

**BIOTYPOWANIE MIKROORGANIZMÓW
ZA POMOCĄ SPEKTROMETRII MAS
ORAZ SPEKTROSKOPII NMR**

**BIOTYPING OF MICROORGANISMS USING MASS
SPECTROMETRY AND NMR SPECTROSCOPY**

Karolina Anna Mielko*, Piotr Młynarz

*Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska,
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
e-mail: karolina.mielko@pwr.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Rozróżnianie drobnoustrojów

2. Metabolomika

2.1. Techniki analityczne stosowane w metabolomice

3. Przykłady zastosowania metod MS i NMR do identyfikacji
i różnicowania drobnoustrojów

3.1. Badania proteomiczne

3.2. Badania metabolomiczne

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Karolina Anna Mielko – doktorantka Zakładu Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Od 2013 roku związana z Politechniką Wrocławską, gdzie w 2017 roku zdobyła tytuł magistra biotechnologii. Jej doktorat ma charakter interdyscyplinarny – równolegle prowadzi badania w Zakładzie Biotransformacji Uniwersytetu Wrocławskiego. Zainteresowania naukowe obejmują metabolomikę i mikrobiologię.



<https://orcid.org/0000-0002-4108-682X>

Dr hab. Piotr Młynarz, prof. Uczelni – doktorat w 2001 roku Uniwersytet Wrocławski Wydział Chemii, praca habilitacyjna 2012 rok Wydział Chemiczny Politechnika Wrocławska, związany z Zakładem Chemii Bioorganicznej w latach 2002-2019. Jego szerokie zainteresowania obejmują chemię supramolekularną i bioorganiczną, koordynacyjną, spektroskopię NMR oraz badanie metabolizmu organizmów żywych za pomocą analitycznych metod chemicznych i biochemicznych.



<https://orcid.org/0000-0002-8502-4022>

ABSTRACT

Typing microorganisms is a very important element of laboratory diagnostics. Appropriate recognition of the pathogen and determination of its sensitivity to the drugs used is necessary to start treatment. There are many types of microbial typing. The most popular division is genotypic and phenotypic typing (among which biotyping, antibiotic resistance analysis, and protein profile analysis are the most common) or phagotyping) [1, 2]. Recently, there has been a very rapid development of mass spectrometry techniques as a method for identifying microorganisms [3].

Mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) are methods that allow the comparison of metabolomic profiles of microorganisms. These are also methods commonly used in metabolomics. Metabolomics is a field of science dealing with the analysis of low-mass compounds characteristic of the studied material [4]. Therefore, the use of metabolomics in microbiology allows to identify and discriminate of microorganisms [5]. Recently, the analyzes also apply to metabolites. Many studies focus on the analysis of volatile organic compounds (VOCs) that allow the analysis of samples directly from the patient without the need for isolation of a single microorganism [6, 7]. Recent studies show many possibilities for the use of NMR spectroscopy. The results of the analysis show that it is also a method that allows the identification and differentiation of strains of microorganisms. Thanks to this method it is also possible to determine the origin of the strain or to indicate its resistance to antibiotics. [10, 11]. Improvement of research algorithms used in metabolomics for biotyping microorganisms may in the future allow for the creation of a fast, accurate and cheap way to identify microorganisms.

Proteomic tests using the MS method are very popular, in which protein profiles of strains are analyzed and compared. These studies are mainly conducted using MALDI-TOF MS mass spectrometry. This technique is now quite widely used in microbiological diagnostics [10]. The research confirms the high discrimination power of this method [11].

Keywords: microbiology, biotyping, NMR, MS, metabolomics

Słowa kluczowe: mikrobiologia, biotypowanie, NMR, MS, metabolomika

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

API	– (ang. <i>Analytical Profile Index</i>)
ESBL	– beta-laktamazy o poszerzonym spektrum działania (ang. <i>Extended-Spectrum Beta-Lactamases</i>)
MALDI-TOF	– (ang. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>)
MLEE	– (ang. <i>Multi-Locus Enzyme Electrophoresis</i>)
MS	– spektrometria mas (ang. <i>Mass Spectrometry</i>)
NMR	– spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i>)
VOC	– lotne związki organiczne (ang. <i>Volatile Organic Compounds</i>)

WPROWADZENIE

Określanie typu drobnoustrojów jest podstawową metodą do identyfikacji szczepów, ustalenia oporności mikroorganizmów na antybiotyki czy środki antyseptyczne i dezynfekujące. Może być kluczowym elementem podczas ustalania przyczyny i wykrywania zakażeń szpitalnych, a także epidemii. Prawidłowa identyfikacja mikroorganizmów jest wyzwaniem współczesnej diagnostyki medycznej oraz mikrobiologii.

Różnorodność metod typowania mikroorganizmów jest bardzo duża [12]. Zawsze należy pamiętać, że testy wykonywane standardowo nie muszą być wystarczające do określenia rodzaju szczepu [2, 13]. Bardzo szybkie mutacje drobnoustrojów, przystosowywanie się do zmiennego środowiska, zmiany ich profili białkowych, czy nabywanie oporności na antybiotyki wymagają stosowania coraz bardziej skutecznych testów diagnostycznych i metod analitycznych, które powinny umożliwić szybkie uzyskanie wyników. Bardzo obiecujące wydają się testy typowania drobnoustrojów za pomocą technik analitycznych używanych w metabolomice i proteomice [14, 15].

1. ROZRÓŻNIANIE DROBNOUSTROJÓW

Współcześnie istnieje wiele metod typowania mikroorganizmów [13, 15]. Do podstawowych metod typowania należą metody fenotypowe i metody genotypowe. Wszystkie używane techniki różnią się od siebie możliwościami rozróżniania i prawidłowością klasyfikowania szczepów. Dodatkowe różnice wynikają ze złożoności metody, w tym stopnia jej skomplikowania oraz kosztocłonności analizy [17]. Najbardziej użyteczne metody to te, które mają wysoką możliwość dyskryminacji, są powtarzalne i wystandaryzowane (co oznacza, że mogą być wykorzystywane w niezależnych laboratoriach) [18].

Metody fenotypowe, jak nazwa wskazuje klasyfikują drobnoustroje na podstawie ich cech fenotypowych. Najbardziej popularne to biotypowanie, ocena lekowrażliwości, typowanie fagowe, a także metody analizy białek wykorzystujące metody elektroforetyczne oraz spektrometrię mas.

Biotypowanie to klasyfikacja drobnoustroju na podstawie cech biochemicznych oraz rodzaju wzrostu kolonii bakteryjnej. Do tego rodzaju badań można wykorzystać testy manualne lub automatyczne. Przykładem bardzo powszechnego testu manualnego jest test API (ang. *Analytical Profile Index*), który polega na określeniu zdolności przemian określonych związków chemicznych [19]. Oba rodzaje testów mają za zadanie określenie cech biochemicznych mikroorganizmu. Ta metoda klasyfikacji jest bardzo powszechna ze względu na prostotę wykonania oraz niskie koszty, niestety posiada niską zdolność dyskryminacji [20].

Ocena lekowrażliwości mikroorganizmów polega najczęściej na monitorowaniu wzrostu bakterii w obecności antybiotyków. Powszechną metodą jest wykorzystanie antybiogramów. Użycie tego testu pozwala na zakwalifikowanie szczepu bakteryjnego na podstawie identycznej (lub zbliżonej) oporności na antybiotyki. Testy te są wykonywane rutynowo, są określane jako pierwszy test wykazujący zmiany w mikroorganizmach. Mogą być też użyteczne przy pierwszych badaniach, które wykazują nabywanie oporności przez bakterie [21].

Typowanie fagowe to badanie wykorzystujące bakteriofagi, które mają zdolność lizy bakterii. W tym teście podział szczepów bakterii polega na identyfikacji, ze względu na uleganie lizie wywołanej przez specyficzne bakteriofagi [22]. Warto zaznaczyć, że do badań używa się sprawdzonych zestawów bakteriofagów, które nie wymagają użycia specjalistycznego sprzętu, co czyni je tanimi [23].

Metody analizy białek stworzone początkowo wykorzystywały metody elektroforetyczne. Najbardziej popularną metodą jest MLEE (ang. *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis*) [24]. Różnicowanie odbywa się na podstawie ruchliwości elektroforetycznej enzymów komórkowych drobnoustrojów, a uzyskane wyniki są charakterystyczne dla danego szczepu [25]. Siła dyskryminacji tej metody uznawana jest za stosunkowo dużą, jednak należy pamiętać, że niektóre enzymy mogą mieć identyczną ruchliwość elektroforetyczną, co utrudnia charakterystykę szczepu [26].

Bardziej dokładną metodą analizy białek jest spektrometria mas sprzężona z chromatografią gazową lub cieczową (GC-MS lub LC-MS). Obecnie jest to powszechna metoda typowania drobnoustrojów. Najczęściej wykorzystuje się instrumenty MALDI-TOF MS (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*). Zastosowanie tej metody pozwala na szybkie i tanie analizowanie wielu tysięcy peptydów zawartych w komórkach. Jest to metoda posiadająca bardzo duży potencjał różnicujący. Wynika to z faktu, że każdy szczep posiada swój własny profil białkowy i metaboliczny [5, 21].

Ostatnia wymieniona cecha mikroorganizmów pozwala również na wykorzystanie do identyfikacji mikroorganizmów metody NMR (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*), która bazując na odpowiedniej metodzie ekstrakcji, posiada możliwość porównywania profili metabolicznych drobnoustrojów i klasyfikowania ich do określonych grup. Metoda ta nie jest powszechnie przyjętą metodą typowania mikroorganizmów, jednak są prowadzone badania, które potwierdzają jej zastosowanie również w mikrobiologii [27, 28]. Rozwinięcie technologii związanej z zastosowaniem spektroskopii NMR może umożliwić uzyskanie szybkiego, taniego, powtarzalnego testu, z dużą siłą dyskryminacji [30].

Metody fenotypowe identyfikacji mikroorganizmów są dobre, jednak warto pamiętać, że fenotyp zmienia się stosunkowo szybko w odpowiedzi na zmiany środowiskowe, dlatego może zdarzyć się sytuacja, że organizmy identyczne genetycznie, mają inny fenotyp i są rozpoznawane jako różne [1].

Naprzeciw tym problemom wychodzą metody genotypowe identyfikacji drobnoustrojów, które analizując genom pozwalają na typowanie mikroorganizmów. Metody genotypowe dzieli się na metody nie wykorzystujące sekwencjonowania genów oraz te które odczytują kolejność nukleotydów [1]. Metody te posiadają większą siłę dyskryminacji, jednak w porównaniu do metod fenotypowych są dużo bardziej skomplikowane i wymagają odpowiedniego sprzętu, w związku z tym są droższe [31].

2. METABOLOMIKA

Metabolomika wraz z genomiką, transkryptomiką i proteomiką należy do podstaw biologii systemowej. Jest to nauka zajmująca się analizą niskomasowych związków (MW <1500 Da) występujących w komórkach, tkankach czy płynach fizjologicznych. Wszystkie niskocząsteczkowe związki wytwarzane w komórce nazywa się metabolitami [4]. Badania metabolomiczne mają na celu zbadanie i porównanie próbek w oparciu o ich profil metaboliczny, czyli scharakteryzowaną zawartość związków chemicznych [32]. Podstawowy podział rodzajów badań w metabolomice to analiza celowana i analiza niecelowana. Pierwszy rodzaj polega na badaniu konkretnego metabolitu lub sprecyzowanej grupy związków posiadających podobne właściwości fizykochemiczne (np. lipidy czy węglowodany). Analiza celowana jest wykorzystywana również do analiz metabolitów znakowanych izotopem węgla ^{13}C , co pozwala na śledzenie zmian w konkretnych szlakach metabolicznych. Metoda ta nazywana jest analizą strumieni metabolomicznych (ang. *flux analysis*). W przypadku analizy niecelowanej nie są istotne poszczególne związki tylko całościowy profil wszystkich związków znajdujących się w próbce. W tym przypadku nie są obserwowane pojedyncze metabolity, ale cały profil metaboliczny grupy [33]. Obecnie badania polegają na oznaczeniach jakościowych zmian zachodzących w metabolomie poprzez założenie, że istnieją różnice w analizowanych grupach próbek. Pełen zestaw związków obecnych w próbce pochodzącej z ekstraktu komórkowego jest uznawany za reprezentacyjny dla danej komórki [34]. Warto zauważyć, że wraz z rozwojem badań powstają nowe definicje i rodzaje analiz metabolomicznych. Innym podziałem analiz metabolomicznych jest podział na rodzaj pochodzenia badanych metabolitów. Może być to tzw. „metabolomiczny odcisk palca” (ang. *metabolomic fingerprinting*) polegający na analizie metabolitów

wewnątrzkomórkowych oraz „metabolomiczny odcisk stopy” (ang. *metabolomic footprinting*) w którym analizie poddaje się związki uwalniane oraz pobierane poza komórkę. Jednym z podstawowych celów badań metabolomicznych jest porównywanie określonych próbek pomiędzy sobą. Ten rodzaj analiz może być wykorzystany do rozróżniania gatunków bakteryjnych, czy określania ich oporności na antybiotyki, a także obserwowania zmian metabolicznych jakie zachodzą wewnątrz mikroorganizmu [35]. Warto zauważyć, że nie ma określonych algorytmów postępowania dotyczących rodzaju wykonywanych analiz, chociaż wielokrotnie były podejmowane próby ich standaryzacji [36]. Różnorodność możliwości porównań jest bardzo duża, wiele z nich obejmuje porównanie pomiędzy szczepami różnego pochodzenia, analizy metabolomu, czy analizy zmian metabolicznych w czasie lub w zależności od metody hodowli [29, 36, 37].

2.1. TECHNIKI ANALITYCZNE STOSOWANE W METABOLOMICE

W badaniach metabolomicznych jako techniki analityczne stosuje się spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) oraz spektrometrię mas (MS) (ang. *Mass Spectrometry*).

Obie te techniki powinny być używane komplementarnie ze względu na różne metody i zakresy pomiarowe. Bardzo ważnym aspektem jest odpowiednie zaplanowanie eksperymentu w którym należy wziąć pod uwagę jaki jest jego cel oraz rezultat, który powinien być osiągnięty.

Ogólny schemat przeprowadzenia identyfikacji mikroorganizmu przebiega za każdym razem podobnie. Pierwszy etap to hodowla mikrobiologiczna, a następnie wykonuje się pomiary MS lub NMR. Po analizie uzyskanych danych tworzony jest profil metabolomiczny danego szczepu bakteryjnego, który po porównaniu z bazą danych pozwala na identyfikację drobnoustroju [39]. Jeśli celem badań jest rozróżnienie mikroorganizmów możliwe jest też porównanie profili metabolomicznych pomiędzy sobą [9, 27, 28].

Schemat eksperymentu przedstawiono na Rysunku 1.

Dla każdego eksperymentu bardzo ważna jest standaryzacja (zachowanie takich samych warunków przeprowadzania hodowli, ekstrakcji i pomiarów). Dodatkowo do obróbki i analizy danych niezbędne jest zastosowanie metod bioinformatycznych, statystycznych i chemometrycznych [39].



Rysunek 1. Schemat identyfikacji (rozróżniania) mikroorganizmu przy użyciu technik NMR lub MS [39]
Figure 1. Scheme of microorganism identification (differentiation) using NMR or MS techniques [39]

3. PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA METOD MS i NMR DO IDENTYFIKACJI I RÓŻNICOWANIA DROBNOUSTROJÓW

Współcześnie bardzo wiele grup zajmuje się identyfikacją mikroorganizmów za pomocą technik NMR, LC-MS i GC-MS. Wiele badań oprócz identyfikacji mikroorganizmów skupia się na ich porównywaniu i poszukiwaniu cech wspólnych lub różnic w profilach proteomicznych i metabolomicznych.

3.1. BADANIA PROTEOMICZNE

Najbardziej powszechną techniką stosowaną rutynowo do identyfikacji i rozróżniania mikroorganizmów jest metoda MALDI/TOF – MS [41]. Technika ta jest metodą pomiarową stosowaną w badaniach proteomicznych i metabolomicznych, jest uznawana za jedną z najbardziej dokładnych [6, 41]. Wiele badań ma na celu potwierdzenie zasadności stosowania tej techniki. Kilka przykładów opisano poniżej.

Chalupova i wsp. przeprowadzili analizy różnych gatunków grzybów za pomocą MALDI-TOF MS (gatunki *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* oraz fitopatogenów i drożdży). Analiza zarodników albo ekstraktów białek powierzchniowych pozwoliła pomyślnie zidentyfikować badane mikroorganizmy. Wykazano, że obecność pików w regionie m/z wynoszącym 1000-20000 pozwoliło na stworzenie profili spektrometrycznych peptydów/białek. W rejonie tym może pojawić się unikalny zestaw sygnałów pochodzących od

zjonizowanych cząsteczek, które jako biomarkery, ułatwiają różnicowanie próbek na poziomie rodzaju, gatunku lub szczepu. Taką możliwość stwarzają odpowiednie programy do przetwarzania i porównywania otrzymanych danych z danymi pochodzącymi od szczepów referencyjnych, które powinny być tworzone w tych samych znormalizowanych warunkach eksperymentalnych [11].

Baudler i wsp. ocenili przydatność techniki MALDI-TOF MS pod kątem przydatności do identyfikacji gatunków *Mycoplasma* pochodzących od ptaków. Wykorzystano szczepy izolowane od ptaków i porównano je ze szczepami referencyjnymi. Analiza profili białkowych wykazała, że spośród 117 szczepów 112 zostało zidentyfikowanych poprawnie z 96% dokładnością identyfikacji szczepu. Wyniki pokazują, że wykorzystana technika jest obiecującym narzędziem i może śmiało konkurować z konwencjonalnymi metodami fenotypowymi [43].

Li i wsp. sprawdzili możliwość identyfikacji bakterii beztlenowych przy pomocy techniki MALDI-TOF MS. Wykorzystanie analiz statystycznych pozwoliło na porównanie różnych testów i obliczenie dokładności identyfikacji. Uzyskane wyniki pokazują, że w zależności od rodzaju mikroorganizmu identyfikacja może być mniej lub bardziej dokładna. Dla rodzajów *Lactobacillus*, *Parabacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Prevotella*, *Veillonella* i *Peptostreptococcus* dokładność identyfikacji jest wyższa niż 90%. Jednak największą dokładność uzyskano dla rodzaju *Bacterioides*, która wynosiła do 97%. Badania potwierdzają, że wyniki identyfikacji patogenów klinicznych przy użyciu metody MALDI-TOF MS są zadowalające [44].

Berrazeg i wsp. jako pierwsi wykorzystali MALDI-TOF MS do analizy i identyfikacji klinicznych izolatów *K. pneumoniae*. W ciągu trzech lat zebrano 535 szczepów ze szpitali we Francji i Algierii. Sprawdzono również antybiotykoodporność i określono fenotyp. Wyniki ujawniły część profili oporności na antybiotyki. Dodatkowo szczepy izolowane w algierskich szpitalach były związane z zakażeniami układu oddechowego i fenotypem ESBL (ang. *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*), a szczepy izolowane we Francji były związane z infekcjami układu moczowego i fenotypem dzikim. Badania potwierdzają, że MALDI-TOF MS może służyć nie tylko do identyfikacji, ale również różnicowania szczepów zgodnie z fenotypem i rozkładem epidemiologicznym [45].

3.2. BADANIA METABOLOMICZNE

Identyfikacja drobnoustrojów może odbywać się za pomocą badań genomu lub proteomu, ale również metabolomu. Jak pokazują wyniki badań, to właśnie analizy metabolomiczne pozwalają na identyfikację szczepów bez hodowli, a nawet bez izolacji mikroorganizmu od pacjenta [39]. Przykłady analiz lotnych

związków organicznych przy pomocy metody GC-MS oraz LC-MS, a także przykłady wykorzystania techniki NMR do identyfikacji mikroorganizmów opisano poniżej.

Wiele badań dotyczących identyfikacji szczepów bakteryjnych za pomocą techniki MS opiera się na badaniu profili lotnych związków organicznych VOC (ang. *Volatile organic compounds*). Identyfikacja szczepu bakteryjnego na podstawie profilu lotnych metabolitów byłaby bardzo przydatna m.in. w diagnostyce infekcji płuc.

Lawal i współpracownicy porównali VOC dla następujących gatunków bakterii: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Porównanie przy użyciu techniki GC-MS było wystarczające do identyfikacji gatunków. Jednak profile zostały znacznie zmienione według rodzaju podłoża uprawowego [6].

Podobny eksperyment został przeprowadzony przez Neerinx i in. W celu porównania lotnych związków organicznych metodą GC-MS porównano dwa szczepy: bakterii i grzybów (*P. aeruginosa* i *A. fumigatus*) oraz ich wspólną hodowlę. Analiza pozwoliła zidentyfikować kombinacje VOC związanych z każdą grupą bakteryjną i ich współhodowlą. Dla każdego punktu czasowego znaleziono określone kombinacje biomarkerów [7].

Nizio i in. przeprowadzili profilowanie lotnych związków organicznych przy użyciu GC × GC-TOF MS w celu różnicowania bakterii związanych z infekcjami płuc (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Burkholderia cenocepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Streptococcus milleri*). Próbkę analizowano w dwóch przedziałach czasowych - krótkookresowym (od 2 do 5 dni) i długoterminowym (od 48 do 50 dni). Ponadto bakterie hodowano w dwóch różnych warunkach fazy wzrostu (stacjonarna i logarytmiczna). Analiza wielowymiarowa wykazała, że profil lotnych związków organicznych był wystarczający do różnicowania rodzajów bakterii. Jednak na profile miały wpływ warunki przechowywania próbek i faza wzrostu bakterii [46].

Hewelt-Belka i wsp. wykorzystali metodę LC-MS do porównania profili szczepów *Staphylococcus aureus*. Sprawdzono profile lipidomiczne szczepów, które są odporne i wrażliwe na antybiotyki (metycyna, erytromycyna, gentamycyna, erytromycyna i kwas fuksynowy). Wyniki badań pokazują, że grupy lipidowe monoglikozyldiacylloglicerolu fosfatydyloglicerolu i diglikozyldiacylloglicerolu są wyższe w szczepach opornych na antybiotyki. Analizy pokazują, że występują różnice we wzorcach lipidowych między wrażliwymi i opornymi szczepami *S. aureus*, oraz że podatność na antybiotyki może być związana z kompozycją lipidową komórek bakteryjnych [47].

Oprócz typowania drobnoustrojów przy pomocy spektrometrii mas, coraz więcej grup badawczych zajmuje się identyfikacją oraz porównywaniem próbek za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego NMR.

Palama i współpracownicy porównali 6 gatunków bakterii odpowiedzialnych za infekcje dróg moczowych (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*), sprawdzając metabolity wewnątrzkomórkowe za pomocą metody NMR. Nienadzorowana, wielowymiarowa analiza danych wykazała znaczną dyskryminację między badanymi próbkami. Ten eksperyment pokazuje, że profilowanie metaboliczne może być szybką metodą identyfikacji gatunków bakterii [8].

Ogromną zaletą wykorzystania metabolomiki do rozróżniania mikroorganizmów jest możliwość porównywania pomiędzy sobą bakterii tego samego gatunku, pochodzącego z różnych źródeł. Kazlovska i współpracownicy porównali 15 izolatów *P. aeruginosa* wyizolowanych z próbek płuc pacjenta. Przeprowadzono analizę medium za pomocą ^1H NMR. Do identyfikacji grup izolatów zastosowano metody statystyczne. Wykres punktowy PCA pokazał cztery różne skupiska różnych szczepów *P. aeruginosa*, z których każdy powiązany był z długością leczenia i funkcją płuc pacjenta. Badania te sugerują, że szczepy *P. aeruginosa* mają szereg strategii wzrostu, które mogą być kontrolowane za pomocą profilowania metabolomicznego jako narzędzia prognostycznego w diagnostyce zakażeń bakteryjnych [9].

Wykorzystanie NMR do porównania rodzajów grzybów wykorzystał również Ząbek i wsp. W badaniach porównano trzy gatunki (*Aspergillus pallidofulvus*, *Fusarium oxysporum* i *Geotrichum candidum*). Każdy gatunek wykazywał specyficzny metabolizm. Szczegółowa analiza zmian metabolicznych wykazała, że *A. pallidofulvus* wydaje się być najbardziej patogennym grzybem spośród badanych szczepów [48].

UWAGI KOŃCOWE

Istnieje wiele metod identyfikacji drobnoustrojów, do najbardziej popularnych należą metody takie jak biotypowanie, ocena lekowrażliwości, analizy spektrometrią mas czy sekwencjonowanie.

Metoda MALDI-TOF MS stała się niezawodnym narzędziem do szybkiej identyfikacji i klasyfikacji drobnoustrojów na podstawie profilu białkowego oraz badań metabolomicznych. Pod tym względem stanowi poważne wyzwanie dla metod mikroskopowych i biologii molekularnej. Obecnie komercyjne systemy MALDI są dostępne do badań biologicznych, a także do zastosowań diagnostycznych w medycynie klinicznej, biotechnologii i przemyśle chemicznym i spożywczym.

Większość badań opisujących identyfikację szczepu używa czystych szczepów hodowanych *in vitro*, jednak badania nad lotnymi związkami organicznymi VOC są pierwszym krokiem w rozwoju metod umożliwiających identyfikację szczepów bez potrzeby izolacji bakterii i ich hodowli. Taka metoda byłaby przydatnym narzędziem diagnostycznym, ponieważ skróciłaby czas między pobraniem materiału a dostarczeniem wyników.

Badania z użyciem MS oraz NMR pokazują, że metody te są pomocne w identyfikacji i rozróżnianiu drobnoustrojów. Przedstawione przykłady pozwalają sądzić, że w przyszłości typowanie mikroorganizmów może być jeszcze szybsze i dokładniejsze niż dotychczas.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Brzozowski, P. Kwiatkowski, D. Kosik-Bogacka, J. Jursa-Kulesza, *Post. Mikrobiol.*, 2017, **56**, 535.
- [2] A. van Belkim, P.T. Tassios, L. Dijkshoom, S. Haeggman, B. Cookson, N.K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse, M. Struelens, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007, **13**, 1.
- [3] U. Kosikowska, D. Stępień-Pyśniak, D. Pietras-Oźga, S. Andrzejczuk, M. Juda, A. Malm, *Diagn. Lab.*, 2015, **51**, 23.
- [4] R. Bujak, W. Struck-Lewicka, M. J. Markuszewski, R. Kaliszan, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, **113**, 108.
- [5] M.L. Reaves, J.D. Rabinowitz, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011, **22**, 17.
- [6] O. Lawal, H. Knobel, H. Weda, T.M.E. Nijsen, R. Googacre, S.J. Fowler, *Metabolomics*, 2018, **14**, 1.
- [7] A.H. Neerinx, B.P. Geurts, M.F. Habets, J.A. Booij, J. van Loon, J.J. Jansen, L.M. Buydens, J. van Ingen, J.W. Mouton, F.J. Harren, R.A. Wevers, P.J. Merkus, S.M. Cristescu, L.A. Kluijtmans, *J. Breath Res.*, 2016, **10**, 1.
- [8] T.L. Palama, I. Canard, G.J.P. Rautureau, C. Mirande, S. Chatellier, B. Elena-Herrmann, *Analyst.*, 2016, **141**, 4558.
- [9] J. Kozłowska, D.W. Rivett, L.S. Vermeer, M.P. Carroll, K.D. Bruce, A.J. Mason, G.B. Rogers, *Metabolomics*, 2013, **9**, 1262.
- [10] A.E. Clark, E.J. Kaleta, A. Arora, D.M. Wolk, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, **26**, 547.
- [11] J. Chalupová, M. Raus, M. Sedlářová, M. Šebela, *Biotech. Adv.*, 2014, **32**, 230.
- [12] B. Buszewski, A. Rogowska, P. Pomastowski, M. Złoch, V. Railean-Plugaru, *J. AOAC Int.*, 2017, **100**, 1607.
- [13] E. Sanjuán, B. Fouz, J.D. Oliver, C. Amaro, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, **75**, 1604.
- [14] M.R. Fairfax, M.H. Bluth, H. Salimnia, *Clin. Lab. Med.*, 2018, **38**, 253.
- [15] C.M.R. Lacerda, K.F. Reardon, *Brief. Funct. Genomic and Proteomics*, 2009, **8**, 75.
- [16] S. Leão, A. Martin, G. Mejia, and J. Robledo, *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Origins of Mycobacterium. Ulcerans View project*, 2004.
- [17] M. Kasela, A. Malm, B. Nowakowicz-Dębek, M. Ossowski, *Post. Hig.*, 2019, **73**, 245.
- [18] A.J. Sabat, A. Budimir, D. Nashev, R. Sa-Leao, J. van Dijk, F. Laurent, H. Grundmann, A.W. Friedrich, *ECDC*, 2013, **18**.
- [19] P.B. Smith, K.M. Tomfrohde, D.L. Rhoden, A. Balows, *Appl. Microbiol.*, 1972, **24**, 449.
- [20] S. Giedrys-Kalemba, *Typowanie molekularne w dochodzeniu epidemiologicznym. Zakażenia szpitalne podręcznik dla zespołów kontroli zakażeń, PZWL, Warszawa, 2009.*

- [21] D. Artur, Lekooporność i antybiotykoterapia zakażeń. Zakażenia szpitalne. Podręcznik dla zespołów kontroli zakażeń, PZWL, Warszawa, 2009.
- [22] D.L. Baggesen, G. Sørensen, E.M. Nielsen, H.C. Wegener, *Eurosurveillance*, 2010, **15**.
- [23] S. Alamian, M. Dadar, S. Solimani, A.M. Behrozikhah, A. Etemadi, *Arch. Razi Inst.* 2019, **74**, 127.
- [24] J. Caierão, J.A.C.D. Paiva, J.L.M. Sampaio, M.G.D. Silva, D.R.S. Santos, F.S. Coelho, L.S. Fonseca, R.S. Duarte, D.T. Armstrong, A.H. Regua-Mangia, *Int. J. Infect. Dis.*, 2016, **42**, 11.
- [25] T. Stanley, I.G. Wilson, *Mol. Biotech.*, 2003, **24**, 203.
- [26] A. Sękowska, E. Gospodarek, D. Kamińska, *Arch. Med. Sci.*, 2012, **8**, 993.
- [27] T.R. Sandrin, J.E. Goldstein, S. Schumaker, *Mass Spectrom. Rev.*, 2013, **32**, 188.
- [28] T. Chen, J. Sheng, Y. Fu, M. Li, J. Wang, A. Q. Jia, *J. Proteome Res.*, 2017, **16**, 824.
- [29] B.B. Aldridge, K.Y. Rhee, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2014, **19**, 90.
- [30] M.L. Reaves, D. Rabinowitz, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011, **22**, 17.
- [31] K. Wolska, P. Szweda, *Genotyping Techniques for Determining the Diversity of Microorganisms. Genetic Diversity in Microorganisms*, InTech, 2012.
- [32] M. Stobiecki, *Biotechnologia*, 2009, **2**, 54.
- [33] A.B. Canelas, A. ten Pierick, C. Ras, R.M. Seifar, J.C. van Dam, W.M. van Gulik, J.J. Heijnen, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 7379.
- [34] A.C. Dona, M. Kyriakides, F. Scott, E.A. Shephard, D. Varshavi, K. Veselkov, J.R. Everett, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2016, **14**, 135.
- [35] A.K. Kosmides, K. Kamisoglu, S.E. Calvano, S.A. Corbett, I.P. Androulakis, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 2013, **41**, 205.
- [36] W. Krzyściak, D. Kościelniak, M. Papież, A. Jurczak, P. Vyhouskaya, *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, 2017, **2017**, 6859543.
- [37] X. Liu, J.W. Locasale, *Trends Biochem. Sci.*, 2017, **42**, 274.
- [38] B. Zhang, R. Powers, *Future Med. Chem.*, 2012, **4**, 1273.
- [39] J. Tang, *Curr. Genomics*, 2011, **12**, 391.
- [40] S. Barnes, H.P. Benton, K. Casazza, S.J. Cooper, X. Cui, X. Du, J. Engler, J.H. Kabarowski, S. Li, W. Pathmasin, J.K. Prasain, M.B. Renfrow, H.K. Tiwari, *J. Mass Spectrom.* 2016, **51**, 535.
- [41] M. Kostrzewa, *Expert Rev. Proteomics*, 2018, **15**, 193.
- [42] A. Sampedro, J. Ceballos Mendiola, L. Aliaga Martínez, *MALDI-TOF Commercial Platforms for Bacterial Identification. The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*, Elsevier, 2018.
- [43] L. Baudler, S. Scheufen, L. Ziegler, F. Möller Palau-Ribes, C. Ewers, M. Lierz, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2019, **31**, 620.
- [44] Y. Li, M. Shan, Z. Zhu, X. Mao, M. Yan, Y. Chen, Q. Zhu, H. Li, B. Gu, *BMC Infect. Dis.*, 2019, **19**, 941.
- [45] M. Berrazeg, S.M. Diene, M. Drissi, M. Kempf, H. Richet, L. Landraud, J.M. Rolain, *PLoS One*, 2013, **8**, 61428.
- [46] K.D. Nizio, K.A. Perrault, A.N. Troonbnikoff, M. Ueland, S. Shoma, J.R. Iredell, P.G. Middleton, S.L. Forbes, *J. Breath Res.*, 2016, **10**, 26008.
- [47] W. Hewelt-Belka, J. Nakonieczna, M. Belka, T. Bączek, J. Namieśnik, A. Kot-Wasik, *J. Proteome Res.*, 2016, **15**, 914.
- [48] A. Ząbek, M. Klimek-Ochab, E. Jawień, P. Młynarz, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, **33**, 132.