

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Szakdolgozat

Érzékenységvizsgálatok MALDI-TOF MS módszerrel

Készítette: Illés Dóra

Biomérnök BSc szakos hallgató

Témavezető: Bereczki László

Konzulens: Dr. Szarka András

Budapest

2016.

Tartalmi összefoglaló

A szakdolgozat témájául egy régi módszer új megközelítésből történő kísérletes vizsgálatát választottuk. Munkánk során a mikrobiológiában hagyományos érzékenységvizsgálatok tömegspektrometriai megközelítését vizsgáltuk. Kíváncsiak voltunk arra, hogy ez az új elgondolás, amiről a napjainkban megjelenő szakirodalomban egyre több és ígéretesebb publikáció születik, vajon a hazai laboratóriumi gyakorlatban is megvalósítható-e.

Célul tűztük ki, hogy ezen a napjainkban még csak kutatott területen kísérletes munkát végzünk és megpróbáljuk eldönteni, hogy vajon helye lehet-e az új módszernek a mikrobiológiai rutin eljárások között. Kísérleteinkben elsősorban az ampicillin antibiotikumot vizsgáltuk részletesen. Az alapelgondolás szerint, ha egy baktérium rezisztenssé válik egy antibiotikummal szemben, akkor azt sok esetben úgy éri el, hogy az antibiotikumot valamely enzimjével hatástalanítja, így elkerüli annak antibakteriális hatását. Ez az ártalmatlanítás általában enzimatis vágásokat jelent az antibiotikum molekulájában, így az már nem lesz képes a baktérium ellen hatást kifejteni. Kísérleteink során azokat a változásokat kerestük tömegspektrometriás módszerrel, amelyek az ampicillin molekulájában történnek a bakteriális rezisztenciát biztosító enzimek működése révén. Így végső soron következtethetünk a vizsgált baktérium izolátum rezisztenciájára.

A módszer újszerűsége miatt többé-kevésbé szabadon kísérletezhettünk a technika megvalósításával és finomításával, terveket készíthettünk a kivitelezésről, tapasztalatokat szerezhettünk a buktatókról, az alapvetően szükséges feltételekről és végül sikereket is elértünk.

Kísérletes munkánkkal sikerült bizonyítanunk, hogy lehetséges ennek az új eszköznek az érzékenységvizsgálatokban való használata is. Az alkalmazott ampicillin bontási kísérletek eredményeként megállapítottuk a kivitelezés feltételeit, kidolgoztuk magunk számára azokat a protokollokat, melyek alapján más antibiotikumok is vizsgálhatók lesznek ezzel a módszerrel.

Eddigi sikereink alapján bizakodunk abban, hogy munkánk esetleg egy nagyobb szabású folyamatban kiépülő módszer egyik építőelemévé válhat.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A MALDI-TOF MS tömegspektrometria általános jellemzése

2.2. A MALDI-TOF MS alkalmazási lehetőségei a mikrobiológiában

2.2.1. Identifikációs lehetőségek

2.2.1.1. Identifikációs módszerek

2.2.1.2. Közvetlen identifikáció klinikai mintából

2.2.1.3. Tipizálási lehetőségek

2.2.2. Érzékenységvizsgálati lehetőségek

2.2.2.1. Érzékenység előrejelezhetősége identifikáció révén

2.2.2.2. MSSA / MRSA

2.2.2.3. *cfiA*

2.2.2.4. „Breakpoint módszer”

2.2.2.5. β -laktamáz aktivitás detektálása

2.2.2.6. Stabil izotóppal jelölt aminosavak módszere

2.2.2.7. Kvantitatív vizsgálat belső kontroll segítségével

2.2.2.8. Érzékenységvizsgálatok automatizálhatósága

2.3. Célkutatózések

3. Kísérletek, módszerek

3.1. Anyagok, eszközök, felhasznált módszerek

3.2. Mérési paraméterek kis molekulatömegű anyagok vizsgálatánál

3.3. Tiszta antibiotikum oldatok kalibrálása

3.4. Antibiotikumokkal végzett kísérletek kivitelezése

4. Eredmények és értékelésük

4.1. β -laktamáz aktivitás detektálása

4.1.1. Vizsgálatok optimalizálása

4.1.2. Eredményességet befolyásoló egyéb tényezők, tapasztalatok

4.1.3. Klinikai izolátumok vizsgálata

4.1.4. Eredmények interpretálása, megvitatása

4.2. Penicillinnel végzett vizsgálatok

4.2.1. Eredmények megvitatása

5. Összefoglalás

6. További terveink, hosszabb távú célkitűzéseink

Irodalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás

Nyilatkozat

Függelék

1. Bevezetés

Napjaink egyik legégetőbb problémája a világ népességének drasztikus növekedése és az ebből következő komplex egészségügyi problémák. Az egyik legfontosabb ilyen nehézség az egészségügyi ellátás minőségének fenntartása a megnövekedett igénybevétel mellett. Mindehhez hozzájárul a továbbra is kontrollálatlan antibiotikumhasználat az egészségügyben és az élet egyéb területein is, a globálissá váló kereskedelem és turizmus széles rétegek részvételével, a mikroorganizmusok antibiotikus szerekkel szembeni rezisztenciájának mind általánosabbá válása, valamint az újonnan kifejlesztett antibiotikus szerek számának és elérhetőségének csökkenése. Ha az emberiség szeretné ezt a folyamatot ellenőrzése alatt tartani, mindenképpen szükséges az ehhez szükséges eszközök fejlesztése, új módszerek bevezetése, a hagyományos rutin mikrobiológiai technológiák felülvizsgálata, és ha szükséges, helyettesítése.

Az antimikrobiális érzékenységvizsgálatok hagyományosan a klinikai mikrobiológiai laboratóriumok feladatköréhez tartoznak. Az alkalmazott rutin technológiák legfontosabb eszközei a korongdiffúziós és a különböző antibiotikumhígítási módszerek. Ezek a metodikák évtizedek óta ismertek, széleskörű szakmai tapasztalatokra épülnek, melyek alapján a mai egészségügyben előforduló mikrobák érzékenységi viszonyai még jól detektálhatók, kontrollálhatók.

Egyre sürgetőbb azonban a beteg- és mintaszámok drasztikus növekedése következtében az az igény, hogy az érzékenységvizsgálatok hagyományosan jó, de időt igénylő módszerei mellett bevezethessünk olyan gyors módszereket is, melyek idővel, a kezdeti technikai, metodikai és szakmai elméleti problémák leküzdése után akár a rutin mikrobiológiai folyamatok részévé, vagy később akár azok fő technológiájává válhatnak gyorsaságuk, egyszerűségük és gazdaságosságuk miatt.

Napjainkban az erre a problémára megoldást nyújtani igyekvő új technikák legígéretesebbjei mindenképpen a tömegspektrometriás módszerek.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A MALDI-TOF MS tömegspektrometria általános jellemzése

A tömegspektrometria (mass spectrometry, MS) olyan analitikai módszer, melynek első lépése a vizsgálandó anyagminta (analit) atomjainak vagy molekuláinak ionizációja, majd a keletkező, különböző méretű, gáz halmazállapotba kerülő részecskéket töltésegységre eső tömegük (mass to charge, m/z) szerint elválasztjuk. Ez elektromos és/vagy mágneses mező segítségével történhet ezen vegyületek eltérő energiája, impulzusmomentuma vagy sebessége alapján [1].

A MALDI-TOF betűszó speciális tömegspektrométert jelent, amelyben az ionforrás a MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) és a tömegszám-analizátor a TOF (Time of Flight), ami az ionizáció során keletkezett ionok tömeg/töltés szerinti szétválasztására szolgál. A MALDI-TOF tömegspektrométer tartalmaz mintabeviteli rendszert, ionforrást, iongyorsítót, analizátort, detektort, vákuumrendszert, számítógépet és elektromos energiát biztosító egységeket, illetve a kísérletekhez szükségünk van egy mintatartó lemezre (plate-re), amire az analit (esetünkben a vizsgált, 18-24 órás, fiatal baktériumtelep), majd a mátrix felvitelre kerül.

A mátrix (pl. alfa-ciano-4-hidroxifahéjsav vagy dihidroxibenzoésav) egy segédanyag, felvitelkor az analit a mátrix molekulakristályába ágyazódik. Funkciója a lézer által biztosított, az ionizációhoz szükséges energia elnyelése és átadása az analit molekuláinak. A mátrixszal együtt kristályosodott analit ennek hatására a mintából felszabadul (deszorpció), és molekulaionok formájában gáz fázisba kerül [2].

A nagy ionizációs energia hatására reakciók játszódnak le a szilárd fázisból kirobbant molekulák között a gáz fázisban, ahol a mátrix molekulák ütközéskor egymást, illetve a vizsgált molekulákat is protonálhatják. Elektromos erőterben egy gyorsítófeszültség (19-20 000 V) készíteti az ionizált molekulákat mozgásra, majd vákuumban repülve a kisebb méretű molekulák rövidebb, a nagyobb molekulák hosszabb idő alatt jutnak el az analizátoron keresztül a detektorba [1].

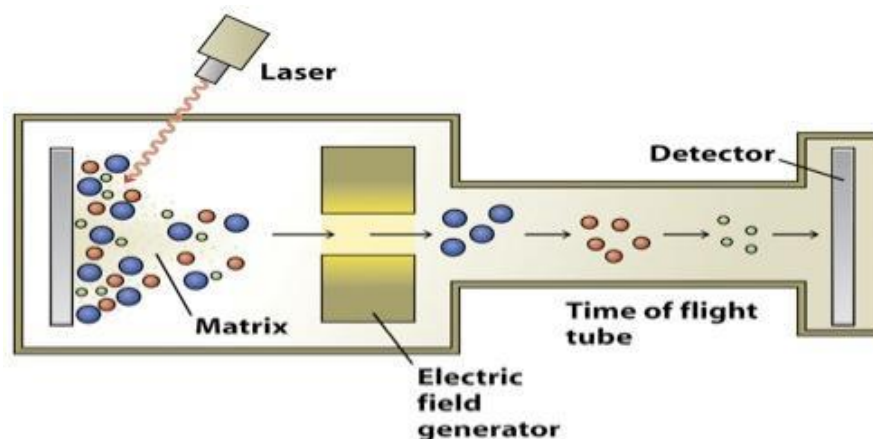


Figure 3-14b Principles of Biochemistry, 4/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

[3]

Ezt a megfigyelést, miszerint a molekula mérete és a detektor eléréséhez szükséges repülési idő között arányosság áll fenn, felhasználhatjuk a felgyorsított ionok tömegének a meghatározásához (time of flight, TOF). Az így kapott eredmény a tömegspektrum, melyben az egyes csúcsok a minta egy adott m/z fajlagos tömegű molekulaionját jelzik (esetünkben a mikroorganizmus különböző fehérjéinek feleltethetőek meg), a csúcsok magassága pedig az adott molekula mennyiségével arányos.

A mikrobák jellegzetes fehérjeprofíllal rendelkeznek, így a kapott tömegspektrum alapján beazonosíthatóak.

2.2. A MALDI-TOF MS alkalmazási lehetőségei a mikrobiológiában

A modern klinikai mikrobiológia napjainkban átalakulóban van. A forradalminak is nevezhető változásokat egy régóta ismert technológiai vívmány idézte elő, mely az 1970-es évek közepén a mikrobiológiában is bontogatni kezdte a szárnyait. Ez a technológia a tömegspektrometria, melyet régóta használtak már különböző kémiai anyagok meghatározására, jellemzésére, de mikrobák identifikálására akkoriban még nem volt alkalmas. Megemlítendő, hogy az 1970-es, '80-as években virágkorát élte egy hasonló mikrobiológiai módszer. A gázkromatográfiás technikával anaerob, nehezen meghatározható baktériumok zsírsavai és egyéb kis molekulatömegű anyagcseretermékei alapján lehetett fajsztíntű identifikálást végezni [4]. A gázkromatográfia kiváló eszköz volt, később azonban a biokémiai identifikáló gyorstesztetek, és a molekuláris biológiai eszközök térhódítása révén háttérbe szorult.

A MALDI-TOF MS tömegspektrometriás módszert baktériumok karakterizálására először 1975-ben próbálták alkalmazni [5]. Az 1980-as évekre odáig fejlődött a módszer, hogy már nagyobb molekulatömegű polimerek, biomolekulák detektálására is alkalmassá vált, így lehetőség nyílt arra, hogy az egyes baktériumokról az identifikáláshoz elegendő mintázatok, ún. „profilokat” hozzanak létre, vagyis tulajdonképpen elkészítették az első adatbázisokat [6, 7, 8, 9]. Maga az ionizációs MALDI-TOF MS technika kifejlesztése Franz Hillenkamp és Michael Karas nevéhez fűződik, akik 1988-ban tették meg az első lépéseket a mai metódus eszközeinek prototípusával [10]. Egy másik kutatócsoport Koichi Tanaka vezetésével szintén kiváló eredményeket ért el az ionizációs technikán alapuló műszerrel [11], munkájuk jelentőségét 2002-ben Nobel-díjjal ismerték el.

A XX. század utolsó évtizedében az alkalmazott tudományok és a mikrobiológia szinte minden területe „felfedezte” a módszert és innentől kezdve terjedése megállíthatatlan volt. Az identifikációs problémákra gyors és világos válasszal szolgálni képes eszköz nagyon hamar meghódította a mikrobiológiai laboratóriumokat. Legelőször a klinikai mikrobiológia volt az, amely a módszert a rutin módszerek közé emelte. Gyors, pontos és tisztán értelmezhető eredményei nem csak a gyakori aerob baktériumok, de később az anaerob baktériumok, a tápanyagigényes és nehezen tenyészthető baktériumok, sőt még bizonyos gombák pontos identifikálásában is elérhetővé váltak. Az adatbázisok fejlődésével, növekedésével mind szélesebbé és „extrémebbé” váltak a MALDI-TOF tömegspektrometria korlátai elsősorban a mikrobiológiai, de más egyéb identifikációs folyamatokban is, sőt még bizonyos DNS-analitikai munkák kapcsán is mind biztatóbb eredmények bukkannak fel a nemzetközi irodalomban [12, 13, 14, 15, 16, 17]. A XXI. század második évtizedére a metodika annyira széleskörűen elterjedt, hogy még olyan tudományterületeken is intenzíven kutatott és mára már alkalmazott módszer a MALDI-TOF MS, mint például a virológia [18]. Mindezeket összefoglalva elmondható, hogy a MALDI-TOF MS technika túlhaladta a hagyományos biokémiai identifikációs módszerek lehetőségeit. A mára már hagyományosnak mondható DNS alapú metodikák lassabbak, nehezebben kivitelezhetőek illetve drágábbak, és ezek miatt háttérbe szorulni látszanak az identifikációban.

2.2.1. Identifikációs lehetőségek

A klinikai mikrobiológiában a MALDI-TOF MS alapú identifikálás rutin módszerré alakul napjainkban már hazánkban is. Gyorsasága, precizitása, megbízhatósága meghaladja a hagyományos módszerek határait. Szoftveres értékelő rendszere (MALDI-BioTyper®) objektív módon interpretálja a faj- vagy nemzetségszintű identifikációs eredményeket [19, 20].

Az értékelés során az adott mintából kapott spektrogramot az adatbázisban szereplő spektrogramok minőségével hasonlítja össze a szoftver és ez alapján ad „score” értéket az adott izolátumra. Az adatbázisban szereplő spektrumokkal való hasonlóság alapján faj- vagy nemzetségszintű meghatározási eredményt kapunk, rosszabb esetben – hibás mintafelvétel, hibás mérés, nem megfelelő minta, stb miatt – „nem megbízható” („not reliable”) is lehet az eredmény. A mérési tartományban spektrumot nem tartalmazó vagy nem detektálható mintáról értékelhető eredmény nem készül („no peaks found”). Olyan esetben azonban, ha a kapott spektrum egyik adatbázisban szereplő spektrumra sem illeszthető, előfordulhat, hogy nem valamilyen hiba folytán kapunk nem megfelelő („not reliable”) eredményt, hanem mert az éppen vizsgált faj eddig még nem szerepelt a használt eszköz adatbázisában. Ilyen esetekben – alapos identifikációs eljárások után (szekvenálás, referenciatörzsek, stb) – az adatbázis fejleszthető, új fajok építhetők be.

2.2.1.1. Identifikációs módszerek

Direkt felvitel

A legegyszerűbb mintafelviteli módszer, mellyel a leggyorsabb eredményeket érhetjük el, a direkt felvitel. A baktériumtelep mintatartó lemezre (plate-re) való felvitele, a mátrix hozzáadása és beszáradása után történik a vizsgálat. A módszer munkaideje néhány perc. Sok aerob bélbaktérium így is jól identifikálható, de az eredmények megbízhatósága legtöbbször csak a nemzetségszintű identifikálási eredmény kategóriájába esik. Leginkább csak nagyon gyors tájékozódásként alkalmazható egy ismeretlen mikroba hovatartozását vizsgálva.

Hangyasavas gyors extrakciós módszer

A legtöbbször használt módszer a MALDI-TOF MS rutin klinikai mikrobiológiai alkalmazások során. A mintafelvitel után egy egyszerű hangyasavas gyors kezelés után történik meg a mérés. Körülbelül 5-10 perces munkaidő után juthatunk eredményekhez. A gyakoribb bélbaktériumok kiváló hatásfokkal azonosíthatók így.

Teljes extrakciós módszer

A legmegbízhatóbb módszer az ismert minta-előkészítési metodikák közül, nehezen feltárható mikrobák esetén is kiváló eredmények biztosíthatók. A minta teljes etanolos extrakcióját követően további tömény (70%) hangyasavas és acetonitriles feltárást (roncsolást) végzünk. Az oldatba vitt vizsgálandó fehérjéket tisztított formában, a sejttöledéktől elválasztva mérjük a tömegspektrométerrel. Körülbelül fél óras munkaidő után kapunk eredményeket a módszerrel.

A legpontosabb eredmények érdekében ez a leginkább javasolt eljárás, de idő- és vegyszerigénye miatt a gyors és egyszerű hangyasavas eljárás elterjedtebb.

2.2.1.2. Közvetlen identifikáció klinikai mintából

A tömegspektrometriás mikrobiológiai módszertan láthatóan abba az irányba igyekszik fejlődni, hogy betegmintákból közvetlen baktériumazonosítás történhessen, ez azonban sok technikai nehézség miatt még nem lehetséges. Néhány kivétel azonban már elérhető. Ilyenek azok a minták, amelyekben sok, viszont csak „egyféle” mikroba található, így azok koncentrált üledékéből közvetlen MALDI-TOF MS mintafelvitel és identifikáció végezhető.

Hemokultúra minták: a szepszist leggyakrabban egyetlen fajhoz tartozó mikroorganizmus okozza, így a feldúsult vérminta üledékéből MALDI-TOF MS identifikáció végezhető. Szepszis esetén a minél gyorsabb és minél pontosabb identifikáció életmentő adatnak minősül, így a módszer fejlesztése, tökéletesítése szükséges is. Ha azonban a mintában nem egy, hanem kettő vagy több mikroorganizmus fordul elő, akkor azok az itt leírt eljárással nem lesznek

azonosíthatóak, valószínűleg csak a legnagyobb mennyiségben jelenlévő mikroba azonosítása történik meg. Emiatt egyelőre szükségszerű párhuzamosan a hagyományos, kioltáson alapuló technika alkalmazása is [21]. Természetesen vannak már olyan szoftveres fejlesztések is, melyek a többféle baktériumot tartalmazó mintából kapott „vegyes” spektrumokat is értékelni lesznek képesek, de ez ma még nem megbízható.

Vizeletminták esetében: monobakteriális fertőzés esetén szintén jó eséllyel megállapítható a fertőző, nagy számban jelen lévő baktérium faja, de a mintában jelenlévő csíraszám – és az érzékenység – meghatározása miatt még mindig szükség van a hagyományos kioltásos módszer párhuzamos alkalmazására is [22].

2.2.1.3. Tipizálási lehetőségek

A faj szintű azonosításon túl, egyre több olyan publikáció jelenik meg, melyek a tipizálás lehetőségét boncolgatják MALDI-TOF MS metodika segítségével. Ezek közül talán a legelőrehaladottabb és epidemiológiai okok miatt a legjelentősebb is, a *Salmonella* izolátumok tipizálása, mely standard módon szerotipizálással történt eddig. A *Salmonella* izolátumok fajszerű meghatározása után szoftveres segítséggel kereshetők olyan egyedi marker fehérjék (a spektrumban csúcsok, ún. „peak”-ek), melyek az adott szerotípusra jellemző, egyedi markerek [23]. Ezek alapján a sokszor nem teljesen megbízható és sok tapasztalatot igénylő tradicionális szerotipizálási módszerek alkalmazása talán kiváltható lehetne ezzel a teljesen objektív identifikálási eljárással, mely időben és költségek tekintetében is messze hatékonyabb eszköz lehetne.

2.2.2. Érzékenységvizsgálati lehetőségek

A MALDI-TOF tömegspektrometriai vizsgálatok területén az igazi újdonság napjainkban az érzékenységvizsgálatok lehetősége. Nincsen még kiforrott módszer, több irányból, több megközelítésből végeznek világszerte alapkutatásokat a metodika kifejlesztésére. Ezen szárnypróbálgatások közül a legígéretesebbnek azok a tesztek tűnnek, melyek az antimikrobiális szerek spektrumainak változását vizsgálják az adott mikroba enzimeinek való kitettség után (a szakdolgozatban részletezett kísérletek is ezt a megközelítést vizsgálják). Az enzimtevékenység nyomán, kismértékű eltolódások

jönnek létre a tömegspektrum egyes csúcsain („peak”-jein) azáltal, hogy egy-egy kötést felszakítva vagy egy-egy atomot, atomcsoportot levágva, módosul az eredeti molekula is, azaz a tömegspektruma is változik. Ezeknél a vizsgálatoknál általában egyelőre még csak egy-egy olyan fontos antibiotikum tesztelése történik, melyek előre jelezhetik valamilyen rezisztenciamechanizmus jelenlétét az adott mikrobában, vagyis az interpretáció során kihasználjuk azt, hogy egyes rezisztenciaviszonyokból több másikra is következtethetünk. A jövőben valószínűleg elérhetők lesznek egész antibiotikum paneleket vizsgáló lehetőségek is, egyelőre – még az alapkutatási szakaszban – lassú és körülményes manuális munka révén vizsgálhatunk egy-egy antibiotikumot.

Ilyen tesztek elvégzéséhez a MALDI-TOF MS készülék alapbeállításait is módosítani kell. Az antibiotikumok jóval kisebb méretű és tömegű molekulák, mint az identifikációknál vizsgált nagytömegű biomolekulák, így a tesztelt tömegtartomány is jóval a szokásos tartományok alatt van. Bár a vizsgált antibiotikumok „mérése” viszonylag alacsony koncentrációban történik, de a megfelelő tömegspektrum eléréséhez a detektor érzékenységét így is le kell csökkenteni, hogy optimálisan tudjuk detektálni a kis molekulatömegű antibiotikum és bomlástermékeinek a jelenlétét. Az ilyen típusú MALDI-TOF MS mérések tehát új paraméterek beállítását követelik meg a készüléken, amelyhez természetesen mindig új kalibrációk is szükségesek a megfelelő molekulatömeg tartományban.

Az érzékenységi vizsgálatok automatizálása tömegspektrométeres mérésekkel valószínűleg a távolabbi jövőt képviselik. Egyelőre a vizsgálati módszerek optimalizálása, használhatóságának tesztelése folyik, ha valamelyik módszer minden szempontból „beválik”, akkor valószínűleg egy újabb területet hódít el magának a rutin mikrobiológiai laboratóriumokban a tömegspektrometria.

2.2.2.1. Érzékenység előrejelezhetősége identifikáció révén

A MALDI-TOF MS vizsgálatok nagyon precíz identifikálást tesznek lehetővé már az elérhető alapszintű adatbázisok rendkívüli sokszínűsége révén is. Nem ritka a rutin mikrobiológiában, hogy egy könnyen határozhatónak tűnő mikrobáról MALDI-TOF

MS analízis után „kiderül”, hogy valami egészen ritka, valami egészen furcsa organizmussal van éppen dolgunk.

Ismerjük, hogy bizonyos gombák és baktériumok egyes fajai genetikailag rezisztensek bizonyos szerekre, azaz természetes rezisztenciával rendelkeznek különböző antimikrobiális szerekkel szemben. A természetes vagy genetikailag meghatározott rezisztencia azt jelenti, hogy az adott faj minden egyede, törzse, izolátuma mindig rezisztens az adott antibiotikummal szemben. Ebből következik, hogy ha az egyszerű identifikáció során kapunk egy megbízható eredményt, akkor a faj ismert természetes rezisztenciaviszonyai révén interpretálhatjuk is az antibiogram bizonyos részeit.

A pontos identifikáció információja tehát már magában hordoz egy sor más információt is, mely az adott faj egyéb tulajdonságaira vonatkozik. Bizonyos fajokról ismert, hogy rezisztensek bizonyos antibiotikumokra, toxintermelők, biofilmképzésre hajlamosak. Előfordulhat olyan eset is, hogy a vizsgálandó antibiotikumok köre egészen más kell, hogy legyen bizonyos baktériumok esetén, így a pontos identifikációnak megint csak fontos szerep jut. Egy nem teljesen objektív azonosítás ezek miatt kifejezetten veszélyezteti is a terápia sikerességét.

Az adott mikroba kóroki szerepének eldöntésekor is fontos a precíz identifikáció, mindenképpen nélkülözhetetlen ez az információ annak elbírálásakor, hogy az adott mintából egy a normál flóra részét képező baktérium kerül-e elő, vagy egy sok patogénitási faktorral rendelkező valódi kórokozó.

2.2.2.2. MSSA / MRSA

A methicillin érzékeny (MSSA) és rezisztens (MRSA) *Staphylococcus aureus* törzsek elkülönítése nagyon fontos mind a klinikumban, mind az epidemiológiában. A két típust elkülönítő hagyományos módszerek sokaságán túl, a MALDI-TOF MS is segítséget nyújthat a gyors és pontos differenciálásban. A módszer a hagyományos spektrometriás identifikációs metóduson alapszik, kiegészítve azzal, hogy az azonosítás során kapott spektrogramok alaposabb analízise révén tárja fel a különbséget a két *S. aureus* típus között [24]. A módszer kifejlesztőinek számításai szerint kb. 30 *S. aureus* izolátum identifikálása és azután az MSSA/MRSA differenciálás mindössze csak két

órát vesz igénybe. Informatikai és statisztikai eszközökkel találták meg azokat a csúcsokat a spektrogramokban, melyek jellegzetesen előfordulnak MRSA izolátumokban és konzekvensen hiányoznak MSSA izolátumokból. Érdekes módon ezek a csúcsok egy bizonyos (m/z) tartományban halmozottan helyezkednek el az MRSA törzsek esetén. A kapott különbségek között két peak szignifikánsan jelen van vagy hiányzik MRSA és MSSA törzsekben: 3784 Da és 5700 Da a két legfontosabb és legbiztosabb marker a differenciálás során, melyek csak MRSA-knál észlelhetők.

2.2.2.3. **cfiA**

Hasonló elven alapul a cfiA gént hordozó, illetve nem hordozó *Bacteroides fragilis* törzsek differenciálása is [25]. A cfiA gén egy karbapenemáz enzimet kódol, mely karbapenemekre rezisztensé teheti az azt termelni képes baktériumot. A *B. fragilis* törzseket két nagy csoportra oszthatjuk: I. és II. divíziókra, melyek közül az I. divízióba tartozó törzsek hordozzák a cfiA gént, a II. divízióba tartozók nem. A MALDI-TOF MS identifikáció során a két divízió elkülöníthető, vagyis a cfiA gén hordozása is screenelhető ezen a közvetett módon. A két divízió elkülönítésekor a 4700 és 5300 Da közötti tartományban 5 olyan csúcs észlelhető, melyek kimutatásával jól differenciálható a két *B. fragilis* csoport.

2.2.2.4. **„Breakpoint módszer”**

A módszer az előzőekhez képest eltérő szemléletű. Ebben a megközelítésben a mikroorganizmust (a módszert leíró közleményben *Candida albicans*-t) egy antimikrobiális szer hígítási sorával tenyésztik folyadékkultúrákban [26]. A tenyésztési idő (15-24 óra) után, amikor a mikroba az adott alacsony koncentrációkban még nem érzékeny a szerre egy „normális” spektrumot kapunk az identifikálás eredményeként. Azokban az esetekben viszont, ahol már eléri a szer az érzékenységi határt – illetve az e fölötti koncentrációknál – a spektrumokon konzekvensen eltérő peak-mintázatú eredményeket figyelhetünk meg. A két eredmény közti eltérés nem folyamatosan kialakuló mintázatváltozás, hanem az egyik koncentrációtól kezdődően hirtelen kialakuló változás. Ez a koncentráció (a publikáció kísérletei alapján) jellemzően nagyon jó egyezést mutat a vizsgált izolátum MIC (minimal inhibitory concentration) értékével.

Ez a módszer tehát azt a kérdést, hogy a vizsgált mikroba érzékeny, vagy rezisztens-e az adott antimikrobiális szerre, nem csak eldönti, de emellett még egy MIC értékkel jól korreláló eredményt is képes szolgáltatni. Természetesen előzetes pontos identifikálást igényel a módszer, mivel a breakpointok értékelése – és ez vonatkozik minden, ezen az elven alapuló egyéb módszerre is – fajfüggő.

2.2.2.5. β -laktamáz aktivitás detektálása

A módszer az antibiotikum ellen ható mikrobiális enzimaktivitást detektálja egy az eddig említettektől ismét jelentősen eltérő megközelítésből [27]. Itt nem a mikroba marker fehérjéinek változásait detektálhatjuk, hanem az antimikrobiális szer mikrobiális enzimaktivitás révén történt módosulásait észlelhetjük az alapvegyület spektrumához képest. Amennyiben a mikroba rendelkezett az inkubáció ideje alatt olyan enzimmel, mellyel módosítani, azaz hatástalanítani volt képes az antimikrobiális szert, akkor a szer spektrumában specifikus módosulásokat fogunk észlelni. Ezek a módosulások általában igen finom és nagy felbontást igénylő eltérések, melyek azonban egyértelműen mutatják egy-egy mikroba enzimatisz tevékenységét az adott szerrel szemben, sőt a molekulában történt változások is kikövetkeztethetők.

Ennek a módszernek is vannak azonban hátrányai: egyrészt azokat a rezisztenciamechanizmusokat nem tudja detektálni, melyek nem az antimikrobiális anyag enzimatisz módosítása révén történnek (uptake blokk, efflux-pumpák, stb), másrészt pedig azokban az esetekben lehetnek technikai problémák, ha az enzimtevékenység a mikrobában csak intracellulárisan van jelen, így módosított termék a leírt módszerrel nem detektálható. Természetesen a probléma megoldható, a sejtek falának permeábilissé tételével (0,1% SDS, vagy lízis), amely a β -laktamáz aktivitás mérését megakadályozhatná [28]. A kísérleteinkben felhasznált baktériumok nem rendelkeztek ilyen mechanizmussal, a sejtfalak kezelésére, vagy a sejtek lízisére nem volt szükség. Ilyen tulajdonság elsősorban a *Pseudomonas* és *Acinetobacter* fajok törzseiben fordul elő.

2.2.2.6. Stabil izotóppal jelölt aminosavak módszere

A vizsgált baktérium izolátumot antibiotikum hígítási sor jelenlétében tenyésztjük. A tenyészetek tápleveséhez előzetesen stabil izotópokkal jelölt aminosavakat adunk

[29]. Abban az esetben, ha az antibiotikumra egy adott koncentrációban már érzékeny volt a baktérium, akkor az általános marker fehérjéinek spektrumában változásokat nem látunk, mert metabolikusan eleve inaktívvá vált a szer hatására. Abban az esetben viszont, ha az antibiotikum adott koncentrációjára a vizsgált baktérium még nem volt érzékeny, akkor jellegzetes peak-eltolódások észlelhetők, mivel metabolikus aktivitása közben a stabil izotópokkal ellátott mesterséges aminosavakat is felhasználta, így a marker fehérjeiben is tömegnövekedés detektálható.

2.2.2.7. Kvantitatív vizsgálat belső kontroll segítségével

Az előzőleg leírtakhoz (2.2.2.6.) sokban hasonlító módszer, de jóval rövidebb inkubációs idővel [30]. Stabil izotópokkal jelölt aminosavak találhatók az 1 órányi inkubációs idő alatt a táplevesekben, melyek MIC érték feletti koncentrációban tartalmazzák a vizsgált antibiotikumot is. Ha a mikroba képes az antibiotikum melletti növekedésre (azaz rezisztens rá), akkor az izotóppal jelölt, beépült aminosavak mennyiségi megbecslése révén eldönthető, hogy rezisztens vagy érzékeny volt-e a vizsgált törzs. A kvantitálás relatív módon történik egy ismert mennyiségű belső kontrollhoz képest, melyet a MALDI-TOF MS mérés előtt adunk a mintához.

2.2.3. Az új érzékenységvizsgálati módszerek összehasonlítása

	kivitelezési idő	MIC becslés	vegyszer-igény	műszer-igény	informatikai támogatás	hátrány	ref
hagyományos érzékenységvizsgálat	20-24 h	+/-	+	-	-	lassú	38
„breakpoint módszer”	20-24 h	+	++	+ (MALDI-TOF MS)	+	egyelőre csak gombáknál	34
β-laktamáz aktivitás	3-4 h	-	++	+ (MALDI-TOF MS)	+	csak extracelluláris enzimaktivitást detektál	35
stabil izotóppal jelölt AS-ak	3-4 h	+	+++	+ (MALDI-TOF MS)	+++	nem költséghatékony	36
stabil izotóppal jelölt AS-ak, kvantitatív	1-2 h	+	+++	+ (MALDI-TOF MS)	+++	nem költséghatékony	37

1. táblázat A fő MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálati módszerek áttekintése

A fent leírt irodalmi módszereket sok szempont figyelembevételével összevetettük, hogy egy olyan módszert használjunk, amely gyorsan, könnyen és költséghatékony módon képes elérni a hagyományos technikák eredményességét.

Hagyományos érzékenységvizsgálatban az izolátum szélesztése és az antimikrobiális szer megfelelő alkalmazása (korong vagy E-teszt) után a Petri-csészében történik az inkubáció (18-20 h), a leolvasás manuális [31]. A „breakpoint módszer” esetén a vizsgálandó törzset az antimikrobiális anyag hígítási sorával inkubáljuk, majd extrahált üledékekből vizsgáljuk a kritikus koncentráció alatti és feletti spektrum-mintázatokat, az értékeléshez egy kevés informatikai támogatásra is szükség van. Az enzimaktivitás mérésnél (itt: β -laktamáz vizsgálat) az antibiotikum módosulását mérjük, amit az esetleges enzimaktivitás révén szenved el a 3-4 órányi inkubáció során. Az értékeléshez egyszerű szoftverek fejleszthetők, kísérleti munkában a manuális értékelés még könnyen megoldható. Stabil izotópok beépülését vizsgáló módszerek nagyon költségesek voltak miatt valószínűleg nem lesznek a rutin laboratóriumokban is megvalósítható módszerek, ennek ellenére az irodalomból megismert eddigi eredmények valóban meggyőzőek.

Mindezen elsődleges szempontok mérlegelése után úgy döntöttünk, hogy kísérletes vizsgálatainkat a β -laktamáz aktivitás mérésének módszerére alapozzuk.

2.2.3.1. Érzékenységvizsgálatok automatizálhatósága

A sok különböző, újonnan kifejlesztett módszer szinte mindegyike olyan apró és egyedi változások detektálásán alapul, melyek észleléséhez informatikai támogatás használata ajánlott. A manuális detektálás is lehetséges ugyan, de fárasztó és időigényes feladatot ruház a felhasználóra. A kezdeti kísérletekből már körvonalazódni látszik, hogy szükség lesz olyan objektív és gyors informatikai háttérre, mely villámgyorsan képes elemezni a kapott spektrumokból az apró, de nagyon fontos változásokat. Ezek automatizálása nyilván felgyorsíthatná, és rutin módszerré tehetné a vizsgálatokat. Ma még ilyen szoftverek nem elérhetőek, de a tesztek fejlődése biztosan magával fogja hozni ezek kifejlesztését is. Ilyen szoftverek létrehozása nem bonyolult, akár még egyszerű táblázatkezelő programokkal is (makrók segítségével) megoldható.

2.3. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a MALDI-TOF tömegspektrometria a jövőben vajon alkalmas, potenciális eszköz lehet-e érzékenységi vizsgálatok elvégzésére rutin klinikai mikrobiológiai laboratóriumokban. A hazánkban még csak néhány éve jelen lévő MALDI-TOF tömegspektrométerek az identifikáció terén már bizonyították, hogy nagyon is helyük van/volna a rutin mikrobiológiai laboratóriumi eszközök, metodikák között. Az érzékenységvizsgálatok egyelőre még egy olyan új és képlékeny területe a tömegspektrometriának, melynek kidolgozásán világszerte több laboratórium is párhuzamosan dolgozik, kísérletezik. Nincsenek még kiforrott ajánlások vagy biztos technikák. A módszer végleges kidolgozásában egyelőre még csak irányokat látunk a szakirodalomban kutakodva, szinte mindegyik fő kutatási irány egy-egy kiváló ötletből született és eredményeiket látva valószínűleg legtöbbjük képes is lenne fejlesztés és optimalizálás után standard módszerként szolgálni, rutin laboratóriumokban való használhatóságuknak azonban biztosan korlátot szab majd némely módszernél azok túlzott bonyolultsága vagy költségessége.

Célul tűztük ki, hogy a viszonylag egyszerű és mindenképpen az egyik leggyorsabb módszerrel, a β -laktamáz aktivitás mérésének módszerével elkezdve a kísérletsorozatot, eljutunk a módszer optimalizálásán keresztül a laboratóriumunkban előforduló klinikai törzsek vizsgálatáig.

A vizsgálatokat olyan törzsekkel kezdtük el, melyekről a hagyományos vizsgálatokkal már ismertek voltak a tömegspektrometriával vizsgált érzékenységi adatok, így az eredményeket ezek ismeretében értékeltük. Későbbi kísérleteinkben végeztük el „a rutinból” előkerülő baktérium izolátumok vizsgálatát, itt a hagyományos mikrobiológiai technikával párhuzamosan történtek a mérések, majd a két módszer eredményeit összehasonlítottuk.

Végső célunk részt venni abban a hosszú folyamatban, mely során ennek az új technikának a fejlesztése történik, szeretnénk megismerni az egyes módszerek előnyeit, hátrányait, hogy a jövő rutin felhasználásában alkalmazhatók legyenek.

3. Kísérletek, módszerek

3.1. Anyagok, eszközök, felhasznált módszerek

Felhasznált táptalajok:

- Biolab – Mueller-Hinton, véres, csokoládé agar

Felhasznált baktériumok:

- *Escherichia coli*
- *Haemophilus parainfluenzae* ill. *influenzae*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Citrobacter braakii*

Baktériumok érzékenységvizsgálatához, fenntartásához:

- a fent említett táptalajok
- Forma Scientific Infrared CO₂ Incubator
- Abtek Nitrocefin korongok

A kiválasztott, a kísérletekhez felhasznált baktériumokat csokoládé táptalajon, heti 2-szer átoltva tartottuk fenn. A termosztátban a hőmérséklet 37°C, a levegő CO₂ tartalma 5.0 % volt. A törzsek a kísérletet megelőző napon is átoltásra kerültek, így fiatal, 24 órás sejtekkel dolgoztunk.

A szükséges koncentrációjú ampicillin oldat készítéséhez:

- Sigma-Aldrich Fluka Ampicillin, 100 mg kiszerelés
- Qiagen RNáz- és DNáz mentes víz
- Finnpiquette, 20- 200 µl
- Ecopipette, 0,5- 10 µl
- Expell pipettahegyek
- FL medical Eppendorf-csövek
- Radwag PS210/C/2 mérleg
- Biosan Multi-Vortex V-32
- hűtő (4°C)

Az antibiotikum oldat készítéséhez 0,010 g ampicillint mértünk be por formájában Eppendorf-csőbe (a rendelkezésemre álló mérleggel ez a legkisebb pontosan kimérhető mennyiség). Pipettával 1 ml analitikai tisztaságú, RNáz- és DNáz-mentes desztillált vizet töltöttem hozzá, vortexszel segítettük a feloldódást és homogenizáltuk.

A kapott 10 mg/ml-es oldat legalább tízszeres hígítására volt szükség, mert 10 mg/ml, illetve 5 mg/ml koncentrációban az oldódás nem teljes.

Homogenizálás után 100 µl oldatot új Eppendorf-csőbe pipettáztuk, és 900 µl desztillált vízzel hígítottuk. A kapott 1 mg/ml-es ampicillin oldattal dolgoztunk.

A mérések során azt tapasztaltuk, hogy az oldat 1-2 napig hűtőszekrényben tárolható, ennél régebben elkészített oldatokkal végzett kísérletek során viszont fals eredményeket kaptunk.

A minták előkészítéséhez, felviteléhez:

- hűtő (4°C)
- Biosan Dry Block Heating Thermostat CH-100 és Bio TDB-120
- fogpiszkáló
- Centurion Scientific K3 series centrifuga
- MALDI plate

A méréshez:

- mátrix oldat: C8982 SIGMA, ≥99% „suitable for MALDI-TOF MS” α-cyano-4-hydroxycinnamic acid
- acetonitril
- desztillált víz

A vak mintákat, az antibiotikum oldatokat, a vízben és az antibiotikummal együtt inkubált baktériumokat pipetta vagy fogpiszkáló segítségével vittük fel a plate megfelelő helyeire, minél vékonyabb rétegben, illetve minél egyenletesebben elosztatva. Száradás után mielőbb felvittük a mátrix oldatot is, majd a kikristályosodása után behelyeztük a lemezt a műszer mintabeviteli egységébe.

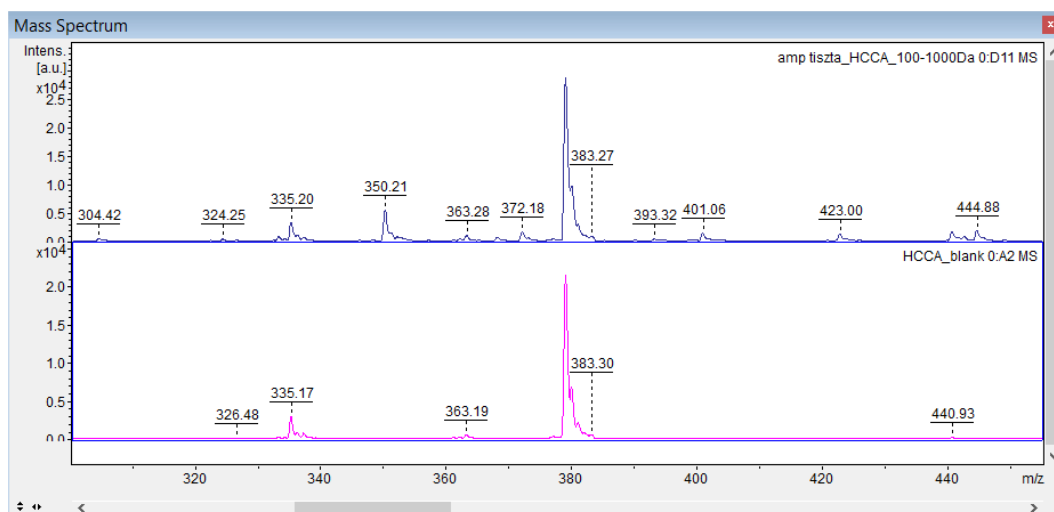
3.2. Mérési paraméterek kis molekulatömegű anyagok vizsgálatánál

- Mérés pozitív lineáris módban
- Mérési tartomány (tömeg): 100 Da – 1000 Da
- Maximális lézer frekvencia

3.3. Tiszta antibiotikum oldatok kalibrálása

A méréseket a vizsgált antibiotikum (ampicillin) intakt spektrumának felvételével kezdtük el. Az adott antibiotikum port megfelelő oldószerben feloldottuk, kísérleteinkben az oldószer minden esetben RNáz- és DNáz-mentes desztillált víz volt. Az oldat koncentrációját a szakirodalomban leírt hasonló kísérletek alapján próbáltuk beállítani. A koncentrációt módosítani voltunk kénytelenek, ha az irodalomban leírt koncentrációk oldhatósági problémák miatt nem voltak kivitelezhetők. A feloldott antibiotikumot több párhuzamosban vittük fel a mintatartó lemezen lévő spot-ok felszínére. Az oldatok beszáradása után a lehető leggyorsabban felvittük a mátrix oldatot, majd ennek beszáradása után végezhető volt a MALDI-TOF MS mérés.

A kísérletek tervezésekor figyelembe vettük, hogy először egy olyan antibiotikummal kell elvégeznünk az alapozó méréseket és a kalibrációt, melyről ismert a megadott paraméterekkel felvehető intakt és módosított spektrum is. A követett módszertani cikkben részletezett eredményeket első méréseinkkel reprodukálni tudtuk (1. ábra), a spektrum kalibrációja után a módszer így alkalmassá válhatott enzimtevékenység közvetett vizsgálatára.



1. ábra Intakt ampicillin, illetve a vak kontroll (víz + mátrix) spektrogramjai.

Jól megfigyelhetők ampicillinnél az ismert 350 Da, 372 Da és a gyengébb 393 Da-os marker csúcsok. A vak kontrollnál látható csúcsok természetesen „kivonandók” a mátrix oldatot is tartalmazó ampicillin oldat spektrumából. A spektrumon látható egyéb csúcsok ismereteink szerint a vizsgálat szempontjából jelentőséggel nem bírnak. A mátrix dimerizálódó molekulája 380 Da-nál látható mindig a vizsgált tartományban (~300-450 Da).

A műszer kalibrálása Maldi Biotyper Realtime Classification szoftver segítségével, esetünkben belső kalibrációval történhet meg.

Optimális energiájú lézerrel szükséges végezni a méréseket, azért, hogy megfelelő intenzitású és felbontású csúcsokat kapjunk, melyek elemzésével a kis mennyiségű analitot tartalmazó felvitt anyag is jól analizálható. A használt lézer energiájának optimalizálása lehet automatikus, illetve végezhető manuálisan is, ami minden egyes közepes intenzitású spektrum felvételéhez lehetővé teszi annak beállítását.

Antibiotikum oldatok kalibrálása során törekszünk arra, hogy ne használjunk túlságosan nagy energiájú lézert (10-20% megfelelő), így érhetjük el a mintából a gáz fázisba felszabaduló mátrix és analit molekulák megfelelő arányát, és könnyebben tudunk detektálni. Inkább sok kisebb vagy átlagos intenzitású spektrumot veszünk fel ugyanarról a mintáról, és ezeket összegezzük a kívánt relatív intenzitás (kb. 10 000) eléréséig.

A program elvégzi a görbeillesztést, és matematikai műveletek (alapvonal kivonás, illetve simítás a zaj csökkentése érdekében) segítségével tesszük a kapott spektrumokat könnyebben elemezhetővé.

A kalibrációt a flex analysis segítségével végezzük el, és a mátrixot használjuk fel hozzá. A belső kalibráció előnye, hogy nem kell külön kalibráló oldatot felvinnünk, magában a mintában benne van az az anyag, amivel kalibrálunk. A mátrix összetételét, ionjainak tömegét ismerjük, így a szoftver a referenciacsúcsok megkeresése után „ráhúzza”, ráilleszti a spektrogramot az ismert tömegszámoknak megfelelő helyre. Úgy mozgatja a tömegszám skálát, hogy a két legnagyobb intenzitású csúcs pontosan a „helyére” kerüljön. Ha 1 tömegszám egység alatt van az eltérés, a kalibrációt elfogadhatónak tekinthetjük.

Ha elvégeztük a kalibrációt, az e kettő között elhelyezkedő csúcsok biztosan pontosak, illetve jobban összehasonlíthatóak.

3.4. Antibiotikumokkal végzett kísérletek kivitelezése

A módszer elve, hogy ha az antibiotikum oldatban 3 órán át inkubált baktérium rendelkezik extracellulárisan jelen lévő, antibiotikumot módosítani, hatástalanítani képes enzimmel (jelen esetben β -laktamázzal), akkor az oldatban lévő antibiotikum módosul. Negatív kontrollok és az intakt antibiotikum párhuzamosai mellett kimutatható, hogy melyek azok az észlelhető változások a spektrumban, melyek biztosan az enzimtevékenység következményei. Tesztjeinkben mindig az alábbi kontrollok párhuzamos mérését is elvégeztük:

- baktériumot nem tartalmazó, tiszta, intakt antibiotikum oldat
- antibiotikumot nem, de baktériumot tartalmazó szuszpenzió
- vak kontroll: csak oldószer (víz) (+mátrix)

Elsődleges kontrolltörzseink egy igazoltan β -laktamáz termelő BLPACR *Haemophilus parainfluenzae* és két ESBL-termelő: egy *Escherichia coli* és egy

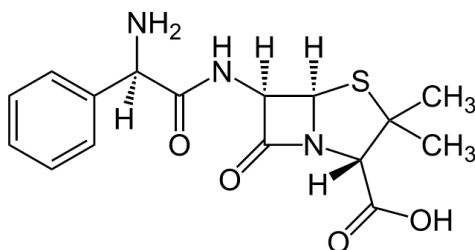
Stenotrophomonas maltophilia voltak. Az adott rezisztencia fenotípusok azonosítása hagyományos metodikával történt:

- a *Haemophilus* törzs (8) az erős nitrocefin-teszt pozitivitás (β -laktamáz aktivitás) mellett korongdiffúziós módszerrel AMP és AMC rezisztens:
 - BLPACR törzs
- korongdiffúziós eljárással észlelt „kulcslyuk jelenség” egy *Escherichia coli* (4) és egy *Stenotrophomonas maltophilia* (15) törzs esetén:
 - ESBL-termelő törzsek

4. Eredmények és értékelésük

4.1. β -laktamáz aktivitás detektálása

Első vizsgálatainkat ampicillinnel végeztük, melynél irodalmi adatok [27] alapján ismertük azokat a változásokat, melyek β -laktamáz aktivitás révén következhetnek be a β -laktám gyűrűt tartalmazó antibiotikum szerkezetében, mind az alapmolekula, mind természetes ionvegyületei esetén (2. ábra).

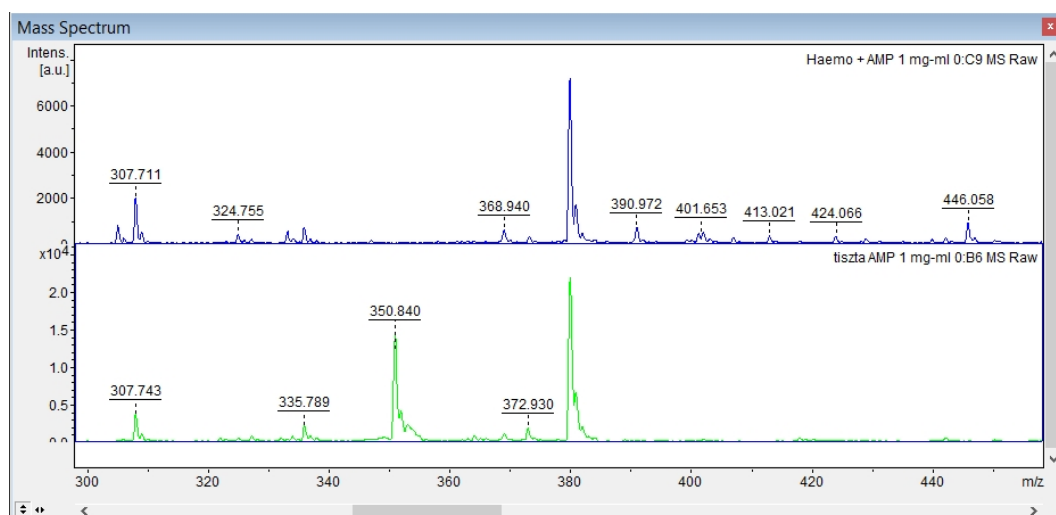


ampicillin ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$, 349 Da)

intakt	350 Da	372 Da	394 Da	394 Da
	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+2Na]^+$	$[M+2Na]^+$
módosított	324 Da	368 Da	390 Da	411 Da
változás	dekarboxiláció	hidrolízis + H^+	hidrolízis + Na^+	hidrolízis + $2Na^+$
	$[M-CO_2+H_2O+H]^+$	$[M+H_2O+H]^+$	$[M+H_2O+Na]^+$	$[M+H_2O+2Na]^+$

2. ábra Az ampicillin intakt molekulája és módosulatai.

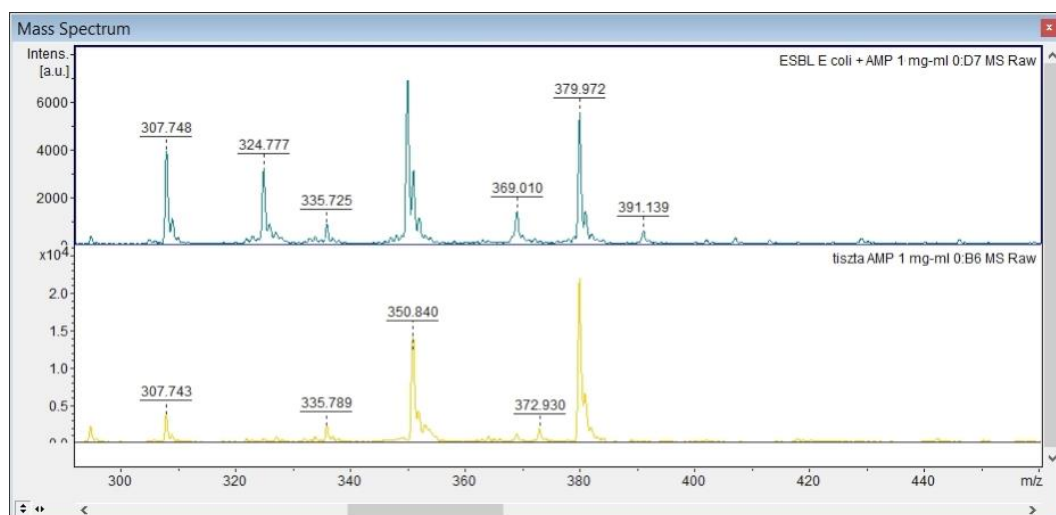
Pozitív kontrollként használt baktériumtörzsainkkal végzett kísérleteink során az itt felsorolt változások közül hármat sikerült detektálnunk. A 411 Da-os csúcs – az irodalmi adatokkal ellentétben – szinte sosem volt egyértelműen detektálható.



3. ábra BLPACR *H. parainfluenzae* (8. törzs) ampicillin-bontási kísérlete.

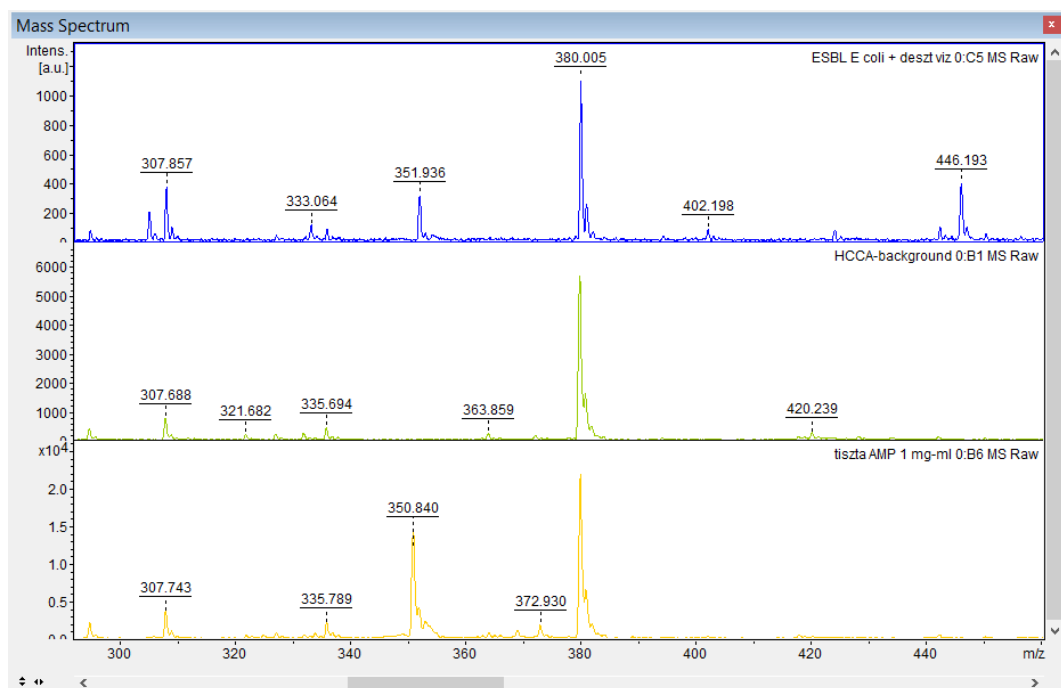
A vizsgálati módszer eredményességének első szemléltetésére a 8-as számú törzsünk (BLPACR *H. parainfluenzae*) példája talán a legmegfelelőbb (3. ábra). β -laktamáz aktivitása révén az oldatban lévő ampicillint képes volt módosítani az inkubáció során, a módosított antibiotikum spektrum (3. ábra felül) jól láthatóan különbözik a kritikus peak-ek tekintetében az intakt ampicillin spektrumától (3. ábra alul). A legnyilvánvalóbb változás a 350 Da-os csúcs teljes „elemészése”, 324 Da-nál megjelent a várt termék csúcsa is. Szintén kiválóan látható a 372 Da-os csúcs szinte teljes eltüntetése és egy csúcs „erősödése” 368 Da-nál. Az irodalom által elvárt 394 Da - 390 Da átalakítást ebben a kísérletben nem sikerült detektálni, valószínűleg azért, mert még az intakt antibiotikum oldat sem tartalmazta a kiindulási 394 Da-os csúcshoz tartozó kiindulási molekulát. Ettől függetlenül azonban az enzimatikusan kezelt ampicillin spektrumában mégis megjelent egy csúcs 390 Da-nál, azaz lehetséges, hogy más kiindulási molekulából származik ez a termék. Elméleti feltételezésünk szerint nem teljesen valószínű az irodalomban leírt $[M+2Na]^+$ forma jelenléte, ezért nem tudjuk ezt detektálni.

Az ESBL-termelő *E.coli* törzzsel elvégzett ugyanilyen kísérlet némileg eltérő eredményeket adott (4. ábra). A tiszta, intakt ampicillin oldatban a marker csúcsok legtöbbje természetesen ugyanúgy és ugyanott jelen volt.



4. ábra ESBL-termelő *E. coli* izolátum (4. törzs) ampicillin-bontási kísérlete.

A 350 Da-os csúcs kiindulási molekulájából kialakuló 324 Da-os termék egyértelműen létrejött az enzimatis működésnek köszönhetően, a 350 Da-os csúcshoz tartozó alapmolekula azonban láthatóan megmaradt még a kezelés után is (a két spektrum léptéke különböző, így mennyiségi következtetéseket ebből levonni ezért sem lehet). A 372 Da – 368 Da átalakulás itt is jól látható (a kezdeti kalibrációs problémák miatt itt még 373 Da – 369 Da m/z értékként látszik). Az előző példához hasonlóan, itt is megjelent a 390 Da-os csúcs (itt kissé még elcsúszva 391 Da-nál), mely sem a negatív kontrollban (baktérium+víz), sem a vak kontrollban nincs jelen (5. ábra), azaz valóban az ampicillin valamilyen bomlásterméke lehet.



5. ábra Párhuzamos negatív kontrollok (csak baktérium; vak; intakt ampicillin).

Újonnan megjelenő csúcsok esetén mindig meg kell arról győződnünk, hogy az szerepel-e valamelyik negatív kontrollban is, mert ez alapján kiszűrhetők esetleges tévedések. Ha az új csúcs létezik egy párhuzamos negatív kontrollban is, akkor nyilvánvalóan nem az antibiotikum bontásából származó termékről, hanem valamilyen műtermékről van szó (a műtermék eredete így ki is következtethető).

Az eddigi adatokat összefoglalva az eredmények jobban értelmezhetők:

	törzs ID#	350 → 324	372 → 368	394 (?) → 390	394 (?) → 411
BLPACR <i>H. parainfluenzae</i>	8. (3154/2015)	+	+	+	-
ESBL <i>E. coli</i>	4. (3024/2015)	+	+	+	-

Következő lépésként az eddigi eredmények reprodukálhatóságáról kellett megbizonyosodnunk, a vizsgálatok ismétlésével visszakaptuk az eredményeket, az eddigi adatok tehát nem véletlenszerű egyezések voltak az irodalmi adatokkal.

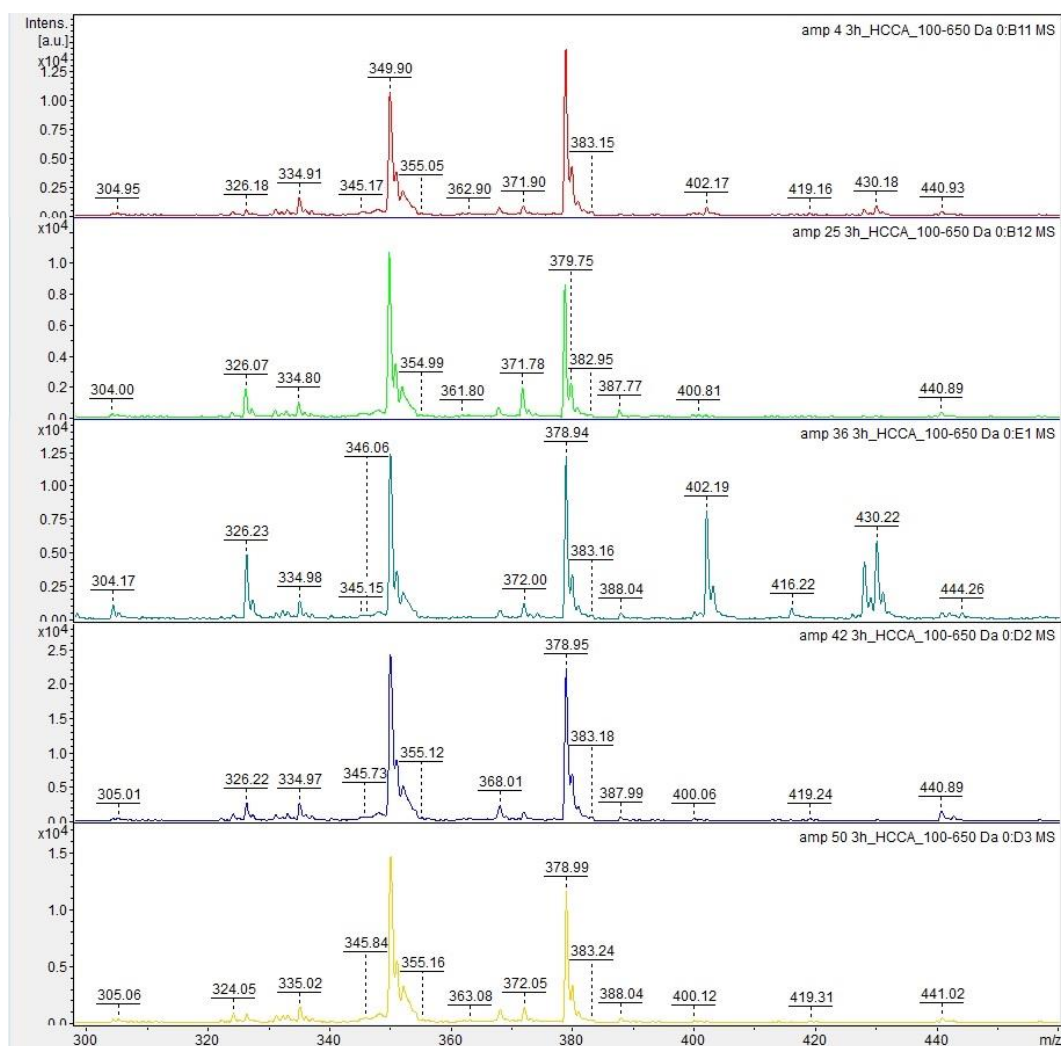
4.1.1. Vizsgálatok optimalizálása

Fals eredmények elkerülése érdekében mindig szükség van a végzett vizsgálatok optimalizálásra is. Kísérleteinkben a következő fő paramétereket teszteltük, melyek befolyásolhatják a mérések minőségét: antibiotikum spontán bomlása, enzimreakciók hőmérsékleti optimuma, alkalmazott antibiotikum koncentrációja a reakciókban és az inkubációs idő.

4.1.1.1. Antibiotikum spontán bomlása

Különböző hőmérsékleteken az általánosan használt inkubációs időt használva vizsgáltuk ezt a paramétert. Amennyiben spontán módon is detektálható valamilyen hidrolízis vagy egyéb változás az „enzim-mentes” tesztekben, akkor ezek a módosulások már nem használhatók később az enzimreakciók vizsgálatára.

Az ampicillin esetén a spontán hidrolízis ismert jelenség, korábbi kolorimetriás tesztekben kimutatták, hogy már 1 óra 25°C-on történő inkubáció után spontán bekövetkezik [32]. A jelenséget részben saját kísérleteink is igazolták: a másodlagos marker peak-ként vizsgált 372 Da – 368 Da átalakulás (hidrolízis) azokban a mérésekben is megfigyelhető volt kisebb-nagyobb mértékben, melyekben semmilyen enzimtevékenység nem volt. A vizsgálatot különböző hőmérsékleteken elvégezve azt találtuk, hogy a spontán bomlás jelensége miatt az említett markerváltozás (melyet a módszertani szakirodalomban nem említene) a fentiek miatt nem megbízható marker a különböző enzimműködések vizsgálatára ampicillint alkalmazva (6. ábra). Ezen eredmények miatt az „éles” tesztek értékelése sokban módosul a továbbiakban. Egyéb spontán bekövetkező módosulást nem tapasztaltunk.



6. ábra Az ampicillin spontán bomlásának vizsgálata standard 3 óra inkubációs idővel különböző hőmérsékleten (4°C, 25°C, 36°C, 42°C és 50°C).

Az ampicillin spontán hidrolízise az összes vizsgált hőmérsékleten többé-kevésbé megtörtént, a 42°C és az 50°C-on végzett inkubálás után az eredeti 372 Da-os csúcs intenzitásához képest a 368 Da-os csúcs intenzitása látszólag növekedett is. A vizsgálandó kritikus zónában (300-450 Da) más, hidrolízisre utaló változást nem észleltünk. A 326 Da-nál jelentkező csúcs (25, 36 és 42°C) nem egyezik meg a 350 Da 324 Da átalakulásnál keresendő marker csúcscsal. Párhuzamos vizsgálatban a 324 Da-os marker láthatóan a 326 Da-os csúcstól elkülönülten volt megtalálható a megfelelő reakcióban. Ez tehát nem kalibrációs hibából eredő jelenség. A 36°C-on végzett párhuzamosban 3 új, nagy intenzitású csúcs is jelentkezett: 402, 428 és 430 Da,

jelentőségüket nem ismerjük, baktériumokkal végzett kísérletekben nem volt tapasztalható.

4.1.1.2. Inkubáció különböző hőmérsékleteken

Egyetlen, általánosan használt hőmérsékleti optimum ilyen jellegű vizsgálatoknál nem lehetséges, mert nem egyféle enzim tevékenységének eredménye az antibiotikum módosítása, sőt néha több enzim is lehet jelen egy baktériumban. Ezen enzimek hőmérsékleti optimumai különbözőek. Emiatt ismert enzimek esetén megállapítható és használható ugyan ilyen optimum, de ismeretlen enzimek esetén ez nem lehetséges, csak egy általános hőmérséklet választható az eljáráshoz. Mivel kísérleteinkben humán kórokozókkal és ellenük használt antibiotikumokkal foglalkozunk, így az emberi test hőmérsékletén (36-37°C) kell tesztelnünk az adott mikrobák enzimátikus tevékenységét is.

Kísérleteket ennek ellenére végeztünk kontrolltörzseink enzimeinek hőmérsékleti optimumának kimutathatóságára (Függelék 1. és 2. ábra).

A vizsgált BLPACR *H. parainfluenzae* törzsünk (8. törzs) β -laktamáza 25°C, 36°C és 42°C hőmérsékleteken egyaránt képes volt véghezvinni a reakciót. Az említett hőmérsékletek között sem intenzitásbeli, sem minőségi különbségek nem fedezhetők fel, de az ismert, hogy *Haemophilus* törzseknél 97,3%-ában TEM-1 típusú β -laktamáz van jelen [33], mely hőmérsékleti optimuma 37°C [34].

Vizsgált ESBL-termelő törzsünk (*S. maltophilia*) (15. törzs) esetében az eredmények gyakorlatilag ugyanazok lettek, mint az előző (8.) törzs esetében.

Mindkét kísérletben 25°C-tól 42°C-ig gyakorlatilag bármelyik inkubálási hőmérséklet megfelelő volt, és mindkét kísérletben az 50°C-os inkubáció már csak kis intenzitású és minőségében is jelentősen romlott eredményeket adott.

4.1.1.3. Antibiotikum koncentráció

A méréseink megfelelő kivitelezésének alapvető feltétele annak ismerete, hogy milyen koncentrációban optimális az adott antibiotikum tömegspektrometriás mérése. Intakt ampicillin hígításaival végzett mérésekkel állapítottuk meg az alsó és felső határokat: 0,1 mg/ml már mérhető, de még nem optimális érték, 5 mg/ml koncentrációtól telítettség miatt már oldhatósági problémák lépnek fel. Optimális koncentrációként 1 mg/ml értéket javasunk (Függelék 3. ábra). A koncentráció további emelése nem szolgáltat részletgazdagabb felbontást (Függelék 4. ábra). Tapasztalataink szerint az ampicillin vízben (pH 7,0) való oldhatósági felső határa 1-5 mg/ml. A követett módszerben leírt 10 mg/ml nem volt megvalósítható. Kísérleteinket 1 mg/ml koncentrációjú oldatokkal végeztük.

4.1.1.4. Inkubációs idő

Fontos paraméter az inkubációs idő: minél rövidebb idő alatt tudjuk a rezisztenciát detektálni, annál gyorsabban kerül eredmény a klinikushoz és tudja alkalmazni őket a kezelés során. Kísérletünkben különböző inkubációs időket alkalmazva vittük fel a mintatartó lemezre az azonos egyéb körülmények közötti ampicillin oldatokat, majd mértük a szokásos eljárással a bontási termékek jelenlétét.

A méréseket a 8. számú *H. parainfluenzae* törzsünkkel végeztük. A legmagasabb inkubációs idővel kezdve indítottuk a vizsgálatot (180'), majd sorban a rövidebb inkubációs idejűeket indítottuk el (120', 60', 30'). A 180 perc letelte után felvittük a plate-re a felülúszókat a szokásos protokollunk alapján és mátrix hozzáadása után mértük a spektrumokat.

Eredményeink alapján az inkubációs idő jelentősen rövidíthető volt a szakirodalomban elvárt 3 órás időnél. Kísérleti törzsünk erős β -laktamáz termelő, így egyelőre ezekből az eredményekből csak arra következtethetünk, hogy ideális esetben (erős β -laktamáz termelés) rövidíthető is a vizsgálat.

Az eredményekből jól látszik, hogy már a 30 perces inkubáció után is mérhető mennyiségű 324 Da-os ampicillinmódosulat alakult ki. Később (60 perc és utána) már az eredeti 350 Da-os intakt ampicillin csúcs sem volt detektálható (Függelék 5. ábra).

4.1.1.5. A mátrix

A MALDI-TOF MS vizsgálatokban manapság a legelterjedtebb mátrix anyag a HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid), melyet a szakirodalom mind az identifikációs eljárásokhoz, mind az érzékenységi kísérletekhez is ajánl. Saját kísérleteinkben e mátrixnak két „típusát” volt módunkban kipróbálni: a Sigma-Aldrich® 99,0% és $\geq 99,0\%$ („suitable for MALDI-TOF MS”) tisztaságú HCCA mátrixát. Az összehasonlító vizsgálatok eredményeiből hamar kiderült, hogy csak a nagy tisztaságú anyag elfogadható számunkra az érzékenységvizsgálatokhoz.

4.1.2. Eredményességet befolyásoló egyéb tényezők, tapasztalatok

Kísérleteink során számos apró részletre lettünk figyelmesek, néhány olyan kisebb tényezőt tapasztaltunk, melyek, ha csak kis mértékben is, de befolyással bírhatnak a végeredmények minőségére. Ezeket a megfigyeléseinket az alábbiakban foglaljuk össze:

- Érzékenységi tesztekhez frissen készített antibiotikum oldatok szükségesek.
- Érzékenységi tesztekhez frissen átoltott (24 órás) tenyészetek szükségesek.
- A MALDI-TOF MS mérésekkel párhuzamosan még szükségesek a hagyományos érzékenységvizsgálatok is. Az új módszer nem validált, egyelőre csak tájékoztató jellegűek az így kapott eredmények.
- Mindig duplikátumban kell felvinni az egyes kísérletek termékeit, mert környezeti hatásokra nagyon érzékeny mintákkal dolgozunk.
- Mindig alkalmazandó többféle negatív kontroll is párhuzamosan.
- A mikroba törzsek antibiotikumos oldatba való beviteléhez műanyag fogpiszkálót érdemes használni, mert a fából készült a kis mennyiségű oldatból sokat fel is szívhat a használat során.
- Az inkubációs idő után a felülúszóból a plate-re felvitt oldat mennyisége limitált, maximum 3 μ l vihető fel egy spot-ra, optimálisan 1-2 μ l felvitele elegendő.

A nagyobb térfogatok felvitelekor a beszáradási idő is lassú, így a szobahőmérsékleten sokáig párolgó oldatban az adott kísérletet már esetleg befolyásoló történések is végbemehetnek.

- A problémát megpróbáltuk áthidalni azzal, hogy az először felvitt 2 µl beszáradása után egy újabb 2 µl-t vittünk fel és szárítottunk rá a spot-okra. Tapasztalataink szerint azonban jelentős változás így sem érhető el.
- Az oldatok beszáritása után minél hamarabb fel kell vinni rá a mátrixot is.
- Ha nincs mód a mátrix oldat azonnali felvitelére, a plate a beszáradás után -20°C-on lefagyasztandó. A felolvasztásnak folyamatos légáramú sterilfülke alatt kell történnie, mert különben a levegő párája kicsapódik a lemezen és a spot-okon lévő felvitt anyagok összefolynak.
- Ha nincs mód a mátrix felvitele és beszáradása után a mérésre, a mintatartó lemez ilyen állapotában már +4°C-on is eltárolható a mérésig.
- Hőmérsékleti vagy más optimumok pontos felderítésére módszerünk nem alkalmas, csak tájékozódási lehetőséget biztosít. Az egyes reakciókban végbement enzimtevékenységek kvantifikálása egyelőre nem lehetséges.
- A spektrometriás vizsgálatok mért m/z tartománya szintén beállítható, így csak a kívánt tartományban vesszük fel a spektrumokat, ha ismerjük a keresett termékek (és módosulataik) molekulaméreteit.
- Az ábrákon látható marker csúcsok apróbb eltolódásai az alacsony m/z tartományban végzett mérések finom kalibrációjának kezdeti nehézségeiből adódtak. Az eltolódások mértéke azonban sohasem haladta meg azt a mértéket, hogy az egyértelmű kiértékelést zavarta volna.

4.1.3. Klinikai izolátumok vizsgálata

Kísérleteink célja az volt, hogy a módszer lépésről-lépésre történő kifejlesztése után használni tudjuk a rutin klinikai mikrobiológiai laboratóriumban izolált törzsek tesztelésére is. Eddigi eredményeink alapján a módszer használható, így az alapozó

kutatásainkban használt ampicillinnel teszteltünk is egy sor klinikai baktériumot. Az adott törzsekből előzetesen természetesen hagyományos érzékenységvizsgálatokat is végeztünk. A kiválasztott törzsek listáját a Függelék 1. táblázata tartalmazza. A törzsek kiválasztása a hagyományos vizsgálattal egyértelmű ampicillin érzékenység vagy rezisztencia alapján történt. Ampicillin rezisztencia esetén a törzs érzékenységi „fenotípusát” is igyekeztünk felderíteni (ESBL, BLPACR, stb). A kapott ampicillin bontási MALDI-TOF MS spektrumokat a Függelék 6-8. ábrái mutatják be részletesen.

4.1.3.1. Eredmények interpretálása, megvitatása

ID #	faj	érzékenységi „fenotípus”	MALDI-TOF MS eredmény		
			350 → 324	372 → 368	394 → 390
1	<i>E. coli</i>	AMP érzékeny	-	-	-
2	<i>E. coli</i>	AMP érzékeny	-	-	-
3	<i>E. coli</i>	AMP, AMC rezisztens	+/-	+	+
4	<i>E. coli</i>	ESBL	+	+	+
5	<i>K. oxytoca</i>	minden β-laktámra rezisztens	+/-	+	+
6	<i>H. parainfluenzae</i>	BLPACR	+	+	+
7	<i>H. parainfluenzae</i>	BLNAR	-	-	-
8	<i>H. parainfluenzae</i>	BLPACR	+	+	+
9	<i>H. parainfluenzae</i>	BLPACR → BLNAR	-	-	-
10	<i>H. influenzae</i>	AMP érzékeny	-	-	-
11	<i>H. parainfluenzae</i>	MDR, nem BLPAR/BLPACR	-	-	-
12	<i>H. parainfluenzae</i>	AMP érzékeny	-	-	-
13	<i>H. parainfluenzae</i>	BLNAR	-	-	-
14	<i>E. coli</i>	AMP, AMC rezisztens	+/-	+	+
15	<i>S. maltophilia</i>	ESBL	+/-	+	+
16	<i>E. coli</i>	AMP, AMC rezisztens	+/-	+	+
17	<i>H. parainfluenzae</i>	BLPACR	+	+	+
18	<i>K. oxytoca</i>	AMP, AMC rezisztens	+/-	+	+
19	<i>C. braakii</i>	AMP, AMC rezisztens	+/-	+	+
20	<i>E. coli</i>	minden β-laktámra rezisztens	+/-	+	+
21	<i>E. coli</i>	AMP érzékeny	-	-	-
22	<i>S. maltophilia</i>	AMP érzékeny (in vitro)	-	-	-
23	<i>H. parainfluenzae</i>	AMP érzékeny	-	-	-
24	<i>E. coli</i>	ESBL	+/-	+	+

2. táblázat Klinikai törzsek MALDI-TOF MS vizsgálata ampicillin bontásra.

Jelmagyarázat: + = validnak ítélt ampicillin módosítás;

+/- = nem teljes, de valid módosítás (kiindulási forma is marad);

- = nem történt módosítás (csak az eredeti forma látható).

A tömegspektrumok egyetlen eset kivételével mindig igazolták a hagyományos technikával kapott érzékenységi eredményeket. A kivételes esetről ellentmondást találtunk a hagyományos és a tömegspektrometriás mérés eredményei között: a 9. törzsünket (*H. parainfluenzae*) nitrocefín teszt pozitivitás és ampicillin rezisztencia alapján korábban BLPACR-nek minősítettük, de az ampicillin bontás a spektrumon egyértelműen láthatóan nem történt meg, így valószínűleg másmilyen ampicillinnel szembeni rezisztenciamechanizmus állhat a háttérben ennél az izolátumnál. A nitrocefín tesztet megismételve kétes eredményt kaptunk, az ampicillin bontási MALDI-TOF spektrum tehát objektívebb eredményt adott a hagyományos módszernél, vagyis az izolátum BLNAR törzs.

ESBL-termelő törzsek esetén a legtöbbször erős és egyértelmű bontás látszott mindhárom marker csúcsnál. Az ESBL enzimek sokféleségével magyarázzuk, hogy két esetben (15. és 24.) a 350 Da-os csúcsához tartozó intakt molekulából még detektálható mennyiség maradt az inkubáció után is.

Azokban az esetekben, ahol nagyon erős és egyértelmű β -laktamáz enzimtermelés volt jelen, mindig megjelent a vártakon kívül egy 406 Da-os csúcs is (4., 6., 8. és 17. törzseink). Érdekes módon mind a két fő enzimnél (BLPACR *Haemophilus* TEM-1 és ESBL) tapasztalható volt a jelenség, azaz nem kötődik egy bizonyos enzim egy bizonyos katalitikus tevékenységéhez, általánosabb dologról lehet szó. Eredetét vizsgálni fogjuk a későbbiekben.

A 388 Da-nál sorozatosan megjelenő csúcs valószínűleg az ampicillin K^+ ionja (7., 9., 10., 11., 12., 13. és 23. törzsek). Konzekvens megjelenésének okát egyelőre nem tudjuk, de mindig azoknál a reakcióknál detektáltuk, ahol β -laktamáz negatív *Haemophilus* törzset vizsgáltunk. Elméleti feltételezésünk szerint bakteriális tevékenység kapcsán kerülhet oldatba K^+ , illetve tűnhet el onnan a Na^+ , esetleg ezért tapasztaljuk ezen törzsek esetén csak a K^+ ionos formát.

Az eddigi eredmények alapján kijelenthető, hogy a módszer kiválóan alkalmazható ampicillin ellen ható enzimtevékenység detektálására. A három marker csúcs a legtöbb esetben egyszerre látható ugyan, de a 390 Da-os csúcs általában

alacsony intenzitású, a 368 Da-os csúcs pedig a spontán bomlást vizsgáló kísérletekben is detektálható volt, így ennek elfogadhatósága véleményünk szerint még bizonytalan. Enzimtevékenység jelenlétében eddig mindig teljes átalakulást tapasztaltunk (372 Da → 368 Da), míg a spontán bomláskor mindkét forma jelen volt kisebb-nagyobb mennyiségben a mintákban. Mivel azonban más markereknél is látható olyan eset (350 Da → 324 Da), hogy az enzimműködés egyértelmű jelenléte mellett megmarad az intakt forma is kis mennyiségben, így ez alapján ezt a kérdést eldönteni nem lehetséges.

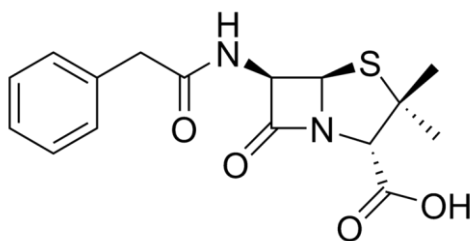
Az ampicillin három marker csúcsa alapján egyértelműen még nem sikerült kimutatni olyan mintázatbeli különbségeket, melyek egy-egy különböző enzim tevékenységére egyértelműen utalnának. Ez azonban lehet következménye az eddigi vizsgálatainkban szereplő kevés fajtájú enzimnek is.

A 411 Da-os marker csúcsot egyetlen β -laktamáz pozitív törzsnél sem tudtuk detektálni.

5. Penicillinnel végzett vizsgálatok

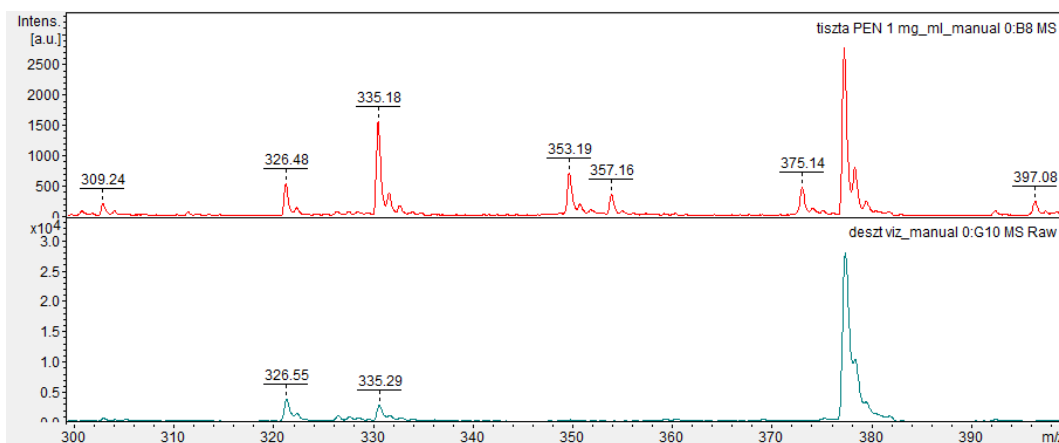
Az ampicillinnel végzett kísérletek célja nem csak ennek az egy antibiotikumnak és a vele való munkának a megismerése volt, hanem hogy a korábbi vizsgálatok során tapasztaltakat átültethessük más antibiotikumokkal való munkákra is. Ha a jövőben a tömegspektrometriás megközelítés a rutinszerű érzékenységvizsgálatokban valóban helyet kap, akkor biztosan szükség lesz több antibiotikum párhuzamos vizsgálatára is, illetve szükség lesz olyan kritikus antibiotikumok vizsgálatára is, melyek eredményei alapján akár teljes rezisztenciamechanizmusok tárhatók fel és interpretálhatók a vizsgált baktériumoknál. Ezek miatt kezdtünk el foglalkozni egy másik antibiotikummal is, először a penicillinnel. Választásunk a penicillinre könnyű és olcsó hozzáférhetősége és a vele szemben nagyon gyakran előforduló penicillináz tevékenység, rezisztencia miatt esett. A penicillinnel való munka minden metódusában igyekezett követni az ampicillinnél végzett kísérletet. A módszer újdonsága, hogy penicillinnel kapcsolatos tömegspektrometriás publikáció, kutatás, vagy egyéb tudományos anyag tudomásunk szerint még nem jelent meg.

Első lépésként itt is az intakt penicillin G és ionvegyületei megismerésével, „feltérképezésével” kezdtük a vizsgálatokat (7. ábra).



penicillin G (C₁₆H₁₈N₂O₄S, 334 Da)

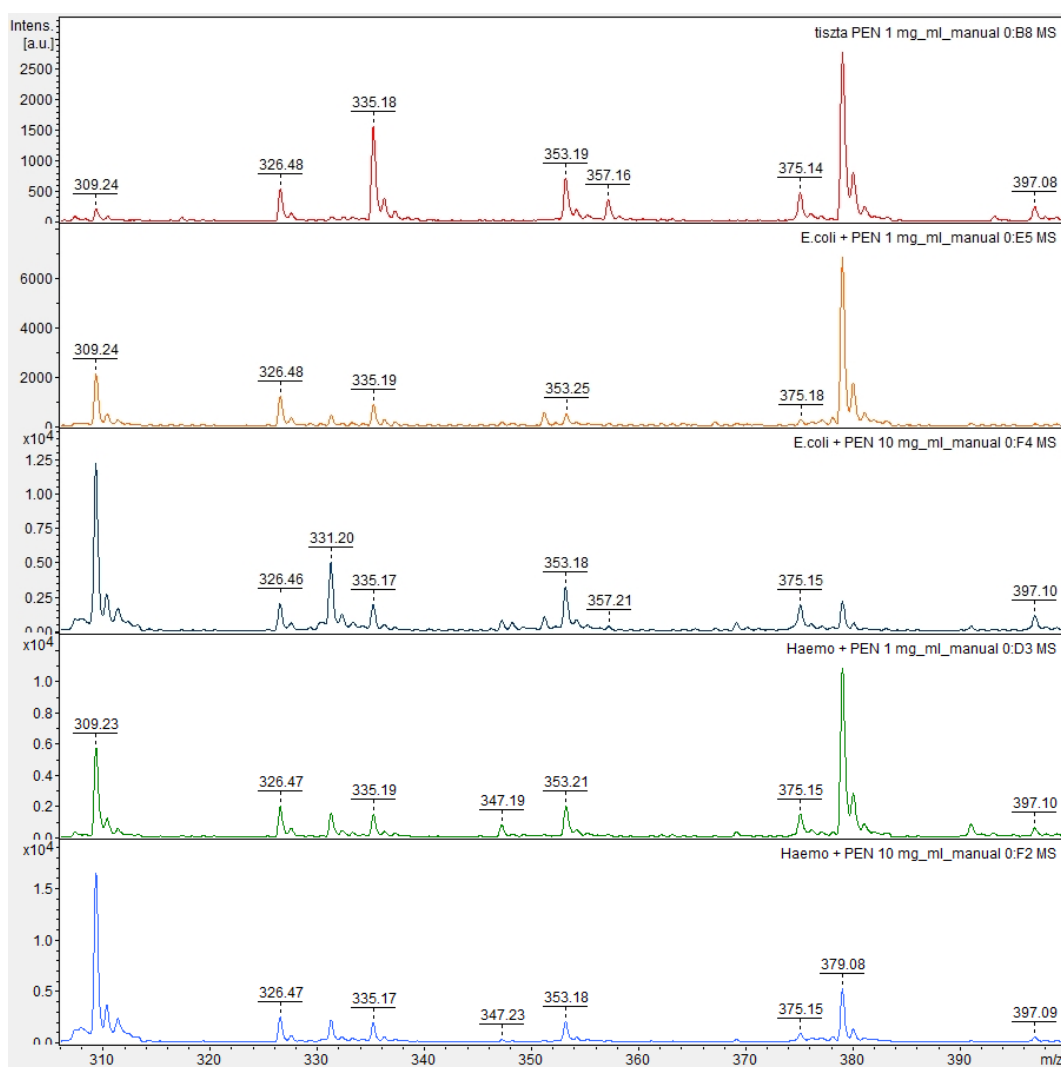
intakt	335 Da	357 Da	380 Da	380 Da
	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ⁺	[M+2Na] ⁺
módosított	309 Da	353 Da	375 Da	398 Da
változás	dekarboxiláció	hidrolízis + H ⁺	hidrolízis + Na ⁺	hidrolízis + 2Na ⁺
	[M-CO ₂ +H ₂ O+H] ⁺	[M+H ₂ O+H] ⁺	[M+H ₂ O+Na] ⁺	[M+H ₂ O+2Na] ⁺



7. ábra A penicillin G intakt molekulája, módosulatai és spektrogramja.

Mint az a 7. ábrán is jól látható, a kémiai elvárt m/z egységek jelen vannak az intakt penicillin spektrumában (380, 357, 335 Da), de sok számunkra kedvezőtlen jelenség is már az első pillanatban nyilvánvaló. Az első negatívum, a mátrix molekula dimerének és a 380 Da-os penicillin 2Na⁺ ionjának egybeesése. Másodszor, a vak kontrollban jelen van egy 335 Da közeli csúcs, ami szintén zavaró. Végül pedig, de nem utolsó sorban, szinte mindegyik módosulat mellett láthatóak különböző intenzitással bomlástermékek is, azaz a penicillin spontán bomlása sokkal komolyabb probléma kísérleteink szempontjából, mint az ampicillin esetében.

Mindezek ellenére természetesen próbát tettünk az alkalmazhatóságot illetően. ESBL-termelő *E. coli* törzsünk erős β -laktamáz termelése révén biztos pozitív kontroll ebben a kísérletben, az eredmény (8. ábra) mégis kétséges. Mind a kiindulási vegyületek, mind a bomlástermékek jelen vannak az enzimműködés után, de ez még nem elegendően különbözik az „intakt” penicillin spektrumától. Egyedüli különbségként felfedezhető, hogy a 357 Da-os csúcs eltűnése, illetve némely bomlástermék intenzitásnövekedése. A penicillin alkalmazott koncentrációjának növelésével ezek a különbségek jobban láthatók ugyan, de így sem egyértelműek az eredmények. A kísérletet BLPACR *H. parainfluenzae* törzsszel megismételve ugyanilyen eredményeket kaptunk.



8. ábra Penicillin bontása ESBL *E. coli*-val és BLPACR *H. parainfluenzae*-vel

5.1. Eredmények megvitatása

Mindezek értelmében a penicillin további alkalmazását elvetettük. Esetleg egy pontosabban optimalizált rendszerben történő alkalmazás, vagy egy nagyobb tisztaságú penicillin lehetne megoldás a problémákra, melynek alapos kikísérletezése terveink között szerepel.

6. Összefoglalás

A mikrobiológiai érzékenységvizsgálatok tömegspektrometriás megközelítése nagyon új és intenzíven kutatott területe a mai mikrobiológiának. Az eddig publikált módszerek egyelőre még csak azt a megfelelő utat keresik, mely alapján gyorsan és olcsón megvalósítható a hagyományos technológiával azonos minőségű érzékenységvizsgálat. A vonatkozó szakirodalom alaposabb megismerése után saját kísérleteinkhez kiválasztottuk azt a módszert, mely számunkra is és szinte bármely más rutin mikrobiológiai laboratórium számára is megvalósítható metodikát alkalmaz, és amellyel remélhetőleg a legígéretesebb eredmények érhetők el.

Kísérleteink eredményeképpen megállapítottuk, hogy az antibiotikum enzimátikus módosítása révén történő változás detektálható tömegspektrometriás eljárással. A kapott eredmények akár kontroll törzsekkel, akár klinikai törzsekkel vizsgálva a legtöbb esetben egyértelműek voltak. A kísérleteinkben vizsgált bakteriális β -laktamáz aktivitás kb. 3-4 óra alatt detektálható, ami jelentősen rövidebb inkubációt jelent a hagyományos, tenyésztésen és korongdiffúzió alapuló érzékenységvizsgálatnál. Természetesen azonban eredményeink még csak egyetlen antibiotikumra vonatkoznak egy kísérlet során minden esetben. Alapvető célkitűzésünket, hogy a β -laktamáz aktivitás mérésének módszerével elkezdve a kísérletsorozatot, eljutunk a módszer optimalizálásán keresztül a laboratóriumunkban előforduló klinikai törzsek vizsgálatáig, elértük.

Megállapítottuk, hogy az ampicillin enzimátikus módosítása során keletkező termékek spektrometriásan detektálhatók, az eredeti molekuláktól könnyen elkülöníthetők. A módszer optimalizálása után viszonylag kevés munkával megvalósíthatók a mérések. Az egyik ilyen marker peak (350 Da $\rightarrow$ 324 Da) jelenléte vagy hiánya egyértelmű eredményt adott minden általunk vizsgált minden esetben. A

372 Da → 368 Da átalakulás szintén jól detektálható legtöbbször, de az ampicillin spontán bomlása során is tapasztalható ugyanilyen (bár nem teljes) átalakulás, így ez a marker véleményünk szerint egyelőre csak fenntartásokkal fogadható el. A 394 Da → 390 Da átalakulás legtöbbször szintén detektálható, de csak a 390 Da-os „végtermék” észlelhető, és intenzitása is jóval alacsonyabb a megbízható 324 Da-os marker peak-nél. Megállapítottuk, hogy a legmegbízhatóbb „marker peak-nek” a 350 Da → 324 Da átalakulás tekinthető.

Klinikai izolátumokkal végzett kísérleteink eredményei – egyetlen törzs kivételével – minden esetben megegyeztek a hagyományos eljárással végzett érzékenységi eredményekkel. A kivételként említett törzs esetében a MALDI-TOF MS vizsgálat eredménye bizonyult a megfelelőnek és kiderült, hogy a hagyományos vizsgálat (nitrocefin teszt) eredménye volt kevésbé objektív.

Megállapítottuk, hogy a nitrocefin teszten alapuló hagyományos eljárás sok esetben szubjektív (piros /„nem eléggé” piros), a tömegspektrometriás mérések eredményeit objektíveknek találtuk.

A marker peakek kísérleteink alapján nem adnak olyan mintázatot, mely egyedileg tükrözné egy-egy enzimtípus működését, bár egyelőre csak kevés ilyen típust volt módunk megvizsgálni. Teljes és nem teljes átalakulásokat észleltünk ugyan, ezek háttérében még csak feltételezzük egy-egy különböző típusú ESBL enzim jelenlétét (15. és 24. ESBL-termelő törzseink).

A különböző inkubálási hőmérsékleteken végzett kísérletek különbségeket alig mutattak, ez felveti annak lehetőségét, hogy a jövőben majd elkészülő, ilyen irányú tesztek (vagy gyorstesztek) akár szobahőmérsékleten is végezhetőek lehetnek majd. Ráadásul, a tiszta antibiotikummal végzett kísérletek tanulsága szerint, az antibiotikum spontán bomlásának veszélye is kisebb lehet 25°C-on végzett kísérletekben.

A különböző inkubációs időkkal végzett kísérletek eredményeként valószínűsítjük, hogy már akár 30 perc – 1 óra inkubáció után is detektálható az ampicillinnel szemben mutatott rezisztencia, vagyis tovább rövidíthető a kiadott eredmény a klinikum felé.

Penicillinnel végzett munkánk során az ampicillinnel végzett kísérletek tapasztalatait alkalmaztuk és ezen keresztül sikerült megállapítani, hogy a módszer

alapelvei más antibiotikumok esetében is működőképesek, de mindenképpen egyedi optimalizálást igényelnek az egyes szerek. A jövőben újabb és újabb antibiotikumok kipróbálást tervezünk.

Eddigi kísérleteink alapozó jellegűek voltak, de eredményeink biztatóak és esetleg kiindulási alapul szolgálhatnak további vizsgálatokhoz, vagy reményeink szerint akár még egy nagyobb léptékű folyamatnak is részei lehetnek.

7. További terveink, hosszabb távú célkitűzéseink

Egyik fő, hosszú távú célunk, hogy olyan optimalizált antibiotikum bontási reakciókat állítsunk be, melyek pozitív/negatív eredményei alapján nagyobb és jelentősebb érzékenységi fenotípusok is differenciálhatók (például: cefoxitin *Staphylococcus aureus*-nál), amelyekkel egész rezisztenciamechanizmusok jelenléte vagy hiánya dönthető el.

A közeljövőben tervezünk olyan kísérletek lefolytatását, melyeknél párhuzamosan antibiotikumot és enzim-inhibítort is tartalmazó reakciókat mérnénk (pl. ESBL esetén klavulánsav).

Szeretnénk olyan antibiotikumot találni ugyanilyen elvű kísérletekhez, amely képes elkülöníteni a hagyományos eljárással csak nehezen, lassan és körülményesen differenciálható β -laktám érzékenységi típusokat (cefalosporinázok, ESBL-ek, AmpC-k, metallo- β -laktamázok, stb). Szeretnénk ezeket a főbb típusokat egymástól elkülöníteni, majd – ha van rá lehetőség – ezeken az enzimesaládokon belüli altípusokat is differenciálni.

Ugyanezen az elven a *Haemophilus* törzseknél körülményesen és nem mindig egyértelműen elkülöníthető BLPACR, BLPAR és BLNAR rezisztenciamechanizmusok differenciálását is szeretnénk egy ilyen módszerrel egyszerűbbé és objektívebbé tenni.

Szeretnénk a kórházhigiéniai szempontból is nagyon fontos karbapenemáz termelés kimutatását szintén ilyen elvű módszerre átvittetve kidolgozni, mert ennek gyors diagnosztizálása fontos kérdés a klinikai mikrobiológiában.

Szeretnénk a lassú növekedésű mikrobák (gombák) esetében is végezni ilyen irányú vizsgálatokat a jövőben.

Szeretnénk egy ún. MALDI-TOF-TOF MS készüléken is méréseket végezni, mely lehetővé teszi az adott molekulák olyan pontos m/z szerinti mérését, mely alapján egyszerű szoftveres támogatottsággal még az atomi összetétel is kiszámolható. Ennek rendkívüli jelentősége számunkra az, hogy kimutatható lenne, hogy egy adott ismeretlen enzimtevékenység révén milyen molekuláris átalakulás történt a vizsgált antibiotikummal.

Szeretnénk eddigi munkánkat tovább folytatni – fent említett céljaink közül minél többet megvalósítva – tudományos folyóiratban tervezük az eredmények publikálását.

Irodalomjegyzék

- [1.] Pokol Gy., Gyurcsányi E.R., Simon A., Bezúr L., Horvai Gy., Horváth V., Dudás K.M. **Analitikai kémia**, 2011-2016, Typotex Kiadó (2011), ISBN 978-963-279-466-2
- [2.] Nagy E., Ábrók M., Bartha N., Bereczki L., Juhász E., Kardos G., Kristóf K., Miszti C., Urbán E. **Mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria speciális alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztika területén**, *Orv. Hetil.* Vol 155 No 38 (2014), pp. 1495-1503
- [3.] Horton, R.A., Moran, L.A., Scrimgeour, G., Perry, M., Rawn, D. **Principles of Biochemistry**, 4th Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, (2006), ISBN 0-13-145306-8
- [4.] Carlon, J. **Simplified Gas Chromatographic Procedure for Identification of Bacterial Metabolic Products**. *Appl Microbiol.* Vol 25 No 2 (1973), pp. 287–289.
- [5.] Anhalt, J.P., Fenselau, C. **Identification of bacteria using mass spectrometry**. *Anal Chem* Vol 47 (1975), pp. 219–225.
- [6.] Heller, D.N., Cotter, R.J., Fenselau C., Uy, O.M.. **Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry**. *Anal Chem.* Vol 59 (1988), pp. 2806–2809.
- [7.] Platt, J.A., Uy, O.M., Heller, D.N., Cotter, R.J., Fenselau, C. **Computer-based linear regression analysis of desorption mass spectra of microorganisms**. *Anal Chem.* Vol 60 (1988), pp. 1415–1419.
- [8.] Shah, H.N., Collins, M.D. **Fatty acid and isoprenoid quinone composition the classification of *Bacteroides melaninogenicus* and related taxa**. *J Appl Bacteriol.* Vol 48 (1980), pp. 75–87.
- [9.] Heller, D.N., Murphy, C.M., Cotter, R.J., Fenselau, C., Uy, O.M. **Constant neutral loss scanning for the characterization of bacterial phospholipids desorbed by fast atom bombardment**. *Anal Chem.* Vol 60 (1988), pp. 2787–2791.
- [10.] Karas, M., Hillenkamp, F. **Laser desorption ionisation of proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons**. *Anal Chem.* Vol 60 (1988), pp. 2301–03.

- [11.] Tanaka, K., et al. **Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Vol 2 No 8 (1988), pp. 151–53.
- [12.] Bader, O., Weig, M, Taverne-Ghadwal, L., Lugert, R., Grob, U., Kuhns, M. **Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight mass spectrometry.** *Clin Microbiol Infect*. Vol 17 (2011), pp. 1359-1365.
- [13.] Normand, A.C., Cassagne, C., Ranque, S., L'Ollivier, C., Fourquet, P., Roesems, S., Hendrickx, M., Piarroux, R. **Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi.** *BMC Microbiol*. Vol 13 (2013), pp. 76.
- [14.] von Bergen, M., Eidner, A., Schmidt, F., Murugaiyan, J., Wirth, H., Binder, H. **Identification of harmless and pathogenic algae of the genus *Prototheca* by MALDI-MS.** *Proteomics Clin Appl*. Vol 3 (2009), pp. 774-784.
- [15.] Yssouf, A., Parola, P., Lindström, A., Lilja, T., L'Ambert, G., Bondesson, U. **Identification of European mosquito species by MALDI-TOF MS.** *Parasitol Res*. Vol 113 (2014), pp. 2375-2378.
- [16.] Perera, M.R., Vanstone, V.A., Jonse, M.G. **A novel approach to identify plant parasitic nematodes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom*. Vol 19 (2005), pp. 1454-1460.
- [17.] Eckhard, N., Luebbert, C., Thiele, G., Heiser, V., Lehrach, H. **Rapid determination of short DNA sequences by the use of MALDI-MS.** *Nucl Acid Res*. Vol 28 No 20 (2000), pp. E86.
- [18.] Cobo, F. **Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Virology: A Review.** *Open Virol J*. 2013 7: 84–90.
- [19.] Bruker Daltonik GmbH, *Microflex LT MALDI-TOF MS Instruction Manual*, 2011
- [20.] Bruker Daltonik GmbH, *MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2*, 2011
- [21.] Lagacé-Wiens, P.R.S., Adam, H.J., Karlowsky, J.A., Nichol, K.A., Pang, P.F., Guenther, J., Webb, A.A., Miller, C., Alfa, M.J. **Identification of Blood Culture Isolates Directly from Positive Blood Cultures by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and a Commercial**

- Extraction System: Analysis of Performance, Cost, and Turnaround Time.** *J Clin Microbiol.* Vol 50 No 10 (2012), pp. 3324-3328.
- [22.] Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., González-Ávila, M., Cembrero-Fuciños, D., Herrero-Hernández, A., González-Buitrago, J.M., Muñoz-Bellido, J.L. **Direct Identification of Urinary Tract Pathogens from Urine Samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry.** *J Clin Microbiol.* Vol 48 No 6 (2010), pp. 2110-2115.
- [23.] Dieckmann, R., Malorny, B. **Rapid Screening of Epidemiologically Important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovars by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry.** *Appl Environ Microbiol.* Vol 77 No 12 (2011), pp. 4136-4146.
- [24.] Wang, Y.R., Chen, Q., Cui, S.H., Li, F.Q. **Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Specimens by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry.** *Biomed Environ Sci.* Vol 26 No 6. (2013), pp. 430-436.
- [25.] Nagy E., Becker S., Sóki J., Urbán E., Kostrzewa, M. **Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *J Med Microbiol.* Vol 16 No 60, (2011), pp. 1584-1590.
- [26.] Marinache, C., Alanio, A., Palous, M., Kwasek, S., Fekkar, A., Brossas, J-Y., Brun, S., Snounou, G., Hennequin, C., Sanglard, D., Datry, A., Golmard, J-L., Maizer, D. **MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole.** *Proteomics.* Vol 9, (2009), pp. 4627-4631.
- [27.] Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., Kostrzewa, M. **Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics.** *J Clin Microbiol.* Vol. 50 (2014), pp. 927-937.
- [28.] Kostrzewa, M., Sparbier, K., Maier, T., Schubert, S. **MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms.** *Proteomics Clin Appl.* Vol. 7, (2013), pp. 767-778.

- [29.] Jung, J.S., Eberl, T., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., Schubert, S., Wieser, A. **Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* Vol 33 (2013), pp. 949-955.
- [30.] Lange, C., Schubert, S., Jung, J., Kostrzewa, M., Sparbier, K. **Quantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Resistance Detection.** *J Clin Microbiol.* Vol. 52 No 12, (2014), pp. 4155-4162.
- [31.] Matuschek, E., Brown, D.F.J., Kahlmeter, G. **Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories.** *Clin Microbiol Infect.* Vol. 20, (2014), pp. O255-O266.
- [32.] Catlin, B.W. **Iodometric detection of *Haemophilus influenzae* beta-lactamase: rapid presumptive test for ampicillin resistance.** *Antimicrob Agents Chemother.* Vol 7, (1975), pp. 265–270.
- [33.] Tristram, S., Jacobs, M.R., Applbaum, P.C. **Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae*.** *Clin Microbiol Rev.* 2007 20(2): 368-389.
- [34.] de Castillo, M.C., Sesma, F., de Nader, O.M., de Ruiz Holgado, A.P. **Properties of β -lactamase from *Neisseria gonorrhoeae*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 93(2): (1998), pp. 237-241.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Lovász Csabának (Wessling Hungary Kft.) a MALDI-TOF MS kísérletekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért és Bereczki Lászlónak (Chemium Kft., G1 Laboratórium) témavezetéséért. Külön köszönettel tartozom Dr. Széll Andrásnak, hogy a MikroMikoMed Kft. laboratóriumában dolgozhattam és elkészíthettem szakdolgozatomat, illetve Dr. Szarka Andrásnak konzulensi segítségéért.

Nyilatkozat

Alulírott Illés Dóra, biomérnök BSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a szakdolgozatomban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

.....

Illés Dóra

Budapest, 2016. május

Függelék:

Rövidítések:

AMP = ampicillin

AMC = amoxicillin/klavulánsav („Augmentin”)

BLNAR = beta-lactamase negative, ampicillin resistant (*Haemophilus* sp)

BLPACR = beta-lactamase producing amoxicillin-clavulanic acid resistant (*Haemophilus* sp)

BLPAR = beta-lactamase producing ampicillin resistant (*Haemophilus* sp)

cfiA = *Bacteroides fragilis*-ben előforduló karbapenemáz gén

ESBL = extended-spectrum beta-lactamase

HCCA = α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (mátrix)

MALDI-TOF MS = matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry

MDR = multi-drug resistant (minden vizsgálható antibiotikumra rezisztens)

MIC = minimal inhibitory concentration

MRSA = methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

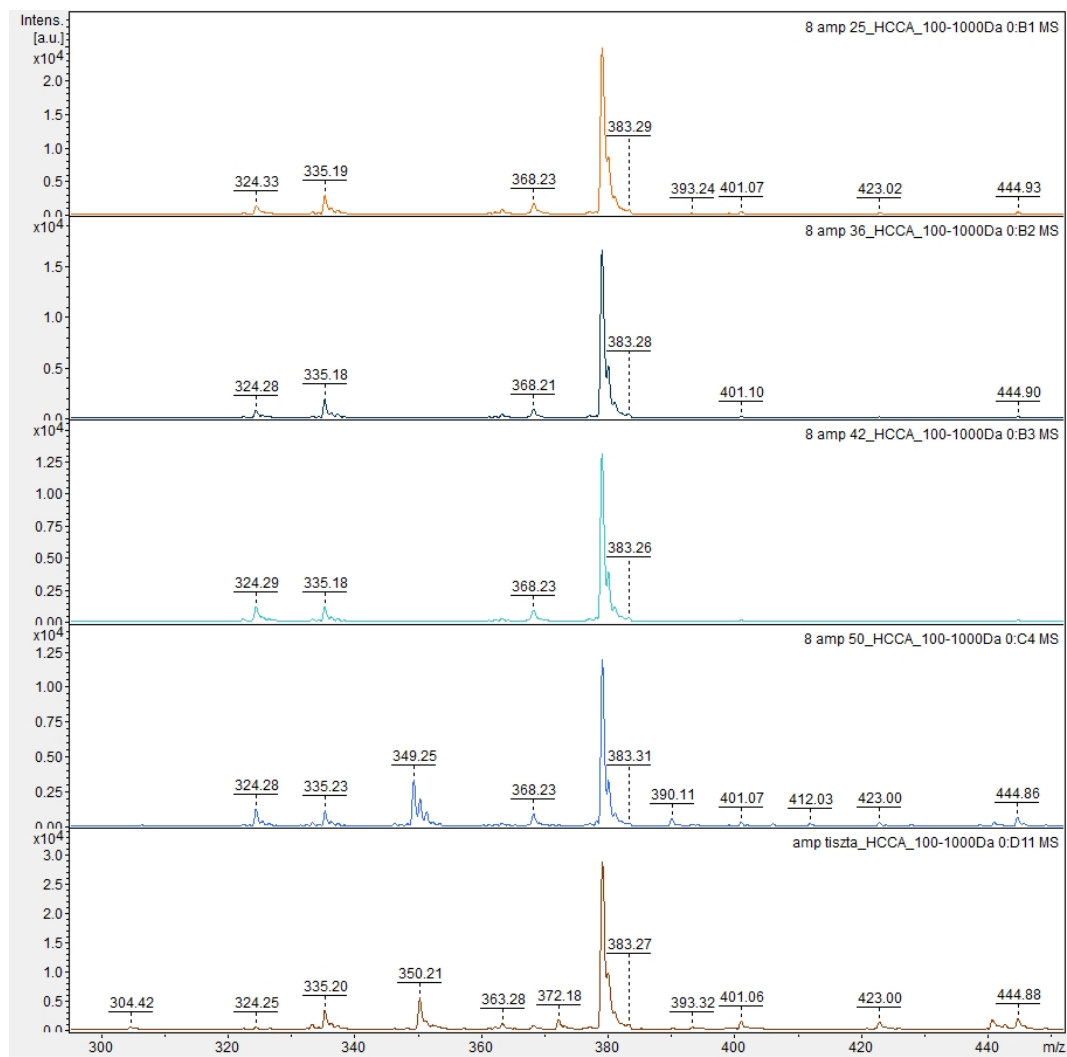
MSSA = methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*

SDS = sodium dodecyl sulphate

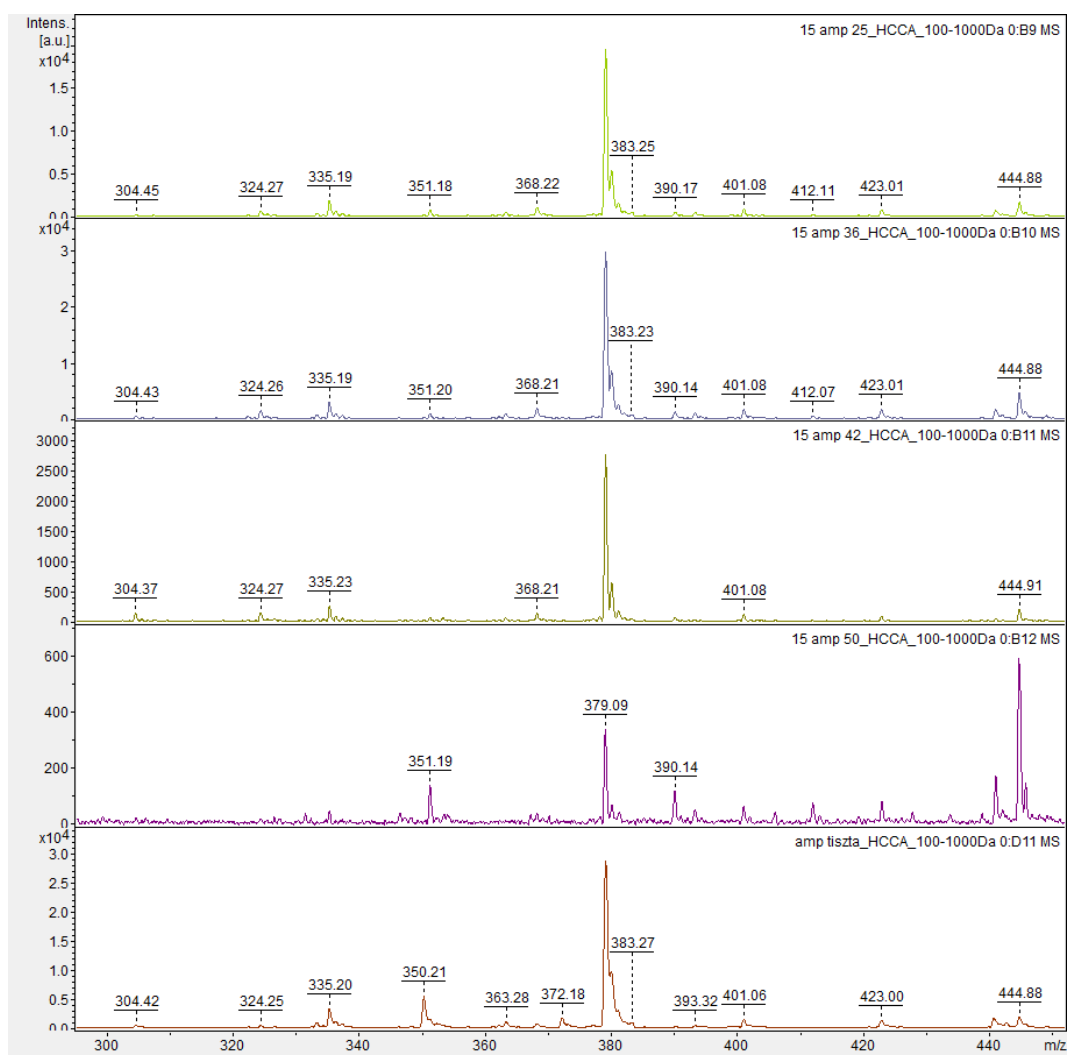
spp. = species (fajok)

munka #	labor #	faj	érzékenységi fenotípus
1	2855/2015	<i>Escherichia coli</i>	AMP érzékeny
2	3424/2015	<i>Escherichia coli</i>	AMP érzékeny
3	3111/2015	<i>Escherichia coli</i>	AMP, AMC rezisztens
4	3024/2015	<i>Escherichia coli</i>	ESBL
5	3246/2015 (6171/FK)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	minden β -laktámra rezisztens
6	3255/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR
7	3238/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLNAR
8	3154/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR
9	3064/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR → BLNAR
10	2049/2015	<i>Haemophilus influenzae</i>	AMP érzékeny
11	3270/2015 (6175/FK)	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	MDR, nem BLPACR
12	246/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	AMP érzékeny
13	3256/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLNAR
14	2828/2015	<i>Escherichia coli</i>	AMP, AMC rezisztens
15	QC 51/2015_II	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ESBL
16	3246/2015	<i>Escherichia coli</i>	AMP, AMC rezisztens
17	3235/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR
18	3300/2015	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AMP, AMC rezisztens
19	3265/2015 (6185/FK)	<i>Citrobacter braakii</i>	AMP, AMC rezisztens
20	3412/2015	<i>Escherichia coli</i>	minden β -laktámra rezisztens
21	505/E	<i>Escherichia coli</i>	AMP érzékeny
22		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	AMP érzékeny
23		<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	AMP érzékeny
24	4013/2015	<i>Escherichia coli</i>	ESBL

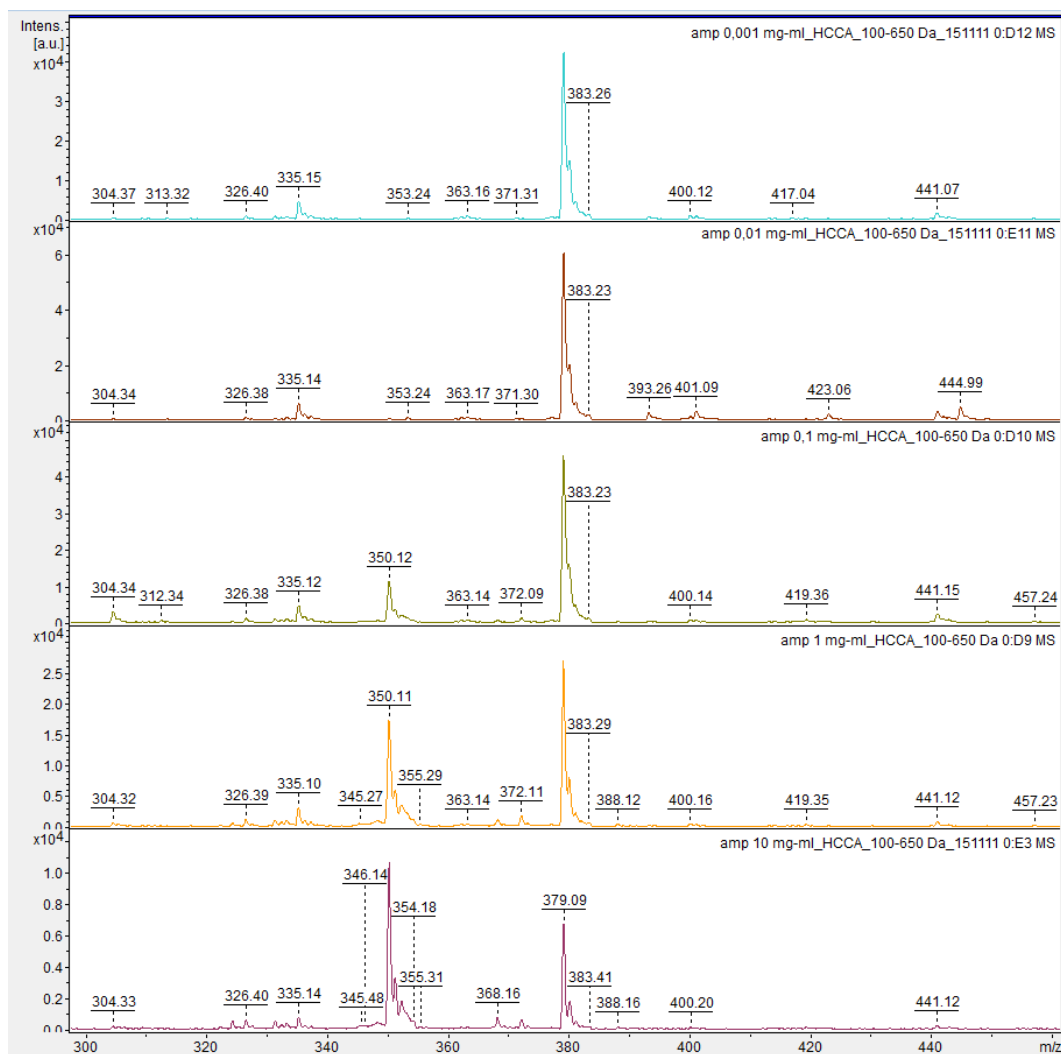
Függelék 1. táblázat A kísérletekben felhasznált törzsek listája



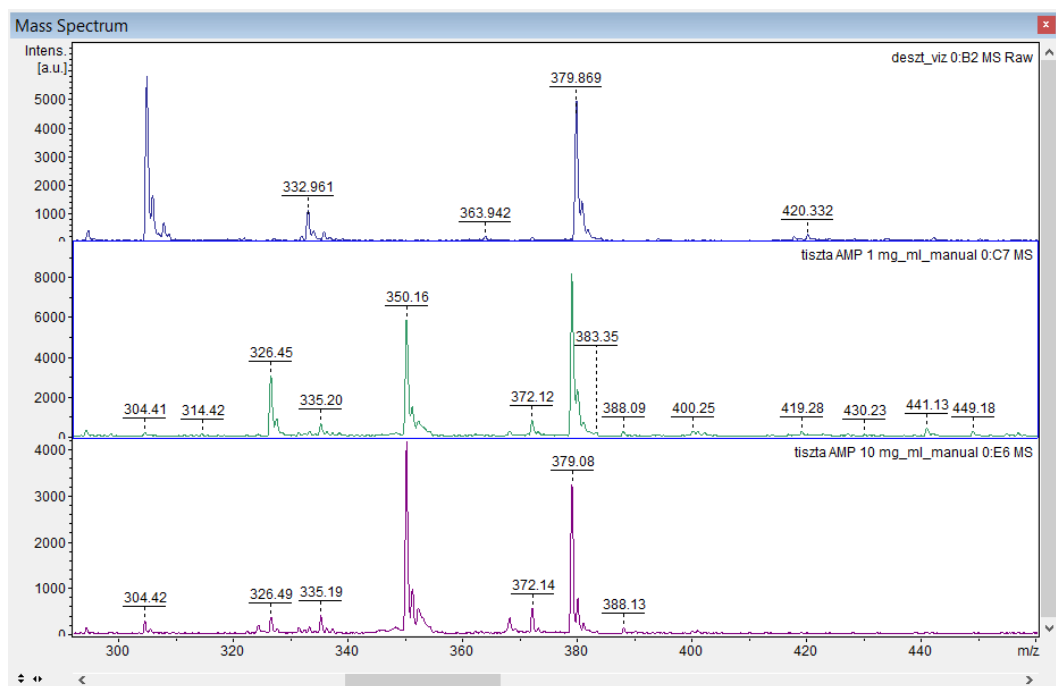
Függelék 1. ábra Vizsgálatok különböző hőmérsékletű inkubációkkal (8. törzs)



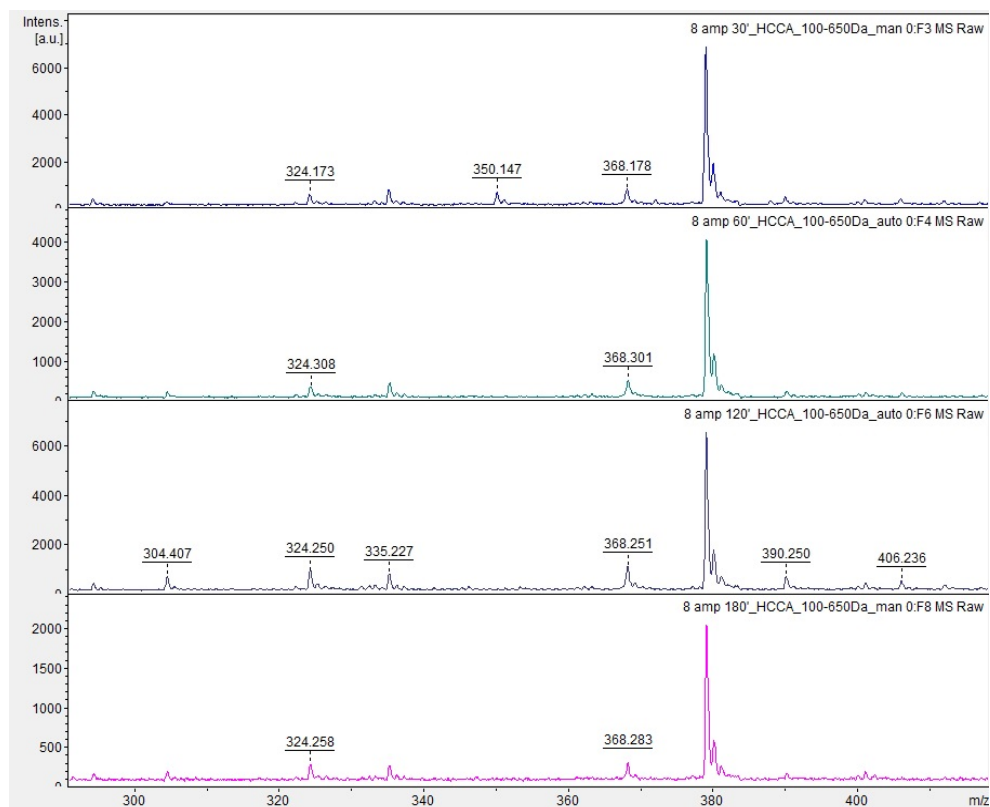
Függelék 2. ábra Vizsgálatok különböző hőmérsékletű inkubációkkal (15. törzs)



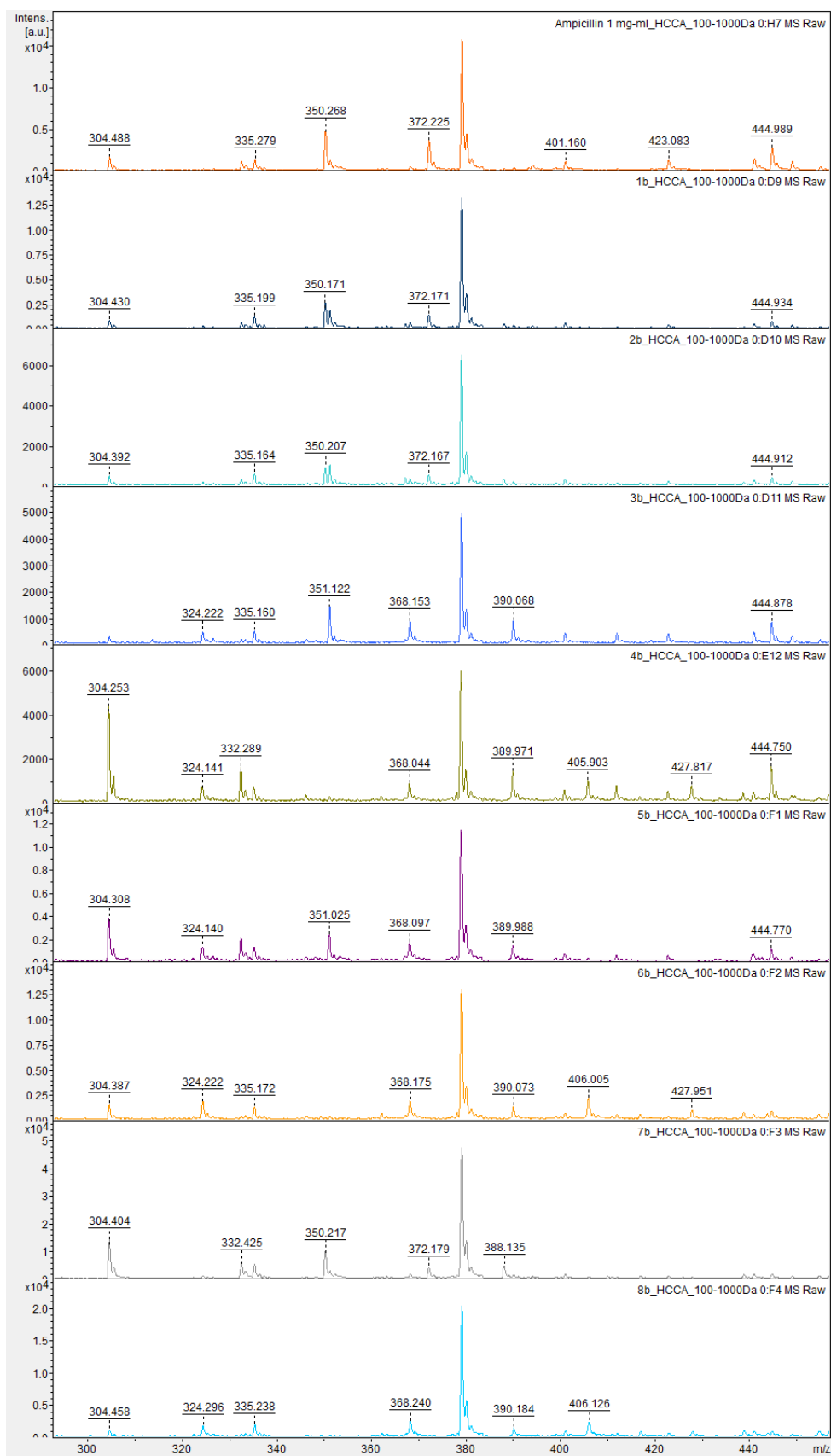
Függelék 3. ábra Optimális mérési koncentráció vizsgálata intakt ampicillinnel



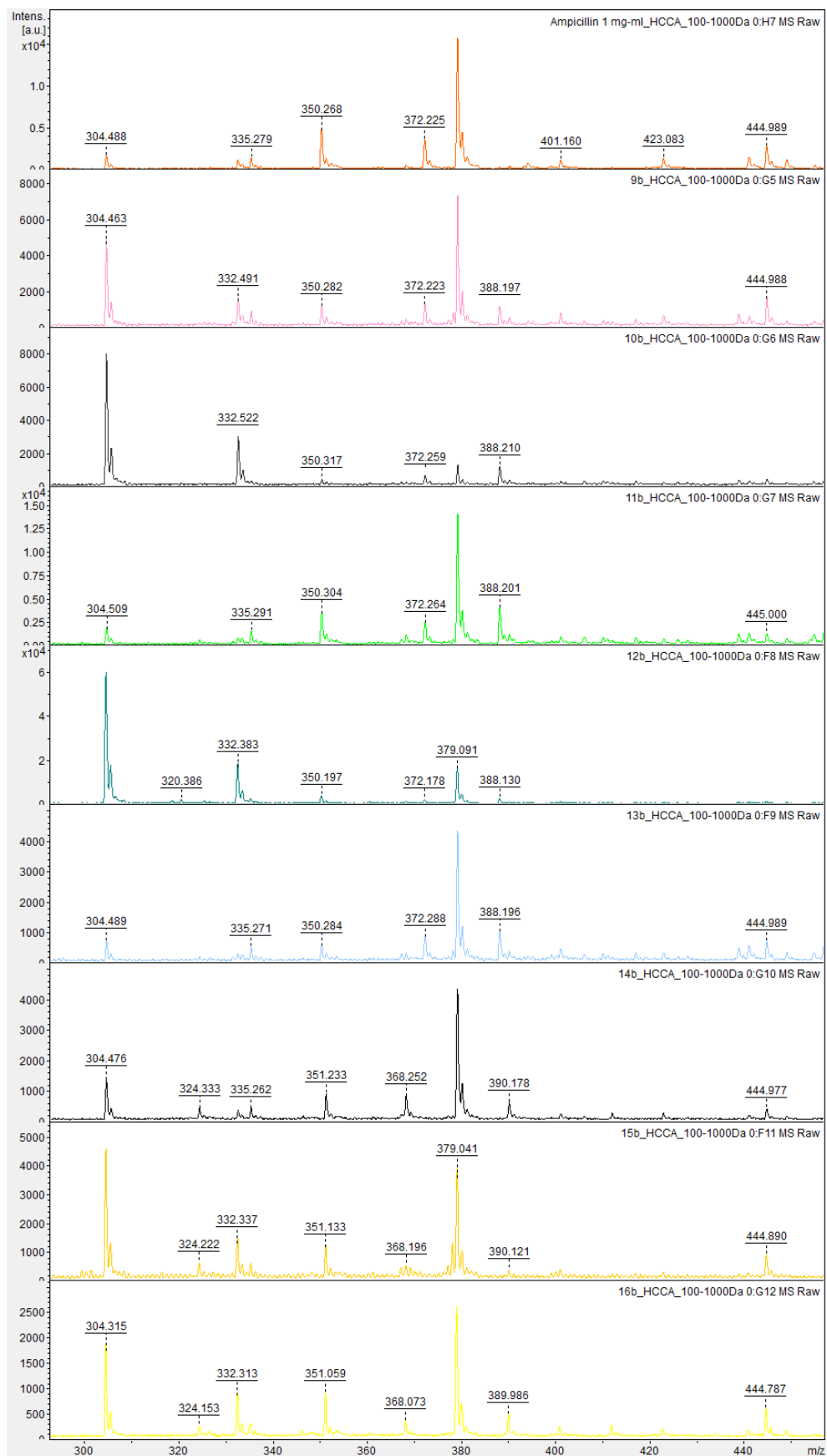
Függelék 4. ábra Ampicillin koncentrációk és a felbontás összefüggése



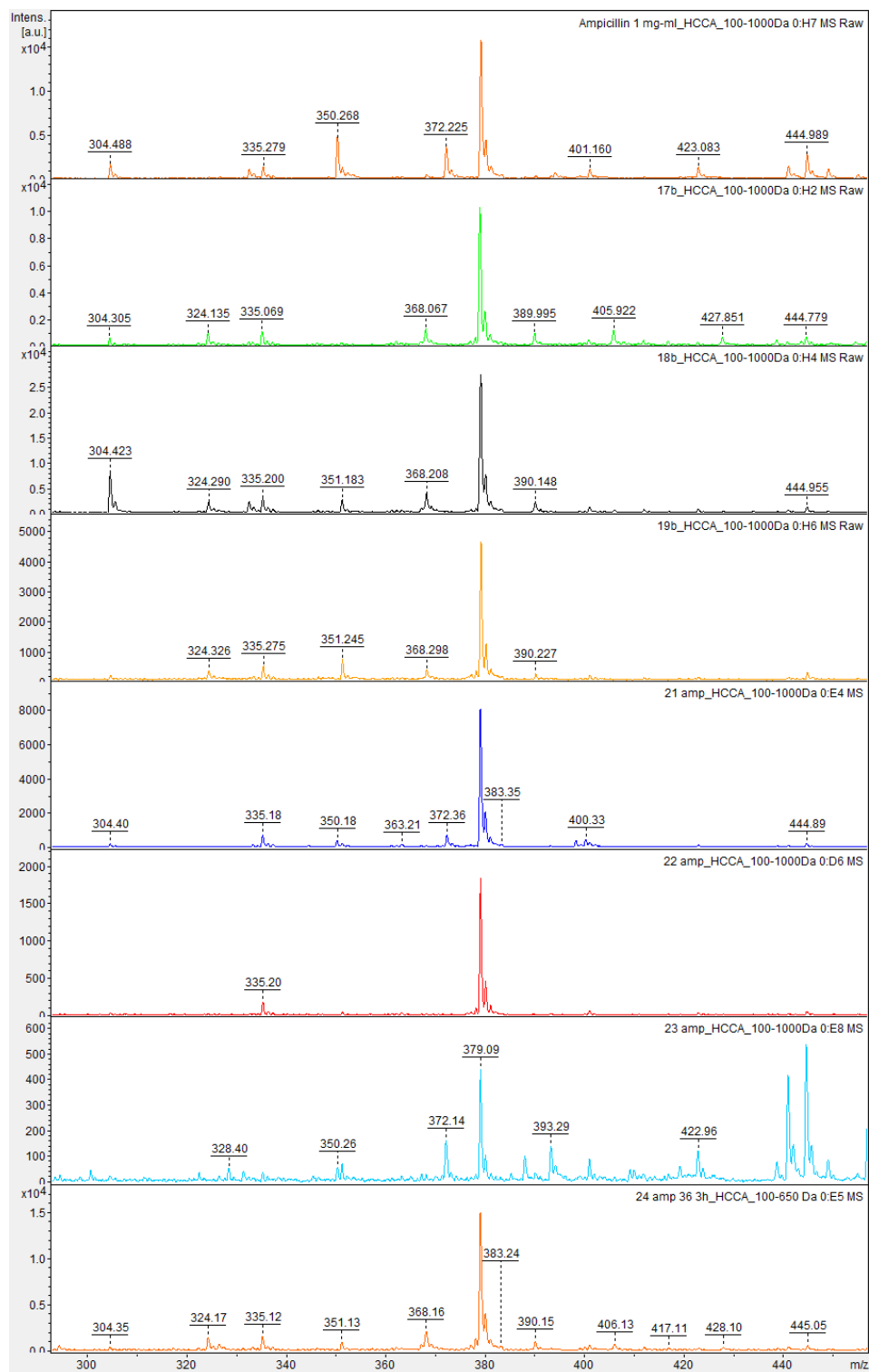
Függelék 5. ábra Kontrollörzssel végzett kísérlet inkubációs idők tesztelésére (30, 60, 120 és 180 perc)



Függelék 6. ábra Klinikai törzsek ampicillin bontási vizsgálata (1-8)



Függelék 7. ábra Klinikai törzsek ampicillin bontási vizsgálata (9-16)



Függelék 8. ábra Klinikai törzsek ampicillin bontási vizsgálata (17-24)