

MALDI TOF MS – nowe możliwości w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej

MALDI TOF MS – new possibilities in routine microbiological diagnostics

Justyna Cieślik¹, Marta Wróblewska^{1,2}

¹Zakład Mikrobiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny w Warszawie

²Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Jednym z problemów współczesnej medycyny jest diagnozowanie, leczenie i zapobieganie zakażeniom wywołanym przez wielolekooporne szczepy bakterii. Bardzo ważna jest ich niezwłoczna i prawidłowa identyfikacja, umożliwiająca wczesne wdrożenie skutecznej terapii. Dlatego też niezwykle cenne są szybkie, nowoczesne i ekonomiczne metody, umożliwiające przeprowadzenie wiarygodnej analizy w bardzo krótkim czasie. Jedną z takich technik jest MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*), która w ostatnich latach jest coraz częściej wykorzystywana w klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych. Metoda ta umożliwia tanią, szybką i wiarygodną identyfikację drobnoustrojów w oparciu o ich profil białkowy. Obecnie możliwości zastosowania metody MALDI-TOF MS są coraz szersze, np. do identyfikacji drobnoustrojów bezpośrednio w dodatnich próbkach krwi na posiew, typowania szczepów bakteryjnych w dochodzeniu epidemiologicznym w ognisku zakażeń oraz wykrywania szczepów wielolekoopornych, w tym wytwarzających karbapenemazy.

Abstract

One of the problems of modern medicine is diagnosis, treatment and prophylaxis of infections caused by multidrug-resistant strains of bacteria. Fast and correct identification of these pathogens is of utmost importance, as it enables early implementation of effective therapy. Therefore, rapid, modern and affordable methods are of outstanding value as they make it possible to conduct a reliable analysis in a very short period of time. One of such techniques is matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), which in recent years is increasingly used in clinical microbiological laboratories. This method enables cheap, fast and reliable identification of microorganisms based on their protein profiles. At present the possibilities of use of MALDI-TOF MS method become more broad, e.g. for identification of microorganisms directly in positive blood culture samples, typing of bacterial strains in epidemiological investigation of an outbreak as well as detection of multidrug-resistant strains, including producers of carbapenemases.

Słowa kluczowe: MALDI-TOF MS, identyfikacja drobnoustrojów, *Candida auris*, karbapenemazy, szczepy wielolekooporne

Key words: MALDI-TOF MS, identification of microorganisms, *Candida auris*, carbapenemases, multidrug-resistant strains

Wstęp

Współczesna diagnostyka mikrobiologiczna do niedawna opierała się na tradycyjnych metodach identyfikacji drobnoustrojów, polegających na charakterystyce fenotypowej szczepów. Techniki te wymagają jednak dużego nakładu pracy i nigdy nie będą tak dokładne i wiarygodne, jak analiza mikroorganizmów przy użyciu technik biologii molekularnej. W ciągu ostatnich lat można zaobserwować duży postęp w dziedzinie chemii i biologii, prowadzący do pojawienia się nowych możliwości szybkiej i precyzyjnej identyfikacji drobnoustrojów w bardzo krótkim czasie i przy stosunkowo niewielkich kosztach.

Nową metodą, która ostatnio coraz powszechniej jest stosowana z powodzeniem w klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych,

jest identyfikacja mikroorganizmów na podstawie ich profilu białkowego z wykorzystaniem spektrometrii masowej – MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) [1–7]. Pomimo, że spektrometria mas po raz pierwszy została opisana już w 1912 r., a jej zastosowanie do identyfikacji bakterii zostało zaproponowane w 1975 r., to jednak dopiero odkrycie w 1985 r. wspomaganą matrycą jonizacji laserem z analizatorem czasu przelotu jonów zapoczątkowało rewolucję w laboratoriach diagnostycznych [1, 8, 9]. Za opracowanie tej metody Kōichi Tanaka otrzymał w 2002 r. nagrodę Nobla w dziedzinie chemii [10]. Technika spektrometrii mas z użyciem desorpcji/jonizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF) szybko zaczęła być wykorzystywana do

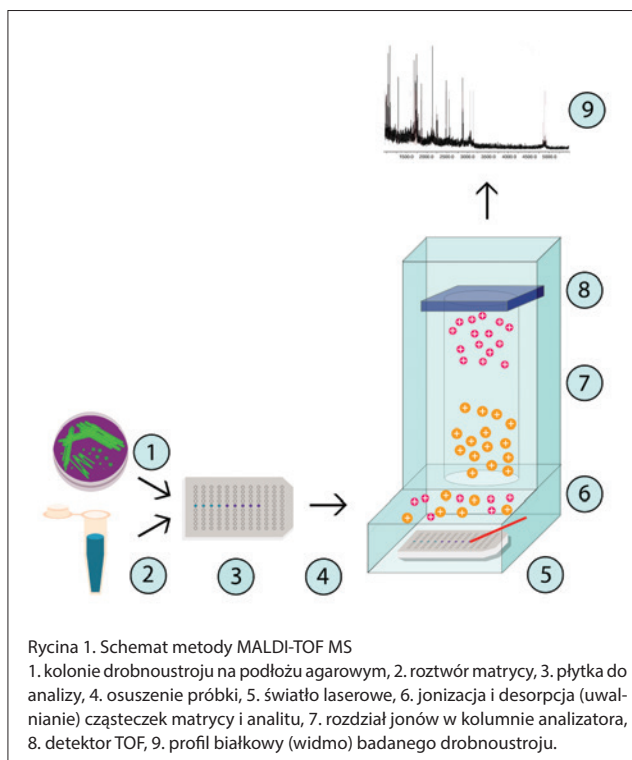
identyfikacji drobnoustrojów w laboratoriach mikrobiologicznych i obecnie jest coraz powszechniej stosowana [1–7, 11]. Podkreśla się też niewielki koszt tych badań [12, 13].

Zasada metody MALDI-TOF MS i dotychczasowe zastosowanie w laboratoriach mikrobiologicznych

Metoda MALDI-TOF MS opiera się na analizie białek rybosomalnych, które w mikroorganizmach występują w dużych ilościach, lecz są unikatowe dla danej rodziny, rodzaju i gatunku, a nawet szczepu drobnoustroju. Umożliwia to identyfikację zarówno bakterii, jak i grzybów drożdżopodobnych oraz pleśniowych [1–4]. Obecnie na rynku znajdują się dwa systemy do identyfikacji drobnoustrojów oparte na technologii MALDI-TOF MS: MALDI Biotyper firmy Bruker (częściej stosowany i szerzej opisany w publikacjach naukowych) i VITEK MS firmy BioMérieux [1]. Wykorzystanie tych systemów skraca czas analizy pojedynczej próbki do kilku minut, czyli nawet o kilkadziesiąt godzin w porównaniu do metod konwencjonalnych.

Metoda MALDI-TOF MS polega na przeniesieniu niewielkiej ilości badanego materiału, zawierającego 10^5 komórek bakteryjnych (w praktyce jest to pojedyncza kolonia z 18–24 h hodowli na podłożu stałym) na płytkę do analizy. W następnym etapie na te komórki nanoszony jest roztwór matrycy zawierający kwas α -cyjano-4-hydroksy-cynamonowy w rozpuszczalniku organicznym (50% acetonitryl i 2,5% kwas trifluoroctowy). Tak przygotowana i osuszona próbka umieszczana jest w komorze analizatora, w której pod wpływem działania lasera dochodzi do desorpcji (uwalniania) i jonizacji cząsteczek matrycy i białek bakteryjnych. W tym procesie kluczową rolę odgrywa matryca, ponieważ silnie absorbuje energię światła laserowego, przyczyniając się do uwalniania (desorpcji) cząsteczek analitu. Stan jonizacji matrycy jest przenoszony na cząsteczki badanego drobnoustroju. Wynik pomiaru tych cząsteczek (podlegających przyspieszeniu w kolumnie analizatora zawierającej próżnię) rejestrowany jest w postaci widma mas, reprezentującego jony wykrywane przez detektor (ryc. 1). W tym procesie do detektora docierają początkowo cząsteczki o małej masie, a następnie coraz większe. W kolejnym etapie widmo, stanowiące rodzaj „odcisku palca” unikatowego i niezmiennego dla każdego gatunku badanego mikroorganizmu, w sposób automatyczny jest analizowane i porównywane z bazą zawierającą widma charakterystyczne dla konkretnych gatunków drobnoustrojów (ryc. 2 i 3).

Prawdopodobieństwo poprawnej identyfikacji drobnoustroju w systemie MALDI Biotyper wyrażane jest w postaci tzw. wskaźnika punktowego mieszczącego się w zakresie od 0 do 3000, określającego stopień podobieństwa do widm referencyjnych (tab. I). Jednocześnie można odczytać identyfikację aż 96 izolatów w ciągu zaledwie ok. 1,5 godz., co jest wielką zaletą tego systemu.



Rycina 1. Schemat metody MALDI-TOF MS

1. kolonie drobnoustroju na podłożu agarowym, 2. roztwór matrycy, 3. płytka do analizy, 4. osuszenie próbki, 5. światło laserowe, 6. jonizacja i desorpcja (uwalnianie) cząsteczek matrycy i analitu, 7. rozdział jonów w kolumnie analizatora, 8. detektor TOF, 9. profil białkowy (widmo) badanego drobnoustroju.

System zaprojektowany przez Bruker Daltonics pozwala też na identyfikację mikroorganizmów, które wcześniej należy poddać ekstrakcji.

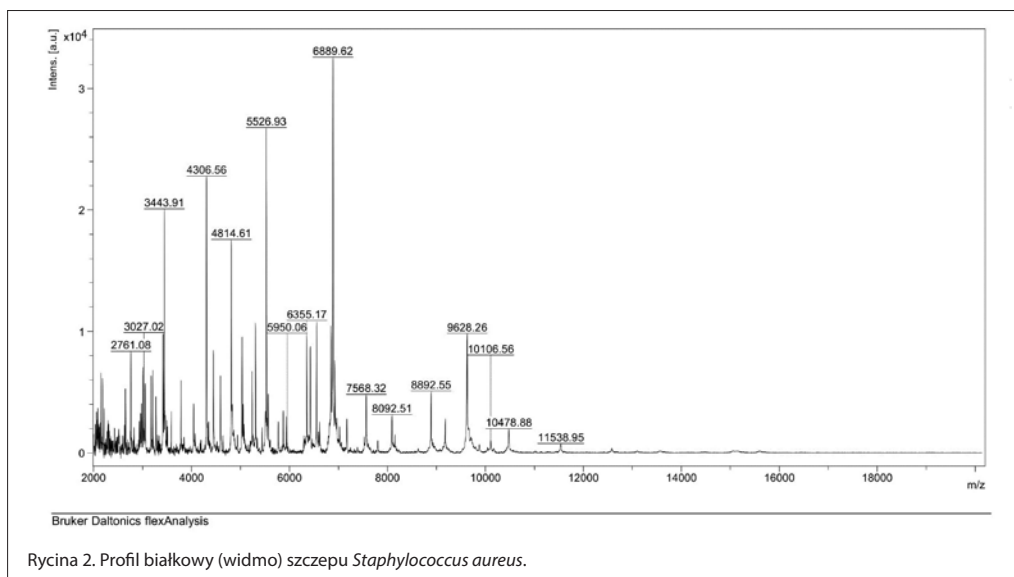
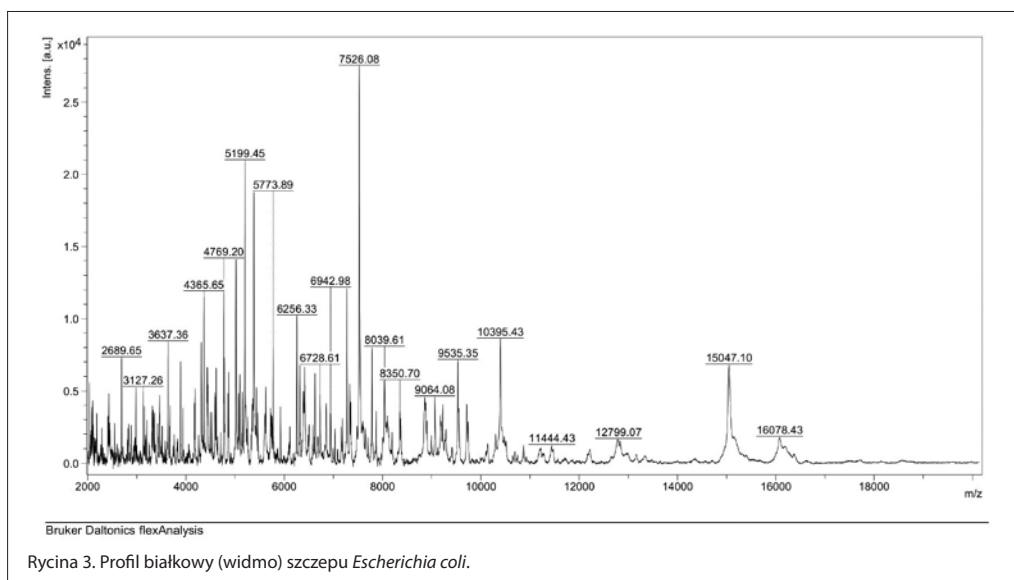
Pomimo wielu zalet, bardzo dużej czułości i dokładności, metoda ta ma też jednak swoje ograniczenia, np. w przypadku występowania między mikroorganizmami wysokiego pokrewieństwa filogenetycznego. W praktyce obserwuje się też, że uzyskanie identyfikacji danego izolatu może być trudne w przypadku małych lub śluzowatych kolonii, a także przy zastosowaniu niektórych podłoży agarowych do namnożenia badanego drobnoustroju [1]. Należy też unikać błędów technicznych podczas nanoszenia izolatu na płytkę do analizy. Błędy w identyfikacji lub brak wyniku identyfikacji najczęściej spowodowane są brakiem profilu białkowego danego gatunku w bazie danych. Jednak należy zauważyć, że metoda ta jest cały czas udoskonalana, pojawiają się nowe możliwości diagnostyczne, a baza danych jest systematycznie aktualizowana i rozszerzana [1–5].

Przykładem praktycznego wykorzystania metody MALDI-TOF MS w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej jest możliwość identyfikacji szczepów *Candida auris*. Jest to nowo opisany gatunek grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*, obecnie stanowiący duży problem kliniczny na świecie [14–20]. Patogen ten łączy w sobie czynniki wirulencji *Candida albicans* i możliwość wywoływania zakażeń inwazyjnych z wyjątkową opornością na leki z grupy azoli (nawet 80–100% szczepów opornych na flukonazol) i inne grupy leków przeciwgrzybiczych oraz z wyjątkowym potencjałem do epidemicznego szerzenia się w szpitalach i innych jednostkach ochrony zdrowia [15, 16, 17, 21–26]. Wykazano, że w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej przy użyciu powszechnie

grzybiczych oraz z wyjątkowym potencjałem do epidemicznego szerzenia się w szpitalach i innych jednostkach ochrony zdrowia [15, 16, 17, 21–26]. Wykazano, że w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej przy użyciu powszechnie

Tabela I. Interpretacja wyników identyfikacji drobnoustrojów w systemie MALDI Biotyper.

| Zakres wskaźnika | Opis prawdopodobieństwa identyfikacji |
|------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 2,300 – 3,000 | Wysoce prawdopodobna identyfikacja do poziomu gatunku |
| 2,000 – 2,299 | Pewna identyfikacja do rodzaju, prawdopodobna identyfikacja do gatunku |
| 1,700 – 1,999 | Prawdopodobna identyfikacja do rodzaju |
| 0,000 – 1,600 | Niewiarygodna identyfikacja |

Rycina 2. Profil białkowy (widmo) szczepu *Staphylococcus aureus*.Rycina 3. Profil białkowy (widmo) szczepu *Escherichia coli*.

dostępnych systemów identyfikacji opartych na testach biochemicznych (np. API AUX 20C, VITEK-2 YST, MicroScan, Auxacolor czy Phoenix Automated Microbiology System) gatunek ten nie jest identyfikowany lub jest oznaczany błędnie, najczęściej jako *Candida haemulonii*, rzadziej *C. duobushaemulonii*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. sake*, *C. catenulata*, *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* lub *Rhodotorula glutinis* [17, 23, 27–29]. Obecnie uważa się, że wiarygodna identyfikacja tego gatunku jest możliwa tylko przy użyciu systemu MALDI-TOF MS lub metod molekularnych [23, 27–31]. Tak więc identyfikacja tego groźnego patogenu w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej jest możliwa tylko w klinicznych laboratoriach wyposażonych w system MALDI-TOF MS.

Nowe możliwości zastosowania techniki MALDI-TOF MS w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej

Stosunkowo niedawno jeden z producentów systemu MALDI-TOF MS zaproponował metodę szybkiej identyfikacji drobnoustrojów bezpośrednio w pozytywnych próbkach krwi na posiew, przy użyciu zestawu MBT Sepsityper Kit (Bruker Daltonics) [1, 32–38]. Wynik identyfikacji tą techniką uzyskiwany jest już po kilkudziesięciu

minutach. Jest to niezwykle cenna metoda, ponieważ sepsa jest ciągle jedną z najczęstszych przyczyn wysokiej śmiertelności pacjentów, a czas wdrożenia odpowiedniej i skutecznej antybiotykoterapii ma kluczowe znaczenie. Poprawność wyników identyfikacji otrzymanych tą metodą jest bardzo wysoka i na podstawie licznych danych literaturowych wynosi od 63% do nawet >90%, choć niektórzy badacze zwracają uwagę na stosunkowo większy odsetek identyfikacji tą techniką bakterii Gram-ujemnych niż Gram-dodatnich [34–39]. Nonnemann i wsp. uzyskali przy użyciu tego testu identyfikację 77% izolatów grzybów bezpośrednio w dodatnich próbkach krwi [39].

Niedawno pojawiły się doniesienia naukowe na temat możliwości szybkiej identyfikacji drobnoustrojów (zwłaszcza bakterii Gram-ujemnych) wywołujących zakażenia układu

moczowego bezpośrednio w próbce moczu przy użyciu metody MALDI-TOF MS [40, 41, 42].

System MALDI Biotyper umożliwia również analizę pokrewieństwa szczepów w obrębie tego samego gatunku [6, 43]. Obecnie prowadzone są prace naukowe badające nie tylko podobieństwo szczepów tego samego gatunku w ramach dochodzenia epidemiologicznego w ognisku epidemicznym, lecz także w zależności od obszaru geograficznego, z którego szczepy te były izolowane [44, 45, 46]. Metoda ta cieszy się dużym zainteresowaniem badaczy – aktualnie jest przedmiotem licznych badań naukowych i w przyszłości może stać się techniką konkurencyjną do drogich badań genetycznych [1, 6, 43, 47].

Coraz częściej pojawiają się doniesienia naukowe o wykorzystaniu metody MALDI-TOF MS do wykrywania szczepów antybioopornych [48, 49]. System ten okazał się pomocny, np. w odróżnianiu metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) od wrażliwych na metycylinę (MSSA; methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*) [50, 51]. Szczepy MRSA różnią się od MSSA intensywnością pików w widmie masowym przy wartości 3784 Da oraz 5700 Da [51]. W podobny sposób odróżnia się szczepy *Escherichia coli* i *Klebsiella*

pneumoniae odporne na antybiotyki β -laktamowe od wrażliwych na te leki [49]. Metoda ta jest coraz częściej badana pod kątem zastosowania w epidemiologii [52].

W ostatnim czasie wielolekooporne szczepy *Enterobacterales* (w tym *Enterobacteriaceae* produkujące karbapenemazy stały się bardzo dużym problemem w szpitalach na całym świecie [49, 52, 53, 54]. Szczepy te stanowią przyczynę wielu ciężkich zakażeń bakteryjnych, często kończących się zgonem pacjentów, dlatego też szybkie zidentyfikowanie czynnika etiologicznego zakażenia i wykrycie ewentualnej produkcji przez dany szczep karbapenemazy ma bardzo duże znaczenie w leczeniu pacjentów i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się patogenu w środowisku szpitalnym. Pojawiły się już pierwsze wyniki badania wprowadzonego na rynek przez producenta nowego zestawu MBT STAR-Carba (*selective testing of antibiotic resistance carbapenemase*) i oprogramowania. Jest to pierwszy test do szybkiej diagnostyki, pozwalający na wykrycie aktywnych karbapenemaz klasy A, B lub D u szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz z rodzaju *Pseudomonas* i *Acinetobacter* z wykorzystaniem spektrometrii mas. Test MBT STAR-Carba z wykorzystaniem imipenemu polega na inkubacji badanego szczepu w roztworze z antybiotykiem, a następnie na analizie widma generowanego przez imipenem. Jeżeli badany szczep wytwarza aktywną karbapenemazę, dochodzi do hydrolizy pierścienia β -laktamowego antybiotyku, co skutkuje zmianą jego masy cząsteczkowej. System ten pozwala również na wykrycie bakterii produkujących karbapenemazę nie tylko z wyhodowanych kolonii bakteryjnych, lecz także bezpośrednio z pozytywnej próbki hodowli krwi z wykorzystaniem zestawu MBT Sepsityper Kit [32, 53, 55, 56, 57].

Podsumowanie

Problem oporności bakterii na antybiotyki to jedno z największych wyzwań dla medycyny zakażeń ostatnich lat. Głównym problemem jest pojawianie się i rozprzestrzenianie szczepów wielolekoopornych. Szacuje się, że w krajach Unii Europejskiej lekooporność drobnoustrojów jest przyczyną śmierci ok. 25 000 osób rocznie. Powoduje to również wzrost kosztów opieki zdrowotnej. Ze względu na brak nowych opcji terapeutycznych konieczne jest zapobieganie rozprzestrzenianiu się patogenów alarmowych, toteż bardzo ważna jest ich niezwłoczna i wiarygodna identyfikacja. Do realizacji tego celu konieczne są skuteczne, szybkie i ekonomiczne metody umożliwiające przeprowadzenie wiarygodnej analizy w bardzo krótkim czasie, co umożliwia wdrożenie racjonalnej i skutecznej antybiotykoterapii. Obecnie kładzie się więc największy nacisk na rozwój tych metod, które usprawniają rutynową diagnostykę mikrobiologiczną, w tym system MALDI-TOF MS.

Piśmiennictwo

- Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chemistry*. 2015; 61(1): 100–111.
- Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(5): 1549–1554.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(4): 1169–1175.
- Żabicka D. Metody detekcji i identyfikacji bakterii. Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków. Warszawa. ichf.edu.pl/r_act/act_pl/fund_strukt/KSP/zabicka.pdf.
- Azarko J, Wend U. Identyfikacja drobnoustrojów – porównanie metody biochemicznej i spektrometrii masowej. *Diagn Lab*. 2011; 47(4): 409–417.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Virdi J S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers Microbiol*. 2015; 6: 791.
- Angeletti, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*. 2017; 138: 20 – 29.
- Anhalt J, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*. 1975; 47: 219–225.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1988; 2(8): 151–153.
- Tanaka K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation. Nobel Lecture, December 8, 2002. www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/tanaka-lecture.html.
- Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16(11): 1614–1619.
- Tran A, Alby K, Kerr A, et al. Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2015; 53: 2473–2479.
- Zhou Y, Shen N, Hou H-Y, et al. Identification accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for clinical pathogenic bacteria and fungi diagnosis: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2017; 10(2): 4057–4076.
- Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol*. 2009; 53: 41–44.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Global emergence of invasive infections caused by the multidrug-resistant yeast *Candida auris*. <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/candida-auris-alert.html>.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). *Candida auris* in healthcare settings – Europe – 19 December 2016. Stockholm 2016. <https://www.ecdc.europa.eu>.
- Sarma S, Upadhyay S. Current perspective on emergence, diagnosis and drug resistance in *Candida auris*. *Infect Drug Resist*. 2017; 10: 155–165.
- Lockhart SR, Etienne KA, Vallbhaneni S, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis*. 2017; 64(2): 134–140.
- Navalkele BD, Revankar S, Chandrasekar P. *Candida auris*: a worrisome, globally emerging pathogen. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017; 14: 1–9.
- Grondalska D, Kmiecik W. *Candida auris* – nowy patogen grzybiczy. *Post Mikrobiol*. 2017; 56(3): 282–288.
- Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog*. 2017; 13(5): e1006290.

22. Tsay S, Welsh RM, Adams EH, et al. Notes from the field: ongoing transmission of *Candida auris* in health care facilities – United States, June 2016–May 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017; 66(19): 514.
23. Bishop L, Cummins M, Guy R, et al. Guidance for the laboratory investigation, management and infection prevention and control for cases of *Candida auris*. Public Health England. Updated August 2017. http://www.isham.org/pdf/Guidance_Candida_auris.pdf.
24. Vallabhanemi S, Kallen A, Tsay S, et al. Investigation of the first seven reported cases of *Candida auris*, a globally emerging invasive, multi-drug-resistant fungus – United States, May 2013–August 2016. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016; 65: 1234–1237.
25. Pan American Health Organization (PAHO)/World Health Organization (WHO). *Candida auris* outbreaks in health care services – Epidemiological alert. Washington, DC; 2016. <http://www.paho.org>.
26. Sherry L, Ramage G, Kean R, et al. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis.* 2017; 23(2): 328–331.
27. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for identification of *Candida auris*. <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/recommendations.html>.
28. Kathuria S, Singh PK, Sharma C, et al. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and E-test method. *J Clin Microbiol.* 2015; 53: 1823-1830.
29. Kim MN, Shin JH, Sung H, et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin Infect Dis.* 2009; 48: e57-61.
30. Mizusawa M, Miller H, Green R, et al. Can multidrug-resistant *Candida auris* be reliably identified in clinical microbiology laboratories? *J Clin Microbiol.* 2017; 55(2): 638-640.
31. Ghosh AK, Paul S, Sood P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of yeasts causing bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21: 372-378.
32. Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the Sepsityper Kit. *Internat J Microbiol.* 2015; 2015: 827416.
33. Leli C, Cenci E, Cardaccia A, et al. Rapid identification of bacterial and fungal pathogens from positive blood cultures by MALDI-TOF MS. *Int J Med Microbiol.* 2013; 303(4): 205-209.
34. Lagace-Wiéns P R S, Adam H J, Kariowsky J A, et al. 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.* 2012; 50(10): 3324-8.
35. Chen J H K, Ho P L, Kwan G S W, et al. Direct bacterial identification in positive blood cultures using two commercial MALDI TOF mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(6): 1733-1739.
36. Gabrych A, Ciešlik J, Sulik-Tyszka B, et al. MALDI SEPSITYPER KIT – ocena nowej możliwości identyfikacji drobnoustrojów bezpośrednio z pozytywnych hodowli krwi. *Zakażenia.* 2014; 2: 74-81.
37. Loonen A J, Jansz A R, Stalpers J, et al. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *J Microbiol Infect Dis.* 2012; 31(7): 1575-1583.
38. Buchan B W, Riebe K M, Ledebner N. Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *Clin Microbiol.* 2012; 50 (2): 346-52.
39. Nonnemann B, Tvede M, Bjarnsholt T. Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *APMIS.* 2013; 121(9): 871-877.
40. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila M, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(6): 2110-2115.
41. Kim Y, Park KG, Lee K, Park Y-J. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples using the vitek ms system based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Ann Lab Med.* 2015; 35(4): 416–422.
42. Íñigo M, Coello A, Fernández-Rivas G, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples, combining urine screening methods and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(4): 988-993.
43. Castaño SV, Juanes FS, Ferreira L, et al. Is MALDI-TOF mass spectrometry a valuable new tool for microorganisms epidemiology? *J Proteomics Bioinform.* 2016; 9(9): 232-237.
44. Mencacci A, Monari C, Leli C, et al. Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(2): 603-606.
45. Josten M, Reif M, Szekat C, et al. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(6): 1809-1817.
46. Christner M, Trusch M, Rohde H, et al. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 2014; 9(7): e101924.
47. Dhieb C, Normand AC, Al-Yasiri M, et al. MALDI-TOF typing highlights geographical and fluconazole resistance clusters in *Candida glabrata*. *Med Mycol.* 2015; 53(5): 462-469.
48. Jung JS, Eberl T, Sparbier K, et al. Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33: 949-955.
49. Hrabak J, Chudáčková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev.* 2013; 26(1): 103-114.
50. Walker J, Fox AJ, Edwards-Jones V, Gordon DB. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J Microbiol Methods.* 2002; 48: 117-126.
51. Wang YR, Chen Q, Cui SH, Li FQ. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biomed Environ Sci.* 2013; 26(6): 430-436.
52. Lau AF, Wang H, Weingarten RA, et al. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(8): 2804-2812.
53. Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, et al. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016; 15: 5.
54. Nikonorow E, Baraniak A, Gniadkowski M. Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β-laktamowe wynikające z wytwarzania β-laktamaz. *Post Mikrobiol.* 2013; 52(3): 261-271.

55. Sakarikou C, Ciotti M, Dolfa C, et al. Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *BMC Microbiol.* 2017; 17(1): 54.
56. Oviaño M, Gómara M, Barba MJ, et al. Towards the early detection of β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(8): 2259-2262.
57. Carvalhaes CG, Cayó R, Visconde MF, et al. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69(8): 2132–2136.

Autor do korespondencji:

dr hab. n. med. Marta Wróblewska
Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
02-097 Warszawa, ul. Banacha 1a
tel. +48 22 5991777
e-mail: marta.wroblewska@wum.edu.pl

Otrzymano: 06.12.2017

Akceptacja do druku: 22.06.2018

Nie zgłoszono sprzeczności interesów