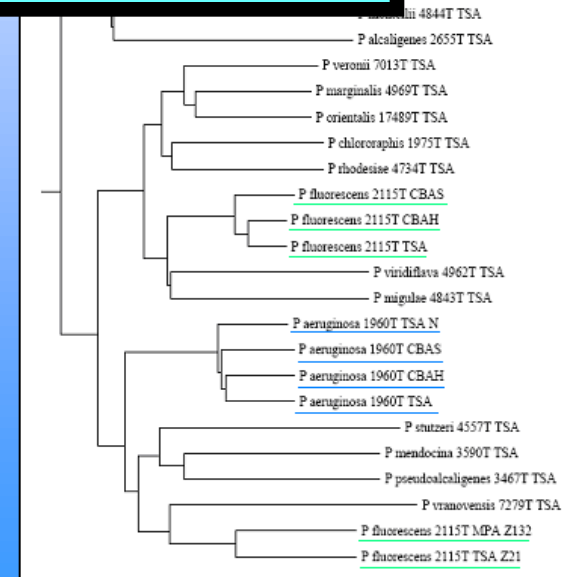
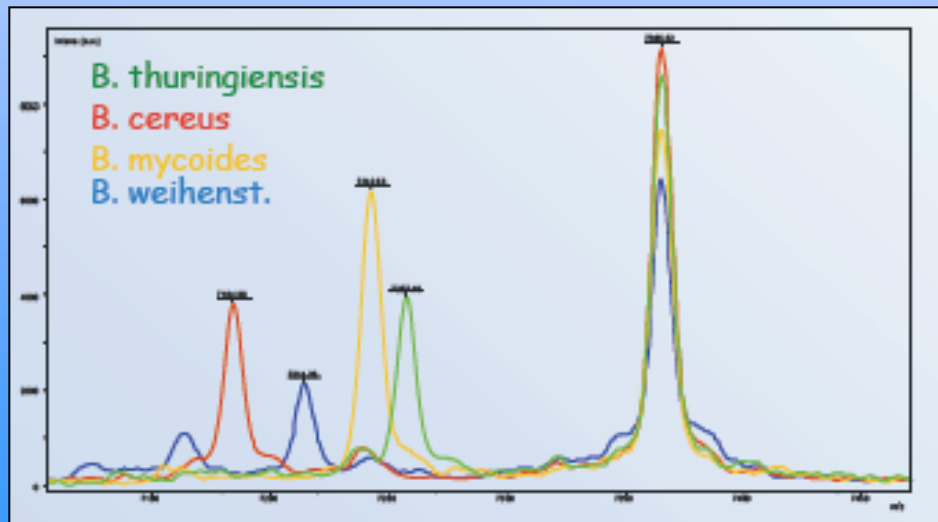


Identifikace a klasifikace mikroorganismů založená na shlukové analýze MALDI-MS protein/peptidových profilů



MALDI-TOF MS

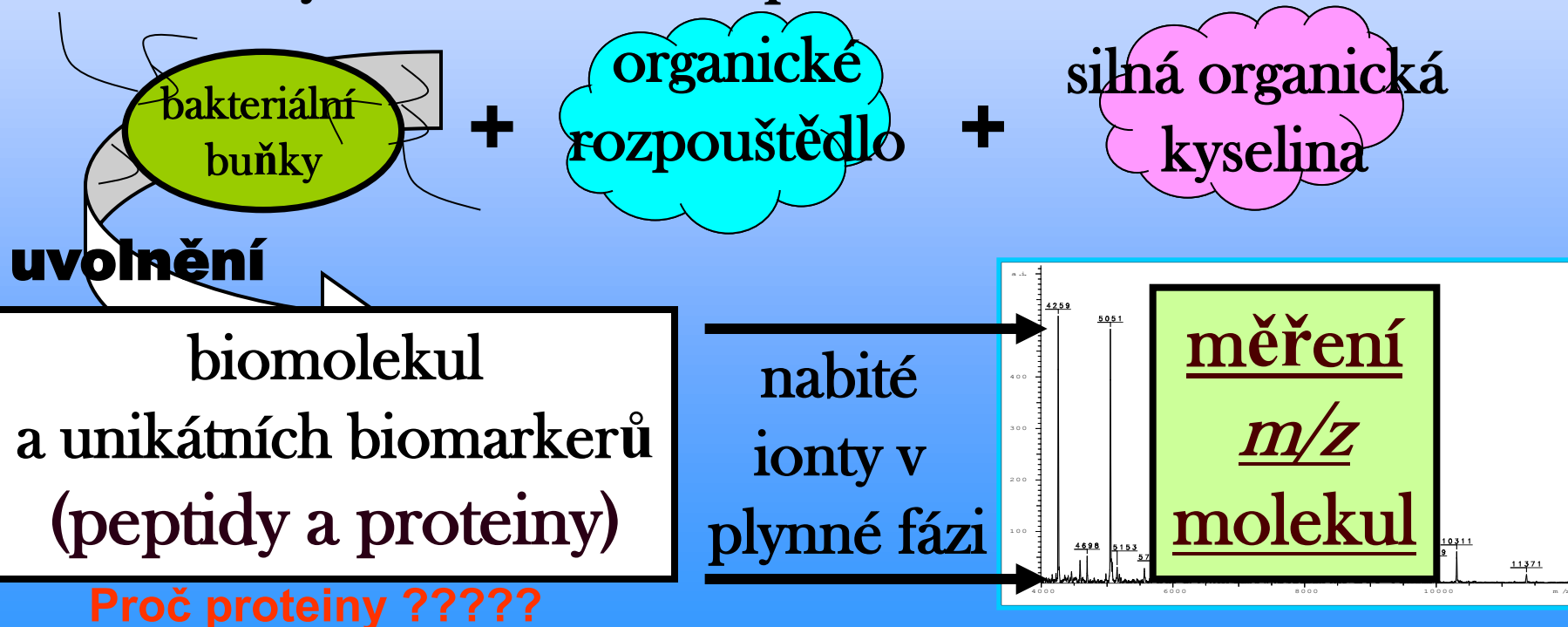
= Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -
Time of Flight Mass Spectrometry

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)

- Jak přesnou identifikaci potřebujeme – po úroveň
rodu?
druhu?
kmene? – technologie, klinika

Příklad: 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 druhů: aeromonády, laktobacily...

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

Př: aeromonády:

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

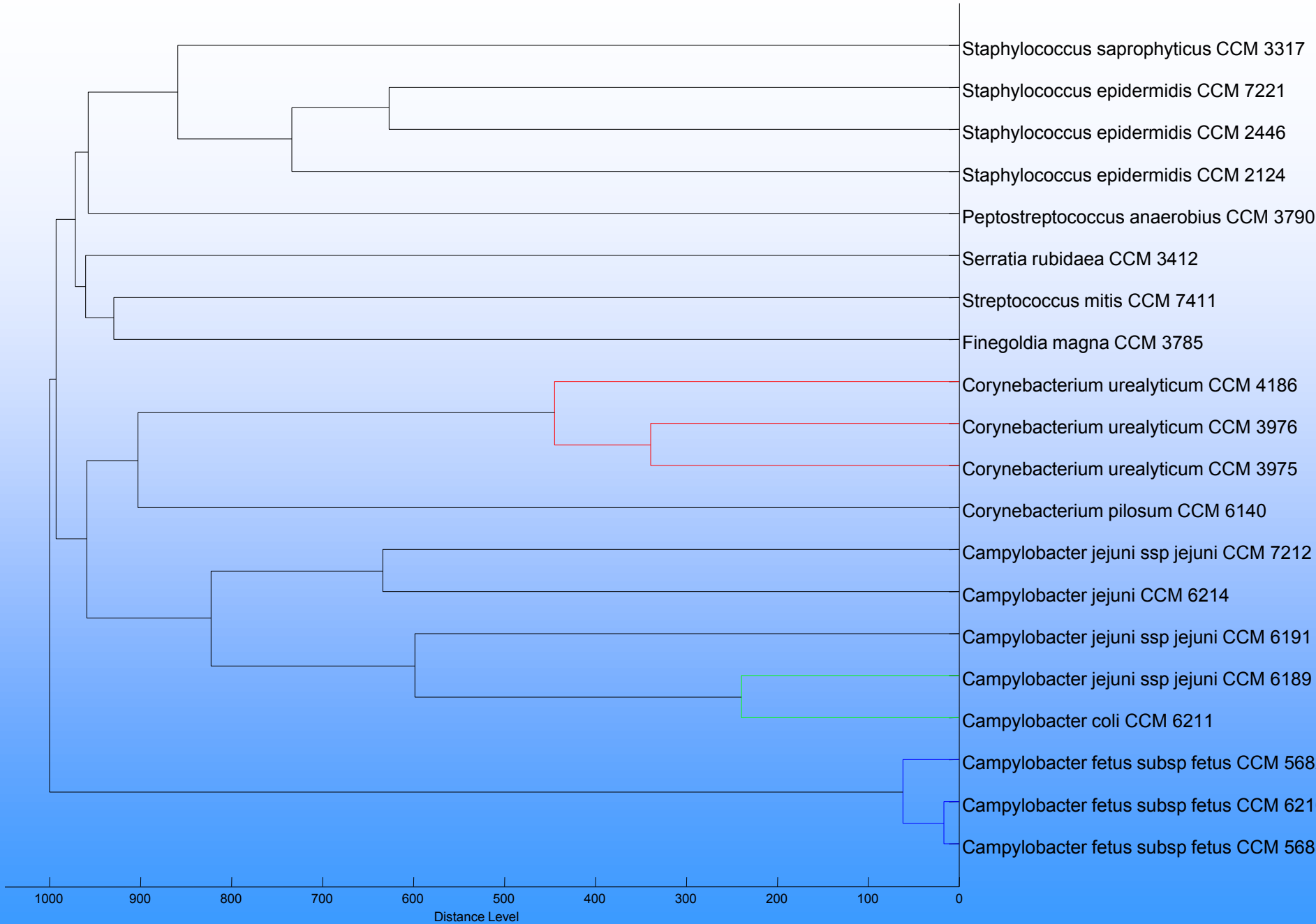
- nepřesná identifikace biochemickými testy -
výsledky vysoce shodné pro většinu druhů



- 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



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

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), kalibrace: lysozym

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



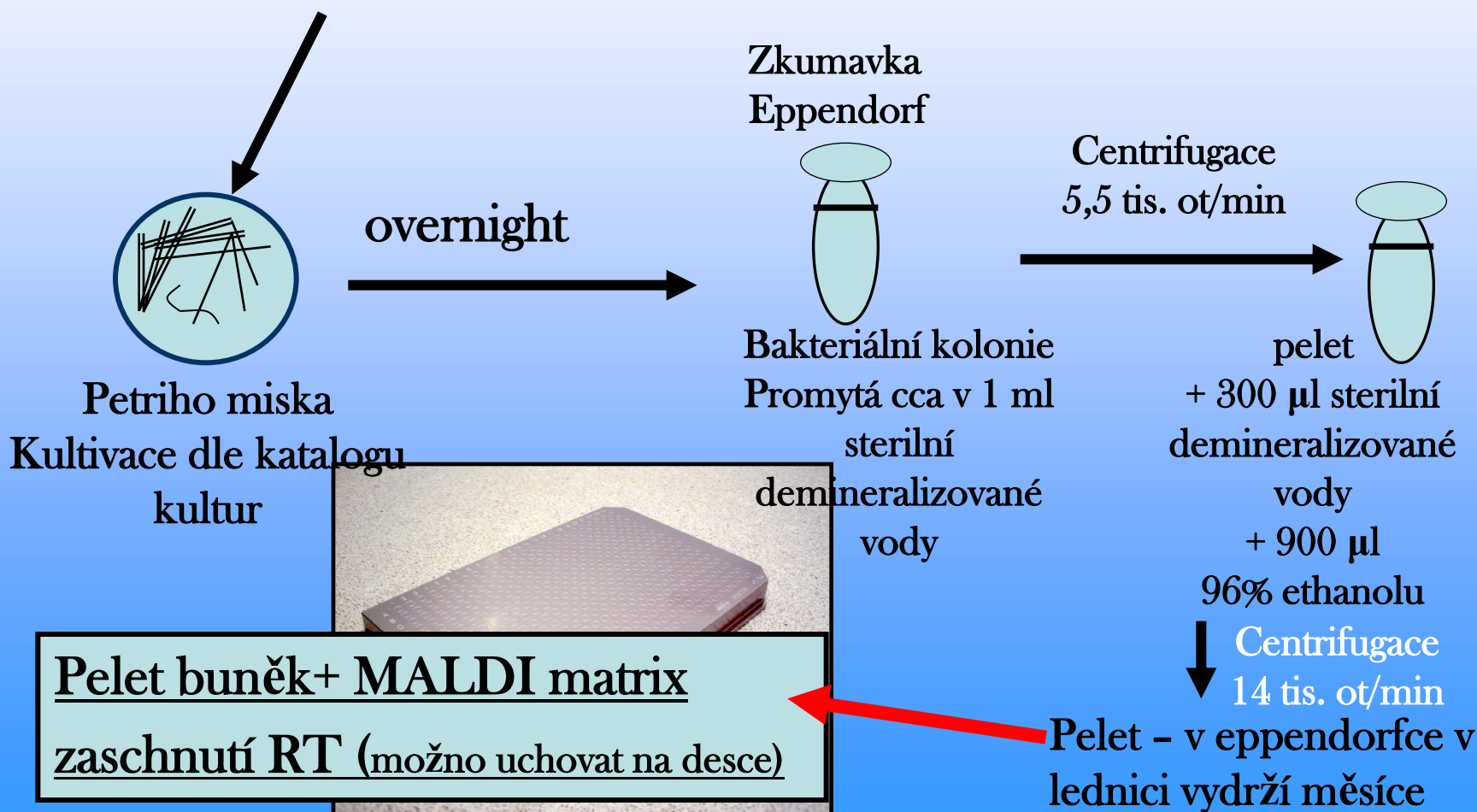
4. Úprava a zpracování spekter

5. Testy reprodukovatelnosti

6. Shluková analýza spekter

Příprava vzorku pro analýzu

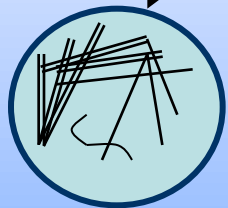
Bakteriální kmen: sbírkový kmen nebo divoký izolát; klinický izolát



Příprava vzorku pro analýzu

jiný příklad: extrakce v acetonitrilu

Bakteriální kmen



Př: *Pseudomonas*

24h

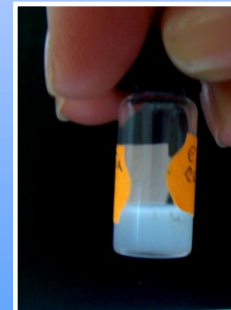


Kultivace

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)

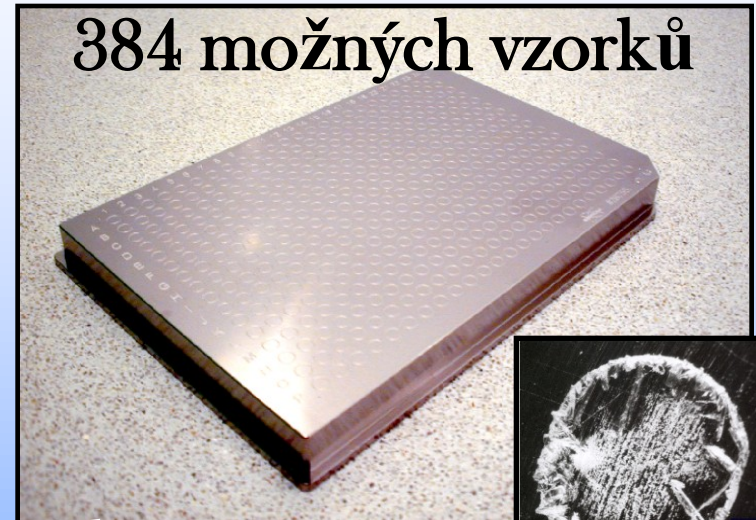


MALDI-TOF MS analýza

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

- MALDI-TOF MS analýza

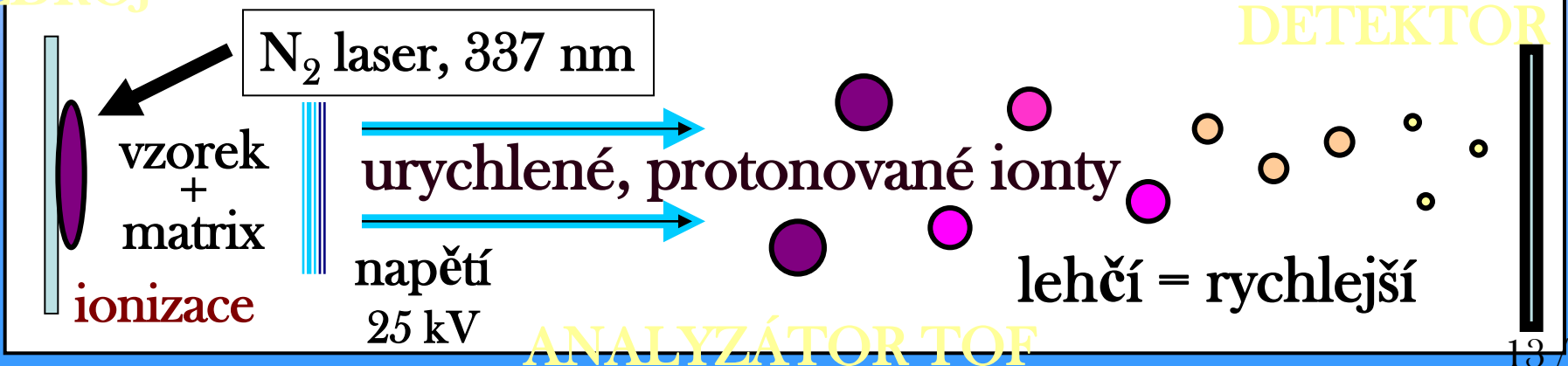
- Hluboké vakuum • Citlivost 10^{-15} mol



MALDI destička



ZDROJ



MALDI-MS profil

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

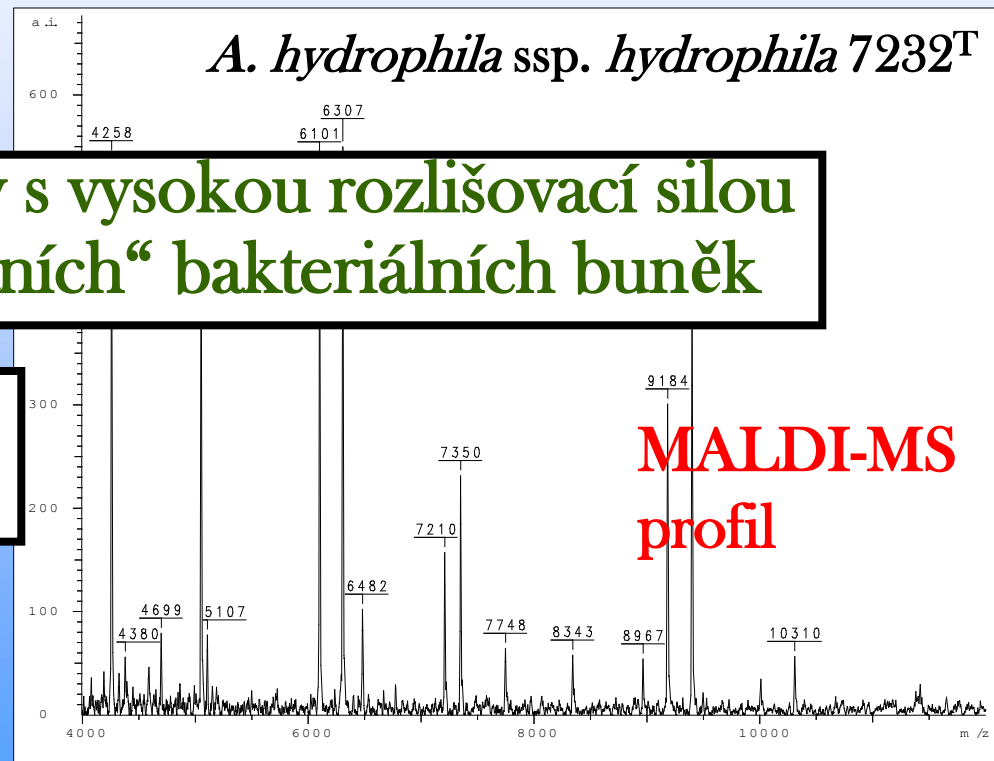
- Proteiny – ribozomu, membrány

= 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**

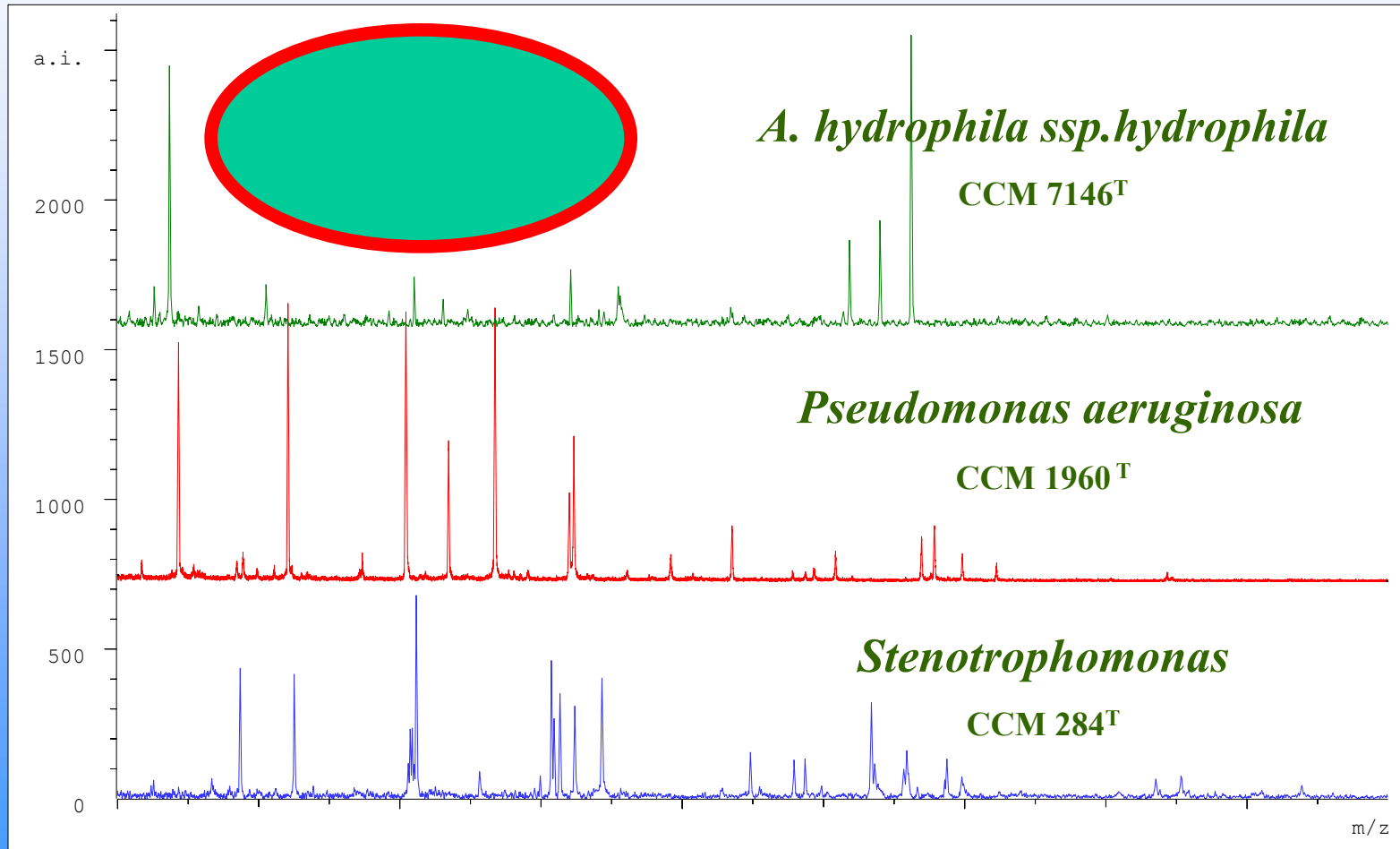
Vychází se z analýzy „bazální“ výbavy proteomu

→ konstantní výskyt základních char. signálů
(základní hladina proteinů syntetizovaná stále nezávisle na změně podmínek)

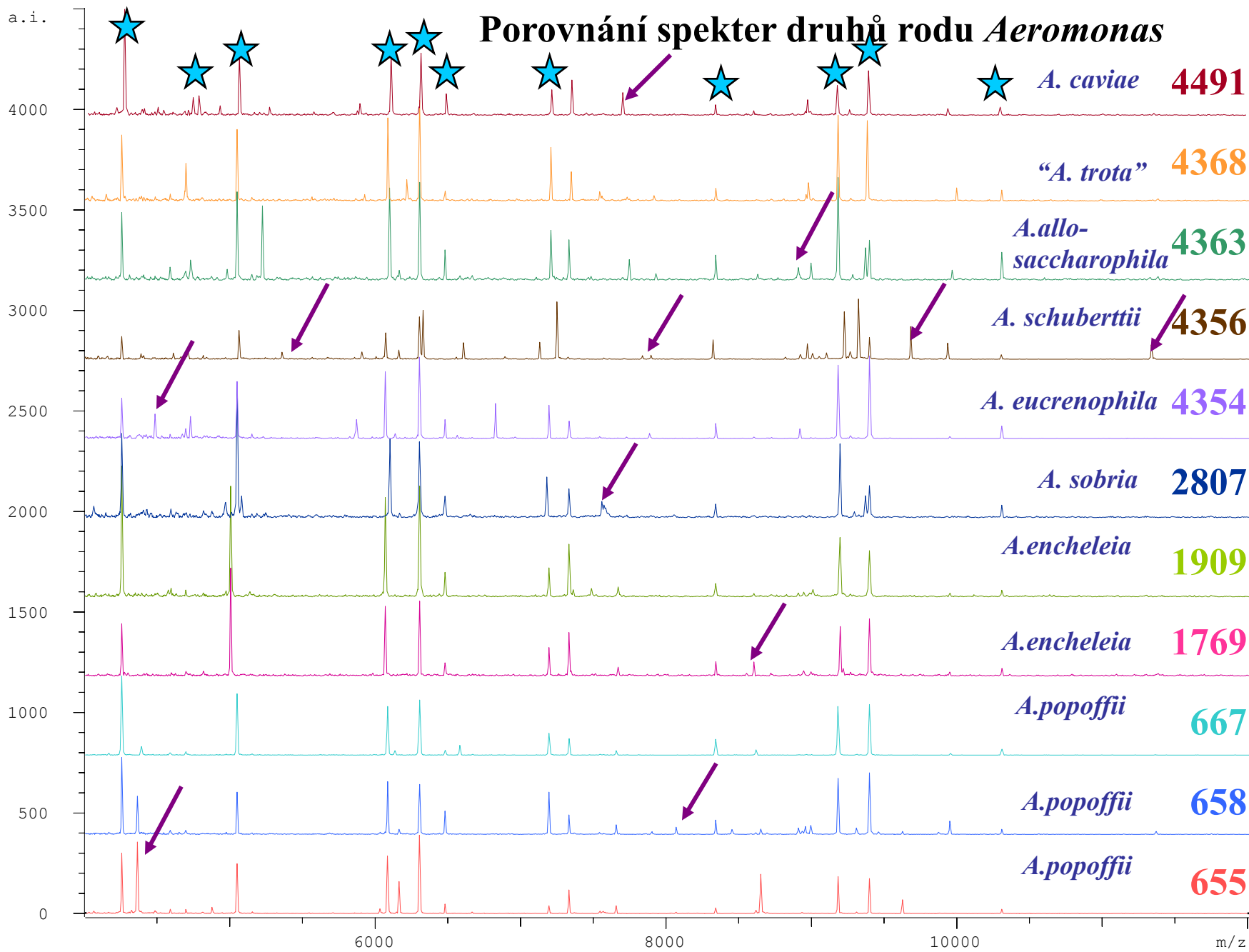
- Pomalu rostoucí - prodloužení doby kultivace
- Chemikálie - **! nejvyšší čistoty !** (pro MS či HPLC)
- Pozor na **uvolňování látek** z „nekvalitních“ plastů

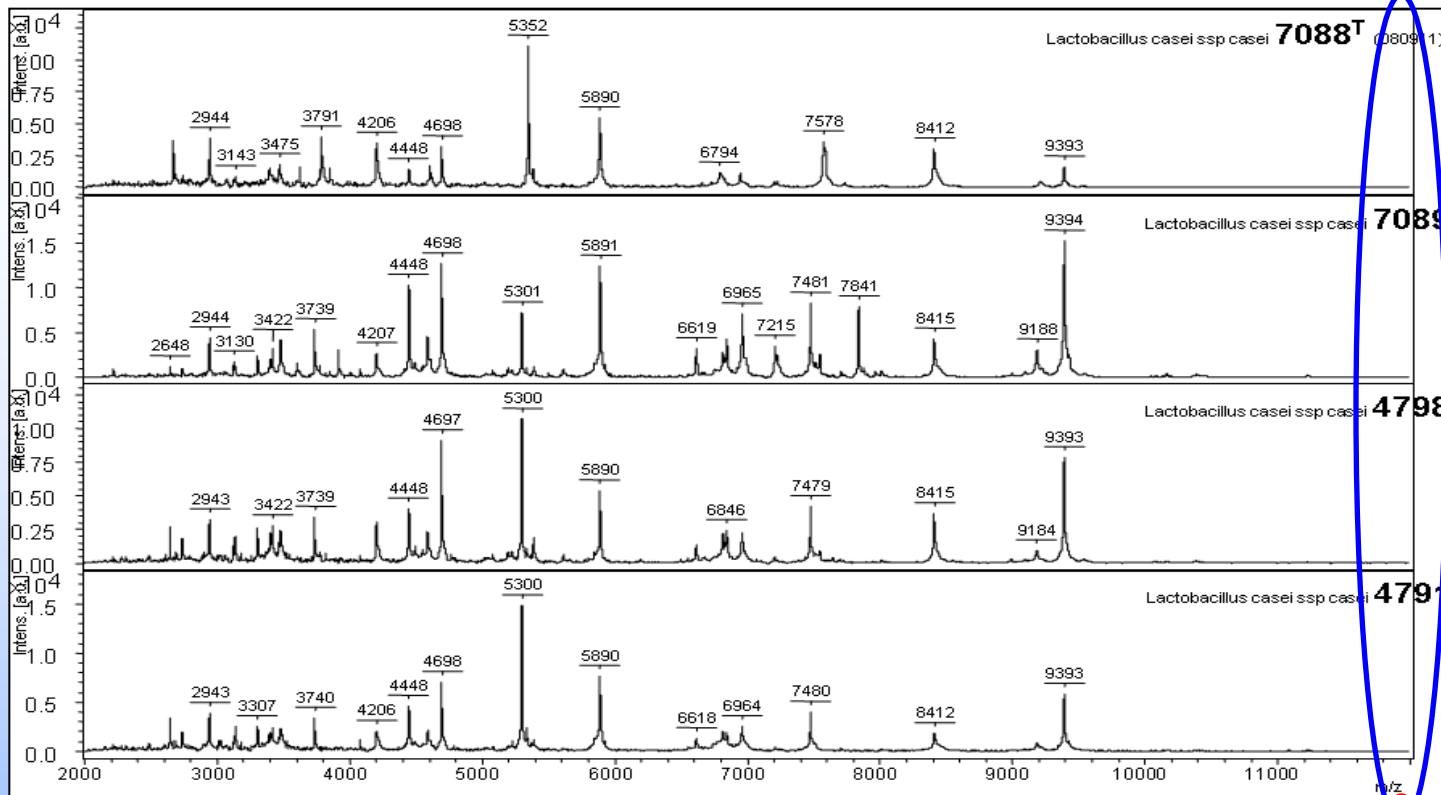
Porovnání spekter

3 typových kmenů různých rodů

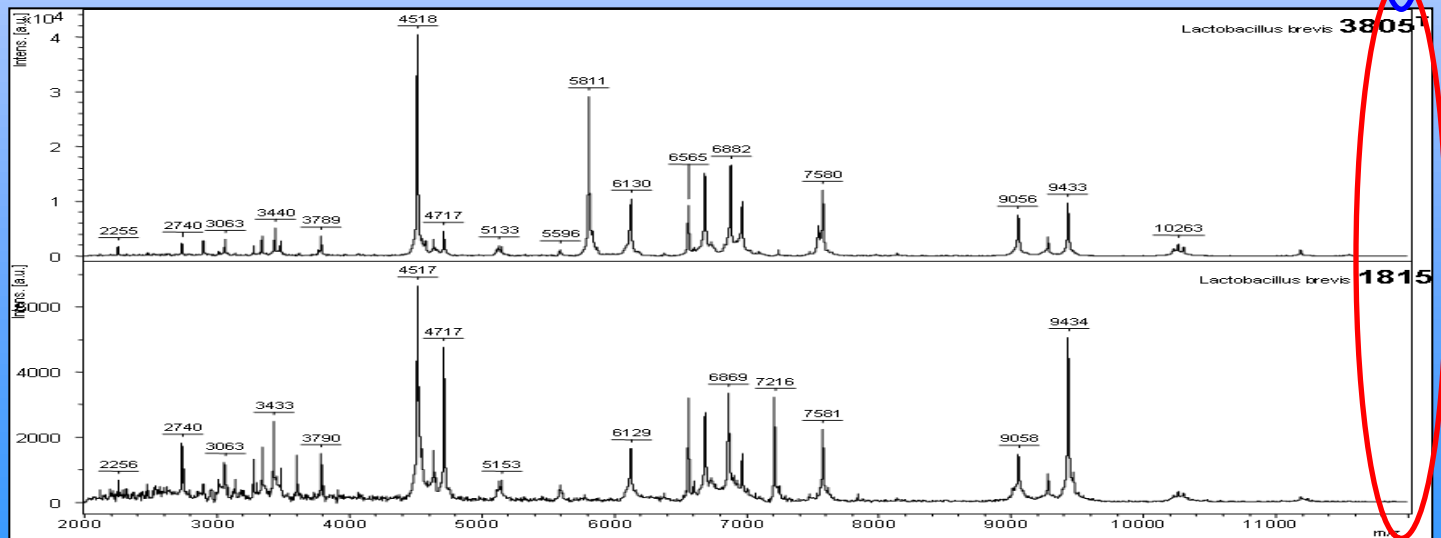


Porovnání spekter druhů rodu *Aeromonas*



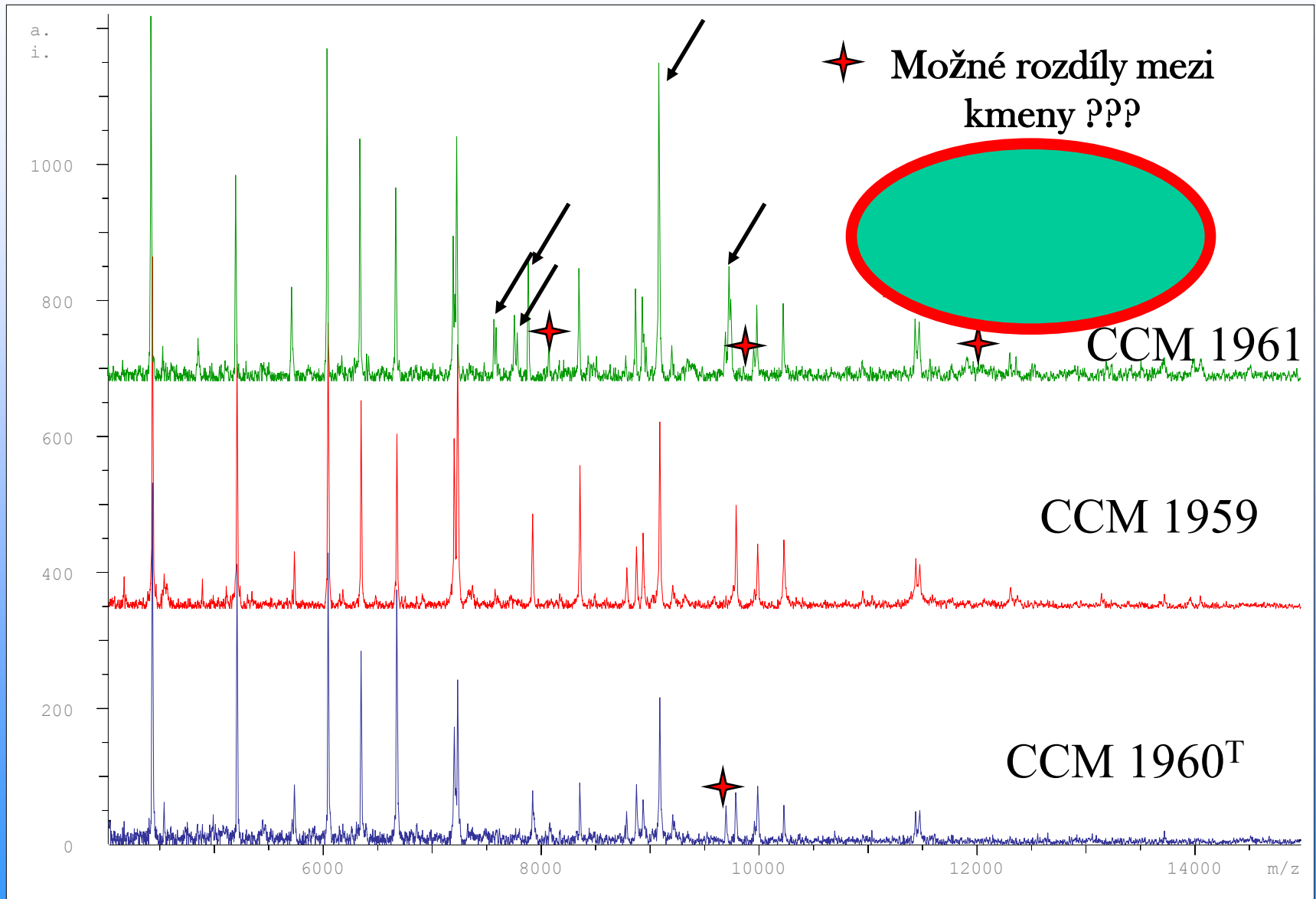


L. casei
ssp.
casei



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.

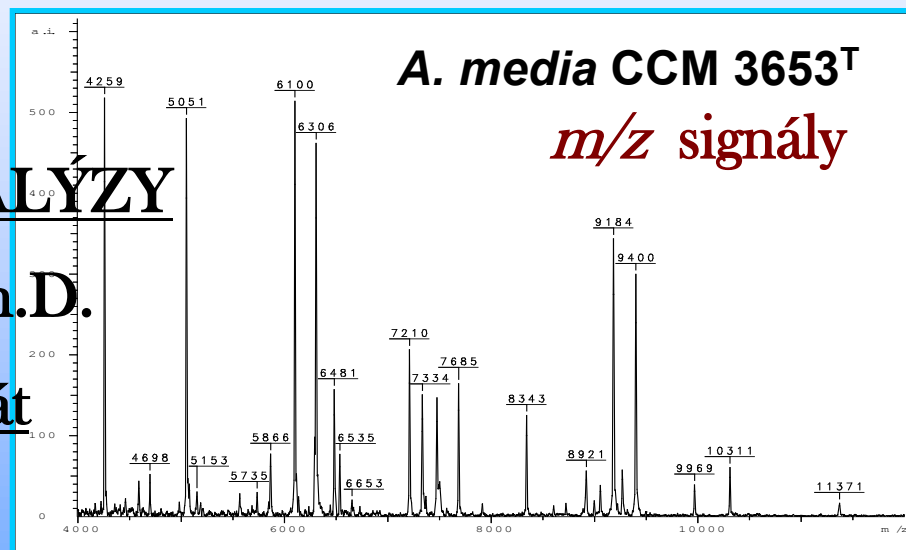
- spektra převedena na ASCII formát

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

- transformována do páru vektorů

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

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



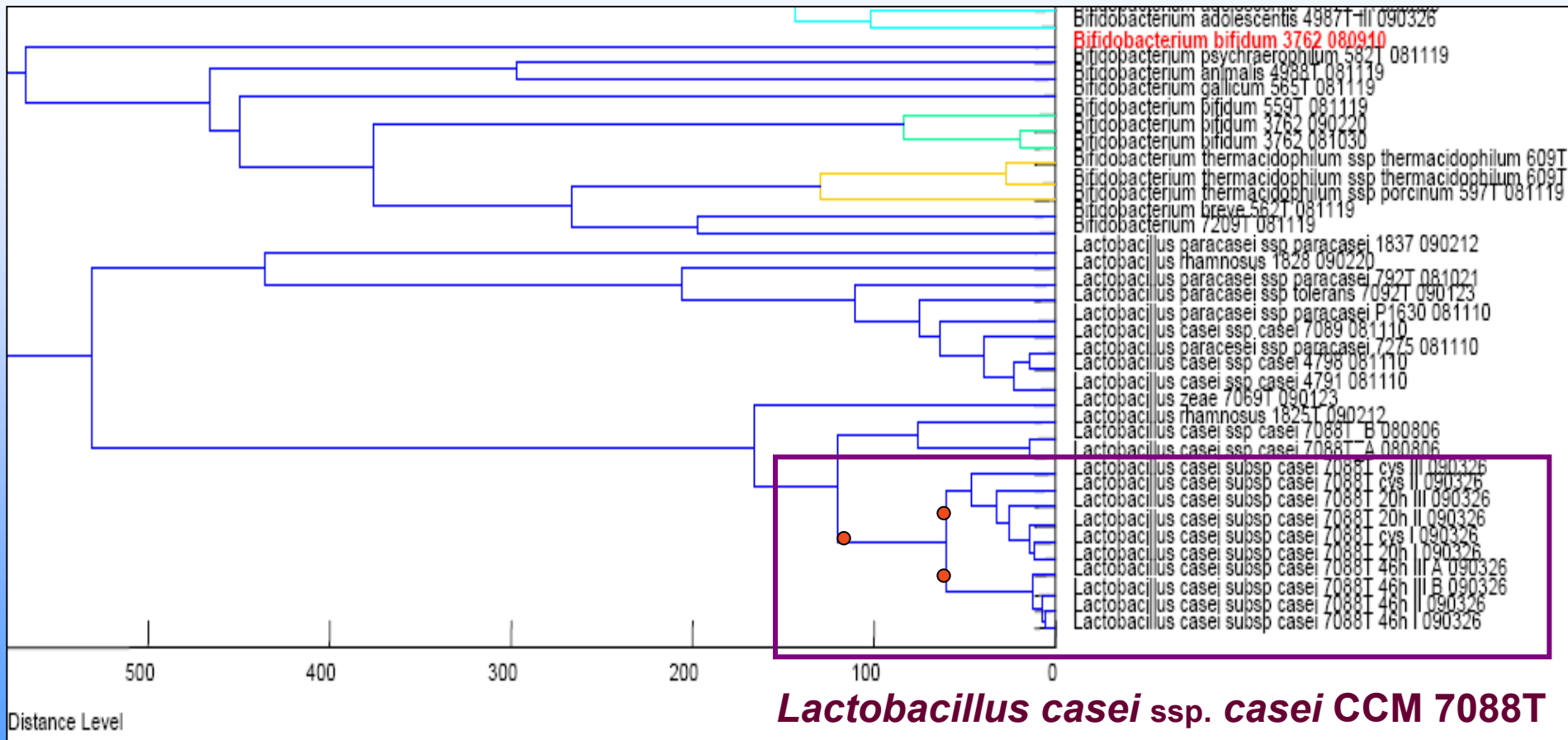
Rozlišení rodů

druhů

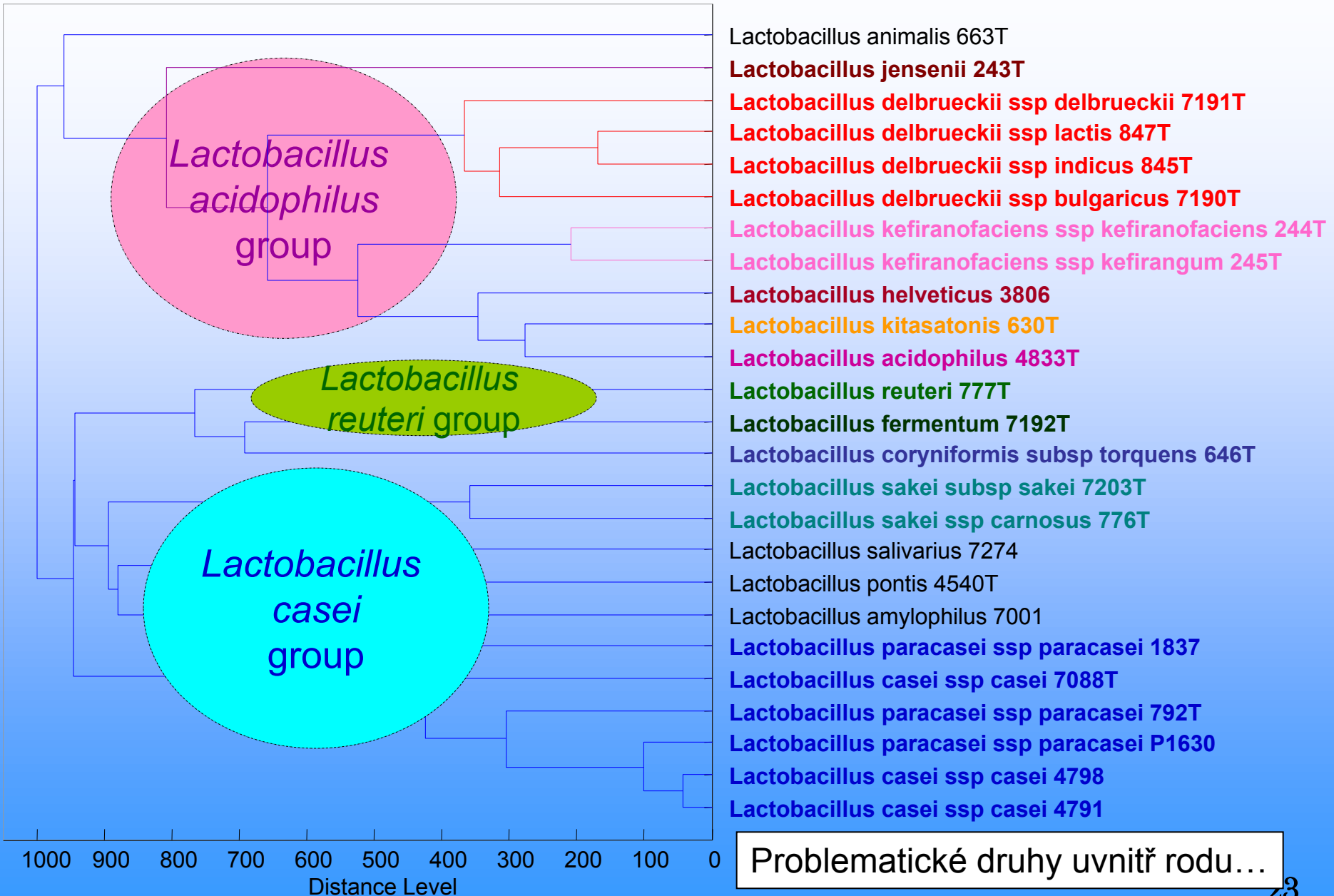
poddruhů

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

jednotlivých kmenů po práci s buňkou



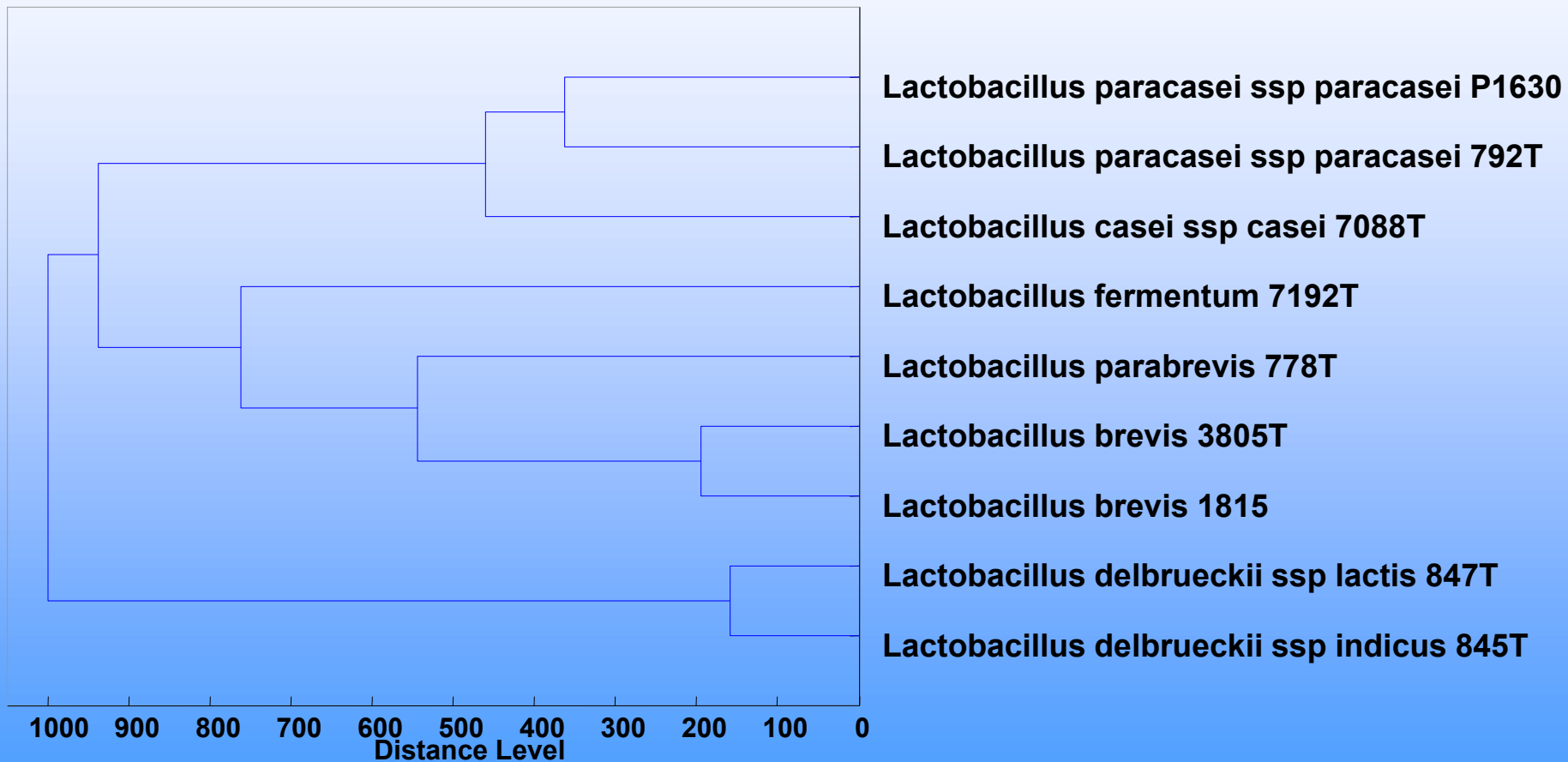
L. acidophilus groups... - shoda s fylogramem??



Problematické druhy uvnitř rodu...

Jeden rod – rozlišení druhů a kmenů

- závislost na počtu zástupců v dendrogramu....

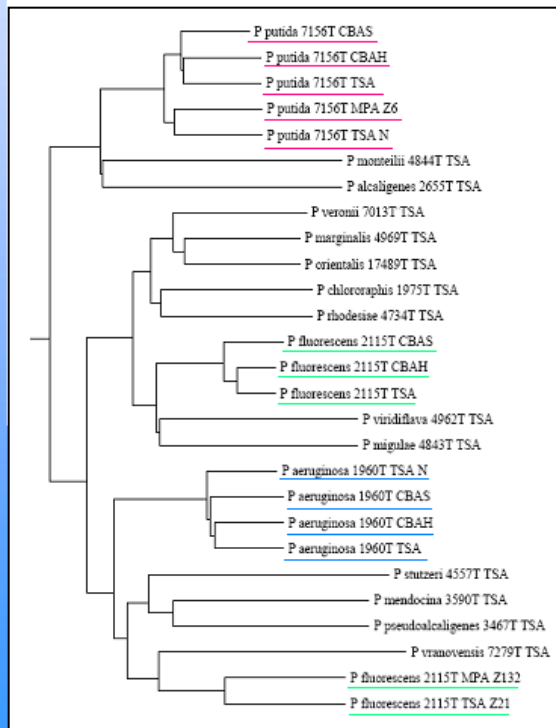
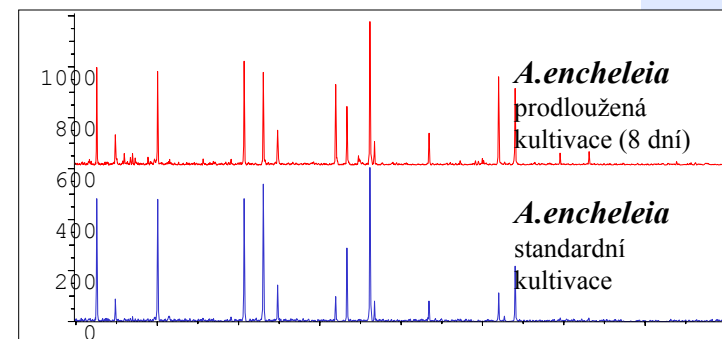
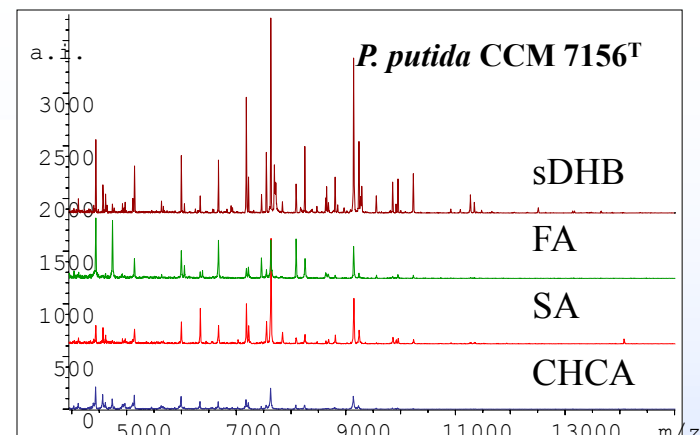




Jediný kmen *Bifidobacterium catenulatum* 4989T analyzovaný
Po časové periodě – řadí se stále stejně = důkaz citlivosti metody pro
Typizaci až jednotlivých kmenů daného druhu

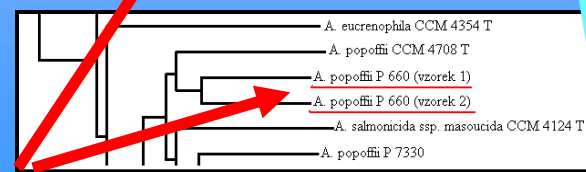
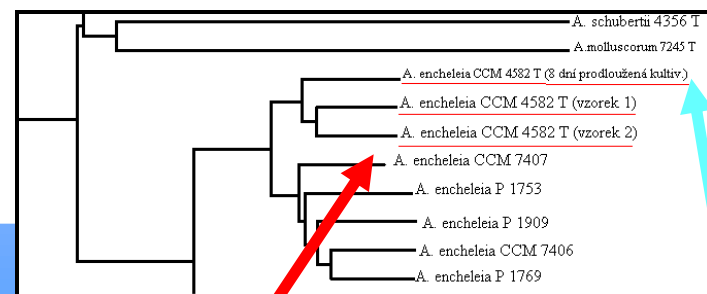
Optimalizace metody

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



Ukázky
optimalizace
pro rod
Pseudomonas

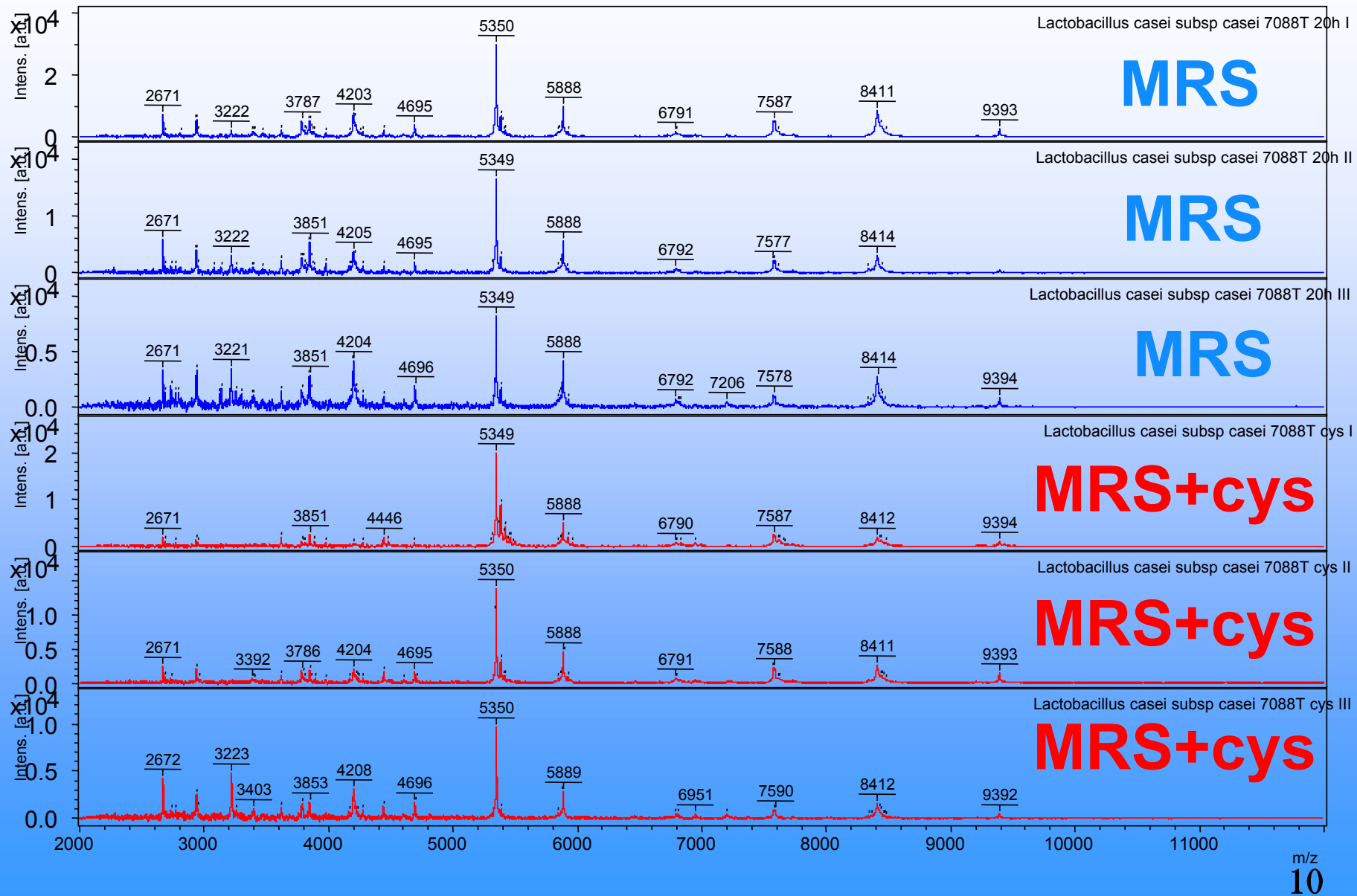
Test vlivu medií:
CBAH, CBAS,
MPA, TSA



Test reprodukovatelnosti prodloužené kultivace

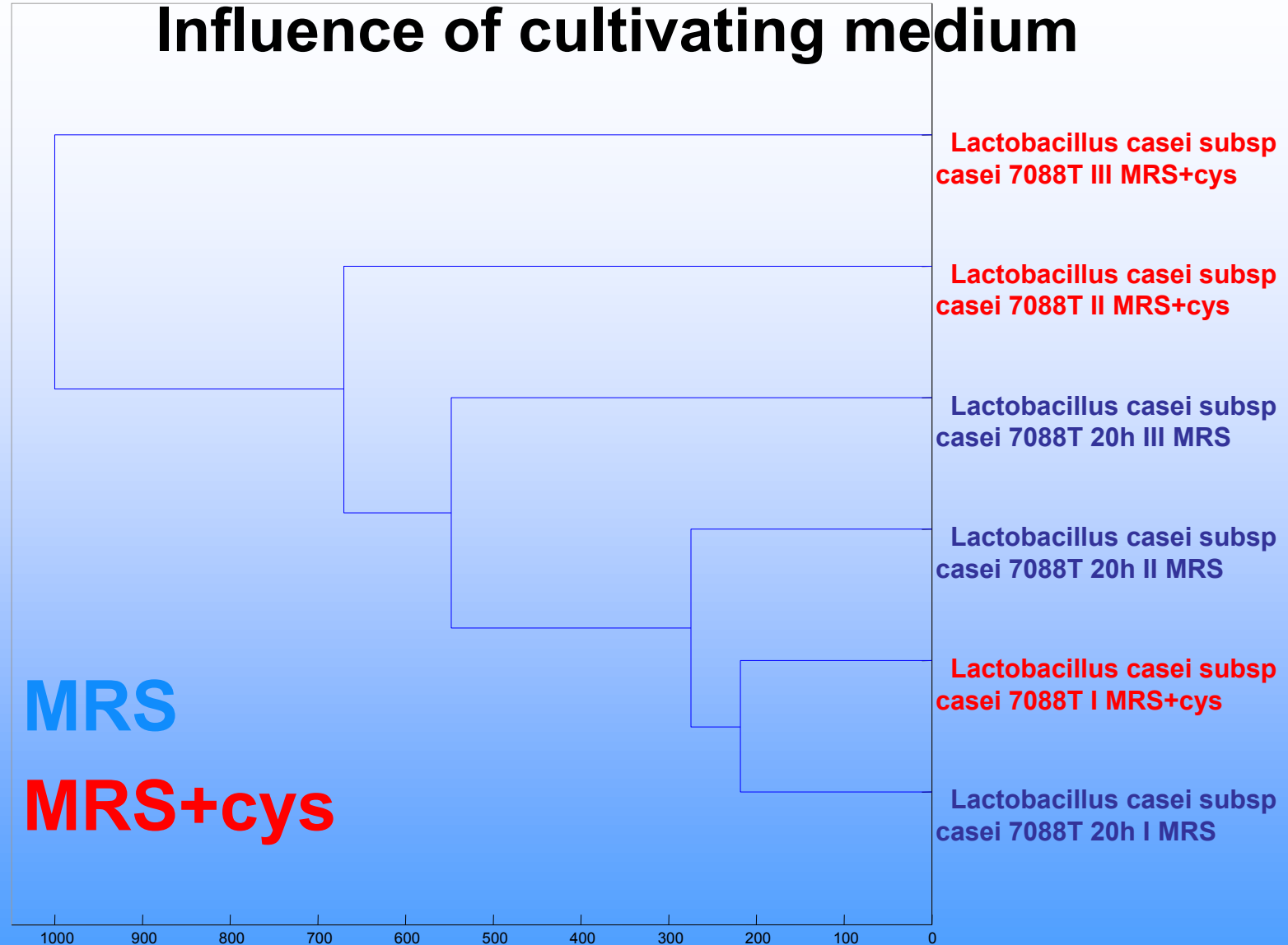
Lactobacillus casei ssp. *casei* CCM 7088T

Influence of cultivating medium



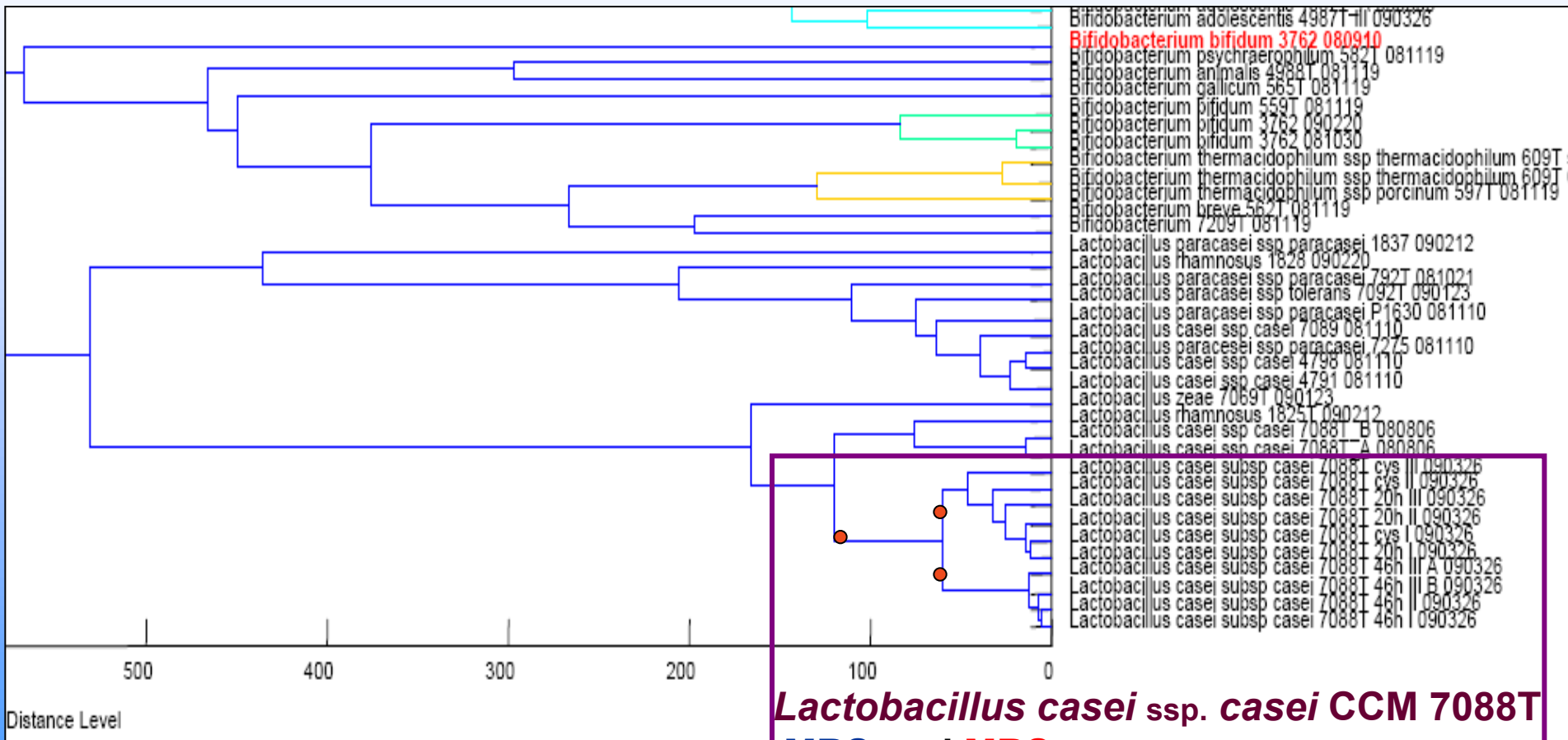
Lactobacillus casei ssp. *casei* CCM 7088T

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



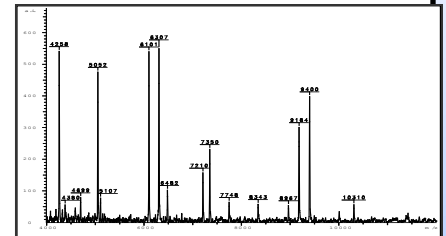
Lactobacillus casei ssp. **casei** CCM 7088T
 MRS and MRS+cys
 20h and 46h cultivation

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

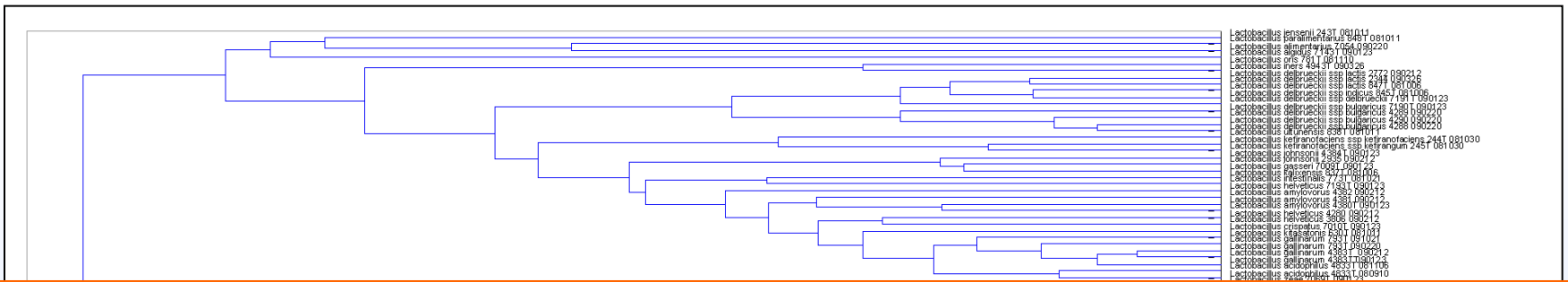


MALDI-MS profil *A. hydrophila*

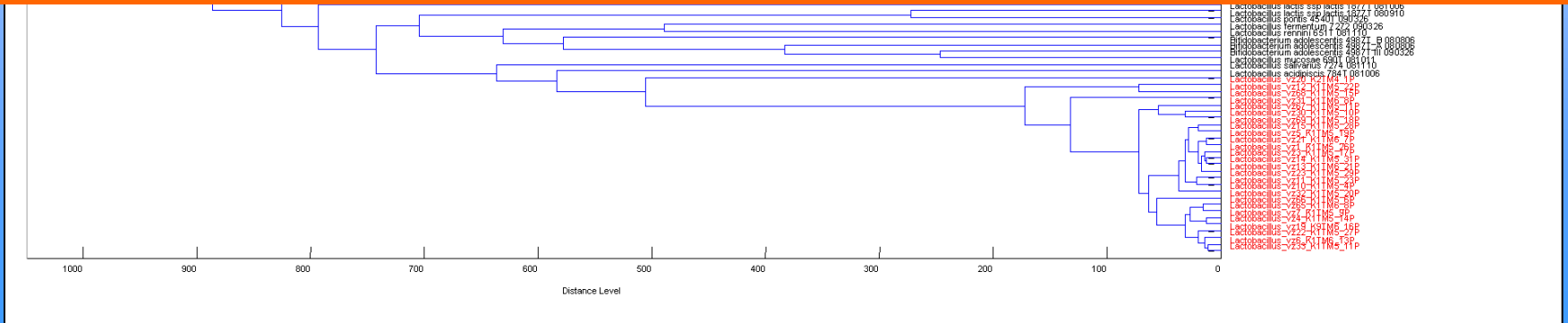
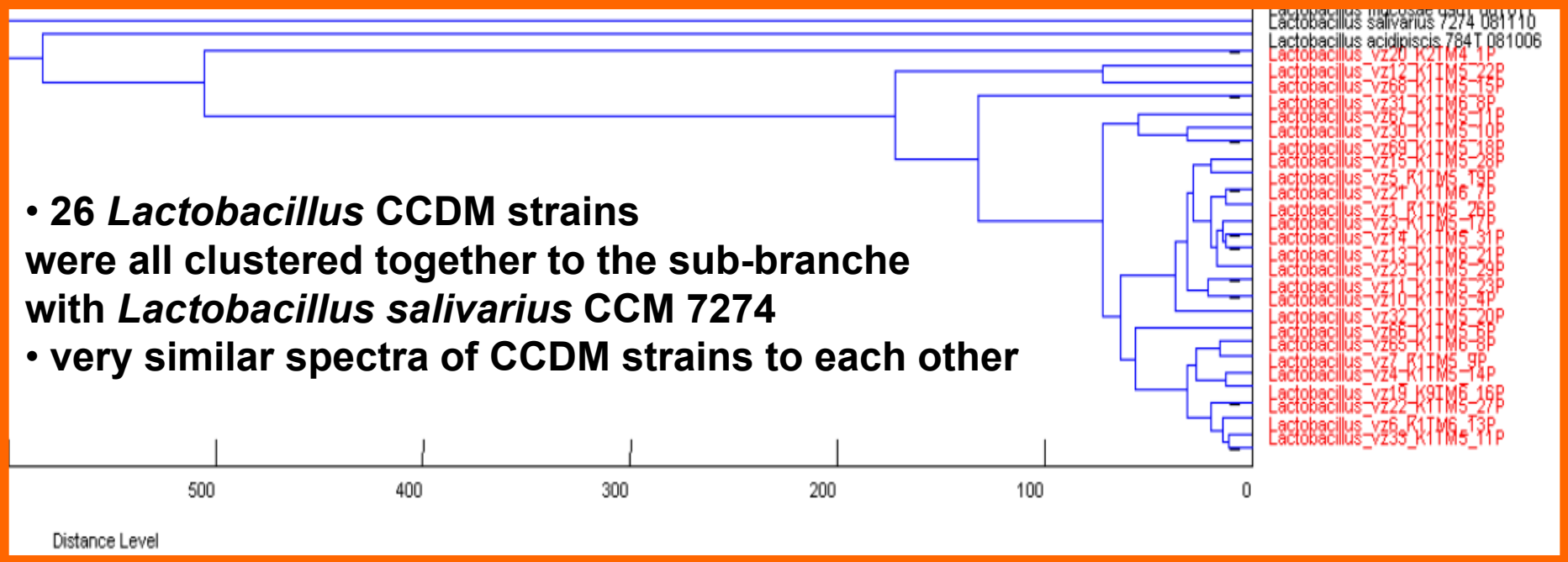
- Klinická diagnostika: *Bacillus* (i spory), *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Haemophilus* (screening nemocničních kmenů), *Helicobacter*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* (MRSA a MSSA)
- Rychlá chemotaxonomie – i druhy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

Potravinářství, technologie..

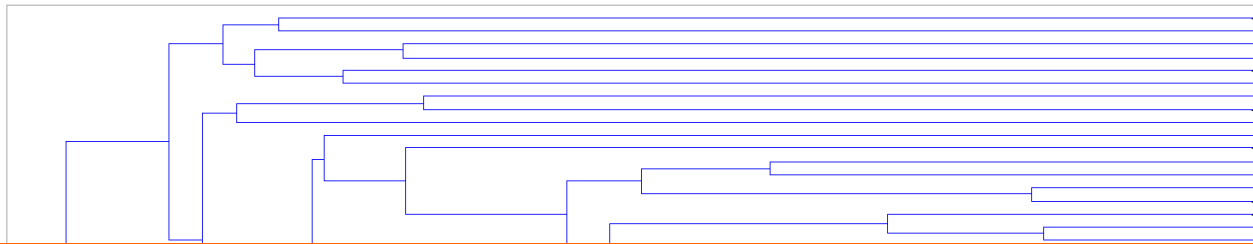
- Kontrola kontaminace
- Mutantních kmenů
- Potvrzení identity kmene
- Kmenově specifické vlastnosti – LAB
 - proteolytické, lipolytické...
 - predikce vlastností
- Biomarkery??



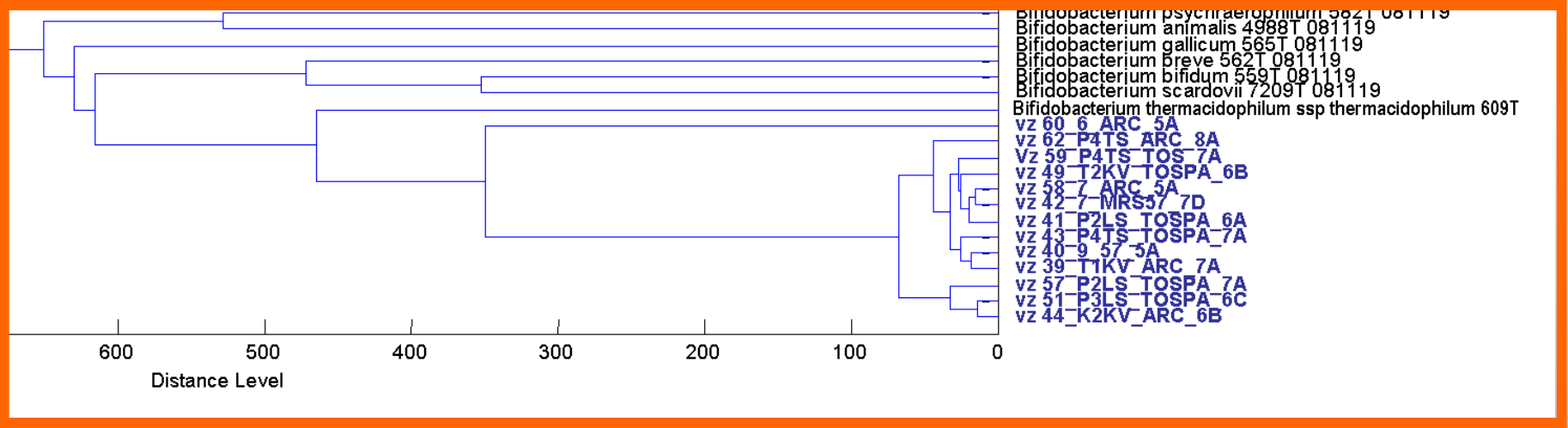
- **26 *Lactobacillus* CCDM strains** were all clustered together to the sub-branch with *Lactobacillus salivarius* CCM 7274
- very similar spectra of CCDM strains to each other



Score Oriented Dendrogram for U9U5ZU

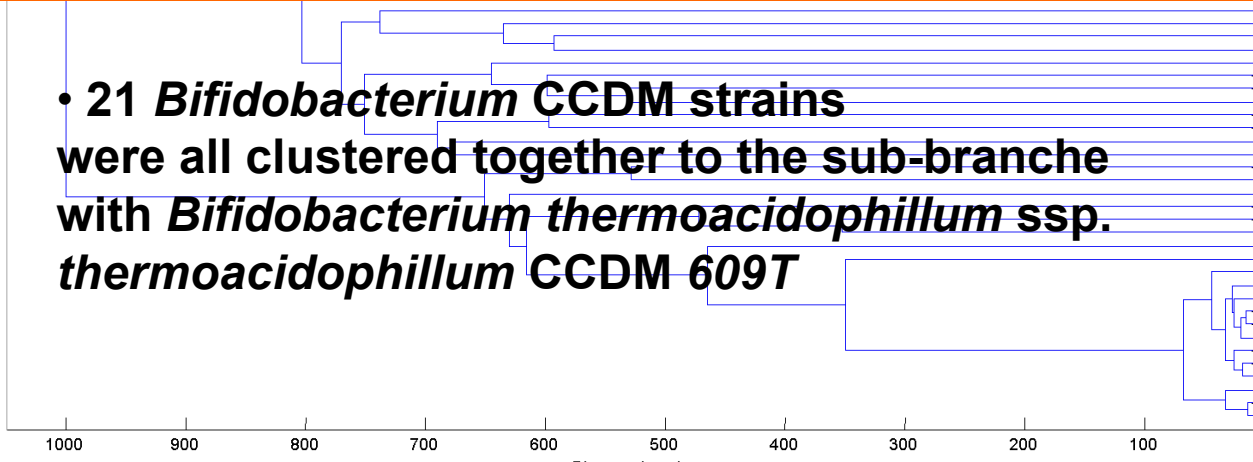


Lactobacillus_vz75
 Lactobacillus_saueri CDDM_649
 Lactobacillus_vz25_K1TM5_32P
 Lactobacillus_nagelii CDDM_648
 Lactobacillus_ruminis_783T_081021
 Lactobacillus_animalis_663T_090220
 Lactobacillus_sharpeae_CDDM_654
 Lactobacillus_reuteri_777T_090226
 Lactobacillus_cynocapsae_708T_090220
 Lactobacillus_jensenii_243T_081011
 Lactobacillus_iners_4943T_090326
 Lactobacillus_kalixensis_837T_081006
 Lactobacillus_intestinalis_773T_081021
 Lactobacillus_debrueckii_ssp_lactis_847T_081006
 Lactobacillus_debrueckii_ssp_indicus_845T_081006
 Lactobacillus_ultunensis_838T_081011
 Lactobacillus_kefiranofaciens_ssp_kefiranofaciens_244T_081030
 Lactobacillus_kefiranofaciens_ssp_kefiranofaciens_245T_081030



Bifidobacterium_psychraerophilum_562T_081119
 Bifidobacterium_animalis_4988T_081119
 Bifidobacterium_gallicum_565T_081119
 Bifidobacterium_breve_562T_081119
 Bifidobacterium_bifidum_559T_081119
 Bifidobacterium_scardovii_7209T_081119
 Bifidobacterium_thermoacidophilum_ssp_thermoacidophilum_609T
 vz_60_6_ARC_5A
 vz_62_P4TS_ARC_8A
 vz_59_P4TS_TOS_7A
 vz_49_T2KV_TOSPA_6B
 vz_58_7_ARC_5A
 vz_42_7_MRS57_7D
 vz_41_P2LS_TOSPA_6A
 vz_43_P4TS_TOSPA_7A
 vz_40_9_57_5A
 vz_39_T1KV_ARC_7A
 vz_57_P2LS_TOSPA_7A
 vz_51_P3LS_TOSPA_6C
 vz_44_K2KV_ARC_6B

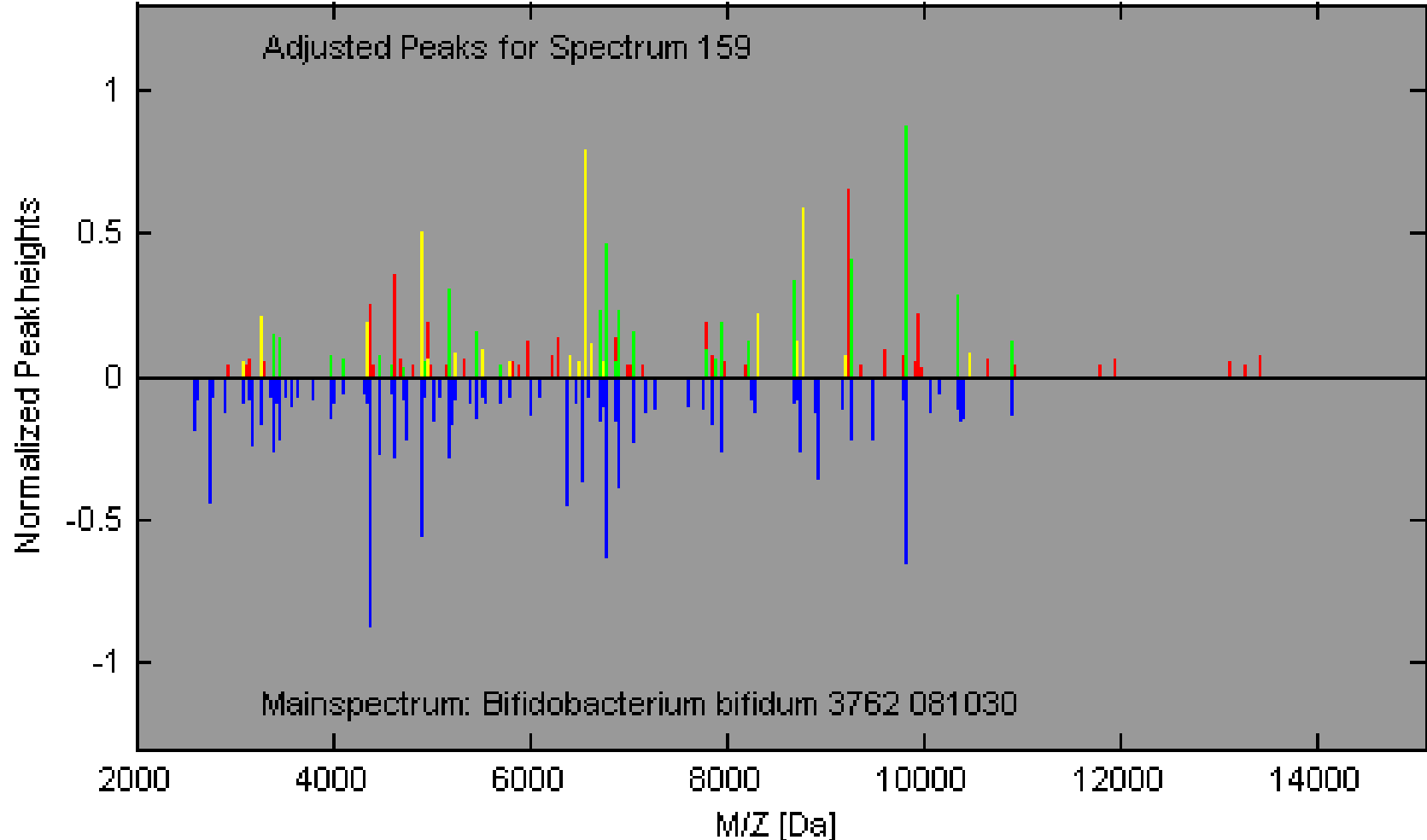
• **21 *Bifidobacterium* CCDM strains**
 were all clustered together to the sub-branche
 with *Bifidobacterium thermoacidophilum* ssp.
thermoacidophilum CCDM 609T



Lactobacillus_collinoides_7038T_090123
 Lactobacillus_mucosae_690T_081011
 Lactobacillus_oris_781T_090220
 Lactobacillus_coleohominis_789T_081006
 Lactococcus_raffinolactis_4543T_081006
 Lactobacillus_pontis_4540T_090326
 Lactobacillus_rennini_651T_081110
 Lactobacillus_lactis_ssp_lactis_1877T_081006
 Lactobacillus_vz75_K1TM5_32P_salivarius
 Lactobacillus_acidiphilus_784T_081006
 Lactobacillus_parietarius_848T_081011
 Bifidobacterium_adolescentis_4987T_A_080906
 Bifidobacterium_psychraerophilum_562T_081119
 Bifidobacterium_animalis_4988T_081119
 Bifidobacterium_gallicum_565T_081119
 Bifidobacterium_breve_562T_081119
 Bifidobacterium_bifidum_559T_081119
 Bifidobacterium_scardovii_7209T_081119
 Bifidobacterium_thermoacidophilum_ssp_thermoacidophilum_609T
 vz_60_6_ARC_5A
 vz_62_P4TS_ARC_8A
 vz_59_P4TS_TOS_7A
 vz_49_T2KV_TOSPA_6B
 vz_58_7_ARC_5A
 vz_42_7_MRS57_7D
 vz_41_P2LS_TOSPA_6A
 vz_43_P4TS_TOSPA_7A
 vz_40_9_57_5A
 vz_39_T1KV_ARC_7A
 vz_57_P2LS_TOSPA_7A
 vz_51_P3LS_TOSPA_6C
 vz_44_K2KV_ARC_6B

Lactobacillus 52 6-57-5A

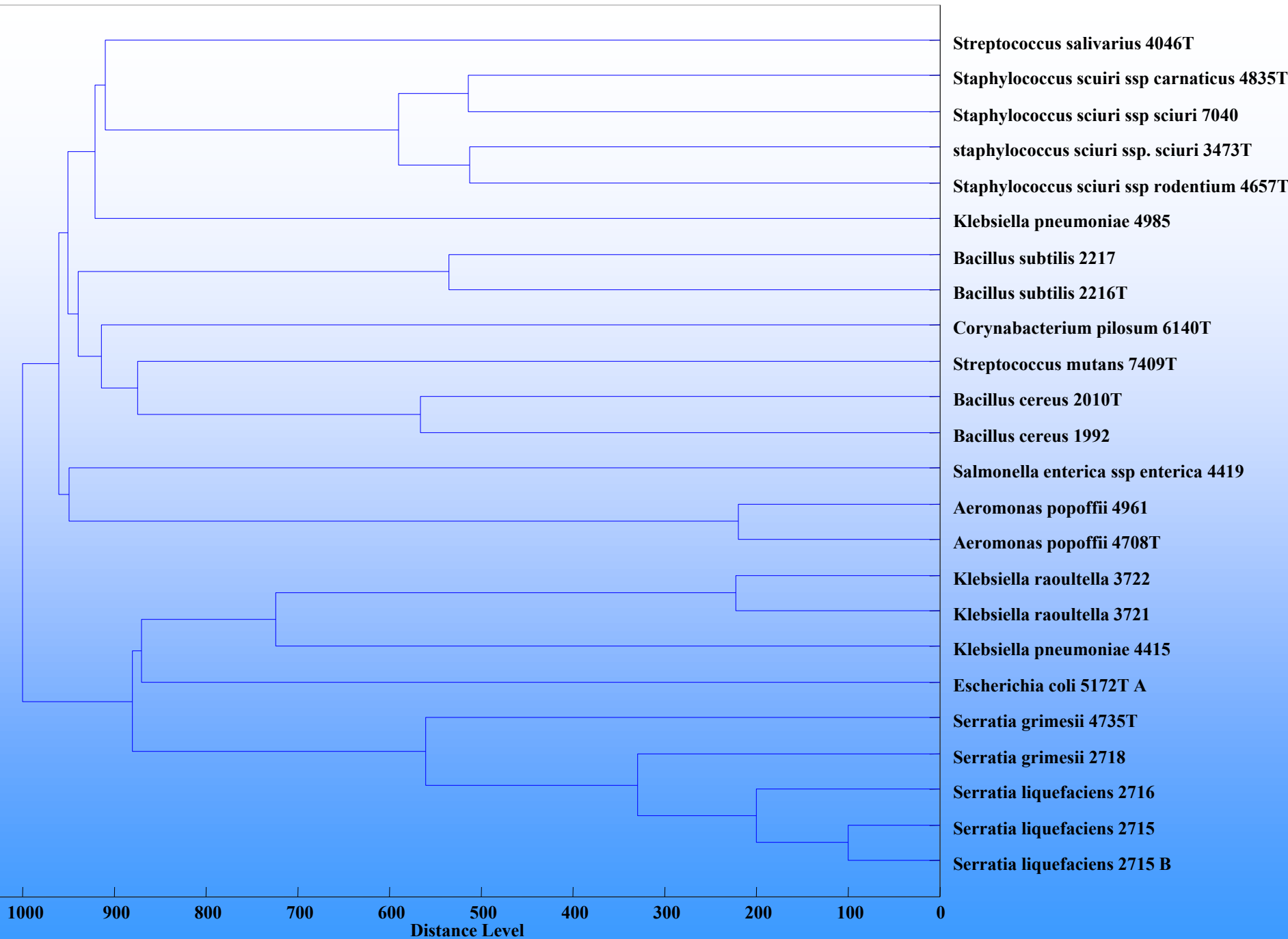
Adjusted Normalized Peaklists



Green signals – identical to reference signals

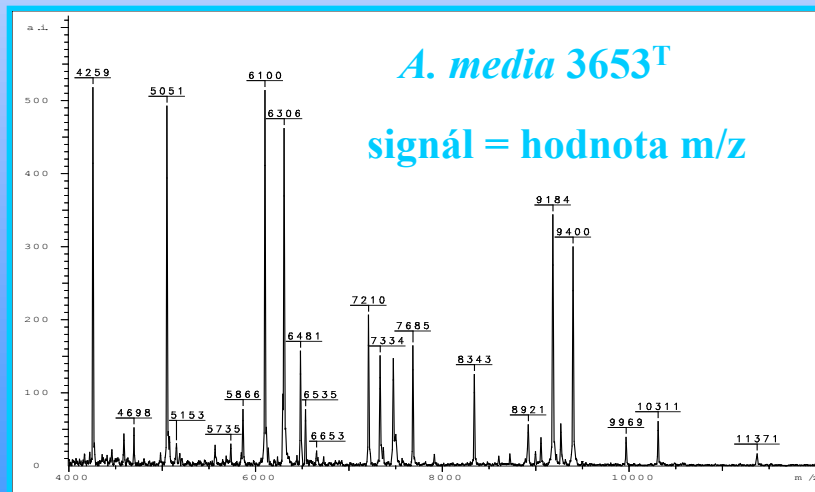
Yellow signals – identical to reference signals with aberration m/z

Red signals – distant signals

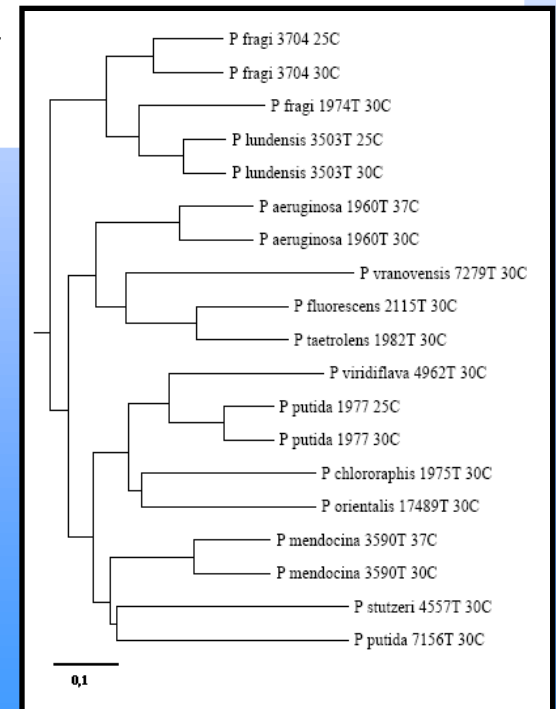


Současné cíle a využití techniky

- 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

FI MU

Vývoj software

Shlukové analýzy

- Analýza spekter
- Studie hladiny

signal-to-noise

Biotyper Software
(BRUKER, Daltonics)

- Komerčně pro identifikaci . Typizace ???

- 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