

ANALYSEN

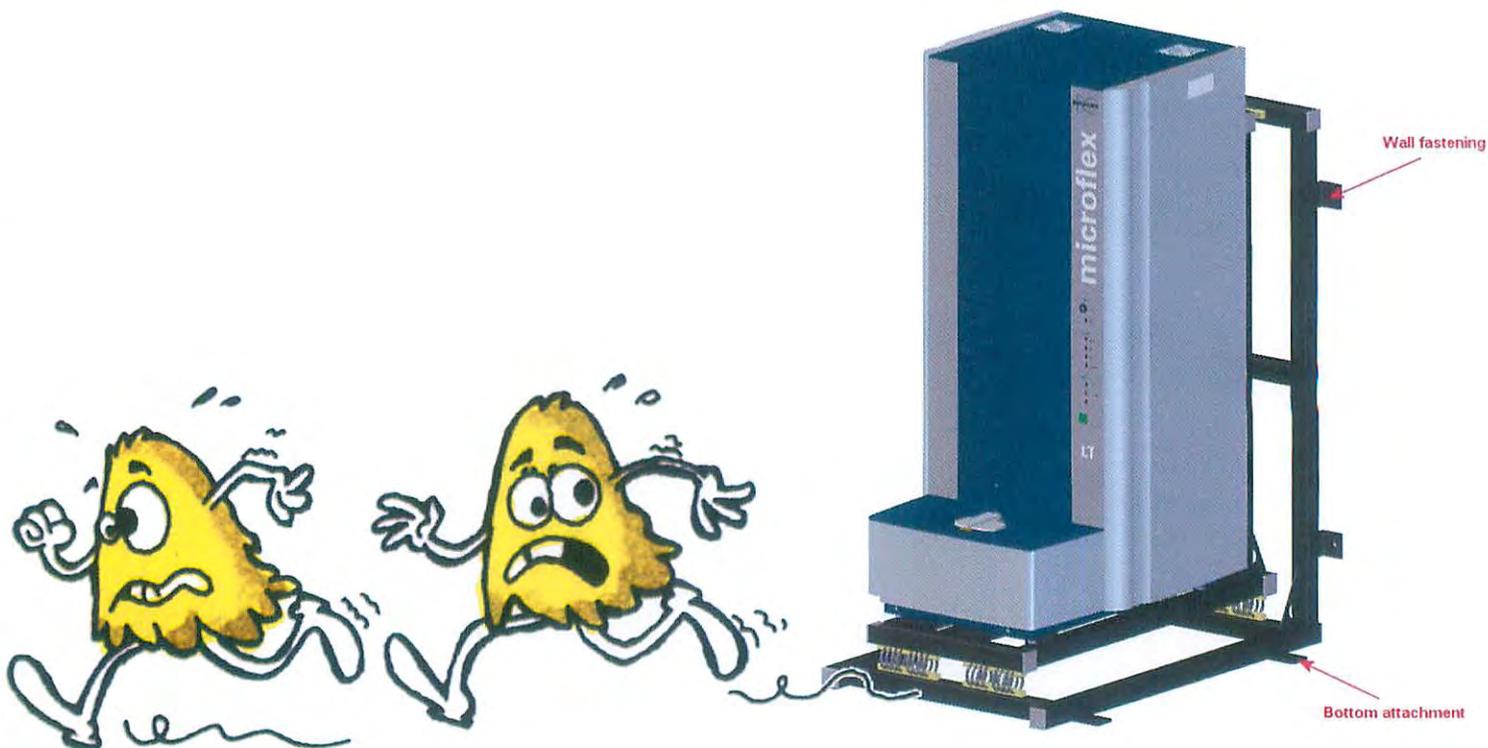
GUTACHTEN

BERATUNGEN



aktuelle Kurzinformationen zu

Keimidentifikation mit MALDI-TOF-MS

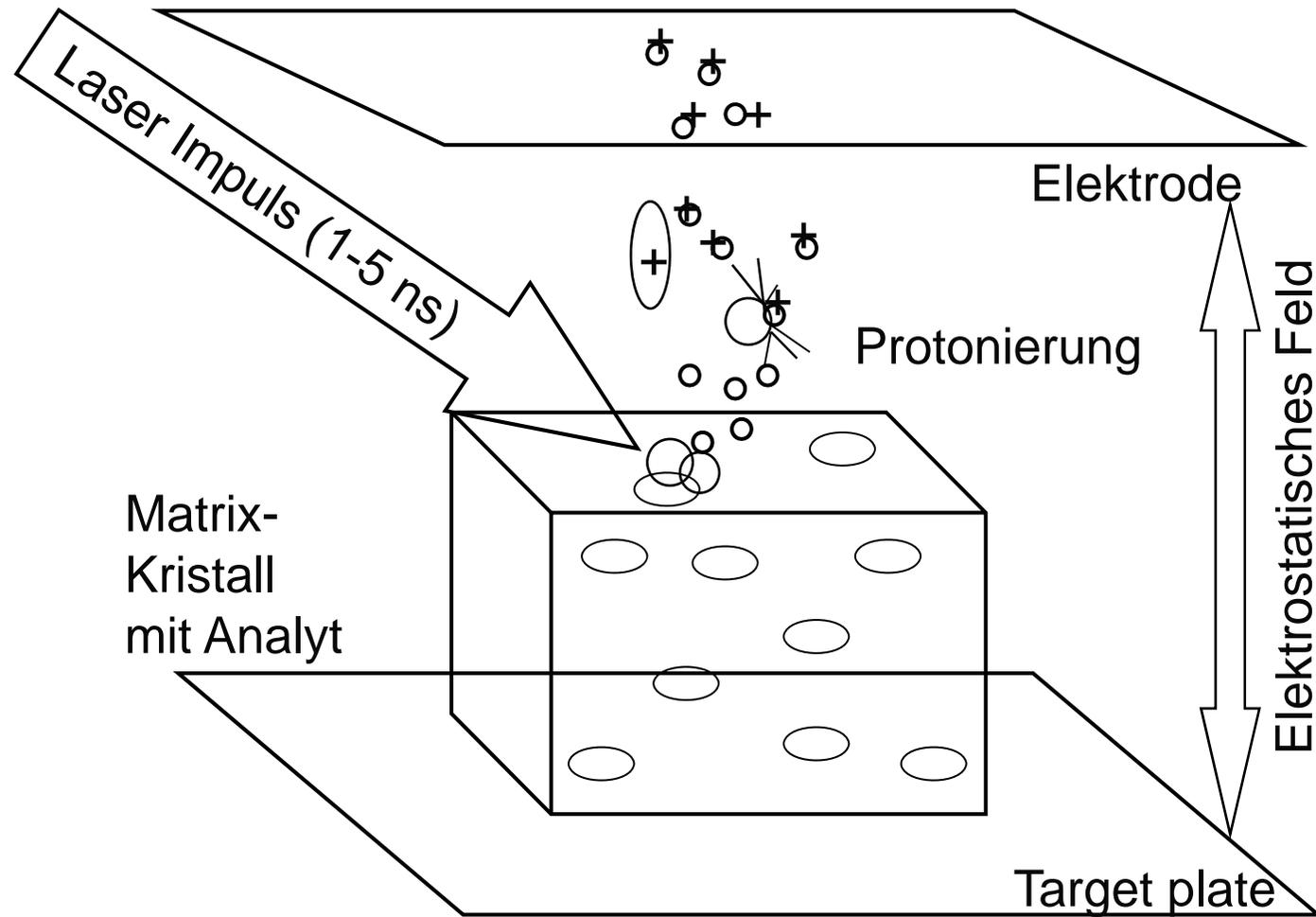




Keimdifferenzierung mittels MALDI-TOF

- ◆ Generierung von charakteristischen Proteinspektren (fingerprints), sowie Abgleich gegen eine Datenbank von Referenzspektren
- ◆ Identifizierung innerhalb von 15 min
- ◆ Reinkulturen notwendig (Kurzkultur oft ausreichend)
- ◆ Massenbereich: 2000 bis 20000 Da
- ◆ Hersteller:
 - ✓ AnagnosTec – SARAMIS aufgekauft von bioMérieux
 - ✓ Bruker Daltonics - Biotyper 2.0

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry



Probenvorbereitung

1. Kolonie picken



2. Auftragen der Zellen oder Extraktion



3. Zugabe der Matrix



4. Lufttrocknung



5. Einlegen des Targets





To Do...

Probenbelegung

Analyte Placement
Please specify the target positions for your analytes by drawing a rectangle, clicking on row/column names or directly on the appropriate spots. Analytes are inserted using the Insert key or with Add Analytes from the context menu. Available target spots are shown below. Spots containing analytes of the current project are white. (Gray spots mark unmovable occupied positions, e.g. analytes from foreign projects.)

Position	Chip	Created	Deleted	Assigned	Assigned	Assigned
A1	0	2/29/2008 2:49:31				
A2	0	2/29/2008 2:49:31	A2	Microc. Luteus TSA	2	
A3	0	2/29/2008 2:49:31	A3	Microc. Luteus VRBG	3	
A4	0	2/29/2008 2:49:31	A4	Microc. Luteus EMB	4	
A5	0	2/29/2008 2:49:31	A5	Microc. Luteus EMB	5	
A6	0	2/29/2008 2:49:31	A6	Microc. Luteus TSA	6	
A7	0	2/29/2008 2:49:31	A7	Citrobacter freundii TSA	7	
A8	0	2/29/2008 2:49:31	A8	Citrobacter freundii TSA	8	
A9	0	2/29/2008 2:49:31	A9	Citrobacter freundii EMB	9	
A10	0	2/29/2008 2:49:31	A10	Citrobacter freundii VRBG	10	
A11	0	2/29/2008 2:49:31	A11	Citrobacter freundii VRBG	11	
A12	0	2/29/2008 2:49:31	A12	Citrobacter freundii EMB	12	

AutoRoute Run: D:\Methods\Auto\Sequences\45630ca5-fab-46fd-8dad-1951d579b616.xml

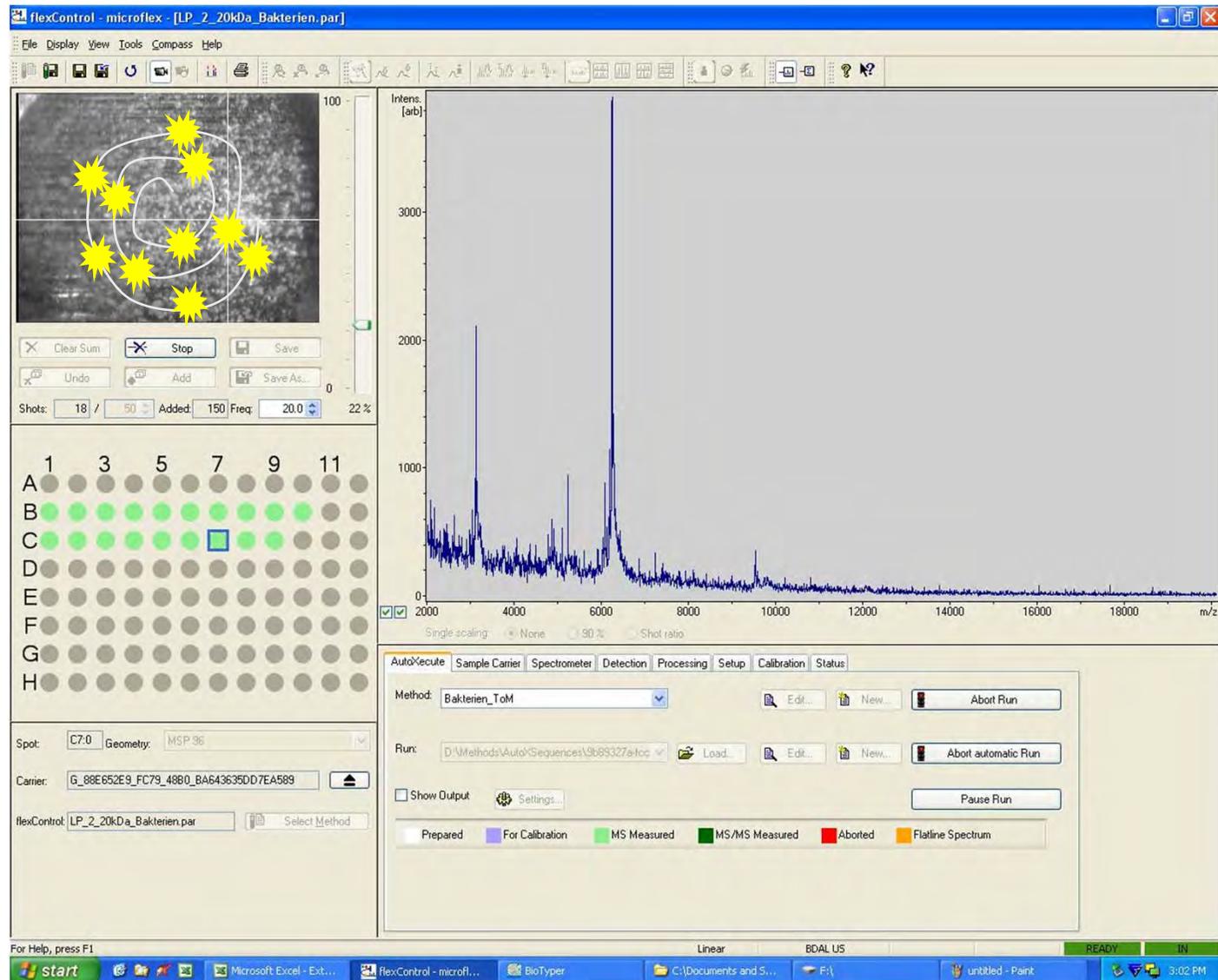
< Back Next > Cancel Help

Auswählen der Datenbank

Start der Messung

**Automatischer Abgleich
mit den Referenzspektren**

Generierung der Spektren



Auswertung

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)
0.000 ... 1.699	no reliable identification	(-)

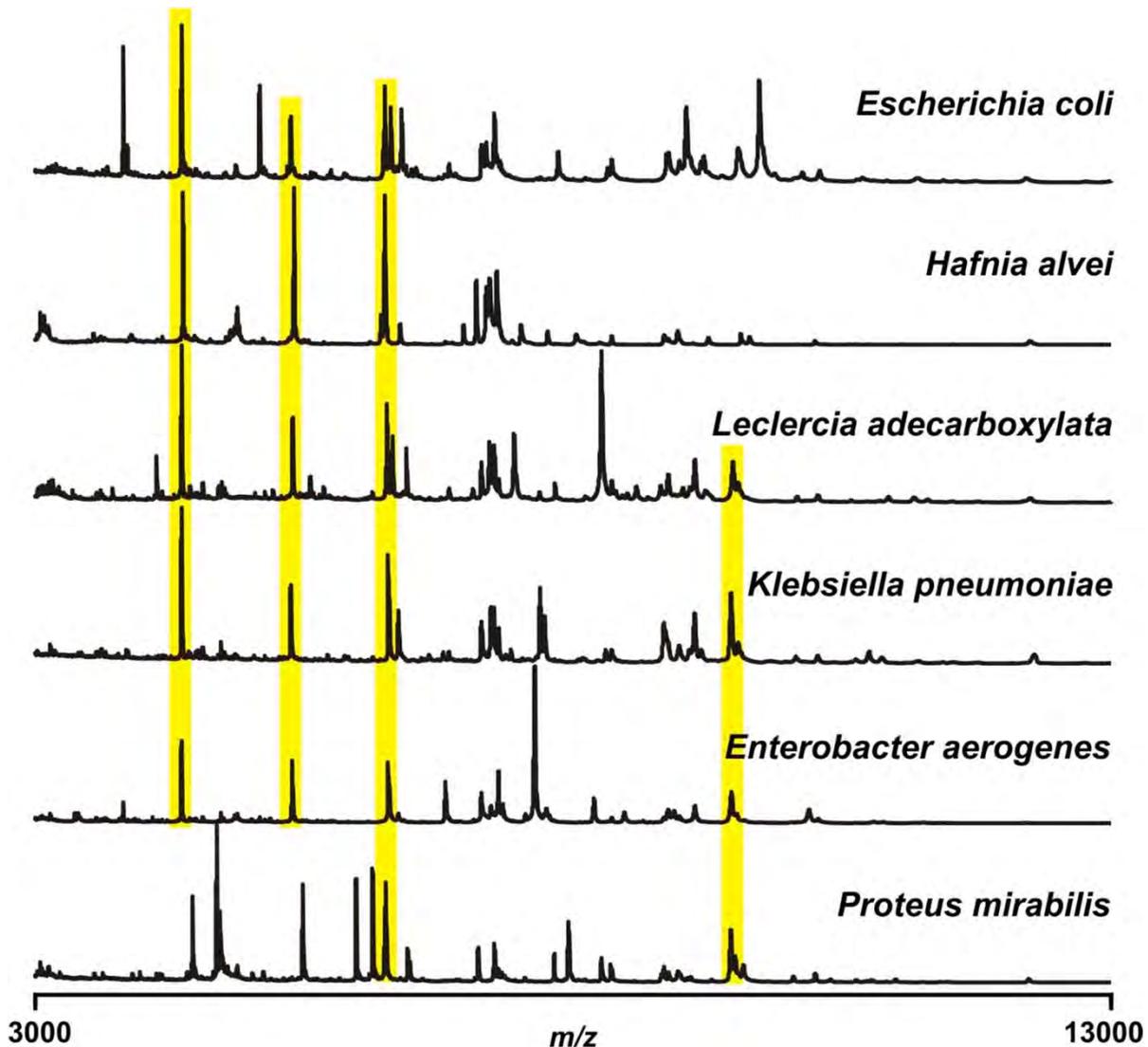


Analyte Name: A3
 Analyte Description:
 Analyte ID: Coryne KL 62
 Analyte Creation Date/Time: 2008-01-18 13:00:24.0
 Applied MSP Lib(s):
 Applied Taxonomy Tree: Bruker Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Corynebacterium diphtheriae DSM 44123_DSM	2.377	1717
2 (+)	Corynebacterium ulcerans DSM 46325_DSM	1.872	65058
3 (-)	Corynebacterium pseudotuberculosis DSM 20689_DSM	1.606	1719
4 (-)	Burkholderia fungorum LMG 20227 HAM	1.311	134537
5 (-)	Corynebacterium glutamicum DSM 20137_DSM	1.474	1718
6 (-)	Clostridium sporogenes 1087_ATCC 3584_BOG	1.449	1509
7 (-)	Actinobacillus pleuropneumoniae 351 LAL	1.419	715
8 (-)	Pandoraea pulmonicola LMG 18106 HAM	1.401	93221
9 (-)	Rhodococcus ruber HKI 7477 HRJ	1.388	1830
10 (-)	Bacteroides fragilis MB_5088_05 THL	1.372	817



Massenspektren von *Enterobacteriaceae*: Familie-, Art-, und Spezies spezifische Massen



Einordnung in die Familie durch „Marken-Massensignalen“



Unterscheidung zwischen Spezies möglich durch bestimmte Massensignale

Ringversuche für Bakteriologie 2008-2010

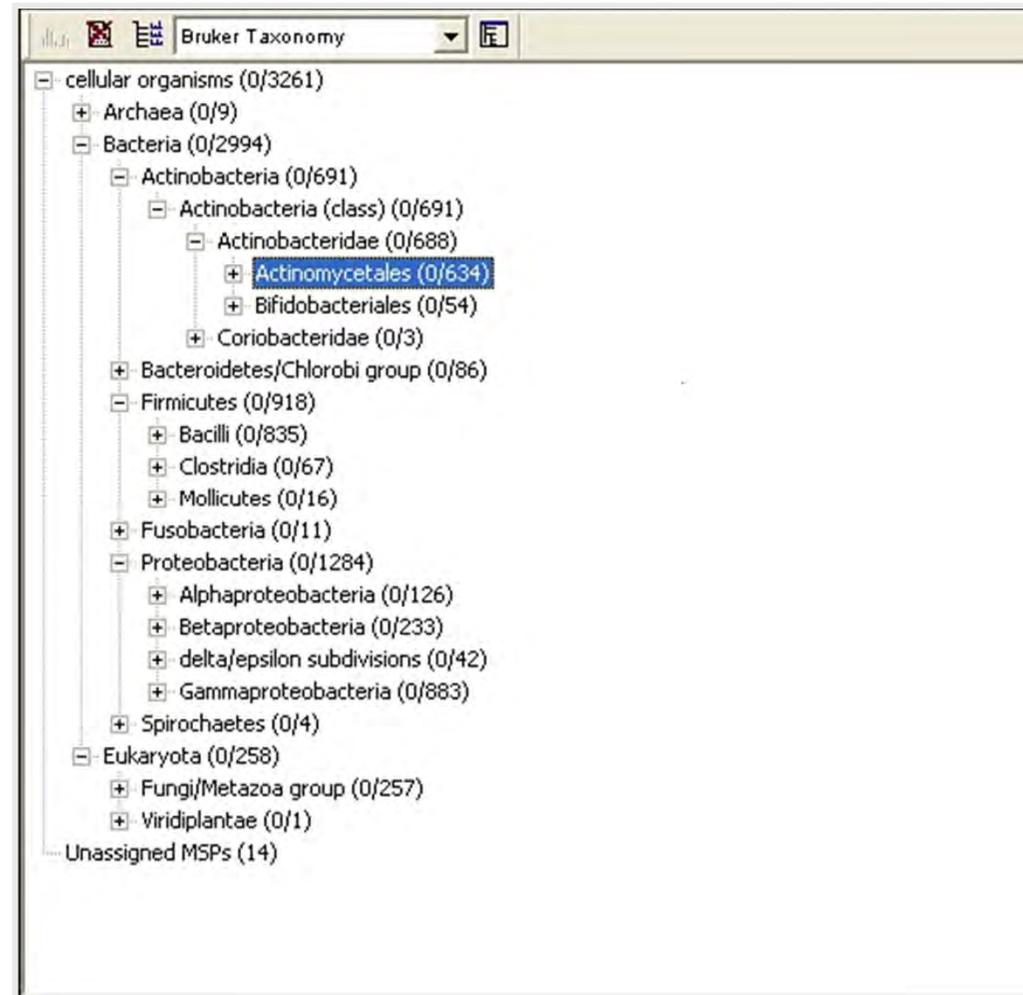


No.	Biochemical tests (API), 16S rDNA Seq.	MALDI Biotyper	
1	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	✓
2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	✓
3	<i>Leuconostoc citreum</i>	No reliable identification	—
4	<i>Kingella kingae</i>	<i>Kingella kingae</i>	✓
5	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	✓
6	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	✓
7	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	✓
8	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	✓
9	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>	✓
10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	✓
11	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	✓
12	<i>Ewingella americana</i>	<i>Ewingella americana</i>	✓
13	<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>	✓
14	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	✓
15	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	✓
16	<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	✓

Datenbank mit Referenzspektren

wird stetig erweitert

>3400 Einträge





Vergleich mit anderen Methoden

	PCR, Sequenzierung	MALDI-TOF MS
➤ Target	DNA	Proteine
➤ Zeit	6-24h	15 min
➤ Arbeitsaufwand	hoch	gering
➤ Unterscheidung nah verwandter Spezies	ja / z.T.	z.T.
➤ Mischkulturen	ja	nein



Derzeitige Probleme...

- ◆ keine Datenbank für Lebensmittelproben
 - ✓ Kooperation Institut Kirchhoff und LGL-Oberschleißheim
- ◆ Etablierung von Extraktionsmethoden notwendig
- ◆ keine Mischkulturen
- ◆ keine Unterscheidung *E. coli* und Shigellen
- ◆ Problem Selektivnährmedien
- ◆ „schwierige“ Gattungen:
 - ⇒ Clostridien (Sporenbildner)
 - ⇒ Streptococcen und Enterococcen
 - ⇒ Pseudomonaden



Kooperation IKB

mit der Gruppe

**Forschung & Entwicklung
Molekularbiologie**

von Dr. Ingrid Huber / Dr. Ulrich Busch

**des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und
Lebensmittelsicherheit (LGL)**

zur Erstellung einer

Datenbank für Lebensmittelproben!



Dr. Erhard Kirchhoff
Institut Kirchhoff Berlin GmbH



Dr. Ulrich Busch
Bayerisches Landesamt für Gesundheit
und Lebensmittelsicherheit. (LGL),
Oberschleißheim