

A kép illusztráció / The picture is illustration
Fotó: Lovász Csaba

Lovász Csaba¹

Érkezett/Received: 2014. február/February – Elfogadva/Accepted: 2014. július/July

A kémiai Nobel-díj és a *Staphylococcus aureus*. A modern tömegspektrometria szerepe a mikroorganizmusok azonosításában.

1. Összefoglalás

A globalizált piacok, a gyorsan változó élelmiszeripari technológiák és táplálkozási irányzatok új kihívások elé állítják az élelmiszerlánc-biztonságot felügyelő szakembereket, laboratóriumokat. A mikrobiológiai laboratóriumok egyik legfontosabb feladata az élelmiszerláncba bekerülő alapanyagok, termékek - takarmányok, élelmiszerek - vizsgálata, a kórokozó mikroorganizmusok jelenlétének gyors, megbízható kimutatása, azonosítása. A szabványos, tenyésztéses mikrobiológiai módszerekkel a patogén mikroorganizmusok kimutatása akár 5-8 napot is igénybe vehet, ezért a modern mikrobiológiai módszerek súlypontja a gyors, műszeres analitikai vizsgálatok felé tolódik el. A molekuláris biológiai kutatások eredményeinek köszönhetően olyan metodikák válnak rutin laboratóriumi módszerekké, amelyek nagyszámú mintáról, rövid idő alatt, megbízható eredményt szolgáltatnak.

Az alternatív mikrobiológiai metodikák egyik legújabb képviselője a tömegspektrometria és az ahhoz kapcsolódó szoftverek, amelyek segítségével mikroorganizmusokat azonosíthatunk. A MALDI-TOF betűszó speciális tömegspektrométer rövidítése. A „MALDI” (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) fotoionizációs ionforrást, míg a „TOF” (Time of Flight) repülési idő tömeganalizátort jelöl. Az azonosítás alapját a mikroorganizmusokban található genetikailag kódolt fehérjék képezik. Minden mikroorganizmus egyedi fehérjeösszetétellel rendelkezik, amelyet egyfajta ujjlenyomatként használhatunk a vizsgálatok során. Ezt a fehérjeprofilt határozzuk meg a MALDI-TOF vizsgálat során, majd ezt hasonlítjuk össze a referenciakönyvtárban található mikroorganizmusok fehérje-adataival. Jelen közleményben bemutatom ennek a módszernek az alapjait, az alkalmazhatóságát a patogén mikroorganizmusok azonosítására, illetve az új metodika helyét a mikrobiológiai vizsgálatokban.

2. Bevezetés:

Mi köze a 2002-ben odaítélt kémiai Nobel díjnak a *Staphylococcus* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusokhoz?

Azt gondolhatnánk, hogy nem sok, de a modern tudomány elmosza a klasszikus tudományterületek határait, így egy molekuláris szerkezet-kutatási mód-

szer - a tömegspektrometria - hatékony eszköz lesz a mikrobiológusok kezében is, segítségével gyorsan, megbízhatóan azonosíthatók a „körözött bűnözők” a patogén mikroorganizmusok.

2002-ben a Nobel díjat a Svéd Tudományos Akadémia három kutatónak ítélte oda a kémia tudományok területén végzett munkásságukért. John B. FENN, Koichi TANAKA és Kurt WÜTHRICH, egy amerikai,

¹ Wessling Hungary Kft.

¹ Wessling Hungary Kft.

egy japán és egy svájci kutató a biológiai makromolekulák szerkezetvizsgálati módszereinek kifejlesztéséért kapták a díjat.

John B. Fenn az elektroporlasztásos ionizáció - közismertebb nevén az ESI (Electrospray Ionization) kifejlesztéséért és alkalmazásáért kapta a díjat [1]. Kurt Wüthrich kutatásai megnyitották az utat a fehérjék térszerkezetének oldatfázisban történő NMR-spektroszkópiai vizsgálatához [2].

Koichi Tanaka a legfiatalabb kémiai Nobel díjazottként, 43 évesen a lágy lézer deszorpció/ionizációs eljárás (*Soft Laser Desorption - SLD*) felfedezéséért vehette át a díjat. A tömegspektrometriás vizsgálatokhoz a molekulákat gázfázisban ionizálni kell, ami makromolekulák esetében korántsem egyszerű feladat. Tanaka nagy energiájú lézer impulzusokat használt a makromolekulák „elpárologtatásához”, ionizációjához, de azt tapasztalta, hogy így a makromolekulák fragmentálódnak, kisebb molekularészekre bomlanak. Ha azonban finom eloszlású fémport tartalmazó glicerinen, mint mátrixban oldotta a célkomponenseket, akkor olyan gázfázisú ionizált részecskéket kapott, amelyek a makromolekulák eredeti szerkezetét is hordozták, azaz sikerült kíméletesen ionizálni és gázfázisba juttatni azokat. Ez a módszer volt az első, amellyel lehetővé vált biológiai makromolekulák tömegspektrometriás vizsgálata [3].

Sokak szerint még két névnek kellett volna szerepelnie a díjazottak között. Két német kutató, Franz Hillenkamp és Michael Karas nevének, akik - Tanakával lényegében egy időben - kis szerves molekulákat alkalmaztak segédanyagként, mátrixként a proteinek tömegspektrometriás vizsgálatához. A módszerüket mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizációnak nevezték el (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI), és lényegében ezt a módszert alkalmazzuk a mai napig proteinek, fehérjék, peptidok tömegspektrometriás vizsgálatára [4].

Hogyan tudjuk ezeket a hihetetlen tudományos eredményeket hatékonyan alkalmazni a patogén mikroorganizmusok azonosítására?

A molekuláris biológia fejlődésével egyre mélyrehatóbb ismeretekkel rendelkezünk a minket körülvevő biótárról, így a humán megbetegedéseket okozó patogén mikroorganizmusokról is. A genetikai anyaguk, a DNS-ük feltérképezésétől kezdve a sejtjeiket felépítő molekulák, fehérjék szerkezetének meghatározásán át, az általuk termelt toxinok szerkezetének felderítéséig igen széleskörű tudásanyag van a birtokunkban ezekről a fontos mikroorganizmusokról.

Számos *alternatív*, a fentebb említett kutatási eredményeken alapuló vizsgálati módszer terjedt el a klasszikus mikrobiológiai metodikák mellett. Ilyenek például a DNS/rDNS alapú kimutatási eljárások (*real-time PCR*, *qPCR*, *MDS*), illetve a szelektív, immunológiai reakciókat alkalmazó (*ELISA*, *ELFA*, *VIDAS*) műszeres analitikai módszerek.

Ebbe a sorba illeszkedik be a modern tömegspektrometria - a MALDI-TOF - mint azonosítási módszer. Egy mikroorganizmus fehérjekészlete, proteínprofilja genetikailag meghatározott, így alkalmas lehet az adott mikroorganizmus azonosítására. A MALDI-TOF tömegspektrométerrel ezt a fehérjeprotint határozzuk meg. A vizsgálat során egy „tömegspektrumot” veszünk fel, majd ezt hasonlítjuk össze a spektrumkönyvtárban található mikroorganizmusok tömegspektrumaival. Ez a tömegspektrum egyedi, egyfajta ujjlenyomatként használható a vizsgált bióta azonosítására. A továbbiakban tekintsük át, hogy valósul meg a vizsgálat a gyakorlatban!

3. A MALDI-TOF tömegspektrometria

A tömegspektroszkópia egy olyan hatékony szerkezetkutatási módszer, amelynek alkalmazása közben a vizsgálandó molekulákat gázfázisba juttatjuk, ionizáljuk és nagyfeszültségű elektromos térrel felgyorsítjuk. A felgyorsított ionokat mágneses, elektrosztatikus, vagy rádiófrekvenciás terekkel tömegük és töltésük szerint elválasztjuk, és meghatározzuk az ionok tömegét.

A vizsgált molekula mérete, molekulatömege az egyik legfontosabb szerkezeti információ, amelyet a tömegspektrometria szolgáltat, ezért a makromolekulák tömegspektrometriás vizsgálatában a kulcskérdés az ionizáció. Hogyan tudjuk gázfázisba juttatni és ionizálni a vizsgálandó biológiailag aktív molekulákat? Milyen módon tudjuk az élettani folyamatok kulcsszereplőit, a több ezres, több tízezres molekulatömegű fehérjéket, enzimeket tömegspektrométerrel vizsgálni? Az egyik megoldás a MALDI-TOF technika alkalmazása lehet.

A MALDI-TOF betűszó speciális tömegspektrométert jelent, amelyben az ionforrás a MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) és a tömegszám-analizátor a TOF (Time of Flight), ami az ionizáció során keletkezett ionok tömeg/töltés szerinti szétválasztására szolgál.

A Tanaka által 1985-ben szabadalmaztatott eljárást (*SLD* - mátrix glicerin és fémpor) soha nem használták fehérjék vizsgálatára, helyette a sokkal érzékenyebb, Hillenkamp és Karas német kutatópáros megoldását alkalmazzuk a mai napig a proteinek vizsgálatára. Ebben az eljárásban a mátrix kis szerves molekula, amely képes elnyelni az ionizációhoz alkalmazott lézer energiáját, illetve ionizálja a célvegyületeket (protonált kvázi molekulaionok, $[M+H]^+$). A MALDI-TOF tömegspektrométerben pulzáló nitrogén lézer sugárforrást alkalmazunk, amely a gyári specifikáció szerint 337,1 nm hullámhosszúságú UV fényt bocsát ki 60 Hz-es impulzusokban. A kibocsátott foton-impulzusok energiája tetszőlegesen szabályozható, a vezérlő szoftver az ionizáció határfokának megfelelően akár impulzusról-impulzusra változtatja.

The Nobel prize in Chemistry and *Staphylococcus aureus*. The role of modern mass spectrometry in the identification of microorganisms.

Csaba Lovász¹

1. Summary:

Experts and laboratories supervising food safety are faced with new challenges by globalized markets, and rapidly changing food industrial technologies and nutrition trends. One of the most important tasks of microbiological laboratories is the analysis of raw materials and products (feeds and foods) entering the food chain, fast and reliable detection and identification of the presence of pathogenic microorganisms. Detection of pathogenic microorganisms might take 5 to 8 days using standard microbiological culture methods, therefore, the emphasis of modern microbiological methods is shifting towards rapid instrumental analyses. Thanks to research in molecular biology, methodologies that can provide reliable results for a large number of samples in a short time are becoming routine laboratory methods.

One of the latest representatives of alternative microbiological methodologies is mass spectrometry (MALDI-TOF) and related software, with the help of which one can identify microorganisms. The acronym MALDI-TOF stands for a special mass spectrometer: MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) is a photoionization ion source, while TOF (*Time of Flight*) denotes a time-of-flight mass analyzer. Identification is based on genetically coded proteins found in microorganisms. Each microorganism has a characteristic protein profile that can be used for identification as a sort of fingerprint. This protein profile is determined during MALDI-TOF analysis, and then it is compared to the protein profiles of microorganisms found in the reference library. In this paper, I would like to present the basis of this method, its applicability for the identification of pathogenic microorganisms, and the place of this new methodology among microbiological tests.

2. Introduction:

What does the 2002 Nobel Prize in Chemistry have to do with a microorganism of the genus *Staphylococcus*?

One might think that the answer is „not much”, but boundaries between classic scientific disciplines are becoming blurred by modern science, and a method for structure determination – mass spectrometry – can be an efficient tool in the hands of microbiologists, it can be helpful in the fast and reliable identification of „wanted criminals”, pathogenic microorganisms.

The 2002 Nobel Prize in Chemistry was awarded by the Royal Swedish Academy of Sciences to three researchers for their work in the field of the chemical sciences. The prize was awarded to John B. FENN, Koichi TANAKA and Kurt WÜTHRICH, three researchers from the USA, Japan and Switzerland, respectively, for the development of structure analysis methods of biological macromolecules.

The prize was awarded to John B. Fenn for the development and application of electrospray ionization, commonly known as ESI [1]. The research of Kurt Wüthrich opened the way for solution phase NMR spectroscopic analysis of the three-dimensional structure of proteins [2].

Koichi Tanaka received the prize, as the youngest Nobel laureate in chemistry, for the discovery of *Soft Laser Desorption (SLD)* at the age of 43. For mass spectrometric analysis, molecules have to be ionized in the gas phase, which is not a simple task at all in the case of macromolecules. High energy laser impulses were used by Tanaka to „evaporate” and ionize macromolecules, but he found that fragmentation of the macromolecules occurred, they broke down into smaller molecules. However, if target components were dissolved in glycerol containing finely dispersed metal powders as the matrix, then ionized particles in the gas phase maintained the original structure of the macromolecules, i.e. they were ionized gently and transferred to the gas phase successfully. This was the first method enabling mass spectrometric analysis of biological macromolecules [3].

According to many, an additional two names should have been among the winners of the Prize. They were two German researchers, Franz Hillenkamp and Michael Karas, who used small organic molecules as additives or as matrix for the mass spectrometric analysis of proteins, basically at the same time as the work performed by Tanaka. They named their method Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – MALDI, and essentially this is the method that is still used for the mass spectrometric analysis of proteins and peptides today [4].

But how can these incredible scientific results be applied efficiently for the identification of pathogenic microorganisms?

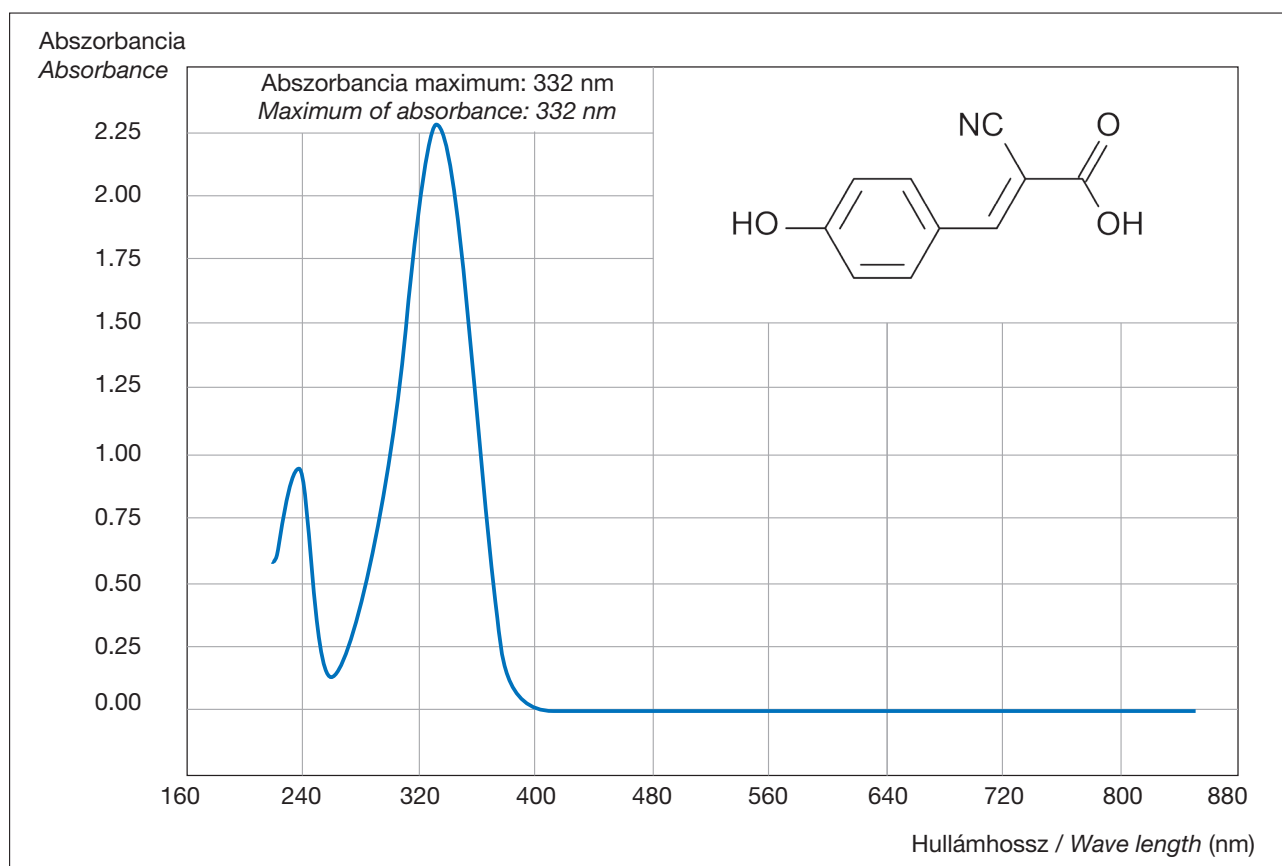
With the development of molecular biology, we possess deeper and deeper knowledge about biota surrounding us, including pathogenic microorganisms that cause human diseases. From mapping out their genetic material, their DNA, through the determination of the structure of molecules and proteins comprising their cells, to discovering the structure of the toxins produced by them, we possess a wide range of knowledge about these important microorganisms.

There are a number of *alternative* test methods, based on the above-mentioned research results, in addition to classic microbiological methodologies. These include DNA/rDNA based detection procedures (*real-time PCR, qPCR, MDS*), and also instrumental analysis methods applying selective immunological reactions (*ELISA, ELFA, VIDAS*).

Modern mass spectrometry – MALDI-TOF – as an identification method fits well in this line. The protein pool or protein profile of a microorganism is genetically determined, so it can be suitable for the identification of the given microorganism. This protein profile is determined by the MALDI-TOF mass spectrometer. During the analysis, a „mass spectrum” is recorded, and then it is compared to the mass spectra of microorganisms found in the spectral library. This unique mass spectrum can be used as a sort of fingerprint for the identification of the biota in question. Henceforward, we review how the analysis is performed in practice!

A mátrixként, segédanyagként leggyakrabban hidroxil-, illetve karboxil-csoportokat tartalmazó aromás-gyűrűs vegyületeket alkalmazunk. A mikroorganizmusok azonosításához a leiratok az α -Ciano-4-hid-

roxi-fahéjsavat (α -HCCA – α -Cyano-4-Hydroxycinnamic acid) javasolják. Az **1. ábra** az α -HCCA szerkezeti képletét és UV spektrumát mutatja.



1. ábra. Az α -Ciano-4-hidroxi-fahéjsav szerkezeti képlete és UV/VIS spektruma [5]
Figure 1. Structural formula and UV/VIS spectrum of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid [5]

Az **1. ábrán** látható, hogy a mátrixként alkalmazott vegyület jól abszorbeálja a Nitrogén UV-lézer fényét (337,1 nm), így az energiaátadás nagyon hatékony. A mátrix oldat formájában kerül fel a mintatartó lemezre (*targetre*), ahol az oldószer elpárolog, és a korábban felvitt, a vizsgált mikroorganizmusból származó fehérjékkel egy szilárd, elegykristály fázist képez, amelyben zárványként találjuk a makromolekulákat. Az ionizáció során a lézer energiája egyrészt a fehérjék gázfázisba jutását szolgálja, *másrészt* az ionizációjukat segíti. Ezzel a módszerrel a vizsgált proteinekből gázfázisú, protonált, jórészt egyszeresen töltött pozitív ionokat kapunk. Az addukt képződés ritka, de a tömegspektrumban megjelennek a kétszeresen töltött ionok is. A speciálisan kialakított ionforrásban képződött ionokat nagyfeszültségű térrel felgyorsítjuk, fókuszáljuk, és a repülési csövön keresztül a detektorba juttatjuk.

A repülési idő tömegspektrométer alkalmazása elegáns lehetőséget kínál a felgyorsított ionok tömeg szerinti elválasztására (*Time of Flight - TOF*, [6]). Ebben a berendezésben a felgyorsított ionok repülési idejét igen pontosan – nano szekundum pontossággal – mérjük. Egy adott kinetikus energiával rendelkező ionsomagból a kisebb tömegű ionok nagyobb sebességgel, rövidebb idő alatt érkezik a detektorhoz,

míg a nagyobb tömegű ionok lassabban, hosszabb idő alatt érnek az analizátor cső végén elhelyezett detektorhoz. Az ionok tömegének meghatározását repülési idejük mérésére vezetjük vissza, így azt mondhatjuk, hogy egy TOF tömegspektrométer a laboratórium legpontosabb „stoppere”. Ezzel a tömeganalizátorral nagy molekulatömegű ionok vizsgálhatóak könnyen.

Egy MALDI-TOF berendezéssel egyszerűen és hatékonyan kaphatunk információkat a vizsgált minta makromolekuláiról, fehérjeprofiliájáról, illetve a vizsgálat során rögzített tömegspektrumot számos módon használhatjuk fel a továbbiakban.

A MALDI-TOF technikával kapott spektrum nem egy konkrét vegyület tömegspektruma, hanem a berendezés repülési csövében megjelenő, különböző tömegszámú ionok, azaz a vizsgált mikroorganizmusban található fehérjék protonált molekulaionjainak jeleinek összessége, vagyis a mintában található fehérje elegy tömegspektruma. A spektrumon megjelenő valamennyi csúcs tehát egy-egy fehérjének felel meg. Hasonlóan az elektronütközéses ionizáció (EI) esetén kapott tömegspektrumokhoz, a MALDI-TOF tömegspektrumai is egyfajta „ujjlenyomatként” használhatóak az adott egyedek, a vizsgált mikroorganizmusok azonosításra.

3. MALDI-TOF mass spectrometry

Mass spectrometry is an efficient method for structure determination during which molecules to be analyzed are transferred to the gas phase, they are ionized and accelerated using a high-voltage electric field. Accelerated ions are separated by magnetic, electrostatic or radio frequency fields according to their mass and charge, and masses of the ions are then determined.

The size or weight of the molecule is one of the most important structural informations provided by mass spectrometry, therefore, ionization is a key question in the mass spectrometric analysis of macromolecules. How can biologically active molecules to be analyzed be transferred to the gas phase and ionized? How can key players of physiological processes, proteins and enzymes with molecular weights in the thousands, and even in the tens of thousands be analyzed by the mass spectrometer? One of the solutions can be the application of the MALDI-TOF technique.

The acronym MALDI-TOF denotes a special mass spectrometer in which the ion source is the MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) and the mass number analyzer is the TOF (Time of Flight), separating ions produced during ionization according to their mass/charge.

The procedure patented by Tanaka in 1985 (*SLD* – glycerol and metal powder matrix) has never been applied to for the analysis of proteins, the much more sensitive solution of the German research team of Hillenkamp and Karas is used instead to this very day. In this procedure, the matrix is a small organic molecule capable of absorbing the energy of the laser used for ionization and ionizing the target compounds (protonated quasi molecule ions, $[M+H]^+$). In the MALDI-TOF mass spectrometer a pulsating nitrogen laser source is applied, emitting UV light of 337.1 nm wavelength in 60 Hz pulses, according to the manufacturer's specification. The energy of the photon pulses emitted can be set to any value, it can even be modified by the control software pulse by pulse as a function of ionization efficiency.

Compounds that are used most often as matrix or additive are aromatic compounds containing hydroxyl or carboxyl groups. For the identification of microorganisms, *a*-cyano-4-hydroxycinnamic acid (*a*-HCCA) is recommended by prescriptors. Structural formula and UV spectrum of *a*-HCCA are shown in **Figure 1**.

As shown in **Figure 1**, the compound used as the matrix absorbs the light of the nitrogen UV laser (337.1 nm) well, energy transfer is quite efficient. The matrix is applied to the sample holder plate (*target*) in the form of a solution, the solvent evaporates, and matrix molecules and proteins coming from the microorganism tested, and applied earlier, form a solid, mixed crystal phase, in which macromolecules are encapsulated. During ionization, the energy of the laser promotes release of the proteins into the gas phase and also helps their ionization. Using this method, gas phase, protonated ions are obtained from the proteins analyzed, mainly possessing a single positive charge. Adduct formation is rare, but doubly charged ions also appear in the mass spectrum. Ions that form in the specially configured ion source are accelerated using a high voltage field, they are focused and introduced into the detector through the flight tube.

Application of the time of flight mass spectrometer provides an elegant solution for the separation of accelerated ions

according to their mass [6]. In this instrument flight times of the accelerated ions are measured very accurately – with nanosecond accuracy. Of an ion package having a certain kinetic energy, smaller mass ions reach the detector at higher speeds, in a shorter time, while larger mass ions reach the detector at the end of the analyzer tube more slowly, over a longer period. Determination of the mass of ions is traced back to the measurement of their time of flight, so we can say that a TOF mass spectrometer is the most accurate „stopwatch” of the laboratory. Large molecular mass ions can be analyzed easily using the mass analyzer.

With a MALDI-TOF instrument, one can obtain information about the macromolecules and protein profile of the sample analyzed simply and efficiently, and the mass spectrum recorded during the analysis can be used further in several ways.

The diagram obtained by the MALDI-TOF isn't a mass spectra of an individual compound, but the mass spectra of the total protonated molecule ions of different weight proteins appearing in the flying tube of instrument. In the other words, the result is a mass spectra of protein mixture existing in the sample. Each peak in the diagram is corresponding to an individual protein. Similarly to mass spectra obtained using electron ionization (EI), MALDI-TOF mass spectra can be used as a type of „fingerprint” for the identification of the given specimen, of the microorganisms analyzed.

4. Sample preparation

First, it is important to clarify what the sample is in this case. Identification of microorganisms is usually performed from microbial cultures, so we understand „samples” to be microorganism colonies grown on general and different selective culture media. Generally, they possess distinct morphologies (color, shape, surface, texture). **Figure 2** shows different bacterial colonies from a water sample, cultured on VPC agar.

It is practical to choose unique, individual colonies for the analysis. There are several sample preparation protocols for the identification of microorganisms, requiring more or less time, but in the majority of cases the most simple direct sample introduction is applied.

4.1. Direct sample introduction [7]

In this case, a sample is taken from the colony to be identified using an inert, sterilized sampling tools, which can be a disposable inoculation loop or even a sterilized toothpick. The sample is applied to the appropriate positions of the prepared sample holder plate, the quantity of the analytical sample is usually a few tenths of a milligram. For quality assurance reasons, the same sample is usually applied to two to five positions. The matrix solution is pipetted onto the sample as soon as possible, and then it is allowed to dry in a laminar flow cabinet.

Figure 3 shows that the analysis requires only a very small amount of „biological matter”. It can even be performed from a bacterial colony with a diameter of only a few tenths of a millimeter.

There are 96 positions (8 rows of 12 sample locations each) on the sample holder plate, at least one of which has to be reserved for calibration in each analysis.

After drying of the matrix solution, the sample holder plate is ready for analysis (**Figure 4**). Solvent evaporation can be accelerated by the use of vacuum, if necessary.

4. Mintaelőkészítés

Első lépésként fontos tisztáznunk azt, hogy mi is a minta ebben az esetben. A mikroorganizmusok azonosítását leggyakrabban mikroba tenyészetekből végezzük, így a „minta” alatt az általános, illetve a

különböző szelektív táptalajokon kinőtt mikroorganizmus-telepeket kell érteni. Ezek általában jól látható morfológiával (szín, forma, felület, állag) rendelkeznek. A 2. ábrán vízmintából származó, VPC-agaron tenyésztett, különböző baktériumtelepek láthatók.



Fotó: Lovász Csaba

2. ábra. Vízmintából származó, VPC-agaron tenyésztett, különböző baktériumtelepek
Figure 2. Different bacterial colonies from a water sample, cultured on VPC agar

A vizsgálatokhoz lehetőség szerint egyedi, különálló telepeket célszerű kiválasztani. A mikroorganizmusok azonosítására számos minta-előkészítési protokoll terjedt el, amelyek több-kevesebb időt igényelnek, de az esetek döntő többségében a legegyszerűbb direkt mintafelvitelt alkalmazzák.

4.1. Direkt mintafelvitel [7]

Ebben az esetben az azonosítandó telepből veszünk mintát egy inert, steril mintavételi eszközzel, amely lehet egyszer használatos oltókacs, vagy akár egy sterilizált fogvájó pálca. A mintát az előkészített min-

tatartó lemez megfelelő pozícióira kenjük fel. A vizsgálati minta mennyisége általában néhány tized milligramm. Egy-egy, a mintát minőségbiztosítási megfontolásokból általában két-öt pozícióra kenjük fel. A mátrix-oldatot a legrövidebb időn belül a mintára cseppentjük, majd lamináris box alatt hagyjuk beszáradni.

4.2. Sample preparation using ethanol extraction [8]

To prepare reference spectra, another sample preparation protocol is recommended by the manufacturer, and this is ethanol extraction. In my experience, this sample preparation procedure improves the reliability of the identification in the case of many, more problematic samples, compared to direct sample introduction.

In this case the sample is taken from the colony to be analyzed using a sterile 1 ml inoculation loop, and the biological material taken, the culture is suspended in 300 ml of deionized water in an Eppendorf tube. 900 ml is added, and after thorough mixing the sample is centrifuged. The supernatant is decanted carefully, and solid parts remaining in the Eppendorf tube are dried in a laminar flow cabinet. After drying 10-50 ml formic acid is added to the sample, and it is allowed to stand for two minutes. Acetonitrile, equal in amount to the formic acid, is pipetted to the content of the tube, it is shaken thoroughly and then centrifuged. 1 ml of the supernatant is transferred to the appropriate position of the sample holder plate, followed by pipetting the matrix solution onto it as soon as possible after drying. Similarly to the previous case, the sample holder plate is ready for analysis after drying of the matrix solution.

It is shown by the above that sample preparation methods for MALDI-TOF analysis consist of only a few simple steps in most cases, so their time demand per sample is very small, in the case of direct sample introduction only a few minutes.

5. MALDI-TOF analysis, identification of microorganisms

5.1. Recording mass spectra

The prepared sample holder plate is introduced into the ion source through the sample reception chamber system of the instrument. Movement necessary for scanning of the samples is performed by a precise mechanism than can move the sample holder plate under the UV laser source in a very accurate way. Analysis of the actual sample in position can be followed by a low resolution digital camera. On the one hand, this helps to verify that the analysis of the proper sample position is performed, and on the other hand, manual recording of spectra can be assisted in case of possible sample application inhomogeneities.

Parameters necessary for the recording of mass spectra can be adjusted using a general instrument control software (*flexControl - Bruker Daltonics*). These parameters include laser energy, high voltage necessary for ion acceleration, movement pattern of the sample holder plate and the mass number range to be analyzed, among others. In addition, this software performs the calibration of the mass number scale of the instrument, and the determination of the function necessary for the conversion of flight times to mass numbers. The principle is quite simple, and a bacterial strain of known protein composition (*Escherichia coli* DH5) is used for this purpose as the calibration standard.

Mass spectrum of the *E. coli* DH5 used for calibration (**Figure 5**) is "peak-rich", so it is easy to find a satisfactory number of ions to cover the mass number range (2.000 - 20.000 amu).

Mass number stability of MALDI-TOF is excellent, but is still recommended to calibrate the instrument before each sample sequence by measuring the reference bacterium standard. It is worth noting that the same calibration sample (*spot*) can be used several times.

To facilitate the work of microbiologists, for fast and simple identification of microorganisms, a software (*MB-RTC MaldiBiotyper Realtime Classification - Bruker Daltonics*) was developed by the manufacturer of the instrument. After entering sample names and IDs, mass spectra are recorded and identified by the software automatically, using the parameters set in the instrument control software. At least 200 spectra with satisfactory signal-to-noise ratio are recorded by the instrument from each sample spot, and an average mass spectrum, suitable for identification, is then calculated and stored by the software.

5.2. Identification of microorganisms

Identification of microorganisms here is nothing more than comparing mass spectra. The software looks up the reference mass spectra most resembling the mass spectrum of the microorganism analyzed, i.e. we receive a list of the ten best matches. This list is compiled by the software based on a „score” (basically a probability) value. Similarly to other mass spectrometric software, a „score” value is obtained during the search of the spectral library, which is a quantified information related to the goodness and adequacy of identification. This is a value between 0.000 and 3.000, calculated by the software as follows:

1. In the first step, the mass spectrum of the sample to be identified is compared to reference spectra found in the mass spectral library, and it is examined whether peaks of the reference spectra are present in the mass spectrum of the sample;
2. In the second step, the mass spectrum to be identified is taken as a basis, and reference mass spectra are compared to this;
3. Finally, symmetry conditions of the spectrum to be identified and reference spectra are examined.

A correspondence factor between 0.000 and 1.000 is calculated by the software in all three steps, these three values are multiplied and the product is normalized to 1000. The „score” value of the identification is the logarithm of this number.

The calculation process might sound complicated, but the software that comes with the instrument is user friendly, and makes the process of microorganism identification simple.

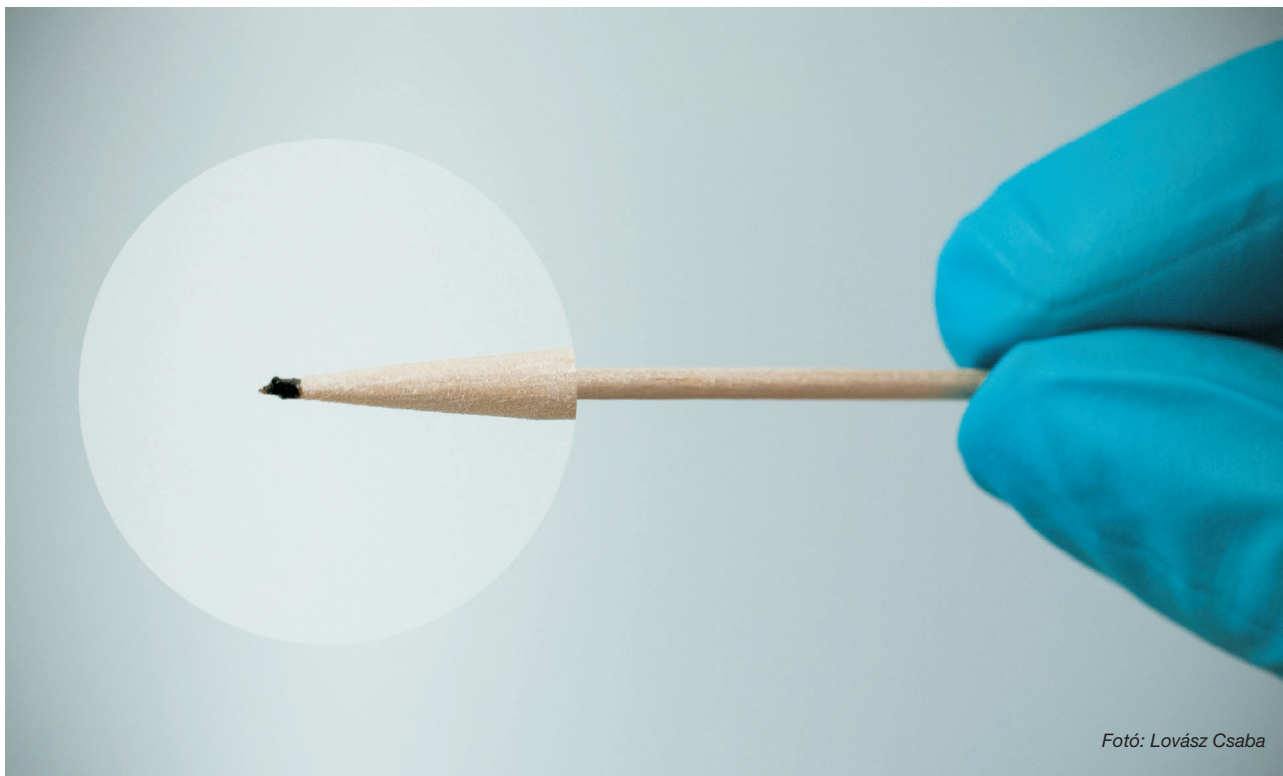
The upper left corner of **Figure 6** shows that circles representing analytical samples are divided into two parts, the left side of the circle providing information about the quality of the recorded mass spectrum, while the color of the right side indicates the adequacy of identification. If the recorded mass spectrum is adequate, then the left side of the circle is green, otherwise it is orange.

If the right side of the circle is green, then it is very likely that the microorganism analyzed and the microorganism in the reference library are the same, the „score” value is greater than 2.000.

If the right side of the circle is yellow, then this probability is lower („score” value between 1.700 and 2.000), supposedly the genus of the microorganism was successfully identified.

If this half of the circle is red, then the result is a label of „no reliable identification”.

Of course, we have the possibility to display hits with the ten best „score” values, which can provide valuable data to microbiologists in many cases.



Fotó: Lovász Csaba

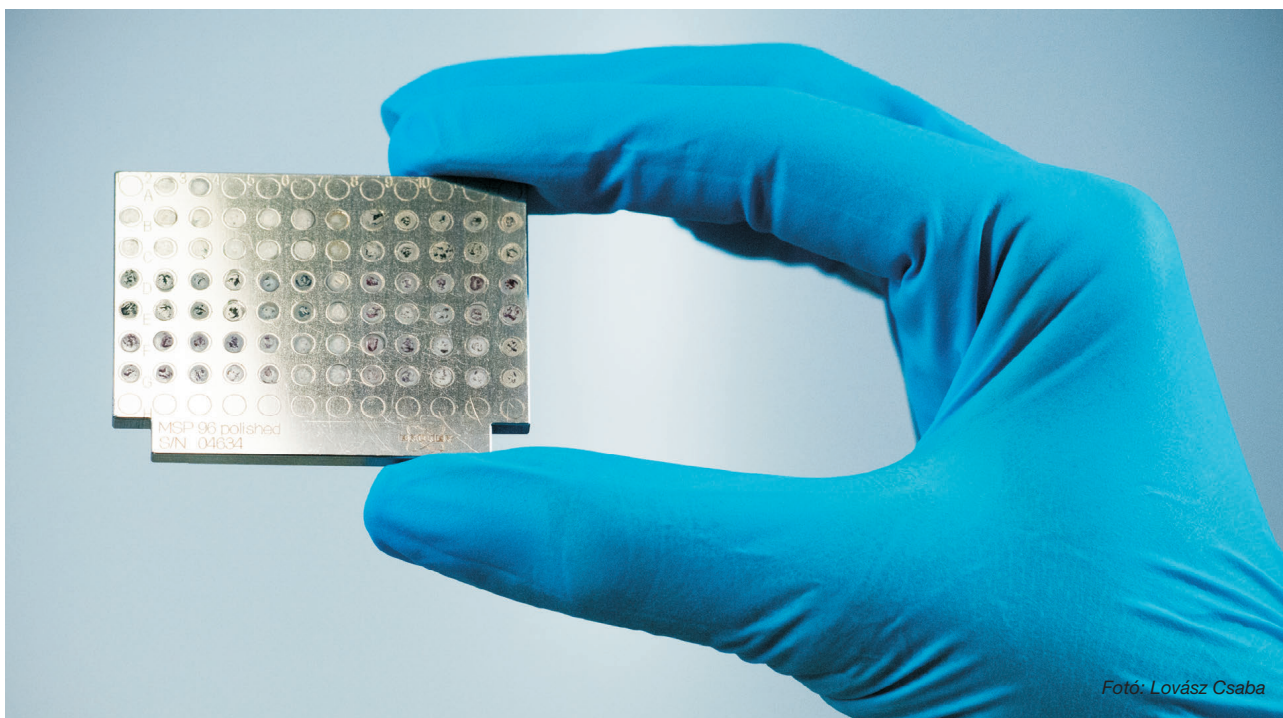
3. ábra. A MALDI-TOF vizsgálathoz szükséges minta mennyisége.
Figure 3. Sample amount necessary for MALDI-TOF analysis.

A **3. ábrán** látható, hogy a vizsgálathoz igen kis mennyiségű „biológiai anyag” elegendő. Az analízist akár egy néhány tized milliméter átmérőjű baktériumtelepből is elvégezhetjük.

A mintatartó lemezen 96 pozíció van (8 sorban so-

ronként 12 mintahely), amiből vizsgálatonként minimum egy pozíciót a kalibrációra kell fenntartanunk.

A mátrix-oldat beszáradása után a mintatartó lemez kész a vizsgálatra (**4. ábra**). Szükség esetén vákuummal gyorsíthatjuk az oldószer elpárologtatását.



Fotó: Lovász Csaba

4. ábra. Az előkészített mintatartó lemez
Figure 4. Prepared sample holder plate

The mass spectrum recording time is 10 to 15 seconds per sample, with computation times for identification being on the same scale, so we can say that identification results of prepared samples, cultures can be obtained in less than one minute.

6. Application of MALDI-TOF in microbiological testing

This method will most likely revolutionize classic microbiology. This opinion might be shocking, but let's examine how this methodology might reshape standard microbiological tests in the areas of food and feed analysis, as well as human clinical tests.

As an example, let's take a look at the standard method of determination of one of the most common pathogenic microorganisms, a *Salmonella* spp.

6.1. Detection of *Salmonella* spp. presence/absence

For the detection of the presence/absence of *Salmonella* spp. in foods, the method of standard MSZ EN ISO 6579:2006 [9] is used as the reference method. The specified amount of analytical sample (usually 25 g) is incubated (37 °C; 18± 2 hrs) in a ten-fold amount of pre-enrichment broth (BPW¹). This is followed by enrichment (incubation at 41.5°C and 37°C; 24 ± 3 hrs) in two selective broths (RVS², MKTTn³). Selective enrichment broths inhibit the growth of accompanying microorganisms. This is followed by streaking onto selective culture media. Streaking is performed on an XLD plate⁴, and then on an optional selective plate (*Salmonella* Harlequin and/or Diassalm). Colonies that developed on different selective plates are shown in **Figure 7**.

Then, colonies isolated from the selective plates are confirmed by biochemical tests, and the presence or absence of *Salmonella* spp. is confirmed using serological identification assays. Detection of pathogenic microorganisms by classic microbiological culture methods is time consuming, it can take up to 5 to 8 days. Therefore, the emphasis of modern, alternative microbiological methods have been shifting towards rapid instrumental (analytical) tests.

For the detection of *Salmonella* spp. presence/absence, validated PCR-based methods (BAX system PCR, MicroSEQ *Salmonella* spp. Detection) are now widely used, providing negative results within 24 hours [10]. However, traditional culture and confirmation tests are always necessary in the case of supposedly positive or inhibitory samples, which are also time consuming.

It can be also seen in **Figure 8** how the MALDI-TOF identification methods can fit into standard culture and alternative PCR-based detection methods.

Validation of the confirmation testing of the presence of *Salmonella* spp. using the MALDI-TOF method was performed in our laboratory. Results were convincing.

Method validation was performed in accordance with the instructions of standard ISO DIS 16140-2:2013 [11]. The following parameters were determined:

1. *Relative accuracy* - AC: $AC = (PA+NA)/N * 100 \%$
2. *Relative specificity* - SP: $SP = NA/(NA+PD) * 100 \%$
3. *Relative sensitivity* - SE: $SE = PA/(PA+ND) * 100 \%$

where:

PA: *Positive Agreement*) results of the reference method and the alternative method are both positive;

NA: *Negative Agreement*, results of the reference method and the alternative method are both negative;

PD: *Positive Deviation*, the result of the reference method is negative, the result of the alternative method is positive;

ND: *Negative Deviation*, the result of the reference method is positive, the result of the alternative method is negative;

N: number of analyses, $N = PA + NA + PD + ND$

Standard MSZ EN ISO 6579:2006 was considered the reference method. More than 150 cultures, prepared on selective culture media, were analyzed, 105 of which were positive for 105 *Salmonella* spp. Results of our validation tests are summarized in **Table 1**.

Our experience shows that the presence of *Salmonella* spp. was identified in all positive cases and was reliably excluded in the case of negative samples by the MALDI-TOF identification method. The method can be used excellently for inhibition samples. There were no false positive or false negative results during our investigations.

As further information, accompanying microorganisms were identified during the analyses, and, in a few cases, *Salmonella* spp. colonies having unusual morphologies were identified that could easily fool less experienced microbiologists. It is important to note that the MALDI-TOF identification method is independent of culture media, i.e. the presence or absence of the microorganism tested was verified with the same efficiency in the case of all three selective culture media.

A further application possibility is that tests can be extended to the serotyping of the identified *Salmonella* spp. colonies. Research shows that mass spectra recorded using the MALDI-TOF method are suitable for distinguishing *Salmonella* serotypes [12]. By comparative analyses of the spectra, a simple algorithm can be established which can help identify main serotypes reliably and rapidly.

Finally, another non-negligible aspect is that, by using the MALDI-TOF confirmation method, analysis times can be reduced by at least 24 hours, which is an extremely important factor in the case of human clinical tests and food analysis.

6.2. MALDI-TOF technique in modern microbiology

Based on the above it can be seen that MALDI-TOF mass spectrometry can fit well into analytical practice performed by classic and modern alternative methods to replace time consuming and costly „traditional” confirmation tests.

The method based on the MALDI-TOF technique has several characteristics that enable it to change modern microbiology significantly and open new avenues of investigation.

Let's see what they are:

1. **Simple, fast, cheap sample preparation** – in case of direct sample introduction, the material cost is less than 0.5 Euro, the sample holder plate can be used for an unlimited time period, and the spotting time for 96 samples is ca. 30 to 40 minutes.
2. **Short identification, analytical times** – measurement of all the samples of a complete sample holder plate requires ca. 25 to 30 minutes.

¹ Buffered Pepton Water

² Rappaport-Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth

³ Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobicin Broth

⁴ Xylose lysine deoxycholate

4.2. Mintaelőkészítés etanolos extrakcióval [8]

A referenciaspektrumok készítéséhez egy másik minta-előkészítési protokollt javasol a gyártó, ez az etanolos extrakció. Tapasztalataim szerint ez a minta-előkészítési eljárás számos, problematikusabb minta esetében javítja az azonosítás megbízhatóságát a direkt mintafelvételhez képest.

Ebben az esetben a mintát a vizsgálandó telepből egy steril 1 ml-es oltókacs segítségével vesszük, és a levett biológiai anyagot, tenyészetet Eppendorf csőben 300 ml ioncserélt vízben szuszpendáltatjuk el. Hozzáadunk 900 μ l etanolt, és alapos keverés után lecentrifugáljuk. A felülúszót óvatosan leöntjük, és az Eppendorf csőben maradt szilárd részeket lamináris box alatt szárítjuk. Száradás után 10-50 μ l 70 %-os hangyasavat adagolunk a mintához, és két percig állni hagyjuk. Ezután a hangyasavval azonos mennyiségű acetonnitrilt pipettázunk a cső tartalmához, alaposan megkeverjük és lecentrifugáljuk. Az oldat tisztájából 1 μ l-t viszünk fel a mintatartó lemez megfelelő pozíciójára, és száradás után a legrövidebb időn belül a mintára cseppentjük a mátrix-oldatot. Az előző esethez hasonlóan a mátrixoldat beszáradása után a mintatartó lemez kész a vizsgálatra.

A fentiekből látszik, hogy a MALDI-TOF vizsgálatokhoz szükséges minta-előkészítés módszerek a legtöbb esetben csak néhány egyszerű lépést tartalmaznak, így az egy mintára vetített időigényük kicsi,

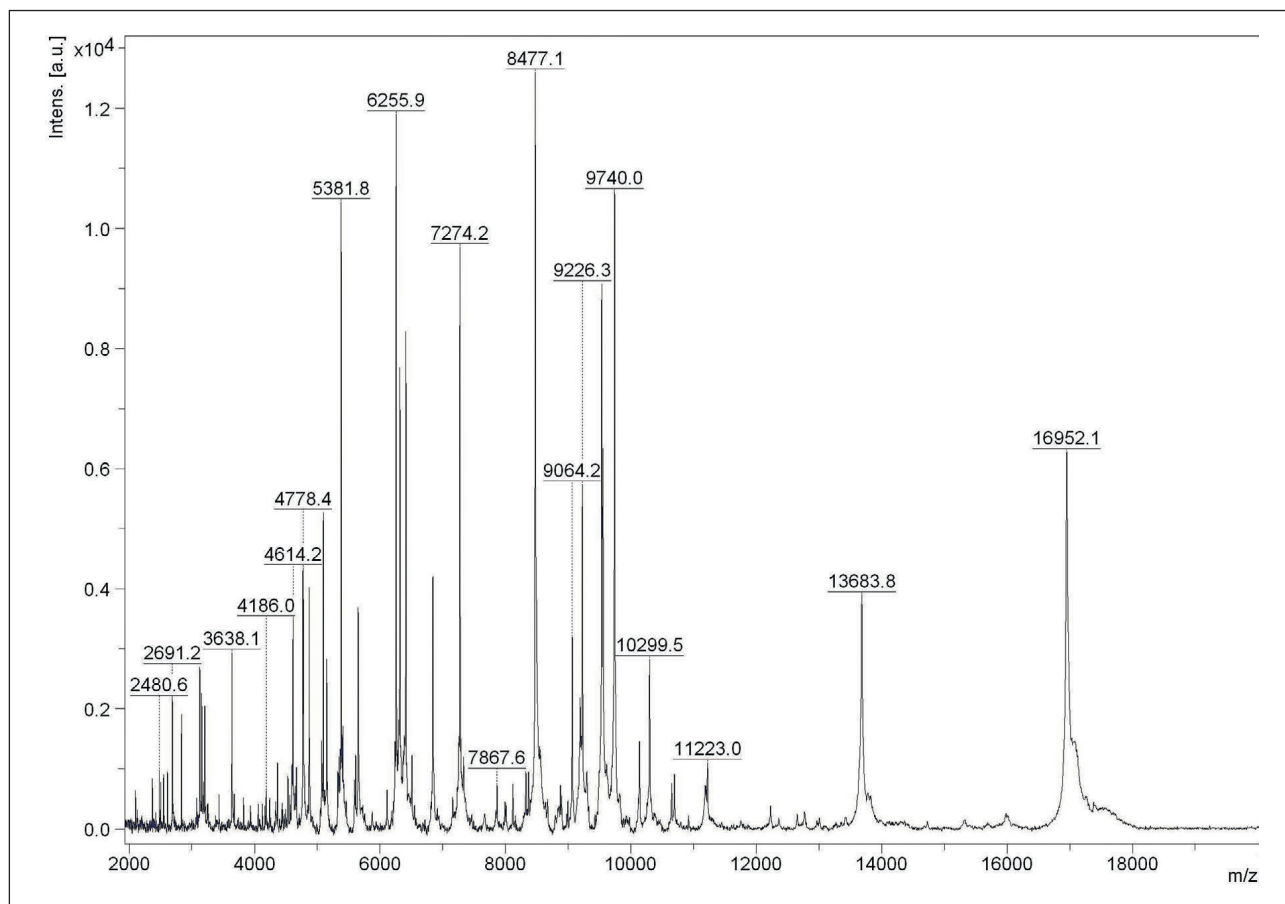
direkt mintafelvétel esetén csak néhány perc.

5. A MALDI-TOF analízis, a mikroorganizmusok azonosítása

5.1. A tömegspektrumok felvétele

Az előkészített mintatartó lemezt a készülék mintafogadó zsiliprendszerén keresztül juttatjuk az ionforrásba. A minták letapogatásához szükséges mozgást egy precíz mechanika végzi, amely igen pontosan tudja mozgatni a mintatartó lemezt az UV lézerforrás alatt. Egy kifelbontású digitális kamerával nyomon is követhetjük az aktuális pozícióban lévő minta vizsgálatát. Ez egyrészt segít ellenőrizni, hogy a vizsgálat a megfelelő minta pozícióból történik, illetve az esetleges mintafelvételi inhomogenitások esetén segíti a manuális spektrum felvételt.

A tömegspektrumok felvételéhez szükséges paramétereket egy általános, műszervezélő szoftverrel (*flex-Control - Bruker Daltonics*) tudjuk beállítani. Például a lézer energiáját, az ionok gyorsításához szükséges nagyfeszültséget, a mintatartó lemez mozgatási sémáját és a vizsgált tömegszám tartományt is. Ezzel a szoftverrel végezhetjük továbbá a készülék tömegszám-skálájának kalibrációját, a repülési idők tömegszámra történő konverziójához szükséges függvény meghatározását. Az elv egyszerű, egy ismert fehérje összetételű baktériumtörzset (*Escherichia coli* DH5), mint kalibráló standardot használunk erre a célra.



5. ábra. Az *Escherichia (E.) coli* DH5 referencia baktérium standard tömegspektruma
Figure 5. Standard mass spectrum of the *Escherichia (E.) coli* DH5 reference bacterium

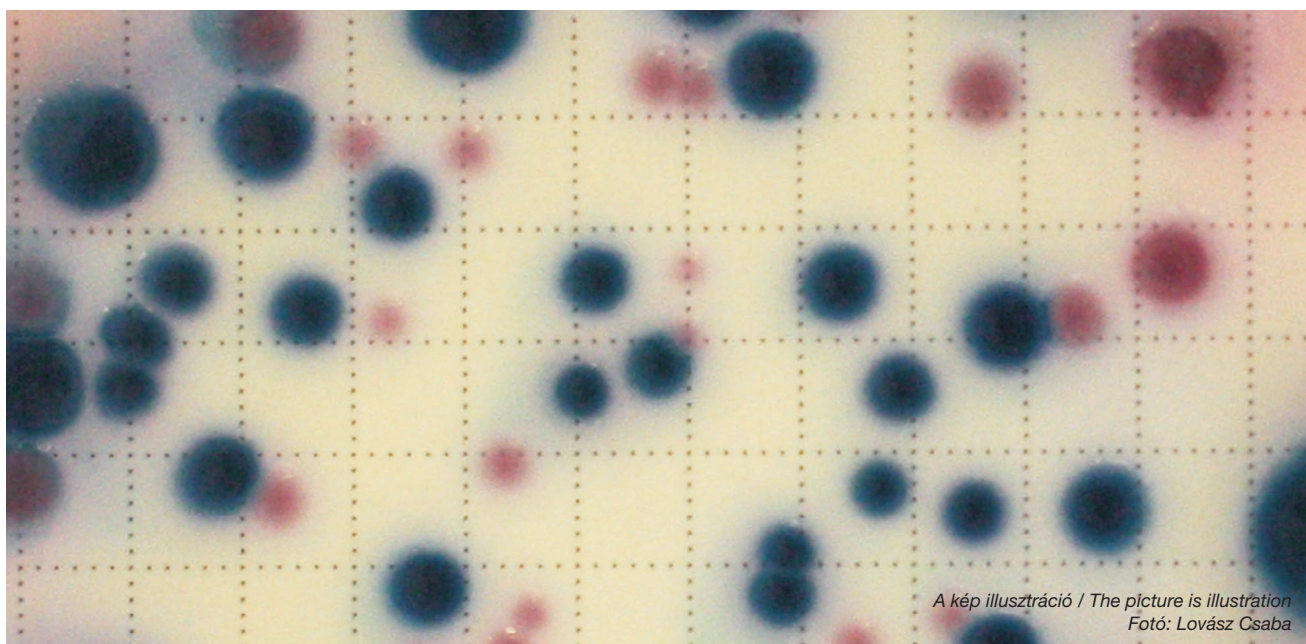
3. **User friendly software** – which allows launching of the measurement in a few simple steps, and results are provided to the microbiologist performing the analysis in the form of an easy to overview, detailed report.
4. **Reliable results** – our results so far show that results obtained using the MALDI-TOF identification method are reliable, no further confirmation tests are required, the mass spectral library contains mass spectra of certified [13] microorganisms from reliable sources.
5. **Efficiency, capacity** – calculating with an average working day of eight hours, 300 to 400 colonies per day can be identified using a parallel sample spotting method. Thus, one instrument can meet the needs of several microbiological laboratories or departments. In practice, sample holder plates can even „travel” refrigerated under sterile conditions after spotting of the samples. In our experience, biological material spotted on the sample holder plate remains suitable for MALDI-TOF analysis for several days. Therefore, it is not even necessary to perform sample preparation and the analysis itself in the same building.
6. **Expandability** – the mass spectral library of the manufacturer is expanded continuously. The library currently used in our laboratory contains 5627 species and 388 genera. Of course, it is possible to use or incorporate mass spectra prepared by the users, and this is aided by the reference spectrum recording protocol supplied by the manufacturer together with the technical description of the instrument. Applicability of the technique and the method is further improved by the fact that today there are online mass spectral databases available where, with user access, even real-time identification operations can be launched, and results are obtained via the internet practically as soon as the analysis is complete. Database operators undertake to develop their databases according to the needs of the users, so the considerable cost of developing a mass spectral library can be saved.
7. **Scan - screen method** – there are a number of alternative molecular biological identification and detection methods used all over the world, such

as DNA/rDNA based detection procedures (*real-time PCR, qPCR, MDS*) and instrumental analytical methods applying selective immunological reactions (*ELISA, ELFA, VIDAS, BBD Christal*). A common characteristic of these methods – with few exceptions – is selectivity, the selective detection and identification of a target microorganism. In contrast, MALDI-TOF identification is a kind of “screening” method, the software looks for the best match in a mass spectral library of several thousands of microorganisms. This way, analyses may result in the identification of unexpected microorganisms, indicating that the selectivity of targeted culture media is overwritten by nature in many cases.

8. **Robustness** – the identification method is basically independent of the quality of the medium used for culturing, so the identification of microorganisms does not require special culture media. Analyses performed on colonies isolated from non-specific culture media provide basically the same results as cultures from selective media. Identification, or MALDI-TOF analysis, can be performed on colonies developed on selective culture media used in standard analytical methods (EN ISO, ISO, DIN etc.) as well.

In my opinion, taking all this into consideration, there will be new microbiological methods and standards developed in the coming years which will exploit the possibilities and advantages inherent in the MALDI-TOF identification method, combining them with the methods of modern molecular microbiology.

Detection of a wide range of pathogenic microorganisms will be possible even within 24 hours by applying analytical methods based on the MALDI-TOF technique together with new procedures requiring shorter culture times. At the same time, selective sample preparation techniques could be introduced, with the application of immunoaffinity adsorbents, that will promote reliable detection of these dangerous pathogens in less time.



A kép illusztráció / The picture is illustration
Fotó: Lovász Csaba

A kalibrációhoz használt *E. coli* DH5 tömegspektruma (5. ábra) „csúcs-gazdag” így könnyen találunk megfelelő számú iont a tömegszám-tartomány (2.000 - 20.000 amu) lefedéséhez.

A MALDI-TOF tömegszám-stabilitása kiváló, ettől függetlenül célszerű minden mintasorozat előtt a referencia baktérium standard mérésével kalibrálni a készüléket. A kalibráló minta (spot) többször is felhasználható.

A mikrobiológusok munkájának megkönnyítésére, a mikroorganizmusok gyors, egyszerű azonosítására a készülék gyártója egy szoftvert fejlesztett ki (MB-RTC *MaldiBiolyper Realtime Classification – Bruker Daltonics*). A mintanevek és azonosítók beírása után a szoftver a műszervezőlő szoftverben beállított paraméterekkel automatikusan felveszi a tömegspektrumokat és elvégzi az azonosításukat is. Egy mintahelyről a berendezés legkevesebb 200 megfelelő jel/zaj viszonyú spektrumot készít, amelyekből az azonosításhoz használható, átlagolt tömegspektrumot számít, illetve tárol el a szoftver.

5.2. A mikroorganizmusok azonosítása

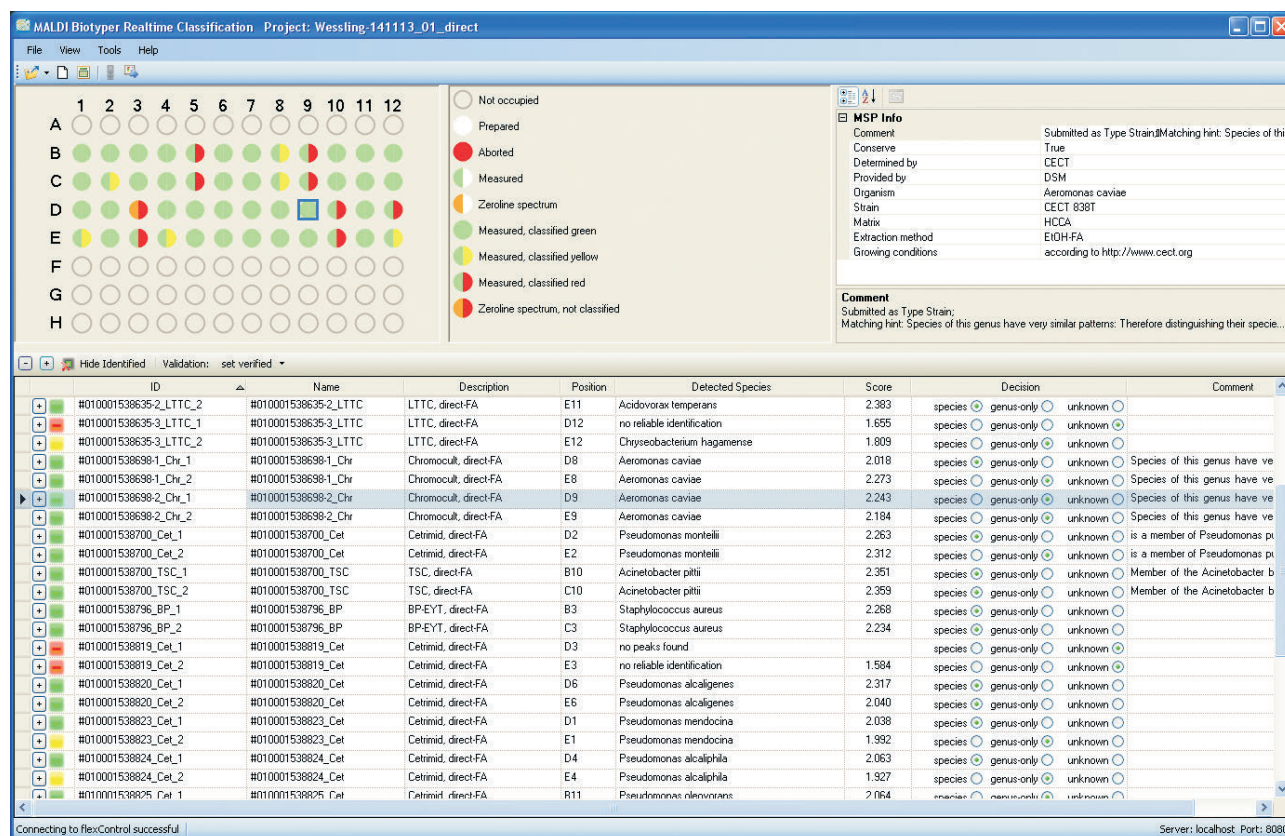
A mikroorganizmusok azonosítása itt nem más, mint tömegspektrumok összehasonlítása. A szoftver a könyvtárból megkeresi a vizsgált mikroorganizmus tömegspektrumához legjobban hasonlító referencia tömegspektrumokat, majd készít egy listát a tíz legjobb találatról. Ezt a listát egy ún. „score” (lényegében valószínűségi) érték alapján állítja össze a szoftver.

Hasonlóan más tömegspektrometriás szoftverekhez, a spektrumkönyvtári keresés során, egy „score” értéket kapunk, amely az azonosítás jóságára, megfelelőségére vonatkozó számszerűsített információ, ez egy 0,000 és 3,000 közötti érték, amelyet a következőképpen számít ki a szoftver:

1. Első lépésben a tömegspektrum könyvtárban található referencia spektrumokhoz hasonlítja az azonosítandó minta tömegspektrumát, azt vizsgálja, hogy a referencia spektrumban szereplő csúcsok megtalálhatók-e a minta tömegspektrumában;
2. Második lépésben az azonosítandó tömegspektrumot tekinti alapnak, és ehhez hasonlítja a referencia tömegspektrumokat;
3. Végül megvizsgálja az azonosítandó és a referenciaspektrumok szimmetriaviszonyait is.

Mindhárom lépésben egy-egy megfelelőségi faktort számít ki a szoftver, amelyek 0,000 és 1,000 közötti értékek, majd ezeket az értékeket összeszorozza egymással, és 1000-re normalizálja. Az azonosítás „score” értéke enne a számnak a logaritmus.

A számítási folyamat bonyolultnak tűnik, de a készülékhez mellékelt szoftver felhasználóbarát, és leegyszerűsíti a mikroorganizmusok azonosításának eljárását.



6. ábra. A mikroorganizmusok azonosításának eredménye
Figure 6. Result of microorganism identification

A **6. ábra** bal felső részén látható, hogy a vizsgált mintákat jelképező körök két részre vannak osztva, a kör bal oldala a rögzített tömegspektrum minőségéről ad információt, míg a jobb oldalának a színe az azonosítás megfelelőségét jelzi. Ha a rögzített tömegspektrum megfelelő, akkor a kör bal oldala zöld, ellenkező esetben narancssárga.

Ha a kör jobb oldala zöld, akkor igen valószínű az azonosság a vizsgált mikroorganizmus és a referencia könyvtárban található mikroorganizmus között, a „score” érték nagyobb 2,000-nél.

Ha a kör jobb oldala sárga, akkor ez a valószínűség kisebb („score” érték 1,700 és 2,000 között), vélhetően a mikroorganizmus nemzetségét sikerült beazonosítani.

Amennyiben a körnek ez a fele piros színű, akkor „nem megbízható azonosítás” címkét kapunk eredményül.

Természetesen lehetőségünk van a tíz legjobb „score” értékkel rendelkező találatot is megjeleníteni, ami számos esetben értékes adatokat szolgáltathat a mikrobiológusoknak.

Egy mintára vetítve a tömegspektrum felvételének időszükséglete 10-15 másodperc és az azonosítás számítási ideje is hasonló, így elmondhatjuk, hogy kevesebb, mint egy perc alatt kaphatunk azonosítási eredményeket az előkészített mintákról, tenyészetekről.

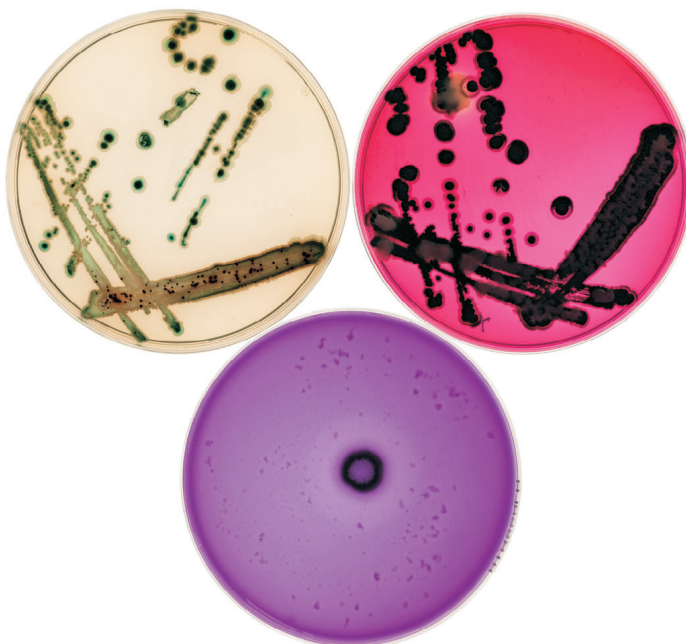
6. A MALDI-TOF alkalmazása a mikrobiológiai vizsgálatokban

Ez a módszer vélhetően forradalmasítja a klasszikus mikrobiológiát. Lehet, hogy ez a vélemény meghökkenítő, de vizsgáljuk meg, hogy valójában milyen módon alakíthatja át ez a metodika a szabványos mikrobiológiai vizsgálatokat az élelmiszer, a takarmány és a humán klinikai vizsgálatok területén egyaránt!

Példaként nézzük meg az egyik legelterjedtebb patogén mikroorganizmus, a *Salmonella* spp. szabványos meghatározási módszerét!

6.1. A *Salmonella* spp. jelenlét/hiány kimutatása

Referenciamódszerként az élelmiszerek vizsgálatára a *Salmonella* spp. jelenlét/hiány kimutatására az MSZ EN ISO 6579:2006 [9] módszert alkalmazzuk. A meghatározott mennyiségű (általában 25 g) vizsgálati mintát a szabványban előírt tízszeres mennyiségű elődúsítóban (BPW¹) inkubáljuk (37 °C; 18±2 óra). Ezt követi két szelektív tápoldatban (RVS², MK-TTn³) történő dúsítás (inkubálás 41,5 °C illetve 37 °C; 24±3 óra). A szelektív dúsítók a kísérő mikroorganizmusok növekedését gátolják. Ezután a szelektív táptalajokra történő szélesztés következik XLD-lemezre⁴, majd egy szabadon választható szelektív lemezre szélesztünk (*Salmonella* Harlequin és/vagy Diassalm). A **7. ábrán** a különböző szelektív lemezeken kifejlődött telepek láthatóak.



Fotó: Lovász Csaba

7. ábra. *Salmonella* spp. feltételezett pozitív tenyészei szelektív táptalajokon
Figure 7. Supposedly positive cultures of *Salmonella* spp. on selective culture media

¹ Buffered Pepton Water - pufferolt peptonvíz

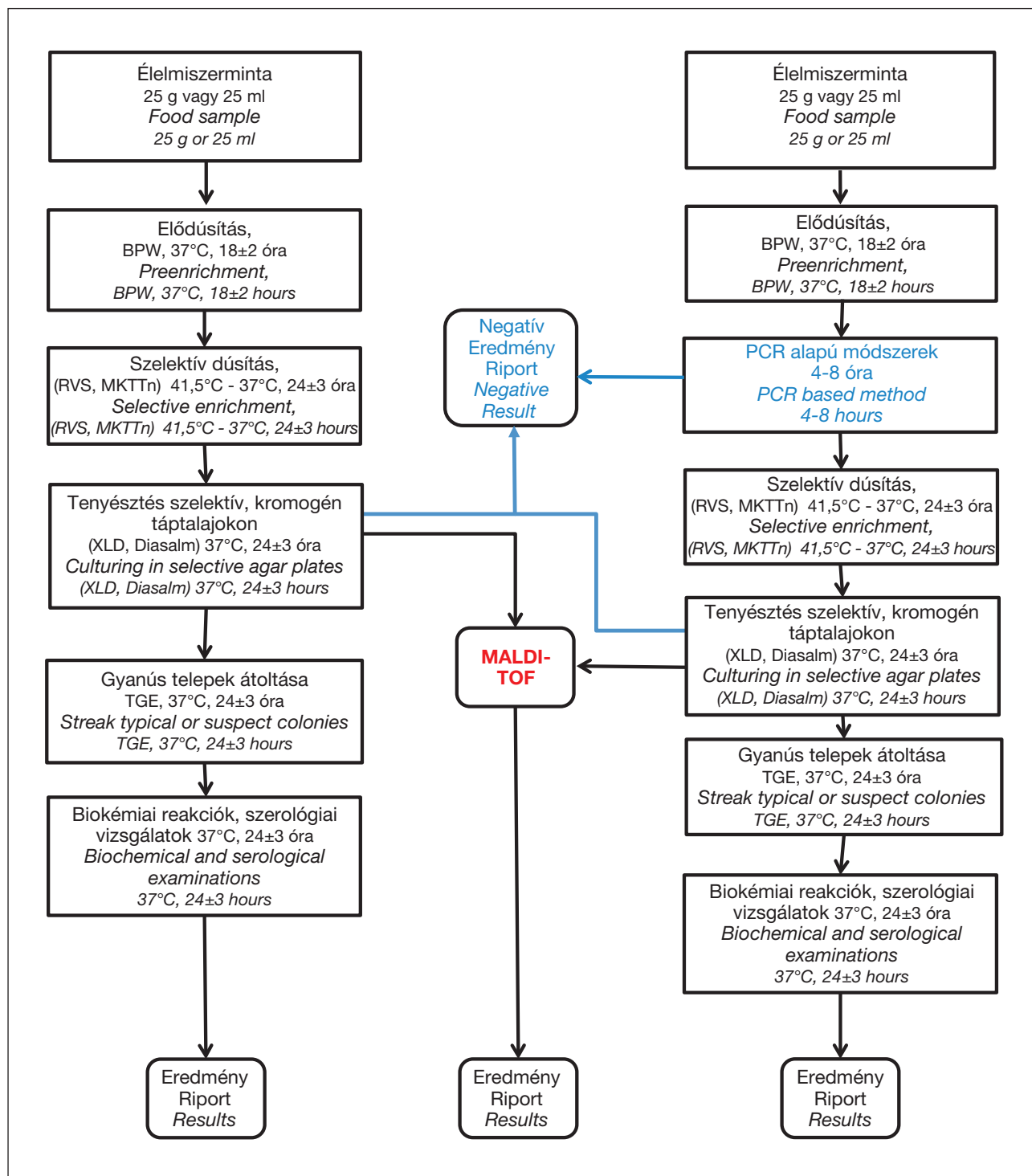
² Rappaport-Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth - Rappaport-Vassiliadis-féle Salmonella dúsító leves

³ Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobicin Broth – Muller-Kauffmann-féle tetrathionát-novobiocin leves

⁴ Xylose lysine deoxycholate – Xilóz-lizin-deoxiklorát agar

A továbbiakban a szelektív lemezekről izolált telepeket biokémiai próbákkal erősítjük meg, és szerológiai azonosító vizsgálatokkal igazoljuk a *Salmonella* spp. jelenlétét, illetve annak hiányát. A klasszikus, tenyésztéses mikrobiológiai módszerekkel a patogén mikroorganizmusok kimutatása időigényes, akár 5-8 napot is igénybe vehet. Ezért a modern, alternatív mikrobiológiai módszerek súlypontja egyre inkább a gyors, műszeres (analitikai) vizsgálatok felé tolódik el.

A *Salmonella* spp. jelenlét/hiány kimutatására széles körben elterjedtek a validált PCR alapú módszerek (BAX system PCR, MicroSEQ *Salmonella* spp. Detection), amelyekkel már 24 órán belül is kaphatunk negatív eredményt [10]. Azonban a feltételezett pozitív, illetve inhibíciós minták esetén mindenképpen hagyományos tenyésztéses és megerősítő vizsgálatok szükségesek, amelyek ugyancsak időigényesek.



8. ábra. Az MSZ EN ISO 6579:2006 és PCR alapú *Salmonella* spp. kimutatási módszerek időigényének összehasonlítása.

Figure 8. Comparison of the time demands of MSZ EN ISO 6579:2006 and PCR-based detection methods of *Salmonella* spp.

A **8. ábrán** az is látható, hogy a szabványos tenyésztéses, illetve az alternatív PCR alapú kimutatás módszerekbe hogyan illeszthetjük be a MALDI-TOF azonosítási módszert.

Laboratóriumunkban elvégeztük a *Salmonella* spp. jelenléte MALDI-TOF módszerrel történő megerősítő vizsgálatának validálását. Az eredmények meggyőzőek voltak.

A módszer validálását az ISO DIS 16140-2:2013 szabvány **[11]** útmutatásai alapján végeztük el. A következő paramétereket határoztuk meg:

1. Relatív pontosság (*Relative accuracy - AC*):

$$AC = (PA+NA)/N * 100 \%$$

2. Relatív specifikusság (*Relative specificity - SP*):

$$SP = NA/(NA+PD) * 100 \%$$

3. Relatív érzékenység (*Relative sensitivity - SE*):

$$SE = PA/(PA+ND) * 100 \%$$

ahol:

PA: pozitív egyezés (*Positive Agreement*), a referencia módszer és az alternatív módszer eredménye is pozitív;

NA: negatív egyezés (*Negative Agreement*), a referencia módszer és az alternatív módszer eredménye is negatív;

PD: pozitív eltérés (*Positive Deviation*), a referencia módszer eredménye negatív, az alternatív módszer eredménye pozitív;

ND: negatív eltérés (*Negative Deviation*), a referencia módszer eredménye pozitív, az alternatív módszer eredménye negatív;

N: a vizsgálatok száma, $N = PA + NA + PD + ND$

Referenciamódszernek az MSZ EN ISO 6579:2006 szabványt tekintettük. A vizsgálatokat több mint 150, szelektív táptalajon készült tenyészetből végeztük el, amelyek közül 105 *Salmonella* spp. pozitív volt. Validálási vizsgálataink eredményeit az **1. táblázatban** foglaltam össze.

1. táblázat. A *Salmonella* spp. jelenlét/hiány vizsgálat validálási eredményei
Table 1. Validation results of the analysis of *Salmonella* spp. presence/absence

Relatív pontosság (AC) / <i>Relative accuracy (AC)</i>	100 %
Relatív specifikusság (SP) / <i>Relative specificity (SP)</i>	100 %
Relatív érzékenység (SE) / <i>Relative sensitivity (SE)</i>	100 %

Tapasztalataink azt mutatják, hogy a MALDI-TOF azonosítási módszerrel minden pozitív esetben azonosítottuk, illetve negatív minták esetén megbízhatóan zártuk ki a *Salmonella* spp. jelenlétét. Inhibíciós minták esetében is kiválóan alkalmazható a módszer. Vizsgálataink során fals pozitív, illetve fals negatív eredményünk nem akadt.

A vizsgálatok során további információként azonosítottuk a kísérő mikroorganizmusokat, illetve néhány esetben olyan, nem tipikus morfológiával rendelkező *Salmonella* spp. telepeket is identifikáltunk, amelyek könnyen megtéveszthetik a gyakorlatlan mikrobiológusok szemét. Fontos megjegyezni, hogy a MALDI-TOF azonosítási módszer táptalaj független, azaz ebben az esetben mindhárom szelektív táptalajról ugyanolyan hatékonysággal tudtuk igazolni a vizsgált mikroorganizmus jelenlétét, vagy annak hiányát.

További alkalmazási lehetőség, hogy a vizsgálatok kiterjeszhetőek az azonosított *Salmonella* spp. telepek szerotipizálására is. A kutatások azt mutatják,

hogy MALDI-TOF módszerrel felvett tömegspektrumok alkalmasak a *Salmonella* szerotípusok megkülönböztetésére is **[12]**. A spektrumok összehasonlító vizsgálatával megadható egy egyszerű algoritmus, amely segítségével a főbb szerotípusok is megbízhatóan, gyorsan azonosíthatóak.

További nem elhanyagolható szempont, hogy a MALDI-TOF megerősítő módszerrel legalább 24 órával rövidíthető a vizsgálati idő, ami a humán klinikai vizsgálatok, illetve az élelmiszervizsgálatok esetén különösen fontos tényező.

6.2. A MALDI-TOF technika a modern mikrobiológiában

A fentebb leírtak alapján belátható, hogy a MALDI-TOF tömegspektrometria jól beilleszthető a klaszikus és a modern alternatív módszerekkel végzett vizsgálati gyakorlatba az időigényes és költséges, „hagyományos” megerősítő vizsgálatok kiváltására.

A MALDI-TOF technikán alapuló módszereknek számos olyan tulajdonságuk van, amely képessé teszi arra, hogy a technika alkalmazása jelentősen megváltoztassa a modern mikrobiológiát, új vizsgálati utakat nyisson.

Nézzük, melyek ezek:

- 1. Egyszerű, gyors, olcsó minta-előkészítés** – direkt mintafelvétel esetén az anyagköltség 0,5 Euro alatt van, a mintatartó lemez korlátlan ideig felhasználható, és 96 minta felviteli ideje körülbelül 30-40 perc.
- 2. Rövid azonosítási, vizsgálati idő** – egy teljes mintatartó lemezre felvitt minták leméréséhez körülbelül 25-30 perc szükséges.
- 3. Felhasználóbarát szoftverek** – amelyek segítségével a mérés néhány egyszerű lépésben elindítható, az eredményeket pedig jól áttekinthető, részletes jelentés formájában kapja meg a mérést végző mikrobiológus.
- 4. Megbízható eredmények** – eddigi vizsgálataink azt mutatták, hogy a MALDI-TOF azonosítási módszerrel kapott eredmények megbízhatóak, nem igényelnek további megerősítő vizsgálatokat, a tömegspektrum könyvtárban bizonylattal ellátott [13] mikroorganizmusok megbízható forrásból származó tömegspektrumai szerepelnek.
- 5. Hatékonyság, kapacitás** – egy átlagos, nyolc órás munkanappal számolva, párhuzamos mintafelviteli módszerrel 300-400 telep azonosítását tudjuk elvégezni naponta. Így egy készülékkel akár több mikrobiológiai laboratórium, osztály kiszolgálása is lehetővé válik. A gyakorlatban a mintatartó lemezek hűtött, steril körülmények között „utazhatnak” a minták felvele után. Tapasztalataink azt mutatják, hogy a mintatartó lemezre felkent biológiai anyag akár több napon keresztül is alkalmas marad a MALDI-TOF vizsgálatra. Így nem szükségszerű, hogy a mintaelőkészítés és maga a mérés akár egy épületben folyjék.
- 6. Fejleszthetőség** - a gyártó folyamatosan bővíti a tömegspektrum-könyvtárat. Laboratóriumunkban jelenleg egy 5627 speciest, 388 genust tartalmazó könyvtárat használunk. Természetesen lehetőség van a felhasználók által készített tömegspektrumok alkalmazására, beépítésére, amelyhez a gyártó a készülék műszaki leírásához mellékeli a referenciaspektrum-készítési protokollt is. A technika és a módszer felhasználhatóságát tovább javítja, hogy napjainkban már olyan on-line tömegspektrum adatbázisok is elérhetőek, ahol felhasználói hozzáférés segítségével akár valós idejű (real time) azonosítási műveleteket indíthatunk, és a mérés befejezésével gyakorlatilag egy időben kapjuk meg interneten keresztül az eredményeket. Az adatbázisok üze-

meltetői vállalják, hogy a felhasználók igényeinek megfelelően fejlesztik az adatbázisaikat, így megtakarítható a tömegspektrum könyvtár fejlesztésének nem kis költsége.

- 7. Áttekintő (scan-screen) módszer** – számos alternatív molekuláris biológiai azonosítási, kimutatási módszer terjedt már el a világon, így például a DNS/rDNS alapú kimutatási eljárások (*real-time PCR, qPCR, MDS*) mellett, a szelektív, immunológiai reakciókat alkalmazó (*ELISA, ELFA, VIDAS, BBD Christal*) műszeres analitikai módszerek. Ezen módszerek - kevés kivételtől eltekintve - közös jellemzője a szelektivitás, a célzott mikroorganizmus szelektív kimutatása, azonosítása. A MALDI-TOF azonosítás ezekkel ellentétben egyfajta áttekintő, „screen” módszer, a szoftver egy időben a tömegspektrum könyvtárban található több ezer mikroorganizmus között keresi a legjobb találatot. Így vizsgálataink során olyan nem várt mikroorganizmusokat is kaphatunk eredményül, amelyek azt is jelzik, hogy a célirányos táptalajok szelektivitását sok esetben felülírja a természet.
- 8. Robusztusság** - az azonosítási módszer gyakorlatilag nem függ a tenyésztéshez alkalmazott táptalaj minőségétől, így a mikroorganizmusok azonosítása nem is igényel speciális táptalajokat. A nem specifikus táptalajokról izolált telepekből végzett elemzések során lényegében ugyanazt az eredményt kaphatjuk, mint a szelektív táptalajokról készült tenyészetekből. A szabványos vizsgálati módszerekhez (EN ISO, ISO, DIN stb.) használt szelektív táptalajokon kifejlődött telepekből is elvégezhető az azonosítás, a MALDI-TOF vizsgálat.

Mindezek figyelembevételével véleményem szerint az elkövetkező években olyan új mikrobiológiai módszerek, szabványok szülehetnek, amelyek már kihasználják a MALDI-TOF azonosítási módszerben rejlő lehetőségeket, előnyöket, kombinálva a modern molekuláris mikrobiológia módszereivel.

A MALDI-TOF technológián alapuló vizsgálati módszereket együtt alkalmazva új, rövidebb tenyésztési idejű eljárásokkal, akár 24 órán belül is lehetséges lesz a patogén mikroorganizmusok széleskörű kimutatása. Másrészt immunoaffin adszorbensek alkalmazásával olyan szelektív minta-előkészítési technikák kerülhetnek bevezetésre, amelyekkel rövidebb idő alatt tudjuk ezeket a veszélyes kórokozókat megbízhatóan kimutatni.

7. Irodalom / References

- [1] Fenn, J.B. (2002): Electrospray Wings for Molecular Elephants, Nobel Lecture, December 8, 2002
- [2] Wüthrich, K. (2002): NMR Studies of Structure and Function of Biological Macromolecules, Nobel Lecture, December 8, 2002
- [3] Tanaka, K. (2002): The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation, Nobel Lecture, December 8, 2002
- [4] Karas, F. M. (1988): Hillencamp, Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons, *Anal.Chem.* **60**, p. 2299
- [5] HCCA UV spektruma, <http://maldimatrixinfo.wikispaces.com> (Hozzáférés: 2014. augusztus 31.)
- [6] Cameron, A.E., Eggers, D.F. (1948): An Ion „Velocitron”, *The Review of Scientific Instruments* Vol.19. Number 9, September, 1948
- [7] Bruker Daltonik GmbH (2013): SOP - Direct Transfer (DT) Method, Rev.3 (August, 2013),
- [8] Bruker Daltonik GmbH (2013): SOP - Formic Acid Extraction (EX) Method, Rev.3 (August, 2013),

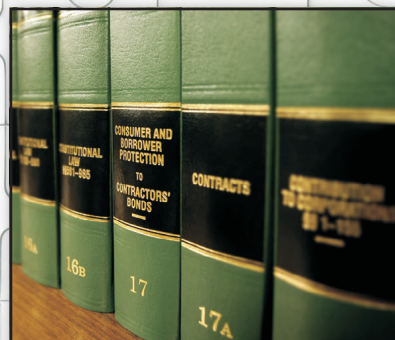
- [9] MSZ EN ISO 6579:2006, Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a szalmonellafajok kimutatására (ISO 6579:2002)
- [10] AFNOR Validation Report, BAX System PCR Assay Salmonella spp. (automated) (QB060BC)
- [11] ISO DIS 16140-2:2013, Microbiology of food and animal feed – Method validation – Part 2: protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method
- [12] Dieckmann, R., Malorny, B. (2011): Rapid Screening of Epidemiologically Important Salmonella enterica subsp. enterica Serovars by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass spectrometry, *Appl. Environ. Microbiol.* **77** (12): p. 4136
- [13] Bruker Daltonics GmbH (2014): Statement on Quality Assurance measures of the MALDI Biotyper database content, 05. 09. 2014

ECO-Invest Kft.

Le vesszük válláról a jogszabályok változásai követésének a terhet!

A korábbi Élelmiszer lemeztörvénytar című kiadványunk „összesített tartalomjegyzékét” feltöltöttük a honlapunkra egy jelszóval védett oldalra. A fejezetekbe rendezett jogszabályok száma és címe link. Magyar jogszabály esetén a Nemzeti Jogszabálytárban található, megtekintés napján hatályos szövegre mutat a link. Ha az adott jogszabálynak ismert később hatályba lépő módosítása, akkor azt feltüntetjük a jogszabály alatt és linkkel elérhetővé tesszük azt a Magyar

Közlönyt, amelyben a módosítás megjelent. Természetesen mellette jelöljük a hatályba lépés időpontját is. Uniós jogszabály esetén annyi a különbség, hogy a linkek a Hivatalos Lap kiadója honlapján mutatnak a hatályosított szövegre és a későbbiekben hatályba lépő módosításokra. Ha a listán szereplő jogszabályt érintő módosítás jelenik meg a Magyar Közlönyben vagy a Hivatalos lapban, e-mailban értesítést küldünk.



www.eco-invest.hu