

A MALDI-TOF tömegspektrometria alkalmazási és fejlesztési lehetőségei a patogén mikroorganizmusok vizsgálatában

Gorka Ágnes

Lovász Csaba

Volk Gábor

Hungalimentaria 2017.04.27.

ELEMZÉS

TANÁCSADÁS

TERVEZÉS

1983 ÓTA



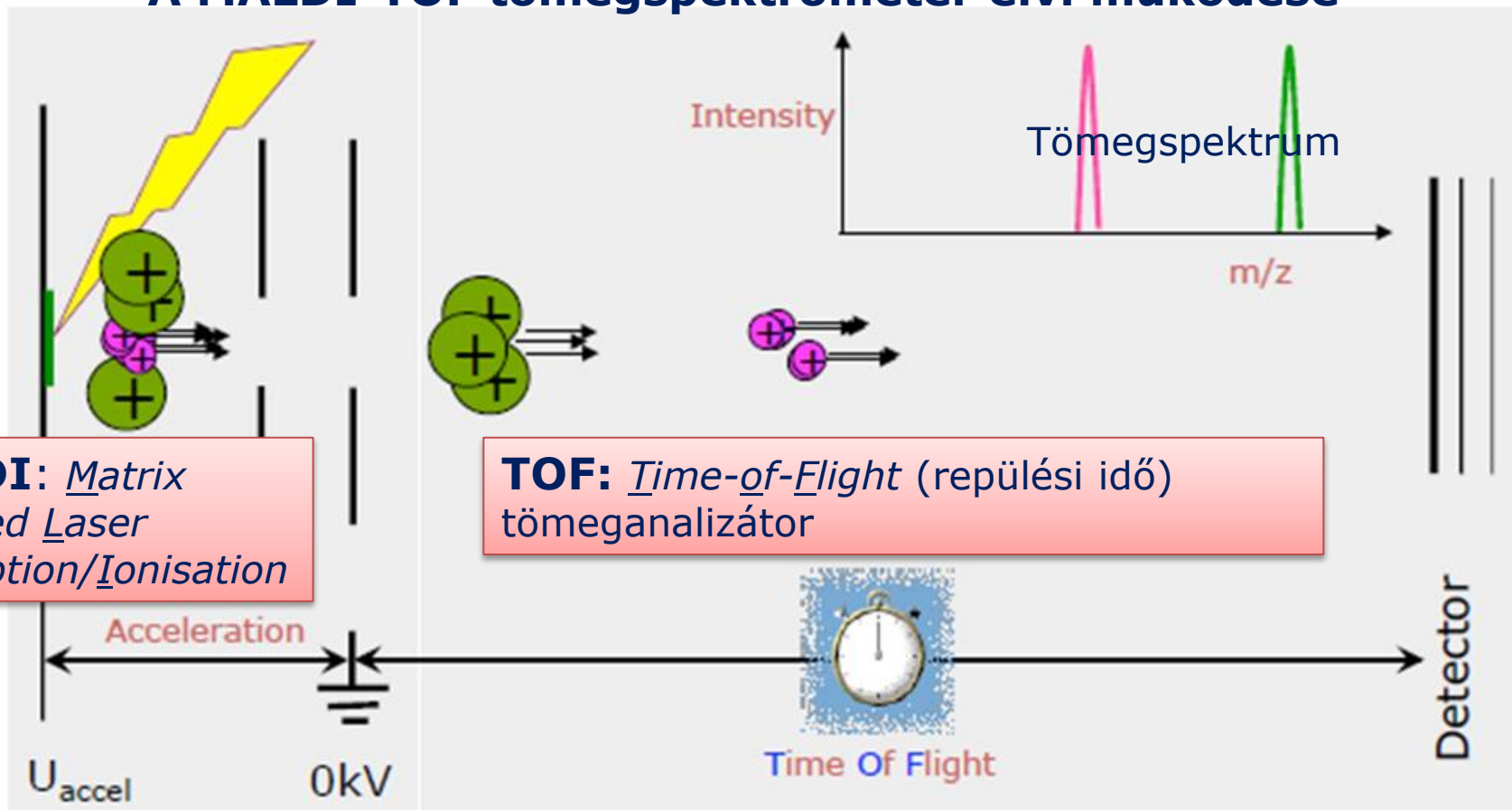
Tömegspektrometria (MS) – szerkezetkutatási módszer

Ionforrás
ionizáció

Tömeganalizátor
ionok felgyorsítása → tömeg/töltés szerinti
elválasztás

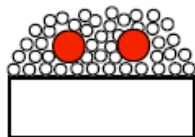
Detektor

A MALDI-TOF tömegspektrométer elvi működése

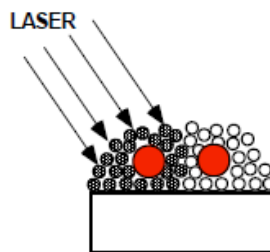


MALDI: Mátrix Asszisztált(Segített) Lézer Deszorpció/Ionizáció

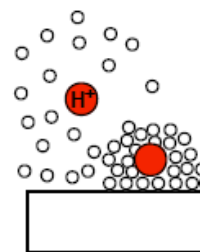
A mátrixba ágyazott minta



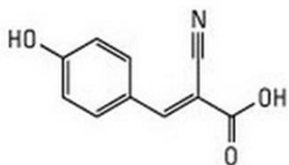
Mátrix molekulák gerjesztése lézerrel



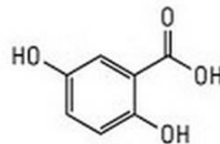
A minta gázfázisba jut és protonálódik



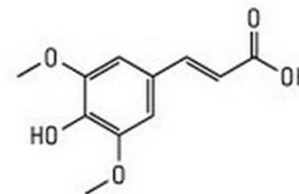
LÉZER + MÁTRIX



HCCA; CHCA



DHB



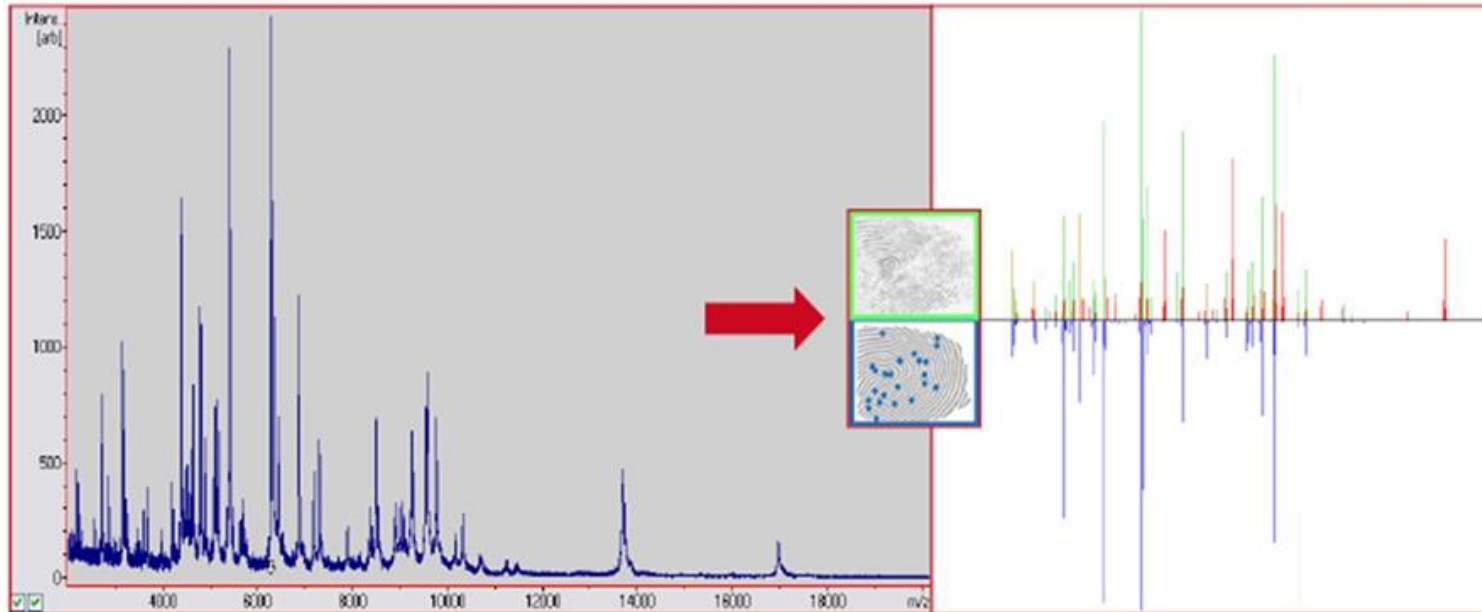
SA

„Lágy” ionizáció → fehérjék, peptidek vizsgálata

A mikrobák **egyedi fehérjeprofil**al rendelkeznek
→ fajra/nemzetségre jellemző **„ujjlenyomat”**
(elsődlegesen riboszómális fehérjék)



Azonosítás: tömegspektrum mintázata (fehérjeprofil)
↓
összehasonlítás a referencia-tömegspektrumokkal



MALDI Biotyper
RTC szoftver:

Referencia-
adatbázis
~ **6900** fajra

„**MINTA**”: baktérium tenyészet



Egyedi telepek
kiválasztása



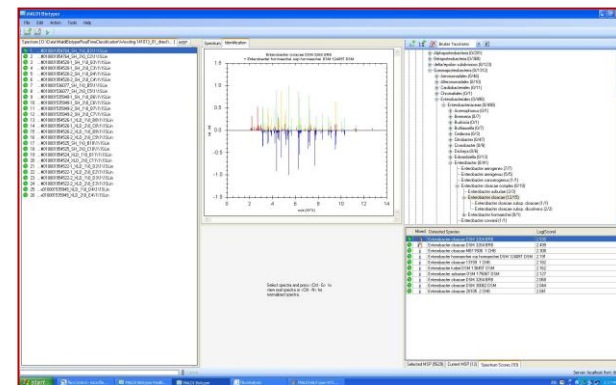
Mintaelőkészítés



Tömegspektrum



Adatértékelés
Azonosítás



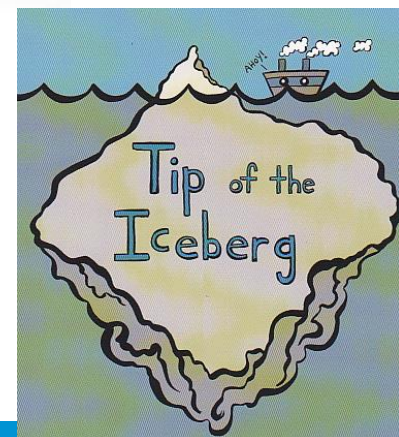
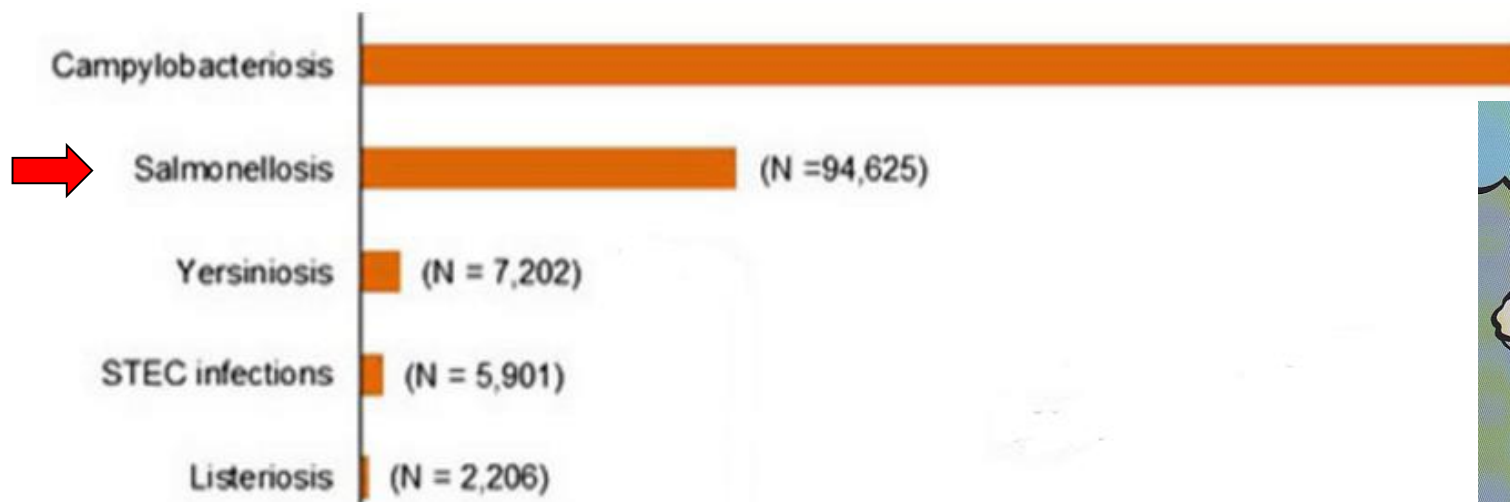
Az azonosítás időigénye 96 mintára nézve: << **1 óra!**

***Salmonella*:** Ételfertőzést okozó zoonotikus patogén baktérium

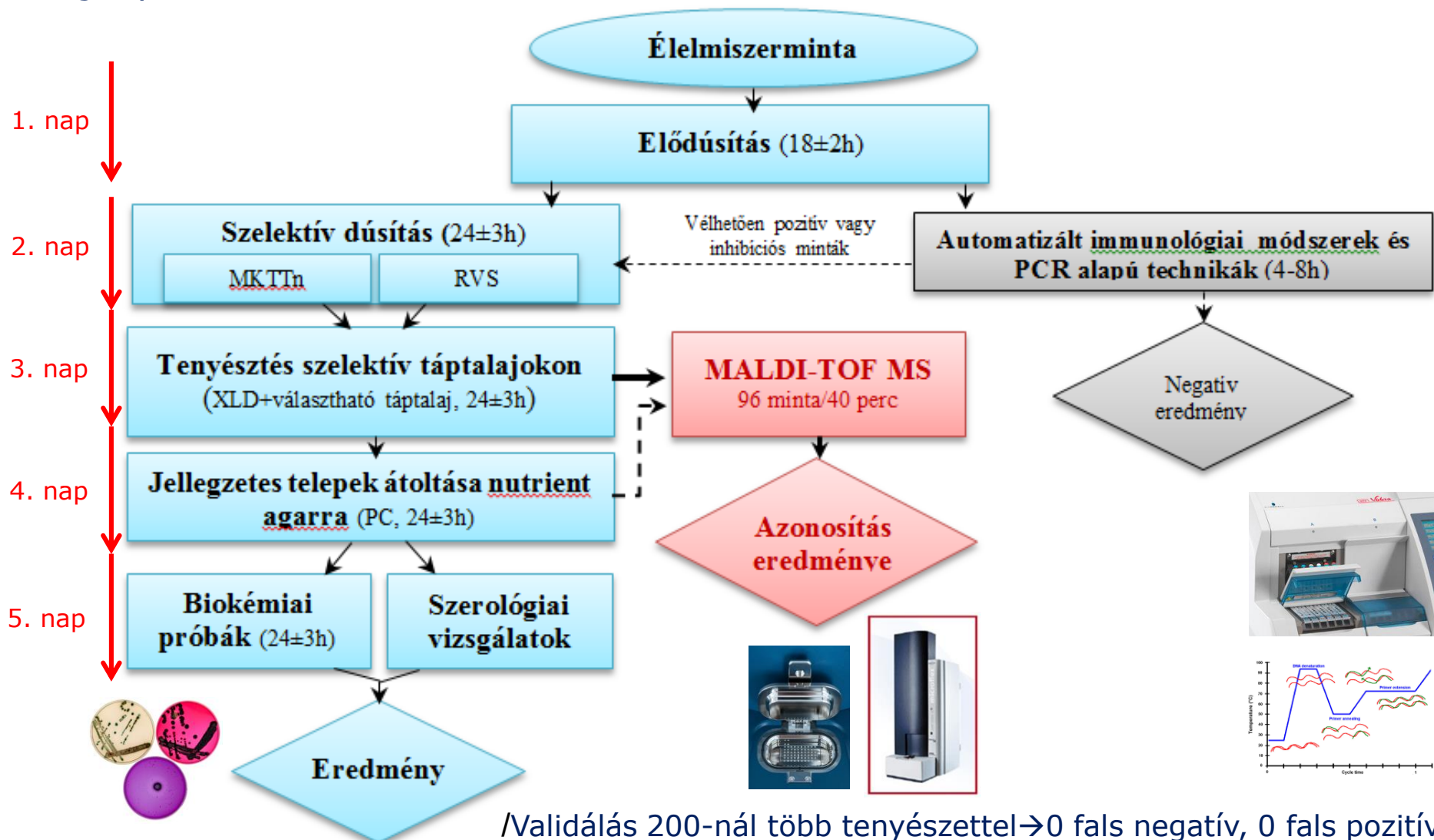
- gastroenteritiszes járványok okozója világszerte
- **>>96 400** megerősített humán szalmonellózis eset az EU-ban évente
- /szárnyasokban, tojásaikban, marha- és sertéshúsban/



EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2015



A klasszikus MSZ EN ISO 6579:2006 szabványos módszer és a műszeres technikák időigényének összehasonlítása



/Validálás 200-nál több tenyészzettel → 0 fals negatív, 0 fals pozitív/

Jelentősége:

- tömeges fertőzések felismerése
- járványügyi követés
- kontaminációs források, útvonalak azonosítása
- egyedi esetek kezelése

White-Kauffmann-Le Minor séma

Antigének (O; H; Vi) vizsgálata

Kivitelezés: **tárgylemez-agglutináció**

Időigényes, szaktudást igényel, drága
(250+ antiszérum)



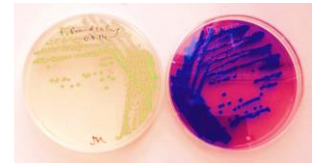
Faj, alfaj alatti rendszertani kategóriák vizsgálata

A nagymértékben expresszált **gének polimorfizmusai** különböző **aminosav-variációkat** eredményezhetnek a fehérjékben

→ **jellegzetes tömegszám-eltolódások**ként
jelentkezhetnek a tömegspektrumon

Több, mint **45 különböző** *Salmonella enterica* subsp. *enterica* szerovariáns referenciatörzsének és izolátumának vizsgálata MALDI-TOF MS-sel

- köztük az 5 epidemiológiailag legjelentősebb szerovariáns:
S. Enterica, S. Typhimurium, S. Virchow, S. Infantis, S. Hadar



Szakirodalmi háttér a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* szerovariánsok megkülönböztetésére MALDI-TOF MS metodikával

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, June 2011, p. 4136–4146
0099-2240/11/\$12.00 doi:10.1128/AEM.02418-10
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 77, No. 12

Rapid Screening of Epidemiologically Important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovars by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry[▽]

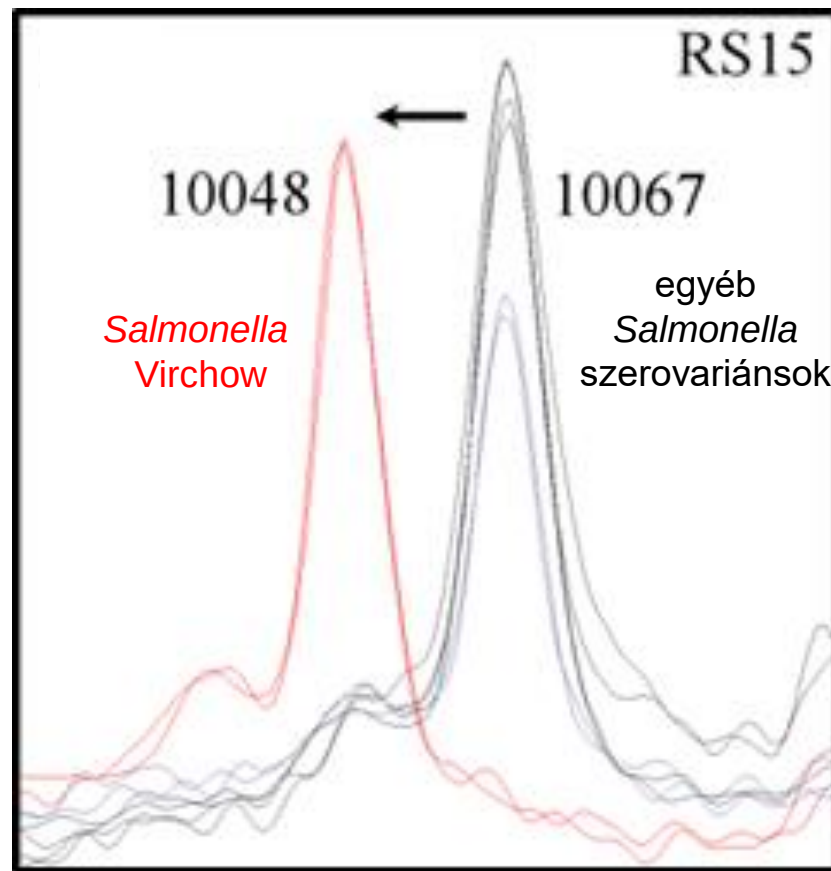
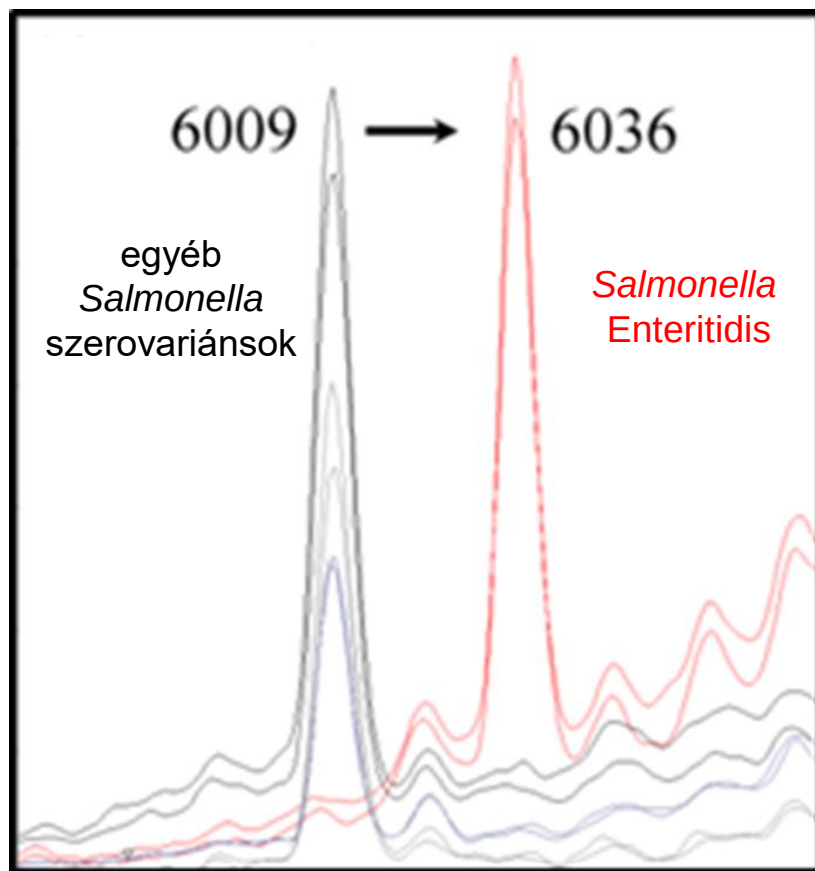
Ralf Dieckmann and Burkhard Malorny*

Federal Institute for Risk Assessment, Biology Safety Department, National Salmonella Reference Laboratory, Berlin, Germany

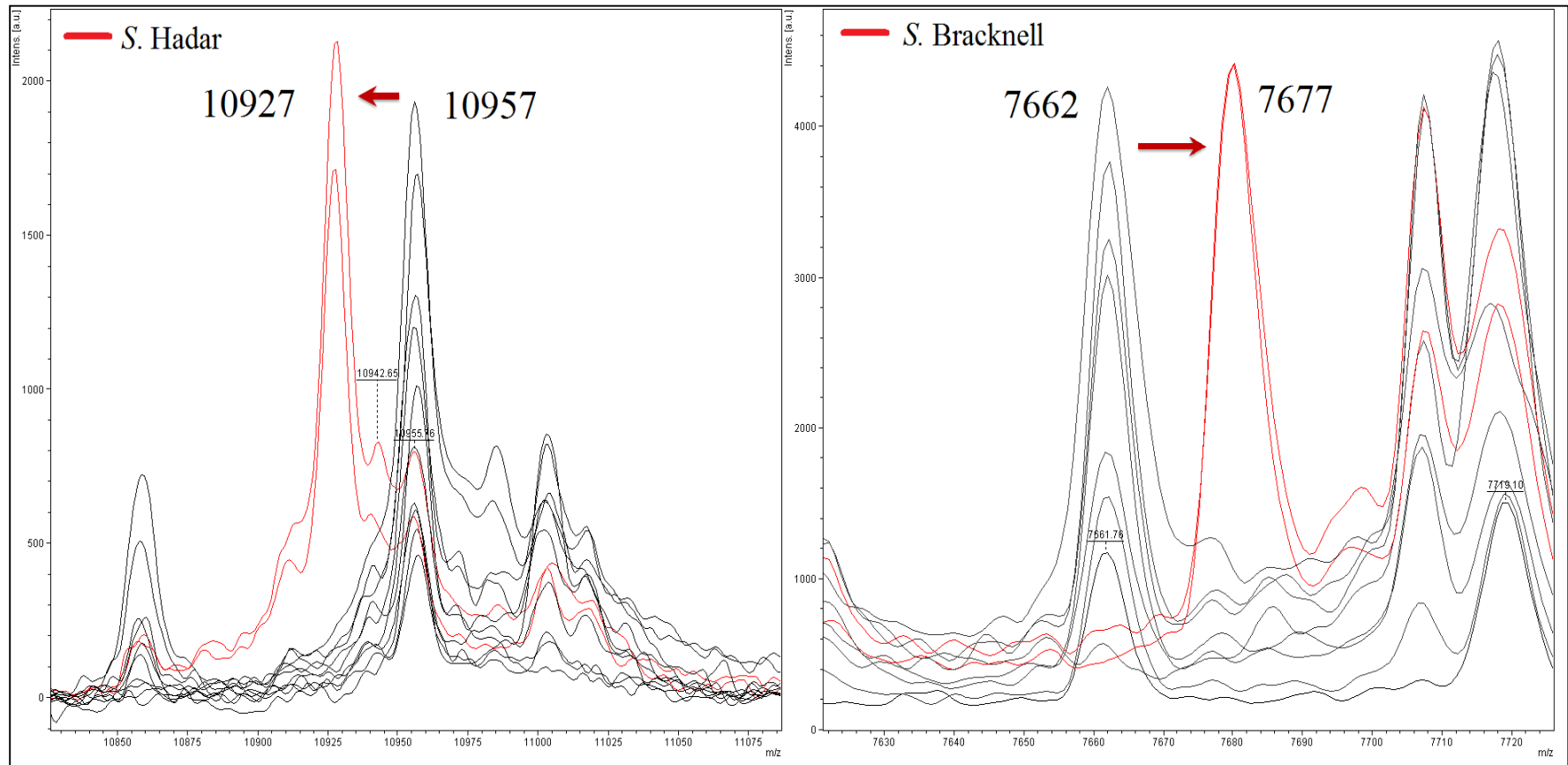
Received 12 October 2010/Accepted 11 April 2011

Currently, 2,610 different *Salmonella* serovars have been described according to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. They are routinely differentiated by serotyping, which is based on the antigenic variability at lipopolysaccharide moieties (O antigens), flagellar proteins (H1 and H2 antigens), and capsular polysaccharides (Vi antigens). The aim of this study was to evaluate the potential of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for rapid screening and identification of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars based on specific sets of serovar-identifying biomarker ions. By analyzing 913 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains representing 89 different serovars using MALDI-TOF mass spectrometry, several potentially serovar-identifying biomarker ions were selected. Based on a combination of genus-, species-, subspecies-, and serovar-identifying biomarker ions, a decision tree classification algorithm was derived for the rapid identification of the five most frequently isolated *Salmonella enterica* serovars, Enteritidis, Typhimurium/4,[5],12:i:-, Virchow, Infantis, and Hadar. Additionally, sets of potentially serovar-identifying biomarker ions were detected for other epidemiologically interesting serovars, such as Choleraesuis, Heidelberg, and Gallinarum. Furthermore, by using a bioinformatic approach, sequence variations corresponding to single or multiple amino acid exchanges in several biomarker proteins were tentatively assigned. The inclusivity and exclusivity of the specific sets of serovar-identifying biomarker ions for the top 5 serovars were almost 100%. This study shows that whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry can be a rapid method for prescreening *S. enterica* subsp. *enterica* isolates to identify epidemiologically important serovars and to reduce sample numbers that have to be subsequently analyzed using conventional serotyping by slide agglutination techniques.

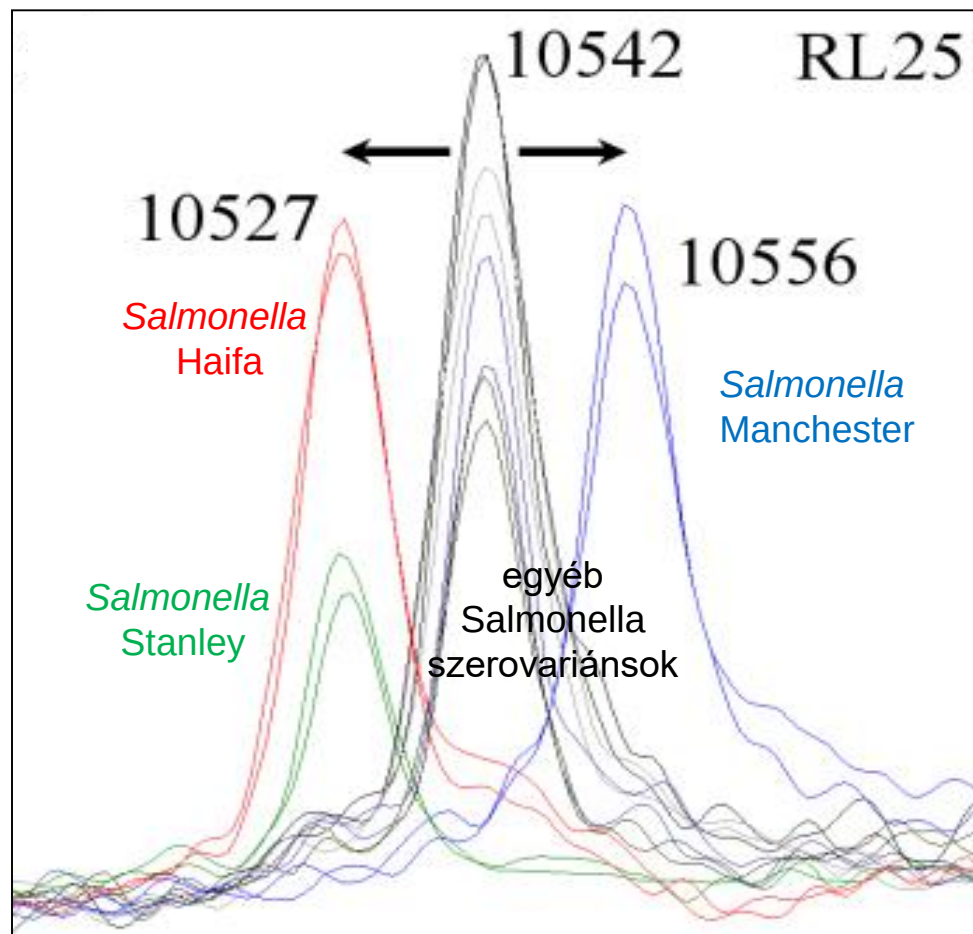
Jellegzetes tömegszám-eltolódások, biomarker ionok a különböző *Salmonella enterica* subsp. *enterica* szerovariánsok tömegspektrumában



Jellegzetes tömegszám-eltolódások, biomarker ionok a különböző *Salmonella enterica* subsp. *enterica* szerovariánsok tömegspektrumában

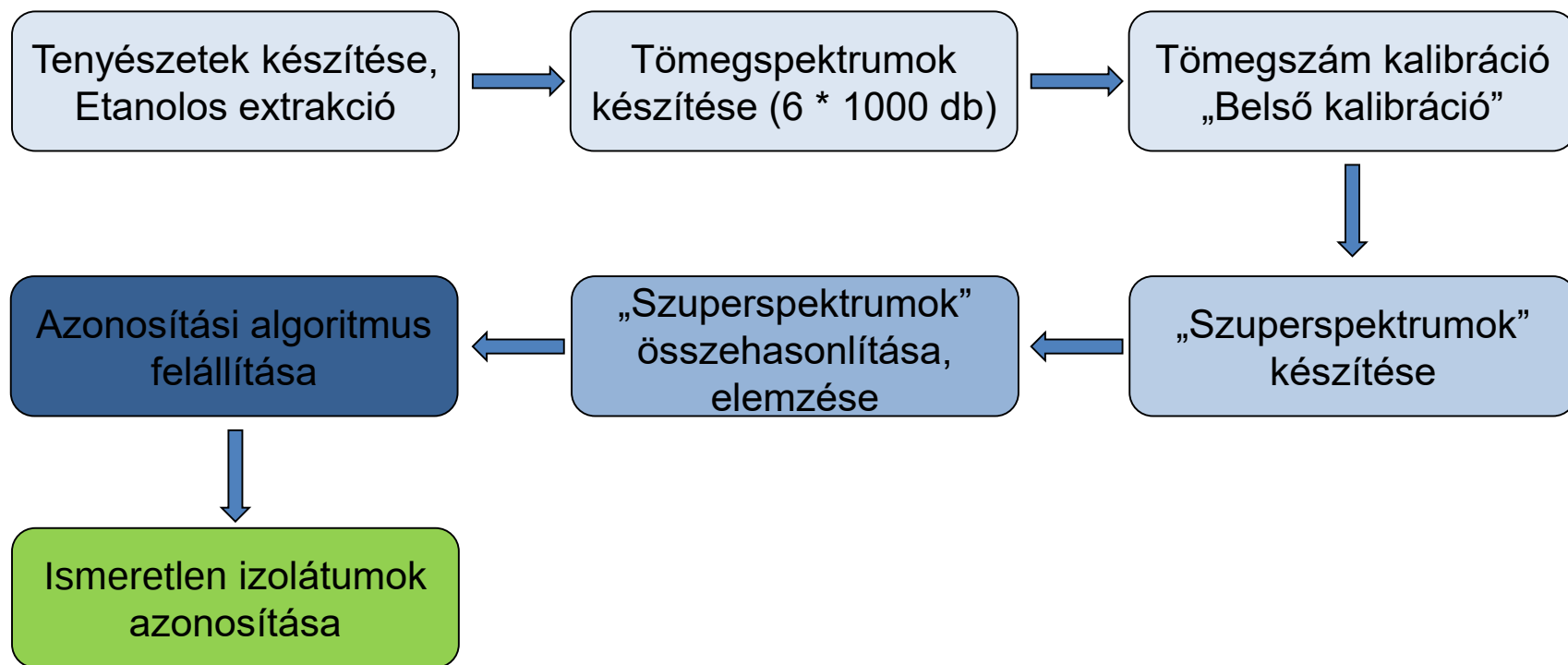


Jellegzetes tömegszám-eltolódások, biomarker ionok a különböző *Salmonella enterica* subsp. *enterica* szerovariánsok tömegspektrumában



A nagy mennyiségű tömegspektrometriás adat feldolgozása nem egyszerű feladat → számítás technikai háttér

„Szuperspektrum” készítése – átlagolt, normalizált, ismételhető, tömegszám pontos, összehasonlítható tömegspektrumok előállítása



A szuperspektrumok összehasonlítása, elemzése:

Táblázat formátum – tömegszám, relatívintenzitás, megjelenési valószínűség

„Belső kalibráció”-hoz használható tömegszámok keresése, biomarkerek

m/z: [3000-16000 Da]

P[%]	m/z	Anatum	Banana	Bracknell	Enteritidis	Hadar	Infantis	Virchow	Typhimurium	Brandenburg	Manchester
50	5 081		8	4		6			3		8
100	5 143	31	46	16	7	16	36	13	38	37	6
10	5 228										2
60	5 272	7	11	4			9		10	8	
10	5 279										2
80	5 311	4	6	4		4	4		3	4	3
80	5 340	7	9	3		9	9	10	6	5	
80	5 353	5	8		2	10	7	11	3	4	
100	5 370	31	54	15	14	46	41	42	24	30	7
100	5 381	86	100	28	22	100	109	100	77	72	7
90	5 396	9	18	3	2	10	13	11	11	8	
90	5 409	11	15	2	2	9	12	12	10	5	
20	5 419					6		8			
20	5 423	5					5				
50	5 433	7	5				8		3	4	
40	5 444	10					14		6	5	
10	5 464					6					
70	5 479		11	10	3	2	5			5	8

Jellegzetes biomarker ionok a különböző *Salmonella enterica* subsp. *enterica* szerovariánsok tömegspektrumaiban

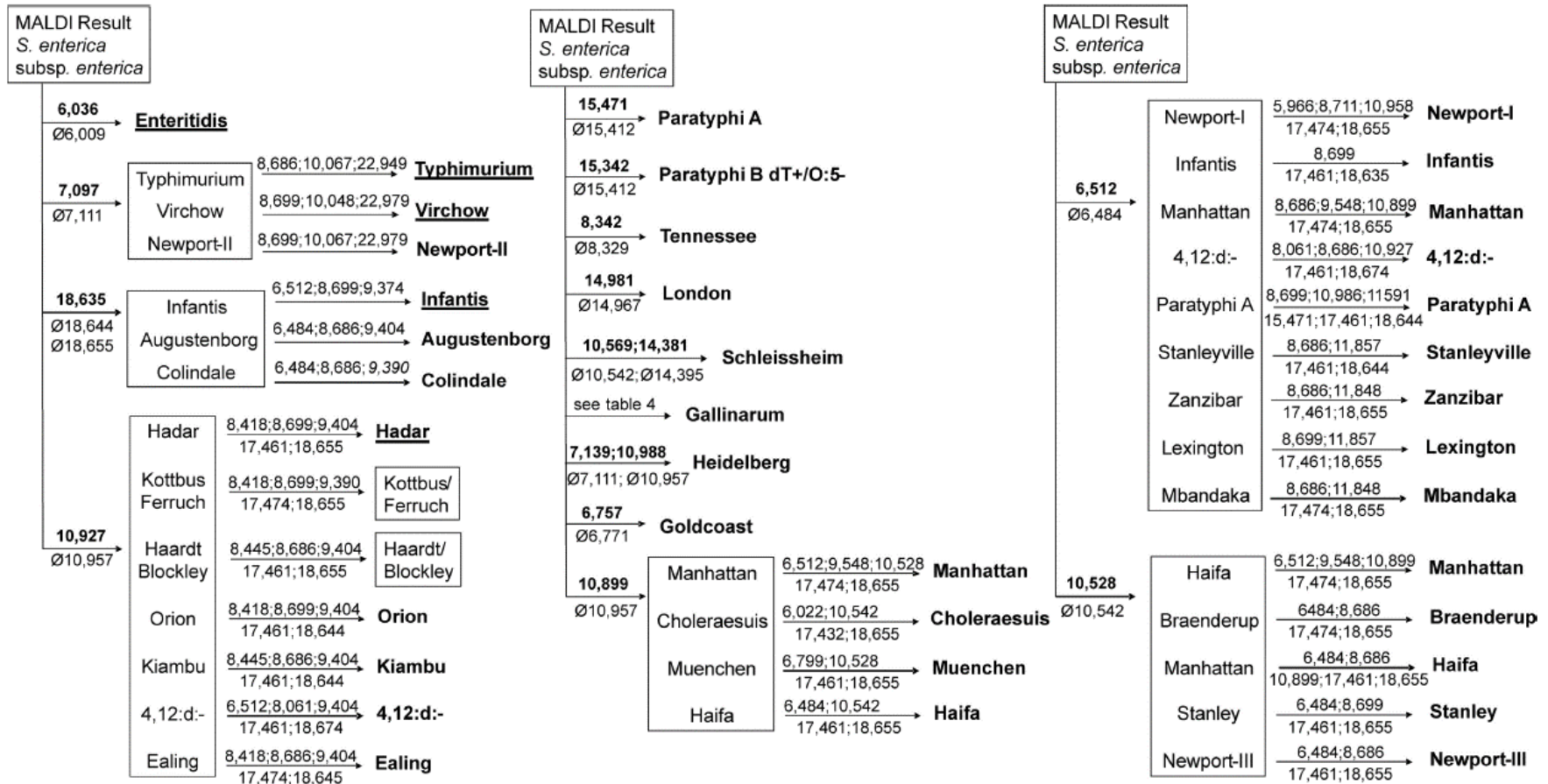
TABLE 5. Major serovar-identifying peaks used for MALDI-TOF screening of the top 5 serovars and results of selectivity validation^a

Parameter	Enteritidis	Typhimurium	Virchow	Infantis	Hadar
Antigenic formula	1,9,12:g,m:-	1,4,[5],12:i:1,2/1,4,[5],12:i:-	6,7,14:r:1,2	6,7,14:r:1,5	6,8,z10:e,n,x
Selectivity (%)	99.3	100	100	100	99.1
Exclusivity (%)	100	100	100	100	100
Inclusivity (%)	86.5	100	100	100	85.7
<i>m/z</i>					
Putative uncharacterized protein	6,036	6,009	6,008	6,009	6,009
Protein Gns	6,484	6,484	6,484	6,512	6,484
Uncharacterized protein YhfG	6,771	6,799	6,799	6,718	6,771
Putative uncharacterized protein YaiA	7,111	7,097	7,097	7,111	7,111
Putative inner membrane protein STM0348	8,686	8,686	8,699	8,699	8,699
NA ^a	9,390	9,404	9,404	9,374	9,404
Ribosomal protein RS15	10,067	10,067	10,048	10,067	10,067
Uncharacterized protein YbgS	10,958	10,958	10,958	10,958	10,927
Putative inner membrane protein YgaM	11,857	11,848	11,848	11,857	11,848
Ribosomal protein RS7	17,474	17,461	17,461	17,461	17,461
Putative uncharacterized protein YciF	18,644	18,655	18,655	18,635	18,654
Superoxide dismutase SodM (Mn)	23,012	22,949	22,979	22,979	22,979

^a Highly specific biomarker combinations are indicated in boldface.

Forrás: *Appl. and Enviro. Microbiol.* 2011,77(12):4136

A *Salmonella enterica* subsp. *enterica* szerovariánsok megkülönböztetése a biomarker ionok alapján



Forrás: Appl. and Enviro. Microbiol. 2011,77(12):4136

Szakirodalmi háttér a *Listeria* speciesek megkülönböztetésére MALDI-TOF MS metodikával

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 2008, p. 5402–5407
0099-2240/08/\$08.00+0 doi:10.1128/AEM.02689-07
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 74, No. 17

Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry[†]

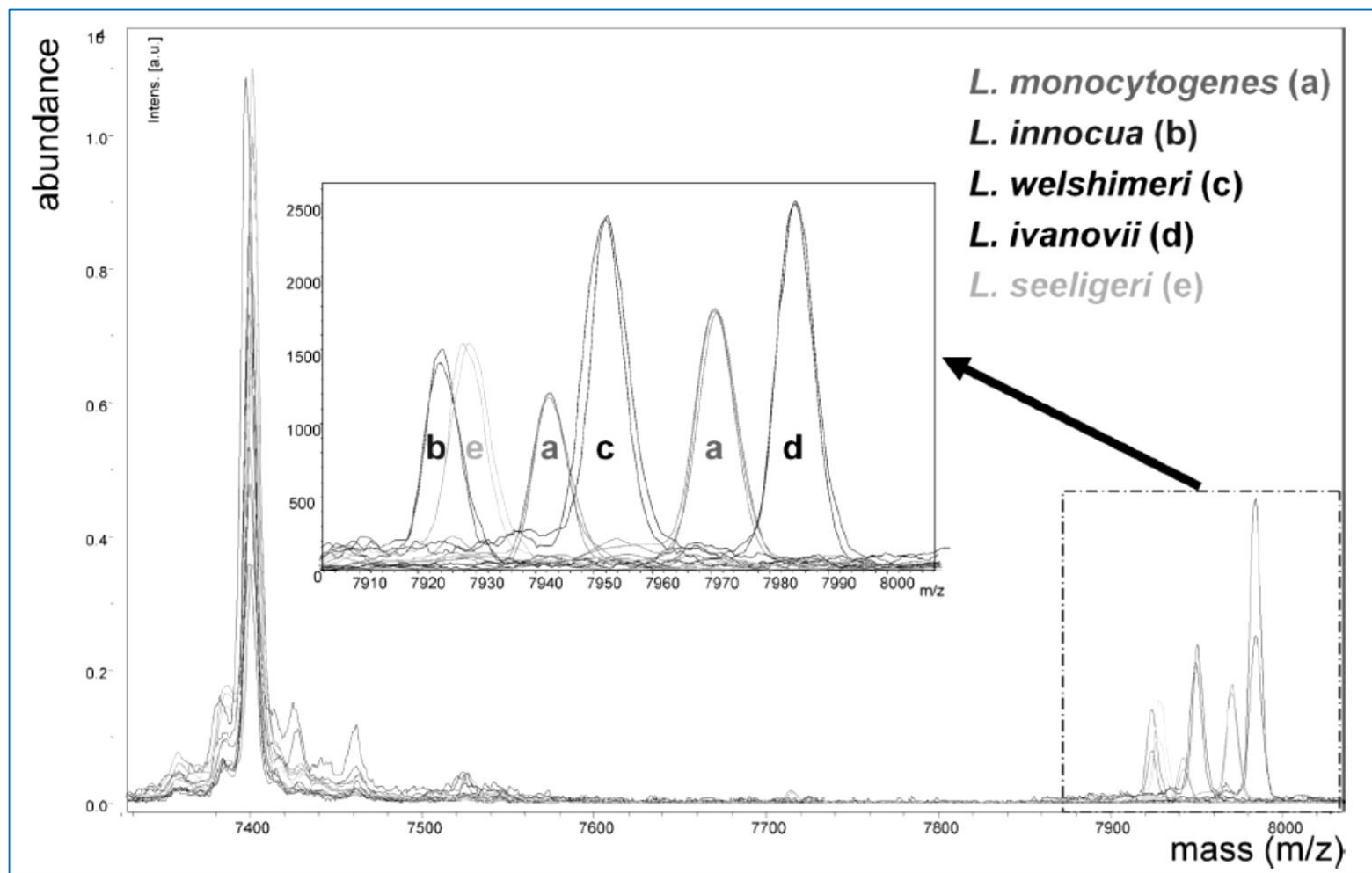
Sukhadeo B. Barbuddhe,¹ Thomas Maier,² Gerold Schwarz,² Markus Kostrzewa,²
Herbert Hof,³ Eugen Domann,¹ Trinad Chakraborty,¹ and Torsten Hain^{1*}

*Institute of Medical Microbiology, Justus Liebig University, Frankfurter Strasse 107, D-35392 Giessen, Germany¹;
Bruker Daltonik GmbH, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany²; and University Hospital Mannheim,
Institute of Medical Microbiology, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, D-68167 Mannheim, Germany³*

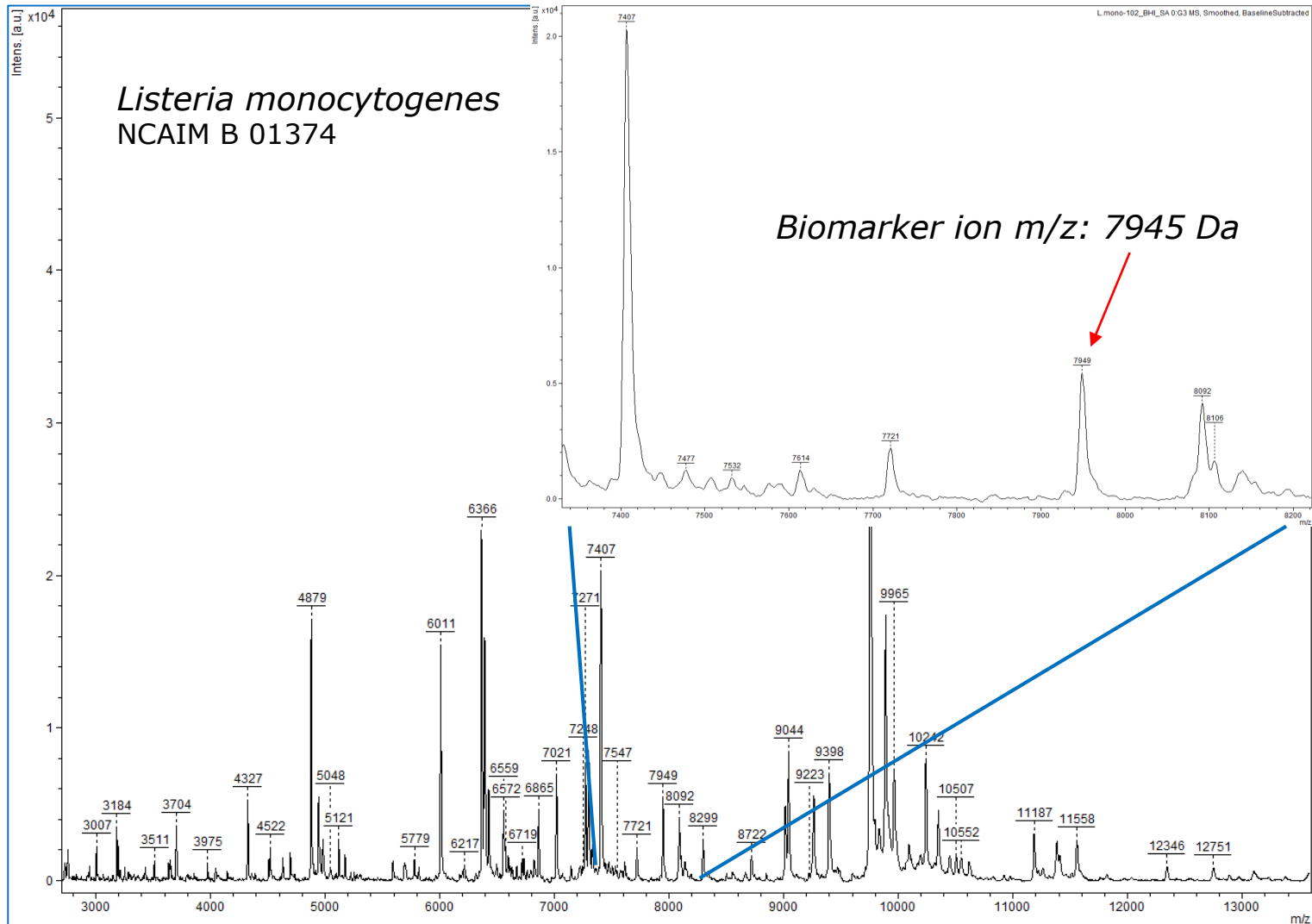
Received 28 November 2007/Accepted 30 June 2008

Listeria monocytogenes is a food-borne pathogen that is the causative agent of human listeriosis, an opportunistic infection that primarily infects pregnant women and immunologically compromised individuals. Rapid, accurate discrimination between *Listeria* strains is essential for appropriate therapeutic management and timely intervention for infection control. A rapid method involving matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) that shows promise for identification of *Listeria* species and typing and even allows for differentiation at the level of clonal lineages among pathogenic strains of *L. monocytogenes* is presented. A total of 146 strains of different *Listeria* species and serotypes as well as clinical isolates were analyzed. The method was compared with the pulsed-field gel electrophoresis analysis of 48 *Listeria* strains comprising *L. monocytogenes* strains isolated from food-borne epidemics and sporadic cases, isolates representing different serotypes, and a number of *Listeria* strains whose genomes have been completely sequenced. Following a short inactivation/extraction procedure, cell material from a bacterial colony was deposited on a sample target, dried, overlaid with a matrix necessary for the MALDI process, and analyzed by MALDI-TOF MS. This technique examines the chemistry of major proteins, yielding profile spectra consisting of a series of peaks, a characteristic “fingerprint” mainly derived from ribosomal proteins. Specimens can be prepared in a few minutes from plate or liquid cultures, and a spectrum can be obtained within 1 minute. Mass spectra derived from *Listeria* isolates showed characteristic peaks, conserved at both the species and lineage levels. MALDI-TOF MS fingerprinting may have potential for *Listeria* identification and subtyping and may improve infection control measures.

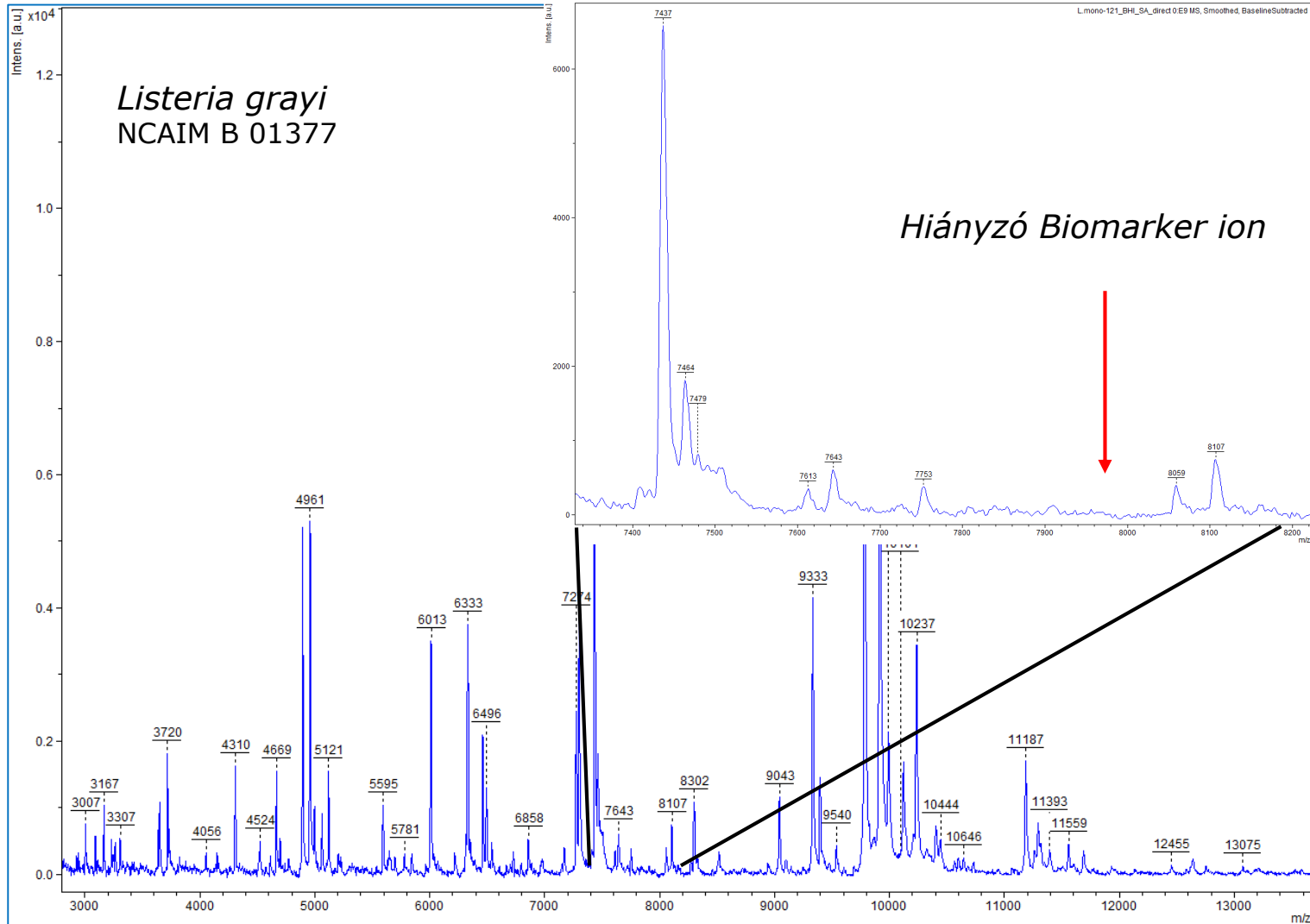
Szakirodalmi háttér a Listeria specierek megkülönböztetésére MALDI-TOF MS metodikával



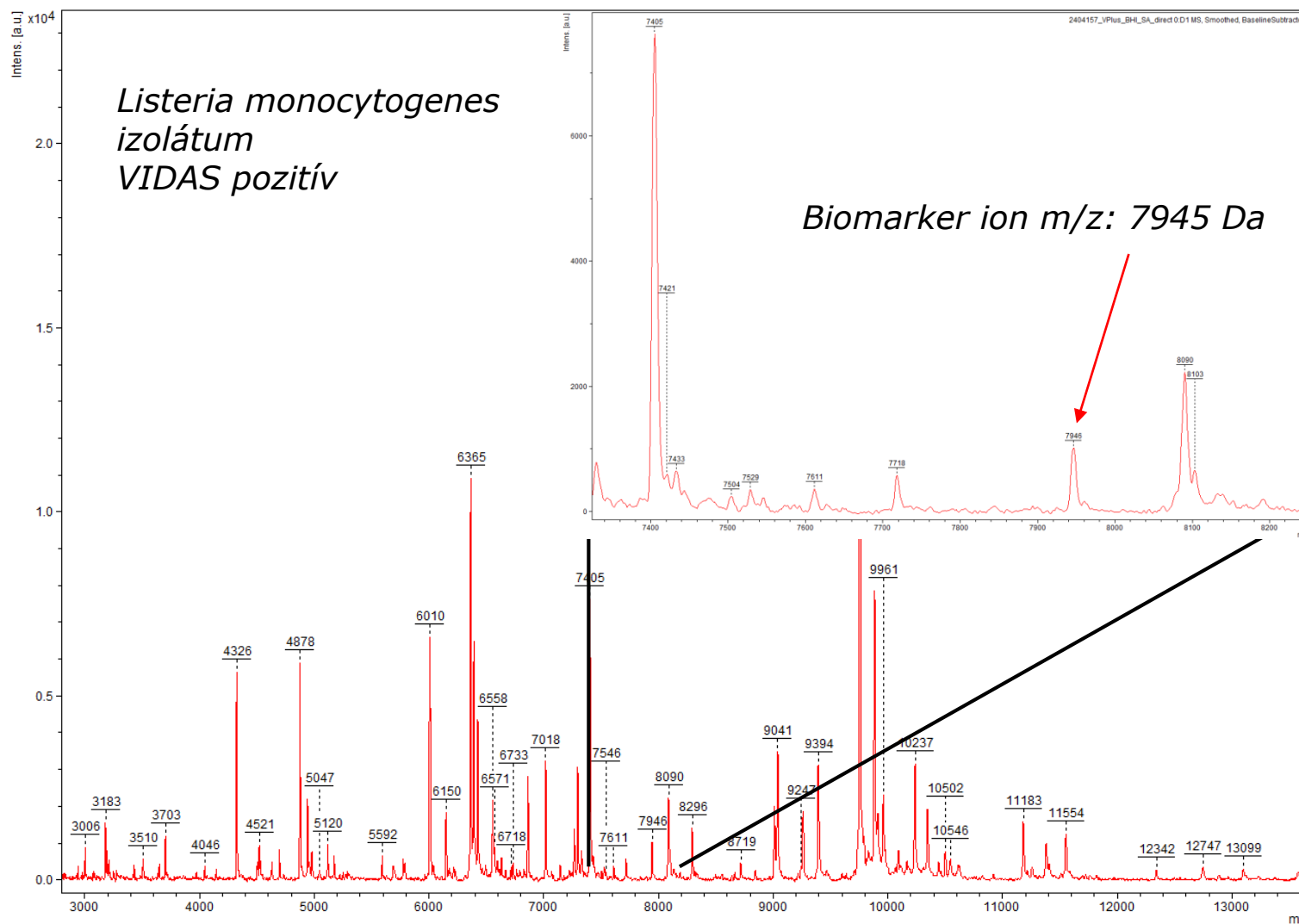
A biomarker ionok alkalmazása a Listeria speciesek esetén



A biomarker ionok alkalmazása a Listeria speciesek esetén



A biomarker ionok alkalmazása a *Listeria specierek* esetén



A MALDI-TOF technikában rejlő potenciál

- *Legionella* spp. meghatározása kevert tenyészetekből
- *Staphylococcus aureus* – MRSA meghatározása (antibiotikum rezisztencia előrejelzés)
- *Campyobacter* spp. megkülönböztetése
- atipikus morfológiával rendelkező tenyészetek azonosítása

MALDI-BioTyper módszerrel történő identifikálás

- Egyszerű és gyors
- Pontos és megbízható
- Könnyedén beilleszthető a rutin mikrobiológiai módszerekbe
- Kimutatás és megerősítés egy lépésben
- *Salmonella* spp. jelenlét vizsgálati ideje legalább **1**, de akár **2** nappal is csökkenthető!

Salmonella szerovariánsok megkülönböztetése

- **Nem-szelektív táptalajok és etanolos extrakcióval kombinált minta-előkészítés** javasolt
- **Számos potenciális biomarker ion**, DE nem feltétlenül csak egy szerovariánsban
- **Biomarker-kombinációk**ban kell gondolkodni
- Bízható eredmények, összhangban a szakirodalommal
- További szerovariáns-izolátumok vizsgálata szükséges

Köszönjük a figyelmet!

www.wessling.hu

WESSLING Hungary Kft.
1047 Budapest, Fóti út 56.
Tel: 06 1 872 3600
Fax: 06-1-435-0100
E-mail: info@wessling.hu

gorka.agnes@wessling.hu
lovasz.csaba@wessling.hu
volk.gabor@wessling.hu

