

## **Metoda: Identifikace organismů pomocí metody MALDI-TOF MS**

Veronika Lízalová, ZL2

Školitelé:

### **Princip:**

MALDI-TOF MS je metoda schopna rozdělit a detekovat v analyzovaném vzorku různé molekuly (např. proteiny, nízkomolekulární složky, antibiotika aj.) ve velkém rozsahu molekulových hmotností. Nanesený vzorek na nerezkovém terčíku je překryt matricí (obvykle kys. skořicová, kys. dihydroxybenzeová apod.) a po zaschnutí umístěn do prostoru hmotnostního spektrometru v trubici s vysokým stupněm vakua.

Následně je místo na terčíku se vzorkem ozářeno krátkým pulsem laseru pracujícím v UV oblasti (obvykle 337 nm). Díky přítomné matrici dochází k přenosu energie na analyzované molekuly (MALDI – matrix assisted laser desorption/ionization). Ty jsou pak urychleny pomocí elektrického pole s vysokým napětím a dále putují do trubice hmotnostního spektrometru.

Na základě kinetické energie jsou během letu látky rozděleny podle své molekulové hmotnosti a náboje. Obecně platí, že látky s nižší molekulovou hmotností doputují na konec trubice rychleji. Na konci trubice hmotnostního spektrometru je umístěn detektor iontů, který zaznamenává dobu průletu dané molekuly ( TOF – time of flight).

### **Uplatnění metody:**

Metoda MALDI-TOF MS našla uplatnění v mnoha klinických laboratořích. Využívá se nejen v oblastech mikrobiologie, klinické biochemie nebo molekulární biologie, ale také v laboratořích se zaměřením na potravinářství, vodohospodářství nebo na ochranu zdraví obyvatelstva. V klinické biochemii je tato metoda využívána například pro analýzu metabolických produktů organismu, biologických markerů, nebo bakteriálních toxinů.

Dále se uplatňuje i při rozpoznávání posttranslačních modifikací proteinů (např. fosforylace či metylace). V oblasti molekulární biologie nám pomáhá odhalit mutace genů. V laboratořích klinické mikrobiologie se MALDI-TOF MS využívá nejčastěji k identifikaci bakterií, kvasinek i vláknitých hub, a to na úrovni rodu i druhu. Dále se metoda uplatňuje při detekci mechanismů antibiotické rezistence na základě průkazu karbapenemázové aktivity.

### **Úskalí metody:**

Jedna z mála nevýhod přístroje MALDI-TOF MS je cenová dostupnost, kdy se cena tohoto přístroje pohybuje v řádech milionů.

Další nevýhodou je například neschopnost identifikace některé bakterie do druhové úrovně (například rod *Streptococcus*) nebo neschopnost odlišit geneticky příbuzné rody (např. rody *Escherichia* a *Shigella*).

### **Přístrojové vybavení:**

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. V případě MALDI spektrometru s analyzátozem TOF se využívají detektory MCP (mikrochannel plate). Každý detektor obsahuje miliony vodivých kanálků.

V iontovém zdroji dochází k ionizaci vzorku pomocí laserového paprsku. Obvykle se jedná o UV laser s vlnovou délkou 337nm. Dopad iontů je zaznamenán digitizérem v podobě analogových signálů.

Data jsou následně pomocí konvertoru převedena do podoby digitálních signálů a jsou zaznamenány do počítače.

Nezbytnou součástí hmotnostního analyzátoru a celé MALDI-TOF analýzy je kovová destička, na kterou se nanáší analyzovaný vzorek. Je vyrobena buď z nerezové oceli, nebo z hliníku.

**Odběr a transport:**

Všechny odběry pro bakteriologické vyšetření by měly být provedeny před zahájením antibiotické léčby. Do odběrové soupravy Amies se odebírají výtěry či stěry, tekuté materiály jsou zasílány ve sterilních zkumavkách, krev na hemokultivaci je umístěna do speciálních odběrových lahvíček s různými médii pro různé využití a u mykobakteriologických vyšetření se tekutý materiál zasílá ve sterilní zkumavce a pevný materiál (např. kožní šupiny) v důkladně zabalené Petriho misce.