

Potencjał MALDI-TOF w badaniach ichtiopatologicznych

Agnieszka Pękala-Safińska

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych, ul. Wołyńska 35, 60-689 Poznań

Opracowanie metod umożliwiających szybką i poprawną identyfikację czynników chorobotwórczych ma kluczowe znaczenie w proces zarządzania zdrowiem zwierząt, usprawniając szybkie rozpoznania choroby i wdrożenie odpowiedniej terapii. Dlatego też niezmiernie istotny jest dostęp do czułych i niedrogich technik diagnostycznych. W obszarze bakteriologii, do diagnostyki wielu gatunków mikroorganizmów wciąż wykorzystuje się stosunkowo drogie, pracochłonne konwencjonalne metody. Powszechnie dostępne komercyjnie systemy biochemiczne oparte na fermentacji, hydrolizie, wykorzystaniu źródła węgla jako specyficznego substratu, stosowane są od około 40 lat wciąż ciesząc się dużym zainteresowaniem diagnostów laboratoryjnych identyfikujących bakteryjne patogeny ryb (Austin i Austin, 2016; Buller, 2014). Zestawy manualne, bo o nich właśnie jest mowa, takie jak testy API (głównie API 20E, API 20NE, API 50 CH) (bioMérieux), Microbact™GNB (Oxoid, Wielka Brytania), ENTEROtest 24, NEFERMtest 24 (Erba Lachema s.r.o., Czechy), a także częściowo zautomatyzowany VITEK 2 (bioMérieux), są powszechnie stosowane w rutynowej diagnostyce bakteryjnych czynników chorobotwórczych ryb (Austin i Austin, 2016; Buller, 2014).

W rutynowej laboratoryjnej diagnostyce ichtiopatologicznej wykorzystywane są głównie testy biochemiczne: manualne testy API oraz systemy VITEK. Zostały one pierwotnie zaprojektowane do identyfikacji kluczowych dla zdrowia ludzi drobnoustrojów, których wymagania wzrostowe oscylują w zakresie temperatur 35 - 37°C. Z tego właśnie powodu przydatność wspomnianych systemów do identyfikacji patogenów ryb została pierwotnie zakwestionowana. Przypomnijmy, że bakterie izolowane od ryb inkubowane są w temperaturze 15 - 22 °C, co znacząco wpływa na wynik badania. Ponadto, często występujące błędy w identyfikacji niektórych bakterii izolowanych od ryb są wynikiem dużej zmienności drobnoustrojów w obrębie gatunku, a także ograniczeń dostępnych baz danych (Brigante i wsp., 2006; Santos i wsp., 1993).

Uzupełnieniem identyfikacji opartej na charakterystyce fenotypowej bakterii są metody molekularne. Spośród nich najczęściej stosowana jest analiza sekwencji genu 16S rRNA (Patel, 2001). Technika ta stała się zło-tym standardem, pozostając jednak zbyt kosztowną, czasochłonną, wymagającą kompetentnego personelu oraz aparatury, aby móc zostać zaplikowaną do powszechnego zastosowania.

Alternatywą dla omawianych powyżej metod są nowe technologie. Jedną z nich jest spektrometria mas z desorpcją/ionizacją laserową wspomagana matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF). Umożliwia ona identyfikację bakterii i grzybów na podstawie ich profili białkowych, wydając się być obiecującą i pomocną w diagnostyce chorób bakteryjnych ryb (Assis i wsp., 2017). W porównaniu z fenotypową lub molekularną metodą identyfikacji, MALDI-TOF charakteryzuje się szybkim czasem procesowym, niewielkim kosztem odczynników oraz niewielką objętością próbki użytej do badań. Niestety, aparatura oraz jej serwis jest niezmiernie kosztowny. Technologię MALDI-TOF oferują komercyjne firmy, takie jak, np. Bruker Daltonics, bioMérieux czy Argenta.

Czy MALDI-TOF jest przydatnym narzędziem w diagnostyce ichtiopatologicznej, poprawnie identyfikując drobnoustroje izolowane od ryb? Aby odpowiedzieć na zadane pytanie, konieczna jest walidacja techniki pod kątem poprawności identyfikacji izolowanych od ryb bakterii. W tym celu przeprowadzono badania własne, których celem było porównanie wyników identyfikacji Gram-ujemnych bakterii izolowanych od ryb słodko-wodnych, z zastosowaniem wybranych komercyjnych systemów diagnostycznych opartych na oznaczeniu profili biochemicznych, z wynikami uzyskanymi metodami molekularnymi i techniką MALDI-TOF.

Przebadano siedemdziesiąt pięć Gram-ujemnych bakterii wyizolowanych od różnych gatunków ryb słodkowodnych, takich jak karp pospolity (*Cyprinus carpio* L.), tołpyga biała (*Hypophthalmichthys molitrix*), lin (*Tinca tinca*), pstrąg tęczowy (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), sandacz (*Lucioperca lucioperca*), szczupak (*Esox lucius*). Drobnoustroje pozyskano z tkanek i/lub narządów wewnętrznych (skóra, skrzel, nerka, śledziona) ryb wykazujących zaburzenia zdrowotne oraz klinicznie zdrowych. Ponadto, w badaniu uwzględniono dziewięć szczepów referencyjnych pochodzących z American Type Culture Collection (ATCC 51208 *Aeromonas allosaccharophila*, ATCC 7966 *Aeromonas hydrophila*, ATCC 14174 *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, ATCC BAA 237 *Aeromonas sobria*, ATCC 53794 *Pseudomonas fluorescens*, ATCC BAA 1097 *Shewanella putrefaciens*), National Collection of Type Cultures (NCTC 12266 *Yersinia ruckeri* O1), a także z Animal Health and Veterinary Laboratories, UK (11/1503 *Hafnia alvei*; 11/1501 *Chryseobacterium indologenes*). Analizy (testy biochemiczne oraz MALDI-TOF) przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producentów (API oraz VITEK 2 - bioMérieux; Microbact™GMB – Oxoid; ENTEROtest 24, NEFERMtest 24 - Erba Lachema s.r.o., Czechy; MALDI-TOF - Bruker Company). Profile biochemiczne uzyskane w systemach API odczytywano wizualnie po 24 i 48 godzinach inkubacji, a następnie interpretowano za pomocą programu komputerowego apiweb™ (bioMérieux). Wyniki identyfikacji w systemie Vitek 2 uzyskano automatycznie za pomocą oprogramowania w wersji 07.01. Interpretację wyników Microbact™GMB przeprowadzono za pomocą oprogramowania Microbact™ Computer Aided Identification (Oxoid). Wyniki identyfikacji z wykorzystaniem ENTEROtest 24 i NEFERMtest odczytywano wizualnie po 24 i 48 godzinach inkubacji za pomocą programu do identyfikacji TNW (Erba Lachema s.r.o.,

Czechy). Sekwencje genu 16S rRNA zebranych izolatów analizowano przy użyciu oprogramowania MEGA 7.0, a podobieństwo sekwencji badanych bakterii porównywano z sekwencjami dostępnymi w GenBank (Tamura i wsp., 2004). Wyniki identyfikacji techniką MALDI-TOF analizowano automatycznie za pomocą oprogramowania MALDI Biotyper (wersja 3.0, Bruker Daltonics). Do analizy przyjęto wartości punktowe zaproponowane przez producenta: wynik $\geq 1,999$ oznaczał identyfikację gatunku; zakres punktowy 1700–1999 oznaczał wiarygodną identyfikację rodzaju bakterii; wynik $< 1,700$ oznaczał niemożność identyfikacji drobnoustroju. Szczegółowe wyniki badań przedstawiono w dwóch załączonych tabelach.

Zaprezentowane wyniki mogą być pomocne w wyborze odpowiedniejszych metod do rutynowej diagnostyki bakteryjnych patogenów ryb, pozwalając na kompromis między czasem i kosztami analiz, a jakością uzyskanych wyników. Poprawność uzyskanych wyników wskazuje na zasadność rozważenia techniki MALDI-TOF w badaniach ichtiopatologicznych, jako nowego narzędzia poszerzającego warsztat metodologiczny. Nowo pojawiające się na rynku aparaty z możliwością rozszerzenia widm, umożliwiają zwiększenie spektrum identyfikowanych drobnoustrojów.

Piśmiennictwo:

Assis G. B. N., Pereira F. L., Zegarra A. U., Tavares G. C., Leal C. A., Figueiredo H. C. P. 2017. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of Gram-positive fish pathogens. *Front. Microbiol.* 8: 1492, doi: 10.3389/fmicb.2017.01492.

Austin B., Austin D. A., 2016. *Bacterial Fish Pathogens. Disease of Farmed and Wild Fish*, sixth ed. Springer International Publishing Switzerland.

Brigante G., Luzzaro F., Bettaccini A., Lombardi G., Meacci F., Pini B., Stefani S., Toniolo A., 2006. Use of the phoenix automated system for identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3263-3267. doi: 10.1128/JCM.00299-06

Buller N.B.: *Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. CABI Publishing, London 2014, pp. 168–176.

Patel J. B., 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol. Diagn.* 6, 313-321.

Santos Y., Romalde J. L., Bandin I., Magarinos B., Nunez S., Barja J. L., Toranzo A. E., 1993. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 116, 111-120.

Tamura K., Nei M., Kumar S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(30), 11030-11035.

Tabela 1. Wyniki identyfikacji szczepów referencyjnych.

Szczepy referencyjne	Sekwencjonowanie	MALDI TOF	Testy biochemiczne				Vitek 2	Microbact
			API 20E	API 20NE	API 50CH			
ATCC 51208 <i>Aeromonas allosaccharophila</i>	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> (KC202276 – 99.9)	<i>Aeromonas veronii</i> (1.891 – 2.000)	<i>A. hydrophila/caviae</i> 1 (87.5)	<i>A. hydrophila/caviae</i> (60.0)	<i>Aeromonas sobria</i> (99.9)		<i>A. hydrophila/caviae</i> (97.0)	<i>Aeromonas veronii</i> bt. <i>sobria</i> (87.1)
ATCC 7966 <i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> (AB680394 – 99.9)	<i>Aeromonas media</i> (1.906 – 2.024)	<i>A. hydrophila/caviae</i> 2 (55.4)	<i>A. hydrophila/caviae</i> (60.8)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (99.7)		<i>A. hydrophila/caviae</i> (95.1)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (73.1)
ATCC 14174 <i>Aeromonas salmonicida</i> ssp. <i>salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (HE979857 – 100)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (1.998 – 2.056)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (91.0)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (98.6)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (99.9)		<i>Aeromonas salmonicida</i> (89.9)	<i>Pasteurella multocida</i> (72.2)
ATCC BAA 237 <i>Aeromonas sobria</i>	<i>Aeromonas sobria</i> (KC213892 – 100)	<i>Aeromonas veronii</i> (1.989 – 2.041)	<i>A. hydrophila/caviae</i> 1 (67.0)	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i> (89.9)	<i>Aeromonas sobria</i> (98.4)		<i>Aeromonas sobria</i> (99.0)	<i>Aeromonas veronii</i> bt. <i>sobria</i> (56.5)
ATCC 53794 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (JQ795779 – 100)	<i>Pseudomonas korensis</i> (2.153 – 2.205)	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> (54.9)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99.7)	profil nie do zaakceptowania		<i>Pseudomonas fluorescens</i> (99.5)	<i>Ps. fluorescens</i> (66.9)
ATCC BAA 1097 <i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> (KP987225 – 99.8)	<i>Shewanella baltica</i> / <i>profunda</i> (1.837 – 2.139)	<i>Sewanella putrefaciens</i> group (98.9)	<i>Sewanella putrefaciens</i> group (94.2)	profil nie do zaakceptowania		<i>Shewanella putrefaciens</i> (93.7)	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i> ssp. <i>xylosus</i> (75.4)
NCTC 12266 <i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Yersinia ruckeri</i> (AB681666 – 99.9)	<i>Yersinia ruckeri</i> (1.985 – 2.025)	<i>Hafnia alvei</i> 2 (99.6)	nie badano	<i>Yersinia ruckeri</i> (99.9)		<i>Yersinia ruckeri</i> (67.3)	<i>Yersinia ruckeri</i> (92.4)
11/1503 <i>Hafnia alvei</i>	<i>Hafnia alvei</i> (JN409459 – 99.9)	<i>Hafnia alvei</i> (2.34 – 2.044)	<i>Hafnia alvei</i> 1 (97.6)	nie badano	<i>Hafnia alvei</i> (99.9)		<i>Hafnia alvei</i> (89.3)	<i>Klebsiella ozaenae</i> (94.4)
11/1501 <i>Chryseobacterium indologenes</i>	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (KP188538 – 99.9)	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (2.153 – 2.102)	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (94.1)	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (99.9)	profil nie do zaakceptowania		<i>Chryseobacterium indologenes</i> (90.3)	<i>Bergeyella zoohelcum</i> (68.6)

Tabela 2. Wyniki identyfikacji wybranych Gram ujemnych bakterii izolowanych od ryb.

No izolatów	Identyfikowany gatunek (% ID – procent poprawności identyfikacji)				MALDI TOF
	Sekwencjonowanie (porównanie ze bazą GenBank)	API 20E API 20 NE API 50 CH	Vitek 2 Microbat	Enterotest Nefermtest	
Izolaty oksydazo-dodatnie					
2	<i>Aeromonas allosaccharophila</i> KC 202267 (99.9)	<i>A. hydrophila/caviae/sobria</i> (67.0-89.8) <i>A.sobria</i> (99.1)/ <i>A.hydrophila/caviae</i> (60.0) <i>A.sobria</i> (99.9)/ <i>Vibrio fluvialis</i> (98.3)	<i>A.sobria/veronii</i> (96) <i>A.veroni</i> bt. <i>sobria</i> (86.2)/ <i>V.fluvialis</i> (60.4)	<i>A.sobria</i> (56.7)/ <i>A.caviae</i> (65.4) <i>A.sobria</i> (85.0)/ <i>A.ichtiosmia</i> (81.0)	<i>A.hydrophila</i> (1.84)/ <i>A.ichtiosmia</i> (1.94)
5	<i>Aeromonas hydrophila</i> AB680394 (99.7 – 99.9)	<i>A.hydrophila/caviae/sobria</i> 1 (56.1-66.2)/ <i>A.hydrophila/caviae/sobria</i> 2 (65.3-68.4) <i>A.sobria</i> (92.0-99.9)/ <i>A.hydrophila/caviae/sobria</i> (83.8-99.9) <i>A.hydrophila</i> (97.8-99.9)/ <i>A.sobria</i> (99.1)	<i>A.hydrophila/caviae</i> (95-97)/ <i>A.sobria/veronii</i> (96) <i>A.hydrophila</i> (66.6-99.9)/ <i>A.caviae</i> (72.4)	<i>A.hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> (67.9-75.5)/ <i>A.hydrophila</i> (66.5-71.0) <i>A.ichtiosmia</i> (79.0-89.0)/ <i>A.sobria</i> (88.2-92.5)/ <i>A.hydrophila</i> (66.5)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (1.94-2.056)
2	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> HE979857 (100) AB680308 (100)	<i>A.hydrophila/caviae/sobria</i> 1 (66.2)/ <i>A.salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (99.6) <i>A.hydrophila/caviae</i> (99.3)/ <i>A.salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (99.6) <i>A.salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (99.6)	<i>A.hydrophila/caviae</i> (95)/ <i>A.salmonicida</i> (94) <i>A.caviae</i> (92.8)/ <i>Pasteurella multocida</i> (72.2)	<i>A.caviae</i> (68.5-79.8) <i>A.ichtiosmia</i> (100)/ <i>A.sobria</i> (86.1)	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> (1.83-1.943)