Mátrixasszisztált lézerdeszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria speciális alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztika területén

**Nagy Erzsébet dr.[1] ▪ Ábrók Marianna[1] ▪ Bartha Noémi dr.[1]
Bereczki László[1] ▪ Juhász Emese dr.[2] ▪ Kardos Gábor[3]
Kristóf Katalin dr.[2] ▪ Miszti Cecilia[3] ▪ Urbán Edit[1]**

[1]Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet, Szeged
[2]Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet,
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratórium, Budapest
[3]Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Debrecen

A mikrobiológiai diagnosztika területén kevés technikai fejlesztés volt az elmúlt évtizedekben, amely olyan rohamos fejlődést hozott volna a baktériumok és gombák fajszintű (speciesszintű) identifikálásában, mint a „matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight" tömegspektrometria. A klinikai mikrobiológiai gyakorlatban ennek jelentősége felbecsülhetetlen, hiszen a kórokozó ismerete jelentősen befolyásolja a terápiás választást még az antimikrobás szerrel szembeni rezisztencia meghatározása előtt. A hagyományos speciesmeghatározás számos, a környezeti hatások által befolyásolt biokémiai reakción alapszik és sok esetben igen időigényes folyamat. A speciális tömegspektrometriás módszer néhány perc alatt elvégzi a kitenyésztett baktérium vagy gomba pontos identifikálását a konzervált riboszomális fehérjék tömegspektrometriás mérése alapján. Emellett a módszer alkalmazásának lehetőségét számos más új területen is kutatják. Így például a pozitív hemokultúrákból történő direkt kórokozó-meghatározás segítségével hamarabb megkezdhető a szeptikus beteg célzott antibiotikumkezelése. Lehetőség van a direkt kórokozó azonosítására pozitív vizeletmintából, esetleg egyébként steril testnedvekből, vagy megkísérelhető szelektív dúsítást követően *Salmonella* kimutatása székletből. Az izolált baktériumok „extended spectrum beta-lactamase" és karbapenemáztermelésének gyors kimutatása segítheti a terápiás választást. Ez a tömegspektrometriás módszer a közeljövőben a klinikai mikrobiológiai diagnosztika más területein is tért nyerhet, így például használható lehet a dezoxiribonukleinsav és a ribonukleinsav analízisére, gyors komplett rezisztencia meghatározására és más proteomikai alkalmazásokra is. A közlemény rövid áttekintést kíván adni ennek az új technikának a klinikai mikrobiológiai diagnosztikában való jelenlegi alkalmazhatóságáról. Orv. Hetil., 2014. *155*(38), 1495–1503.

Kulcsszavak: MALDI-TOF MS, speciesidentifikálás, tipizálás, rezisztenciameghatározás

Special application of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in clinical microbiological diagnostics

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry as a new possibility for rapid identification of bacteria and fungi revolutionized the clinical microbiological diagnostics. It has an extreme importance in the routine microbiological laboratories, as identification of the pathogenic species rapidly will influence antibiotic selection before the final determination of antibiotic resistance of the isolate. The classical methods for identification of bacteria or fungi, based on biochemical tests, are influenced by many environmental factors. The matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is a rapid method which is able to identify a great variety of the isolated bacteria and fungi based on the composition of conserved ribosomal proteins. Recently several other

application of the method has also been investigated such as direct identification of pathogens from the positive blood cultures. There are possibilities to identify bacteria from the urine samples in urinary tract infection or from other sterile body fluids. Using selective enrichment broth *Salmonella* sp from the stool samples can be identified more rapidly, too. The extended spectrum beta-lactamase or carbapenemase production of the isolated bacteria can be also detected by this method helping the antibiotic selection in some cases. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry based methods are suitable to investigate changes in deoxyribonucleic acid or ribonucleic acid, to carry out rapid antibiotic resistance determination or other proteomic analysis. The aim of this paper is to give an overview about present possibilities of using this technique in the clinical microbiological routine procedures.

Keywords: MALDI-TOF MS, species level identification, typing, antibiotic resistance determination

Nagy, E., Ábrók. M., Bartha, N., Bereczki, L., Juhász, E., Kardos, G., Kristóf, K., Miszti, C., Urbán, E. [Special application of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in clinical microbiological diagnostics]. Orv. Hetil., 2014, *155*(38), 1495–1503.

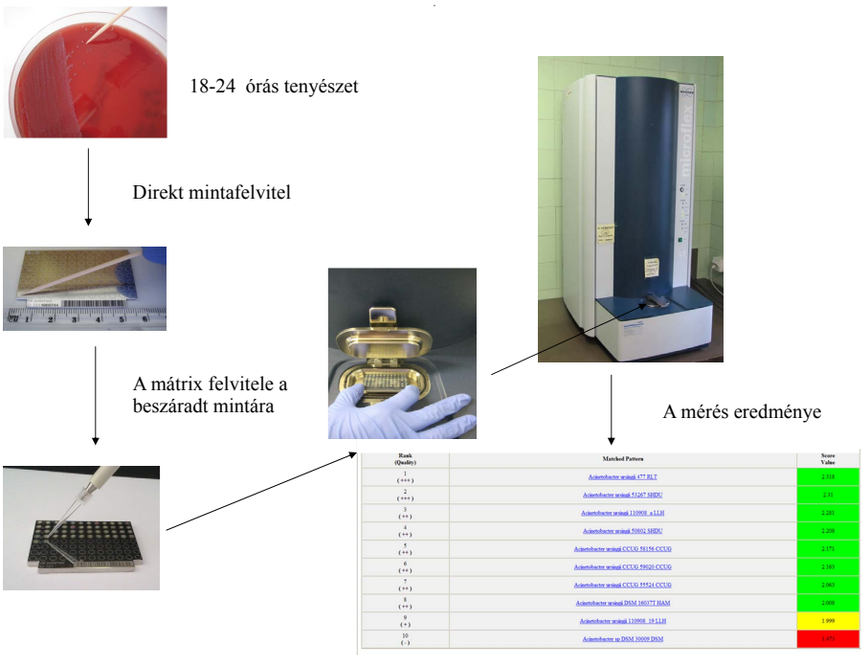
(Beérkezett: 2014. június 19.; elfogadva: 2014. július 20.)

Rövidítések

CFU = (colony forming unit) telepformáló egység; DNS = dezoxiribonukleinsav; ESBL = (extended spectrum beta-lactamase) kiterjesztett spektrumú béta-laktamáz; MALDI-TOF MS = matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry; MIC = (minimal inhibitory concetration) minimális gátlókoncentráció; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz láncreakció; PCR-ESI-MS = PCR-electrospry ionization mass spectrometry; REI-MS = rapid evaporative ionisation mass spectrometry; RNS = ribonukleinsav; rRNS = riboszomális ribonukleinsav; SELDI-TOF MS = surface-enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectormetry

A tömegspektrometria (mass spectrometry – MS) olyan kémiai/biokémiai analitikai módszer, amely a vizsgálandó anyagminta atomjainak vagy molekuláinak ionizációját követően a keletkező kisebb-nagyobb vegyületeket töltésegységre eső tömegük (mass to charge [m/z]) szerint elválasztja. Az eredmény a keletkező ionokat jelző csúcsokból álló tömegspektrum, amelyben egy-egy csúcs egy adott m/z fajlagos tömegű ionizált molekulát jelez, a csúcsok magassága pedig arányos az adott molekula mennyiségével. A módszerek az ionizáció mechanizmusában és az alkalmazott tömeganalizátor természetében, mechanizmusában különböznek egymástól. A tömegspektrometria alkalmas többek között a spektrum mintázata alapján a vizsgált minta azonosítására. Ezt a lehetőséget használhatjuk ki a mikrobiológiában; a mikroorganizmusokra jellemző molekuláris mintázatok tömegspektrometriás vizsgálatával a mikrobák azonosítására nyílik lehetőség.

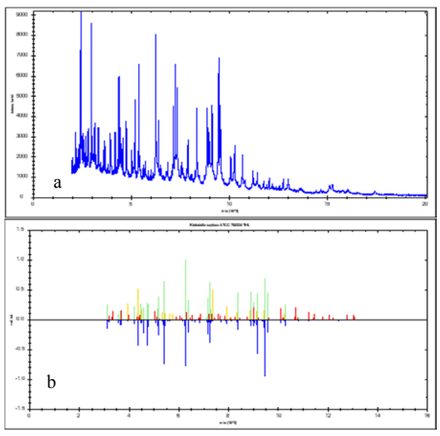
Az erre a célra jelenleg használt módszer a mátrixasszisztált lézerdeszorpciós ionizáció (MALDI). A MALDI-módszer lényege, hogy a vizsgált minta molekuláinak ionizációja egy segédanyag, a mátrix, például alfa-ciano-4-hidroxi-fahéjsav vagy dihidroxi-benzoesav segítségével történik meg, amely képes elnyelni az ionizációhoz használt lézer energiáját [1, 2, 3]. Az analit a mátrix kis molekuláiba ágyazódik, amelyek a lézer energiáját átadják az analit makromolekuláinak [2]. A folyamat közben a makromolekula-mátrix komplexek a vizsgálati mintából felszabadulnak (deszorpció), majd a keletkező molekulaionokat nagyvákuumban egy gyorsítófeszültség juttatja az analizátorba. Az analízis a repülési idő (time of flight – TOF) detektor alkalmazásával történik. Ennek a lényege, hogy a gyorsító elektromos erőteréből kilépve és nagyvákuumban repülve a detektor eléréséhez szükséges repülési idő a molekula méretével arányos, a kisebb méretű molekuláknak rövidebb, a nagyobbaknak hosszabb időbe telik a detektorig eljutni [1, 2]. A kapott tömegspektrum csúcsai tehát a vizsgált minta egyes fehérjéinek felelnek meg. A mikrobák jellegzetes, a taxonra jellemző fehérjeprofillal rendelkeznek, így a MALDI-TOF MS-vizsgálat során keletkező tömegspektrum egy adott mikrobafajra (species), illetve nemzetségre (genus) jellemző. Jelenleg az azonosítására használt MS-módszerek a mikrobák konzervált, riboszomális (és bizonyos esetekben egyéb, transzlációs és transzkripciós) proteinjeinek analízisén alapulnak, kihasználva azt a tényt, hogy ezek a fehérjék nagy mennyiségben találhatóak meg a sejtekben. A mért fehérjeprofil, illetve tömegspektrum azonosítása egy adatbázishoz történő hasonlítás útján megy végbe *(1. ábra)*. Az azonosítható mikrobák köre tehát elsősorban az adatbázisban található referenciaspektrumok számától függ, annak bővítésével a módszer egyre többféle mikroba azonosítására tehető alkalmassá *(2. ábra)*. Mivel ez a technika igen érzékeny, így igen kis anyagmennyiség (10^4–10^5 CFU baktériumszám) elegendő a vizsgálat elvégzéséhez. A szükséges vizsgálati minta legtöbb esetben a kitenyésztett mikroba (baktérium, gomba) telepének direkt felvitelével kerül az úgynevezett mintahordozóra („target plate") *(1. ábra)*. Egyes esetekben (például egyes Gram-pozitív baktériumok) szükség lehet egy egyszerű, a mintahordozón történő gyors feltárásra 70%-os hangyasavval, vagy más esetekben egy néhány lé-



1. ábra | A kórokozó-identifikálás menete MALDI-TOF MS-módszerrel

pésből álló, hangyasavval és acetonitrillel történő fehérjekivonási módszert kell alkalmazni és ez a fehérjemolekula-keverék kerül fel a mintahordozóra. A vizsgálat előtt a megszárított mintára kell felvinni a mátrixot [3]. A mérések kontrollját a cégek által rendelkezésre bocsátott standard proteinkeverék (például *E. coli*-fehérjekivonat) naponkénti, illetve méréssorozatonkénti futtatása biztosítja.

Több, kereskedelmi forgalomban lévő készülék közül a klinikai mikrobiológiai gyakorlatban használható adatbázissal két rendszer rendelkezik, a MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) és a VITEK MS (bioMérieux) (korábban SARAMIS; Shimadzu&Anagnostec). A két rendszer ugyanazon az elven működik, a különbség az adatbázisok összetételében és méretében van, valamint a minta-előkészítéssel kapcsolatos előírásokban és az elfogadható identifikálás bioinformatikai megközelítésében. Jelenleg hazánkban három orvosegyetemi laboratórium használja a MALDI Biotyper rendszert a rutin klinikai mikrobiológiai gyakorlatban.



2. ábra | a) Az ismeretlen baktérium mért fehérjespektruma. b) A specifikus csúcsok összehasonlítása az adatbázisban lévő ismert species spektrumával

A MALDI-TOF MS alkalmazásának lehetősége baktériumok identifikálásában

A baktériumok hagyományos, fenotípusos jellemzők (mikroszkópos morfológia, telepmorfológia, biokémiai profil) alapján történő identifikálását kiegészíti, sőt egyre inkább helyettesíti a MALDI-TOF MS-sel való azonosítás Európa legtöbb nagy klinikai mikrobiológiai laboratóriumában. Mára a MALDI-TOF MS-készülékek adatbázisában a legtöbb klinikailag releváns aerob baktérium spektruma megtalálható. Sok környezeti baktérium spektrumát is tartalmazzák a könyvtárak, amelyek a klinikai mikrobiológiában is használhatók, például kontaminánsbaktériumok egyszerű azonosítására (például *Bacillus* fajok). Több vizsgálat igazolta, hogy MALDI-TOF MS-módszerrel az aerob baktériumizolátumok 84–97%-a helyesen azonosítható fajszinten a hagyományos biokémiai identifikáló módszerekhez hasonlítva az eredményeket [3, 4, 5].

A legtöbb aerob baktérium esetében a direkt mintafelviteli módszer alkalmazható, azonban bizonyos baktériumok komplexebb felépítéséből következő technikai nehézségekkel számolni kell a MALDI-TOF MS-vizsgálatnál. A Gram-pozitív aerob baktériumok esetén az ösz-

szetettebb és vastagabb sejtfal miatt – hasonlóan a gombákhoz, saválló baktériumokhoz és a masszív tokot vagy biofilmet képző *Klebsiella* vagy *Pseudomonas* fajokhoz – sokszor a minta-előkészítés során a proteinextrakciós eljárást kell alkalmazni, hogy megfelelő minőségű tömegspektrumokat kapjunk [6].

Egy nagyszámú klinikai izolátumot feldolgozó vizsgálatban a helyes identifikálás aránya *Enterobacteriaceae* fajoknál 97%, *Staphylococcus* fajoknál 94%, *Streptococcus* fajoknál 84% volt [7]. Az *Enterobacteriaceae* családon belül még közeli fajok (például *Enterobacter cloacae* komplex tagjai) elkülönítése is lehetséges. A koagulázne-gatív *Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, Leuconostoc, Corynebacterium* fajok azonosítása, amely korábban egy sor biokémiai próbát igénylő, hosszas, gyakran bizonytalan eredményt adó folyamat volt, a MALDI-TOF MS-módszer alkalmazása révén leegyszerűsödött; gyorsan kapunk a nukleinsav-szekvenálással megegyező eredményt. A *Neisseria, Haemophilus, Moraxella, Pasteurella* stb. fajok éppúgy sikerrel és megbízhatóan identifikálhatók, mint a *Campylobacter* speciesek, *a Yersinia enterocolitica* vagy akár *Helicobacter pylori* [4, 8]. A biokémiailag inaktív, lassan növekvő vagy speciális tápigényű aerob baktériumok esetében (például *Abiotrophia, Granulicatella* spp, a HACEK-csoport tagjai) és a nem fermentáló Gram-negatív pálcák (*Pseudomonas, Acinetobacter* spp, *Burkholderia cepacia* komplex) identifikálásában is jelentős változást hozott a MALDI-TOF MS-módszer a speciesszintű gyors identifikálás lehetőségével [9, 10]. Ennek eredményeként olyan, korábban csak DNS-alapú molekuláris módszerrel azonosított fajok jelentek meg a klinikai mikrobiológiai gyakorlatban, mint például *Cupriavidus* sp., *Padoraea* sp., *Delftia* sp. vagy *Ochrobactrum* sp. [5, 9].

A MALDI-TOF MS-módszer napjainkra már a mycobacteriumok esetében is megfelelő identifikáló eljárássá vált. Összetettebb sejtfalszerkezetük és jól ismert ellenálló képességük miatt komplexebb fehérjeextrakciós metodikák kidolgozása volt szükséges a megfelelő minőségű tömegspektrumok eléréséhez. A mycobacteriumok hővel és/vagy etanollal történő inaktiválása és szilikagyöngyökkel vagy szonikálással végzett mechanikus roncsolása nélkülözhetetlen lépés a hangyasavval és acetonitrillel végzett kémiai fehérjeextrakció előtt, amely 45–90 perc alatt elvezet az adott *Mycobacterium* faj pontos identifikálásához [11]. A vizsgálathoz szükséges mycobacterium-biomassza szilárd táptalajokról és folyékony tenyészetekből is nyerhető [12, 13], bár az irodalmi adatok ma még ellentmondásosak a tekintetben, hogy melyik közegből kiindulva lehet jobb tömegspektrumokat nyerni. A táptalaj mellett a tenyészet kora is szignifikáns hatással van a tömegspektrum minőségére [13]. A sikeres fajszintű *Mycobacterium* identifikálásához egy speciális *Mycobacterium*-adatbázis használata szükséges. Megfelelő feltételek mellett a *Mycobacterium* fajok 89–98%-a pontosan azonosítható MALDI-TOF MS-módszerrel [12]. A *Mycobacterium tuberculosis* vagy *M. avium* komplexeken belüli speciesszintű identifikálásra a módszer jelenleg még nem alkalmas [14]. A hagyományos fenotípusos identifikáló módszerekhez képest a MALDI-TOF MS gyorsabb, egyszerűbb és olcsóbb metodikát jelent a laboratóriumok számára a mycobacteriumok pontos azonosításához, de a molekuláris eljárásokat a gyakori és klinikailag releváns fajok esetében egyelőre nem helyettesíti. Végül, de nem utolsósorban meg kell még említeni, hogy bár igen kevés baktérium elegendő a MALDI-TOF MS-vizsgálathoz, a megfelelő mennyiségű biomassza elérése a lassan növekvő fajok esetén heteket vehet igénybe.

A *Nocardia* fajok vastag, hidrofób, mikolsavtartalmú sejtfaluk miatt az aerob baktériumoktól eltérő, a mycobacteriumokhoz hasonló komplex előkészítést igényelnek a MALDI-TOF MS-analízishez. Az általánosan használt tömegspektrum-könyvtárak jelen hiányosságai miatt sikeres MALDI-TOF MS-azonosításukhoz kiegészítő – akár saját felépítésű, biztos szekvenálási eredményekre alapuló – adatbázisok szükségesek. Így a *Nocardia*-izolátumok 88%-ának helyes azonosításáról számol be egy vizsgálat [15]. Mivel a *Nocardia* fajok hagyományos fenotípusos azonosítása nehéz, lassú (akár két hetet is igénybe vehet) és sokszor bizonytalan eredményt ad, a gyors MALDI-TOF MS-módszer előnye e genus esetén is egyértelmű.

Az anaerob baktériumok vonatkozásában talán még több előnnyel jár ez a módszer. Jól ismert, hogy a sokszor életet is veszélyeztető, gyakran polimikrobiális infekcióban szerepet játszó anaerob baktériumok tökéletesen oxigénmentes körülmények között is lassabban növekednek és legtöbbször további szubkultúra készítését követően lehet csak elkezdeni az identifikálásukat. A hagyományos biokémiai próbákon alapuló identifikálás ezen baktériumok esetében sokszor 5–7 napig is eltart vagy csak a 16S rRNS gén szekvenálása ad végleges eredményt, ezért ilyen esetekben a mikrobiológiai laboratóriumok eltekintenek a pontos speciesmeghatározástól és csak „vegyes anaerob flóratenyészet” leletet adnak ki a klinikusnak. A MALDI-TOF MS-módszer előnye ebben az esetben, hogy az igen kis telepek is alkalmasak lehetnek a direkt speciesidentifikálásra a vizsgálati mintával beoltott, anaerob körülmények között inkubált táptalajról. E baktériumcsoport esetében igen fontos mindkét jelenleg használt rendszer esetében az adatbázis optimalizálása. Egy nagy európai rezisztenciafelmérésből származó 277 *Bacteroides* törzs 97,5%-át azonosították sikeresen speciesszinten ezzel a módszerrel, és a hagyományos biokémiai próbákkal eltérő speciesmeghatározást mutató törzseknél a 16S rRNS gén szekvenálása a MALDI-TOF MS-eredményeket erősítette meg [16]. A vizsgálat során a MALDI Biotyper adatbázisát új speciesekkel (*Bacteroides eggerthii, Bacteroides goldsteinii, Bacteroides intestinalis)* egészítették ki. Az adatbázis-fejlesztés a prevotellák [17], a clostridiumok [18] és a Gram-pozitív anaerob coccusok esetében is tovább folyt [19] és ennek eredményeként számos újonnan leírt vagy ritkán identifikált

anaerob baktérium identifikálásának lehetősége nyílt meg. Intenzív adatbázis-fejlesztés eredményeként jelenleg több mint 330 különböző Gram-pozitív és Gram-negatív anaerob species található a MALDI Biotyper (Bruker) adatbázisában.

A gyakran izolált anaerob baktériumok közül porphyromonasok, fusobacteriumok és actinomycesek speciesszintű identifikálása elmarad a már említett speciesekhez képest. A különbség egyik lehetséges magyarázata a fenti speciesek széles körű heterogenitása. A módszer egyre kiterjedtebb használatával azonban számos, ritkán izolált vagy új anaerob species klinikai jelentőségére derül fény [20].

A speciesszintű identifikálás mellett a MADI-TOF MS-módszer lehetővé teszi a hagyományos módszerekkel nehezen elkülöníthető speciesek pontos identifikálását is. Jó példa erre a *Prevotella nigrescens* és *Prevotella intermedia* elkülönítése, amely ugyanolyan megbízható MALDI-TOF MS-módszert alkalmazva, mint 16S rRNS gén szekvenálással vizsgálva [21]. Hasonló megfigyelés történt a hagyományos módszerekkel nehezen vagy egyáltalán nem elkülöníthető *Clostridium chauvoei* és *Clostridium septicum* esetében, sikeres speciesszintű azonosításuk a MALDI-TOF MS-módszerrel viszont lehetséges [18].

Meg kell említenünk a módszer jelen korlátait is: egyes közeli fajok tömegspektrum alapján nem különíthetők el egymástól megbízhatóan (például egyes viridans streptococcusok, mint *S. mitis/oralis* és a *S. pneumoniae*, vagy a *Shigella* fajok és az *E. coli*). A *Salmonella enterica* spp. *enterica* szerovariánsok tömegspektrum alapján való elkülönítése sem megoldott még, de a fejlesztések eredményei biztatóak [22]. Az adatbázisok bizonyos baktériumok esetén egyelőre kevés referenciaspektrumot tartalmaznak, így az identifikálás eredménye nem mindig pontos. Az ilyen kivételes esetek miatt egyes klasszikus biokémiai próbák, antigén-detektáló tesztek továbbra is szükségesek, illetve a molekuláris identifikáló módszerek (például 16S rRNS gén szekvenálása), mint aranystandard alkalmazhatók. Az adatbázis, illetve a preanalitikai technikák fejlődésével egyre több ilyen probléma fog a közeljövőben megoldódni. Addig a klinikai mikrobiológus felelőssége, hogy a MALDI-TOF MS-sel kapott eredményeket kellő kritikával értelmezze és a klinikusok számára helyesen interpretálja.

A MALDI-TOF MS-módszer bakteriológiai diagnosztikába való bevezetésének egyik legfontosabb előnye a klinikusok számára, hogy a leletátfordulási idő jelentősen csökkenhet bármely baktériumcsoportot is tekintjük [23]. A pontos fajszintű azonosítás eredményéből következtethetünk a baktériumok természetes antibiotikumrezisztenciájára vagy -érzékenységére, amely az azonosított baktérium nevével együtt egy előzetes mikrobiológiai részeredményben a legtöbb esetben, akár a minta laborba érkezését követő 24 órán belül közölhető.

MALDI-TOF MS alkalmazásának lehetősége a gombadiagnosztikában

Ahogy a klinikai mikrobiológia más területein is, a mikológiában is egyre fontosabb eszköznek tűnik a MALDI-TOF MS-módszer. A sokszor életet is veszélyeztető infekciókban szerepet játszó opportunista gombák minél gyorsabb, minél pontosabb identifikálása segíti az adekvát antifungális terápia korai elindítását, így csökkentheti a mortalitást [24].

A módszer alapelveiben nem különbözik a bakteriológiai alkalmazási területektől, de fontos kiemelni itt is a minta előkészítésének fontosságát; a gombák sokkal komplexebb sejtfalszerkezete igényli a proteinextrakciós módszerek alkalmazását. Nem kevésbé fontos probléma, hogy a jelenleg rutinhasználatban lévő rendszerek bakteriológiai adatbázisaihoz képest ma még szűkebb gombaadatbázisokkal rendelkeznek. A gombafajok, főleg a fonalas gombák növekedési ütemüknek, spóraképzésüknek különbözősége miatt további vizsgálatokat igényelnek, hogy a tenyészet kora és a használt táptalaj összetétele hogyan befolyásolja az identifikálás alapjául szolgáló fehérjespektrumot [25].

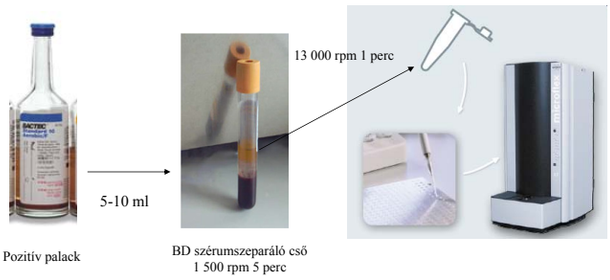
A leggyakrabban előforduló sarjadzó gombafajok gyors és pontos identifikálása mellett kiválóan alkalmas a módszer olyan közeli rokon fajok differenciálására is, amelyek elkülönítése az adott csoporton belül eddig csak DNS-alapú vizsgálatokkal volt lehetséges (*Candida parapsilosis* sensu lato csoport, *Candida albicans* – *Candida dubliniensis* [26, 27]). Olyan ritka fajok azonosítására is lehetőség van, amelyeket a hagyományos morfológiai vagy biokémiai alapokon nyugvó identifikálási eszköztár segítségével nem tudunk megfelelően identifikálni. A rutindiagnosztika során a vitás esetekben érdemes DNS-alapú vizsgálattal konfirmálni a ritka eredményt. A kevésbé gyakori non-*albicans Candida* fajokon túl, bizonyos non-*Candida* sarjadzó gombafajok meghatározására is lehetőség van, de itt már gyakrabban észlelhető a klinikai mikrobiológiai gyakorlat számára elérhető adatbázis limitáltsága, így például a potenciálisan patogén környezeti izolátumok esetén pusztán az alapadatbázisra alapozott identifikálás már bizonytalan kimenetelű lehet [14, 28].

A klinikai gyakorlatban fontos fonalas gombák rendkívül változatos morfológiai és biokémiai tulajdonságaik miatt valódi kihívást jelenthetnek a hagyományos identifikálás során is. A MALDI-TOF MS előnyét számos vizsgálat bizonyította, mivel azonban jelentős taxonómiai változások zajlanak, valamint a MALDI-TOF MS-rendszerek adatbázisai sem ölelik fel a szóba jövő összes speciest, további kutatások szükségesek a fonalas gombák tömegspektrometrián alapuló identifikálása területén [26, 29].

Baktériumok és gombák tipizálása MALDI-TOF MS-módszerrel

Baktériumok és gombák speciesszintű meghatározásán túl egyre gyakrabban alkalmazzák a MALDI-TOF MS-módszert szubspeciesek meghatározására, mint például *Francisella tularensis* [30] vagy a *Legionella pneumophila* [31] esetében. Fajkomplexek, mint a *Burkholderia cepacia* komplex, tagjainak [32] vagy a *Candida parapsilosis* komplex tagjainak [26] fajszintű azonosítására is alkalmas a módszer. Bizonyos esetekben a tömegspektrum alapján lehetőség van virulens és kevésbé virulens patotípusok elkülönítésére, mint például a *Yersinia enterocolitica* esetében a SARAMIS adatbázis speciális, célzott fejlesztésével elkülöníthető volt a nem patogén 1A patotípus a patogén 2-es és 4-es patotípustól. Egyben a törzsek egyértelműen különböztek tömegspektrumuk alapján 11 további *Yersinia* speciestől. A MALDI-TOF MS-eredmények megegyeztek a hagyományos bio- és szerotipizálási módszerekkel kapott eredményekkel [33]. Vizsgálatok igazolták, hogy a módszer alkalmas a *Streptococcus agalactiae* magas virulenciájú ST17 és ST-1 klónjainak elkülönítésére a törzsek rutinidentifikálását követően [34]. A *Bacteroides fragilis* I és II divíziójának elkülönítésével igen rövid határidőn belül válasz adható arra a kérdésre, hogy a súlyos infekcióból izolált *Bacteroides fragilis* törzs hordozza-e a karbapenemrezisztenciáért felelős *cfiA* gént, hiszen csak a II divízióba tartozó törzsek esetében van jelen a gén [35]. Az eredményeket a DNS-alapú vizsgálatok minden esetben megerősítették. A *Propionibacterium acnes* MALDI-TOF MS-módszerrel történő típusmeghatározás során a vakon végzett MLST-tipizálás eredményével megegyező típusok (IA, IB, II, III) azonosítására volt lehetőség a speciesmeghatározást követő speciális tömegspektrum-analízis alapján. A módszer lehetőséget adhat a *Propionibacterium acnes*-izolátumok esetében a kontamináns vagy valódi patogén kérdés gyors eldöntésében mély szövetekből nyert mintából történő izolálás során [36].

A tömegspektrumok alapján készített dendogramok a vizsgált törzsek közötti hasonlóságról adnak felvilágosítást néhány perccel az azonosítást követően. Egyes kísérletek bizonyítják, hogy a módszer valódi, járványügyi szempontból fontos tipizálási vizsgálatokra is alkalmas. A *Listeria monocytogenes* I., II. és III. csoportba tartozó törzsek esetében a hagyományos pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE) módszert alkalmazva a tipizálásra teljesen megegyező eredményt kaptak, mint a tömegspektrométerrel történő méréssel [37] igazolva a MALDI-TOF MS-módszer epidemiológiai célból történő tipizálásra való alkalmasságát például ételeredetű esethalmozódás esetén. Ugyanígy bizonyítható volt az igen komoly járványügyi jelentőséggel bíró, gyakori *Clostridium difficile* ribotípusba tartozó törzsek (001, 027 és 126/078) elkülönítésének lehetősége egy saját fejlesztésű adatbázis használatával a SARAMIS (Simadzu) szoftver segítségével [38]. Az MRSA-törzsek fontosabb klonális komplexei (CC5, CC8, CC22, CC30, CC45) reprodukálható spektrumkülönbségeket mutattak a speciesidentifikálást követő analízis alapján, amelyet Biotyper 2.0 és FlexAnalysis programok (Bruker) segítségével végeztek el [39]. A mycobacteriumok speciesszintű identifikálása mellett a MALDI-TOF MS-sel a kapott spektrumok dendrogramban való összehasonlító megjelenítése alapján az izolátumok közötti rokonsági fokra is következtetni lehet a spoligotipizálási módszerhez hasonlóan [40].



3. ábra Baktérium/gomba identifikálása közvetlenül a pozitív hemokultúrából 10-30 perc alatt

Baktériumok és gombák direkt kimutatása pozitív hemokultúrából MALDI-TOF MS-módszerrel

A baktériumok és gombák gyors kimutatása és identifikálása véráram-infekció során életmentő lehet a beteg számára. A pozitív jelzést adó hemokultúrából történő MALDI-TOF MS-analízis kivitelezéséhez számos házilag fejlesztett *(in house)* minta-előkészítő módszer és gyári kit áll rendelkezésre. Ezek közös vonása, hogy a vér sejtes elemeitől elválasztott és mosási lépésekkel tisztított baktérium/gomba üledékből közvetlenül vagy extrakciós lépéseket követően a tömegspektrum alapján azonosítható a kórokozó *(3. ábra)*. Az identifikálás ideje, az előkészítő lépéseket is beleszámítva, körülbelül 30-40 perc, amely után az identifikálás eredménye és az identifikált törzs természetes rezisztenciája egy előzetes leletben közölhető. A baktériumüledék bizonyos szerzett rezisztenciamechanizmusok gyors kimutatására is alkalmas: például b LACTA gyorsteszt (BioRad) a 3. generációs cephalosporinbontást detektálja, vagy PBP-latex gyorsteszt a methicillinrezisztencia kimutatására alkalmas, illetve az üledékből ismerve a baktériumspeciest, megkísérelhető automata rendszerrel az antibiotikumérzékenységi vizsgálat [41]. Így átlagosan 12 óra alatt elkészülhet a teljes mikrobiológiai lelet. Több felmérés alapján a különböző minta-előkészítési protokollokat alkalmazva 75–96%-ban sikerült speciesszinten identifikálni a kórokozót a pozitív jelzést adó hemokultúrapalackból [41, 42]. Fontos kiemelni, hogy félrevezető eredményt adhat a többféle baktériumot tartalmazó pozitív hemokultúraminták direkt MALDI-TOF MS-vizs-

gálata (általában a domináns mikroba kerül azonosításra), így a pozitív hemokultúrapalackból készített natív, illetve Gram-festett kenet mikroszkópos vizsgálata még MALDI-TOF MS-technika mellett sem nélkülözhető.

Az antibiotikumrezisztencia-vizsgálat lehetőségei MALDI-TOF MS-módszerrel

A vizsgálati anyagból kitenyésztett vagy a pozitív hemokultúrában található baktériumok, gombák speciesszintű azonosítása már segítheti a klinikust az empirikus antibiotikumválasztásban a baktériumok, gombák ismert veleszületett rezisztenciája alapján Az igazi áttörés azonban a tömegspektrometria alkalmazásának lehetősége a rezisztenciameghatározás területén. Erre az elmúlt 2-3 évben igen sok vizsgálat indult. A béta-laktamáz-termelő törzsek esetében néhány órát igénylő módszerrel detektálni lehet a kitenyészett baktérium béta-laktamáz-aktivitását a megfelelő antibiotikummal, mint szubsztráttal történő együttinkubálás során. Itt a választott antibiotikum (ampicillin vagy valamely karbapenem) tömegspektrumában végbemenő változást (degradációját) detektáljuk az izolált baktériummal történő együtt-tenyésztés során [43, 44]. A vizsgálat időtartama nem több, mint 1-3 óra, és megfelelő inhibitorokat alkalmazva a vizsgálat specificitása növelhető. A legkülönbözőbb karbapenemázt (NDM-1, VIM-1, -2, IMP-6, KPC-1, SIM-1, OXA-23, -48, -51, -162) termelő *Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Acinetobacter* törzsek esetében alkalmazták sikerrel ezt a gyors rezisztenciameghatározási módszert [43]. A metallo-béta-laktamáz-termelő *Bacteroides fragilis* esetében is kimutatható az ertapenem bontási termékek megváltozott spektruma [45]. Egy, az antibiotikumok szélesebb körében alkalmazható módszer lehet a stabil izotóppal jelölt, aminosavat tartalmazó táptalajban antibiotikum nélkül vagy antibiotikum jelenlétében inkubált baktérium tömegspektrumában bekövetkező változáson alapuló eljárás. Amennyiben a törzs rezisztens és szaporodik az antibiotikumot és izotóppal jelölt aminosavat tartalmazó táptalajban, úgy a kontroll (antibiotikum- és izotópmentes) táptalajban történő tenyésztéshez képest a keletkezett csúcsokban eltolódás figyelhető meg [46]. A módszer bármely antibiotikummal szembeni rezisztencia detektálására alkalmas lehet. Az eddigi vizsgálatok szerint a MALDI-TOF MS-módszer alkalmas lehet a mycobacteriumok rezisztenciavizsgálatára is jelentősen lerövidítve a célzott terápia alkalmazásának időpontját [47].

A sarjadzó gombák esetében egy másik rezisztenciameghatározási módszer kipróbálására került sor. A módszer alapötlete, hogy az antifungális szert a MIC (minimal inhibitory concentration) érték alatti és feletti koncentrációkban tartalmazó táplevesben inkubálják a *Candida*-izolátumokat. Összehasonlítva a MALDI-TOF MS-spektrumokat a MIC-érték felett jelentősen megváltozik a spektrum, így a MIC-érték megállapítható. Noha az eredeti módszer még nem rövidítette le jelentősen az érzékenységvizsgálat idejét, az újabban megjelenő változatai azonban valószínűleg áttörést hozhatnak a MALDI-TOF MS-technológia segítségével a sarjadzó gombák antimycoticumokkal szembeni érzékenységének meghatározásában [48].

További alkalmazási lehetőségek a jövőben

Számos további alkalmazási lehetőséget is vizsgálnak, amelyek hasznosíthatók lehetnek a klinikai mikrobiológiai gyakorlatban. A vizsgálatok azt mutatják, hogy a vizelet alkalmas a direkt MALDI-TOF MS-analízisre, mivel nincs normális flórája, alacsony a saját fehérjetartalma, az infekció általában monomikrobiális, a kórokozó pedig relatíve magas koncentrációban van jelen [49]. Áramlási citometriával (vagy egyszerű mikroszkópos natív vizeletüledék-vizsgálattal) előszűrt és pozitívnak minősített vizeletmintákból két centrifugálási lépés után az üledékből végzett teljes sejt MALDI-TOF MS-analízissel (illetve, amennyiben ez eredménytelen, akkor extrakciós eljárás után végzett vizsgálattal) identifikálható a vizeletben a $\geq 10^5$ CFU/ml csíraszámban jelen lévő kórokozó. Ahol megoldható a vizelet „előszűrése”, ott a vizeletmintából végzett MALDI-TOF MS egy gyors és hatékony módszer lehet a húgyúti patogének identifikálására, ami segíti a megfelelő antibiotikus terápia mielőbbi kiválasztását.

Történtek vizsgálatok *Salmonella* sp. gyors kimutatására a székletminták szelenites szelektív dúsítóban 18–24 órán át történt inkubálása után, közvetlenül a dúsítóból végzett MALDI-TOF MS-analízissel. Mivel a *Salmonella* sp. mozog és a szelenites dúsító felső rétegében gyűlik össze, ebből a felső rétegből származó 150 ml folyadékot elegendő használni. *Sparbier és munkatársainak* [50] 92%-ban sikerült MALDI-TOF MS-módszerrel a szelektív dúsítást követően *Salmonella* sp.-t azonosítani, ez lehetővé teheti a *Salmonella*-pozitív eredmény kiadását a minta beérkezése után már 1 nappal. Hasonló elv alapján várandós nők *Streptococcus agalactiae* szűrővizsgálatára is alkalmas lehet a szelektív dúsító és a MALDI-TOF MS-technika kombinációja [Ábrók és mtsai; nem közölt adatok].

A MALDI-TOF MS a speciesmeghatározáson, -tipizáláson és antibiotikumrezisztencia-meghatározáson túl jól alkalmazható DNS- és RNS-analízisre, továbbá számos más proteomikai kérdés megoldására is. Alkalmazása a klinikai virológiában több új lehetőséget nyithat meg a vírusdiagnosztika területén is. Más, a MALDI-TOF MS-hez hasonló technikákat, így például „rapid evaporative ionisation mass spectrometry” (REI-MS), az „electrospay ionization mass spectrometry” (ESI-MS) vagy a „surface-enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectormetry” (SELDI-TOF MS) szintén alkalmazták már baktériumok azonosítására. A „PCR-electrospry ionization mass spectrometry” (PCR-ESI-MS) a multiplex PCR vagy multiplex RT-PCR módszereket kombinálva az ESI-MS módszerrel, lehe-

tőséget biztosít – csökkentett időintervallumban – annak a megválaszolására, hogy egy ismert vagy még ismeretlen patogén jelen van-e a beteg mintájában. További vizsgálatok fogják megmutatni ezen módszerek alkalmazhatóságát a klinikai mikrobiológiai rutindiagnosztikában.

Következtetések

A tömegspektrometria klinikai mikrobiológiai alkalmazása során a baktériumok és gombák széles körének pontos identifikálása, szubtípusszintű analízise, valamint ma még bizonyos korlátok közötti rezisztenciameghatározása igen rövid időn belül (10 perc vagy 2-3 óra) elvégezhető, ami segíti a célzott terápia korai megkezdését, és ezzel lerövidíthető az ápolási idő és annak költsége. Járványügyi és epidemiológiai kérdések gyors megoldására is lehetőséget biztosít. Nem elhanyagolható azonban a módszer laboratóriumon belüli költséghatékonysága sem. Bár a készülék beszerzési ára és éves karbantartási költsége magas, azonban az egyes mérések kivitelezésének ára minimális (5–10 Ft). Jelentősen csökkenthető továbbá a hagyományos identifikálási és rezisztenciameghatározási módszerek használata során keletkező veszélyes hulladék megsemmisítésének költsége. Az igen nagy ütemben haladó kutatások további korlátlan lehetőségeket jósolnak a módszernek a rutin klinikai mikrobiológiai gyakorlatban.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: Az összefoglaló jellegű cikk megírásából minden szerző egyformán vette ki a részét. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekeltségek: A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

Irodalom

[1] *Siuzdak, G.:* The emergence of mass spectrometry in biochemical research. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, *91*(24), 11290–11297.

[2] *Lewis, J. K., Wei, J., Siuzdak, G.:* Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000, 5880–5894.

[3] *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.

[4] *Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., et al.:* MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl. Microbiol. Biotechnol., 2012, *93*(3), 965–974.

[5] *Seng, P., Abat, C., Rolain, J. M., et al.:* Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol., 2013, *51*(7), 2182–2194.

[6] *McElvania TeKippe, E., Shuey, S., Winkler, D. W., et al.:* Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry system. J. Clin. Microbiol., 2013, *51*(5), 1421–1427.

[7] *Lartigue, M. F.:* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for bacterial strain characterization. Infect. Genet. Evol., 2013, *13,* 230–235.

[8] *Ford, B. A., Burnham, C. A.:* Optimization of routine identification of clinically relevant Gram-negative bacteria by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Bruker Biotyper. J. Clin. Microbiol., 2013, *51*(5), 1412–1420.

[9] *Jacquier, H., Carbonnelle, E., Corvec, S., et al.:* Revisited distribution of nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2011, *30*(12), 1579–1586.

[10] *Schaumann, R., Knoop, N., Genzel, G. H., et al.:* Discrimination of Enterobacteriaceae and non-fermenting Gram negative bacilli by MALDI-TOF mass spectrometry. Open. Microbiol. J., 2013, *7,* 118–122.

[11] *Machen, A., Kobayashi, M., Connelly, M. R., et al.:* Comparison of heat inactivation and cell disruption protocols for identification of mycobacteria from solid culture media by use of vitek matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol., 2013, *51*(12), 4226–4229.

[12] *Buchan, B. W., Riebe, K. M., Timke, M., et al.:* Comparison of MALDI-TOF MS with HPLC and nucleic acid sequencing for the identification of Mycobacterium species in cultures using solid medium and broth. Am. J. Clin. Pathol., 2014, *141*(1), 25–34.

[13] *Mather, C. A., Rivera, S. F., Butler-Wu, S. M.:* Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. J. Clin. Microbiol., 2014, *52*(1), 130–138.

[14] *Chen, J. H., Yam, W. C., Ngan, A. H., et al.:* Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. J. Clin. Microbiol., 2013, *51*(12), 3981–3987.

[15] *Verroken, A., Janssens, M., Berhin, C., et al.:* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of Nocardia species. J. Clin. Microbiol., 2010, *48*(11), 4015–4021.

[16] *Nagy, E., Maier, T., Urban, E.:* Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin. Microbiol. Infect., 2009, *15*(8), 796–802.

[17] *Wybo, I., Soetens, O., De Bel, A., et al.:* Species identification of clinical Prevotella isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol., 2012, *50*(4), 1415–1418.

[18] *Veloo, A. C., Erhard, M., Welker, M., et al.:* Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. Syst. Appl. Microbiol., 2011, *34*(1), 58–62.

[19] *Barreau, M., Pagnier, I., La Scola, B.:* Improving the identification of anaerobes in the clinical microbiology laboratory through MALDI-TOF mass spectrometry. Anaerobe, 2013, *22,* 123–125.

[20] *Stingu, C. S., Rodloff, A. C., Jentsch, H., et al.:* Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF MS. Oral Microbiol. Immunol., 2008, *23*(5), 372–376.

[21] *Grosse-Herrenthey, A., Maier, T., Gessler, F., et al.:* Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser

desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOF MS). Anaerobe, 2008, *14*(4), 242–249.

[22] *Ikryannikova, L. N., Filimonova, A. V., Malakhova, M. V., et al.:* Discrimination between Streptococcus pneumoniae and Streptococcus mitis based on sorting of their MALDI mass spectra. Clin. Microbiol. Infect., 2013, *19*(11), 1066–1071.

[23] *Tan, K. E., Ellis, B. C., Lee, R., et al.:* Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-banch study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. J. Clin. Microbiol., 2012, *50*(10), 3301–3308.

[24] *Morrell, M., Fraser, V. J., Kollef, M. H.:* Delaying the empiric treatment of Candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. Antimicrob. Agents Chemother., 2005, *49*(9), 3640–3645.

[25] *Cassagne, C., Cella, A. L., Suchon, P., et al.:* Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. Med. Mycol., 2013, *51*(4), 371–377.

[26] *De Carolis, E., Hensgens, L. A., Vella, A., et al.:* Identification and typing of the Candida parapsilosis complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. Med. Mycol., 2014, *52*(2), 123–130.

[27] *Hof, H., Eigner, U., Maier, T., et al.:* Differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans by means of MALDI-TOF mass spectrometry. Clin. Lab., 2012, *58*(9–10), 927–931.

[28] *Lacroix, C., Gicquel, A., Sendid, B., et al.:* Evaluation of two matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of Candida species. Clin. Microbiol. Infect., 2014, *20*(2), 153–158.

[29] *Lau, A. F., Drake, S. K., Calhoun, L. B., et al.:* Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol., 2013, *51*(3), 828–834.

[30] *Seibold, E., Maier, T., Kostrzewa, M., et al.:* Identification of Francisella tularensis by woll-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable robust and cost-effective differentiation on species and subspecies leveles. J. Clin. Microbiol., 2010, *48*(4), 1061–1069.

[31] *Fujinami, Y., Kikkawa, H. S., Kurosaki, Y., et al.:* Rapid discrimination of legionella by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectormetry. Microbiol. Res., 2011, *166*(2), 77–86.

[32] *Vanlaere, E., Sergeant, K., Dawyndt, P., et al.:* Matrix-assisted laser desorption ionization- time-of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of Burkholderia cepacia complex. J. Microbiol. Methods, 2008, *75*(2), 279–286.

[33] *Stephan, R., Cernela, N., Ziegler, D., et al.:* Rapid species specific identification and subtyping of Yersinia enterocolitica by MALDI-TOF mass spectormetry. J. Microbiol. Methods, 2011, *87*(2), 150–153.

[34] *Lartigue, M. F., Kostrzewa, M., Salloum, M., et al.:* Rapid detection of „highly virulent" group B Streptococcus ST-17 and emerging ST-1 clones by MALDI-TOF mass spectrometry. J. Microbiol. Methods, 2011, *86*(2), 262–265.

[35] *Nagy, E., Becker, S., Sóki, J., et al.:* 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., 2011, *60*(Pt 11), 1584–1590.

[36] *Nagy, E., Urbán, E., Becker, S., et al.:* MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I, II and III of Propionibacterium acnes. Anaerobe, 2013, *20,* 20–26.

[37] *Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., et al.:* Rapid identification and typing of Listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol., 2008, *74*(17), 5402–5407.

[38] *Reil, M., Erhard, M. Kuijper, E. J., et al.:* Recognition of Clostridium difficile PCR-ribotypes 001, 027, and 126/078 using an extended MALDI-TOF MS system. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2011, *30*(11), 1431–1436.

[39] *Wolters, M., Rohde, H., Maier, T., et al.:* MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant Staphylococcus aureus lineages. Int. J. Med. Microbiol., 2011, *301*(1), 64–68.

[40] *Shitikov, E., Ilina, E., Chernousova, L., et al.:* Mass spectrometry based mathods for the discrimination and typing of mycobacteria. Infect. Genet. Evol., 2012, *12*(4), 838–845.

[41] *Wimmer, J. L., Long, S. W., Cernoch, P., et al.:* Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of Gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system. J. Clin. Microbiol., 2012, *50*(7), 2452–2454.

[42] *Ferroni, A., Suarez, S., Beretti, J. L., et al.:* Real-time identification of bacteria and Candida species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol., 2010, *48*(5), 1542–1548.

[43] *Hrabák, J., Studentová, V., Walková, R., et al.:* Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, Oxa-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol., 2012, *50*(7), 2441–2443.

[44] *Sparbier, K., Lange, C., Jung, J., et al.:* MALDI Biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. J. Clin. Microbiol., 2013, *51*(11), 3741–3748.

[45] *Demirev, P. A., Hagan, N, S., Antoine, M. D., et al.:* Establishing drug resistance in microorganisms by mass spectormetry. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2013, *24*(8), 1194–1201.

[46] *Johansson, A., Nagy, E., Sóki, J.:* Detection of carbapenemase activities of Bacteroides fragilis strains with matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Anaerobe, 2014, *26,* 49–52.

[47] *Zhang, R., Long, Y., He, W., et al.:* Application status of MALDI-TOF mass spectrometry in the identification and drug resistance of mycobacterium tuberculosis. J. Thorac. Dis., 2014, *6*(5), 512–516.

[48] *Vella, A., De Carolis, E., Vaccaro, L., et al.:* Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. J. Clin. Microbiol., 2013, *51*(9), 2964–2969.

[49] *Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., Muñoz-Bellido, J. L., et al.:* Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. Clin. Microbiol. Infect., 2011, *17*(7), 1007–1012.

[50] *Sparbier, K., Weller, U., Boogen, C., et al.:* Rapid detection of Salmonella sp. by means of a combination of selective enrichment broth and MALDI-TOF MS. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2012, *31*(5), 767–773.

(Nagy Erzsébet dr.,
Szeged, Pf. 427., 6701
e-mail: nagy.erzsebet@med.u-szeged.hu)