

# METODA „MALDI-TOF“ V MIKROBIOLOGII VODY .....

## DOBRÝ SLUHA

**Dana Baudišová**

Státní zdravotní ústav

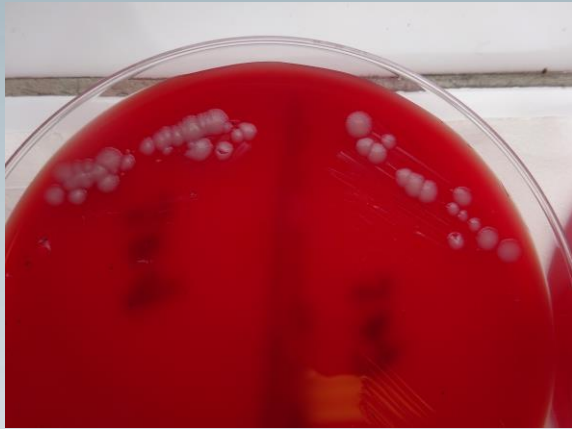


# Rozvoj techniky/nové metody/ nové přístupy

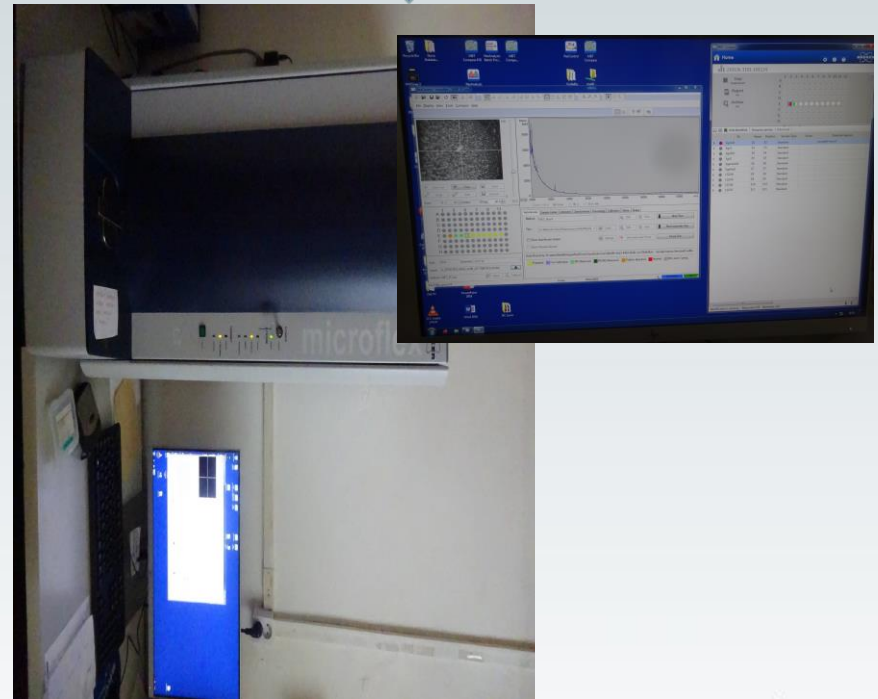
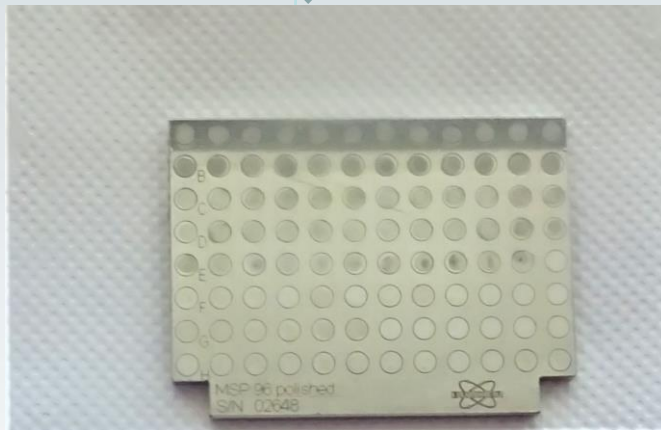
- Velký rozvoj instrumentálních metod, které umožňují výzkum mikroorganismů na molekulárních principech.
- Využití např. nukleových kyselin, **proteinů**, apod.
- Velký rozvoj taxonomie bakterií
- Nedostatek „znalostí“ k interpretaci výsledků

# Metoda MALDI-TOF

- **Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace** (matrix – assisted laser desorption/ionization -MALDI-TOF) je metoda založená na laserové desorpci a ionizaci molekul za účasti matrice.
- Jedná se o techniku, která využívá tzv. **měkké ionizace**. Ta způsobuje, že molekuly nejsou štěpeny, ale pomocí matričního roztoku (my používáme deriváty kyseliny skořicové) pouze ionizovány.
- **Nabité částice jsou rozděleny na základě molekulové hmotnosti v elektrickém a magnetickém poli.**
- V mikrobiologii slouží k identifikaci bakterií na základě **jedinečného složení proteinů**.
- Proteinové profily jsou **srovnávány s databázemi kmenů ze světových sbírek**.



- Zakápnout 0,1 ml kyseliny skořicové
- Vysušit



# Výsledky – protokol (základní)

<a href="#">G10</a> (+) (B)	07.III	Enterococcus haemoperoxidus	<a href="#">01.VIII</a>	nespolehlivá identifikace
<a href="#">G11</a> (-) (C)	08.III	nespolehlivá identifikace	<a href="#">I.32</a>	nespolehlivá identifikace
<a href="#">G12</a> (++) (A)	sT2h1	Enterococcus durans	<a href="#">II.14</a>	Enterococcus durans
<a href="#">H1</a> (++) (A)	sT2h2	Enterococcus durans	<a href="#">02.VI</a>	Enterococcus durans
<a href="#">H2</a> (+) (B)	3	Enterococcus durans	<a href="#">01.IX</a>	Enterococcus durans

- Skóre 2,3-3 (+++) vysoce pravděpodobnost druhové identifikace
- Skóre 2 -2,2999 (++) s jistotou identifikován rod, pravděpodobně druh
- Skóre 1,7 – 1,999 (+) pravděpodobná identifikace na úrovni rodu
- Menší než 1,699 nespolehlivá identifikace

# Úskalí (technické) metody

- Nutnost čisté kultury.
- Obvykle se používá 24 hodinová kultura; primokultura – orientační výsledky.
- Kultivační médium ovlivňuje přesnost výsledků.
- V případě, že opakovaně vychází nízké identifikační skóre (a je tudíž i nepřesná identifikace), může se kultura před aplikací matrice zkusit ošetřit kyselinou mravenčí (pro zvýšení kyselosti) – zejména **G+ bakterie**.

<u>G5</u> (++) (A)	M75	Enterococcus gallinarum	02.VIII	Enterococcus gallinarum	02.VII
<u>G9</u> (+) (B)	M75sb	Enterococcus gallinarum	1.88	Enterococcus gallinarum	1.77

Okyselený vzorek			Původní		
Název analytu	ID analytu	Organismus (nejlepší shoda)	Hodnota skóre	Organismus (nejlepší shoda)	Hodnota skóre
<u>D3</u> (+++)(A)	St3/031	Enterococcus hirae	1.49	nespolehlivá identifikace	1.45
<u>D4</u> (+++)(A)	2	Enterococcus durans	1.32	Enterococcus durans	1.93
<u>D5</u> (+++)(A)	3	Enterococcus durans	1.27	nespolehlivá identifikace	1.59
<u>D6</u> (+++)(A)	4	Enterococcus durans	1.49	nespolehlivá identifikace	1.38
<u>D7</u> (+++)(A)	5	Enterococcus durans	1.35	Enterococcus durans	1.93
<u>D8</u> (+++)(A)	6	Enterococcus durans	1.53	Enterococcus durans	02.VII
<u>D9</u> (+++)(A)	7	Enterococcus durans	1.53	Enterococcus durans	1.51
<u>D10</u> (+++)(A)	8	Enterococcus faecium	1.31	nespolehlivá identifikace	1.45
<u>D11</u> (+++)(A)	9	Enterococcus faecium	1.32	nespolehlivá identifikace	1.24
<u>D12</u> (+++)(A)	10	Enterococcus hirae	1.58	nespolehlivá identifikace	1.49
<u>E1</u> (+++)(A)	11	Enterococcus hirae	1.47	nespolehlivá identifikace	1.65
<u>E2</u> (+++)(A)	12	Enterococcus hirae	1.53	Enterococcus hirae	1.97

# Interpretace výsledků

- Dostupné informace z MALDI (další části protokolu o výsledcích)
- Znalosti z mikrobiologie (fyziologie bakterií, mikrobiální ekologie, taxonomie).
- Je také nutné brát v potaz všechny dostupné informace (zdroj izolátu, kultivační médium, a jeho vlastnosti (aerobie/anaerobie), vzhled kolonií apod.).
- V případě pochybností je nutné využívat i klasické doplňující testy (mikroskopie, biochemie apod.).

**Analýza**

Název analyty: ODPověď C 9  
 Popis analyty: 9  
 ID analyty: 2021\_07\_29\_CAS\_1148-02-760  
 Datum a čas vytvoření analyty: Standardní vzorek  
 Typ analyty: Taxonomie, Diskuze taxonomie, projekt, SR taxonomie  
 Aplikovaná knihovna MSP: Taxonomie, Diskuze taxonomie, projekt, SR taxonomie  
 Strana aplikované taxonomie:

Průběh (snímek)	Odporující vzor	Hodnota skóre	Identifikace NCBI
1 (+++)	<a href="#">Enterobacter cloacae JH1106_1_CDB</a>	1,90	350
2 (**)	<a href="#">Enterobacter homachei.sp.novaeformis DSM 101087 DSM</a>	1,85	13816
3 (**)	<a href="#">Enterobacter cloacae J1319_1_CDB</a>	1,79	350
4 (**)	<a href="#">Enterobacter cloacae JH_2477_01_THL</a>	1,61	350
5 (**)	<a href="#">Enterobacter homachei.sp.novaeformis DSM 101087 DSM</a>	1,56	13816
6 (**)	<a href="#">Enterobacter cloacae JH_1170_01_THL</a>	1,50	350
7 (**)	<a href="#">Enterobacter homachei.sp.novaeformis DSM 124097 DSM</a>	1,50	13816
8 (*)	<a href="#">Enterobacter faeco DSM 116472 DSM</a>	1,49	20224
9 (*)	<a href="#">Enterobacter cloacae DSM 10082 DSM</a>	1,41	350
10 (*)	<a href="#">Enterobacter sakazakii JCV412_A1_2010_01_LBK</a>	1,6	60451

**Analýza**

Aeromonas veronii CECT 4397 DSM	Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Aeromonas veronii CECT 4217 DSM	Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Aeromonas veronii CECT 37617 DSM	Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Aeromonas veronii DSM 117797 HLM	Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Bacillus sporadicus DSM 102877 DSM	Kvalita spektra (skóre) je nízká na srovnání. Použití lepšího materiálu.
Bacteroides ovatus CCGO 41561 CCGO_2	Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Burkholderia anthracis L340 16670 HLM	je členem komplexu Burkholderia anthracis
Burkholderia anthracis Opaq 18875_1_CDB	je členem komplexu Burkholderia anthracis
Citrobacter brasili 20661_2_CDB	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter brasili 9314_2_CDB	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter brasili 13181_1_CDB	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter brasili 22014_1_CDB	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter brasili DSM 19179 DSM	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter brasili DSM 160979 DSM	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter brasili DSM 160979 HLM	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter brasili L340 12197 L340	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter brasili L340 12197 L340	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter gilliesii CCGO 2748 CCGO	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter gilliesii DSM 158847 DSM	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter gilliesii DSM 138847 HLM	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter moutonensis DSM 138871 HLM	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Citrobacter yongae DSM 173787 HLM	je členem komplexu Citrobacter brasili. Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Clonostilium berytus 1011 DSM 512 BOG	Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Clonostilium berytus 1072_ATCC 27527 BOG	Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Cryptosporidium parvum ATCC 14118 THL	je členem komplexu Cryptosporidium parvum
Elizabethkingia meningitidis DSM 146177 HLM	Děly tohoto rodu mají větší podobnost vzor: Proto je obtížné rozlišit jejich druh.
Enterobacter sakazakii DSM 175667 DSM	je členem komplexu Enterobacter cloacae
Enterobacter sakazakii JCV412_A1_2010_01_LBK	je členem komplexu Enterobacter cloacae
Enterobacter heparum DSM 101088 DSM	je členem komplexu Enterobacter cloacae
Enterobacter heparum DSM 101087 DSM	je členem komplexu Enterobacter cloacae
Enterobacter heparum DSM 101088 DSM	je členem komplexu Enterobacter cloacae
Enterobacter heparum DSM 101089 DSM	je členem komplexu Enterobacter cloacae
Enterobacter heparum DSM 101090 DSM	je členem komplexu Enterobacter cloacae
Enterobacter heparum DSM 101091 DSM	je členem komplexu Enterobacter cloacae



# Další informace – NCBI identifikátor

Prohlížeč taxonomie (Legionella) x +  
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=458

Entrez PubMed Nukleotid Bilkovina Genom Struktura PMC Taxonomie Biokolekce

Hledat [ ] jako celé jméno [x] zamknout [ ] Jit [ ] Jasný [ ]  
Ukázat [ 3 ] úrovně pomoci filtru: [ none ]

## Legionella rubrilucens

ID taxonomie: 458 (pro odkazy v člencích použijte NCBI:tsid458)  
aktuální název  
*Legionella rubrilucens* Brenner et al. 1985  
typ kmene *Legionella rubrilucens*: [ATCC:35304](#), [CCUG:29671](#), [CIP: 103848](#), [JCM:7565](#), [NCTC:11987](#), personal: : WA-270A-C2, [DSM:11884](#)

NCBI BLAST jméno: **g-proteobakterie**  
Pořadí: **druh**  
Genetický kód: [Translační tabulka 11 \(Bakteriální, Archeální a rostlinný PlastiD\)](#)

[Rodokmen \(plný\)](#)  
[buněčné organismy](#); [Bakterie](#); [Proteobakterie](#); [Gamaproteobakterie](#); [Legionellales](#); [Legionellaceae](#); [Legionella](#)

Entrez records		
Název databáze	Přímé odkazy	Odkazy z typu
Nukleotid	224	126
Bilkovina	5,883	-
Genom	1	-
Popset	7	-
PubMed Central	23	-
Gen	2,970	-
Experimenty SRA	5	-
Identické proteinové skupiny	3,356	-
Bio projekt	5	-
Bio ukázka	8	4
Shromáždění	2	2
Sonda	2	-
Taxonomie	1	-

### Komentáře a reference:

[Brenner DJ et al. \(1985\)](#)  
Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Gorman, G.W., Wilkinson, H.W., Bibb, W.F., Hackel, M., Tyndall, R.L., Campbell, J., Feeley, J.C., Thacker, W.L., Skaliv, P., Martin, W.T., Brake, B.J., Fields, B.S., McEachern, H.V. a Corcoran, L.K. "Deset nových druhů Legionella." Int. J. Syst. Bacteriol. (1985) 35:50-59. [Není k dispozici žádný záznam PubMed.]

Hookey JV et al. (1996)  
Hookey, J.V., Saunders, N.A., Fry, N.K., Birtles, R.J., and Harrison, T.G. "Phylogeny of Legionellaceae based on small-subunit ribosomal DNA sequences and proposal of Legionella lytica comb. listopad. pro amébální patogeny podobné legionellám." Int. J. Syst. Bacteriol. (1996) 46:526-531. [Není k dispozici žádný záznam PubMed.]

Legionella erythra = Legionella rubrilucens?  
Hookey et al. (1996) považují L. erythra a L. rubrilucens za poddruhy stejného druhu.

### Externí informační zdroje (NCBI LinkOut)

LinkOut	Předmět	Poskytovatel LinkOut
<a href="#">Legionella rubrilucens</a>	meta-databáze	<a href="#">BacDive</a>
<a href="#">Legionella rubrilucens WA-270A-C2</a>	specifické pro organismus	<a href="#">BioCyc</a>
<a href="#">Legionella rubrilucens Brenner et al. 1985</a>	taxonomie/fylogenetika	<a href="#">Encyklopedie života</a>
<a href="#">GOLD Multi-Isolate Organism: Go0124411</a>	specifické pro organismus	<a href="#">Genomy On Line databáze</a>
<a href="#">Legionella rubrilucens</a>	kultura/skladové sbírky	<a href="#">Globální katalog mikroorganismů</a>
<a href="#">2660238232: Legionella rubrilucens ATCC35304</a>	specifické pro organismus	<a href="#">Integrované mikrobiální genomy</a>

Sem zadejte hledaný výraz

Adresa [ ] 14:45 07.01.2022 1°C Převáz. oblačno



# Gramnegativní fakultativně anaerobní tyčky

Čeď Vibrionaceae - rod *Aeromonas* - MALDI- TOF neumí rozlišit druhy – určení pouze na rodové úrovni. Potenciální patogen např. *A. hydrophila*

## Čeď Enterobacteriaceae

- Nelze spolehlivě odlišit rody *Escherichia* a *Shigella*
- Přestože jsou popsány a s relativně vysokým identifikačním skóre identifikovány druhy, řada patří do širších komplexů (např. *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* apod. )

- *Enterobacter asburiae* RV412\_A1\_2010\_05 LBK je členem komplexu *Enterobacter cloacae*
- *Enterobacter cancerogenus* DSM 17580T DSM je členem komplexu *Enterobacter cloacae*
- *Enterobacter cloacae* ssp rozpouští DSM 16657T HAM je členem komplexu *Enterobacter cloacae*
  - *Enterobacter kobei* DSM 13645T DSM je členem komplexu *Enterobacter cloacae*
  - *Enterobacter ludwigii* DSM 16688T DSM je členem komplexu *Enterobacter cloacae*

„*Klebsiella oxytoca* a druh *ornithinolytica* / *planticola* / *terrigena* rodu *Raoultella* mají velmi podobné vzory: Proto je obtížné rozlišit jejich druh“

- Nové rody: *Lelliottia (amnigena)*, *Raoultella (ornithinolytica)*, *Leclercia (adekarboxylata)* apod.



# Gramnegativní aerobní tyčky

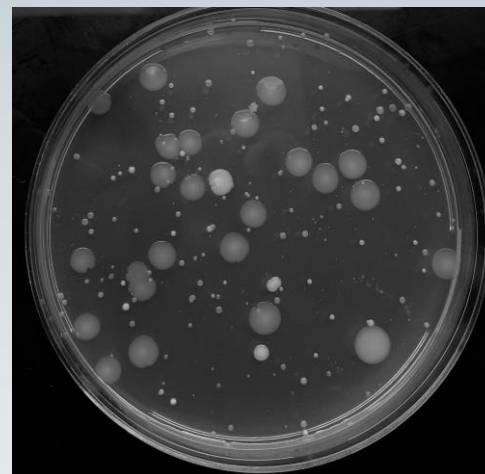
- Velmi rozsáhlá skupina. Řada „potenciálních patogenů“
- **Užitečné** – jinak se špatně se identifikuje
- Hledání problematických bakterií, např.:

Ralstonia

Burkholderia (cystická fibróza)

konfirmace pseudomonád apod.

Acidovorax



C3  
(+++)(A)

RT  
10

Ralstonia  
pickettii

2.39

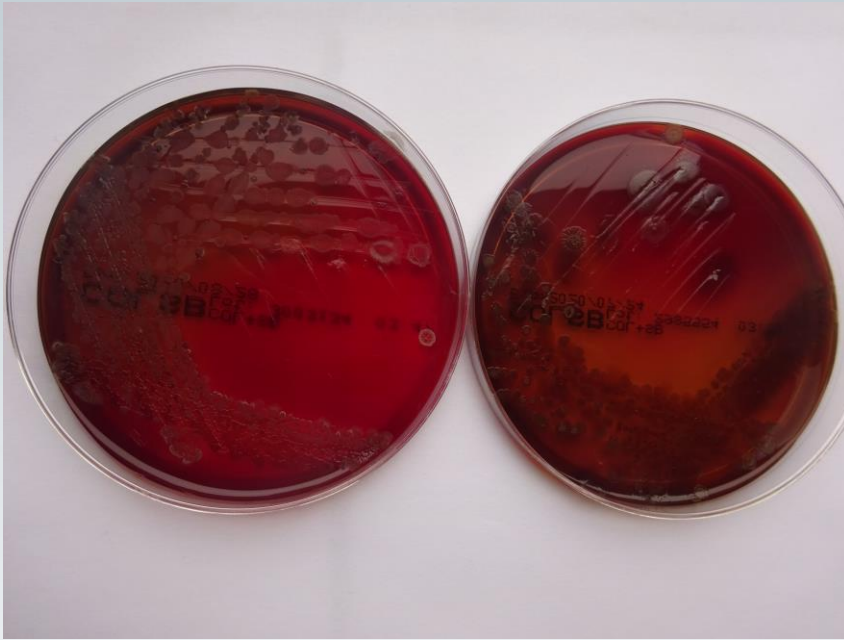
C1  
(+++)(A)

KRP

Pseudomonas  
aeruginosa

2.4

# Grampozitivní sporulující bakterie



- *Clostridium* – dobré výsledky
- *Bacillus* – problematické, rychlá sporulace. Víceméně rodové, nebo skupinové určení. “Kvalita spekter (skóre) závisí na stupni sporulace: Použijte čerstvý materiál“
- Nerozliší se např. *B. anthracis* od *B. cereus* (k rozlišení je možno použít jeho fenotypové vlastnosti, hemolýza, citlivost k penicillinu, pohyblivost, a další podrobné např. PCR testy a testy patogenity)

B2  
(+) (B)

ECO3

Bacillus anthracis

1.86

# Grampozitivní koky

## Dobré výsledky

- *Streptococcus* / *Enterococcus*:  
Interpretace výsledků – co znamenají  
nálezy jednotlivých druhů (*E. mundtii*, *E. gallinarum*, apod.)
- *Staphylococcus*: Vhodné ke konfirmaci *S. aureus*.

# Legionely

- Překvapivě dobré výsledky.
- Nikdy nenahradí sérologii a další konvenční testy
- Potvrzení druhů ze skupiny *Legionella* spp.



**PROBLÉM: pomalý růst!**

G8  
(+++)**(C)**

B4

Fluoribacter  
bozemanae

2.46

A3  
(+)**(B)**

C2

Legionella  
rubrilucens

1.86

E8  
(++)**(A)**

LSZU8

Legionella  
pneumophila

2.16

DILGER T., MELZL H., GESSNER A. (2016): Rapid and reliable identification of waterborne Legionella species by MALDI-TOF mass spektrometry. J Microbiol Methods. 2016 Aug;127:154-159. doi: 10.1016/j.mimet.2016.05.028.

# Závěr

- MALDI TOF je (i pro) mikrobiology (vody) dobrý sluha .....  
ale nic víc!

## Poděkování:

Vznik příspěvku byl podpořen v rámci MZ  
ČR - RVO (Státní zdravotní ústav - SZÚ, IČ  
75010330)