

SÚJCHBO, v.v.i.

Certifikovaná metodika

Označení metodiky:
B2/MS-BAYP

**Identifikace *Yersinia pestis* a *Bacillus anthracis* pro potřeby
kontroly zákazu biologických zbraní metodou LC-MS**

RNDr. Michal Dřevínek, Ph.D.

Realizační výstup projektu MV ČR „Výzkum moderních metod detekce a identifikace nebezpečných CBRN látek a materiálů, metod snížení jejich nebezpečnosti a dekontaminace; výzkum moderních prostředků ochrany osob a prvků kritické infrastruktury“ číslo VF20112015013.

Oponenti: RNDr. Martin Štícha, PřF UK Praha
RNDr. Hana Kubátová, Ph.D., SÚJB Praha

2015

SÚJCHBO, v.v.i.	Název metodiky: Identifikace <i>Yersinia pestis</i> a <i>Bacillus anthracis</i> pro potřeby kontroly zákazu biologických zbraní metodou LC-MS	Označení metodiky B2/MS-BAYP
-----------------	---	---------------------------------

Normativní odkaz:		-	
Verze metodiky	01	počet stran:	8
Počet řízených výtisků:	2	Distribuce výtisků:	výt. č. 1 - LBMO výt. č. 2 - kanc. Ústavu
		+ umístění aktuální verze na intranetu SÚJCHBO, v.v.i.	
Řídí:	vedoucí LBMO SÚJCHBO, v.v.i.		
Autor metodiky:	RNDr. Michal Dřevínek, Ph.D. SÚJCHBO, v.v.i. - odbor biologické ochrany, Laboratoř biologického monitorování a ochrany		
Metodiku schválil:	RNDr. Josef Břínek, Ph.D. zast. vedoucí odboru BO SÚJCHBO, v.v.i.		
	MUDr. Stanislav Brádka, Ph.D. ředitel SÚJCHBO, v.v.i.		

Metodika zavedena dne:	20. 1. 2015	
Platnost metodiky:	neomezeně	

Interval přezkoumávání metodiky:	2 roky				
Termín:	2017	2019	2021	2023	2025
Přezkoumal:					

Obsah

1. CÍL METODIKY	4
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ.....	6
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY.....	7
5. POUŽITÁ LITERATURA	7

1. CÍL METODIKY

Hlavním cílem metodiky je poskytnout zejména inspektorům Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) vhodnou metodu pro průkaz přítomnosti vysoce rizikových bakterií *Yersinia pestis* a *Bacillus anthracis* ve vzorcích získaných při kontrole dodržování zákazu biologických zbraní.

Metodika se cíleně zaměřuje na:

- možnost identifikace *Y. pestis* a *B. anthracis* např. v neznámých terénních vzorcích;
- použitelnost pro široký rozsah vzorků;
- rychlou analýzu s jasnou interpretací výsledků pro zaškolený personál.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

B. anthracis a *Y. pestis* jsou patogenní bakterie, patřící mezi vysoce riziková biologická agens (dále jen VRA; viz Příloha č. 1 k vyhlášce č. 474/2002 Sb.). Vzhledem k vysokému stupni příbuznosti s druhy, jejichž patogenita je výrazně nižší (skupina *B. cereus*, *Y. pseudotuberculosis* / *enterocolitica*), je spolehlivé odlišení druhů patřících mezi VRA v řadě případů obtížné. Pro rozšíření portfolia metod diferenciací mezi těmito příbuznými druhy byla vyvinuta metoda založená na detekci druhově specifických peptidových markerů metodou LC-MS.

Kultury bakteriálních patogenů, získané kultivací na živných agarech, jsou extrahovány TFA. Získané proteinové extrakty jsou poté podrobeny trypsinovému štěpení a získané peptidy analyzovány technikou LC-MS. Ve spektrech jsou selektivně identifikovány peptidy vzniklé štěpením druhově specifických proteinů *B. anthracis* lethal factor a Plasmid replication protein RepX, resp. *Y. pestis* Virulence-associated V antigen, F1 capsule-anchoring protein a Outer membrane protein yopN.

2.1 Chemikálie a spotřební materiál

TFA (kys. trifluoroctová), FA (kys. mravenčí), ACN (acetonitril), MeOH, CHCl₃, guanidin.HCl, Tris.HCl, EDTA, DTT (dithiothreitol), jodoacetamid, NH₄HCO₃, trypsin

Amicon MWCO 10000 filtr, bakteriální filtr 0,22 μm

2.2 Vzorkování (odběry vzorků, zásady odběru, plán odběru, podmínky transportu, konzervace, příprava k analýze)

Tato metoda je vyvinuta pro identifikaci cílových agens v bakteriálních kulturách. Vzorkování tedy není součástí této metody, ale metod zabývajících se zpracováním vzorků a kultivací mikroorganismů.

2.3 Přístroje a pomocná zařízení

Pipety, chladnička, třepačka, centrifuga, termostat, LC-MS systém (Agilent 1200 - HCTultra)

2.4 Příprava vzorku pro měření na hmotnostním spektrometru

2-3 kličky bakteriálních kultur se promyjí 2x 1 ml deionizované vody - suspenze je vždy roztřepána na vortexu a centrifugována po dobu 20 min při 12000 rpm. Peletka je poté resuspendována ve 300 µl vody s 0,5% TFA. K suspenzi je přidáno 700 µl ACN, směs je po dobu 5 min třepána na vortexu a následně zcentrifugována po dobu 15 min při 12000 rpm. Supernatant je poté přefiltrován přes 0,22 µm filtr a zakoncentrován proudem dusíku na objem 0,2 ml. Ke směsi je přidáno 0,8 ml MeOH, 0,2 ml CHCl₃ a 0,6 ml vody. Po protřepání je vrchní fáze odstraněna, ke směsi je přidáno 0,6 ml MeOH a po promíchání vysrážené proteiny odstředěny při 5000 rpm (1 min). Po odstranění supernatantu je proteinová peletka resuspendována v 50 µl 70% ACN.

K 5 µl extraktu se přidá 300 µl pufru (6M guanidin.HCl, 100mM Tris.HCl, 5mM EDTA), směs přenesena na Amicon filtr a odstředěna při 12000 rpm po dobu 1 hod. K redukovanému objemu na filtru se přidá 100 µl 100mM DTT ve 100mM NH₄HCO₃ a směs se nechá inkubovat při 56°C po dobu 1 hod. Směs na filtru je poté opět odstředěna a alkylována působením 100 µl 300 mM jodoacetamidu při 25°C po dobu 30 min v temnu. Vzorek je poté opět odstředěn, 2x promyt 200 µl 50mM NH₄HCO₃ v 5% ACN, přidáno dalších 100 µl tohoto pufru s 0,2 µg trypsinu a směs ponechána v termostatu při 37°C přes noc. Po ukončení digesce jsou peptidy odstředěny při 12000 rpm po dobu 1 hodiny, filtr promyt 50 µl 0,1% FA v 30% ACN a 50 µl 60% ACN. Peptidy jsou následně vysušeny ve vakuu a rozpuštěny v 30 µl 0,1% FA v 2% ACN, čímž jsou připraveny k LC-MS analýze.

2.5 Akvizice a vyhodnocení spekter

Parametry měření - HCTultra:

Metoda: MD_peptBAYP.par
Rozsah: 250-3000 Da
Polarita: pozitivní
Mod: multiple SIM

Separace – Agilent 1200:

Kolona: Zorbax SB-C18 150x2,1mm
Gradient mobilní fáze: 5 – 60% ACN / 40 min
Průtok: 150 µl/min

Vyhodnocení:

Zjištění přítomnosti sady charakteristických peptidických fragmentů:

Druh	Fragment	m/z (Da)
<i>Y. pestis</i>	AYEQNPQHFIEDL	1603,7
	SRPLNDLVSQK	1256,4
	GYTNYGYLTP	1148,2
	GIVISDLQK	972,2

Druh	Fragment	m/z (Da)
<i>B. anthracis</i>	NDSEGFHIEFGHVAVDDYAGYL	2356,5
	EEGSNLTSYGR	1212,2
	NQLDTENPLGYLTQLGNA	1961,1

2.6 Validace

Metoda byla ověřena na panelu intralaboratorních slepých testů a v mezinárodních mezilaboratorních srovnávacích testech organizovaných v rámci EU projektu QUANDHIP (Quality Assurance Exercises and Networking on the Detection of Highly Infectious Pathogens).

2.7 Bezpečnost při práci

Přípravné práce je nutné provádět v ochranných rukavicích neošetřených maskem v laminárním boxu.

2.8 Nebezpečné odpady a jejich likvidace

Při práci nevznikají žádné nebezpečné odpady, přesto doporučujeme veškerý spotřební materiál, který přišel do kontaktu se vzorkem, likvidovat jako nebezpečný - spálením.

3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ

Do zavedení této metodiky identifikace *B. anthracis* a *Y. pestis* byly v Laboratoři biologického monitorování a ochrany (dále jen LBMO) Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i. (dále jen SÚJCHBO) k jejich detekci a identifikaci využívány jednak metody zaměřené na průkaz genetického materiálu pomocí PCR, jednak identifikace metodou MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Jelikož však je složení ribozomálních proteinů, které jsou zdrojem signálů při MALDI-TOF analýze, u druhů *B. anthracis*/*B. cereus* a *Y. pestis*/*Y. pseudotuberculosis* identické, je v řadě případů odlišení těchto druhů problematické.

V rámci řešení projektu MV ČR číslo VF20112015013 (Výzkum moderních metod detekce a identifikace nebezpečných CBRN látek a materiálů, metod snížení jejich nebezpečnosti a dekontaminace; výzkum moderních prostředků ochrany osob a prvků kritické infrastruktury) byla vypracována a následně certifikována metodika Průkaz přítomnosti genetického materiálu *Bacillus anthracis* pro potřeby kontroly zákazu biologických zbraní pomocí real time PCR. V rámci řešení výzkumného záměru č. SUJ 200401 (Studium materiálových a lidských faktorů pro ochranu osob před chemickými a biologickými látkami, včetně jejich detekce a identifikace) byla v roce 2010 vypracována metoda detekce *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* a *Y. intermedia* pomocí PCR.

Vzhledem k požadavkům na schopnost laboratoře provést verifikační analýzy minimálně dvěma na sobě nezávislými metodami byla vypracována metodika založená na MS analýze, která na rozdíl od stávajících metod nevyžaduje použití specifických reagensů

(primerů, sond). V návaznosti na výsledky identifikace získané metodami MALDI-TOF MS a PCR je možno provést konfirmační analýzu pro odlišení cílových agens od příbuzných druhů, vyznačujících se vysokou mírou shody MS profilů ribozomálních proteinů.

Inovační aspekt této metodiky tkví ve využití druhově specifických proteinů pro identifikaci sledovaných agens. Byla tak vyvinuta nová originální metoda pro odlišení *B. anthracis* a *Y. pestis* od vysoce příbuzných druhů, jejichž patogenita je výrazně nižší.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vyvinuta jako hlavní analytický postup metodicko-odborné podpory laboratoře LBMO SÚJCHBO při plnění úkolů státního dozoru SÚJB v oblasti zákazu biologických zbraní pro zmíněná agens.

Metodika bude využívána pro potřeby dozoru nad dodržováním zákona č. 281/2002 Sb., konkrétně bude sloužit k průkazu přítomnosti *B. anthracis* a *Y. pestis* ve vzorcích získaných při dozorové činnosti pracovníků SÚJB. Lze předpokládat, že by metodika mohla být rovněž využita k identifikaci agens *B. anthracis* a *Y. pestis* pro potřeby integrovaného záchranného systému v případech, kdy existuje podezření na přítomnost uvedených agens v neznámých vzorcích (biologické tkáně, stěry, tzv. bílé prášky neznámého původu apod.). Nicméně metodiku lze využít i v laboratořích orgánů ochrany veřejného zdraví, vybavených odpovídající instrumentací.

5. POUŽITÁ LITERATURA

Ibrahim A., Goebel B.M., Liesack W., Griffiths M., Stackebrandt E. (1993): The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16S rDNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* 114(2): 173-7.

Trebesius K., Harmsen D., Rakin A., Schmelz J., Heesemann J. (1998): Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* 36(9): 2557-64.

Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B., Vogler A.J., Wagner D.M., Allender C.J., Easterday W.R., Chenal-Francisque V., Worsham P., Thomson N.R., Parkhill J., Lindler L.E., Carniel E., Keim P. (2004): Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(51): 17837-42.

Chain P.S., Hu P., Malfatti S.A., Radnedge L., Larimer F., Vergez L.M., Worsham P., Chu M.C., Andersen G.L. (2006): Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal516: evidence of gene reduction in an emerging pathogen. *J Bacteriol* 188(12): 4453-63.

Pouillot F., Fayolle C., Carniel E. (2008): Characterization of chromosomal regions conserved in *Yersinia pseudotuberculosis* and lost by *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 76(10): 4592-9.

Kotetishvili M., Kreger A., Wauters G., Morris J.G. Jr, Sulakvelidze A., Stine O.C. (2005): Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* 43(6): 2674-84.

Arnold R. J., Reilly J. P. (1999): Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal Biochem* 269: 105–12.

Wynne C., Fenselau C., Demirev P.A., Edwards N. (2009): Top-down identification of protein biomarkers in bacteria with unsequenced genomes. *Anal Chem.* 81(23): 9633-42.

Sebbane F., Jarrett C.O., Gardner D., Long D., Hinnebusch B.J. (2006): Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(14): 5526-30.

Lathem W.W., Price P.A., Miller V.L., Goldman W.E. (2007): A plasminogen-activating protease specifically controls the development of primary pneumonic plague. *Science* 315(5811): 509-13.

Sodeinde O.A., Goguen J.D. (1988): Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 56(10): 2743-8.