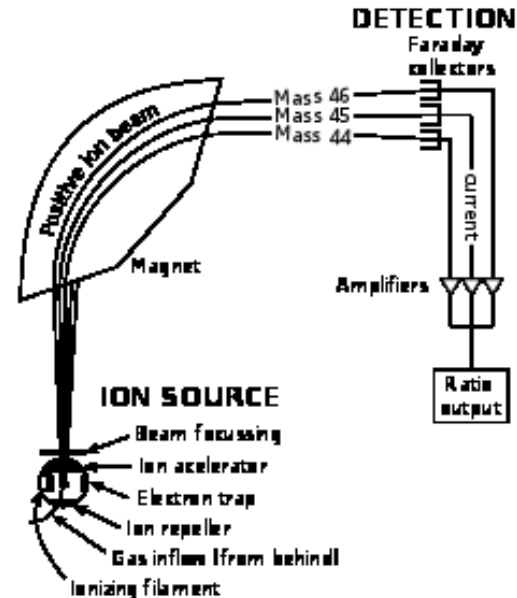


**Identifikace a klasifikace
mikroorganismů
založená na shlukové analýze
MALDI-MS
protein/peptidových profilů**

**Příprava vzorku pro analýzu
Využití metody v mikrobiologii**

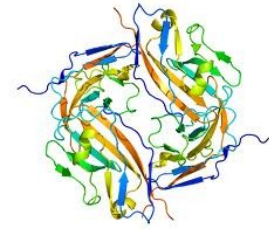
Zařazení techniky

- Hmotnostní spektrometrie

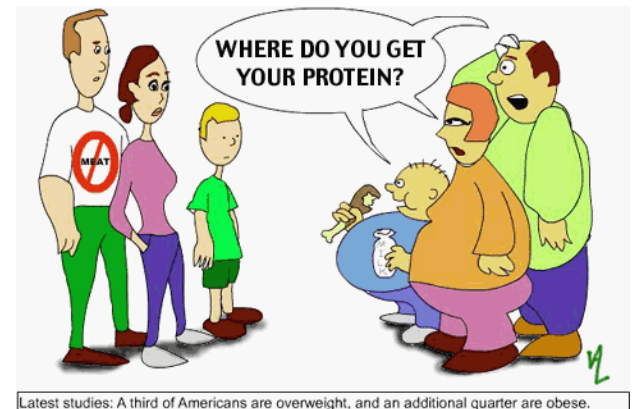
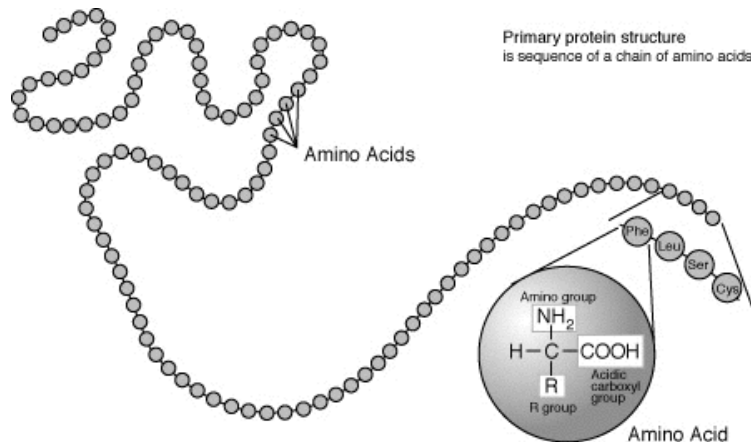


- V mikrobiologii - chemotaxonomie
- Analyzované složky buňky/virů
 - a) profil extraktu celých buněk, b) biomarkery – vytipované složky
 - nejvíce: proteiny/peptidy (ribosomální, membránové)
 - méně: sacharidy, lipidy, NK

Proč proteiny??



- Vysoce informativní markery současného stavu kultury
- „protein turnover“ – změny za různých podmínek prostředí, stresů.. (technologie, transport kultur, vliv látek...)
- Systematické mapování proteinů – taxonomie, studium fce proteinů
- Databáze proteomu (SWISSPROT)

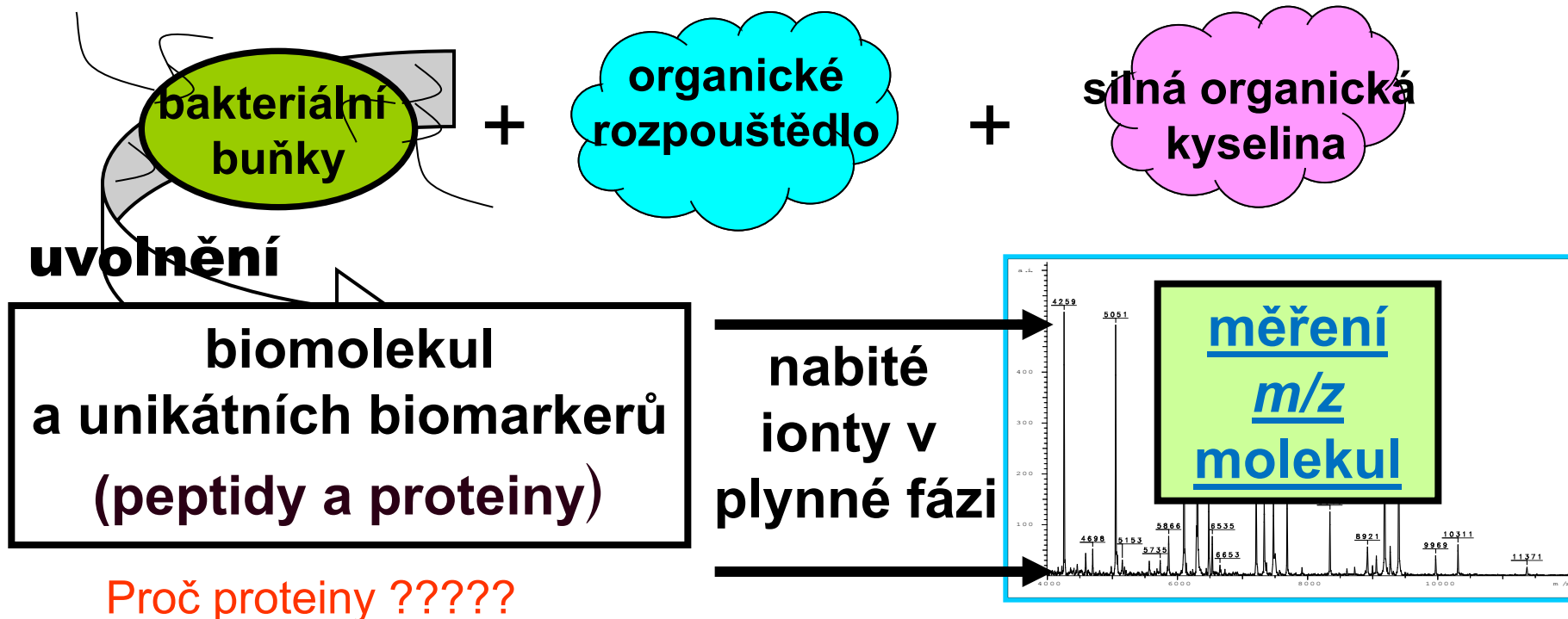


MALDI-TOF MS

= Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -
Time of Flight Mass Spectrometry

Hmotnostní
spektrometrie
s laserovou desorpcí
a ionizací za účasti
matrice s průletovým
analyzátozem

- jednoduchá, rychlá, spolehlivá
chemotaxonomická technika
vysoká citlivost a reprodukovatelnost



K čemu *m/z* protein-peptidový profil slouží?

- Kvasinky, bakterie, viry, houby....
- Identifikace kmene – po jakou úroveň?
- Charakterizace kmene
 - sledování profilu kultury (změny proteomu) v průběhu působení faktoru
 - sledování mutací
 - sledování rezistentních kmenů
 - sledování kontaminace kultury
- Detekce markerů/biomarkerů, toxinů...
- První databáze – 2004 – Bruker Daltonics
- Smíšené kultury? Biofilm? Vzorky moči? Krve?

MALDI – MS profil

je charakteristickým otiskem
analyzovaného bakteriálního kmene

- Proteiny – ribozomu, membrány

A. hydrophila ssp. *hydrophila* 7232^T

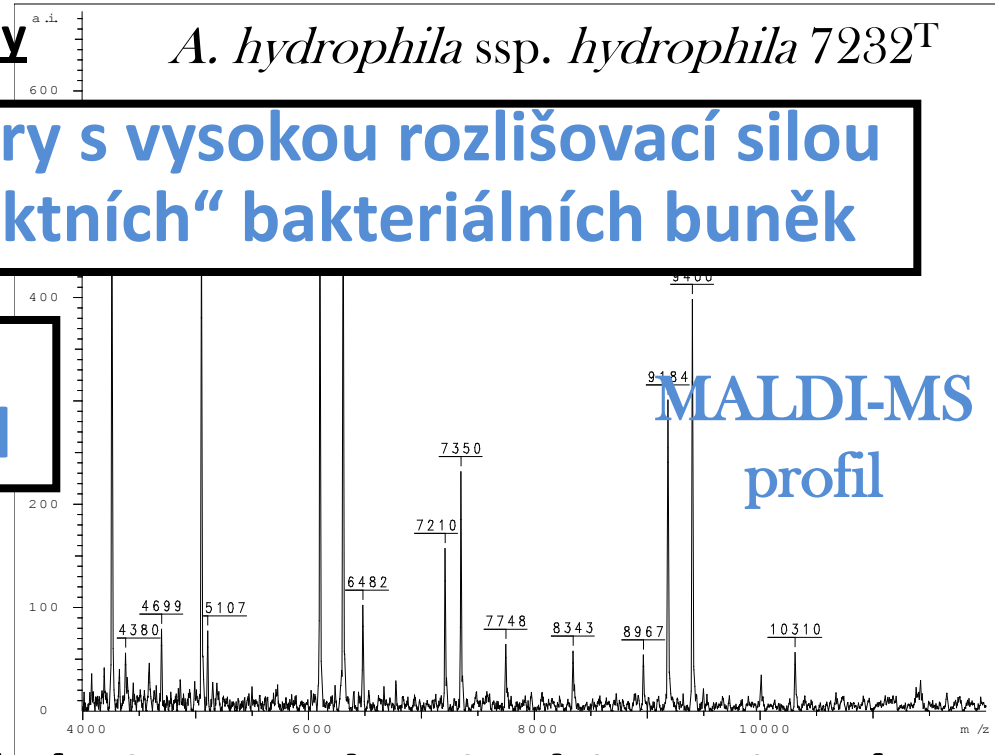
= charakteristické markery s vysokou rozlišovací silou
dostupné analýzou „intaktních“ bakteriálních buněk

50% sušiny
200 - 6 000 typů molekul

→ možnost rozlišit

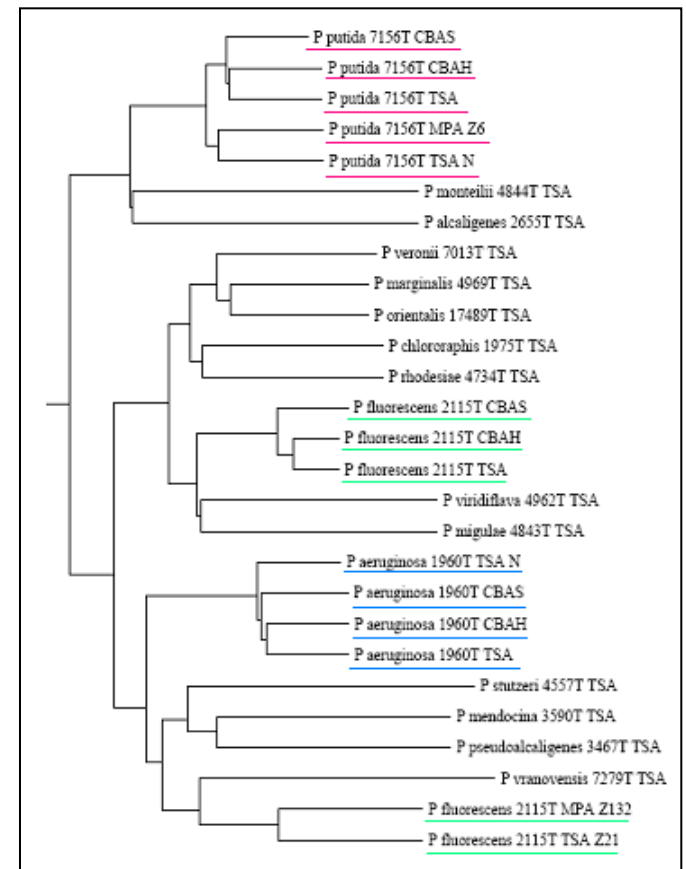
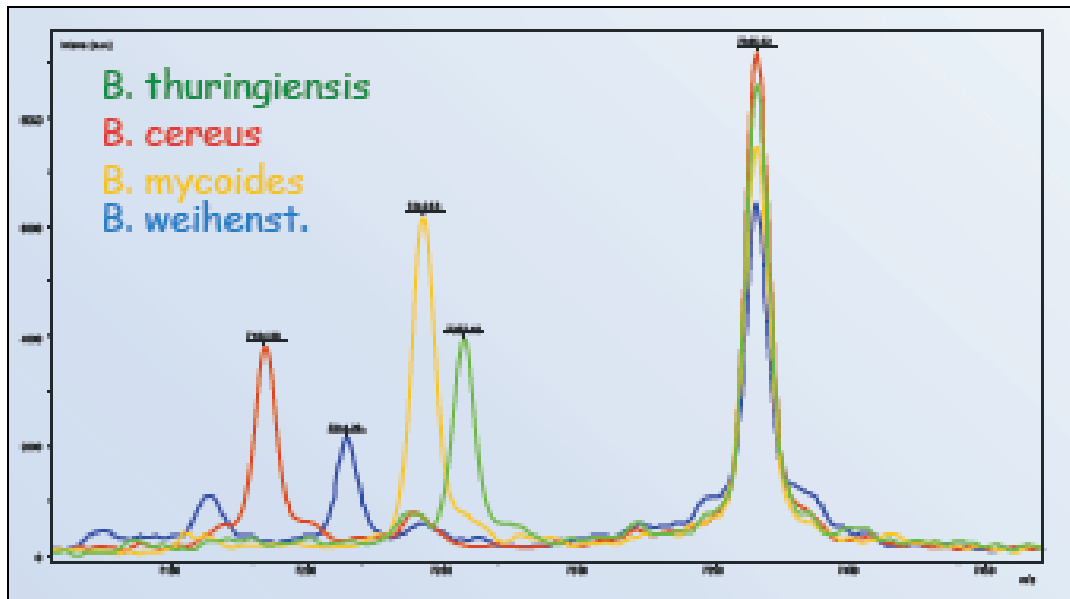
úzce příbuzné druhy,

neodlišitelné genotypizačními metodami a biotypizací



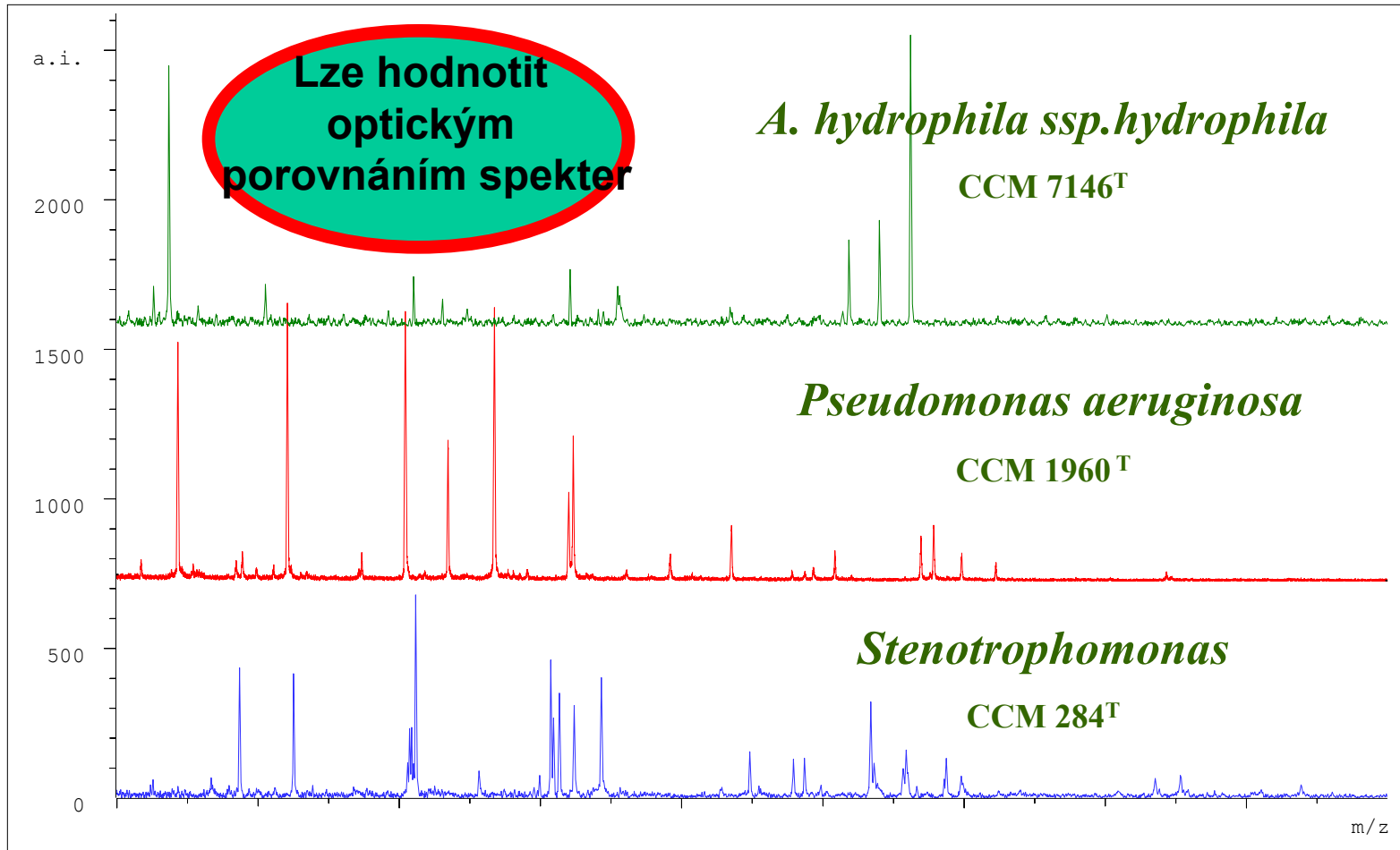
Výstupy metody

- Hmotnostní spektra
- Po provedení shlukové analýzy
- dendrogramy

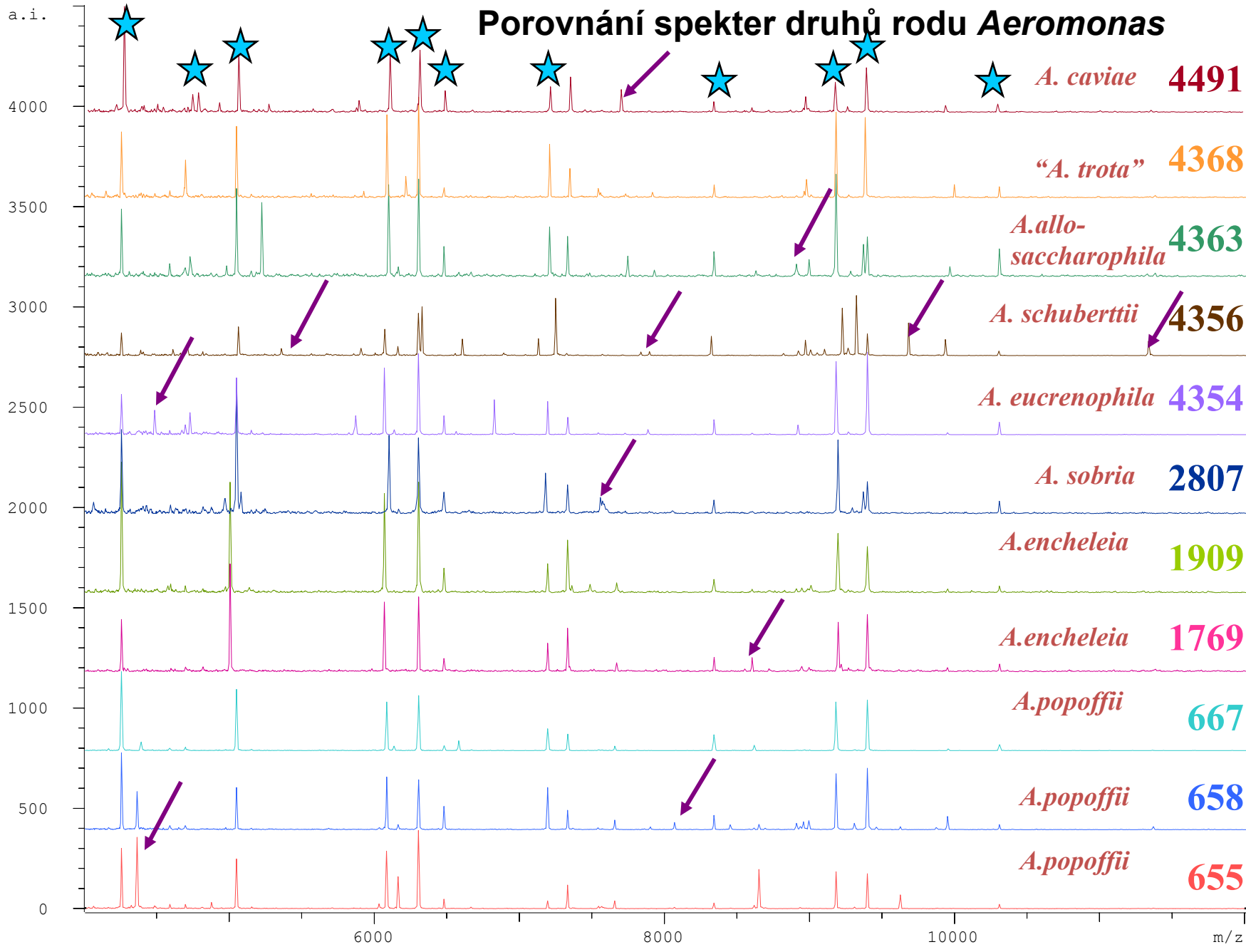


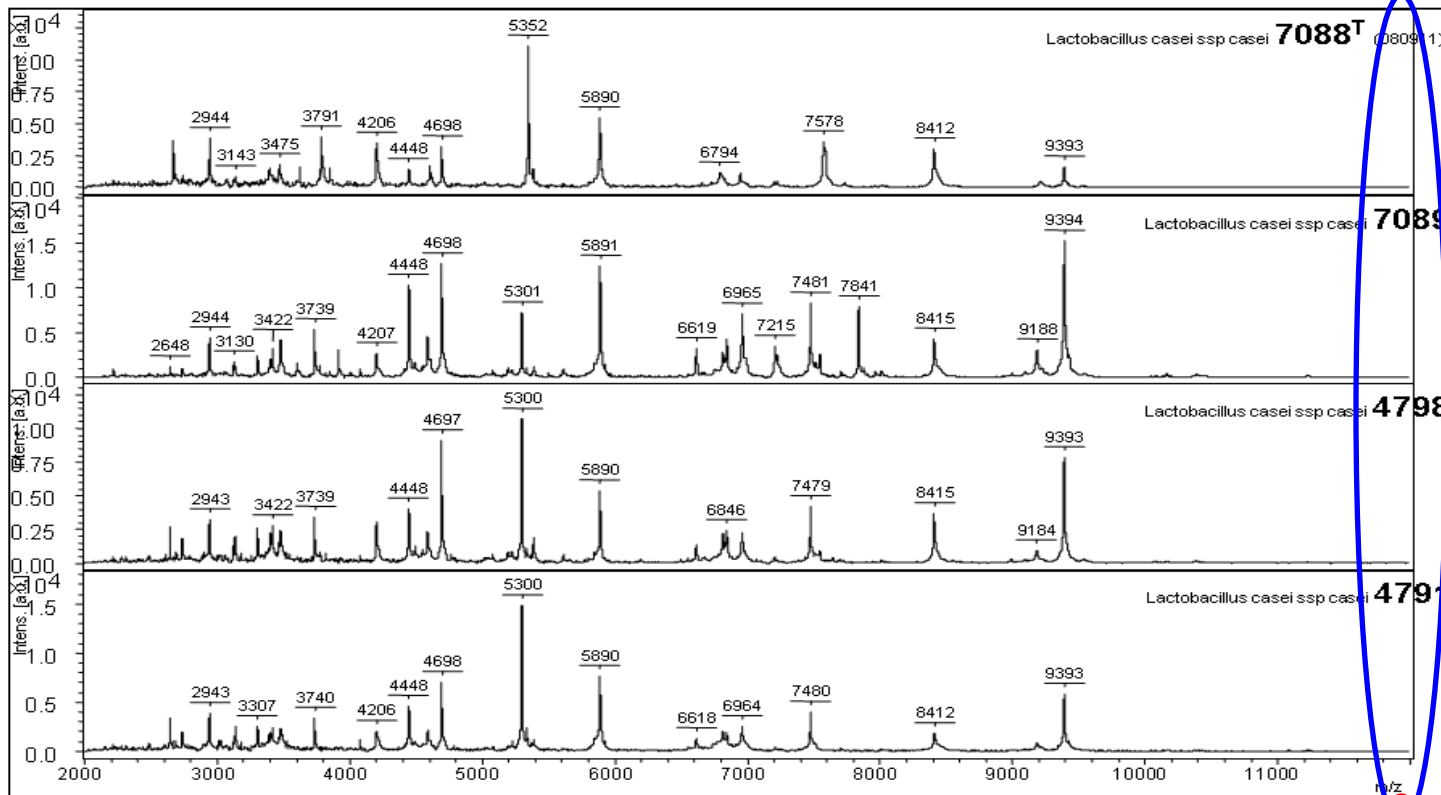
Porovnání spekter

3 typových kmenů různých rodů

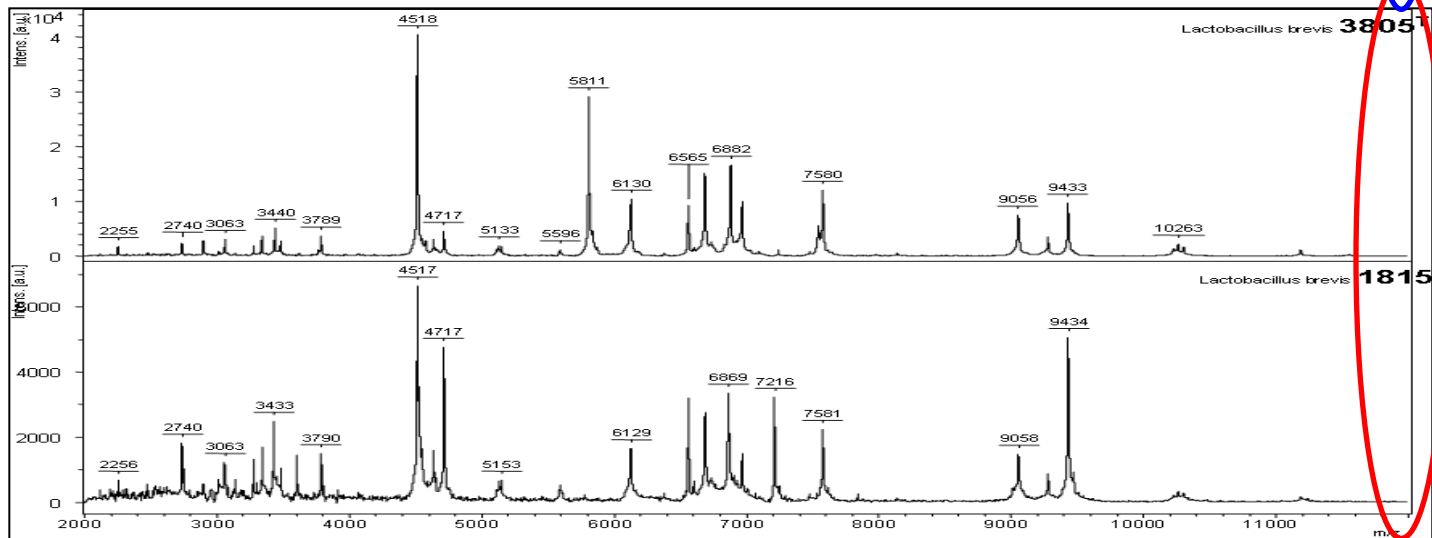


Porovnání spekter druhů rodu *Aeromonas*



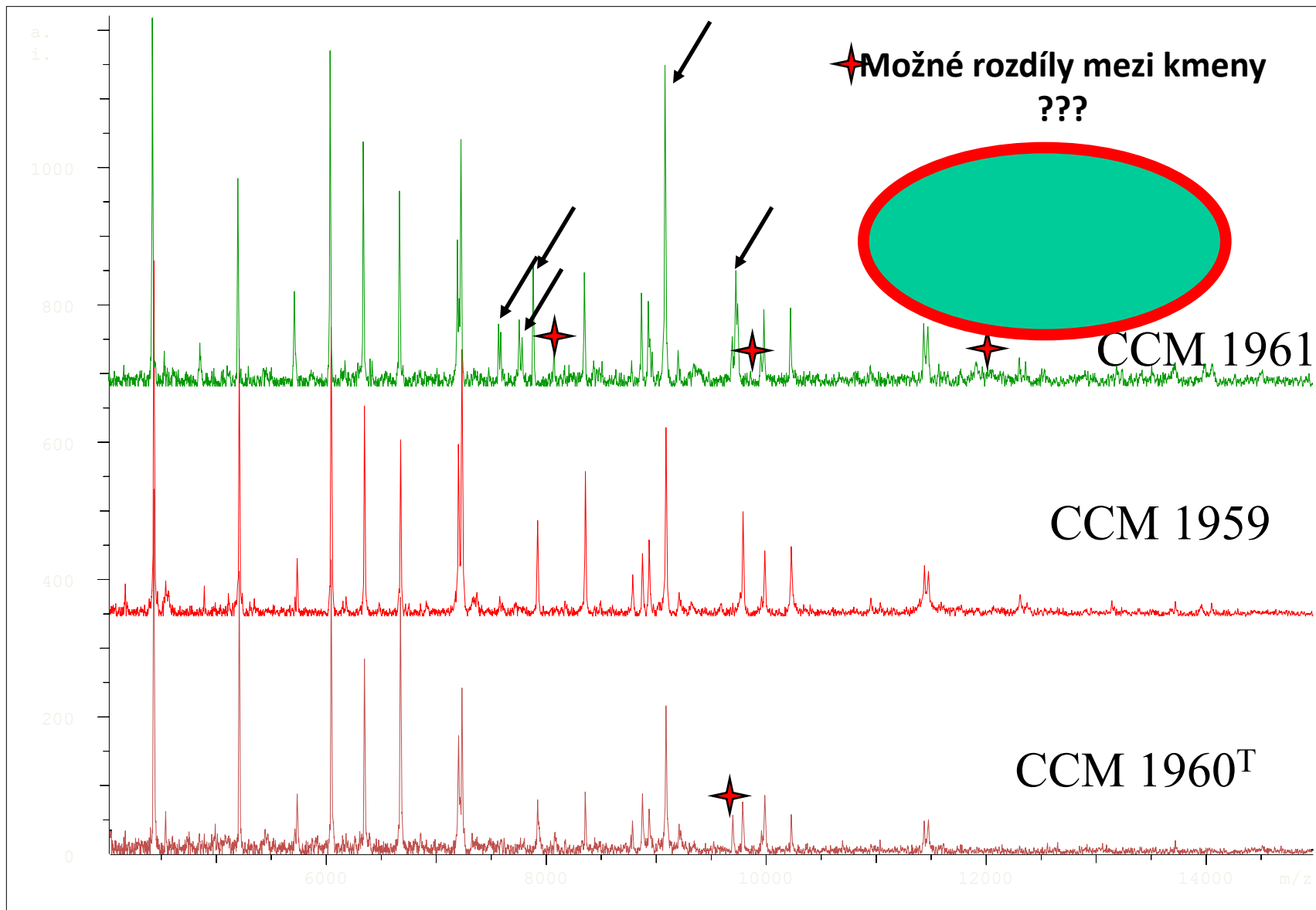


L. casei
ssp.
casei

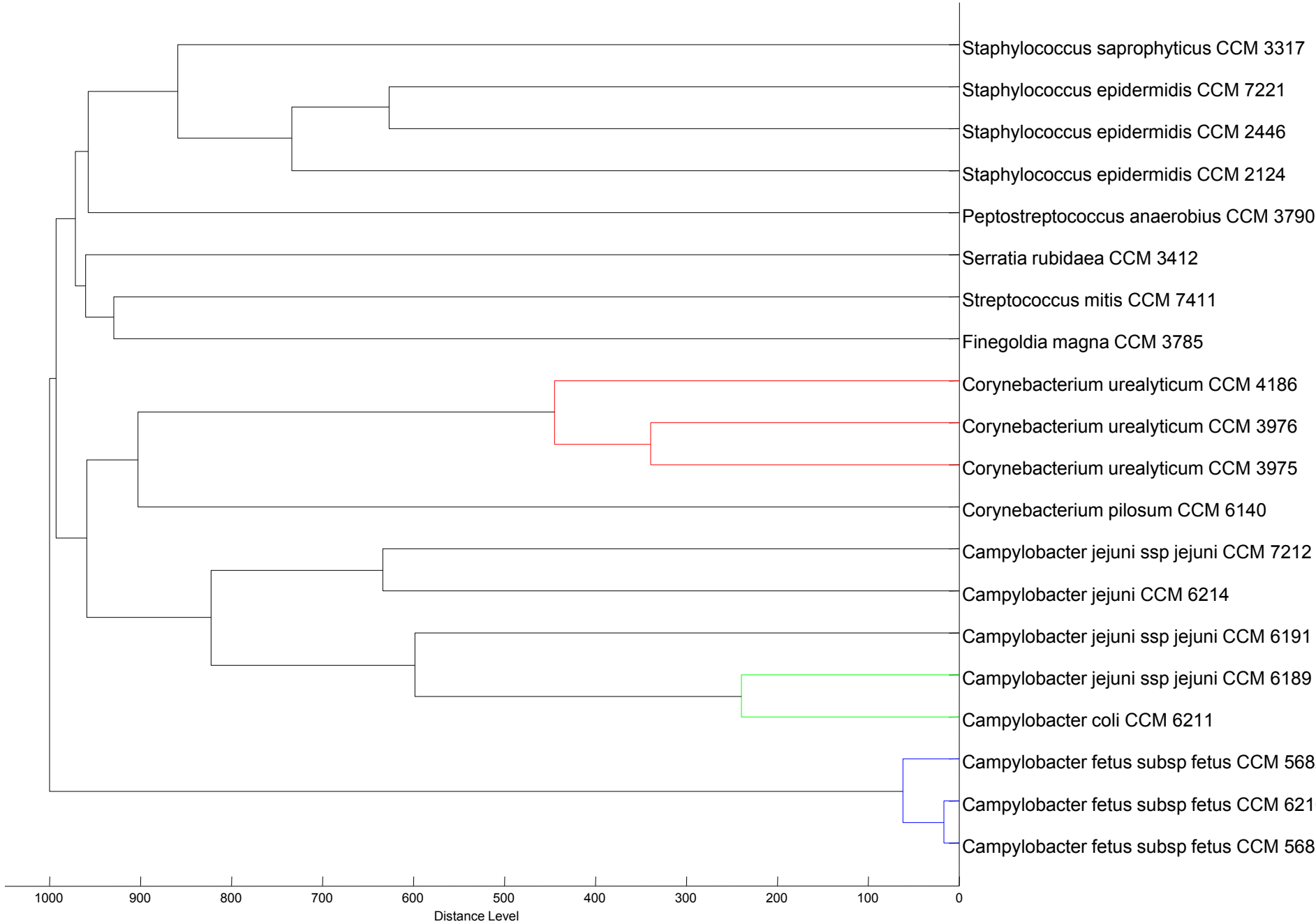


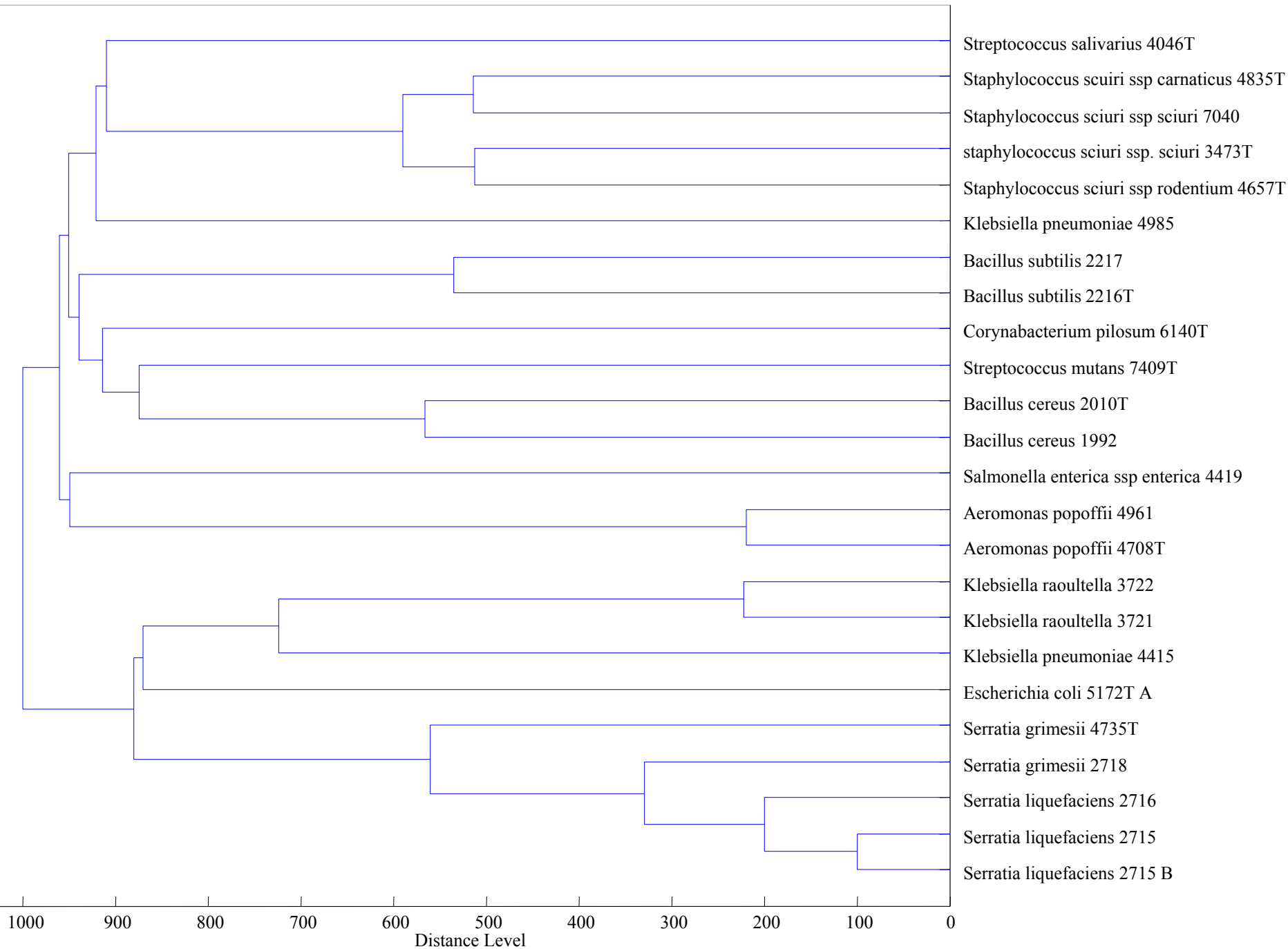
L. brevis

Porovnání spekter kmenů druhu *P.aeruginosa* (šipka označuje stejné signály odlišné intenzity)



Score Oriented Dendrogram for bruker_ukazky





Základy metodiky přípravy a analýzy vzorku – kultura?? Krev/moč?? máte databázi???

1. Kultivace:

kmeny pro databázi = typové kmeny (CCM, DSMZ, referenční)

Následně neznámé izoláty

2. Optimalizace přípravy a analýzy vzorku

3. MALDI MS analýza

Kultivace na vhodném mediu

Možné promytí buněk od media

Suspenze buňky : rozpouštědlo

Kokrytalizace s matricí

Reflex IV (Bruker)

4. Úprava a zpracování spekter

5. Testy reprodukovatelnosti

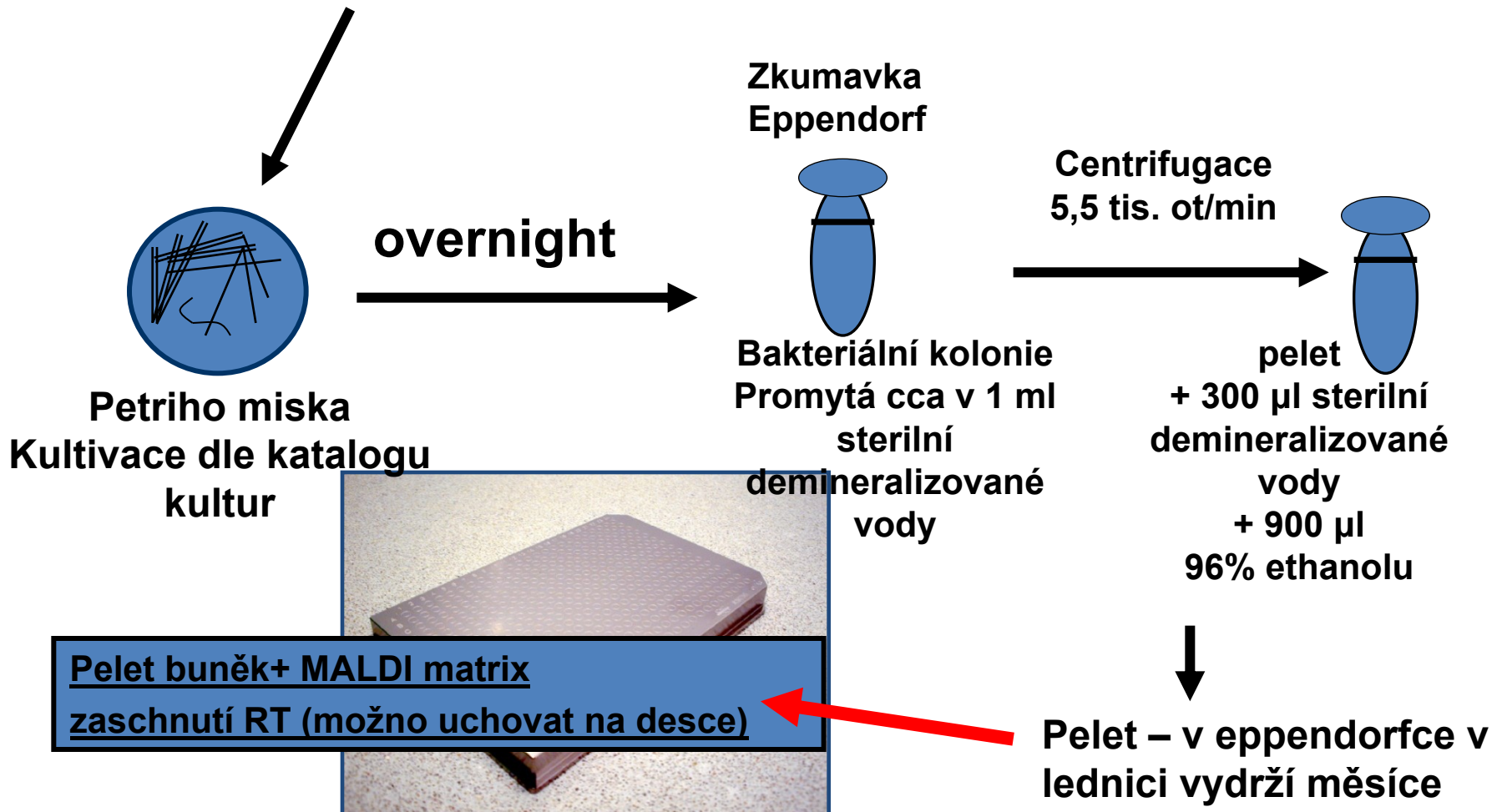
6. Shluková analýza spekter

Vlivy během
kultivace?
Růstové fáze?
Buněčné obaly?
Odsolení vzorku?



Příprava vzorku pro analýzu

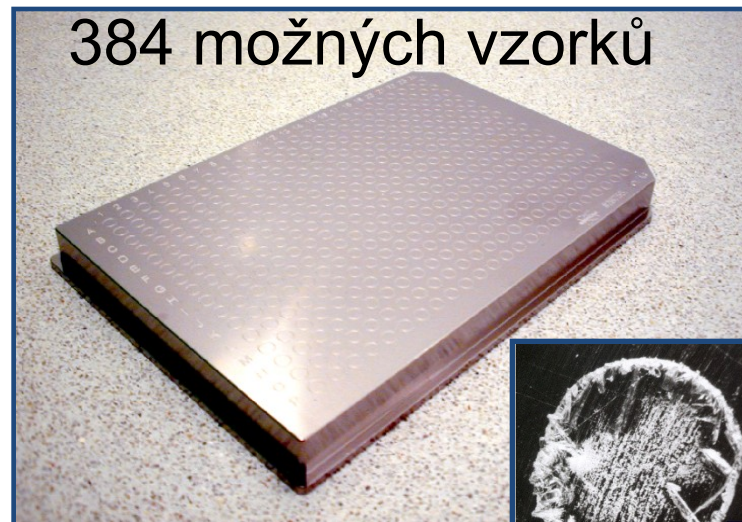
Bakteriální kmen: sbírkový kmen nebo divoký izolát; klinický izolát



MALDI – TOF MS analýza

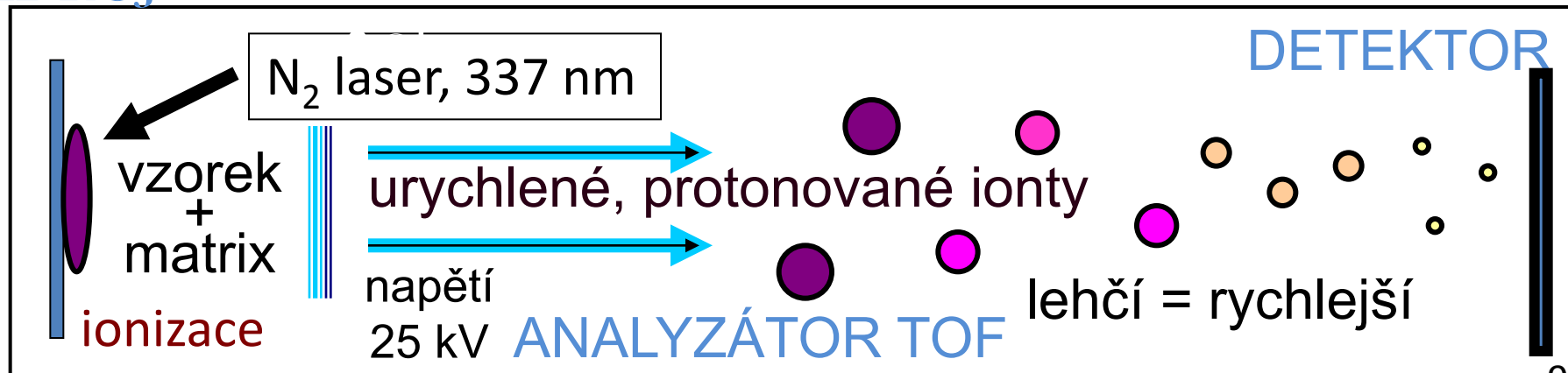
Mgr. Ondrej Šedo, Ph.D.

- Každý kmen
 - 3 spoty na MALDI desce
 - vysušení při RT
- MALDI-TOF MS analýza



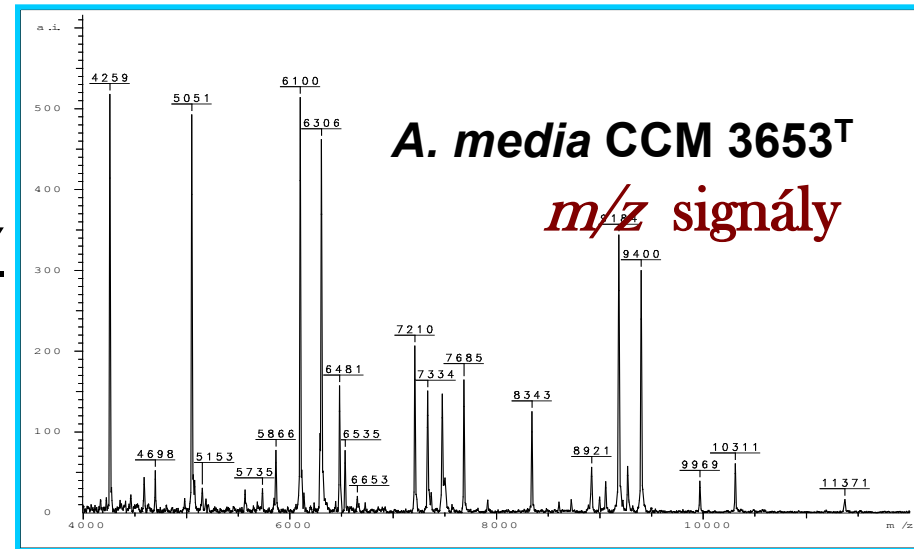
MALDI destička

ZDROJ



Analýza spekter

- 1 spektrum
 - suma 100-150 zásahů laseru
- 1 spot = 5 spekter
- SOFTWARE SHLUKOVÉ ANALÝZY
 - 1) FI MU - Ing. Matej Lexa, Ph.D.
 - spektra převedena na ASCII formát
(mass range 3 000 - 15 000 m/z)
 - transformována do páru vektorů
 - je vypočítána jejich cosinová vzdálenost a provedeno hierarchické aglomerativní shlukování založené na vzájemné podobnosti spekter
 - 2) Biotyper Software (Bruker Daltonics) - komerční



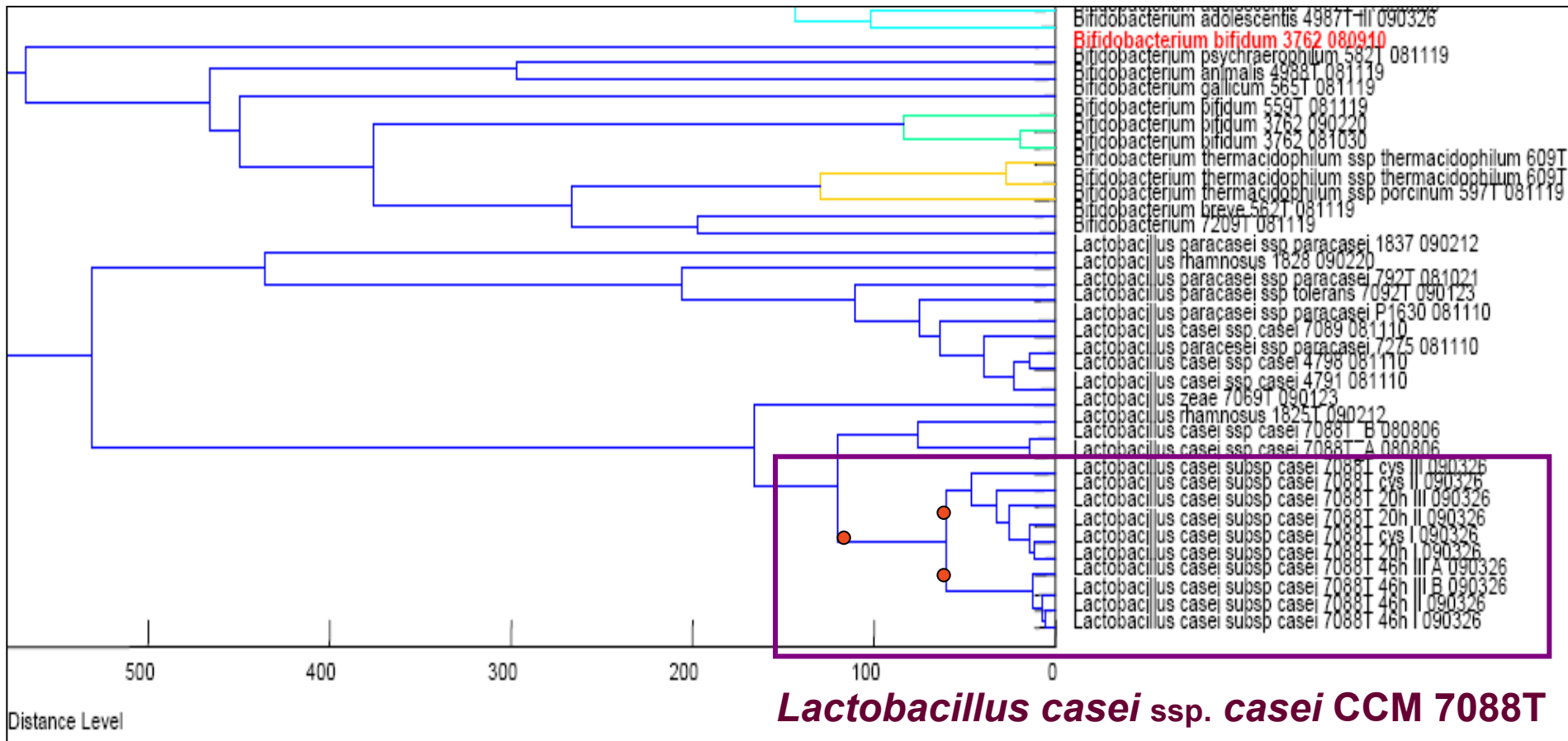
Rozlišení rodů

druhů

poddruhů

!!! Kmenů !!!! – využití – sledování změn klasifikace

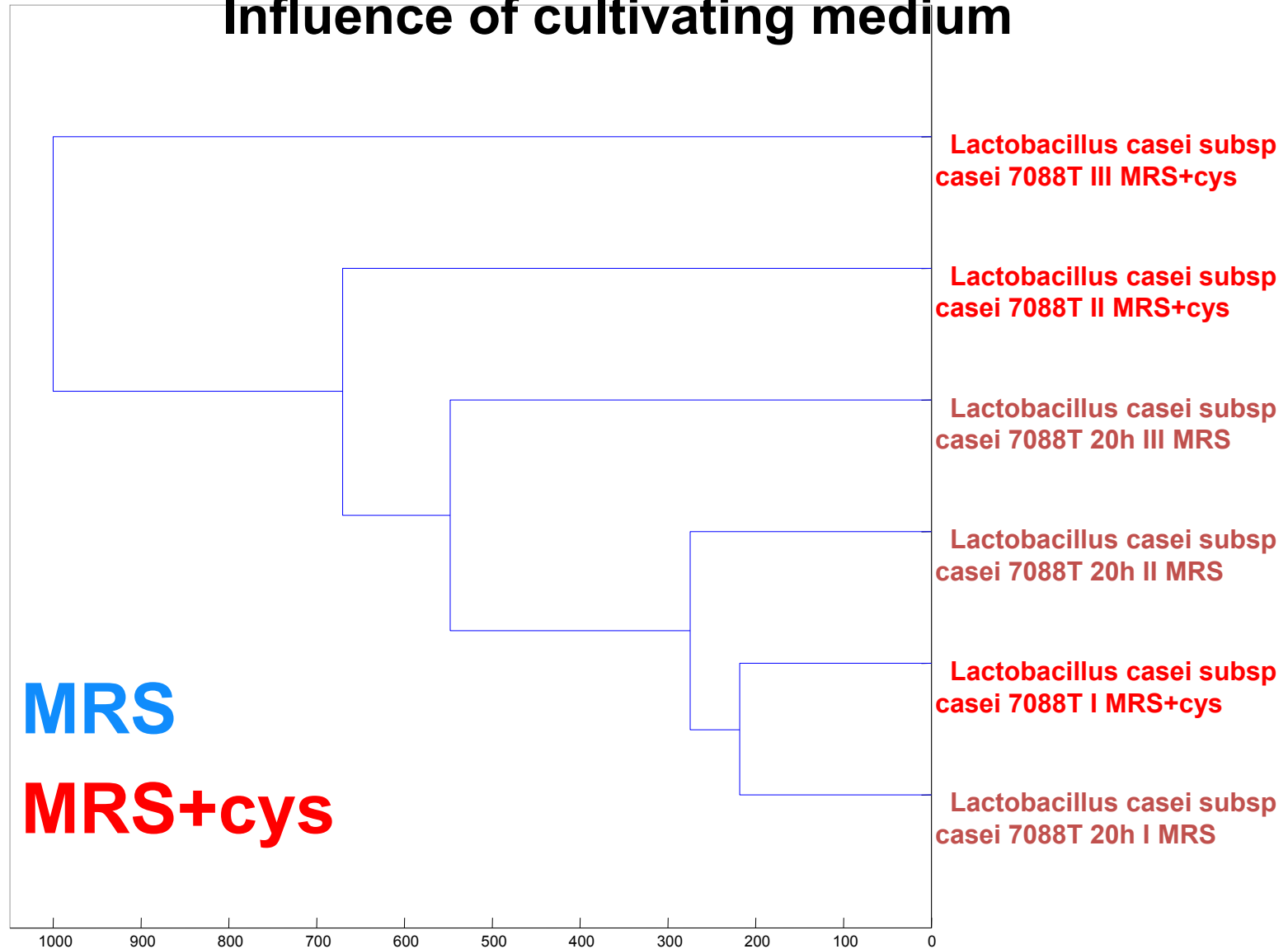
jednotlivých kmenů po práci s buňkou



***Lactobacillus casei* ssp. *casei* CCM 7088T**

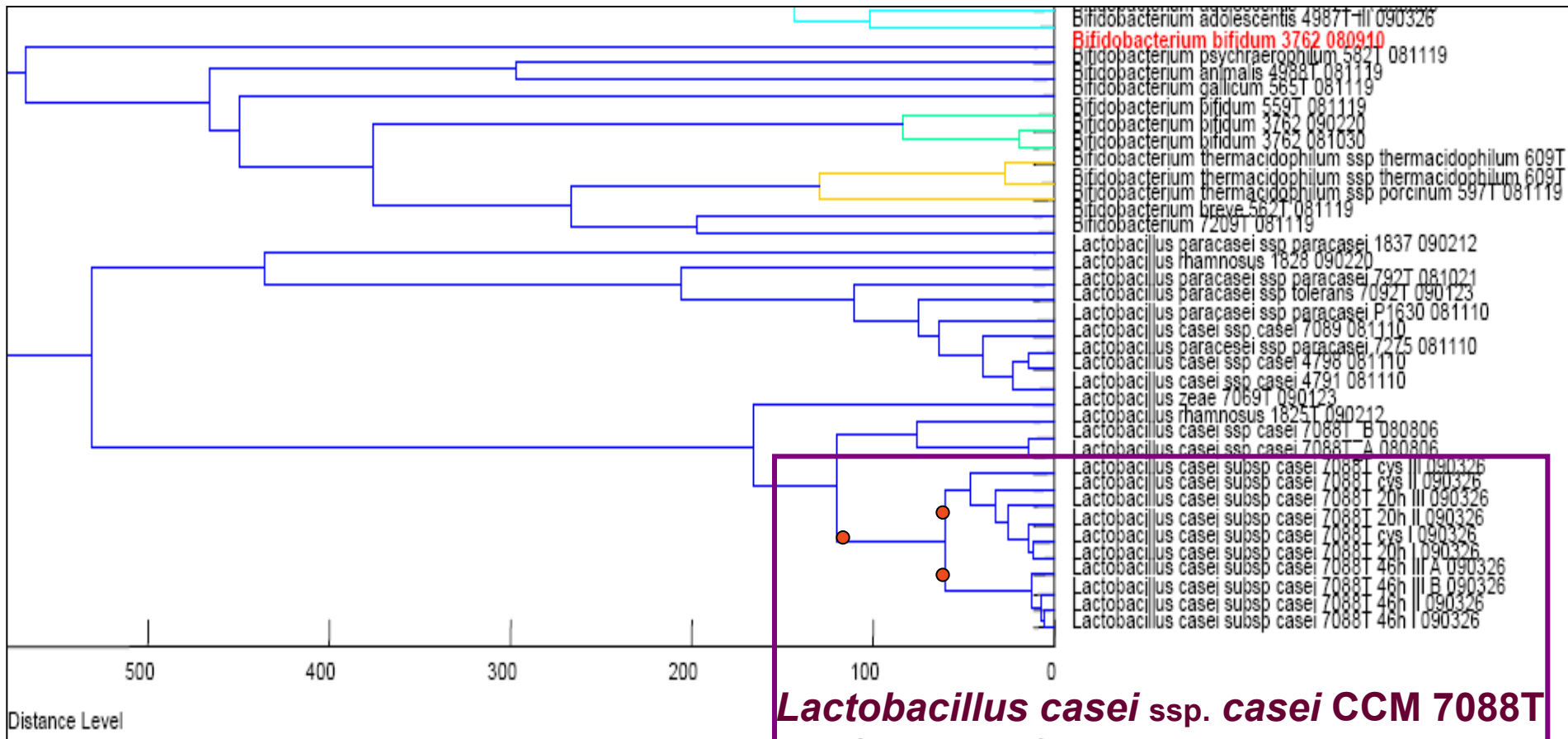
Lactobacillus casei ssp. *casei* CCM 7088T

Influence of cultivating medium



Small variations in spectra do not influence the certain sum of protein/peptide markers that remain constant (Valentine et al. 2005).

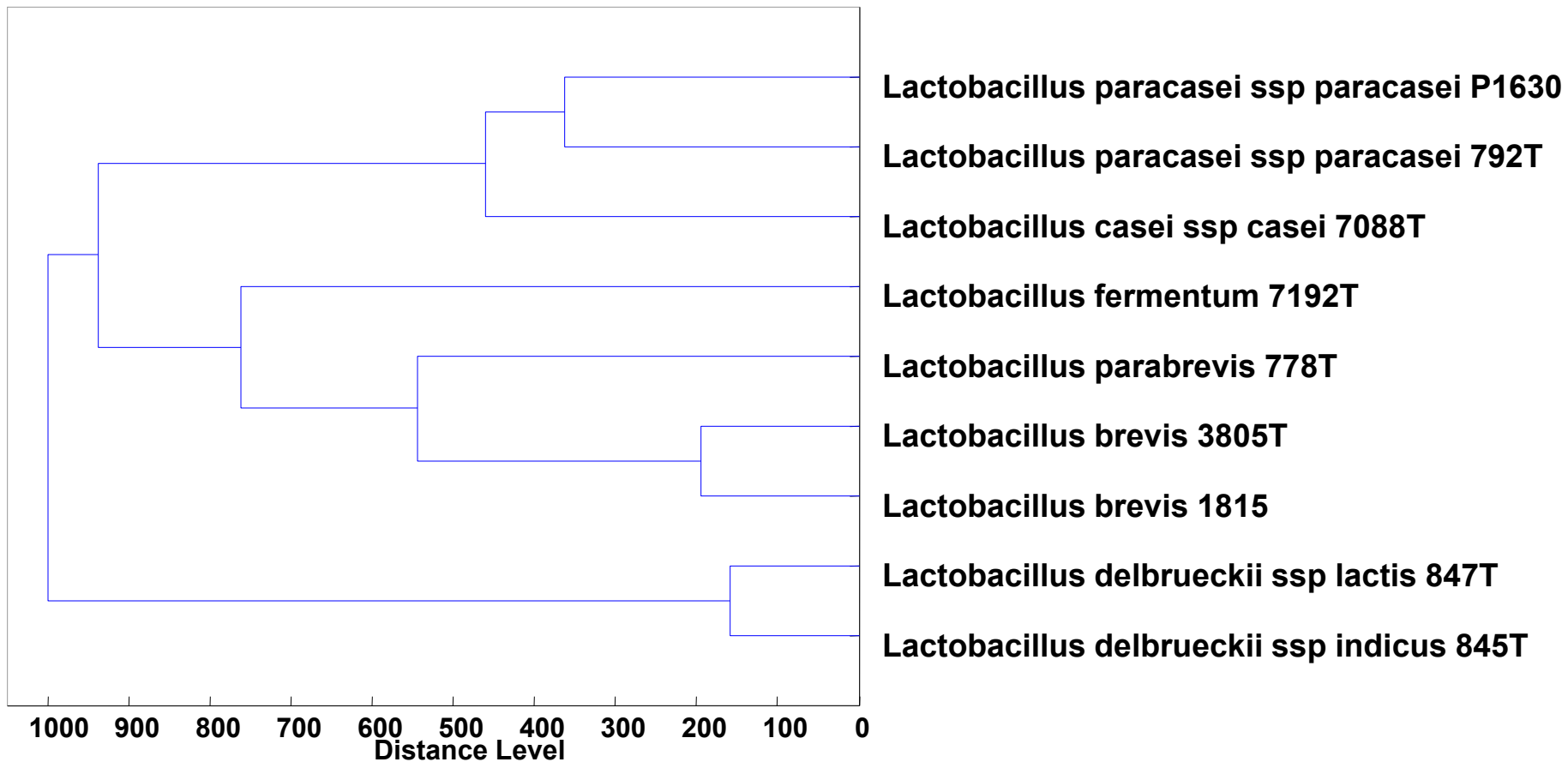
In a total dendrogram different samples of the same strain cultivated different period of time in different media form common branche



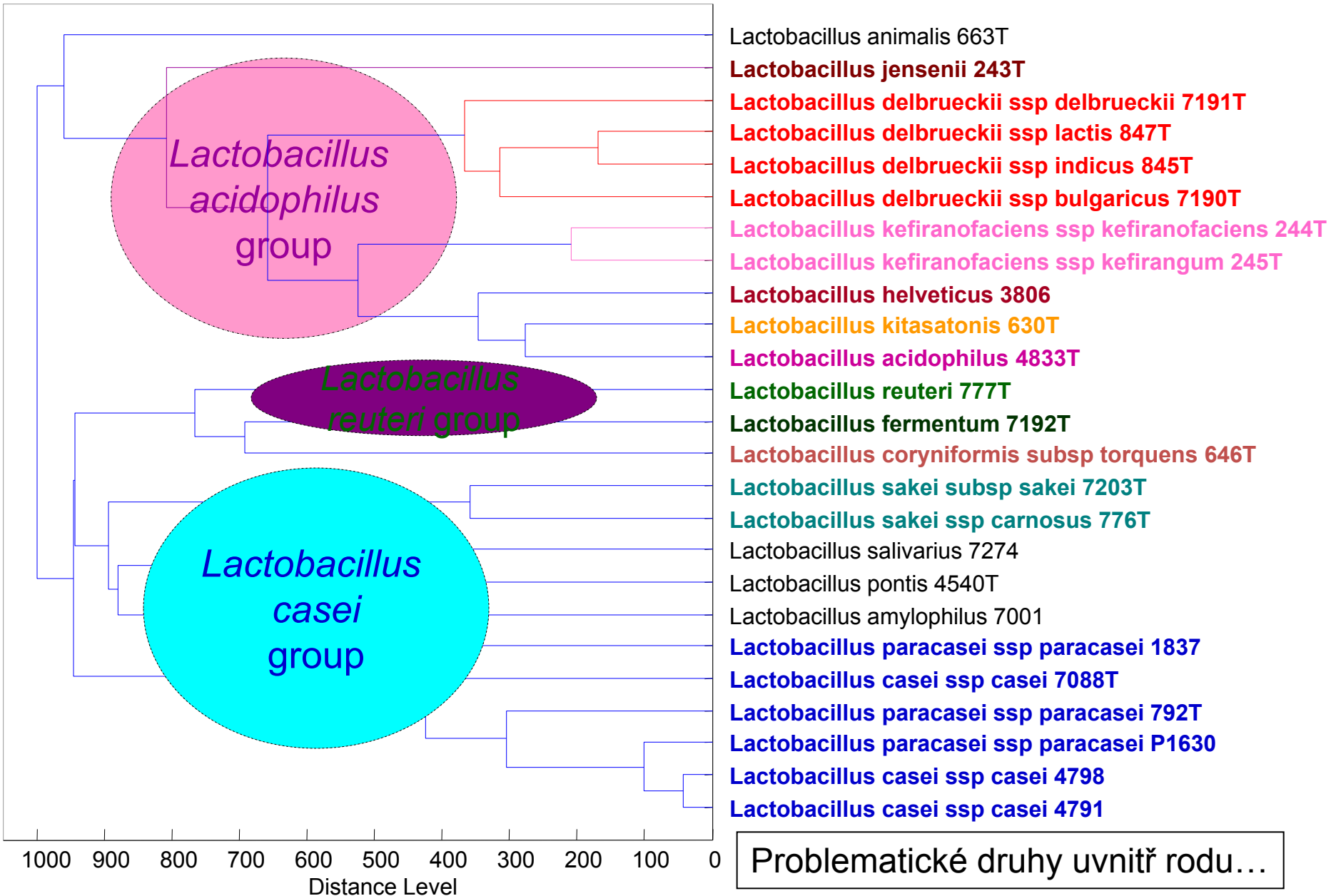
Lactobacillus casei ssp. casei CCM 7088T
MRS and MRS+cys
20h and 46h cultivation

Jeden rod – rozlišení druhů a kmenů

- závislost na počtu zástupců v dendrogramu....



L. acidophilus groups... - shoda s fylogramem??



A. bestiarum
A. jandaei
A. media
A. salmonicida
A. schubertii
A. enteropelogenes

A. caviae
A. hydrophila
A. veronii

Primáti + člověk

1951 První asociace s infekcí člověka
(fulminantní metastatická myositida)

1968 První větší lékařská zpráva popisující širší
spojení humánních infekcí s rodem *Aeromonas*

A. allosaccharophila
A. eucrenophila
A. popoffii
A. simiae
A. tecta

A. caviae

Potraviny

A. enteropelogenes
A. schubertii

A. hydrophila
A. veronii

- geny rezistence
- cytotoxické, hemolytické
- enteroinvazivní

- **Gastroenteritidy** - *A. hydrophila*, *A. veronii* biotyp *sobria*, *A. caviae*, *A. jandaei*, *A. trota*
- **Kůže a měkké tkáně** – *A. hydrophila* , *A. schubertii*
- **Infekce dýchacího traktu, pneumonie** – *A. hydrophila*
- **Infekce oka (keratitidy, ulcerace rohovky)** - *A. caviae*
- **Intraabdominální infekce – peritonitidy** - *A. hydrophila*, *A. veronii*; mortalita 56%
- **Infekce hepatobiliárního traktu a slinivky** - *A. hydrophila*
- **Celulitida, bakteriémie** – *A. jandaei*
- **hemolyticko uremický syndrom, urogenitální infekce** - *A. popoffii*, *A. caviae*
- **Septikémie** - v 95% *A. hydrophila sensu stricto*, *A. caviae*, *A. veronii* bv. *sobria*,
A. jandaei, *A. veronii* bv. *veronii*, *A. schubertii*

Komplikace při identifikaci...

Similarita sekvencí NK
(97,9-100% 16S rDNA)

**Nespolehlivé komerční
sety**

Vysoká **fenotypová podobnost**
(proto HG groups)

Pomalý vývoj **minimálních standardů** pro
definici nových druhů
– např. *A. sobria* popsána podle 2 kmenů

Odlišnosti environmentálních
a klinických izolátů?

Problematika nomenklatury - **synonyma**:
„*A. trota*” - 43 citací (2010)
“*A. enteropelogenes*” - 7 citací, ale prioritně

Konkrétně...

A. enteropelogenes* a *A. caviae

16S rRNA - odlišitelné pouze na základě 1bp
genu pro *gyrB* - odlišnost 57-69 bp

A. salmonicida* a *A. bestiarum

16S rRNA - odlišitelné pouze na základě 2bp

A. hydrophila*/ *A. media

– odlišnost jen 3bp

16Sr RNA identické

A. schuberti*/ *A. encheleia

biochemicky neodlišitelné

A. media*/ *A. eucrenophila

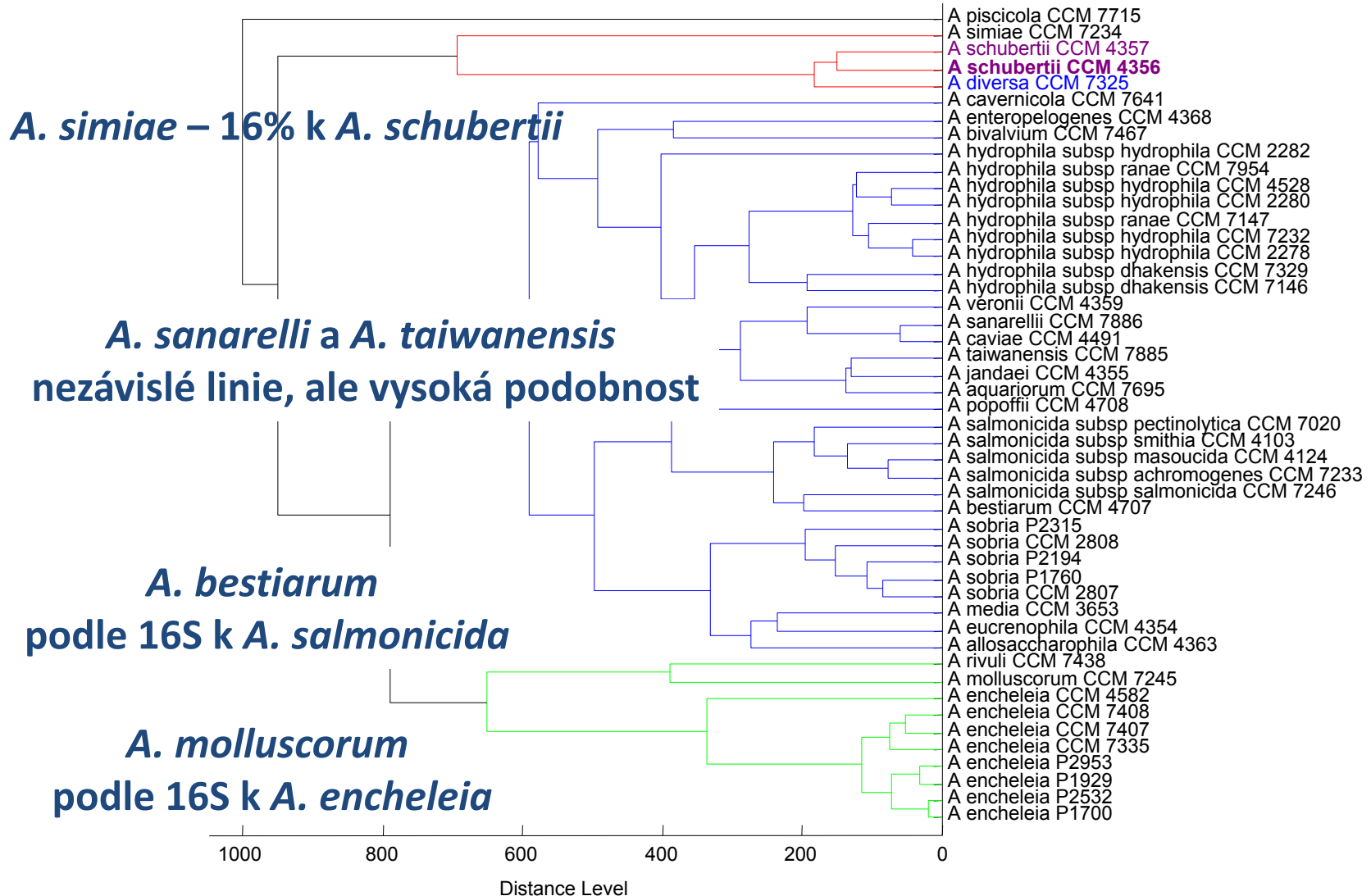
A. bestiarum*/ *A. hydrophila

In vitro – přítomnost faktorů
virulence ovlivněna kultivační
teplotou

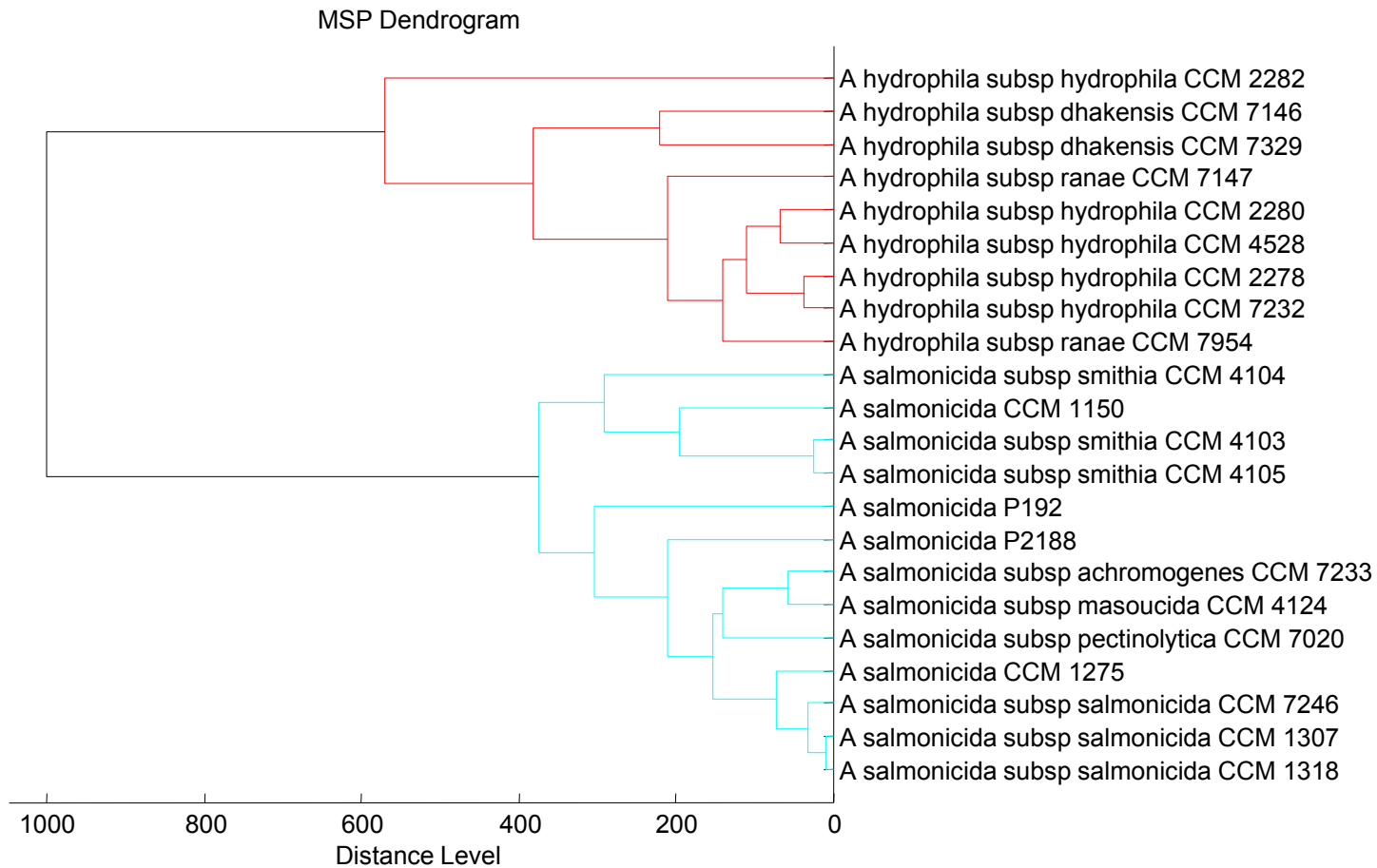
Genetické clustery korespondují s
populacemi s odlišnou ekologií

Př: *A. diversa* – nejpríbuznější *A. schubertii*; (Galbis 2010)

MSP Dendrogram



Typizace kmenů aeromonád

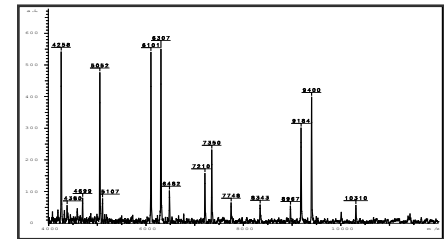


- Podmínky kultivace mají na výsledná spektra malý vliv
- **určitá hladina konstantních signálů** „bazální“ výbavy proteomu (základní hladina proteinů syntetizovaná stále nezávisle na změně podmínek)
- Pomalu rostoucí – prodloužení doby kultivace
- Chemikálie – ! **nejvyšší čistoty** ! (pro MS či HPLC)
- Pozor na **uvolňování látek** z „nekvalitních“ plastů

Využití techniky MALDI-TOF MS

- Citlivá analytická ionizační technika MS (UV laser)
- Proteomika: šetrná ionizace peptidů a proteinů
- Využití MALDI-TOF MS v mikrobiologii:

MALDI-MS profil - identifikace rodu a druhů
- autentizace kmene
- analýza biomarkerů



Klinická diagnostika: *Bacillus* (i spory), *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Haemophilus* (screening nemocničních kmenů), *Helicobacter*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* (MRSA a MSSA)

Rychlá chemotaxonomie – i druhy fenotypicky a genotypicky nerozlišitelné

Enviromentální studie, potravinářství – kontrola čistoty, pg MO

Analýza specifických proteinů bakterií, hub a virů: rekombinantní proteiny, faktory virulence, enzymy, metabolity, proteiny sporových stěn a S-vrstvy, významné je studium bakteriocinů, peptidové mapování

Sekvenování bakteriálních nukleových kyselin

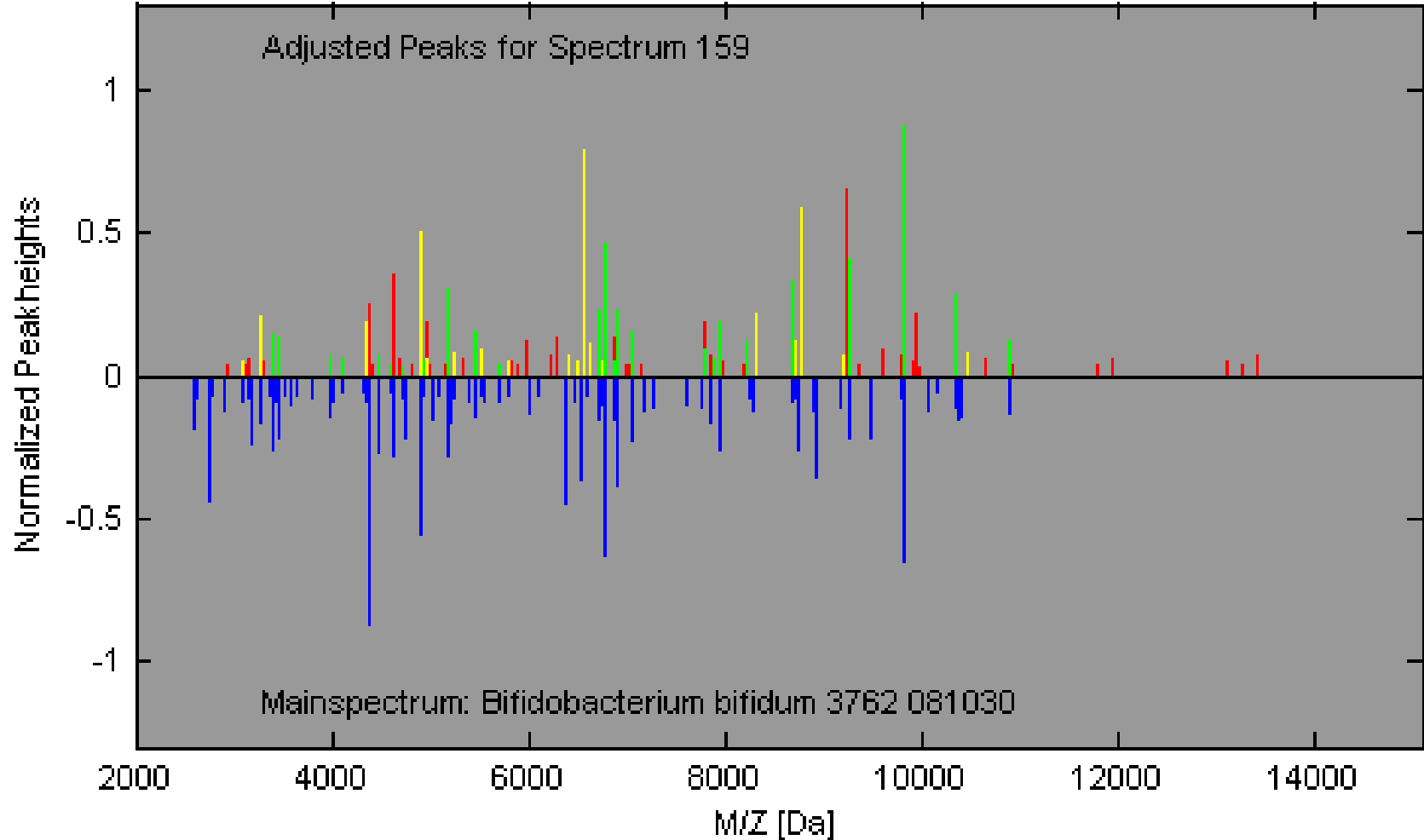
- **Referenční spektra:** je možno identifikovat neznámý vzorek

Potravinářství, technologie..

- Kontrola kontaminace
- Monitoring mutantních kmenů
- Potvrzení identity kmene
- Kmenově specifické vlastnosti – LAB
 - proteolytické, lipolytické...
 - predikce vlastností „podobných“ kmenů
- Biomarkery

Lactobacillus 52 6-57-5A

Adjusted Normalized Peaklists



Green signals – identical to reference signals

Yellow signals – identical to reference signals with aberration m/z

Red signals – distant signals

MALDI-TOF MS

Moderní technika pro mikrobiologii

- **Kapacita v odlišení a klasifikaci kmenů na druhové a poddruhové úrovni (př:MRSA, MSSA!!!)**
- **Přímá identifikace mikroorganismů**
- **rychlý screening či selektivní monitoring patogenů či metabolických produktů MO**
- **Detekce a analýza unikátních proteinů a biomarkerů**
- **Sledování dané kultury v čase!!!**

Výhody MALDI-MS

Vysoká **rychlost a jednoduchá příprava** vzorku

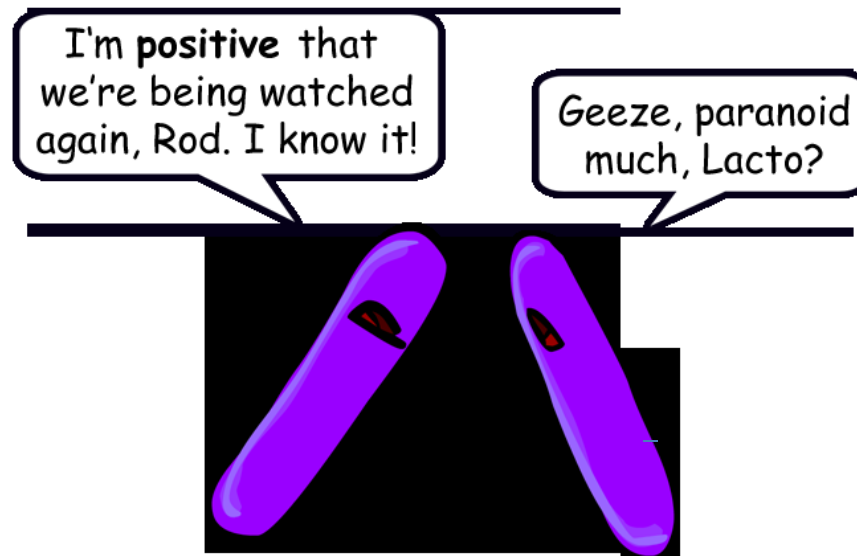
- Malý **objem** vzorku; šetření chemikáliemi
- Vysoká citlivost a nízký detekční limit
- Vysoce reprodukovatelný výstup
 - taxonomie, klin. diagnostika, charakterizace průmysl. kmenů
- Rychle vyvíjející se metodika tvorby **databází a statistického hodnocení výsledků**
- **Možnost srovnání** s informacemi sekvenování genomu, proteinů
- Možnost **kombinace** s dalšími metodami (off-line separace – ELFO, HPLC)



Výhody MALDI-MS

- **Vysoce reprodukovatelný výstup bez předchozí separace, filtrování či ošetření buněk**
- **Vysoká rozlišovací schopnost**
- **screening založený na rozšiřující se databázi referenčních spekter mikroorganismů**

Děkuji za pozornost



Zpracováno v projektu:

FRVŠ č. 1918 (2008): MALDI-MS v taxonomii prokaryot – inovace výuky mikrobiologie (hlavní řešitel: I. Sedláček).