

# Hmotnostní spektrometrie: slibný nástroj k druhové identifikaci organismů

Pro jakékoli zkoumání živých organismů je nepochybně jednou z klíčových vlastností jejich druhová identita. Jde-li navíc o organismy patogenní, vedle obecných informací o jejich biodiverzitě vystupuje do popředí i potřeba diagnostiky – pokud možno co nejpřesnější a nejrychlejší, neboť u řady infekčních onemocnění rozhoduje o úspěchu terapie právě počáteční období nemoci. Druhová identifikace organismů byla po staletí doménou taxonomů, využívajících především jejich klasické morfologické nebo jiné fenotypové vlastnosti. Zavedení molekulárních metod, založených na analýze DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), způsobilo bez nadsázky revoluci ve studiu taxonomie, fylogeneze i biodiverzity (viz také příspěvky K výuce v Živě 2017, 3: 118–120 a LXXIII–LXXVI). Využití genetické informace k druhovému určení organismů umožnilo odhalit dříve netušené kryptické druhy a usnadnilo identifikaci v taxonomicky velmi obtížných skupinách (např. rubrika K výuce v Živě 2016, 1–6). Nyní se zdá, že srovnatelný dopad na určování druhové identity by mohlo mít proteinové profilování pomocí metod hmotnostní spektrometrie, především technikou MALDI-TOF, které je věnován tento článek.

Celá analýza MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight), tedy matricí umožněná laserová desorpce a ionizace částic a jejich detekce na základě doby letu, je velice jednoduchá, levná a rychlá metoda. Malý vzorek (mikrobiální kolonie, jednoduše extrahované proteiny z tkáně apod.) se smíchá s matricí tvořenou jednoduchou aromatickou kyselinou (např. kyselinou sinapovou), jež přenese na vzorek ionizační energii laseru, a v hmotnostním spektrometru jsou takto vzniklé krystaly vystaveny pulznímu lase-

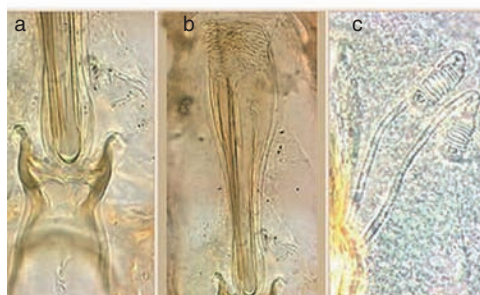
ru. Matrice jeho energii pohlcuje a ionizuje molekuly vzorku, které následně, urychleny působením elektrického pole, prolétají vakuovou trubicí, a to různě rychle v závislosti na poměru své velikosti a náboje. Čas letu se zaznamená a na jeho základě je sestaveno proteinové spektrum vzorku. Získáváme tak proteinový otisk, ne nepodobný populárnímu DNA fingerprintu (také např. Živa 2012, 4: 155–157). Důležité je, že tento profil je druhově specifický, jeho srovnáním s referenční databází organismus druhově určíme.

Proteinové profilování bylo využito nejprve k druhové identifikaci mikroorganismů, především bakterií a kvasinek. Metodicky přináší v několika rovinách značnou úsporu, díky které je předurčeno stát se vítanou metodou především v klinické mikrobiologii. Klíčovou výhodou představuje rychlost identifikace – na rozdíl od klasických kultivačních metod jde o zrychlení ca z 30–36 hodin na pouhých 30–60 minut (Jamal a kol. 2013); k analýze se navíc dají použít různé typy klinických vzorků jako moč, krev nebo mozkomíšni mok (Dierig a kol. 2015). Takto rychlé určení patologického agens vede ke včasnější a výrazně úspěšnější terapii, i např. podstatným úsporám ve spotřebě širokospektrých antibiotik (Huang a kol. 2013). Vzhledem ke snadné přípravě vzorku a nízké ceně samotné analýzy se úspory týkají i finančních nákladů. Několik studií vyčíslilo ekonomický přínos zavedení proteinového profilování v řádu stovek tisíc dolarů ročně (shrnuto v publikaci S. Angelettiho z r. 2017) a často citované vysoké náklady na pořízení přístrojového vybavení jsou tedy splaceny v horizontu několika let. Výše popsané vlastnosti předurčily proteinové profilování k tomu, aby se stalo během necelých dvou dekád jednou z hlavních diagnostických metod klinické mikrobiologie.

Ovšem využití se neomezuje pouze na diagnostické postupy humánní nebo veterinární medicíny. Metoda byla v posledních letech úspěšně použita v plejádě dalších mikrobiologických aplikací. Ty sahají od rozlišování bakteriálních patogenů hospodářsky významných druhů obratlovců – např. bakterií rodu *Tenacibaculum*, které infikují řadu komerčně chovaných druhů mořských ryb (Fernández-Álvarez a kol. 2017), přes bakterie znehodnocující potravinářské výrobky jako mléko (Vithanage a kol. 2011) až k tak speciálním studiím, jako je charakterizace bakteriálního složení tradičně vyráběných farmářských jogurtů v turecké Anatolii. Jejím výsledkem byl mimochodem nikoli překvapivý závěr, že

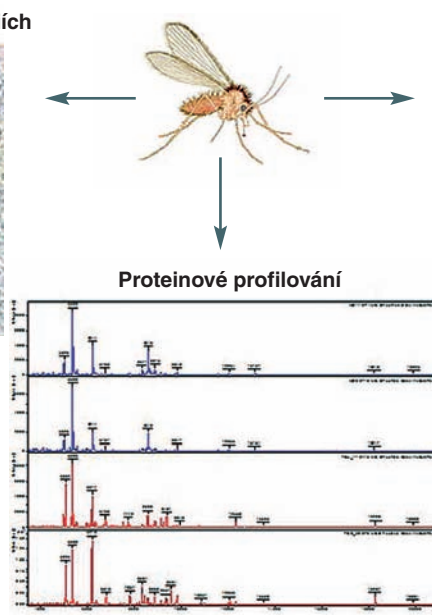
1 Možnosti využití jednoho jedince flebotoma (Phlebotominae) k různým metodám druhové identifikace. Orig. V. Dvořák

## Morfologická analýza znaků na hlavě a genitáliích

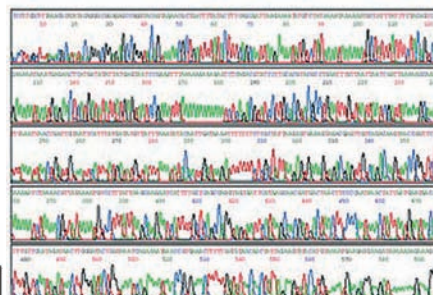


Pitvou je tělo samice flebotoma rozděleno na několik částí. Hlava a genitálie slouží k morfologickému určení (a – horní část ústní dutiny zvaná cibarium, b – hltan neboli farynx, c – spermatéky pro uskladnění spermií od samce).

Z hrudi (thoraxu) jsou extrahovány proteiny pomocí hmotnostní spektrometrie a proteinové spektrum je srovnáno s referenční databází.



## Analýzy DNA (sekvenování, barcoding)



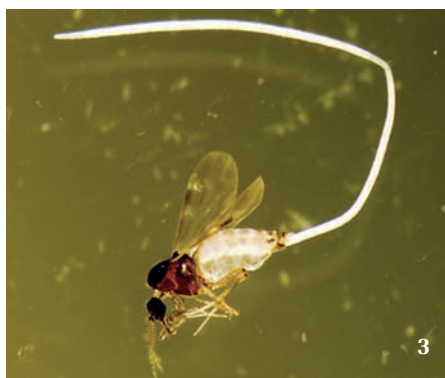
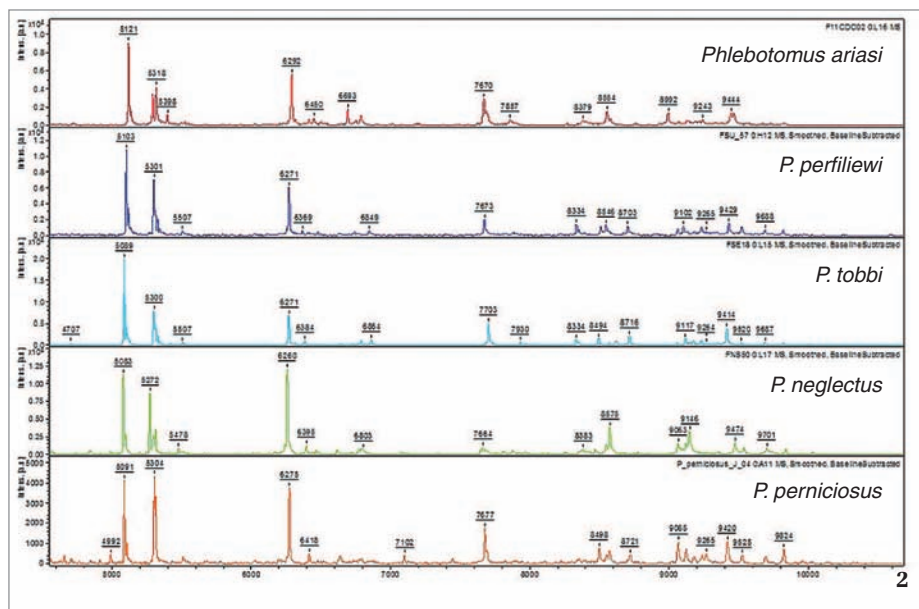
Zadeček (abdomen) se využije k izolaci DNA a sekvenování vybraných úseků pro srovnání s genovými databázemi (GenBank, BOLD – Barcode of Life Database).

ke vzniku těchto pochoutek přispívají jiné druhy ve srovnání s jogurty z definovaných podmínek průmyslové výroby (Karaduman a kol. 2017).

Pro další rozvoj využití proteinového profilování MALDI-TOF k druhové identifikaci se stal zcela zásadním přechod od zkoumání jednobuněčných organismů k mnohobuněčným. Je příznačné, i když jistě ne náhodné, že první úspěšná aplikace metody na mnohobuněčný organismus si za cíl zvolila octomilky druhového komplexu *Drosophila melanogaster*, který máme díky roli modelového organismu podrobně prostudován. Prokázáním, že jak jedinci druhu *D. melanogaster*, tak příbuzných a morfologicky obtížně rozlišitelných *D. simulans*, *D. mauritiana* nebo *D. yakuba*, poskytují komplexní reprodukovatelná a především stabilně druhově specifická proteinová spektra, umožňující správnou identifikaci laboratorních i v přírodních biotopech odchycených jedinců, se použití této metody otevřely dveře u dalších skupin hmyzu i jiných mnohobuněčných. Octomilky zase jednou sehrály úlohu průkopnického modelu. Už tato pionýrská práce správně předpověděla, že k rutinnímu nasazení metody bude klíčová standardizace nejen přípravy vzorků, ale i jejich sběru a uchování před samotnou analýzou.

#### Od octomilek k přenašečům parazitóz

Rozvíjení metody se dnes vedle jiných věnují entomologové – především ti, kteří se zaměřují na medicínsky významné skupiny hmyzu, často sehrávající roli přenašečů lidských nebo zvířecích patogenů. První přišli na řadu tiplíci (Diptera: Ceratopogonidae, obr. 3), přičemž nešlo o náhodu, ale spíše volbu z nutnosti – klasická druhová identifikace těchto drobných krevsajících dvoukřídle se totiž opírá hlavně o pigmentaci na křídlech a představuje oříšek i pro zkušené taxonomy. Proteinové profilování se osvědčilo jak pro laboratorně chované jedince, tak především pro tiplíky téměř dvou desítek evropských druhů odchycené v přírodních ohniscích přírodně právě v době, kdy v Evropě vrcholily epizootie (hromadné nákazy zvířat – obdoba epidemií u lidí) způsobené virem Schmallenberg a Blue tongue, jež tiplíci přenášejí (Kaufmann a kol. 2011 a 2012). V krátkém sledu se pak metodu podařilo využít k druhové identifikaci dalších skupin hmyzu, významných z hlediska lékařské entomologie, u zástupců dvoukřídle – komárů (Yssouf a kol. 2013), muchtse-tse (Hoppenheit a kol. 2013) a flebotomů (viz dále; Dvořák a kol. 2014), a také u blech (řád Siphonaptera; Yssouf a kol. 2014). Nová technika se tak v horizontu pěti let stala rutinním přístupem, umožňujícím např. ve Švýcarsku celonárodní sledování výskytu invazních druhů komárů (viz článek na str. 174 tohoto čísla Živy) díky analýze vajíček sebraných v terénu, která odhalila šíření nového druhu komára *Aedes koreicus* z Itálie (Suter a kol. 2015). Je třeba zdůraznit, že vhodně zvolený protokol umožní analýzu jednoho konkrétního vzorku hned několika metodickými přístupy. Jelikož proteinové profilování není nutné provádět z celotělního homogenátu, ale jen z určité části (hruď, končetiny), zbylé tělní okrsky lze využít k izolaci DNA



2 Srovnání druhově specifických proteinových spekter 6 středomořských druhů flebotomů podrodu *Larroussius*, jejichž morfologické rozlišení je obtížné, ale proteinové profilování umožňuje jednoznačnou druhovou identifikaci. Všechny 6 druhů se podílí na přenosu lidské viscerální leishmaniózy. Orig. P. Halada

3 Tiplíci z druhového komplexu *Culicoides obsoletus* se určují podle pigmentace křídel velmi obtížně. Jedinec na snímku je napadený parazitickou hlísticí. Foto J. Rádřová

4 Samice flebotomy *Phlebotomus argenteipes*, významného přenašeče viscerální leishmaniózy na Indickém poloostrově, sající na lidském hostiteli. Foto J. Bulantová

přinést revoluci i v detekci hmyzem přenášených patogenů, zodpovědných za tak závažné nemoci, jako je malárie, leishmanióza nebo spavá nemoc.

Jak už to u nových metod bývá, musíme ještě vyřešit některé zdánlivé „detaily“. Tím hlavním u proteinového profilování je systém sdílení dat. Všechny popsané studie začínaly vytvořením vlastní referenční databáze, protože na rozdíl od mikrobiologických aplikací nejsou u medicínsky či hospodářsky významných organismů k dispozici komerční, ani veřejně přístupné databáze k jejich identifikaci. Existuje pět hlavních výrobců hmotnostních spektrometrů – každý s vlastním softwarovým vybavením pro zpracování výsledků, nicméně srovnávací studie proteinových spekter flebotomů (rod *Phlebotomus*, podčeleď Phlebotominae, obr. 2 a 4) ukázala, že data lze vzájemně vyhodnocovat na různých platformách (Mathis a kol. 2015). Úkolem vědecké komunity je tak v tuto chvíli především vytvoření jednotné a veřejné databáze, obdobné úložišti genových sekvencí GenBank, BOLD nebo proteinové databázi Uniprot, která by umožnila sdílení proteinových profilů, a tím ještě větší rozšíření této slibné metody, jeví se jako atraktivní a komplementární k již zavedeným postupům.

Článek byl podpořen projektem Grantové agentury České republiky (č. 15-04329S).

Použitou literaturu najdete na webu Živy.