Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg

Einsatz der MALDI-TOF MS bei der Untersuchung von Speiseinsekten im Untersuchungsamt

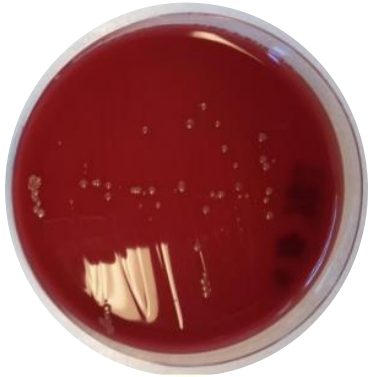
Tomke Marie Asendorf

Übersicht

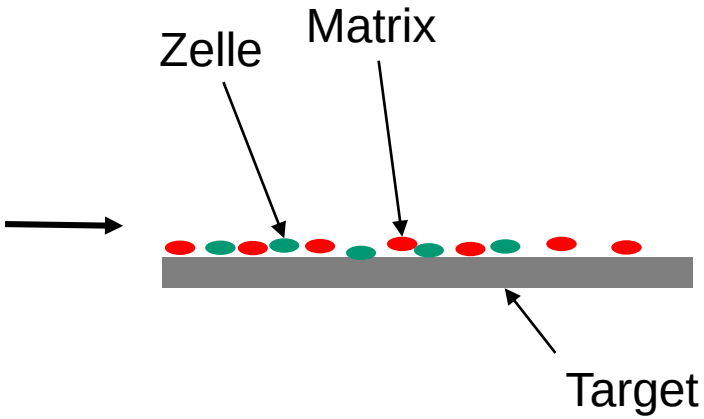
- Funktionsweise MALDI-ToF MS
- Insektenartbestimmung
- Mikrobiologische Untersuchung
- Sequenzanalyse zur Datenbankerweiterung
- Toxinnachweis

Funktionsweise MALDI-ToF MS

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry



α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure
(HCCA)



Funktionsweise MALDI-ToF MS

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry

Target E-Feld feldfreies Detektor Massenspektrum

Matrix

Flugrohr

Zelle

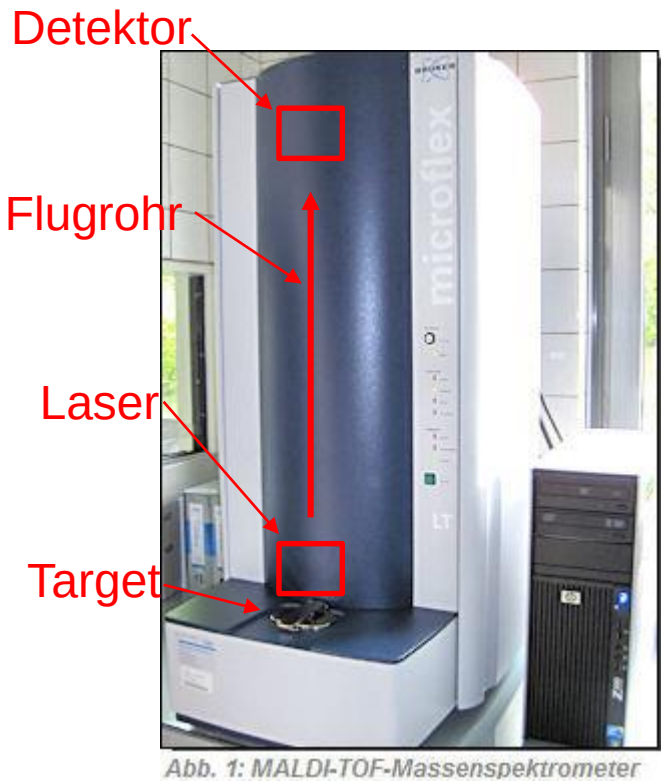


Abb. 1: MALDI-TOF-Massenspektrometer

Ionenquelle

Insekten Internetprojekt

- Durchführung: Ende 2020
- Untersuchungsmaterial:
  - ganze Insekten
  - Mehle aus ganzen Insekten
- Probenanzahl: 18
- Herkunft: Online-Händler aus
  - Deutschland (14)
  - Ausland
    - England (1)
    - Österreich (1)
    - Vereinigte Arabische Emirate (2)

Bild: CVUA Freiburg

Insektenartbestimmung

Extraktion → **Messung** → **Datenbankabgleich Ergebnis**

1

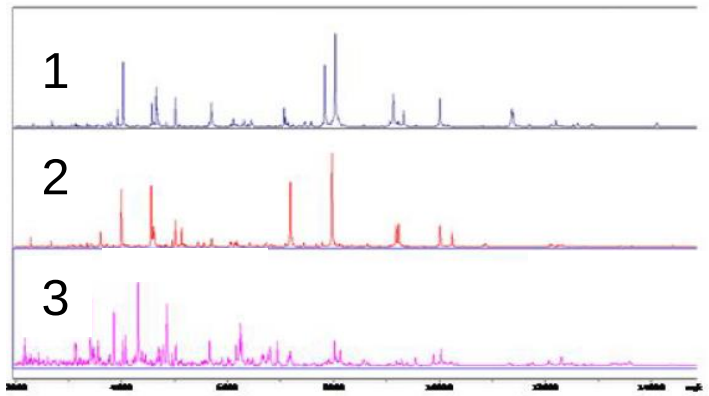
2

3

↓

Ameisensäure-Extraktion

Abb. 1: MALDI-TOF-Massenspektrometer



↓

1 Riesenmehlwurm

2 Mehlwurm

3 Buffalowurm

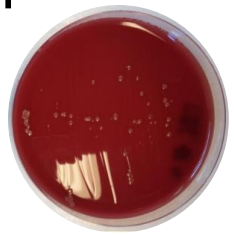
Bilder: CVUA Freiburg

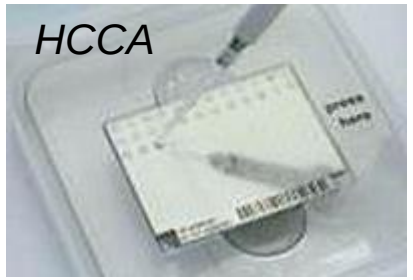
Mikrobiologische Untersuchungen

- hausinterner Prüfplan → versch. Selektivmedien
- 144 Mikroorganismen von Speiseinsekten isoliert
- Identifikation im MALDI-ToF MS

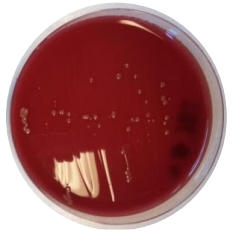
Mikrobiologische Untersuchungen
→ Auftragung

Direkttransfer

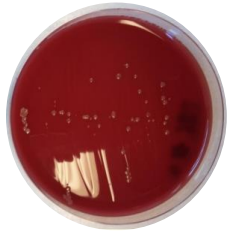




erweiterter Direkttransfer



Ameisensäure-Extraktion



Mikrobiologische Untersuchungen
→ Ergebnis

- 99 Proben eindeutig im MALDI-ToF MS identifizierbar
- 35 aus *Bacillus cereus* Gruppe
  – nicht weiter differenzierbar
- 39 nicht identifizierbar
- (6 Kulturen nicht mehr angewachsen oder unrein)

Bacillus cereus Gruppe

17 Spezies:

- *B. cereus (s.s.)*
- *B. paranthracis*
- *B. pacificus*
- *B. albus*
- *B. mobilis*
- *B. wiedmannii**
- *B. tropicus*
- *B. nitratreducens*
- *B. proteolyticus*
- *B. thuringiensis*
- *B. anthracis*
- *B. mycoides*
- *B. pseudomycoides*
- *B. cytotoxikus*
- *B. toyonensis*
- *B. paramycoides*
- *B. luti**

Sequenzanalyse zur Datenbankerweiterung

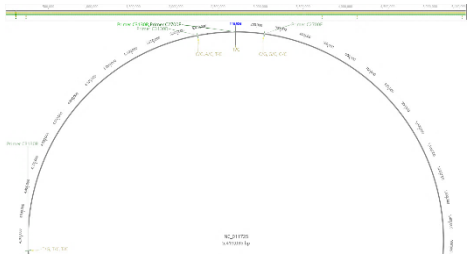
- Ziel:
  - *Bacillus cereus* Gruppe (besser) differenzieren
  - Identifizieren unbekannter Stämme

Sequenzanalyse zur Datenbankerweiterung

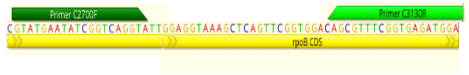
- rpoB Gen zur Speziesdifferenzierung von *B. cereus* (Carroll2019)
- entsprechende Primer auch zur Sequenzierung anderer Mikroorganismen verwendbar (Adékambi2009)

Sequenzanalyse zur Datenbankerweiterung

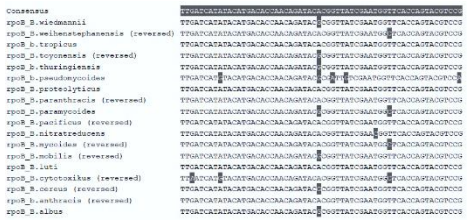
- Amplifizieren Primer einen Bereich, der zur Speziesdifferenzierung ausreicht?
- Überprüfung in Bioinformatik Software (Geneious)



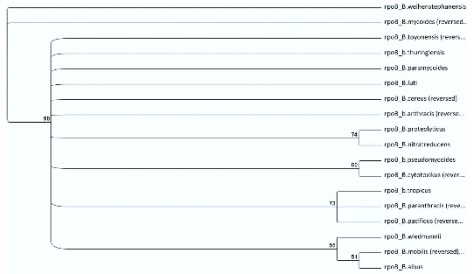
Gesamte Sequenz



Teilsequenz (Gen rpoB)



Vergleich der Teilsequenzen



Differenzierung der Spezies

Sequenzanalyse zur Datenbankerweiterung

- Identifizierung zuvor unbekannter Proben → Datenbankerweiterung → Anpassung an speiseinsektenspezifische Mikroorganismen

- Differenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe → paarweise nicht unterscheidbar
  - neues Gen (pycA Gen), mit neu erstellten Primern wird gerade untersucht

Toxinnachweis

- Pathogenitätsfaktoren der *Bacillus cereus* Gruppe:
  - diarrhöische Enterotoxine (NHE, HBL, Cytotoxin K)
  - emetisches Toxin Cereulid

Toxinnachweis
→ Cereulid

- zyklisches Peptid
- 1,2 kDa groß
- hitze- und säurestabil
- löst 0,5 – 6h nach Intoxikation Erbrechen aus
- Ionophore: diffundiert durch Zellmembran, bindet Kalium → zerstört elektrochemischen Gradienten

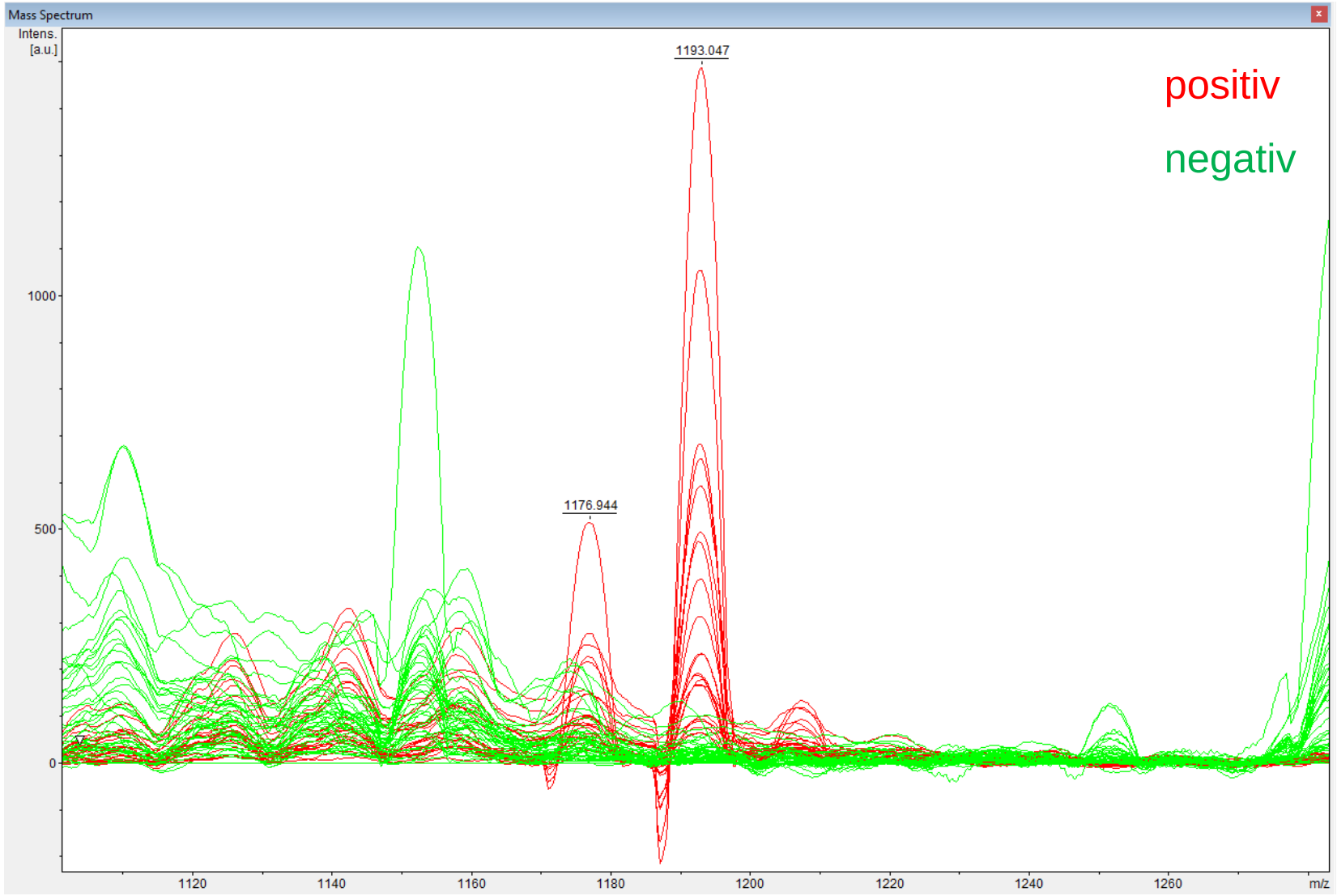
Toxinnachweis
→ Cereulid

Nachweismethoden:

- Bioassay mit Eberspermatozoen
- Realtime-PCR: *ces*-Gen
- LC-MS/MS

- MALDI-ToF MS

Toxinnachweis
→ erweiterter Direkttransfer

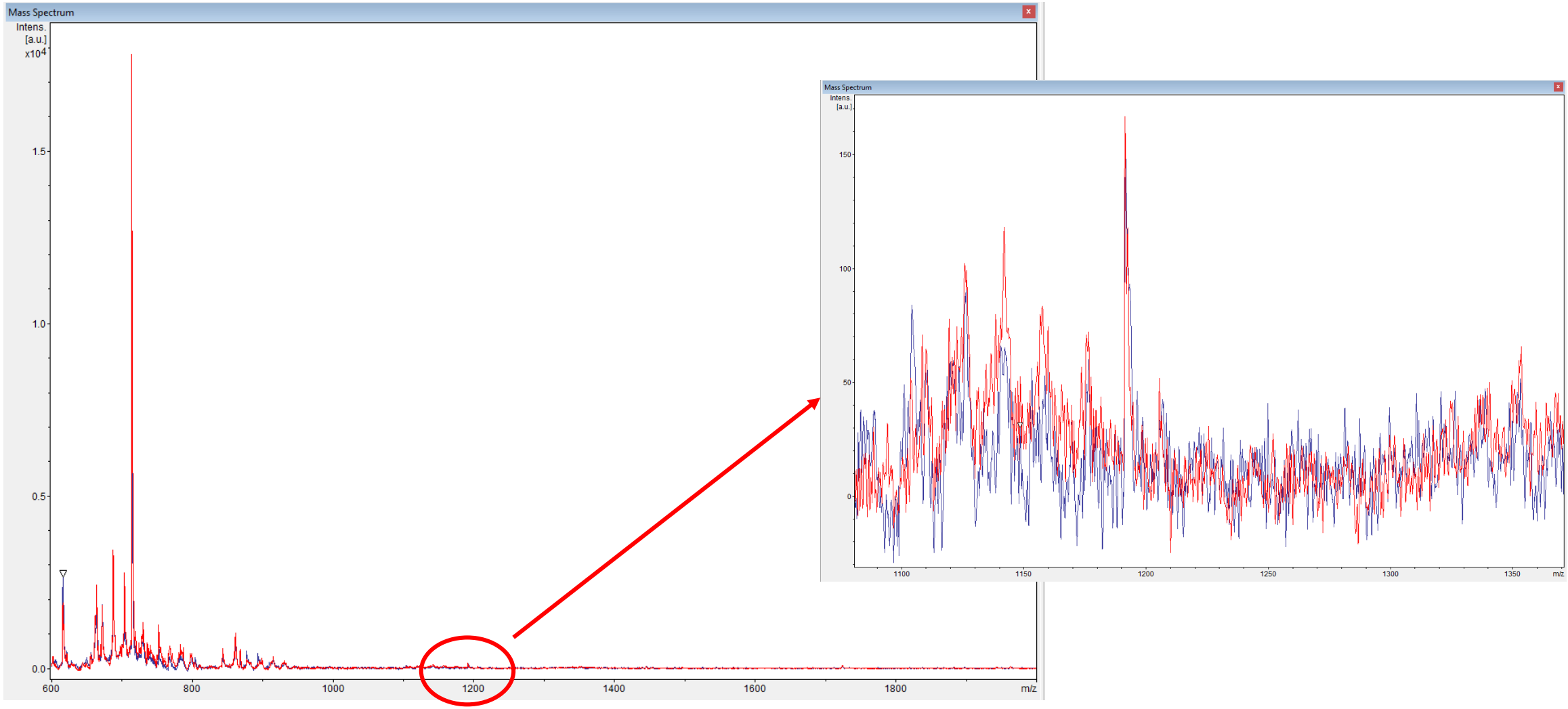


Cereulid-Peaks:

1191 ± 2 m/z

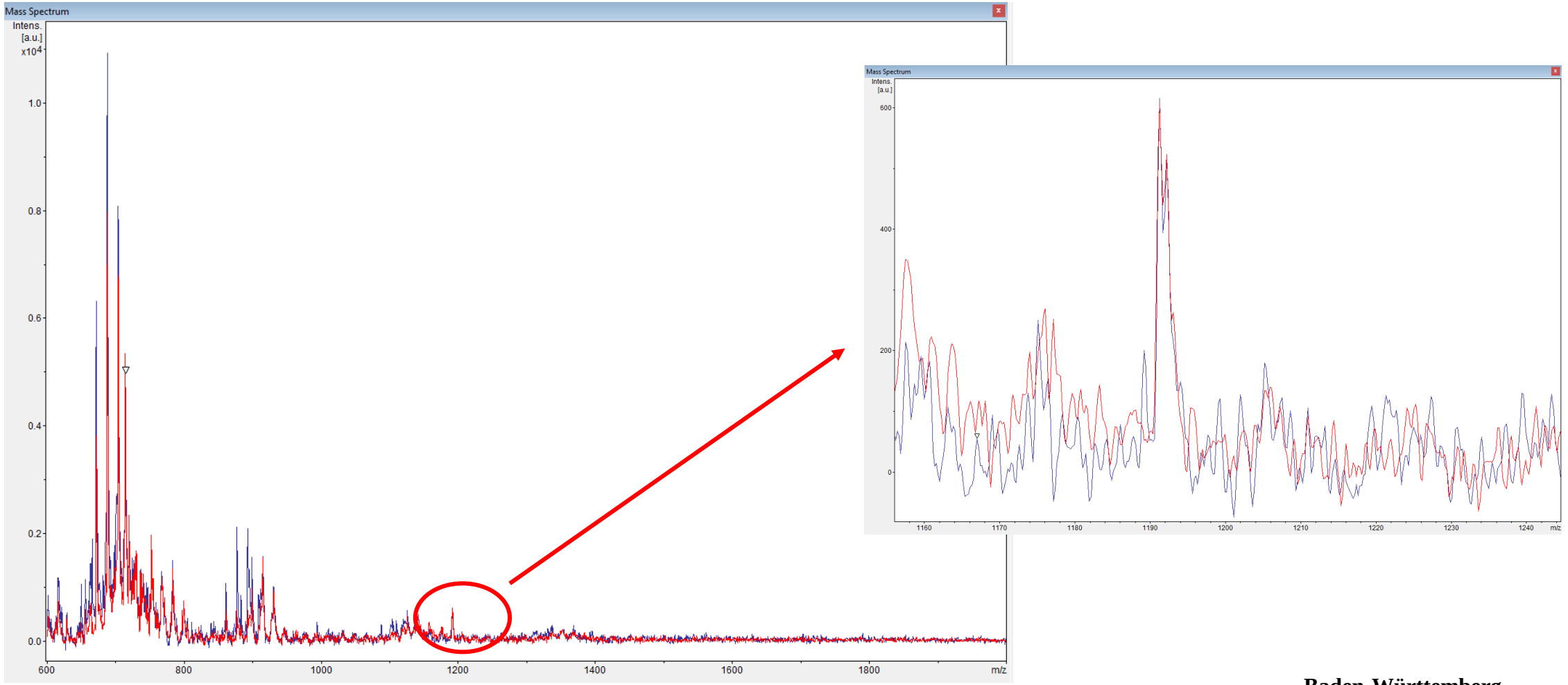
1175 ± 2 m/z

Toxinnachweis
→ Problem: Schwachproduzierer



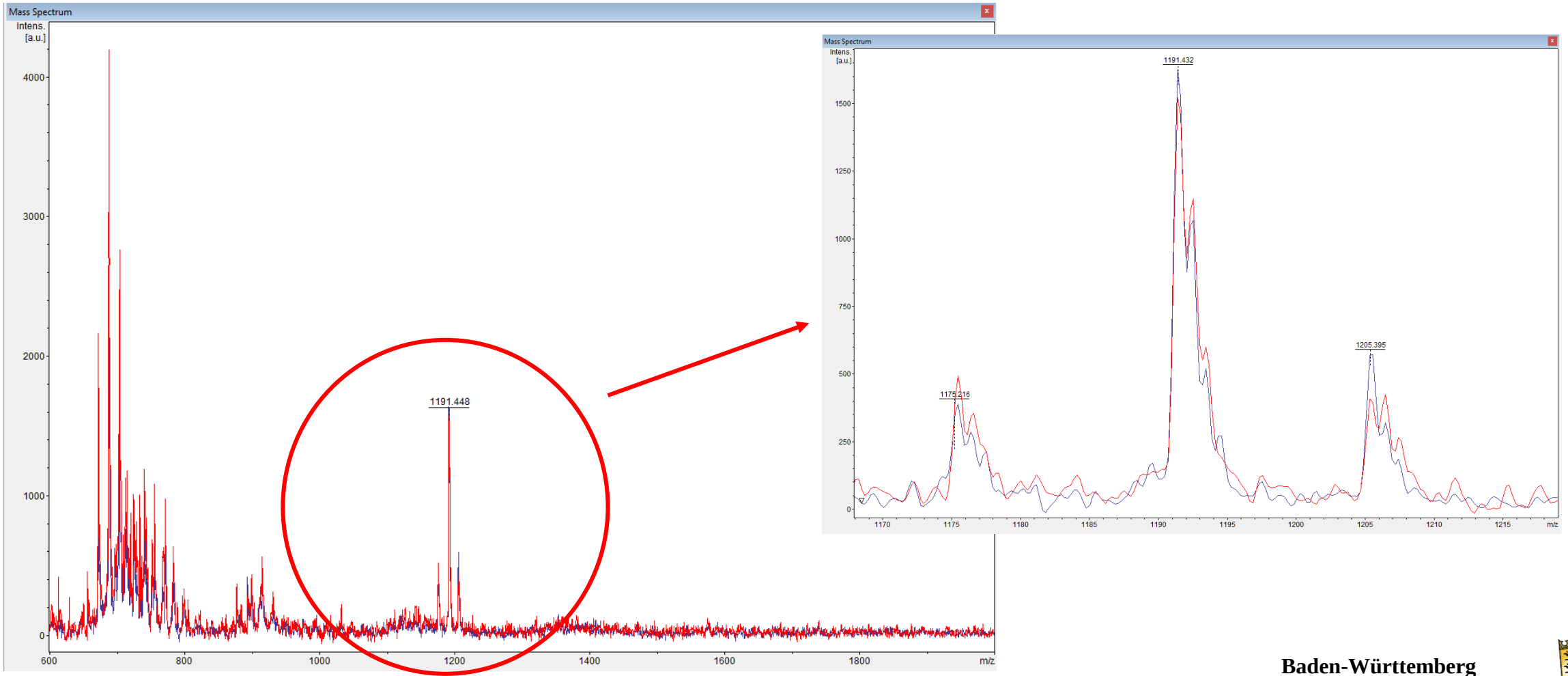
Toxinnachweis
→ Problem: Schwachproduzierer

Schritt 1: Anpassung der Messmethode



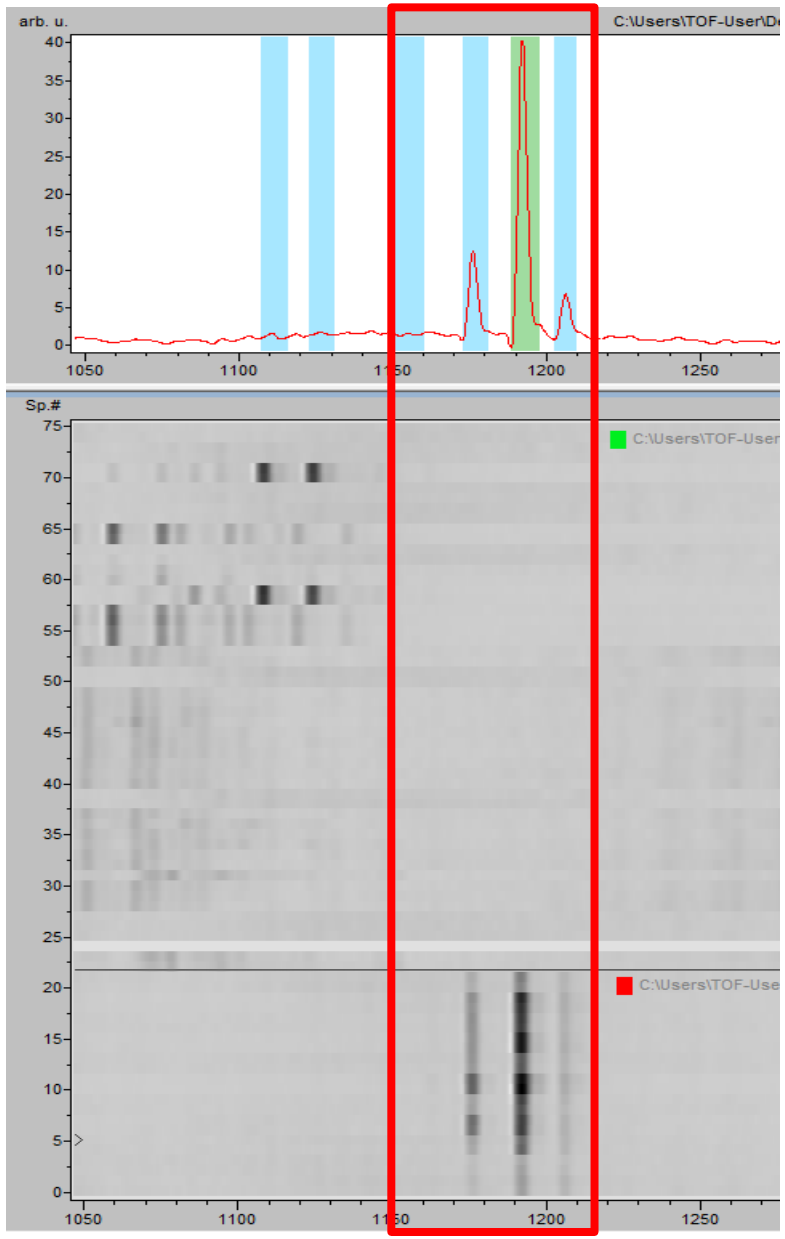
Toxinnachweis
→ Problem: Schwachproduzierer

Schritt 2: Neues Extraktionsprotokoll



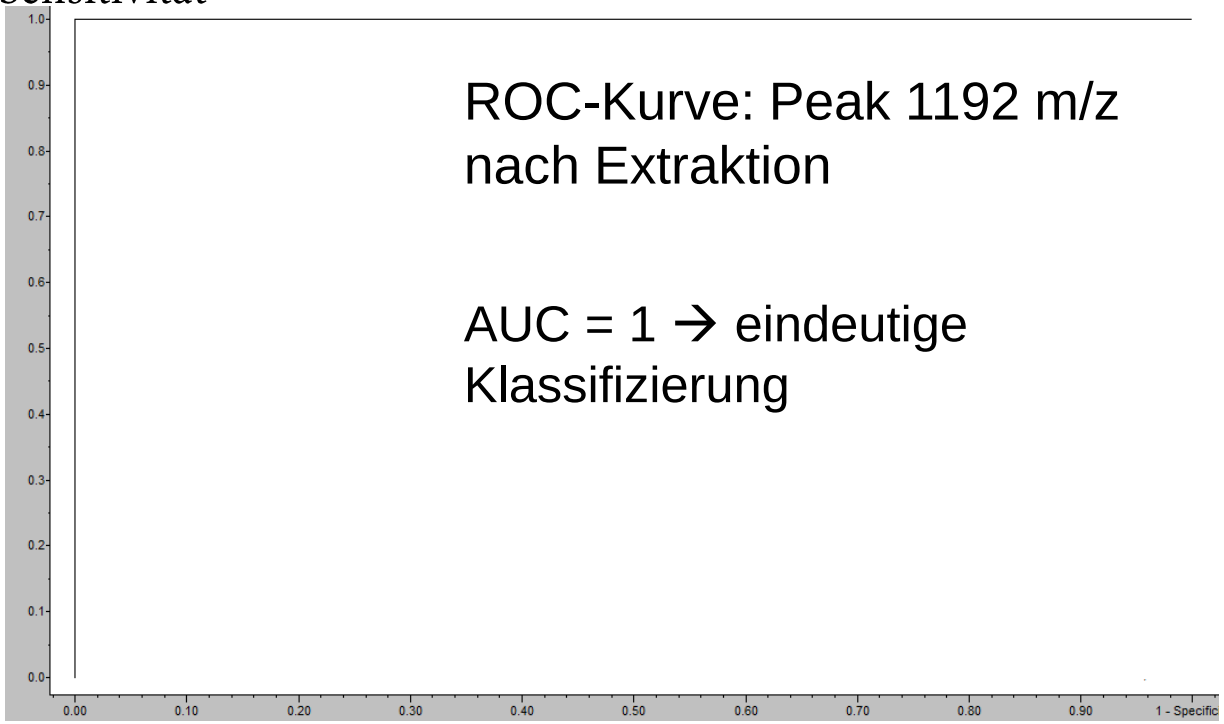
Toxinnachweis
→ ClinProTool 3.0

- Modellgenerierung mit bekannten Stämmen
- Test mit *Bacillus cereus* Isolaten aus Proben & CVUA Stuttgart
- 100% Übereinstimmung mit PCR-/ bzw. HPLC Ergebnissen



Toxinnachweis
→ ClinProTool 3.0

Sensitivität

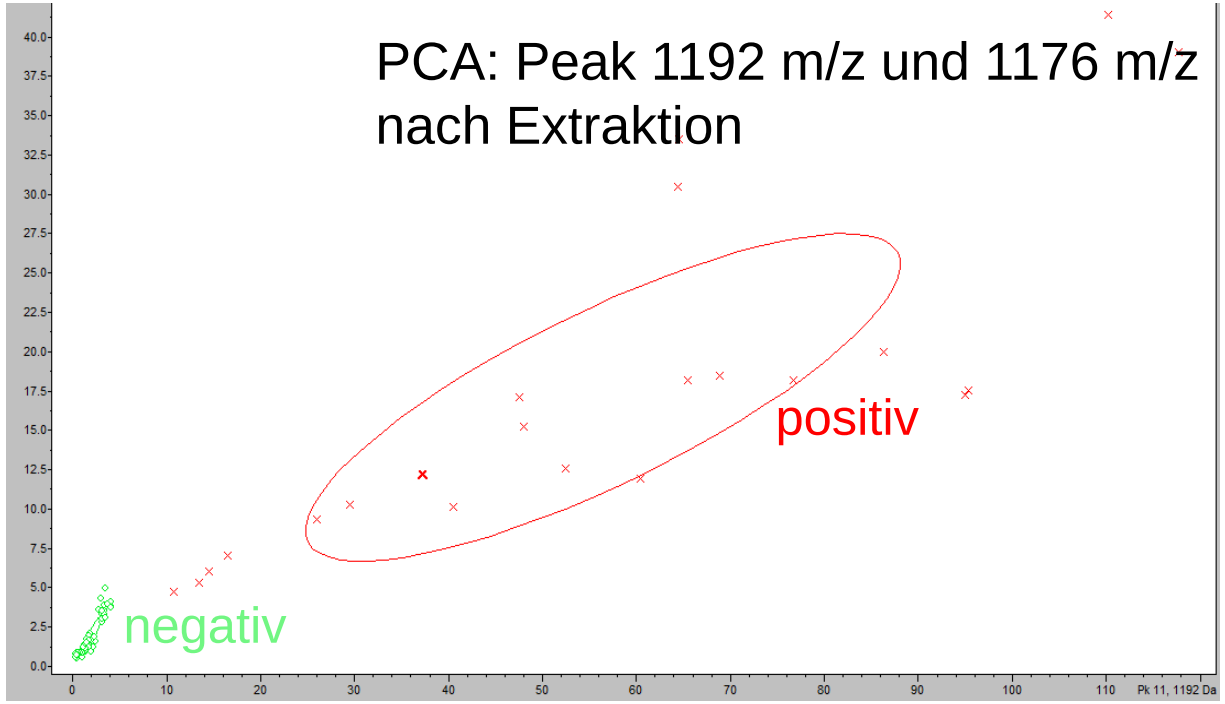


1-Spezifität

ROC-Kurve: Peak 1192 m/z nach Extraktion

AUC = 1 → eindeutige Klassifizierung

Peak 1176 m/z



Peak 1192 m/z

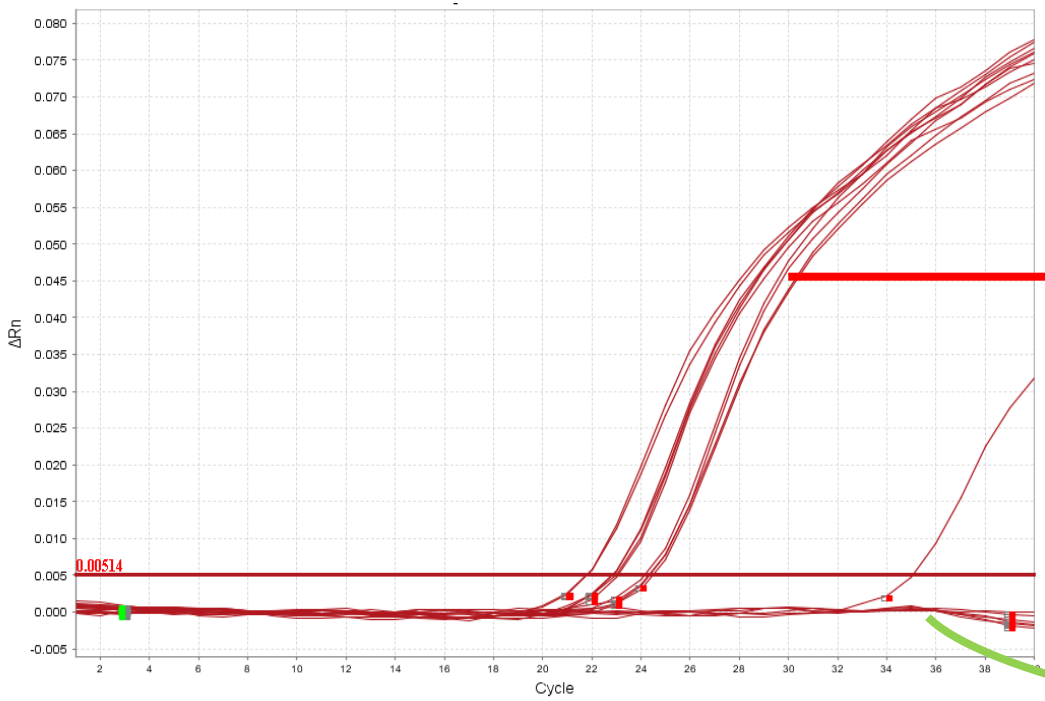
PCA: Peak 1192 m/z und 1176 m/z nach Extraktion

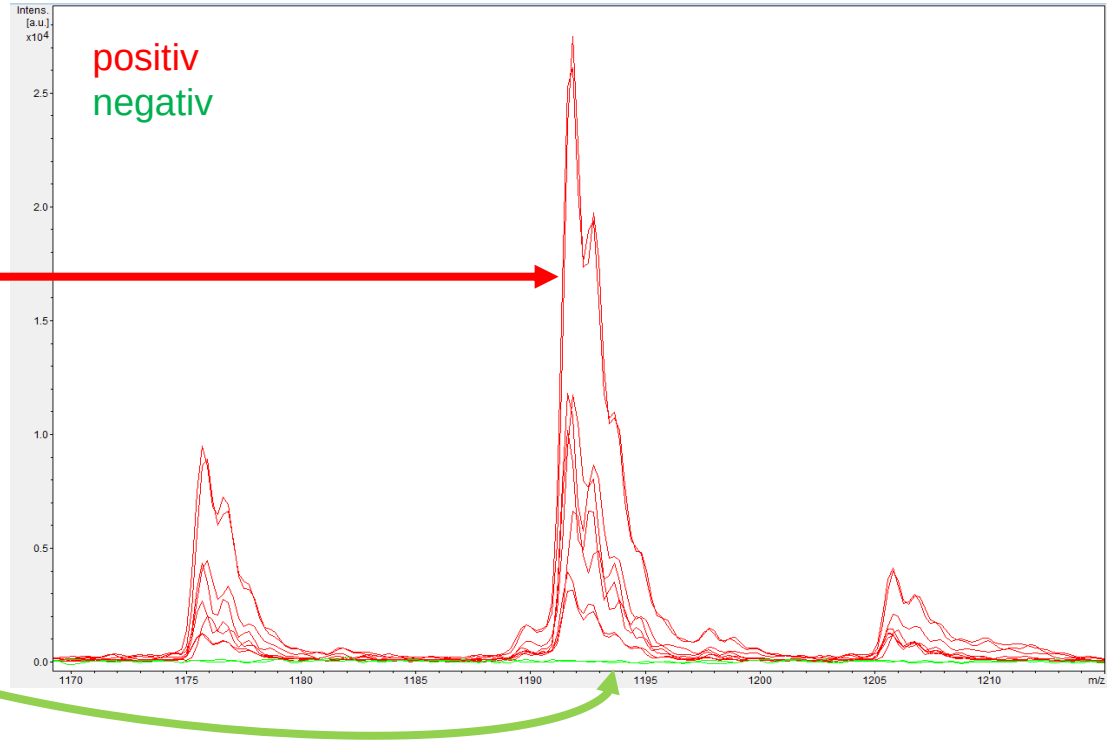
Toxinnachweis
→ Vorteile MALDI-ToF MS

- Schnell & einfach
- direkter Nachweis des Toxins (nicht nur Gen)
- Kopplung an ClinProTool → automatische Klassifizierung möglich

Toxinnachweis in Insekten aus Internetprojekt

- 4 *ces*-positive *Bacillus cereus* Isolate gefunden
- PCR und MALDI ToF MS Ergebnisse stimmen überein

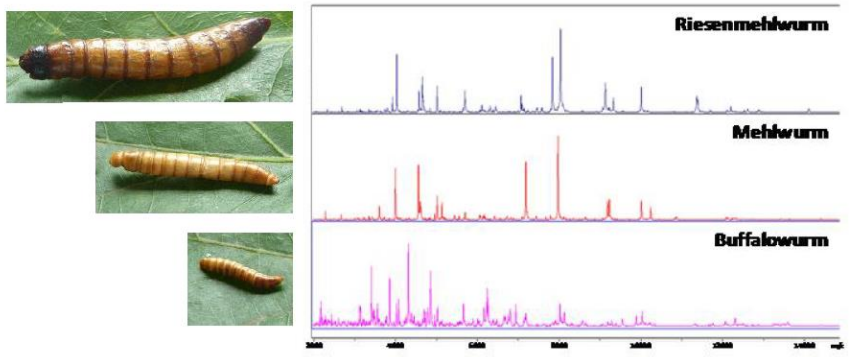


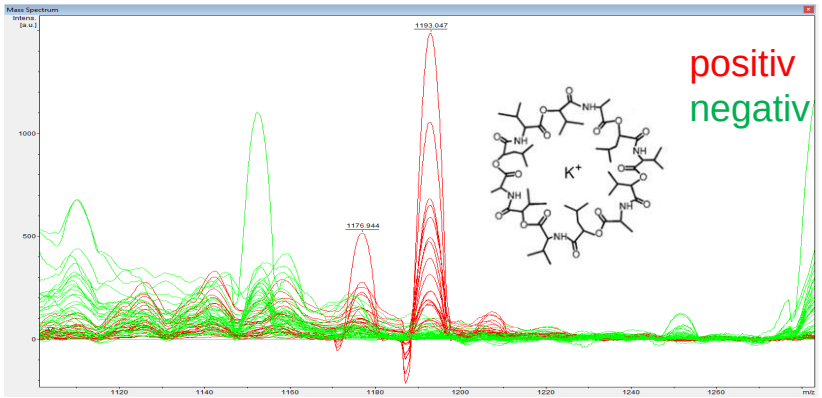


a) ces-PCR Amplifikationsplot

b) MALDI-ToF MS Spektrum

Einsatz der MALDI-TOF-MS bei der Untersuchung von Speiseinsekten im Untersuchungsamt





Kontakt:

Tomke.Asendorf@cvuafr.bwl.de bzw.

Tomke.Asendorf@web.de

07611502 - 2601