

ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII MAS W DIAGNOSTYCE MIKROBIOLOGICZNEJ

Jakub J. Guzek

Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Biotechnologia, Nr. albumu: 195528

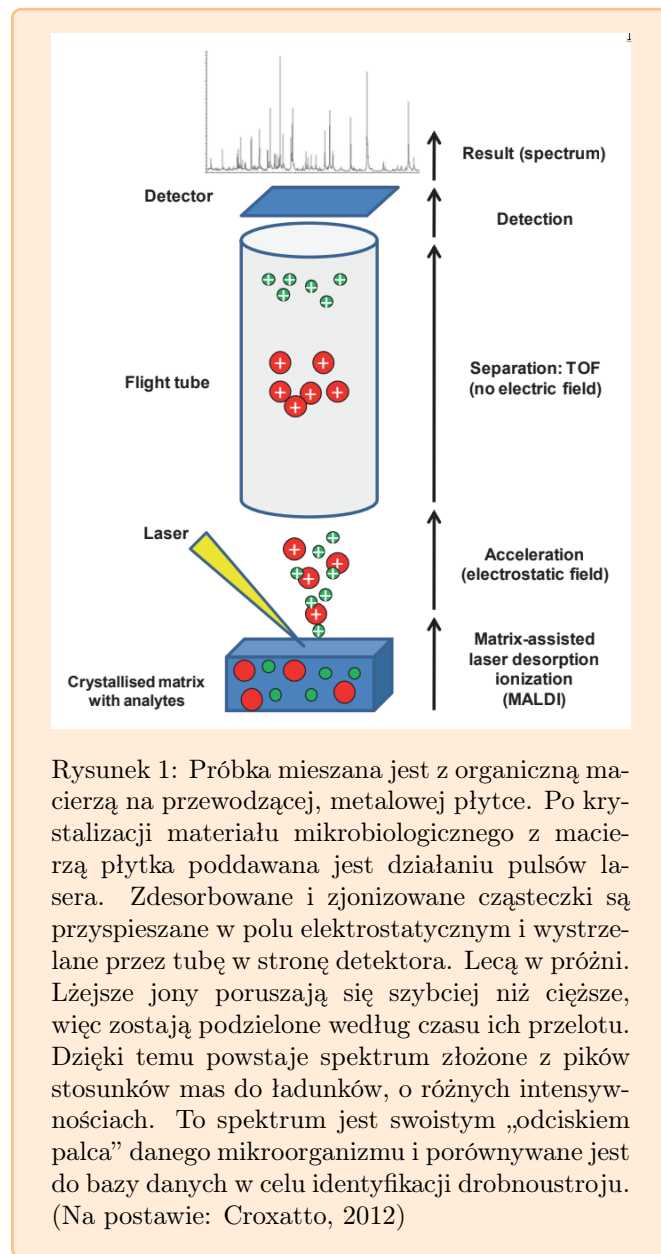
Spektroskopia mas jest jedną z opracowanych w XXw. metod analizy cząsteczek, umożliwiającą poznanie masy cząsteczki i częściowo wnioskowania o jej strukturze na podstawie widma mas. Początkowo była to metoda stosowana wyłącznie do badania prostych cząsteczek organicznych z czasem jednak była adoptowana do coraz bardziej złożonych związków, a pod koniec XXw. pojawiły się propozycje użycia jej na całych organizmach (konkretnie na komórkach bakteryjnych). Opracowane do badania tą metodą sposoby jonizacji próbki i analizy wyników takie jak MALDI-TOF MS, czy ESI MS, umożliwiają identyfikację i klasyfikację mikroorganizmów na podstawie uzyskanego widma – które stanowi niejako „odcisk palca” danego mikroorganizmu – nawet do poziomu gatunku, czy w niektórych przypadkach do poziomu serogrupy[1].

WSTĘP

Jedną z pierwszych szeroko stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej metod spektrometrii mas jest **jonizacja laserem wspomagana matrycą – analiza czasu przelotu** (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF MS). Generuje ona widma mas charakterystyczne dla danego mikroorganizmu, umożliwiające identyfikację na poziomie rodzaju, gatunku lub nawet szczepu czy serogrupy[1–3].

Pierwszym etapem w tej metodzie jest jonizacja próbki. Próbka, którą są albo wyizolowane peptydy, albo całe mikroorganizmy, jest adsorbowana na organicznej matrycy. Matrycą taką zwykle jest kwas synapinowy, kwas ferulowy lub kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy. Po adsorpcji jest poddawana działaniu impulsów z lasera UV. Wzbudzenie jonizuje cząsteczki matrycy i prowadzi do powstawania jonów molekularnych i desorpcji składników próbki. Składniki te są transferowane do zjonizowanej fazy gazowej, a następnie przyspieszane w polu elektrycznym urządzenia spektrometru. Czas potrzebny na przelot zjonizowanych cząstek jest proporcjonalny do pierwiastka ze stosunku ich masy i ładunku m/z . Na podstawie czasu przelotu określone jest właśnie m/z . Ponieważ ładunek jonu wynosi w całkowitej większości przypadków jeden (dodatnie lub ujemne) to znając czas jego przelotu, można łatwo obliczyć jego masę. Rejestracja przelotu jonów z próbki jaką jest cały mikroorganizm daje widmo masy charakterystyczne dla danej próbki i mające unikalne piki, umożliwiające identyfikację i klasyfikację[2, 3].

Istnieją też inne sposoby prowadzenia tego typu spektrometrii takie jak np. **technika jonizacji przez rozpylenie w polu elektrycznym** (*electrospray-ionization*, ESI) lub **technika jonizacji chemicznej** (*chemical ionization CI*)[2, 3]

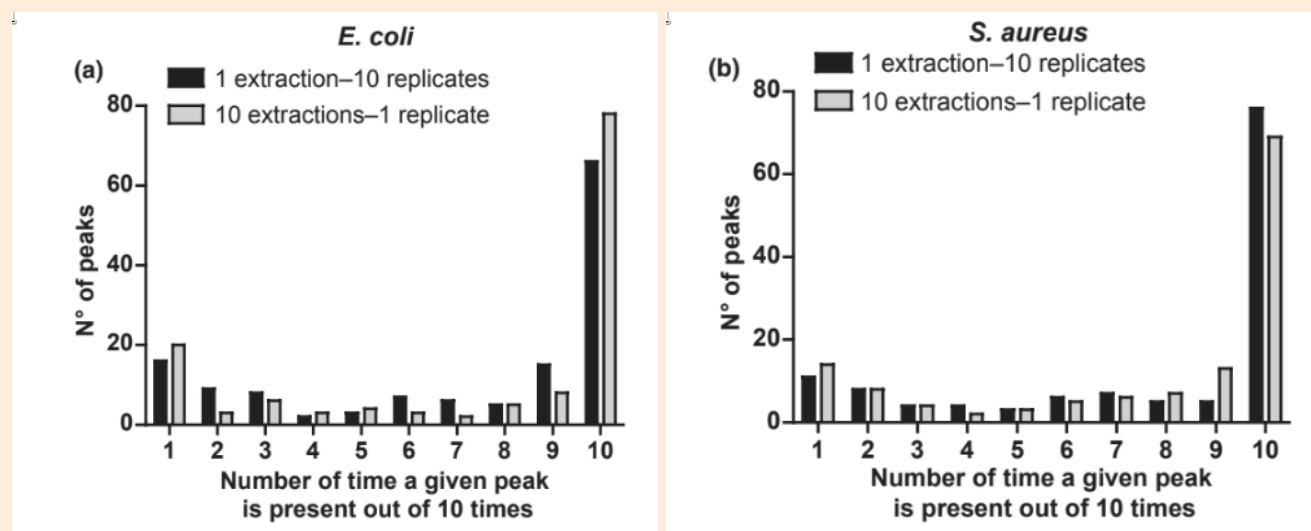


Rysunek 1: Próbką mieszaną jest z organiczną matrycą na przewodzącej, metalowej płytce. Po krystalizacji materiału mikrobiologicznego z matrycą płytka poddawana jest działaniu pulsów lasera. Zdesorbowane i zjonizowane cząsteczki są przyspieszane w polu elektrostatycznym i wystrzelane przez tubę w stronę detektora. Lecą w próżni. Lżejsze jony poruszają się szybciej niż cięższe, więc zostają podzielone według czasu ich przelotu. Dzięki temu powstaje spektrum złożone z pików stosunków mas do ładunków, o różnych intensywnościach. To spektrum jest swoistym „odciskiem palca” danego mikroorganizmu i porównywane jest do bazy danych w celu identyfikacji drobnoustroju. (Na podstawie: Croxatto, 2012)

Prócz tego istnieją również inne rodzaje analizatorów mas takie jak **kwadru-pol**, **hybrydowy kwadru-pol w analizę czasu przelotu** (*hybrid quadrupole TOF*, Q-Q-TOF), lub **analizator cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników** (*Fourier-transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR)[2].

BIOMARKERY I ANALIZA DAYCH

Wyniki uzyskane przy użyciu techniki MALDI-TOF i niektórych jej pokrewnych są to charakterystyczne widma mas, unikalne dla danej próbki. Daje się jednak w takich widmach zidentyfikować powtarzalne piki, pozwalające na



Rysunek 2: Wewnątrzlaboratoryjna powtarzalność wyników sprawdzona poprzez mierzenie ilości pików w dwóch eksperymentach. W pierwszym ekstrakcja przy użyciu etanolu/kwasu mrówkowego zostawała zastosowana dla *E. coli* (a) i *S. aureus* (b). 10 namnożonych próbek z jednej ekstrakcji zostało zbadanych przy użyciu MALDI-TOF MS. W drugim przeprowadzone zostało 10 niezależnych ekstrakcji i jedna próbka każdej z nich została zbadana przy użyciu MALDI-TOF MS. Z obydwu eksperymentów wybrane zostało 100 najsilniejszych pików i zliczone zostało ile razy dany pik pojawił się w 10 próbach przeprowadzonych w obydwu eksperymentach. (Na podstawie Croxatto, 2012)

identyfikację mikroorganizmów poddanych MALDI-TOF MS, poprzez porównanie otrzymanych widm z widmami obecnymi w bazach danych, które są często dostępne wraz ze spektrometrami.

Charakterystyczne są zwłaszcza piki korespondujące do zasadowych białek, o lekko hydrofobowym charakterze, których zawartość w komórce jest relatywnie wysoka. Białkami o takich cechach jest duża ilość białek rybosomalnych, białek asocjujących z DNA oraz białek szoku termicznego. Peptydy te stanowią więc biomarkery w tej metodzie i umożliwiają identyfikację mikroorganizmów.

Metoda MALDI-TOF MS ma dobre rezultaty dla dużej części testowanych drobnoustrojów i zwykle misidentyfikację można przypisać niewystarczającej liczbie spektrów dla danego mikroorganizmu obecnych w bazie danych, lub specyfice danego organizmu[3]

ZASTOSOWANIE MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS umożliwia wielokrotne skrócenie czasu potrzebnego do identyfikacji mikroorganizmów zawartych zarówno w hodowlach jak i np. w krwi pacjenta w stosunku do metod bacujących na fenotypie lub biochemii. Dodatkowo jest wielokrotnie tańsze i mniej pracochłonne niż wiele metod biochemicznych lub molekularnych.

Problematyczna jest konieczność ścisłego trzymania się protokołu przygotowywania próbki w celu uzyskania jak najdokładniejszej identyfikacji, gdyż jest to metoda niezwykle czuła na nawet najmniejsze zmiany w środowisku hodowlanym drobnoustrojów. Problem ten częściowo rozwiązuje zastosowanie algorytmów bazujących na uczeniu maszynowym, które przy zastosowaniu bazy danych o zadowalających zasobach są zdolne do identyfikacji nawet próbek poddanych działaniu różnych warunków środowiska[3].

Bardzo istotna jest możliwość zastosowania techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji i klasyfikacji¹ mikroorganizmów kłopotliwych w hodowli takich jak anaeroby z rodzajów *Bacterioides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Pep-tostreptococcus*, *Anaerococcus*, *Clostridium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* i *Veillonella*; wolnorosnące auktotrofy z rodzajów *Bartonella*, *Legionella* i *Coxiella*; oraz mykobakterie. Możliwość przyspieszenia identyfikacji wymienionych organizmów ma szczególne znaczenie dla diagnostyki klinicznej, gdyż wiele z nich powoduje poważne choroby (patogenne kostridia, *Legionella pneumophila*, wywołująca gorączkę Q *Coxiella burnetii*, czy *Mycobacterium tuberculosis* – czynnik etiologiczny gruźlicy i *Mycobacterium leprae* – czynnik etiologiczny trądu), a jest trudne do zidentyfikowania z wielu względów. Niektóre z nich rosną niezwykle powoli. Inne są niezwykle trudne do identyfikacji przy użyciu metod biochemicznych lub obserwacji cech fenotypowych, a zastosowanie metod molekularnych jest pracochłonne, czasochłonne i nieraz wymaga uprzedniego określenia z jaką grupą organizmów się pracuje[1].

Wszystkie wyżej wymienione mikroorganizmy mogą być zidentyfikowane przez MALDI-TOF MS przy zastosowaniu odpowiednich protokołów dotyczących przygotowania próbek, lub analizy danych, przy czym może to wymagać czasem zastosowania technik pomocniczych w celu potwierdzenia wyniku jak np. w wypadku *Coxiella burnetii*[1, 3]

Metody spektrometrii umożliwiają także identyfikację grzybów strzępkowych, dermatofitów i drożdży, przy czym jest to nieco bardziej problematyczne w wypadku pierwszych dwóch gdyż mają one o wiele bardziej heterogenną strukturę niż większość bakterii, co skutkuje koniecznością modyfikacji procedur przy pracy z nimi[3]

¹przy użyciu odpowiednich metod komputerowych i statystycznych

PODSUMOWANIE

Metody spektrometrii umożliwiają znaczące skrócenie czasu potrzebnego do identyfikacji mikroorganizmów (z wielu godzin do nawet kilku minut²), a także zmniejszenie koniecznego do tego nakładu pracy. Pociąga za sobą także obniżenie kosztów takiej identyfikacji oraz daje lepsze prognozy dla identyfikacji organizmów neutralnych biochemicznie i trudnych do rozpoznania fenotypowo, co ma niebagatelne znaczenie w diagnostyce klinicznej i weterynaryjnej. Przyspieszenie procesu identyfikacji patogenu jest niezwykle znaczące dla kuracji pacjenta.

Spektrometria umożliwia także, do pewnego stopnia, badanie proteomu i tego jak jego struktura zmienia się w różnych warunkach.

BIBLIOGRAFIA

1. Biswas, S. & Rolain, J.-M. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Journal of microbiological methods* **92**, 14–24 (2013).
2. Brown, T. A. *Genomes 4* (Garland Science, Taylor & Francis Group LLC, 2019).
3. Croxatto, A., Prod'homme, G. & Greub, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews* **36**, 380–407 (2012).

²nie licząc czasu potrzebnego do ewentualnej hodowli drobnoustrojów, gdyż jest to konieczne, również w metodach „tradycyjnych”