



MALDI TOF NOVÉ MOŽNOSTI V IDENTIFIKACI BAKTERIÍ

Cílem mikrobiologických vyšetřovacích metod je identifikace původce infekčního onemocnění v odebraném vzorku a stanovení jeho citlivosti k antimikrobním látkám v návaznosti na klinickou diagnózu.

V procesu identifikace se analyzují vlastnosti vykultivovaných mikroorganismů s použitím široké škály fenotypových a genotypových metod. Celý proces identifikace zahrnuje několik na sebe navazujících kroků. Základem je kultivace na příslušných médiích, inkubace a následné makro i mikroskopické posouzení růstu, hodnocení vzhledu jednotlivých kolonií, zjišťování biochemických a fyziologických vlastností. Důležitým kritériem v celém procesu je čas – rychlost, za kterou se dospěje k validnímu (klinicky relevantnímu) výsledku. Především u těžkých infekcí může včasný výsledek ovlivnit osud pacienta. Proto se hledají možnosti jak urychlit a zpřesnit diagnostiku. Dnes se v klinické mikrobiologii zavádějí nové technologie, které splňují nároky na vysokou přesnost a rychlost diagnostického procesu.

Takovou technologií je i identifikace bakterií metodou hmotnostní spektrometrie MALDI TOF (Matrix Assisted Desorption Ionization – Time of Flight).

Hmotnostní spektrometrie je metoda analytické chemie, která určuje hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty. Tato technika

se využívá kvalitativně i kvantitativně, např. při identifikaci neznámých látek, při určování izotopového složení prvků v molekule atd. Historie metody sahá do začátku 20. století, kdy byly položeny teoretické základy (J. J. Thomson – 1913). První moderní hmotnostní spektrometr sestrojil F. W. Aston, který za svoji práci získal Nobelovu cenu za chemii v roce 1922. S technikou Maldy jsou spojena jména K. Tanaka a J. B. Fenn, kteří jsou také nositeli Nobelovy ceny v oboru chemie (2002).

Principem metody Maldy Tof je stanovení molekulové hmotnosti zkoumaného vzorku ionizací laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detekcí doby letu.

Vzorkem v tomto případě je jednotlivá bakteriální kolonie nebo kvasinka či vláknitá houba vyrostlá na povrchu agarové pěstí. Matricí, která slouží jako rozpouštědlo, je kyselina skořicová. Příprava vzorku je velice jednoduchá. Velmi malé množství vyšetřované kultury se nanese na příslušné místo na pracovní destičce a následně se zakápnou kyselinou skořicovou, která vyextrahuje jednotlivé proteiny, převážně ribosomálního původu. Po zaschnutí je vzorek připraven k měření. Pracovní destička se vloží do přístroje. Směs matrice



a vzorku na nosiči je zasažena nanosekundovým pulzem laseru, přičemž dojde k ionizaci molekul vzorku. Vzniklé ionty jsou urychleny silným elektrickým polem a proletí trubici detektoru rychlostí úměrnou jejich hmotnosti a náboji. Zaznamenává se celková doba letu částic od aplikace laseru po dopad na detekční destičku. Výsledkem celého procesu je hmotové spektrum, které je druhově specifické pro jednotlivé mikroorganismy. Naměřené spektrum se následně srovnává s profily v referenční databázi a vyhodnotí se. Získaná data slouží k identifikaci mikroorganismů na úrovni rodu a druhu, často i kmenu. Celý proces identifikace trvá řádově minuty. Pro porovnání výsledky klasických biochemických testů bývají k dispozici za několik hodin (minimálně 8, v průměru však 18–24 hodin, někdy i déle).

Nyní bude možné využívat tuto špičkovou technologii i v mikrobiologické laboratoři EUC Laboratoří.

Vysoce spolehlivá a přesná druhová identifikace a významné zkrácení času nutného k vydání výsledku přispějí ke zkvalitnění práce celé laboratoře. Předpokládáme její velký přínos v diagnostice všech původců infekčních nemocí, nemocničních i komunitních patogenů (střevní patogeny – salmonely, kampylobaktery, yersinie..., respirační patogeny – hemofily, streptokoky,... patogeny urogenitálního traktu atd.), a hlavně u pomalu rostoucích anaerobních a nutričně náročných patogenů.

Pouze v některých případech se přesná identifikace nemusí povést. Metoda MALDI si pro velkou genetickou příbuznost neumí poradit s identifikací některých streptokoků (*Str. pneumoniae*) a s rozlišením rodu *Shigella* a *Escherichia*. V těchto případech se proto musí volit alternativní diagnostický postup.

Možnosti metody se neomezují pouze na identifikaci, lze ji využít např. pro detekci některých mechanismů rezistence (průkaz karbapenemáz), ev. pro přímou identifikaci z hemokultivačních lahvíček a hledají se i další možnosti. Je možné do budoucna předpokládat další rozšíření jejího využití v mikrobiologii.

MUDr. Katarina Kučmašová
vedoucí mikrobiologie

