

SÚJCHBO, v.v.i.

Certifikovaná metodika

Označení metodiky:
B2/MS-LEG

**Identifikace jednotlivých druhů rodu *Legionella* pro potřeby kontroly
zákazu biologických zbraní metodou hmotnostní spektrometrie**

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. Vladimír Drašar, NRL Vyškov, ZÚ Ostrava
RNDr. Hana Kubátová, Ph.D., SÚJB Praha

2015

SÚJCHBO, v.v.i.	Název metodiky: Identifikace jednotlivých druhů rodu <i>Legionella</i> pro potřeby kontroly zákazu biologických zbraní metodou hmotnostní spektrometrie	Označení metodiky B2/MS-LEG
-----------------	---	--------------------------------

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	7
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	8
5. POUŽITÁ LITERATURA	8

1. CÍL METODIKY

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

Metodika se cíleně zaměřuje na:

- možnost identifikace bakterií rodu *Legionella* např. v neznámých terénních vzorcích;
- použitelnost pro široký rozsah vzorků;
- rychlou analýzu s jasnou interpretací výsledků pro zaškolený personál;

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Bakterie rodu *Legionella* jsou patogenní bakterie, způsobující zejména u imunodeficientních jedinců těžké a v řadě případů letální pneumonie. Vzhledem k patogenitě *L. pneumophila*, která je řazena mezi riziková biologická agens (viz Příloha č. 2 k vyhlášce č. 474/2002 Sb.), ale i dalších druhů ve vyhlášce neuvedených, existuje riziko zneužití bakterií rodu *Legionella* jako agens pro výrobu biologické zbraně (vedle *L. pneumophila* např. *L. longbeachae*, *L. micdadei*, *L. anisa apod.*). Z tohoto důvodu byla pro potřeby detekce a identifikace jednotlivých druhů bakterií rodu *Legionella* vyvinuta nová metoda založená na technice celobuněčné MALDI-ToF hmotnostní spektrometrie.

Identifikace je založena na celobuněčné MALDI-ToF hmotnostní spektrometrii v kombinaci s databází referenčních spekter pokrývající celý rod *Legionella*. Vyhodnocení signálů je poté provedeno za použití databázového systému BioTyper.

2.1. Chemikálie a spotřební materiál

Roztok matrice: nasycený roztok HCCA (kys. α -kyano-4-hydroxyskořicové) v 50% acetonitrilu s 2,5% kys. trifluoroctové (OS).

Příprava roztoku matrice: 1-2 mg HCCA v plastové mikrozkušavce Eppendorf smíchat s 200-500 μ l rozpouštědla (OS), několik minut vortexovat při pokojové teplotě, poté ohřát na cca 35°C a opět několik minut vortexovat, dokud není roztok nasycen; připravený roztok je stálý při pokojové teplotě a může být používán maximálně 1 týden.

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 není tedy součástí této metody, ale metod zabývajících se zpracováním vzorků a kultivací mikroorganismů

2.3. Přístroje a pomocná zařízení

MALDI-TOF systém AutoFlex, vortex, centrifuga, lednice.

2.4. Příprava vzorku pro měření na hmotnostním spektrometru

- Bakteriální kulturu (jednotlivá kolonie) z kultivačního média (BCYE agar) nanést na MALDI platformu (MTP ground steel, Bruker) a rozetřít za použití pipetovací špičky nebo očkovací kličky do formy tenkého filmu.
- Převrstvit 1-1,5 µl roztoku matrice. Při nanášení matrice se vyvarovat kontaminace mezi jednotlivými vzorky (výměna pipetovacích špiček).
- Ponechat na vzduchu důkladně zaschnout (před vložením do hmotnostního spektrometru provést vizuální kontrolu).
- Připravenou platformu přenést do hmotnostního spektrometru.

2.5. Vyhodnocení analýzy

Komparace spektrálního profilu s databází referenčních spekter *Legionella_genus.mdb* v systému BioTyper – míra shodnosti musí být vyšší než 100 (resp. 2 v logaritmických hodnotách u BioTyper 2.0).

Databáze referenčních spekter zahrnuje:

<i>Legionella</i>	<i>adelaidensis</i>	NCTC 12735; NRLL 1109;
	<i>anisa</i>	NCTC 11974; ATCC 35290; ATCC 35291; NRLL 1086; NRLL BE-63;
	<i>beliardensis</i>	ATCC 700512;
	<i>birthingamensis</i>	NRLL 1094; NRLL FH-165; NRLL JI-58-682;
	<i>bozemanii</i>	ATCC 33217; NRLL 11451; NRLL 11342; NRLL 11343 WIGA;
	<i>brunensis</i>	ATCC 43878; NRLL PLE-32; NRLL OV-182; NRLL KV-11; NRLL JI-646; NRLL FS-60; NRLL BT-172;
	<i>busanensis</i>	NCTC 13316;
	<i>cincinnatiensis</i>	NRLL 1098;
	<i>dumoffii</i>	ATCC 33279; NRLL FM-10-702;
	<i>erythra</i>	NCTC 11977;
	<i>fairfieldensis</i>	NCTC 12488;
	<i>feeleei</i>	NCTC 11978; NCTC 12022; NRLL TT-158; NRLL KE-172; NRLL KE-161; NRLL BZ-26; NRLL SO-102;
	<i>geestiana</i>	NCTC 12373; NRLL FM-59; NRLL BV-728; NRLL L-V-3; NRLL SA-29;
	<i>gormanii</i>	NRLL PR-13; NRLL IM-12;
	<i>gratiana</i>	NCTC 12388; NRLL SO-61; NRLL IK-79;
	<i>gresilensis</i>	NCTC 13312;
	<i>hackeliae</i>	NCTC 11979; NCTC 11980;
	<i>cherii</i>	NCTC 11976; NRLL MA-72;
	<i>impletisolii</i>	NRLL 11340;
	<i>israelensis</i>	NCTC 12010;
	<i>jamestowniensis</i>	NCTC 11981;
	<i>jordanis</i>	ACTC 33484; NRLL FM-165;
	<i>lansingiensis</i>	NCTC 12830; NRLL AL-1;
	<i>londiniensis</i>	ATCC 49505; NRLL WTP;
	<i>longbeachae</i>	NCTC 11477; NCTC 11530; NRLL KR-20; NRLL EQA;
	<i>maceachernii</i>	NCTC 11982; NRLL MO-7; NRLL VRBA;
<i>micdadei</i>	ATCC 33218; NRLL PL/3; NRLL UL-2T; NRLL PB-2CJ; NRLL IV-3; NRLL CB-2; NRLL SA-13; NRLL SA-14;	
<i>moravica</i>	ATCC 43877;	
<i>nagasakii</i>	ATCC BAA-1557;	

<i>nautarum</i>	NCTC 12923; NRLL KE-26-7;
<i>oakridgensis</i>	NRLL FWnSA-2; NRLL KE-21; NRLL SZU-16; NRLL L-VI-3; NRLL FM-1-679;
<i>parisiensis</i>	ATCC 35299; NRLL 11345; NRLL 11346; NRLL 11347; NRLL FSK-62;
<i>pneumophila</i>	sg. 1: ATCC 43106 Allentown; ATCC 33152 Philadelphia; ATCC 33153 Knoxville; ATCC 43107 Heysham; ATCC 43108 Benidorm; NCTC 12008 OLDA; ATCC 43113 France; ATCC 43113 Camperdown; NCTC 12009 Oxford; NRLL AL-81; NRLL UL-36; NRLL LI-91; NRLL 1030; NRLL KE-161; NRLL UL-61; NRLL KV-1; NRLL LL-1; sg. 2: NCTC 11230; NRLL PR-163; sg. 3: ATCC 33155; NRLL IK-31; NRLL IK-11; NRLL BE-10; NRLL PRA-21; NRLL JV-114; sg. 4: ATCC 33156; NRLL LI-92; NRLL OLS-1; NRLL PR-43; NRLL PLS-24; NRLL BE-122; sg. 5: ATCC 33216; NRLL UL-34; NRLL PRA-22; sg. 6: ATCC 33215; NRLL PR-24; NRLL HOK-31; NRLL HOK-32; NRLL FS-433; NRLL BA-5; NRLL UL-7T; NRLL KV-22; NRLL PL-151; sg. 7: ATCC 33823; sg. 8: ATCC 35096; NRLL UL-35; NRLL KE-26; sg. 9: NCTC 11986; NRLL UL-20; sg. 10: NCTC 12000; NRLL SZU-3; NRLL PL-57; NRLL BA-9; sg. 11: ATCC 43130; sg. 12: ATCC 43290; NRLL LI-11; NRLL UL-9T; NRLL BUL-12; sg. 13: ATCC 43736; sg. 14: ATCC 43703; sg. 15: ATCC 35251; NRLL BA-1;
<i>quateriensis</i>	NCTC 12376;
<i>quinlivanii</i>	ATCC 43830; NCTC 12434;
<i>rowbothamii</i>	NRLL TE-1;
<i>rubrilucens</i>	ATCC 35304; NRLL MOR-19; NRLL BE-123; NRLL UL-132;
<i>sainthelensii</i>	NCTC 11988;
<i>santicrucis</i>	ATCC 35301;
<i>shakespearei</i>	NCTC 12829;
<i>spiritensis</i>	ATCC 11990; ATCC 12082; NRLL HI-238; NRLL KE-9; NRLL RS-12; NRLL IV-5; NRLL ISS;
<i>steigerwaltii</i>	NCTC 11991;
<i>taurinensis</i>	NCTC 13314; NRLL KC-1; NRLL BM-750;
<i>tucsonensis</i>	ATCC 49180; NRLL PB-1;
<i>wadsworthii</i>	ATCC 33877; NRLL L-VI-2;
<i>waltersii</i>	NRLL 13017;
<i>worsleiensis</i>	NCTC 12377; NRLL GI-12;
<i>yabuuchiae</i>	NRLL 11341;

2.6. Validace

Metoda byla ověřena na panelu intralaboratorních slepých testů a na panelu slepých testů zabezpečených Národní referenční laboratoří pro legionelly.

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 mimo BSL3 nevznikají žádné nebezpečné odpady, přesto doporučujeme veškerý spotřební materiál, který přišel do kontaktu se vzorkem, likvidovat jako nebezpečný - spálením.

2.9. Poznámky

Nutno dodržovat pravidla pro práci s patogenními mikroorganismy a při kultivaci zachovávat sterilitu používaných materiálů.

Při akvizici dat nastavit energii laseru tak, aby dosahované rozlišení bylo vyšší než 700 – v opačném případě může dojít k distorzi měřených signálů.

Vždy použít pouze mikroskopavky Eppendorf (tj. výrobce Eppendorf) – v opačném případě může dojít k uvolnění plastifikátorů!!!

Vždy používat chemikálie nejvyšší čistoty (vhodné pro MALDI nebo HPLC).

Používat vždy čerstvé kultury – během skladování při 4°C kvalita spekter relativně rychle klesá.

3. INOVAČNÍ ASPEKTY, NOVOST POSTUPŮ

Současné metody identifikace druhů rodu *Legionella* jsou založeny převážně na molekulárně-biologických a sérologických technikách. Z molekulárních metod je využívána zejména PCR cílená na geneticky stabilní *mip* gen, vykazující 3-31% variace v nukleotidových sekvencích jednotlivých druhů. Tato variabilita však s sebou nese nutnost používání rozsáhlé kolekce primerů (případně sond) a různé reakční podmínky specifické pro jednotlivé druhy, což klade časové, pracovní i finanční nároky na provedení analýzy. Laboratoře disponující technikou pro sekvenování NK proto upřednostňují sekvenování *mip* genu a 16S rRNA, pro genotypizaci a taxonomické účely je pak využívána technika MLST.

Většina klinických laboratoří nejčastěji využívá identifikace založené na serologických testech. Monoklonální protilátky jsou však dostupné pouze pro subtypy *L. pneumophila* a polyklonální protilátky nejsou komerčně dostupné. Serologie rodu *Legionella* navíc vykazuje široké spektrum křížových reakcí, které činí diskriminaci a identifikaci některých druhů značně obtížnou.

Jelikož MALDI-TOF MS umožňuje rychlou identifikaci různých taxonů bez potřeby specifických reagensů (primerů, protilátek), byla tato technika použita ve spolupráci s NRL pro identifikaci *Legionella* spp. Přestože v poslední době bylo publikováno několik prací zaměřených na MS analýzu legionel, žádná z nich není zaměřena na spektrální databázi pokrývající celý rod *Legionella*.

V rámci řešení výzkumného záměru č. SUJ 200401 (Studium materiálůvých a lidských faktorů pro ochranu osob před chemickými a biologickými látkami, včetně jejich detekce a identifikace) byla v roce 2008 zavedena a následně certifikována metodika "Identifikace *Legionella pneumophila* metodou MALDI-ToF MS"; postup z této metodiky byl následně akreditován ČIA v metodice "Identifikace vysoce rizikových a rizikových biologických agens pomocí hmotnostní spektrometrie". V roce 2009 pak byla vytvořena a v roce 2010 certifikována metodika "Identifikace *Legionella longbeachae* metodou MALDI-ToF MS", umožňující identifikaci dalšího vysoce virulentního druhu rodu *Legionella*.

Vzhledem ke skutečnosti, že potenciálně zneužitelné jako biologická zbraň jsou i další druhy rodu *Legionella*, byla vyvinuta metodika identifikace pokrývající všech 52 oficiálně uznaných druhů.

Inovační aspekt této metodiky tkví ve využití MALDI-TOF analýzy v kombinaci s unikátní databází referenčních spekter, vytvořené na pracovišti LBMO SÚJCHBO v.v.i. a zahrnující druhy uvedené v odst. 2.5. Byla tak vyvinuta nová originální metoda identifikace bakterií všech oficiálně uznaných druhů rodu *Legionella*.

V rámci MALDI-TOF analýzy v kombinaci s databází referenčních spekter, pokrývající celý rod *Legionella*, je možno identifikovat libovolný druh v rámci daného rodu, a to bez potřeby jakýchkoliv specifických reagencií (protilátek, primerů, sond apod.).

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika byla vyvinuta jako hlavní analytický postup metodicko-odborné podpory Laboratoře biologického monitorování a ochrany (LBMO) Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i. (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 *L. pneumophila* a dalších druhů rodu *Legionella* ve vzorcích získaných při dozorové činnosti pracovníků SÚJB. Lze předpokládat, že by metodika mohla být rovněž využita k identifikaci *L. pneumophila* a dalších druhů rodu *Legionella* pro potřeby integrovaného záchranného systému v případech, kdy existuje podezření na přítomnost uvedených agens v neznámých vzorcích. Nicméně metodiku lze využít i v laboratořích orgánů ochrany veřejného zdraví, vybavených odpovídající instrumentací.

5. POUŽITÁ LITERATURA

Ratcliff R.M., Lanser J.A., Manning P.A., Heuzenroeder M.W. (1998): Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. *J Clin Microbiol* 36: 1560-7.

Moliner C., Ginevra C., Jarraud S., Flaudrops C., Bedotto M., Couderc C., Etienne J., Fournier P.E. (2010): Rapid identification of *Legionella* species by mass spectrometry. *J Med Microbiol* 59: 273-84.

Fujinami Y., Kikkawa H.S., Kurosaki Y., Sakurada K., Yoshino M., Yasuda J. (2011): Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res* 166: 77-86.

Gaia V., Casati S., Tonolla M. (2011): Rapid identification of *Legionella* spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. *Syst Appl Microbiol* 34: 40-4.

Akreditovaná metodika B-MALDI-01 "Identifikace vysoce rizikových a rizikových biologických agens pomocí hmotnostní spektrometrie", SÚJCHBO v.v.i. 2012

Certifikovaná metodika B2-MALDI-LL01 “Identifikace *Legionella longbeachae* metodou MALDI-ToF MS”, SÚJCHBO v.v.i. 2010