výhodou je také to, že analyzované vzorky DNA jsou stabilní po velice dlouhou dobu. Kromě toho je použitelná i pro nekultivovatelné bakterie, pokud se podaří izolovat totální DNA přímo z environmentálního vzorku. Nevýhodou této metody je časové hledisko a finanční náročnost. Proto se v současnosti zavádí některé nové techniky a postupy, mezi které patří využití hmotnostní spektrometrie. Metoda hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry – MS) se v biologii a biochemii zpočátku využívala k identifikaci proteinů či peptidů. V roce 1994 se podařilo dokázat, že pomocí MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) lze identifikovat celé spektrum proteinů z předem dezintegrovaných buněk. Hmotnostní spektrometrie s detektorem MALDI-TOF byla poprvé využita k identifikaci mikroorganismů o několik let později. Hlavním důvodem byla snaha detekovat snadno a především rychle bakterie, které mohly být potenciálně použity jako biologická zbraň. Metoda byla úspěšně otestována na identifikaci bakterií *Bacillus anthracis*, *Brucella melitensis*, *Francisella tularensis* a *Yersinia pestis*. Celá podstata metody spočívala v extrakci proteinů z bakterií a následné analýze proteinových extraktů přímo MALDI-TOF MS. Takto byla získána jednotlivá proteinová spektra pro vybrané bakterie. Spektra byla tvořena jednotlivými vrcholy, které odpovídaly velikostí a intenzitou uvolněným proteinům během analýzy MALDI-TOF MS. Poté byly vytvořeny slepé vzorky identických bakterií a opět byla proměřena jejich spektra. Vzájemným porovnáním spekter bylo zjištěno, že spektra neznámých vzorků a standardů jsou shodná, a tudíž je lze použít pro identifikaci bakterií. Zároveň bylo zjištěno, že každý bakteriální druh tvoří unikátní spektrum vrcholů, které se mezidruhově liší svou pozicí a intenzitou. Na základě těchto výsledků byla hmotnostní spektrometrie označena za vhodnou metodou pro detekci bakterií a její hlavní předností byla rychlost a jednoduchost. V průběhu let se podařilo vyvinout několik rychlejších a efektivnějších postupů pro přípravu bakteriálních vzorků pro měření. Většinou z těchto metod postačuje jedna kolonie bakterie narostlá na mediu za přesně definovaných podmínek. Nejběžněji používanou metodou je metoda celých buněk. Postup byl poprvé popsán pracovní skupinou Holland a kol. Podstatou metody bylo odebrání jedné bakteriální kolonie narostlé na misce s živným agarem a následné rozetření na destičku. Takto rozetřená kolonie byla převrstvena maticí a po vysušení mohla být provedena samotná analýza. Pomocí této metody se podařilo rozlišit nejen rod a druh bakterií, ale také některé jednotlivé kmeny bakterií. Odebrání kolonie přímo

z růstového media má také tu výhodu, že všechny bakterie rostou za shodných podmínek. Jelikož identická bakterie může poskytnout různá hmotnostní spektra v závislosti na různých podmínkách kultivace (teplota, doba růstu, použité medium), anebo může být ovlivněna použitými chemikáliemi, je nutné před samotnou analýzou zajistit standardizaci přípravy vzorku a tím umožnit dobrou reprodukovatelnost. Pochopitelně je možné srovnávat jen spektra, která byla měřena stejným postupem. Dnes existuje několik softwarových vybavení, která celé stanovení usnadňují, jako jsou MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), Samaris (AngnosTec-Shimadzu) nebo MicrobeLynx (Waters). Tyto programy bohužel pracují na odlišných algoritmech, a proto není možné srovnávat spektra mezi databázemi. Všechny softwary tedy umožňují tvorbu vlastních knihoven spekter. Naše laboratoř využívá tuto metodu k identifikaci bakterií izolovaných z kontaminovaných zemín, identifikaci patogenních bakterií z potravinářských surovin. K analýze je využíván hmotnostní spektrometr od firmy Bruker Daltonics, také software pro analýzu pochází od této firmy. Při měření pak postupujeme dle standardního protokolu dodaného výrobcem. Tento protokol je založen na metodě celých buněk, viz výše. V případě izolace bakterií ze životního prostředí je nejdříve nutné izolovat jednotlivé bakteriální druhy, které jsou reprezentovány jednotlivými koloniemi narostlými např. na agarovém mediu. Dříve bylo nutné tyto jednotlivé kolonie individuálně testovat buď biochemickými testy nebo později po izolaci a sekvenaci 16SrDNA. V řadě případů však bylo po delší době zjištěno,

že se jedná o stejné druhy. V případě MS MALDI-TOF lze měřit spektra několika desítek bakterií najednou a srovnáním spekter lze velmi rychle vyloučit identické druhy. Kromě identifikace neznámých vzorků jsme také zkoumali vliv použitých médií, teplot růstu a doby růstu na výsledky analýzy. Bylo zjištěno, že např. různé typy media pro kultivaci bakterií mohou ovlivnit výsledek stanovení, naopak teplota a doba růstu měly minimální vliv.

Poděkování: Tato práce byla vypracována s podporou grantů MSM 6046137305, MŠMT č. 21/2010, NPVII 2B08031.

**Štursa P., Junková P., Střežek M., Macek T., Macková M.:
MALDI-TOF MS simple and rapid tool for identification
of bacteria isolated from the environment**

This paper is focused on the use of mass spectrometry in the biological sciences, especially the possibility of using this method for the identification of microorganisms particularly bacteria and not only from clinical or food material but also from the environment. Article also offers a brief comparison of some methods that are used for identification of microorganisms.

Key words: Mass spectrometry, MALDI-TFO MS, bacteria, protein, identification.

Kontaktní adresa – Contact address:

Ing. Petr Štursa, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6 Dejvice, Česká republika, e-mail: stursap@vscht.cz