proLékaře.cz | 18.7.2025

Identifikace izolátů *Mycobacterium* spp. pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Amlerová J., Študentová V., Hrabák J.

Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Plzni, Univerzita Karlova

SOUHRN

Cíl práce: MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie je v posledních letech široce zaváděna do diagnostických mikrobiologických laboratoří. Poskytuje levnou a rychlou metodu pro taxonomickou identifikaci bakterií a mikromycet. Kromě těchto aplikací je používána i pro detekci mechanismů antibiotické rezistence. V budoucnu lze očekávat další rozšíření i pro jiné aplikace v mikrobiologii. Cílem této studie bylo validovat MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii pro identifikaci mykobakterií.
Materiál a metody: Do studie bylo zařazeno 30 izolátů *Mycobacterium* spp. izolovaných v laboratoři mykobakteriologie Fakultní nemocnice v Plzni. Druhová identifikace izolátů byla provedena biochemickými testy, genovými sondami a sekvenací genu pro 16S rRNA. Identifikace MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií probíhala s využitím extrakce pomocí silikonových kuliček. Identifikace kmene sekvenací genu pro 16S rRNA byla považována za referenční metodu.
Výsledky: Pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie byly správně identifikovány všechny izoláty *Mycobacterium* spp. (hodnota skóre 1,461–2,168). Jednalo se o druhy *Mycobacterium tuberculosis* (n = 5), *Mycobacterium kansasii* (n = 5), *Mycobacterium avium* (n = 6), *Mycobacterium intracelullare* (n = 3), *Mycobacterium xenopi* (n = 3), *Mycobacterium gordonae* (n=1), *Mycobacterium abscessus* (n=1), *Mycobacterium kumamotonense* (n=2), *Mycobacterium mantenii* (n = 1), *Mycobacterium lentiflavum* (n = 1), *Mycobacterium fortuitum* (n = 1), *Mycobacterium scrofulaceum* (n = 1).
Závěr: Identifikace hmotnostní spektrometrií je tedy vhodná k rutinní identifikaci *Mycobacterium* spp. v laboratořích, kde již je tato metoda zavedena pro konvenční identifikaci mikrobů.

KLÍČOVÁ SLOVA

MALDI-TOF MS – *Mycobacterium tuberculosis* – 16S rRNA – sekvenace

ABSTRACT

Amlerová J., Študentová V., Hrabák J.: Identification of *Mycobacterium* spp. isolates using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)
Study objective: Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has recently been widely used in diagnostic microbiological laboratories. It is a cheap and rapid method for the identification of bacteria and micromycetes. Apart from this purpose, it is also used for the detection of antibiotic resistance mechanisms. It has the potential to be extended for other purposes in microbiology. The aim of this study was to validate MALDI-TOF MS for the identification of mycobacteria.
Material and methods: Thirty isolates of *Mycobacterium* spp. isolated in the Laboratory of Mycobacteriology of the Plzeň University Hospital were included in the study. The isolates were identified to the species level using biochemical tests, gene probes, and sequencing of the gene encoding 16S rRNA. The identification by MALDI-TOF MS was performed with the use of silica beads. Strain identification by sequencing the gene encoding 16S rRNA was considered as the reference method.
Results: MALDI-TOF MS correctly identified all isolates of *Mycobacterium* spp. (score range 1.461 – 2.168). The species identified were *Mycobacterium tuberculosis* (n= 5), *Mycobacterium kansasii* (n=5), *Mycobacterium avium* (n=6), *Mycobacterium intracelullare* (n=3), *Mycobacterium xenopi* (n=3), *Mycobacterium gordonae* (n=1), *Mycobacterium abscessus* (n=1), *Mycobacterium kumamotonense* (n=2), *Mycobacterium mantenii* (n=1), *Mycobacterium lentiflavum* (n=1), *Mycobacterium fortuitum* (n=1), and *Mycobacterium scrofulaceum* (n=1).
Conclusion: MALDI-TOF MS is a suitable tool for the routine identification of *Mycobacterium* spp. in laboratories using this method for the conventional identification of microbes.

KEYWORDS

MALDI-TOF MS – *Mycobacterium tuberculosis* – 16S rRNA – sequencing

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 63, 2014, č. 3, s. 195–198

ÚVOD

Česká republika patří v současné době mezi země s nízkým výskytem tuberkulózy. V roce 2012 bylo hlášeno do registru tuberkulózy 611 onemocnění tuberkulózou všech forem, lokalizací a recidiv, tj. incidence 5,8/100 000 obyvatel. Mykobakterióz bylo hlášeno 108, tj. incidence 0,1/100 000 obyvatel. Jako příčina mykobakterióz byl identifikován *M. avium* komplex (52 případů), *M. xenopii* (21) a *M. kansasii* (19) [1]. Přes tyto velmi příznivé údaje zůstává problematika tuberkulózy a onemocnění způsobených mykobakteriemi jiných

proLékaře.cz | 18.7.2025

druhů než **Mycobacterium tuberculosis** komplex (MOTT) stále aktuální. Tuberkulózní pacient představuje významné epidemiologické riziko, mykobakteriózy nabývají význam u imunokompromitovaných nemocných [2]. Zásadní součástí diagnostiky těchto onemocnění je laboratorní průkaz agens, identifikace kmene a stanovení citlivosti k antituberkulotikům.

Identifikace mykobakteriálních izolátů prodělala v poslední době velký vývoj. Klasické konvenční metody identifikace – morfologie, pigmentace, biochemické a další testy mají v diagnostice stále svoje nezastupitelné místo. Genetické metody hybridizační i amplifikační našly široké uplatnění pro svoji specificitu a senzitivitu a při použití komerčních souprav i pro svoje poměrně snadné provedení [3]. Při identifikaci vzácných nebo „problematických" druhů je s dobrým úspěchem používána sekvenace genu pro 16S ribozomální RNA a následné porovnání sekvencí nukleotidů s databází NCBI (National Center for Biotechnology Information) [4]. V poslední době jsou zaváděny další metody, principiálně odlišné. Jednou z těchto metod je hmotnostní spektrometrie [5].

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která umožní stanovit molekulovou hmotnost studovaných látek ve velkém rozsahu (cca 50 ≥ 50 000). V mikrobiologické diagnostice se využívá systém MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS) [6].

Ionizace molekul ve vzorku probíhá pomocí laseru za přítomnosti matrice. V klinické mikrobiologii je tento systém využíván k identifikaci bakteriálních izolátů, dále k identifikaci kvasinek a vláknitých hub. Nově jsou zaváděny aplikace k detekci antibiotické rezistence [7]. Nabízí se také možnost použití pro identifikaci mykobakterií, zejména tam, kde je vhodné co nejširší využití tohoto přístrojového vybavení [8, 9].

MATERIÁL A METODY

Izoláty *Mycobacterium* spp.

Do studie bylo zařazeno 30 izolátů rodu *Mycobacterium* spp. deponovaných v Ústavu mikrobiologie LF UK a FN v Plzni (tab. 1). Vzorky byly uchovány v kryozkumavkách (ITEST Plus, Hradec Králové, Česká republika) a očkovány na pevné vaječné půdy (Löwenstein-Jensen a Ogawa; TRIOS, Olomouc, Česká republika) a do tekutého média (Middlebrook 7H12B) v lahvičkách pro detekční systém BACTECÒ MGITÔ 960.

Tabulka 1. Druhy klinického materiálu
Table 1. Types of clinical specimens

Druh materiálu	Počet
Sputum	23
BAL	5
Tkáň plicní	1
Sekret z píštěle	1

Identifikace klasickými metodami

Mezi konvenční metody identifikace byly zahrnuty mikroskopická morfologie, makroskopická morfologie, pigmentace, test fotochromogenity, růst v různých teplotách, biochemické testy (produkce niacinu, redukce nitrátu, citlivost na hydrazid kyseliny thiofen-2-karbonové (TCH), hydrolýza Tweenu 80, průkaz arylsulfatázy, průkaz kyselé fosfatázy) [11].

Identifikace pomocí genových sond

Identifikace byla provedena podle návodu výrobce (genové sondy – GenProbe, San Diego, CA, USA). Genové sondy byly použity pouze pro dostupné druhy – *komplex Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* a *M. gordonae*.

Identifikace pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA

Mykobakteriální izoláty byly inaktivovány teplem (95 °C, 10 min). DNA byla izolována kitem PathogenFree DNA Isolation Kit (GeneProof, Brno, Česká republika). PCR amplifikace genu pro 16S RNA a sekvenace PCR produktů byla provedena podle Marchesi et al. [10]. Výsledné sekvence byly srovnány s databází GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Pro identifikaci metodou MALDI-TOF MS byl použit postup doporučovaný výrobcem (Bruker Daltonik, Brémy, Německo). Byla použita 1 plná klička kmene z pevné vaječné půdy nebo 1 ml suspenze z tekuté půdy. Kultura byla inaktivována pomocí 1 ml 75% ethanolu s následnou centrifugací 5 min při 12 000xg. Peleta byla resuspendována v 500 µl sterilní destilované vody, směs byla centrifugována (5 min při 12 000×g) a výsledná peleta byla resuspendována v 50 µl sterilní destilované vody. Vzorky byly inkubovány 30 minut při 95 °C. K inaktivovaným vzorkům bylo přidáno 1,2 ml vychlazeného ethanolu (-20 °C), peleta byla vysušena při otevřené zkumavce při 35 °C (cca 10 minut). Následně byla suchá peleta resuspendována v 50 µl acetonitrilu. Poté bylo přidáno malé množství silikonových kuliček (průměru 0,5 mm) a intenzivně vortexováno po dobu 1 minuty. Po promíchání bylo přidáno 50 µl 70% kyseliny mravenčí a ihned centrifugováno (5 min při 12 000×g). 1 µl supernatantu byl nanesen na destičku pro hmotnostní spektrometrii a po usušení byl převrstven 1 µl matrice (roztok kyseliny skořicové). Naměřená spektra byla vyhodnocena pomocí MALDI Biotyper, verze 3.0 s databází Mycobacteria Library 1.0 (bead method).

Interpretace výsledků byla provedena podle hodnotových skóre a srovnáním pravděpodobnosti pořadí jednotlivých identifikovaných druhů.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky identifikací u jednotlivých izolátů a různých metod jsou uvedeny v tabulce 2. Kromě druhů *Mycobacterium tuberculosis* komplex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* a *M. gordonae* se podařilo identifikovat i druhy, které nebylo možné určit biochemickými testy nebo genovou sondou (*M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. kumamotonense*, *M. mantenii*, *M. lentiflavum*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*).

Hodnocení výsledků MALDI-TOF MS probíhalo v souladu s doporučením výrobce podle hodnotových skóre (tab. 3). Výsledky byly interpretovány v souvislosti s dalšími vlastnostmi izolátů a z hodnocení kvality spektra (charakter jednotlivých vrcholů spektra). Zásadní pro identifikace metodou MALDI-TOF MS se ukázala příprava izolátů. Bylo potřeba dostatečné množství mykobakteriální kultury. Druh kultivační půdy (vaječné nebo tekuté) neměl na kvalitu výsledných spekter vliv. Je nutné přesné dodržení množství reagencií a reakčních časů. Klíčovým problémem se ukázal druh silikonových kuliček, které při přípravě vzorku slouží jako inertní mechanický prostředek k narušení buněk. Při použití doporučeného druhu o průměru 0,5 mm byla lýza kultury dostatečná a získaná spektra kvalitní pro provedení

proLékaře.cz | 18.7.2025

Tabulka 2. Výsledky identifikace (ID)
Table 2. Identification results (ID)

Vzorek číslo	ID rutinní		ID sekvenací	ID MALDI-TOF MS	Hodnota skóre
	konvenční	genová sonda			
1	*M. tuberculosis*	*M. tuberculosis komplex*	*M. tuberculosis*	*M. tuberculosis komplex*	1,804
2	*M. tuberculosis*	*M. tuberculosis komplex*	*M. tuberculosis*	*M. tuberculosis komplex*	1,903
3	*M. tuberculosis*	*M. tuberculosis komplex*	*M. tuberculosis*	*M. tuberculosis komplex*	1,973
4	*M. tuberculosis*	*M. tuberculosis komplex*	*M. tuberculosis*	*M. tuberculosis komplex*	2,109
5	*M. tuberculosis*	*M. tuberculosis komplex*	*M. tuberculosis*	*M. tuberculosis komplex*	1,904
6	*M. kansasii*	*M. kansasii*	*M. kansasii*	*M. kansasii*	1,588
7	*M. kansasii*	*M. kansasii*	*M. kansasii*	*M. kansasii*	1,924
8	*M. kansasii*	*M. kansasii*	*M. kansasii*	*M. kansasii*	2,123
9	*M. kansasii*	*M. kansasii*	*M. kansasii*	*M. kansasii*	2,155
10	*M. kansasii*	*M. kansasii*	*M. kansasii*	*M. kansasii*	2,164
11	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium ssp. avium*	1,719
12	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	2,067
13	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	1,555
14	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	1,987
15	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	1,997
16	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	*M. avium*	1,839
17	*M. intarcelullare*	*M. intarcelullare*	*M. intarcelullare*	*M. intarcelullare*	1,988
18	*M. intarcelullare*	*M. intarcelullare*	*M. intarcelullare*	*M. intarcelullare*	1,852
19	*M. intarcelullare*	*M. intarcelullare*	*M. intarcelullare*	*M. intarcelullare*	1,461
20	*M. xenopi*	neprovedeno	*M. xenopi*	*M. xenopi*	1,598
21	*M. xenopi*	neprovedeno	*M. xenopi*	*M. xenopi*	1,950
22	*M. xenopi*	neprovedeno	*M. xenopi*	*M. xenopi*	1,936
23	*M. gordonae*	neprovedeno	*M. gordonae*	*M. gordonae*	2,119
24	*M.abscessus*	neprovedeno	*M.abscessus*	*M.abscessus*	2,074
25	neurčeno	neprovedeno	*M. kumamotonense*	*M. kumamotonense*	1,797
26	neurčeno	neprovedeno	*M. mantenii*	*M. mantenii*	2,168
27	*M. lentiflavum*	neprovedeno	*M. lentiflavum*	*M. lentiflavum*	1,954
28	*M. terrae*	neprovedeno	*M. kumamotonense*	*M. kumamotonense*	2,111
29	*M. fortuitum*	neprovedeno	*M. fortuitum*	*M. fortuitum*	2,049
30	*M. scrofulaceum*	neprovedeno	*M. scrofulaceum*	*M. scrofulaceum*	1,630

identifikace. Další důležitou fází přípravy je úplné vysušení pelety před přidáním acetonitrilu. Vlastní měření spekter probíhalo až na výjimky manuálně s výběrem vhodných míst pro měření na pozici terčíku.

Srovnáním s identifikací pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA se identifikace metodou MALDI-TOF MS ukázala být velmi spolehlivá, srovnatelná s ostatními, molekulárně-genetickými metodami. Přestože byly skóre u některých izolátů nižší, než doporučuje výrobce, bylo možné identifikaci uzavřít v kontextu s ostatními výsledky (např. pořadí a pravděpodobnost identifikovaných druhů) a ostatními diagnostickými znaky (např. morfologie kolonií). V případě nižších hodnot identifikačního skóre je nutné výsledky MALDI-TOF MS identifikace hodnotit vždy v kontextu s ostatními identifikačními technikami (morfologie kolonií, biochemické testy atp.). Výhodou této metody je bezesporu možnost identifikovat izoláty i jednotlivě, bez rizika exspirace diagnostických kitů. Časová náročnost je nízká (cca 2 hod). Materiálové náklady na vyšetření jednoho vzorku se pohybují cca 30 Kč (cena reagencií). Cenové náklady na přístrojové vybavení jsou ovšem vysoké. Tato metoda je proto vhodná zejména na pracovištích, která mají MALDI-TOF MS analyzátor již k dispozici i k jiným účelům.

Identifikace pomocí sekvenace genu pro 16S ribozomální RNA je metodou vysoce spolehlivou, ale velmi ekonomicky i časově nákladnou. Na většině pracovišť proto zůstává jako metoda specializovaná pro případy, u nichž jednodušší metody selhávají.

Tabulka 3. Význam hodnot skóre výsledku metody MALDI-TOF MS
Table 3. The significance of the MALDI-TOF MS score

Rozsah	Popis
2,300–3,000	Druh byl s vysokou pravděpodobností identifikován
2,000–2,299	Rod identifikován s jistotou, druh pravděpodobně
1,700–1,999	Pravděpodobná identifikace rodu
0,000– ,699	Nespolehlivá identifikace

ZÁVĚR

Identifikace *Mycobacterium* spp. pomocí MALDI-TOF MS „klasickou“ extrakční metodou s využitím kyseliny mravenčí selhává. Výsledná spektra nejsou vhodná pro identifikaci. K rozrušení buněk je nezbytně nutné využít metodu se silikonovými kuličkami, které umožní optimální extrakci ribosomálních proteinů. Nezbytnou pro identifikaci je i využití speciální databáze určené pro *Mycobacterium* spp.

proLékaře.cz | 18.7.2025

V této konfiguraci lze dosáhnout výsledky srovnatelné se sekvenací genu pro 16S rRNA. MALDI-TOF MS je tedy spolehlivou metodou pro identifikaci *Mycobacterium* spp. využitelnou v rutinních diagnostických laboratořích i referenčních centrech.

Literatura

1. Ústav zdravotnických informací. Tuberkulóza a respirační nemoci 2012. Praha: ÚZIS, 2013. Available on: http://www.uzis.cz.
2. Tortoli E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections.*Clin Microbiol Infect,* 2009;15:906–910.
3. Drobniewski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis*; 2003;3:141–147.
4. Slany M, Pavlik I. Molecular detection of nontuberculous mycobacteria: advantages and limits of a broad-range sequencing approach. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2012;22:268–276.
5. Seng P, et al. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol*, 2010;5:1733–1754.
6. Shah HN, Gharbia SE. Mass Spectrometry for Microbial Proteomics, London: Wiley, 2010. ISBN 978-0-470-68199-2.
7. Hrabák J, Chudackova E, Walkova R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *Clin Microb Rev*, 2013;26:103–114.
8. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol,* 2011;49:1790–1794.
9. Lotz A, et al. Rapid Identification of Mycobacterial Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol,* 2010;48:4481–4486.
10. Marchesi JR, et al. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1997;64:795 – 799.
11. Havelková M, et al. Doporučené standardní metody v mikrobiologii mykobakteriálních infekcí. 1. vyd. Praha: SZÚ Praha ve spolupráci s firmou Trios s.r.o., 1998.

Poděkování

Práce byla podpořena projektem PRVOUK P36 – Náhrada, podpora a regenerace funkce některých životně důležitých tkání a orgánů.

Do redakce došlo dne 22. 1. 2014.

Adresa pro korespondenci:

MUDr. Jana Amlerová

Ústav mikrobiologie
Fakultní nemocnice v Plzni
Dr. E. Beneše 13
306 05 Plzeň
e-mail: amlerova@fnplzen.cz