

Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS

Truong Thanh Huong^a, Markéta Komínková^a, Roman Guráň^a, Branislav Ruttkay-Nedecký^b, Pavel Kopel^b, Libuše Trnková^b, Ondřej Zítka^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Identification of microorganisms using MALDI-TOF MS

One of the possible usages of MALDI-TOF MS is identification of microorganisms. It is highly accurate and faster than other methods and suitable for a large area of microorganisms. But unfortunately cannot reliably differentiate some closely related species. Often, it is possible to detect pathogenic organisms and use their accurate determination for monitoring environment, food processing or clinical diagnostics. Data obtained from mass spectra are compared with library of microorganisms and result of this was agreement or disagreement of microorganisms with specific spectrum.

Přijato k publikování: 20. 6. 2014

Klíčová slova: identifikace bakterií, MALDI-TOF MS, mikroorganismy

Úvod

Identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry) je vysoce přesná, aplikovatelná pro široké spektrum mikroorganismů a mnohem rychlejší ve srovnání s tradičními metodami¹. Dosavadní znalosti a výsledky pokusů provedených pomocí MALDI-TOF MS dokazují schopnost rozlišit bakterie či jiné mikroorganismy na rodové, druhové a často i na kmenové úrovni^{2,3}. Jejich přesné stanovení může sloužit pro monitoring životního prostředí, zpracování potravin, ochranu veřejného zdraví či klinickou diagnostiku, kde je důležité zjištění přítomnosti patogenních organismů⁴⁻⁷.

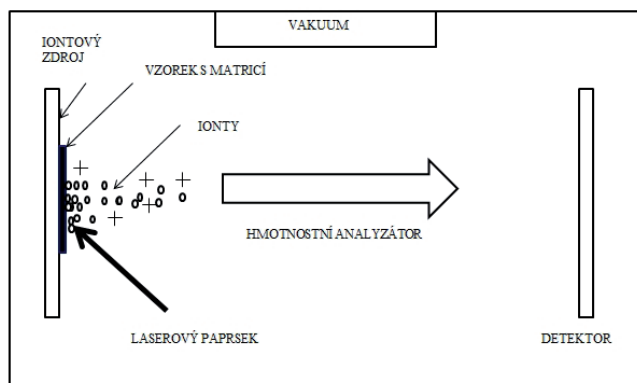
Hmotnostní spektrometrie

Na počátku hmotnostní spektrometrie stál J. J. Thomson, který začal proud částic ionizovaného neonu přes magnetické a elektrické pole, umístěním fotografické desky v proudu iontů neonu změřil jejich odchylku. Pozoroval dvě světelné stopy na fotografické desce, pro které navrhl dvě odlišné odchylky parabol.

Thomson došel k závěru, že neonový plyn byl složen z atomů s různým nukleonovým číslem (²⁰Ne a ²²Ne)⁸. Teoretické základy hmotnostní spektrometrie položil J. J. Thomson roku 1913⁹. O několik let později F. W. Aston sestrojil první moderní hmotnostní spektrometr, který je založen na separaci iontů v silném magnetickém poli permanentního magnetu tzv. magnetického selektoru¹⁰. Pomocí hmotnostního spektrometru identifikoval 212 z 287 přirozeně se vyskytujících izotopů, za což získal v roce 1922 Nobelovu cenu za chemii¹¹.

MALDI TOF-MS

Na Obr. 1 je uvedeno jednoduché schéma MALDI-TOF. Na krystaly matrice se vzorkem je aplikováno laserové záření, které způsobí desorcpci molekul matrice spolu s molekulami vzorku a zároveň dojde k ionizaci molekul vzorku předáním H⁺ od molekul matrice. Poté je aplikováno extrakční napětí mezi MALDI destičku a vstupní šterbinu průletového analyzátozu, čímž dojde k extrakci nabitých molekul podle zvolené polaroty napětí a k jejich analýze v průletovém hmotnostním analyzátozu. V závislosti na době letu molekul analyzátozem k detektoru se vypočítá poměr m/z .



Obr. 1: Schéma MALDI–TOF hmotnostního spektrometru

TOF analyzátor

Základním principem TOF analyzátoru je extrakce iontů a měření doby jejich letu. Ionty se pomocí vloženého napětí na extrakční mřížku urychlí (extrahují) elektrickým polem a získají rychlost v závislosti na jejich hmotnosti m a velikosti náboje z . Získaná kinetická energie je přímo úměrná náboji iontů a nepřímo úměrná jejich hmotnosti. Výsledkem je rozdílná rychlost iontů s různým poměrem m/z , a proto takto urychlené ionty dopadnou na detektor v rozdílném čase, pokud urazí stejnou vzdálenost^{7,12}.

Ionizace

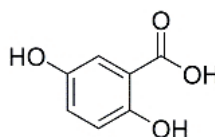
Proces maticí zprostředkované laserové ionizace „matrix assisted laser desorption ionization“ (MALDI) využívá ke své funkci matici, schopnou transformovat energii laseru na ionizaci a předat ji analytu. V případě MALDI dochází k podobným desorpčním procesům jako v případě LDI (laserem indukovaná ionizace). Energie, která je potřebná pro desorpci, závisí na sublimační energii daného vzorku a chemických reakcích probíhajících v kondenzované fázi těsně před expanzí plazmového obláčku. Při jednom „střelení“ se vytvoří řádově několik tisíc iontů. V průběhu MALDI „mikroexploze“ dochází nejen k desorpčním jevům podobným LDI, ale také k chemickým a fotony indukovaným reakcím. Nejčastěji se využívají dusíkové nebo Nd-YAG lasery emitující UV záření^{12,13}.

Detektor

Detektor je schopen zachytit dopadající ionty, ze kterých vypočítává hmotnost každého iontu, který na něj dopadne. Velká část detektorů je založena na převodu iontů na elektrický signál pomocí scintilační vrstvy, která při dopadu iontů vydává světelné záření. Tento typ záření je převeden na elektrický proud a dále zesílen. Detektory rozdělujeme na elektronový, fotonásobič a Faradovu klec¹².

Matrice

Výběr matrice je důležitým faktorem analýzy. Vhodné matrice pro UV lasery jsou aromatické karboxylové kyseliny, většinou deriváty kyseliny benzoové rozpuštěné nejčastěji ve vodném roztoku acetonitrilu, ethanolu nebo methanolu. Roztok se navíc často okyseluje kyselinou trifluoroctovou. Nejpoužívanější matrice jsou kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA), 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA), 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová, DHB), 4-hydroxy-3-methoxyskořicová (ferulová, FA). Matrice odlišně krystalizují a ionizují látky. DHB (viz Obr. 2) se používá jako univerzální matrice, je vhodná pro stanovení vysokomolekulárních látek, dobře ionizuje peptidy, proteiny, lipidy, nukleové kyseliny a sacharidy¹².



Obr. 2: Vzorec DHB (2,5 - dihydroxybenzoová kyselina)

Závěr

Hmotnostní spektrometrie je mimo celé řady svého využití velmi často využívána pro identifikaci mikroorganismů^{12,14}. Tato práce shrnuje vlastní popis analytické metody, a to především v souvislosti s vlastní detekcí mikroorganismů. Vyhodnocená data získaná z hmotnostních spekter a následující porovnání s knihovnou

hmotnostních spekter mikroorganismů v programu MALDI Biotyper slouží k identifikaci mikroorganismů na úrovni rodu, druhu a často i kmenu¹⁵. Výsledkem porovnání může být shoda nebo neshoda s hmotnostními spektry vzorku¹⁶. Program Biotyper vyhodnocuje výsledky pomocí tzv. skóre (nejvyšší možná hodnota je 3), které je dále barevně označeno červenou (žádná shoda), žlutou (částečná shoda) a zelenou (plná shoda) barvou¹⁷. Příčiny neshody výsledků s knihovnou mohou často souviset například s kontaminací vzorků s jinými mikroorganismy nebo nesprávnou kultivací mikroorganismů¹⁷.

Tato práce byla financována z projektu SIX CZ.1.05/2.1.00/03.0072.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, products, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

- Guo L., Ye L., Zhao Q., Ma Y., Yang J., Luo Y.: Journal of thoracic disease, 6, 534 (2014).
- Trevino M., Areses P., Penalver M. D., Cortizo S., Pardo F., del Molino M. L. P., Garcia-Riestra C., Hernandez M., Llovo J., Regueiro B. J.: Anaerobe, 18, 37 (2012).
- Pinto L., Poeta P., Vieira S., Caleja C., Radhouani H., Carvalho C., Vieira-Pinto M., Themudo P., Torres C., Vitorino R., Domingues P., Igrejas G.: Journal of Proteomics, 73, 1535 (2010).
- Schafer M. O., Genersch E., Funfhaus A., Poppinga L., Formella N., Bettin B., Karger A.: Veterinary Microbiology, 170, 291 (2014).
- Wang W., Xi H., Huang M., Wang J., Fan M., Chen Y., Shao H., Li X.: Journal of thoracic disease, 6, 524 (2014).
- Chalupova J., Raus M., Sedlarova M., Sebela M.: Biotechnology Advances, 32, 230 (2014).
- DeMarco M. L., Ford B. A.: Clinics in Laboratory Medicine, 33, 611 (2013).
- Thomson J. J.: Proceedings of the Royal Society, 1, 1 (1913).
- Thomson J. J.: Science (New York, N.Y.), 37, 360 (1913).
- W. A. F.: Phys. Review, 316 (1918).
- Aston F. W.: 152 (1922).
- van den Boom D., Wjst M., Everts R. E.: Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1015, 71 (2013).
- Cho Y. T., Su H., Huang T. L., Chen H. C., Wu W. J., Wu P. C., Wu D. C., Shiea J.: Clinica Chimica Acta, 415, 266 (2013).
- Samb-Ba B., Mazenot C., Gassama-Sow A., Dubourg G., Richet H., Hugon P., Lagier J. C., Raoult D., Fenollar F.: Plos One, 9, (2014).
- Braga P. A. C., Tata A., dos Santos V. G., Barreiro J. R., Schwab N. V., dos Santos M. V., Eberlin M. N., Ferreira C. R.: Rsc Advances, 3, 994 (2013).
- Sauer S., Kliem M.: Nature Reviews Microbiology, 8, 74 (2010).
- Machen A., Drake T., Wang Y. F.: Plos One, 9, (2014).



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.