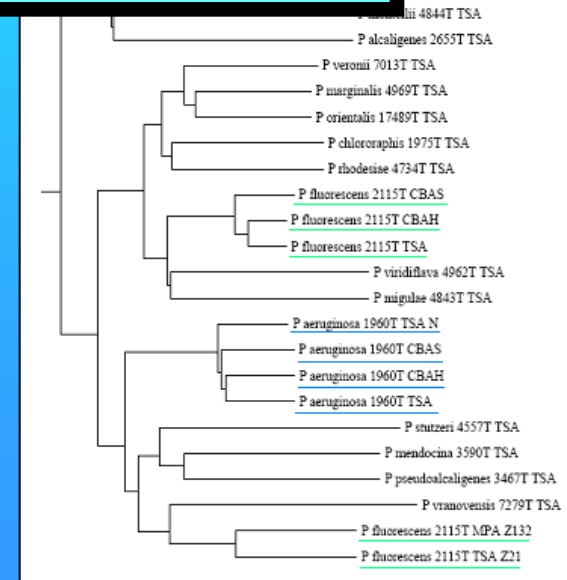
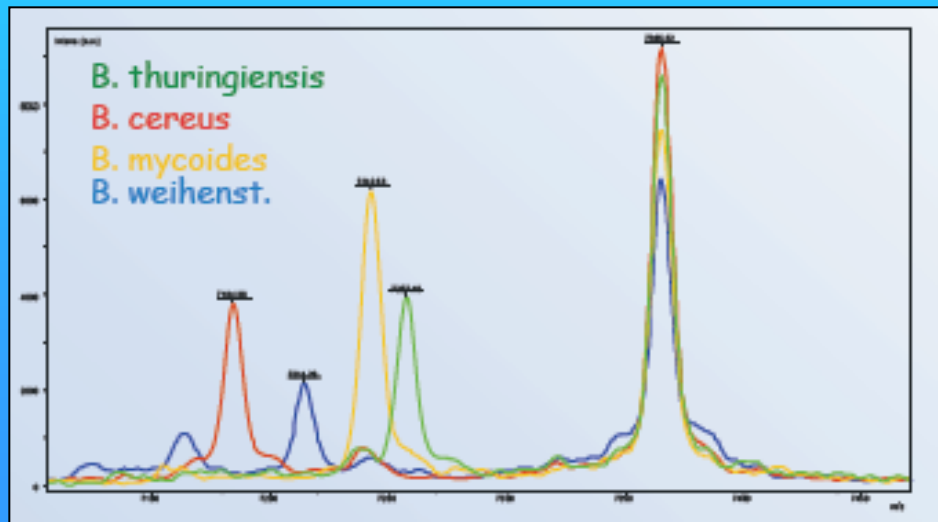


Identifikace a klasifikace mikroorganismů založená na shlukové analýze MALDI-MS protein/peptidových profilů



MALDI-TOF MS

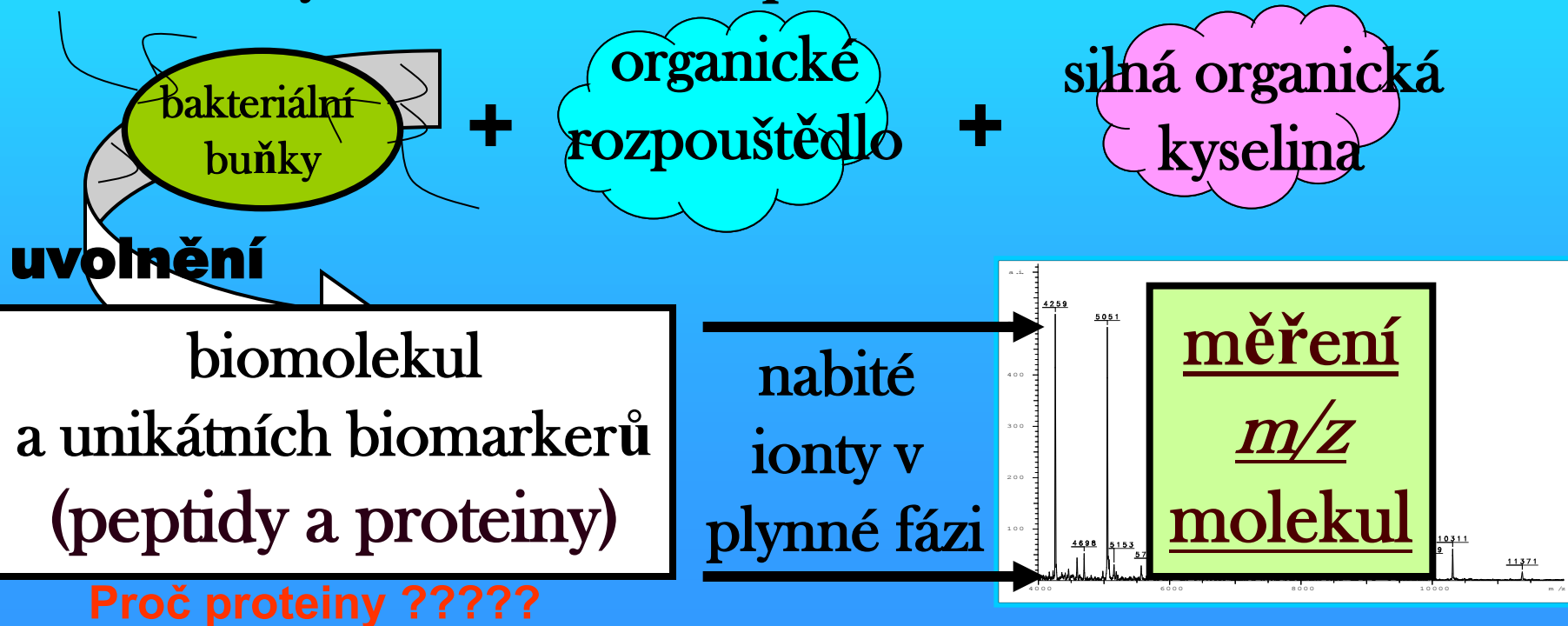
= Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -
Time of Flight Mass Spectrometry

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

- jednoduchá, rychlá, spolehlivá

chemotaxonomická technika

vysoká citlivost a reprodukovatelnost



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)

Analýza MALDI-TOF MS

- Jednotný spolehlivý protokol přípravy MALDI-MS profilů u daného bakteriálního rodu

- OPTIMALIZACE

- podmínky kultivace
- příprava vzorku
- MALDI-MS analýza „intaktních“ buněk

- Vhodný software shlukové analýzy MALDI-MS profilů a následné klasifikace a identifikace bakterií

- odlišení rodů, jednotlivých druhů rodu
- až individuálních kmenů daného druhu

Databáze
MALDI-MS
profilů

Př: klasifikace *Aeromonas*

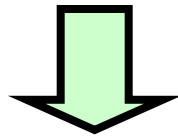
- *Aeromonas* **23 species**
 - *Aeromonas hydrophila*
 - *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila*
 - *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila* CCM 7232^T
 - *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila* CCM 1271
CCM 1275
- 17 hybridizačních sk. (genospecies)
poddruhy
biovary
- rod druh poddruh kmen
- Aeromonas caviae* (*A. media*, *A. eucrenophila*, *A. encheleia*)
KOMPLEX
Aeromonas hydrophila (*A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. popoffii*)
KOMPLEX
Aeromonas sobria (*A. veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii*)
-

Problematická identifikace aeromonád

fylogenetické studie: geny *gyrB*, *rpoD*, 16S rDNA, *dnaJ*

Aeromonády: úzce příbuzné - 97,9-100 % shoda sekvencí 16S rDNA
- liší se pouze v rozmezí 0 - 33 bp

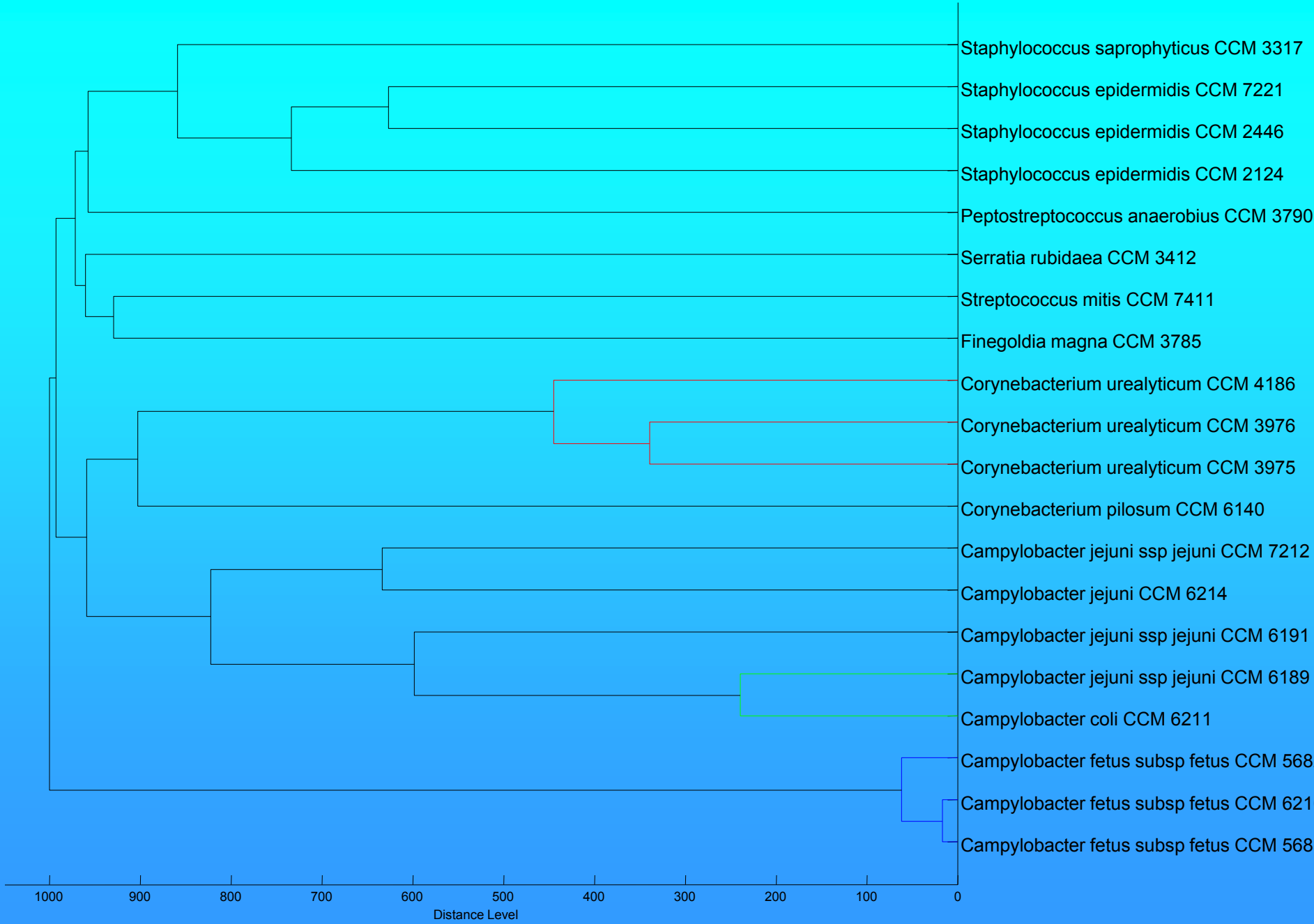
- nepřesná identifikace biochemickými testy -
výsledky vysoce shodné pro většinu druhů



- Identifikace: komplikovaná vzhledem k vysokému % shody sekvencí 16S rDNA a fenotypu

platí i pro řadu druhů rodů *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Campylobacter*.....

Score Oriented Dendrogram for bruker_ukazky



Základy metodiky přípravy a analýzy vzorku:

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), kalibrace: lysozym

Vlivy během
kultivace?
Růstové fáze?
Buněčné obaly?



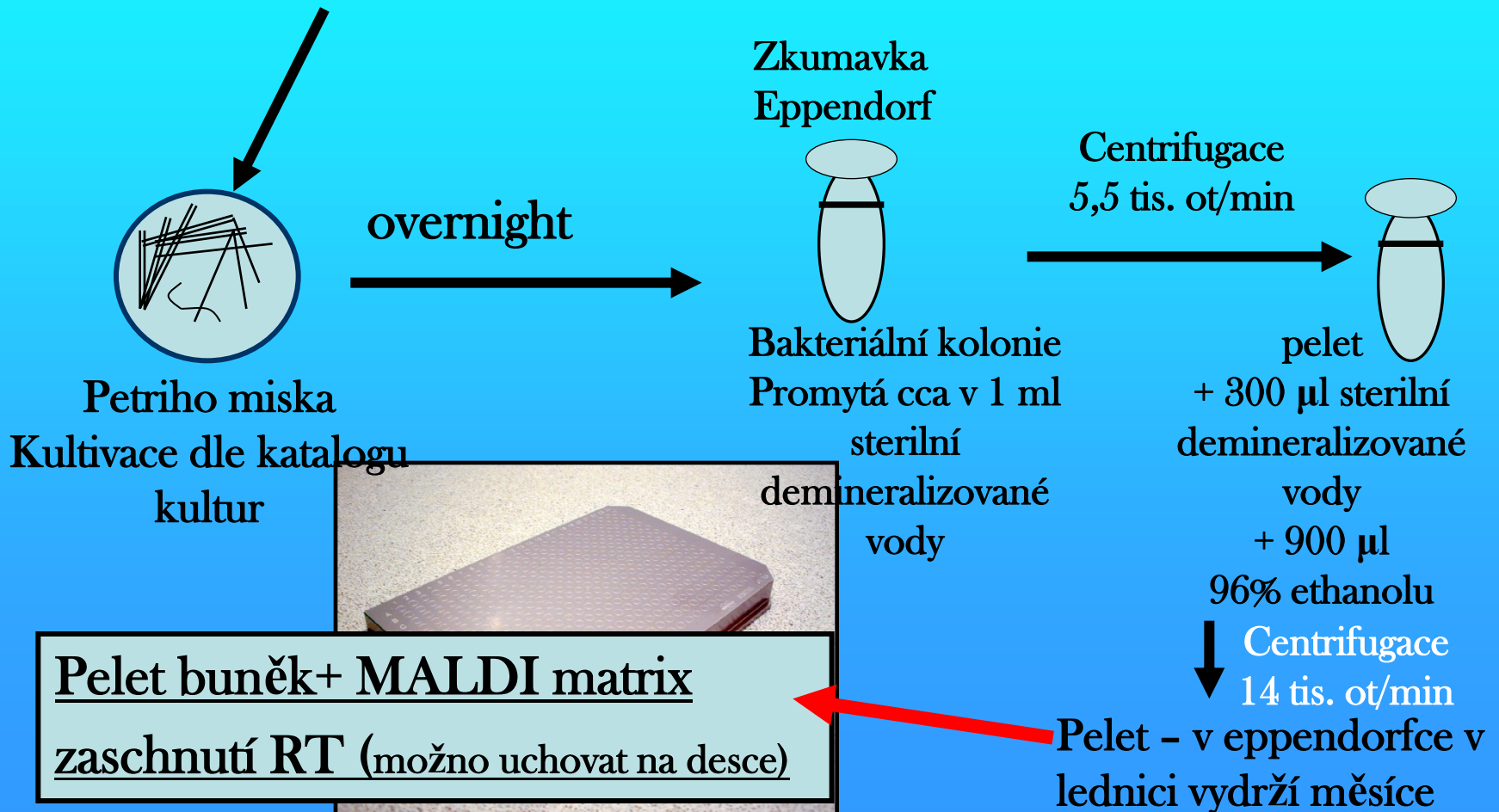
4. Úprava a zpracování spekter

5. Testy reprodukovatelnosti

6. Shluková analýza spekter

Příprava vzorku pro analýzu

Bakteriální kmen: sbírkový kmen nebo divoký izolát; klinický izolát



Příprava vzorku pro analýzu

jiný příklad: extrakce v acetonitrilu

Bakteriální kmen



Př: *Pseudomonas*

24h



Kultivace

Trypton soya agar
30°C

24h

Buňky z
druhé pasáže



buňky
+

voda : acetonitril
1:1 (v/v)

Suspenze buněk + MALDI matrix sDHB

2,5-dihydroxybenzoová kyselina

(20% acetonitril a 1% TFA)

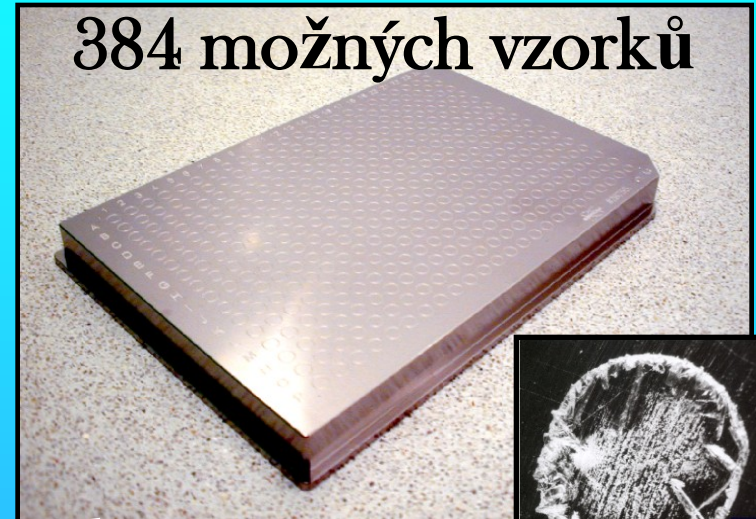


MALDI-TOF MS analýza

- Každý kmen
 - 3 spoty na MALDI desce
 - vysušení při RT

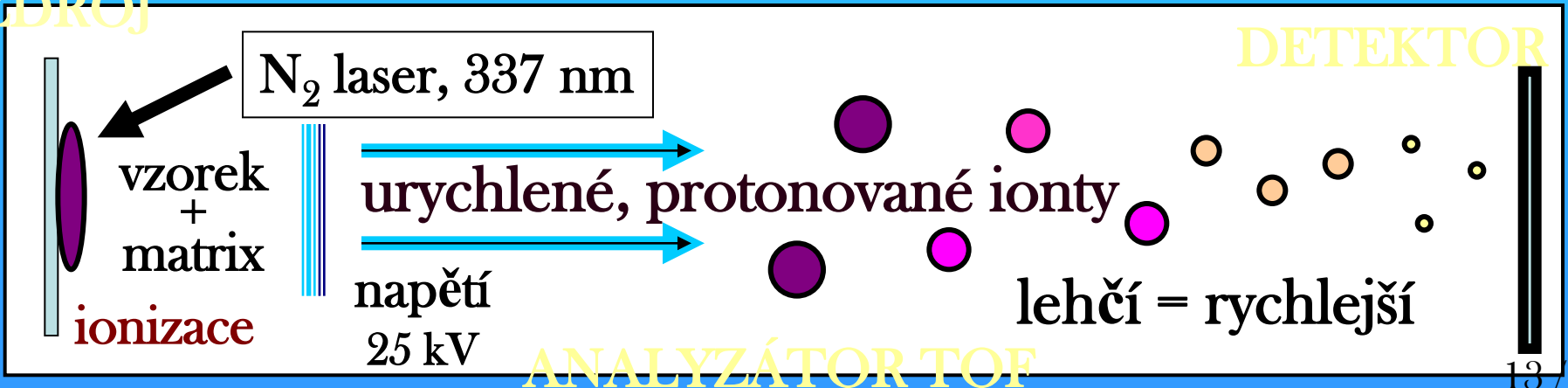
- MALDI-TOF MS analýza

- Hluboké vakuum • Citlivost 10^{-15} mol



MALDI destička

ZDROJ



MALDI-MS profil

MALDI-MS **protein/peptidový profil** je charakteristickým otiskem analyzovaného bakteriálního kmene

- Proteiny – ribozomu, membrány

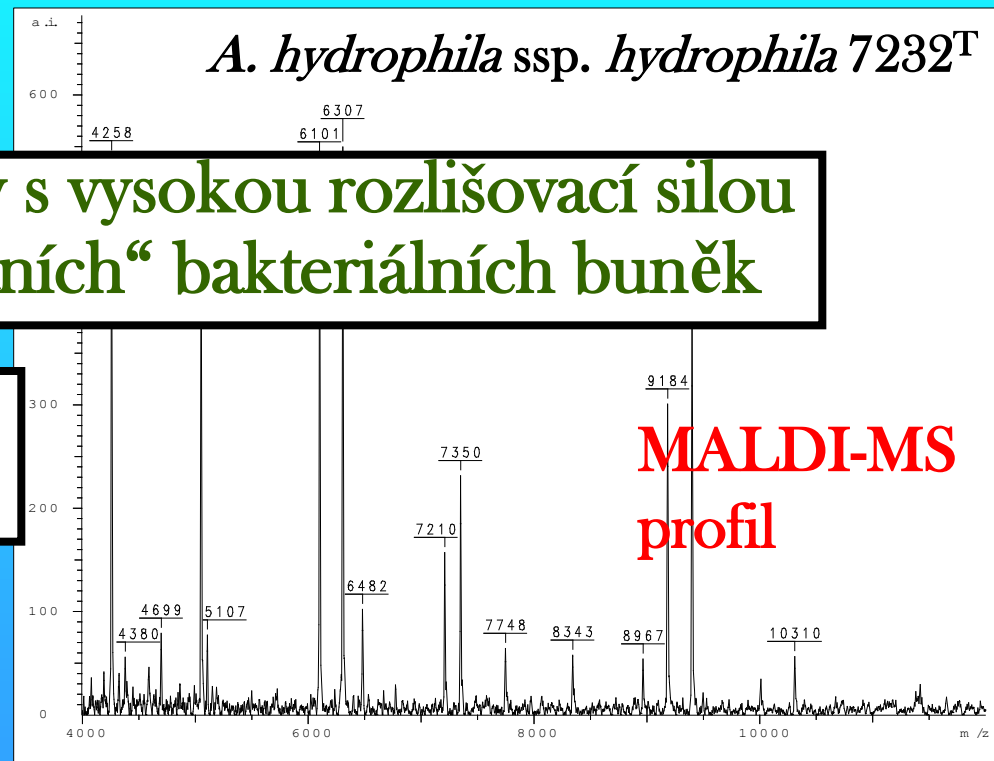
= charakteristické markery s vysokou rozlišovací silou dostupné analýzou „intaktních“ bakteriálních buněk

50% sušiny
200 - 6 000 typů molekul

→ možnost rozlišit

úzce příbuzné druhy,

neodlišitelné genotypizačními metodami a biotypizací



- Podmínky kultivace mají na výsledná spektra malý vliv - **určitá hladina konstantních signálů**

Vychází se z analýzy „bazální“ výbavy proteomu

→ konstantní výskyt základních char. signálů

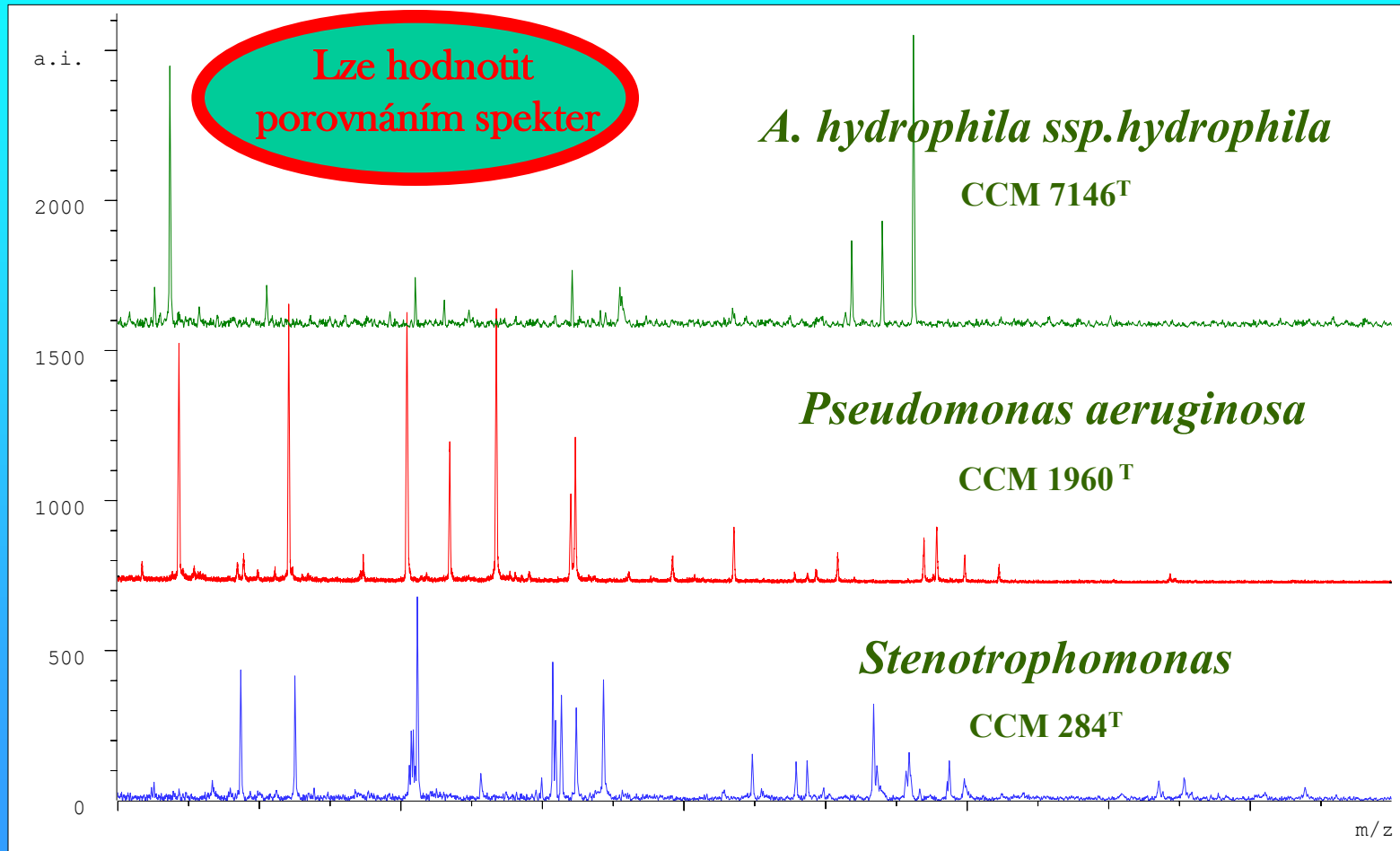
(základní hladina proteinů syntetizovaná stále

nezávisle na změně podmínek)

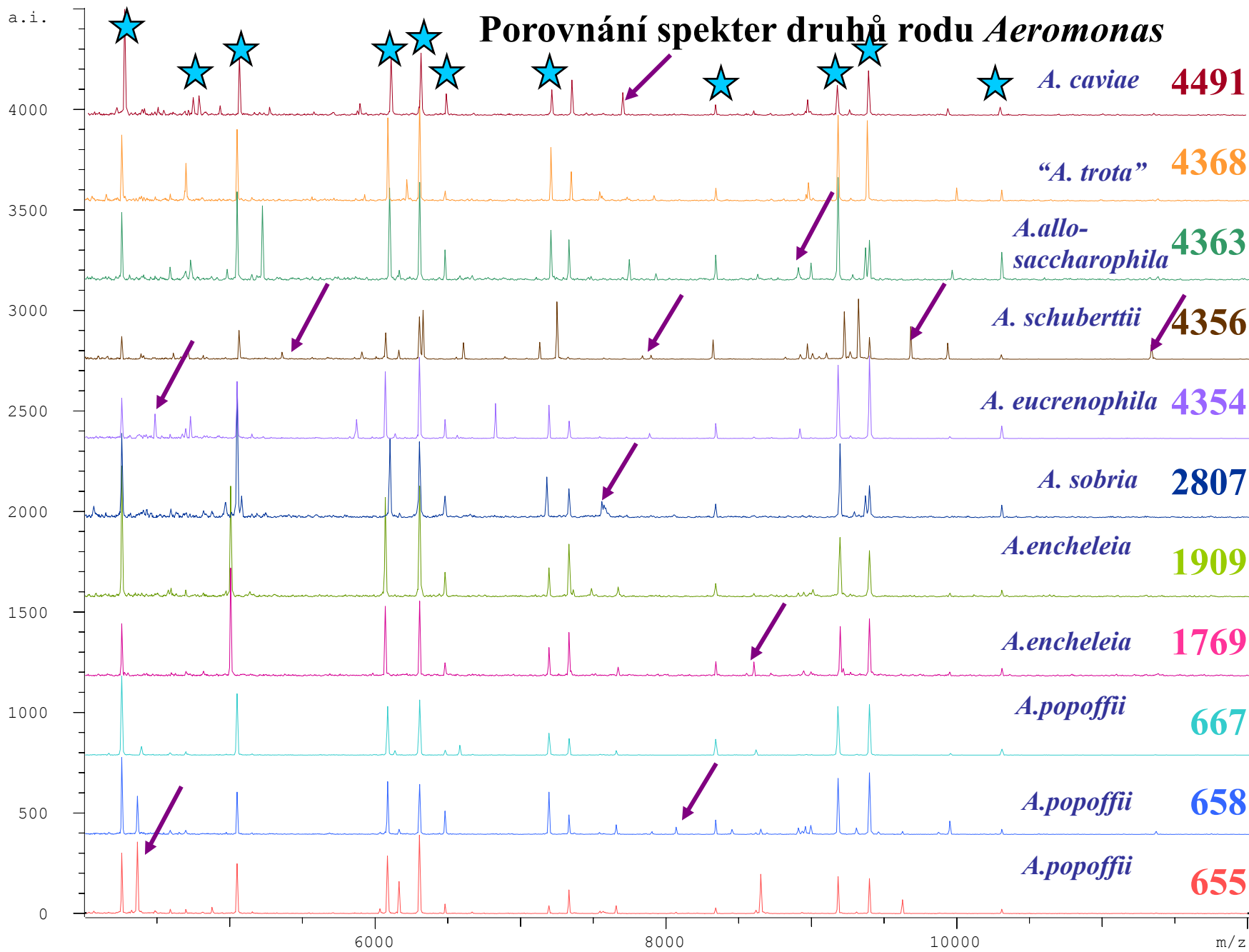
- Pomalu rostoucí - prodloužení doby kultivace
- Chemikálie - **! nejvyšší čistoty !** (pro MS či HPLC)
- Pozor na **uvolňování látek** z „nekvalitních“ plastů

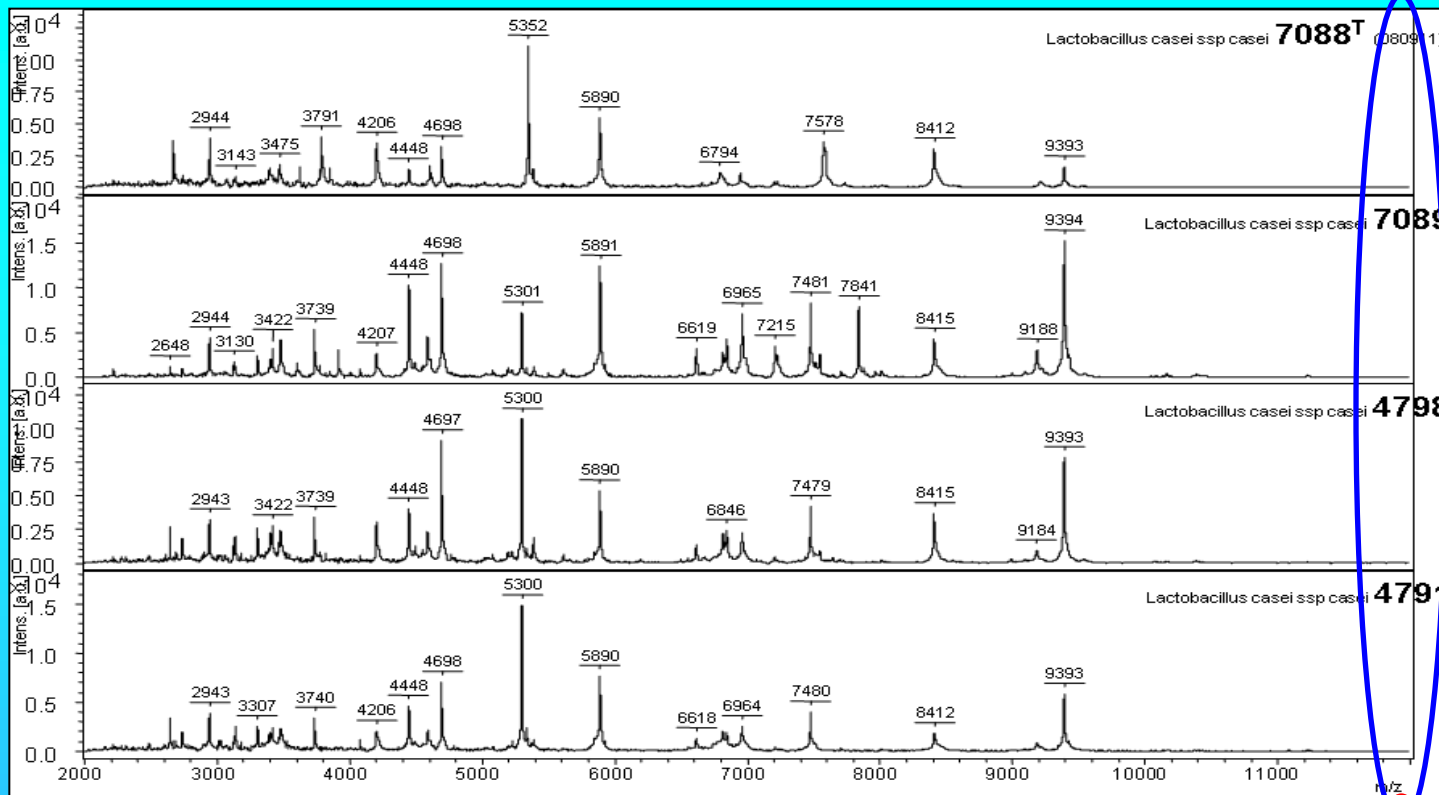
Porovnání spekter

3 typových kmenů různých rodů

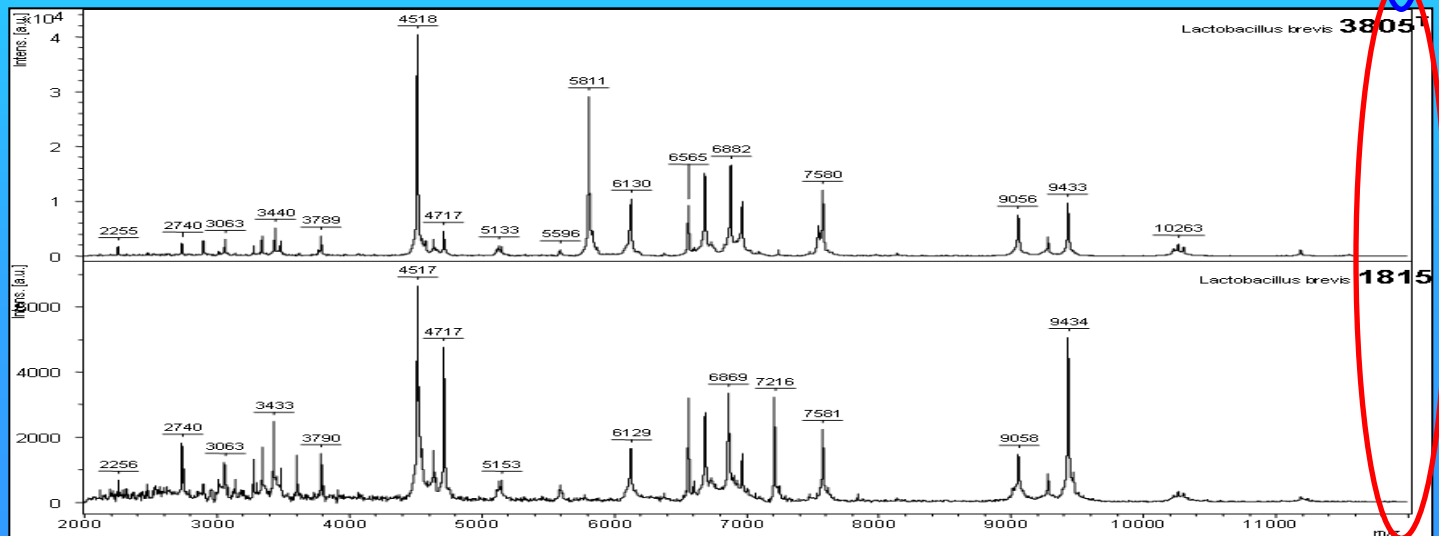


Porovnání spekter druhů rodu *Aeromonas*



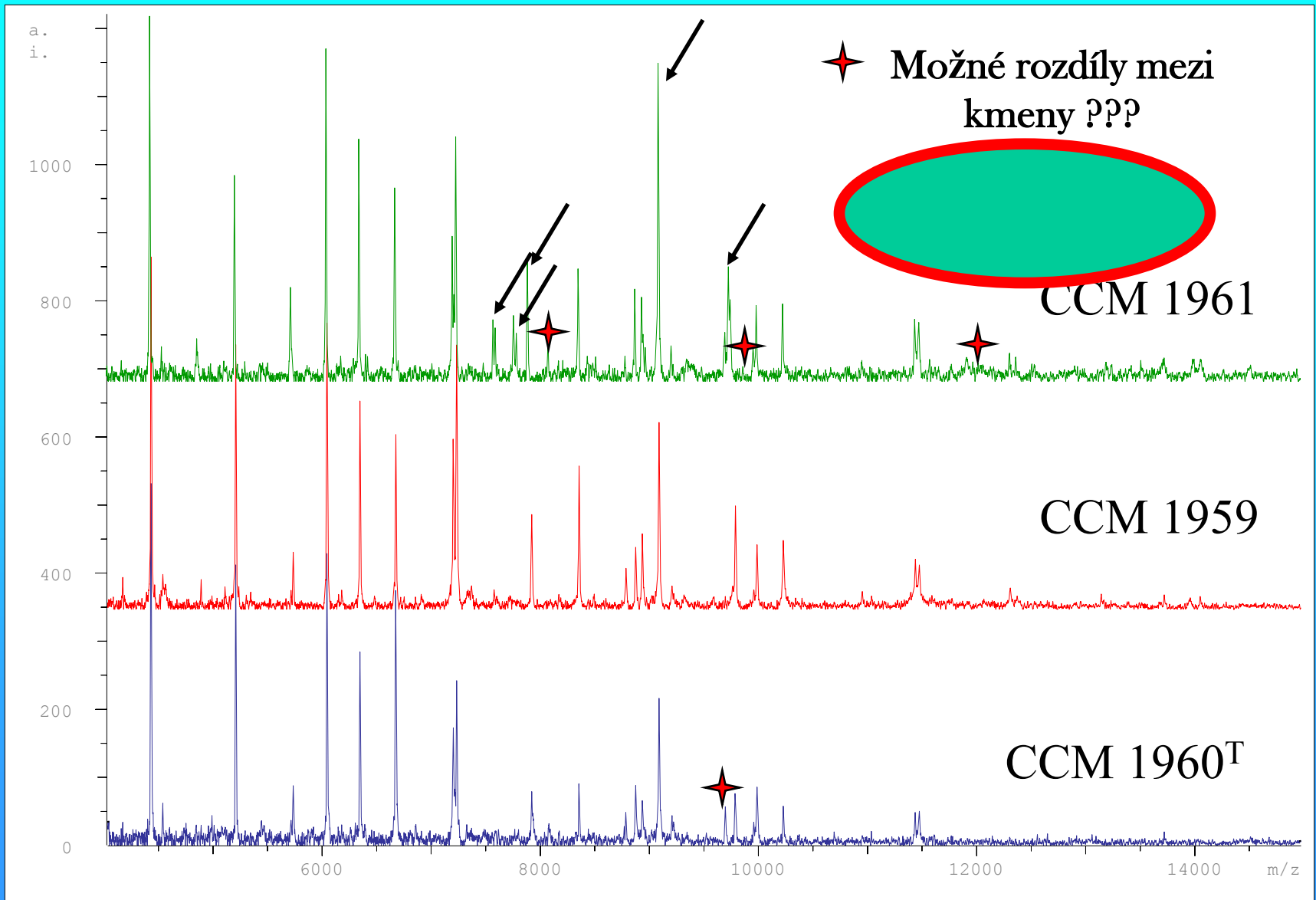


L. casei
ssp.
casei



L. brevis

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



Analýza spekter

- 1 spektrum - suma 100-150 zásahů laseru

- 1 spot → 5 spekter

- SOFTWARE SHLUKOVÉ ANALÝZY

- 1) **FI MU** - Ing. Matej Lexa, Ph.D.

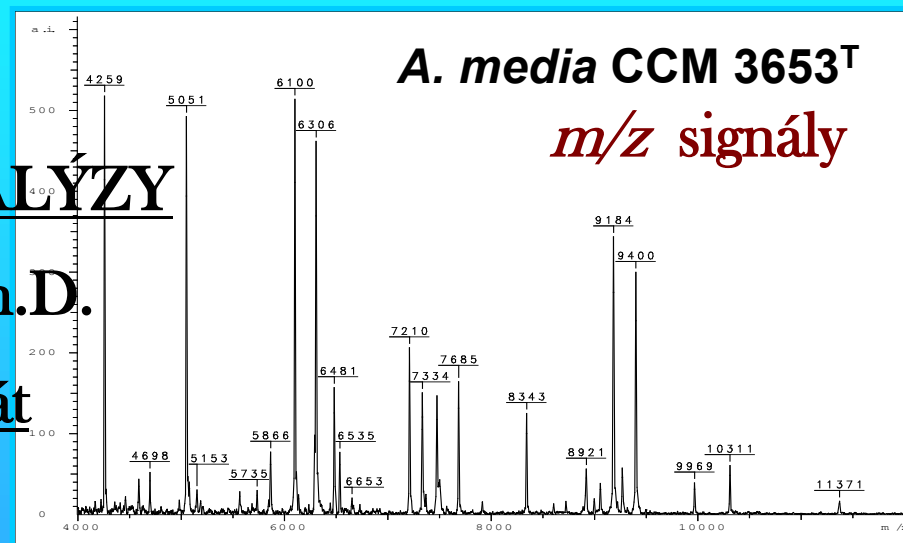
- spektra převedena na ASCII formát

(mass range 3 000 - 15 000 m/z)

- transformována do páru vektorů

- je vypočítána jejich cosinová vzdálenost a provedeno hierarchické agglomerativní shlukování založené na vzájemné podobnosti spekter

- 2) **Biotyper Software (Bruker Daltonics)** - komerční



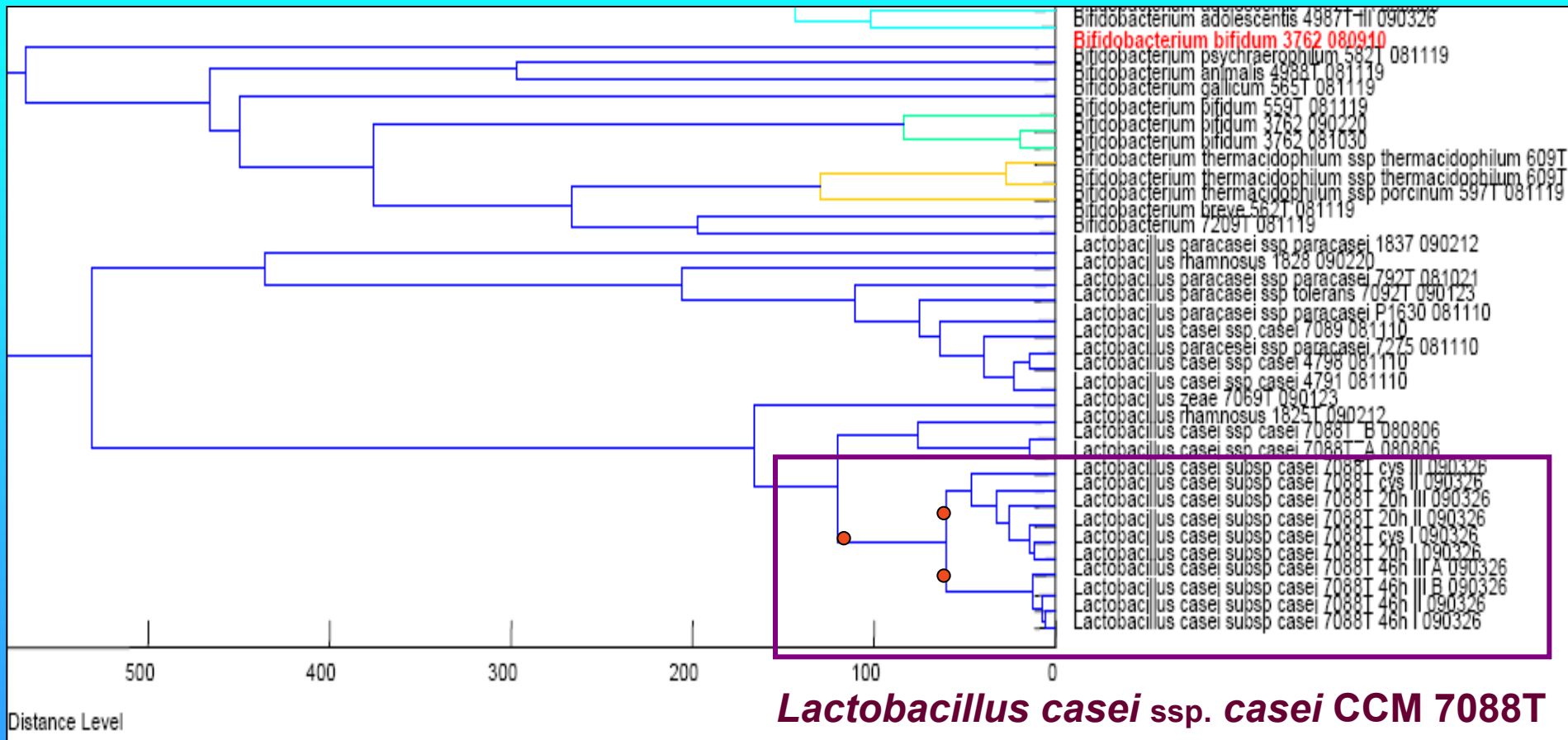
Rozlišení rodů

druhů

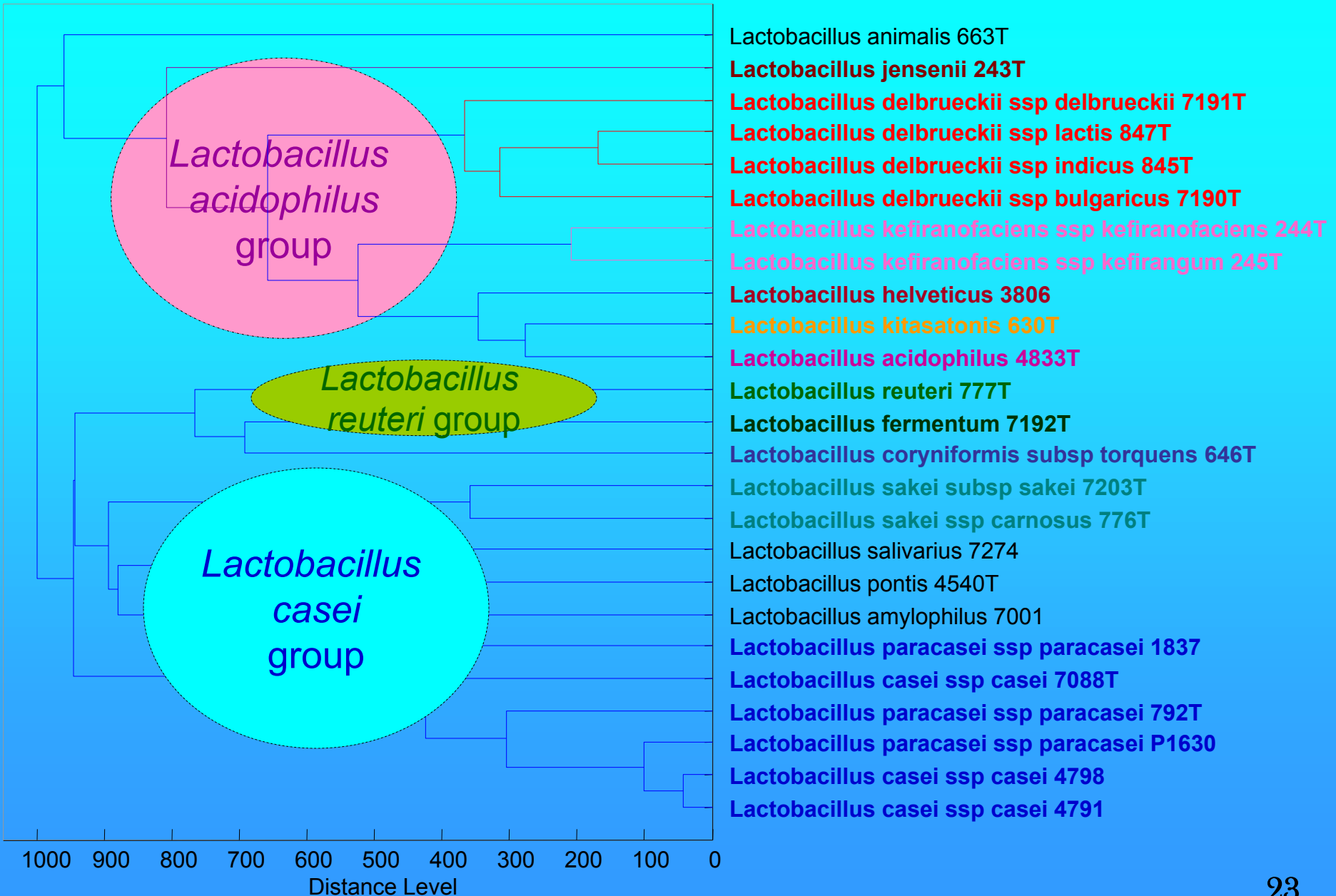
poddruhů

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

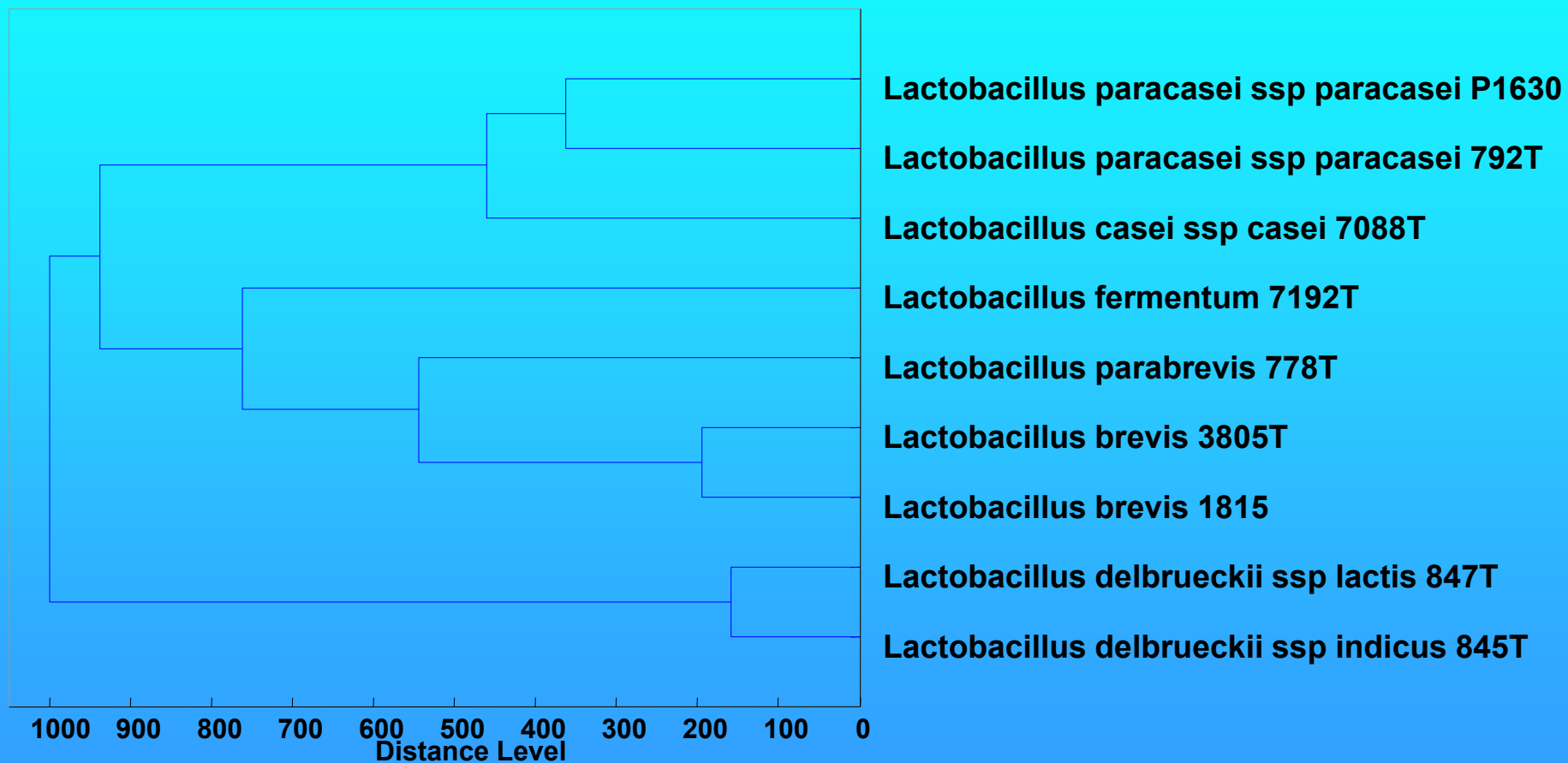
jednotlivých kmenů po práci s buňkou

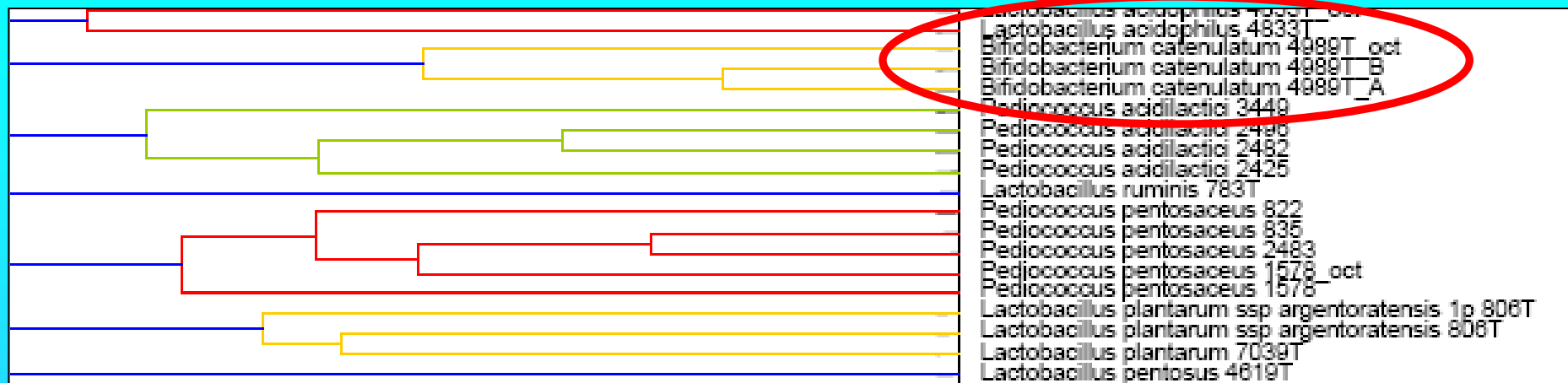


Main *L. acidophilus* groups...



Jeden rod – rozlišení druhů a kmenů





Jediný kmen *Bifidobacterium catenulatum* 4989T analyzovaný
Po časové periodě – řadí se stále stejně = důkaz citlivosti metody pro
Typizaci až jednotlivých kmenů daného druhu

MALDI-MS fingerprints' use in species discrimination

- Which bacterial species are present in **different parts** of technology process?

Reuteri group:

- at least 6 species isolated from sourdough
(*L. frumenti*, *L. pontis*, *L. panis*, *L. reuteri*,
L. rossiae, *L. siliginis*, *L. secaliphilus*)

= species adapted to the **particular niche**
interesting challenge for a proteomic study

to link ecological specification

**to functional characteristics embedded in the
proteome of the strains.**

MALDI-MS profiles of pure culturable cultures through technology proces

- **Species and strains identity confirmation**
control of
microorganisms' contamination

**With the other methods'
undistinguishable
mutants or
related species**

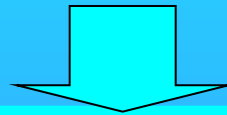
- **Analysis without cultivation?**
Limits: mixtures of strains

The use of **MALDI-MS fingerprints** in comparing of strains with specific patterns = characterization of the strain

- Strain-dependent properties:

probiotics: up (host mucin production) and down regulation (virulence factor expression in pathogens), production of specific antibiotics and antibiotic-like substances (reuterin...)

technology: proteolytic and lipolytic patterns: flavour, ripening, gaps forming ...



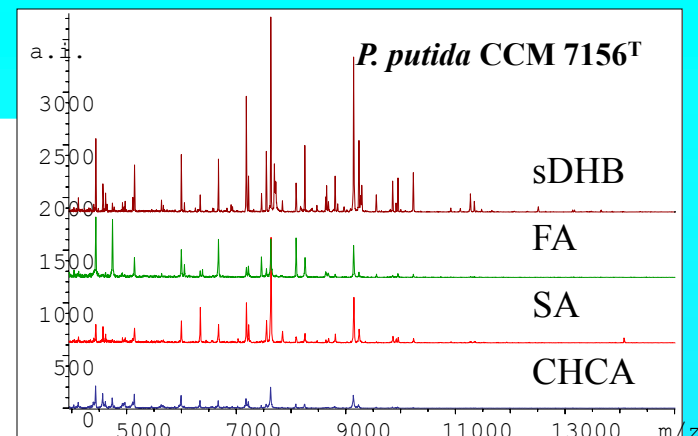
outputs of **comparable fingerprints of strains**, that are unidentified genotypically/phenotypically

- **By novel or uncharacterized strain:**

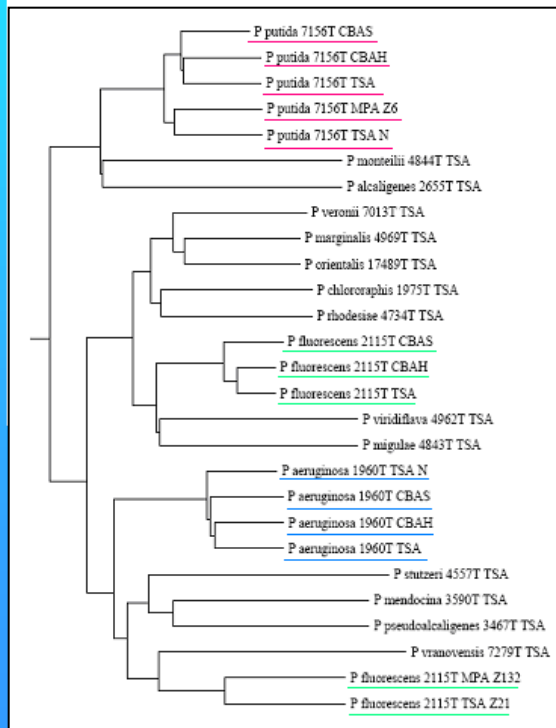
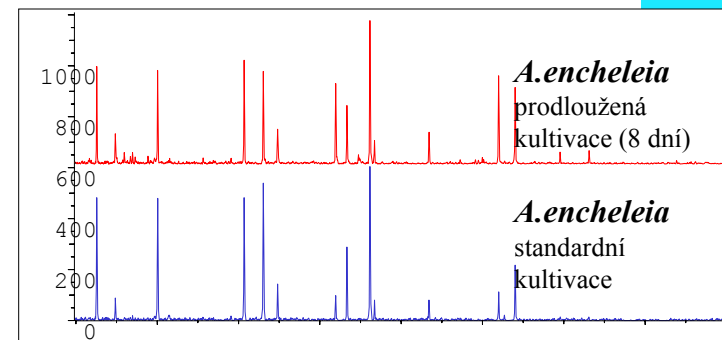
—————→ prediction of strain-specific properties

Optimalizace metody

- Test typu a okyselení matrice
(sDHB v 20% ACN s 1% TFA)
- Medium, hustota suspenze vzorku
(2 μl buněk + 500 μl voda : ACN 1:1)
- Test reprodukovatelnosti
- Vliv délky zamražení, kultiv. teplota

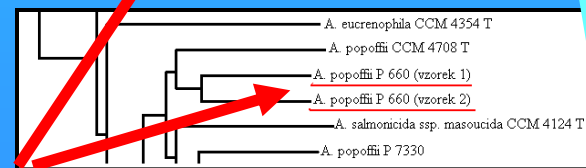
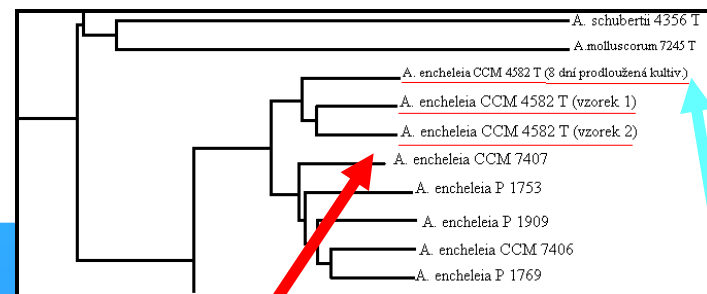


Test vlivu matrice



Ukázky
optimalizace
pro rod
Pseudomonas

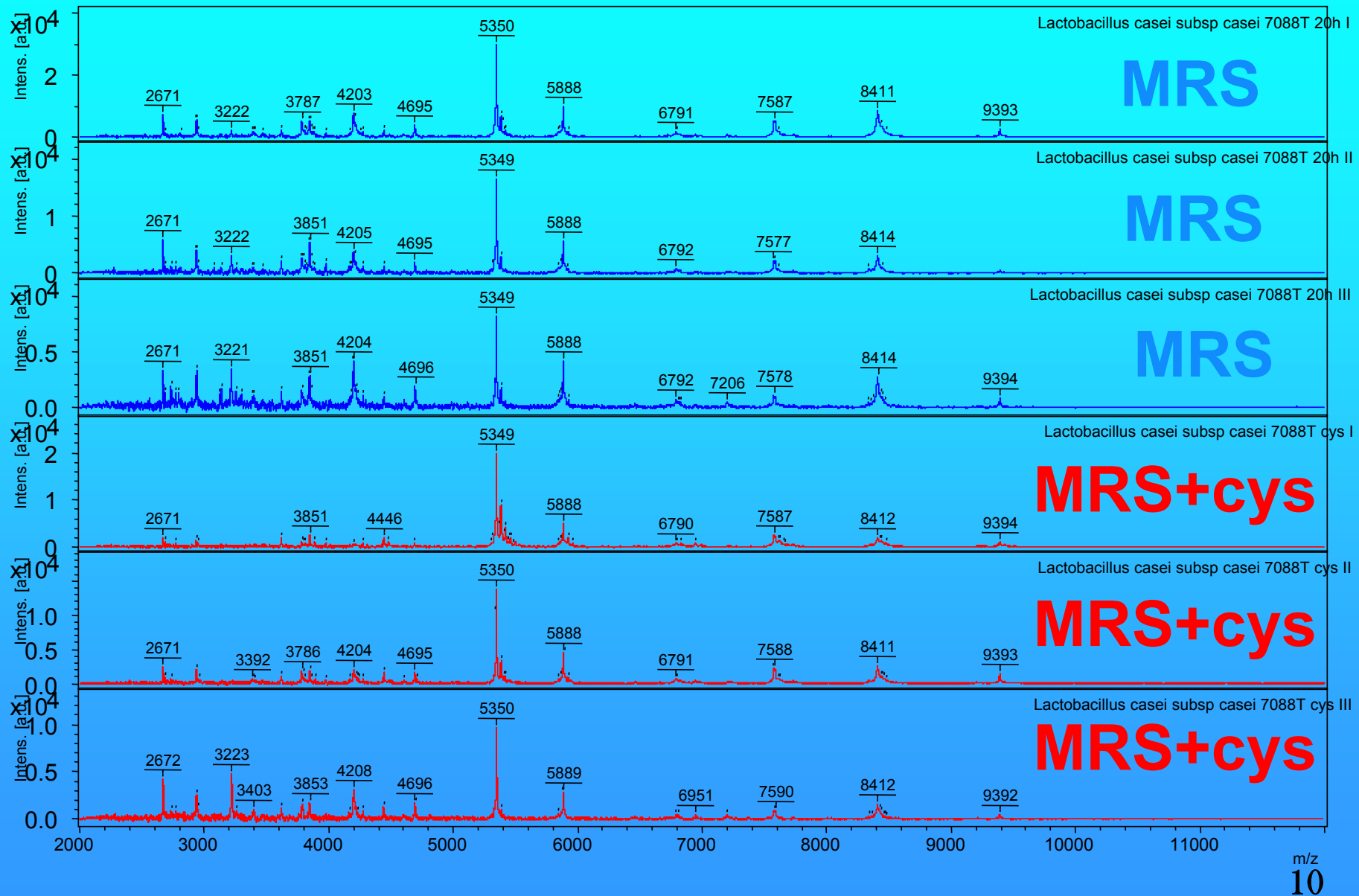
Test vlivu medií:
CBAH, CBAS,
MPA, TSA



Test **reprodukovatelnosti** prodloužené kultivace

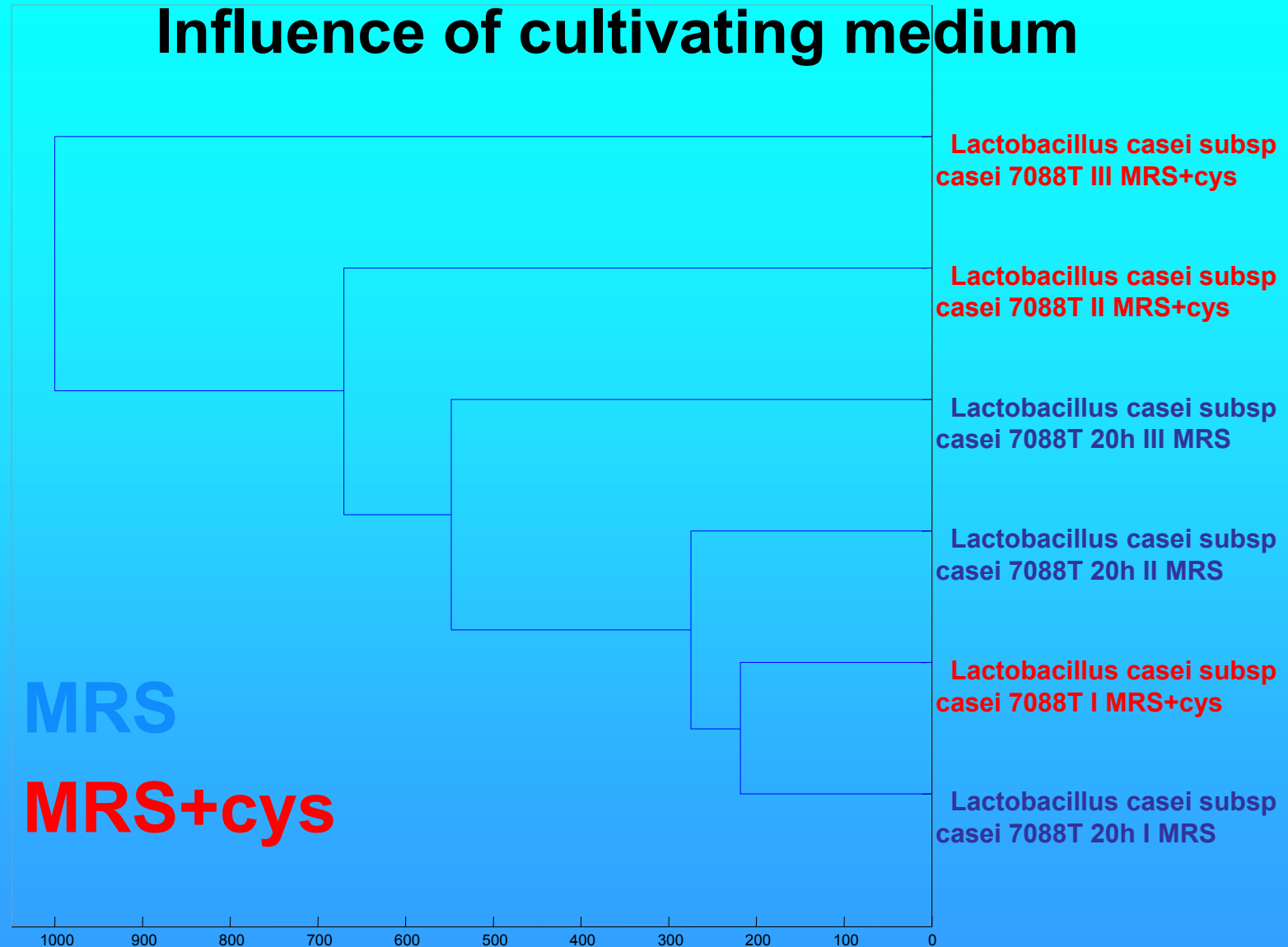
Lactobacillus casei ssp. *casei* CCM 7088T

Influence of cultivating medium



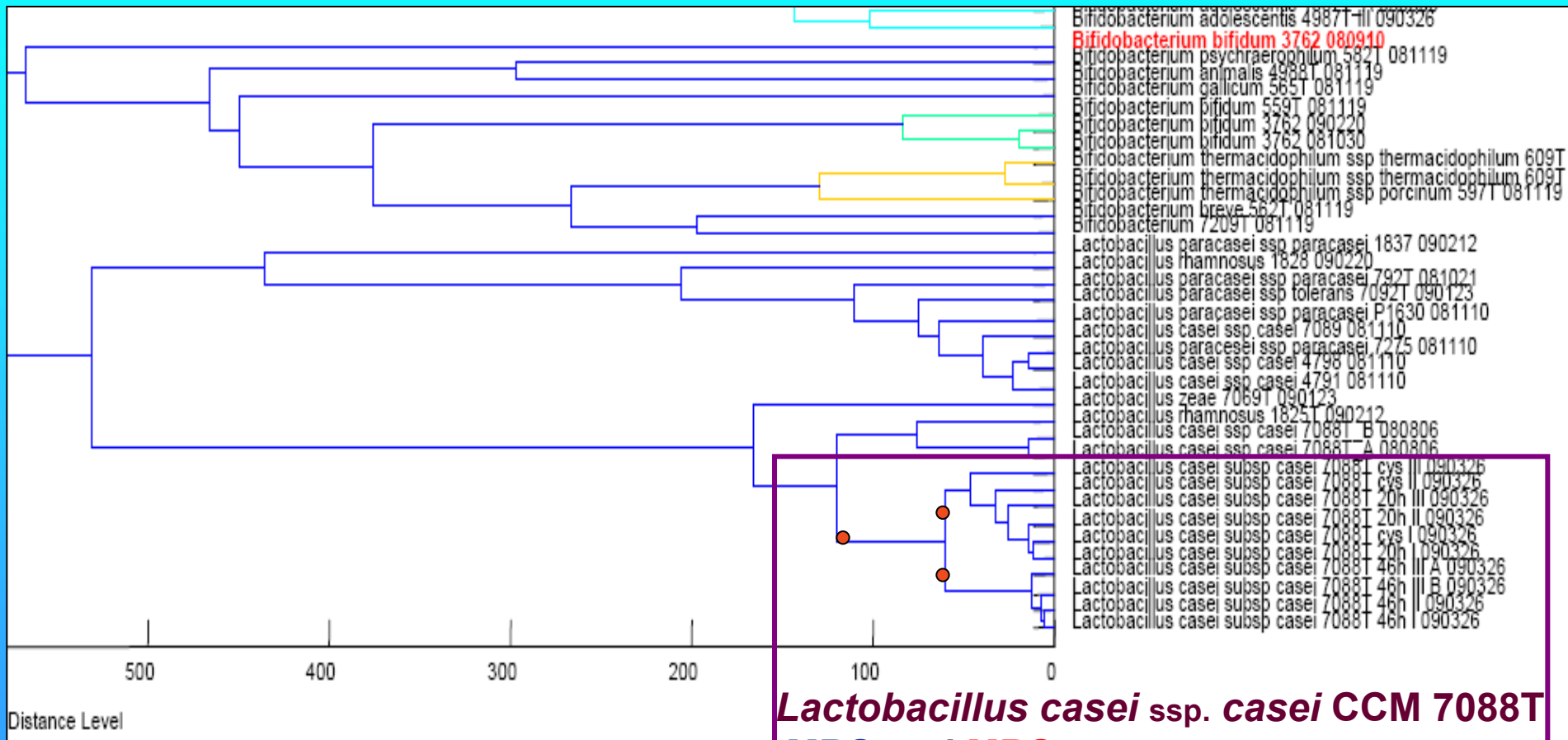
Lactobacillus casei ssp. *casei* CCM 7088T

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



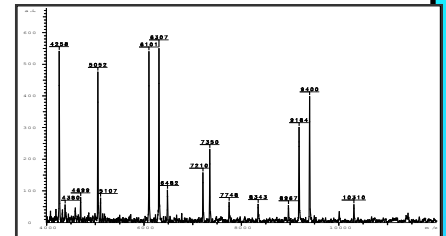
Lactobacillus casei ssp. *casei* CCM 7088T
MRS and MRS+cys
20h and 46h cultivation

Využití techniky MALDI-TOF MS

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

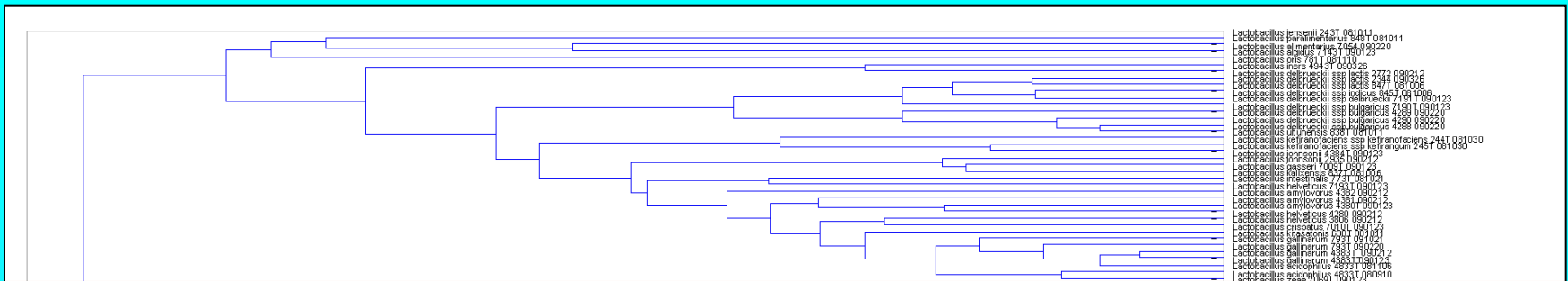
MALDI-MS profil - identifikace rodu a druhů

- autentizace kmene
- analýza biomarkerů



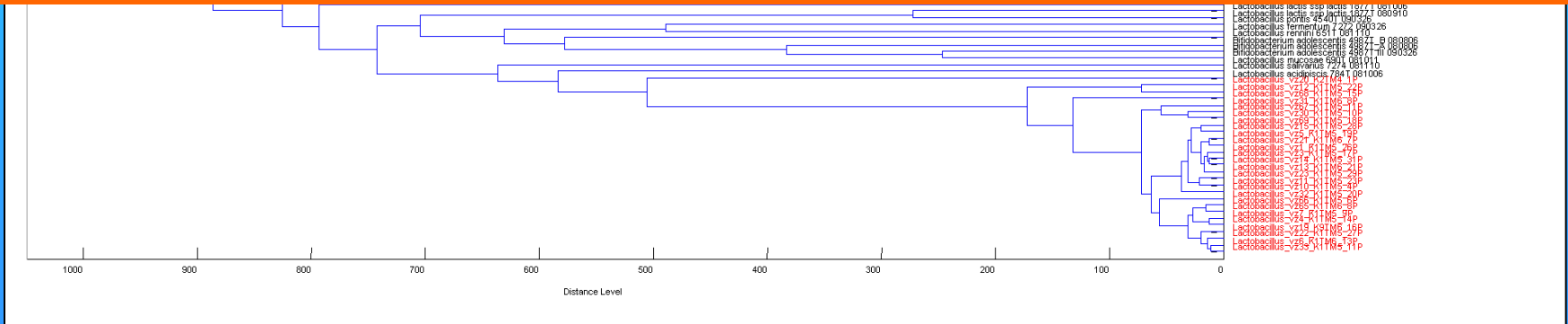
MALDI-MS profil *A. hydrophila*

- 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

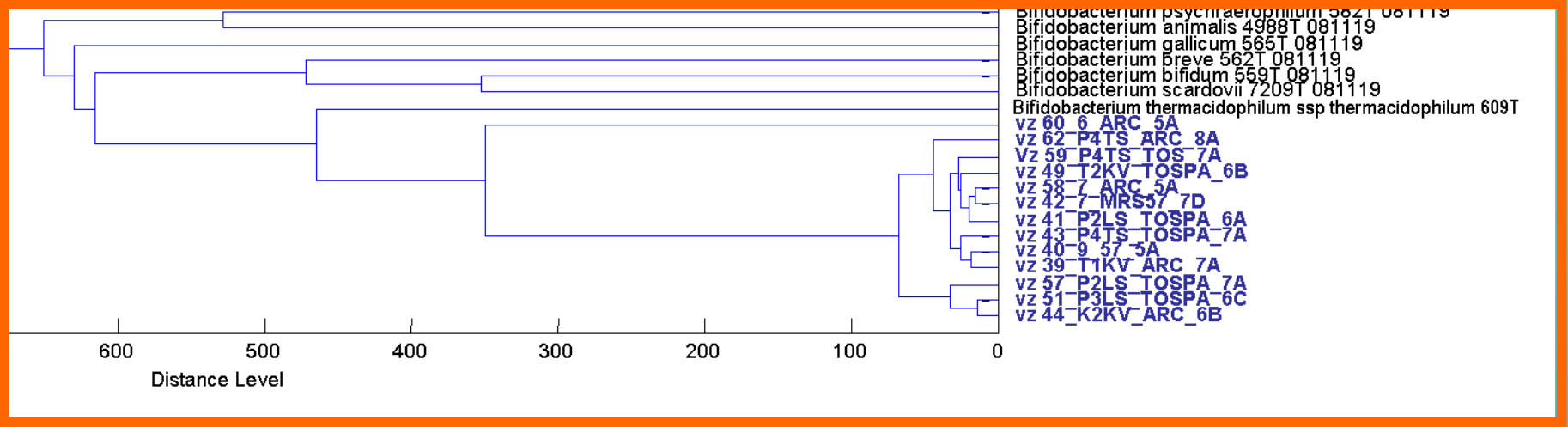
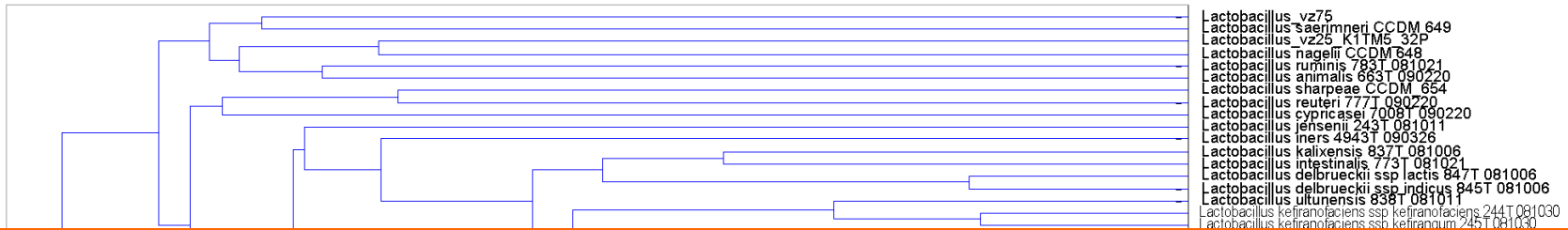


- 26 *Lactobacillus* CCDM strains were all clustered together to the sub-branch with *Lactobacillus salivarius* CCM 7274
- very similar spectra of CCDM strains to each other

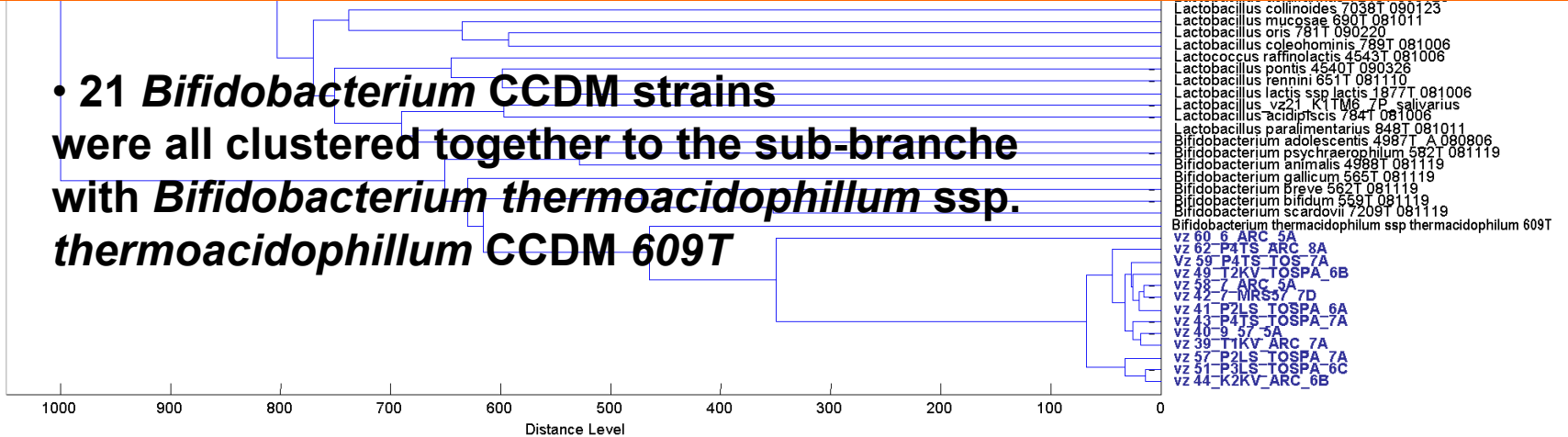
Lactobacillus salivarius 7274 081110
 Lactobacillus acidophilus 7847 081006
 Lactobacillus_vz20_K1IM4_1P
 Lactobacillus_vz12_K1IM5_22P
 Lactobacillus_vz66_K1IM5_15P
 Lactobacillus_vz31_K1IM6_8P
 Lactobacillus_vz67_K1IM5_11P
 Lactobacillus_vz30_K1IM5_10P
 Lactobacillus_vz69_K1IM5_18P
 Lactobacillus_vz15_K1IM5_28P
 Lactobacillus_vz5_K1IM5_19P
 Lactobacillus_vz21_K1IM6_7P
 Lactobacillus_vz1_K1IM5_26P
 Lactobacillus_vz3_K1IM5_17P
 Lactobacillus_vz13_K1IM6_21P
 Lactobacillus_vz23_K1IM5_29P
 Lactobacillus_vz11_K1IM5_23P
 Lactobacillus_vz10_K1IM5_4P
 Lactobacillus_vz32_K1IM5_20P
 Lactobacillus_vz65_K1IM5_6P
 Lactobacillus_vz65_K1IM6_8P
 Lactobacillus_vz7_K1IM5_9P
 Lactobacillus_vz4_K1IM5_14P
 Lactobacillus_vz19_K9IM5_16P
 Lactobacillus_vz22_K1IM5_27P
 Lactobacillus_vz6_K1IM6_13P
 Lactobacillus_vz35_K1IM5_11P



Score Oriented Dendrogram for U9U5ZU

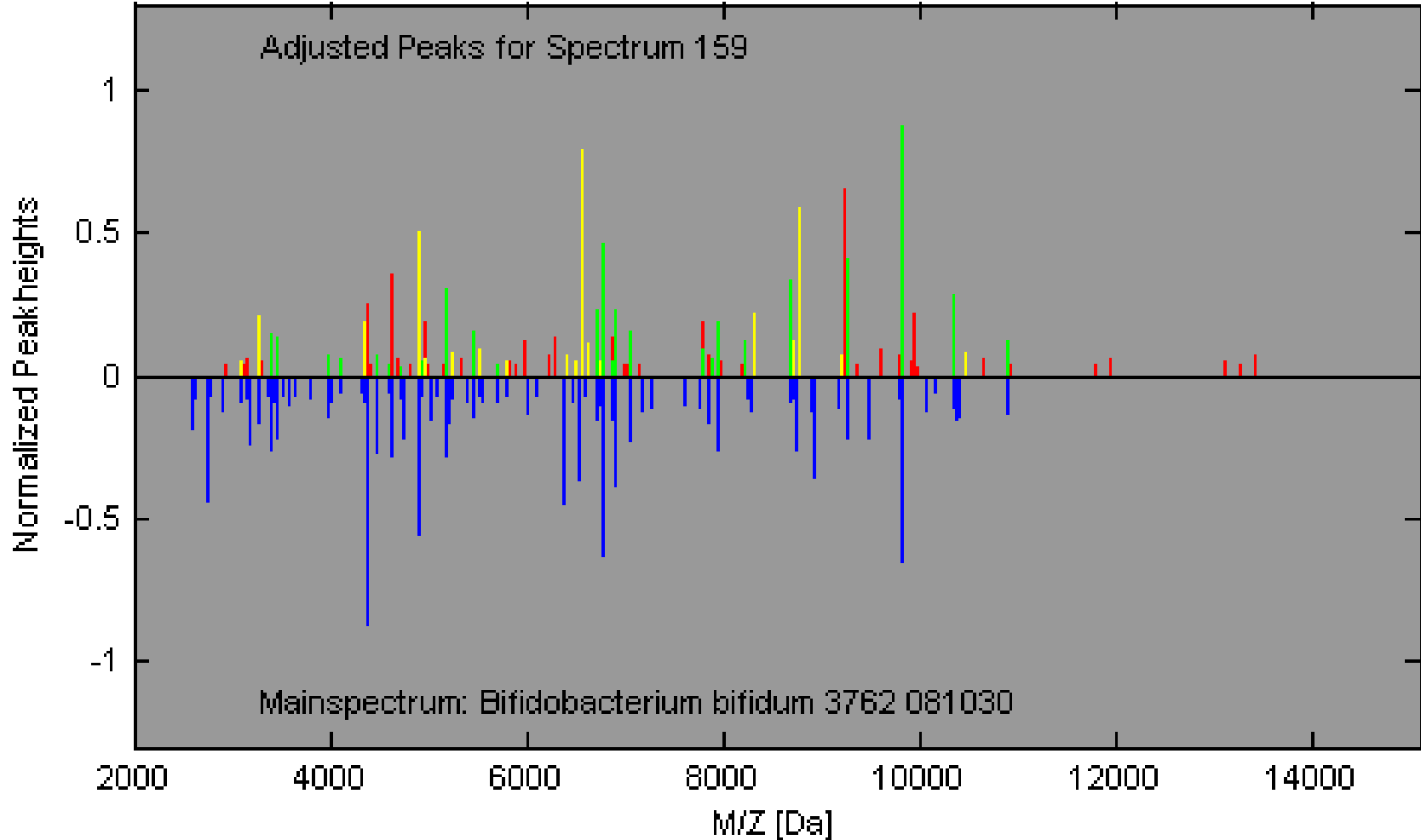


• 21 *Bifidobacterium* CCDM strains were all clustered together to the sub-branche with *Bifidobacterium thermoacidophilum* ssp. *thermoacidophilum* CCDM 609T



Lactobacillus 52 6-57-5A

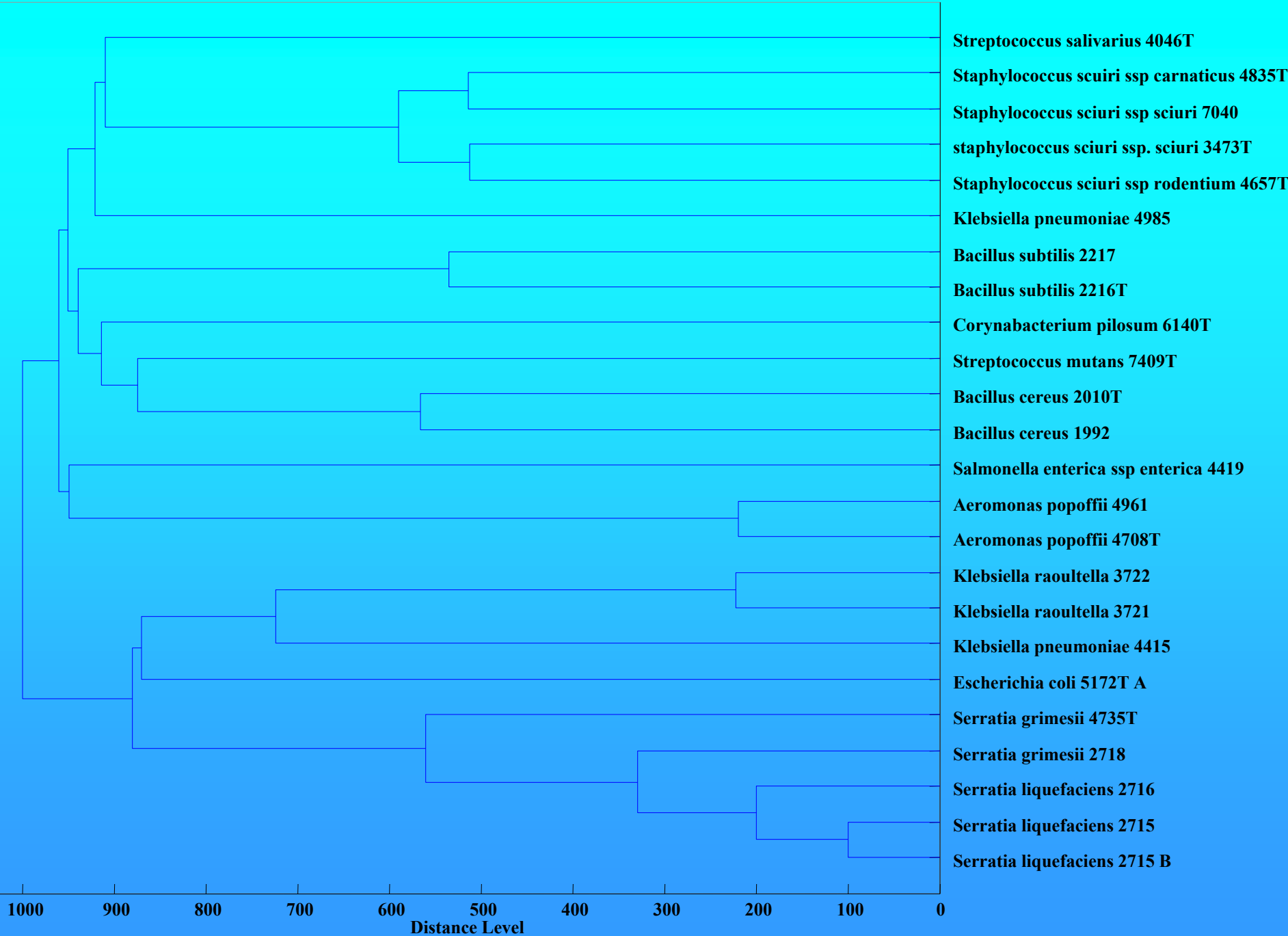
Adjusted Normalized Peaklists



Green signals – identical to reference signals

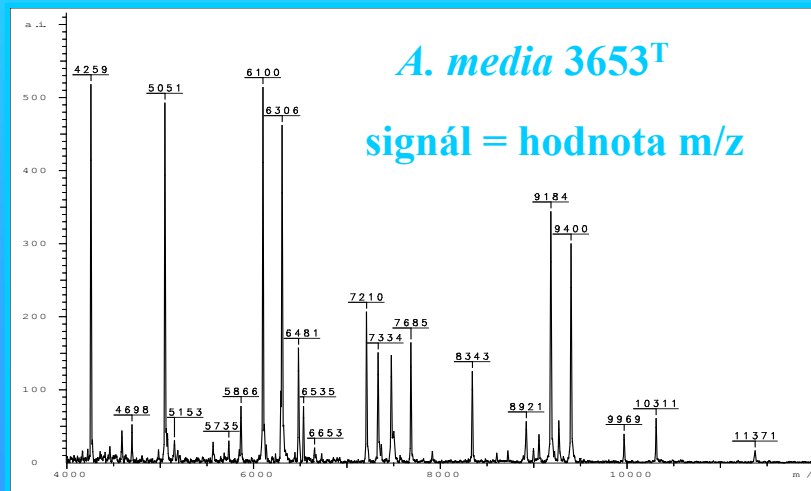
Yellow signals – identical to reference signals with aberration m/z

Red signals – distant signals

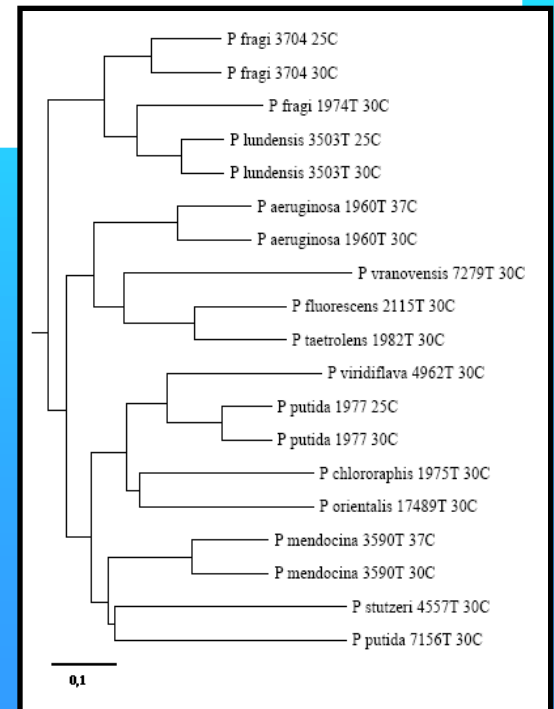


Současné cíle a využití techniky

- Zavedení a optimalizace stanovení MALDI-MS profilů bakterií
- Ověření diferenciační schopnosti MALDI-MS
- Snaha získat :
reprodukovatelná charakteristická spektra rodů a druhů
→ autentizace, identifikace kmenů
- Interpretace a statistické zpracování výsledných spekter - vhodný software



Charakteristické spektrum = MALDI MS profil
kmene *A. media* 3653^T

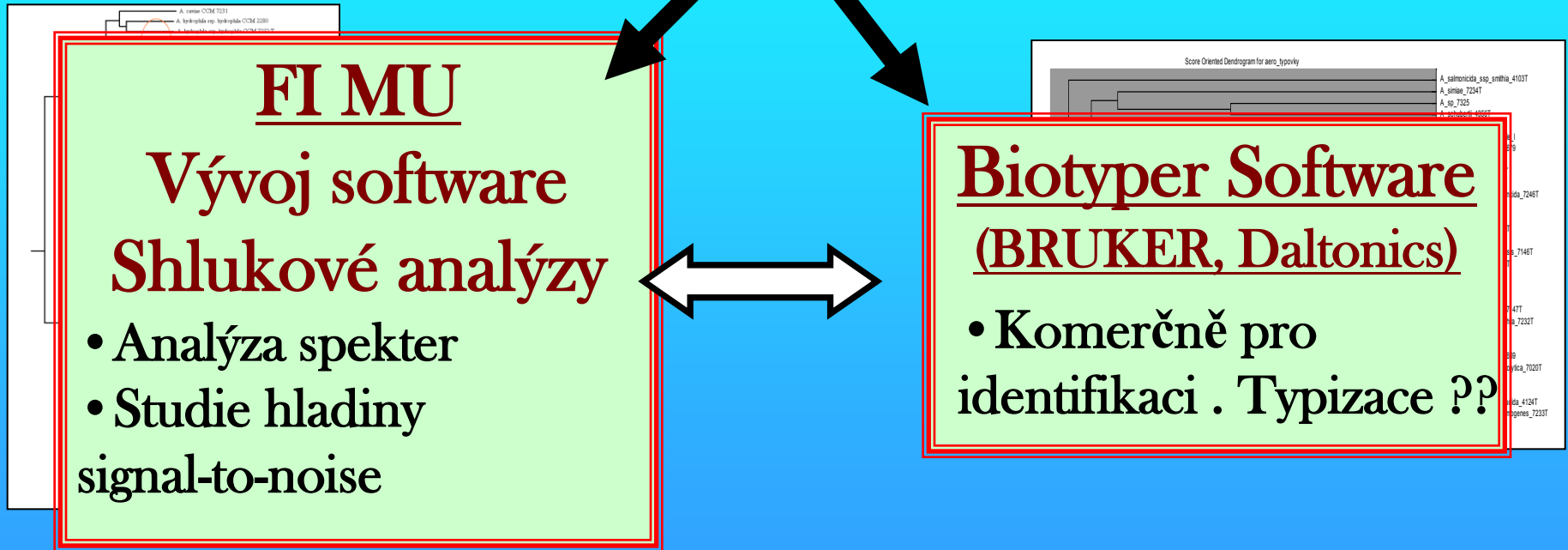


Výsledný dendrogram

Současné cíle a využití techniky

Pro shodnocení hladiny spolehlivosti odlišení:
identifikace (species) + typizace (kmeny)
porovnání různých typů software:

Databáze: jen typové a referenční kmeny



- Klasifikace neznámých vzorků
- Porovnání se studii genotypizace

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**