

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sandra CIRMAN

**PRIMERJAVA EKSTRAKCIJSKIH METOD ZA
IDENTIFIKACIJO GLIV KVASOVK Z MASNO
SPEKTROMETRIJO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sandra CIRMAN

**PRIMERJAVA EKSTRAKCIJSKIH METOD ZA IDENTIFIKACIJO
GLIV KVASOVK Z MASNO SPEKTROMETRIJO**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**COMPARISON OF EXTRACTION METHODS FOR THE
IDENTIFICATION OF YEAST FUNGI BY MASS SPECTROMETRY**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Za mentorico magistrskega dela je imenovana doc. dr. Tadeja MATOS, za recenzentko prof. dr. Kristina SEPČIĆ.

Mentorica: doc. dr. Tadeja MATOS, dr. med.

Recenzentka: prof. dr. Kristina SEPČIĆ, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Neža ČADEŽ, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Mentorica: doc. dr. Tadeja MATOS, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za
mikrobiologijo in imunologijo

Recenzentka: prof. dr. Kristina SEPČIĆ, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Sandra Cirman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
DK UDK 579.61:616-078:582.282.23:577.2.083(043)=163.6
KG glive/kvasovke/*Candida*/diagnostika glivičnih okužb/sepsa/identifikacija kvasovk/
ekstrakcija/biokemijski testi/molekularne tehnike/masna spektrometrija/MALDI-
TOF
AV CIRMAN, Sandra, dipl. mikrobiol. (UN)
SA MATOS, Tadeja (mentorica)/SEPČIČ, Kristina (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2014
IN PRIMERJAVA EKSTRAKCIJSKIH METOD ZA IDENTIFIKACIJO GLIV
KVASOVK Z MASNO SPEKTROMETRIJO
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP X, 62 str., 10 pregl., 10 sl., 28 vir.
IJ sl
JI sl/en
AB Zaradi sprememb v socialno ekonomskem standardu in napredka v medicini, je delež okužb z glivami v zadnjem času vedno večji. Za večino mikoz so odgovorne kvasovke iz rodu *Candida*. Za učinkovito zdravljenje je potrebna hitra in pravilna identifikacija povzročitelja, ki pa je klasične identifikacijske metode kot so morfološki ter biokemijski testi, žal ne zagotavljajo. Poleg molekularno-biološke in serološke diagnostike nam hitro in učinkovito identifikacijo kvasovk omogoča masna spektrometrija, pri kateri analiziramo masne spektre v celici najštevilčnejših in konzervativnih beljakovin, na podlagi katerih lahko identificiramo glive do nivoja vrste. Masna spektrometrija je zaradi svoje visoke specifičnosti in hitrosti mikavna metoda za rutinske diagnostične laboratorije. Ker pa je uspešnost masne spektrometrije odvisna od uspešnosti beljakovinske ekstrakcije, smo skušali najti najboljšo, najučinkovitejšo ter najhitrejšo metodo za glivne celice. Primerjali smo tri različne metode, metodo polne ekstrakcije, metodo s segrevanjem in hitro metodo. Prva se je izkazala za najuspešnejšo, vendar pa smo tudi z ostalima dvema dosegli zadovoljive rezultate. Najhujša oblika kandidoze lahko vodi v razvoj kandidemije ali sepse, zato smo postopek masne spektrometrije preizkusili tudi neposredno iz hemokulturnih stekleničk. Tu smo primerjali, dve metodi, metodo s kitom Sepsityper in modificirano metodo s spiranjem. Za uspešnejšo se je izkazala metoda s kitom Sepsityper vendar tudi pri tej metodi delež uspešne identifikacije ni presegel 54 %. V prvem delu posredne identifikacije z masno spektrometrijo smo uporabili skupno 199 izolatov gliv kvasovk večinoma iz rodu *Candida*, v drugem delu neposredne identifikacije pa 96 izolatov gliv kvasovk, prav tako večinoma iz rodu *Candida*.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC UDC 579.61:616-078:582.282.23:577.2.083(043)=163.6
CX fungi/yeasts/*Candida*/diagnosis of fungal infections/sepsis/yeasts
identification/extraction/biochemical tests/molecular techniques/mass
spectrometry/MALDI-TOF
AU CIRMAN, Sandra
AA MATOS, Tadeja (supervisor)/ SEPČIČ, Kristina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2014
TY COMPARISON OF EXTRACTION METHODS FOR THE IDENTIFICATION
OF YEAST FUNGI BY MASS SPECTROMETRY
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes Field Microbiology)
NO X, 62 p., 10 tab., 10 fig., 28 ref.
LA sl
AI sl/en
AB Due to changes in social and economic standards and progress in medicine, the proportion of infections caused by fungi recently increasing. For most mycoses are responsible yeasts of the genus *Candida*. For effective treatment we need rapid and accurate identification of the pathogen, which the classical identification methods such as morphological and biochemical tests, unfortunately, does not provide. In addition, molecular-biological and serological diagnosis and mass spectrometry allows quickly and efficiently identification of yeasts. With mass spectrometry we analyze the mass spectra of the conservative cell proteins on the basis of which we can identify the fungi to the species level. Mass spectrometry is due to their high specificity and speed, very attractive method for routine diagnostic laboratories. However, since the success of mass spectrometry depends on the success of the protein extraction, we tried to find the best, most efficient and fastest method for fungal cells. We compared three different methods, the method of full extraction, method by heating and fast method. The first proved to be the most successful, but with the other two, we also achieved satisfactory results. Candidiasis may lead to the development of candidemia or sepsis, so we also tested mass spectrometry directly from blood culture bottles. Here, we compared two methods, a method with Sepsityper kit and a modified method of washing with distilled water. More successful was method with Sepsityper kit, but also in this method the proportion of successful identification did not exceed 54 %. In the first part of the indirect identification by mass spectrometry, we used a total number of 199 isolates of yeasts, mainly of the genus *Candida* and in the second part, the direct identification of 96 isolates of yeasts, also mainly of the genus *Candida*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 POVZROČITELJI SISTEMSKIH/INVAZIVNIH GLIVIČNIH OKUŽB	3
2.1.1 Osnovne značilnosti rodu <i>Candida</i>	3
2.2 EPIDEMIOLOGIJA	4
2.3 DEJAVNIKI TVEGANJA	5
2.4 ZGRADBA GLIVNE CELIČNE STENE	6
2.5 IDENTIFIKACIJA GLIV KVASOVK	8
2.5.1 Biokemijski testi	8
2.5.2 Molekularne tehnike	10
2.5.2.1 Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija	10
2.5.2.2 Verižna reakcija s polimerazo	11
2.5.3 Masna spektrometrija	12
2.6 PRINCIP TER DELOVANJE MALDI-TOF MASNE SPEKTROMETRIJE	15
2.6.1 Postopek	18
2.6.2 Vzorci oziroma material primeren za analizo z MALDI-TOF masno spektrometrijo	20
2.6.3 Interpretacija rezultatov	21
2.6.4 Primerjava uspešnosti štirih različic predobdelave vzorca pred samo identifikacijo z masno spektrometrijo	22
2.6.5 Identifikacija gliv kvasovk neposredno iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk	23
3 MATERIALI IN METODE	29
3.1 PRIMERJAVA DVEH METOD EKSTRAKCIJE BELJAKOVIN IZ GLIVNIH CELIC - METODE POLNE EKSTRAKCIJE IN POLNE EKSTRAKCIJE S SEGREVANJEM	29
3.1.1 Metoda polne ekstrakcije	29
3.1.2 Metoda polne ekstrakcije s segrevanjem	30
3.2 PRIMERJAVA DVEH METOD EKSTRAKCIJE BELJAKOVIN IZ GLIVNIH CELIC - METODE POLNE EKSTRAKCIJE IN HITRE EKSTRAKCIJE	30
3.2.1 Metoda polne ekstrakcije	31
3.2.2 Hitra metoda	31

3.3 PRIEMRJAVA DVEH METOD IDENTIFIKACIJE GLIV KVASOVK NEPOSREDNO IZ POZITIVNIH HEMOKULTURNIH STEKLENIČK - METODE S KITOM SEPSITYPER IN MODIFICIRANE METODE S SPIRANJEM	31
3.3.1 Metoda s kitom Sepsityper	32
3.3.2 Metoda s spiranjem	32
3.4 ANALIZA VZORCEV Z MASNIM SPEKTROMETROM	33
3.5 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	34
4 REZULTATI	35
4.1 PRIMERJAVA DVEH METOD EKSTRAKCIJE BELJAKOVIN IZ GLIVNIH CELIC-METODE POLNE EKSTRAKCIJE IN POLNE EKSTRAKCIJE S SEGREVANJEM	35
4.2 PRIMERJAVA DVEH METOD EKSTRAKCIJE BELJAKOVIN IZ GLIVNIH CELIC - METODE POLNE EKSTRAKCIJE IN HITRE METODE	38
4.3 PRIMERJAVA DVEH METOD IDENTIFIKACIJE GLIV KVASOVK NEPOSREDNO IZ POZITIVNIH HEMOKULTURNIH STEKLENIČK-METODE S KITOM SEPSITYPER IN MODIFICIRANE METODE S SPIRANJEM	41
5 RAZPRAVA	44
5.1 METODA POLNE EKSTRAKCIJE IN POLNE EKSTRAKCIJE S SEGREVANJEM	44
5.2 METODA POLNE EKSTRAKCIJE IN HITRA METODA	45
5.3 IDENTIFIKACIJA GLIV KVASOVK NEPOSREDNO IZ HEMOKULTUR	51
6 SKLEPI	55
7 POVZETEK	57
8 VIRI	58
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Slabosti in prednosti biokemijskih testov za identifikacijo gliv kvasovk (Buesching in sod., 1979).....	10
Preglednica 2: Prednosti in slabosti molekularnih testov pri identifikaciji gliv kvasovk (Eisenstein, 1990).....	12
Preglednica 3: Prednosti in slabosti masne spektrometrije kot metode za identifikacijo gliv kvasovk (Bader, 2013).....	14
Preglednica 4: Prednosti in slabosti identifikacije z masno spektrometrijo neposredno iz pozitivnih hemokultur (Yan in sod., 2011; Spanu in sod., 2012).....	28
Preglednica 5: Primerjava števila pravilno identificiranih gliv kvasovk z metodo polne ekstrakcije in metodo polne ekstrakcije s segrevanjem ter pripadajoči deleži ter izračunana vrednost hi-kvadrat, kot orodje za statistično obdelavo podatkov	36
Preglednica 6: Primerjava povprečnega "log score" pri metodi polne ekstrakcije in metodi polne ekstrakcije s segrevanjem	37
Preglednica 7: Primerjava pravilno identificiranih gliv kvasovk z metodo polne ekstrakcije in hitro metodo ter pripadajoči deleži, ter izračunana vrednost hi-kvadrat, kot orodje za statistično obdelavo podatkov	39
Preglednica 8: Primerjava povprečnega "log score" pri metodi polne ekstrakcije in hitri metodi	40
Preglednica 9: Primerjava pravilno identificiranih gliv kvasovk s kitom Sepsityper in z modificirano metodo s spiranjem. Pri metodi s spiranjem je vključeno večkratno spiranje ter dodatek surfaktanta.....	42
Preglednica 10: Primerjava povprečnega "log score" pri metodi s kitom Sepsityper in metodi s spiranjem. Pri metodi s spiranjem je vključeno večkratno spiranje ter dodatek surfaktanta.	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura in shematski prikaz zgradbe celične stene <i>C. albicans</i> (Ruiz-Herrera in sod., 2006: 15)	7
Slika 2: Primerjava masnih spektrov <i>C. albicans</i> v primeru a) brez etanola in v primeru b) z dodatkom etanola (Qian in sod., 2008:442).....	14
Slika 3: Shematski prikaz MALDI-TOF masnega spektrometra (Theel, 2013; Bader, 2013)	15
Slika 4: Zunanji izgled MALDI-TOF masnega spektrometra (foto: Cirman S.).....	16
Slika 5: Sestavni deli MALDI-TOF masnega spektrometra (Theel, 2013: 156)	17
Slika 6: Shematski prikaz postopka in delovanja MALDI-TOF masnega spektrometra (Theel, 2013: 156)	19
Slika 7: Celoten postopek identifikacije mikroorganizma od kolonije do masne spektrometrije (Theel, 2013: 158)	21
Slika 8: Grafični prikaz primerjave povprečnega "log score" pri metodi polne ekstrakcije in polne ekstrakcije s segrevanjem	38
Slika 9: Grafični prikaz primerjave povprečnega "log score" pri metodi polne ekstrakcije in hitre ekstrakcije	41
Slika 10: Grafični prikaz primerjave povprečnega "log score" pri metodi s kitom Sepsityper in metodi s spiranjem.....	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ASL	argininosukcinat liaza (angl. argyninosuccinate lyase)
CO ₂	ogljikov dioksid
dATP	deoksiadenozin trifosfat
dCTP	deoksicitozin trifosfat
DESI	desorpcijska ekeltrosprej masna spektrometrija (angl. desorption electropray ionization)
dGTP	deoksigvanozin trifosfat
dTTP	deoksitimin trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
FISH	luorescentna in situ hibridizacija
GPI	glikozil fosfatidilnozitolni protein (angl. glycoposphatidylinositol protein)
HCCA	α -ciano-4-hidroksicinamska kislina (angl. α -ciano-4-hydroxycinnamyc acid)
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti (ang. human immunodeficiency virus)
log score	vrednost ujemanja masnih spektrov (izrazi, ki opisujejo enako vrednost so score value, log (score) value)
m	masa
m/z	razmerje med maso in nabojem
MALDI	ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo (angl.matrix-assisted laser desorption/ionization)
MS	masna spektrometrija
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain raction)
pH	merilo za koncentracijo hidroksidnih ionov v raztopini
PNA	poliamidne sode (angl. peptide nucleic acid)
RAE	proteini vezani z disulfidnimi mostički
rRNA	ribosomalna ribonukleinska kislina (angl. ribosomal ribonucleic acid)
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. sodium dodecyl sulfate)
SIMS	sekundarna ionska masna spektrometrija (angl. secondary ion mass spectrometry)
Taq DNA	termostabilna DNA polimeraza (angl. thermostable DNA polymerase)

TFA trifluoroocetna kislina (angl. trifluoroacetic acid)
TOF čas potovanja (angl. time of flight)
z naboj

1 UVOD

Masna spektrometrija je metoda, ki se uporablja za strukturno analizo kompleksnih beljakovinskih vzorcev. Z njo lahko določamo strukturo posameznih molekul, izmerimo njihovo molekulsko maso in opredelimo molekulsko formulo. Je učinkovita tehnika za identifikacijo beljakovin na osnovi analize ioniziranih molekul v plinski fazi. Zaradi visoke občutljivosti metode lahko zaznamo tudi spojine, v vzorcu prisotne v zelo majhnih koncentracijah. Spodnja meja detekcije je odvisna od uporabljenega postopka ionizacije. Masno spektrometrijo nam omogoča instrument masni spektrometer, ki ione v plinski fazi loči glede na njihovo maso (m) in naboj (z), oziroma glede na njihovo razmerje (m/z). Poznamo dve obliki ionizacije molekul, tako imenovane "mehke" tehnike za ionizacijo bioloških molekul in ostale za ionizacijo nebioloških molekul. Mehke oblike desorpcijske ionizacije molekul so: sekundarna ionska masna spektrometrija (angl. secondary ion mass spectrometry; SIMS), ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo (angl. matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) in desorpcijska elektrosprej masna ionizacija (angl. desorption electrospray ionization; DESI). Za detekcijo večjih biomolekul kot so beljakovine se najpogosteje uporablja MALDI ionizacija v kombinaciji z analizatorjem časa potovanja (angl. time of flight; TOF). Masna spektrometrija je zaradi svojih značilnosti določanja masnega profila molekul vzorca, primerna metoda za identifikacijo bakterijskih in glivnih povzročiteljev okužb. Tovrstna identifikacija poteka glede na primerjavo beljakovinskega profila preiskovanega vzorca z znanimi beljakovinskimi profili najpogostejših povzročiteljev okužb. Ne le bakterijske, tudi okužbe z glivami postajajo vse pogostejše. Zaradi sprememb v socialno ekonomskem standardu in napredka v medicini, se delež okužb z glivami v zadnjem času povečuje. Glive lahko povzročajo kolonizacijo, lokalne in sistemske okužbe, preobčutljivostne reakcije, sepsa ali toksični šok. Ločimo lokalne ter invazivne/sistemske okužbe. Slednje so značilne predvsem za imunsko kompromitirane ljudi, hospitalizirane in ljudi s kroničnimi obolenji. Število imunsko kompromitiranih ljudi v zadnjem času zelo hitro narašča. Med njimi so kronično bolni, ljudje ki okrevajo po operativnih posegih, ter tisti kateri so dlje časa pod bolniško oskrbo v intenzivni negi. Sočasno z naraščanjem števila imunsko oslabelih se povečuje tudi spekter oportunističnih invazivnih/sistemskih glivičnih okužb. Za učinkovito zdravljenje le-teh je potrebna hitra in pravilna identifikacija povzročitelja, ki pa je klasične identifikacijske

metode, kot so morfološki ter biokemijski testi, žal ne zagotavljajo. Poleg molekularno-biološke in serološke diagnostike nam zato hitro in učinkovito identifikacijo gliv omogoča masna spektrometrija, pri kateri analiziramo masne spektre v celici najštevilčnejših in konzervativnih beljakovin, na podlagi katerih lahko identificiramo glive do nivoja vrste. Masna spektrometrija je zaradi svoje visoke specifičnosti in hitrosti mikavna metoda za rutinske diagnostične laboratorije.

1.1 NAMEN DELA

- ugotoviti učinkovitost različnih postopkov beljakovinske ekstrakcije gliv kvasovk večinoma iz rodov *Candida*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, osamljenih iz različnih kliničnih vzorcev v letih 2012 in 2013
- ugotoviti učinkovitost identifikacije z masno spektrometrijo: ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo ter analizo časa potovanja molekul (angl. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight; MALDI-TOF) neposredno iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk
- oceniti uporabnost omenjenih postopkov v okviru laboratorijske diagnostike glivičnih okužb

1.2 HIPOTEZA

Pričakovali smo, da bomo z modifikacijo postopkov ekstrakcije v 1. delu naloge povečali uspešnost in zanesljivost metode ter skrajšali čas identifikacije povzročiteljev glivičnih okužb, ter z modifikacijo postopka identifikacije neposredno iz hemokultur v 2. delu pridobili učinkovito orodje za identifikacijo kandidemije.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POVZROČITELJI SISTEMSKIH/INVAZIVNIH GLIVIČNIH OKUŽB

Zaradi sprememb v socialno ekonomskem standardu in napredka v medicini, je delež okužb z glivami v zadnjem času vedno večji. Glive lahko povzročajo kolonizacijo, lokalne in sistemske okužbe, preobčutljivostne reakcije, sepsa ali toksični šok. Ločimo lokalne ter invazivne/sistemske okužbe. Slednje so značilne predvsem za imunsko kompromitirane ljudi, hospitalizirane in ljudi s kroničnimi obolenji. Število imunsko kompromitiranih ljudi v zadnjem času narašča. Med njimi so kronično bolni, ljudje ki okrevajo po operativnih posegih, ter tisti kateri so dlje časa pod bolniško oskrbo v intenzivni negi (Delaloye in Calandra, 2014). Sočasno z naraščanjem števila imunsko oslabilih se povečujeta tudi incidenca in spekter oportunističnih invazivnih/sistemskih glivičnih okužb. Najpogostejši povzročitelji bolnišničnih okužb med glivami so iz rodu *Candida* in *Aspergillus*. Redkejši povzročitelji so npr. *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii*, *Penicillium marneffeii*, *Mucor* spp., *Lichthemia ramosa*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. in drugi. Ti sistemske okužbe povzročajo pri bolnikih s HIV, onkoloških in hematoloških bolnikih, bolnikih po presaditvah organov, bolnikih, ki jemljejo zaviralce imunskega odziva ali kortikosteroide (Delaloye in Calandra, 2014).

2.1.1 Osnovne značilnosti rodu *Candida*

Glive rodu *Candida* spadajo med kvasovke. Kvasovke so enocelični organizmi, ki se razmnožujejo z brstenjem. Novo nastale celice blastospore lahko ostanejo povezane v posebne strukture psevdohife, razen pri vrsti *Candida glabrata* za katero psevdohife niso značilne. Blastospore so okrogle in velike okoli 5 µm. Po Gramu se obarvajo pozitivno, na Sabouraud agarju tvorijo kremaste bele kolonije premera do 2 mm, na koruznem agarju *Candida albicans* tvorijo odebeljene klamidospore (Matos, 2002).

Prvi zgodovinski zapisi okužb z glivami rodu *Candida* so iz časa grškega zdravnika Hipokrata, kjer so se med ljudmi pogosto pojavljale v obliki belih tvorbo na ustni sluznici. Prav tako pogoste so bile vaginalne okužbe in okužbe žrela. *C. albicans* je bila identificirana že v 19. stoletju, vendar večina raziskav patogenosti te kvasovke je bilo narejenih v drugi polovici 20. stoletja (Barnett, 2008).

Predstavnike rodu *Candida* najdemo povsod, saj so prisotne tako v zemlji in vodi kot tudi na koži in sluznici ljudi. So oportunistični patogeni, ki okužbo povzročajo ob zmanjšanem delovanju imunskega sistema, ko ta ni več zmožen ubraniti prekomernega razrasta gliv kvasovk. Težave lahko povzročajo tudi v bolnišnicah, saj so potencialni povzročitelji bolnišničnih okužb. Število bolnišničnih okužb z glivami rodu *Candida* je od leta 1980 še posebej pričelo naraščati (Pfaller, 1996).

Poznamo več kot 150 različnih vrst. Spadajo v kraljestvo gliv, deblo Ascomycota, poddeblo Saccharomycotina, razred Saccharomycetes, red Saccharomycetales, družino Saccharomycetaceae in rod *Candida* (McCullough in sod., 1996).

2.2 EPIDEMIOLOGIJA

Glive so odgovorne za 15 % bolnišničnih okužb. Med njimi *Candida* predstavlja od 70 do 90 % vseh invazivnih okužb. Sledi ji *Aspergillus* z 10-20 % (Delaloye in sod., 2014). Glive rodu *Candida* so najpogostejši vzrok glivičnih seps ter septičnih šokov na intenzivnem oddelku. Invazivne/sistemske okužbe s kandido so povezane z visoko smrtnostjo. Ker pa gre pri bolnikih, še posebej pri tistih na intenzivnem oddelku ponavadi za sočasno prisotnost tudi drugih resnih boleznih, mnogokrat ni popolnoma jasno ali je res glavni vzrok za smrt okužba s kandido ali osnovna bolezen. Smrtnost invazivnih okužb ima zato širok razpon in znaša od 5 do 71 % (Delaloye in Calandra, 2014). V primerih, ko se sepsa razvije v septični šok, smrtnost znaša nad 60 % (Delaloye in Calandra, 2014).

Starost bolnika, geografska lega ter splošna razširjenost uporabe protiglivičnih zdravil vplivata na porazdelitev ter zastopanost vrst rodu *Candida* (Delaloye in Calandra, 2014). Na južni polobli (južna Evropa, Latinska Amerika in Avstralija) se pogosteje pojavlja *Candida parapsilosis*, *C. glabrata* pa več okužb povzroča pri starejših kot pri mlajših bolnikih (Delaloye in Calandra, 2014).

Do nedavnega je bila *C. albicans* najpogostejši povzročitelj kandidoze in kandidemije. Predstavljala je kar dve tretjini vseh izolatov. Vendar pa se epidemiologija ves čas spreminja, zato je v zadnjih dveh desetletjih med povzročitelji vse več tudi drugih vrst kot so *C. glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* in *C. parapsilosis*. Tako so v zadnjem

času preostale vrste, ne *C. albicans* skupaj postale odgovorne za več kot 50 % kandidoz (Delaloye in Calandra, 2014). Vzrokov za porast okužb z ostalimi vrstami rodu *Candida* (ne *C. albicans*) je več. Eden izmed njih je zmanjšana občutljivost za azole, predvsem flukonazol pri vrsti *C. glabrata* ali prav tako zmanjšana občutljivost za ehinokandine pri vrsti *C. parapsilosis*. Proti flukonazolu je odpornih 17,1 % vrst rodu *Candida*. Najmanj odpornih je iz vrste *C. albicans*. Poglaviten vzrok za spremembe v epidemiologiji je zato lahko tudi pretirana, nesmotrna uporaba antimikotikov, v prvi vrsti azolov (Delaloye in Calandra, 2014).

2.3 DEJAVNIKI TVEGANJA

Glive rodu *Candida* so pri ljudeh del normalne mikrobiote kože, sluznice spolovil ter gastrointestinalnega traka (Delaloye in Calandra, 2014). Velika večina okužb je zato endogenega izvora. Možen pa je tudi eksogen vnos, npr. v bolnišnicah z okuženimi infuzijskimi tekočinami, s kontaminiranimi rokami bolnišničnega osebja (Pfaller, 1996). *Candida* je oportunistični patogen, zato ne povzroča okužb, dokler ne pride do zmanjšanja delovanja imunskega sistema ali porušanja ekologije normalne mikroflore. Pomemben dejavnik je spreminjanje endogene mikroflore z antibiotiki, saj tako z odstranitvijo naravno prisotnih mikroorganizmov omogočimo nepravilno ali prekomerno razraščanje gliv na površini kože ter sluznic. Drugi pomemben dejavnik pa so namerne ali nenamerne fizične poškodbe naravnih barier kot sta koža in sluznica, npr. pri operativnih posegih ali zdravljenjih s kemoterapijo. Na ta način odstranimo pomembno mejo, ki glivam preprečuje vstop v naše telo (Delaloye in Calandra, 2014).

Glavni dejavniki tveganja za razvoj okužbe z glivami rodu *Candida* so a) dolgotrajno zdravljenje v bolnišnični oskrbi, kar še posebej veliko nevarnost predstavlja za bolnike na intenzivnem oddelku; b) uporaba širokospektralnih antibiotikov, ki poškodujejo naravno bakterijsko mikrofloro in s tem naravno zaščitno plast; c) imunska oslabelost zaradi različnih vzrokov kot je levkemija, limfom, HIV, napredovani rak, zdravljenje raka z obsevanjem ali citostatiki, zdravljenje z zaviralci imunskega odziva po transplantacijah, zdravljenje avtoimunskih bolezni s citostatiki; d) vstavljeni trajni intravenski katetri; e) operativni poseg in f) parenteralna prehrana (Pfaller, 1996).

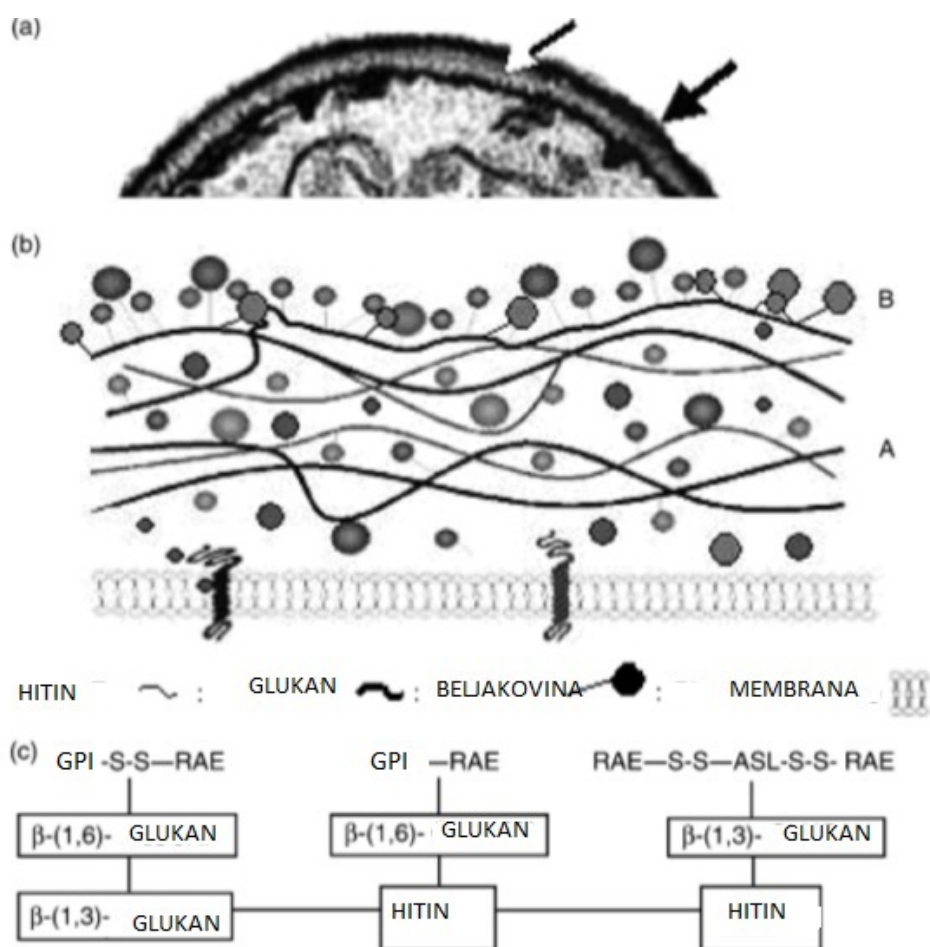
2.4 ZGRADBA GLIVNE CELIČNE STENE

Celična stena je zunanja celična struktura s številnimi funkcijami. Glivno celico varuje pred zunanjimi fizikalnimi, kemijskimi in biološkimi agensi. Ima pomembno zaščitno vlogo. Ščiti pred imunskim odzivom gostitelja ter hkrati preko adhezije omogoča neposreden stik z gostiteljevo celico oziroma njeno površino (Chaffin, 2008).

Celična stena je koherentna struktura, sestavljena iz urejenega zaporedja sestavin. Kemijske vezi med posameznimi sestavinami so kovalentne, vodikove, ionske interakcije ter hidrofilne in hidrofobne interakcije. Sestavljena je iz več različnih slojev, ki se med seboj razlikujejo po elektronski gostoti. Celična stena *C. albicans* je sestavljena iz 4 do 8 slojev (Ruiz-Herrera in sod., 2006; Chaffin in sod., 1998).

Približno 80-90 % celične stene *C. albicans* je iz ogljikovih hidratov, 6-25 % predstavljajo beljakovine, le manjši del 1-7 % lipidi. Tri ključne komponente celične stene so **β glukani** (polimeri glukoze vezani z β - 1,3 in β - 1,6 vezmi), **hitin** (polimeri N-acetil-D-glukozamina vezani z β - 1,4 vezmi) in **gliko-mano-proteini** (polimeri manoze, ki so kovalentno vezani z beljakovinami). Skupaj tvorijo rigidno strukturo, ki celici nudi oporo in zaščito (Chaffin in sod., 1998).

V celični steni največ β -glukana (47-60 %), sledijo manoproteini (40 %) najmanj je hitina (0,6-9 %) (Chaffin in sod., 1998). Notranji sloj celične stene vsebuje več hitina in polisaharidov, zunanji sloji vsebujejo več manoproteinov (Chaffin, 2008).



Slika 1: Struktura in shematski prikaz zgradbe celične stene *C. albicans* (Ruiz-Herrera in sod., 2006: 15)

Slika a) je posneta z elektronsko mikrofografijo in prikazuje elektronsko redkejši notranji sloj, ter elektronsko gostejši zunanji sloj. Notranji sloj je sestavljeni večinoma iz polisaharidov β -glukana in hitina in manjše količine beljakovin. Zunanji sloj je sestavljen iz različnih manoproteinov, to so glikoproteini ki vsebujejo manozo. Slika b) prikazuje shemo celične stene. V notranjem sloju so β -1,3/1,6-glukanske verige s kovalentnimi vezmi vezane na hitinska vlakna (mikrofibrile). β -1,3/1,6-glukan, hitin in manjši del nekaterih proteinov tako skupaj sestavljajo osnovno komponento celične stene. Zunanji sloj celične stene vsebuje več proteinov, kot notranji. Ti proteini so pripeti s kovalentnimi ali nekovalentnimi vezmi. Slika c) prikazuje molekularno organizacijo celične stene. Proteini so pripeti bodisi na kratke verige β -1,6-glukana, bodisi na hitin preko β -1,6-glukana, ali pa direktno na hitin.

GPI - proteini vezani z glikozil fosfatidilinozitolnim delom

ASL - proteini vezani z vezmi občutljivimi na alkalen pH

RAE - proteini vezani z disulfidnimi mostički (Ruiz-Herrera in sod., 2006)

Struktura celične stene je pri identifikaciji gliv kvasovk zelo pomembna ter za nas zanimiva, saj pri identifikaciji gliv z masno spektrometrijo ciljamo na določitev celičnih komponent, do katerih pridemo le z učinkovitim sredstvom za razgradnjo celične stene. Prav zato je ključnega pomena, da podrobno poznamo njene komponente ter povezave med njimi (Chaffin, 2008).

2.5 IDENTIFIKACIJA GLIV KVASOVK

2.5.1 Biokemijski testi

Klasična biokemijska identifikacija gliv kvasovk temelji na fenotipskih biokemijskih lastnostih mikroorganizma, kot so sposobnost fermentacije različnih sladkorjev, sposobnosti razgradnje določenih virov ogljika in dušika, torej glede na zmožnost tvorbe različnih encimov oziroma razlike v presnovnih poteh. Poleg razgradnje različnih virov ogljika in dušika spremljamo tudi tvorbo plinov kot je CO₂, potrebo po vitaminih, rast pri visokih koncentracijah sladkorja, soli ali etanola in različnih zmožnostih razgradnje sečnine (Zalar in sod., 2012).

Biokemijske teste lahko izvajamo v tekočih ali trdnih gojiščih. Med biokemijskimi testi je na voljo več različic polavtomatskih testov s posebnimi stripi z luknjicami v katerih so različni substrati in kontrola. Na substrat je kot označevalec lahko vezan naftil. V primeru da mikroorganizem sintetizira encim specifičen za razgradnjo določenega substrata, se naftil odcepi kar povzroči nastanek barvne reakcije. Pozitivna barvna reakcija pomeni tvorbo določenega encima, intenziteta barve pa nam pove količino proizvedenega encima (Zalar in sod., 2012). Lahko pa test poteka tudi brez indikatorja, kjer o rasti sklepamo glede na motnost vsebine posamezne luknjice.

Biokemijski testi so dokaj uporabni, vendar je ponavadi za popolno identifikacijo potrebno opraviti še dodatne teste, kot je mikroskopiranje. Prav tako biokemijski testi niso najbolj primerni za hitro identifikacijo saj inkubacija ponavadi trajaja od 24 do 72 ur po inokulaciji. Pri počasi rastočih organizmih, kot je *C. neoformans* to predstavlja še večjo težavo, saj je pogosto potrebna podaljšana inkubacija dodatnih 24 ur (Buesching in sod., 1979).

Za metodo identifikacije z biokemijskimi testi je značilna nizka specifičnost, ker temelji na fenotipskih in ne genotipskih lastnostih. Zato se pogosto pojavljajo napake v identifikaciji med podobnimi organizmi, ki so prilagojeni na enako okolje, na primer zamenjava *C. albicans* s *C. tropicalis* in obratno. Kot primer, če pride do lažno pozitivnega rezultata asimilacije melezitose lahko seve *C. albicans* napačno identificiramo kot *C. tropicalis* in obratno, če pride do lažno negativnega rezultata asimilacije melezitose sev *C. tropicalis* napačno imenujemo za *C. albicans*. Značilnost obeh organizmov *C. albicans* in *C. tropicalis* je namreč prav variabilnost v razgradnji melezitose (Buesching in sod., 1979). Rešitev v takšnih primerih nam predstavljajo klasični testi identifikacije kot je kultivacija na različnih gojiščih saj si glivi *C. albicans* in *C. tropicalis* na kromogenem agarju nista podobni. Več težav pa imamo s tistimi glivami, katere na kromogenem agarju izgledajo zelo podobno, kot je značilno za *C. albicans* in *Candida dubliniensis*. Prav tako z biokemijskimi testi ne moremo ločevati kvasovk znotraj posameznih kompleksov, ker so si kvasovke znotraj takih kompleksov fenotipsko preveč podobne. Takšni kompleksi so kompleks *C. albicans/C. dubliniensis/Candida stellatoidea*, kompleks *C. glabrata/Candida bracarensis/Candida nivariensis* in kompleks *C. parapsilosis/ Candida orthopsilosis/ Candida metapsilosis*. Pozneje odkritih gliv kvasovk kot sta *C. metapsilosis* in *C. orthopsilosis* tako s fenotipskimi testi ne moremo ločiti od že bolj znane *C. parapsilosis* (Marklein in sod., 2009). Posledica nerazločevanja znotraj kompleksov je, da z biokemijsko identifikacijo v primeru okužbe bolnika bodisi s *C. metapsilosis*, sev nepopolno identificiramo kot *C. parapsilosis*.

Preglednica 1: Slabosti in prednosti biokemijskih testov za identifikacijo gliv kvasovk (Buesching in sod., 1979)

<u>Slabosti:</u>	<ul style="list-style-type: none">- dolgotrajni, potrebna je rast čez noč (inkubacija 48-72 ur pri 30 °C)- zahtevajo veliko dela (večkratno odčitavanje, po 24, 48 in 72 urah)- dolgi časi inkubacije (pri počasi rastočih organizmih kot je <i>C. neoformans</i> tudi dlje kot 72 ur)- dolgotrajen postopek za izvajalca- rezultati reakcije so zelo subjektivni (večja možnost napačne interpretacije rezultatov)- možnost napačne identifikacije zaradi enakih biokemijskih profilov pri različnih vrstah (pogosto zamenjamo <i>C. albicans</i> za <i>C. tropicalis</i> in obratno)- nerazločevanje znotraj kompleksov- pomanjkljivi podatki v podatkovnih zbirkah (ni vnešenega encimskega profila <i>Candida lambica</i>)
<u>Prednosti:</u>	<ul style="list-style-type: none">- cenovno ugodna metoda

Namesto biokemijskih testov na osnovi fenotipskega razlikovanja zato vse več posegamo po hitrejših ter bolj natančnih molekularnih tehnikah, ki pa so drage ter zahtevne (Bader, 2013).

2.5.2 Molekularne tehnike

2.5.2.1 Fluorescentna *in situ* hibridizacija

S fluorescentno *in situ* hibridizacijo (angl. fluorescent *in situ* hybridization; FISH) lahko s pomočjo fluorescentno označenih poliamidnih (angl. peptide nucleic acid; PNA) sond označimo dele kromosomov, ki nas zanimajo in jih nato prepoznamo pod fluorescentnim mikroskopom (Rigby in sod., 2002). V samo reakcijo vključimo več različnih sond označenih z različnimi fluorescentnimi barvili. Vsaka označena sonda pomeni svojo skupino kvasovk. Tarčno zaporedje označenih sond je ribosomalna ribonukleinska kislina (angl. ribosomal ribonucleic acid; rRNA). S hibridizacijo se fluorescentno označena PNA sonda veže na rRNA, kar nam omogoča, da kompleks določene barve vidimo pod fluorescentnim mikroskopom. Glede na barvo, ki jo vidimo pod fluorescentnim

mikroskopom, lahko določimo skupino preiskovanega organizma (kvasovke). Metoda ima 100 % občutljivost in specifičnost. Vendar pa z njo lahko določamo le nekatere skupine kvasovk in ne posameznih vrst (Rigby in sod., 2002).

2.5.2.2 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction; PCR) je encimska tehnika pomnoževanja željenega specifičnega zaporedja DNA *in vitro*. Imamo več možnosti, s to metodo lahko namnožimo izbrani odsek ter ga nato sekvenciramo ali ločimo pomnožene produkte z elektroforezo na agaroznem gelu. V PCR reakciji uporabimo ustrezno označene začetne sonde, specifične za določen organizem (vrsto kvasovke), ki nalegajo le na zaporedje tega organizma. Glede na produkt reakcije nato sklepamo o vrsti organizma (Eisenstein, 1990).

Za PCR reakcijo potrebujemo vzorec DNA, pufer, 4 vrste deoksiribonukleozid trifosfatov (dGTP, dATP, dCTP, dTTP), par začetnih oligonukleotidov, Taq DNA polimerazo. Reakcija poteka v treh stopnjah. V prvi stopnji je temperatura 92 °C. V tej fazi DNA denaturira v dve ločeni verigi. V naslednji stopnji temperaturo znižamo na 50-55 °C. Začetna oligonukleotida se v tej fazi pritrdita na komplementarno zaporedje. Vsak na svoji verigi sta obrnjena drug proti drugemu s 3' koncem. V tretji stopnji temperaturo spet zvišamo na 72 °C, kar je optimalna temperatura za delovanje Taq polimeraze. Od vsakega začetnega oligonukleotida vsaki verigi Taq polimeraza v 5' - 3' smeri sintetizira komplementarno verigo. Na ta način dobimo dve dvojni vijačnici DNA z vključenima začetnima oligonukleotidoma. PCR reakcija ima ponavadi okoli 30 takšnih ponovitev. Po končani PCR reakciji običajno sledi gelska elektroforeza, kjer z lisami standarda primerjamo lise našega pomnožka (Eisenstein, 1990).

Preglednica 2: Prednosti in slabosti molekularnih testov pri identifikaciji gliv kvasovk (Eisenstein, 1990)

<u>Prednosti:</u>	<ul style="list-style-type: none">- zelo hitre metode v primerjavi s konvencionalnimi biokemijskimi testi- jasni in točni rezultati identifikacije
<u>Slabosti:</u>	<ul style="list-style-type: none">- draga metoda- zahtevajo veliko znanja in usposabljanja izvajalca- niso primerni za masovne bolnišnične potrebe- ni standardiziranih in validiranih protokolov

2.5.3 Masna spektrometrija

Masna spektrometrija zagotavlja večjo natančnost kot biokemijski testi ali mikroskopiranje oziroma ostali klasični testi ter posledično krajši čas identifikacije povzročitelja okužbe in pričetka ustreznega zdravljenja. Masna spektrometrija (angl. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; MALDI-TOF MS) poleg identifikacije povzročiteljev okužb omogoča tudi ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom in antimikotikom, tipizacijo mikroorganizmov ter možnost identifikacije povzročiteljev okužb neposredno iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk (Bader, 2013).

Čim prejšnji začetki zdravljenja okužb z glivami so pomemben korak pri okrevanju bolnika, zato je pomembno, da imamo v rutinski diagnostiki glivičnih okužb na voljo čim hitrejše, učinkovite ter zanesljive metode identifikacije. Na takšen način zmanjšamo tudi celotne stroške zdravljenja, saj je tako zdravljenje krajše, hkrati pa povečamo učinkovitost zdravljenja. Pogosti so primeri neučinkovitega zdravljenja npr. zdravljenje z azoli pri okužbi z *C. glabrata* ali *Candida krusei*, ter prav tako primeri nepravega dragega zdravljenja v primeru okužb s *C. parapsilosis* z ehinokandini med katerimi je najpogosteje uporabljen kaspofungin (Bader, 2013). *C. parapsilosis* je namreč naravno odporna proti kaspofunginu, zanjo je značilna višja minimalna inhibitorna koncentracija (angl. minimal inhibitory concentration; MIK) za občutljivost za kaspofungin.

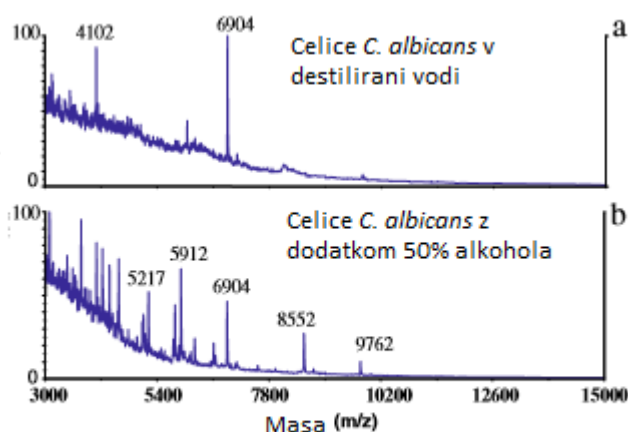
Prvi začetki idej o identifikaciji z masno spektrometrijo segajo v leto 1980, za identifikacijo kvasovk pa je bila prvič uporabljena leta 2001 (Bader, 2013). V rutinski diagnostiki se metoda uporablja šele zadnjih nekaj let zaradi napredka računalniških sistemov, obširnejših podatkovnih zbirk ter možnostjo standardizacije. V tem času je

metoda pridobila na hitrosti, zaradi česar je sedaj še bolj primerna za diagnostične namene. Računalniški procesorji delujejo vse hitreje, na voljo so moderne oblike laserjev, hitro pridobivanje masnih spektrov iz obsežnih podatkovnih zbirk omogoča identifikacijo iz dobro pripravljenega analita v le nekaj sekundah. V primerjavi z biokemijskimi testi, ki zahtevajo rast gliv čez noč je masna spektrometrija izredno hitra metoda (Bader, 2013).

Trenutno so v uporabi 4 komercialni sistemi

- MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Nemčija)
- AXIMA@SARAMIS database (AnagnosTec, Potsdam Nemčija in Shimadzu, Duisburg, Nemčija)
- Andromas (Andromas, Pariz, Francija)
- VITEK MS systems (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija)

Vsi ti sistemi zelo dobro delujejo pri identifikaciji bakterij, nekaj več težav pa je pri identifikaciji gliv (Bader, 2013). Identifikacija po Gramu pozitivnih bakterij in gliv kvasovk z MALDI-TOF MS je nekoliko težja od identifikacije po Gramu negativnih bakterij, zaradi kompaktnejše celične stene po Gramu pozitivnih bakterij in gliv (Schubert in sod., 2011). Tudi Qian in sod. (2008) navajajo nekoliko težjo identifikacijo gliv z masno spektrometrijo v primerjavi z identifikacijo bakterij. Kot eno izmed rešitev pri izboljšanju identifikacije omenjajo uporabo etanola za inaktivacijo in fiksacijo celic. Z etanolom naj bi preprečili povezovanje celic v agregate in na ta način izboljšali dostopnost celične stene posamezne celice ter tako olajšali ekstrakcijo znotrajceličnih beljakovin potrebnih za identifikacijo. Celice gliv v vodni raztopini tvorijo agregate, v raztopini vode in etanola pa do nastanka agregatov ne pride. Pri ekstrakciji beljakovin iz celic fiksiranih z etanolom pride do sprostitve večjega števila ionov, tako dobimo lepše masne spektre, kjer je prisotnih več vrhov značilnih za posamezno vrsto, vrhovi pa so tudi lepši in višji (Qian in sod., 2008).



Slika 2: Primerjava masnih spektrov *C. albicans* v primeru a) brez etanola in v primeru b) z dodatkom etanola (Qian in sod., 2008:442)

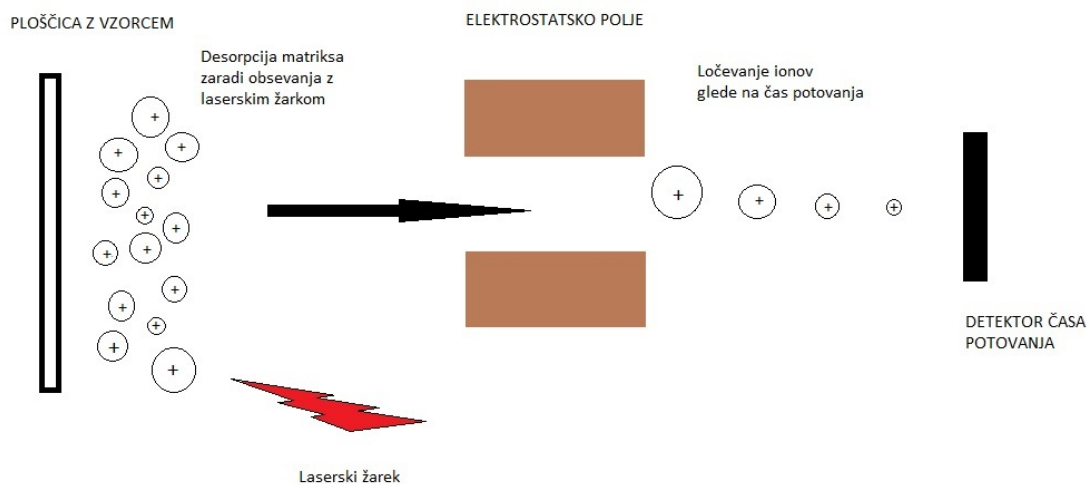
Na x osi je razmerje mase in naboja posameznega iona, na y osi je intenziteta izmerjenega signala za posamezen ion. V primeru a) so bile celice *C. albicans* pred ekstrakcijo beljakovin le v vodi, v primeru b) pa v vodni raztopini z dodatkom 50 % alkohola. Razlika v masnih spektrih je ta, da je sta v primeru a) prisotna le dva vrhova značilna za vrsto *C. albicans*, v primeru b) pa je vrhov več. Ostali vrhovi so v primeru b) lepše ločeni in višji, kar kaže na to, da alkoholna fiksacija izboljša kvaliteto masnih spektrov pridobljenih z MALDI-TOF MS (Qian in sod., 2008).

Preglednica 3: Prednosti in slabosti masne spektrometrije kot metode za identifikacijo gliv kvasovk (Bader, 2013)

<u>Prednosti:</u>	<ul style="list-style-type: none"> - avtomatizirana metoda - hitra metoda, možnost sočasne identifikacije več vzorcev (od 24 do 96 različnih) - cenovno ugodna (stroški veliki le ob prvotni vzpostavitvi in vpeljavi metode) - potrebno le malo vzorca, 10^6-10^7 celic - jasni rezultati (ni subjektivnosti) - možnost širjenja zbirke masnih spektrov standardnih izolatov - okolju prijazna, malo potrošnega materiala (ploščice za večkratno ponovno uporabo)
<u>Slabosti:</u>	<ul style="list-style-type: none"> - za analizo običajno potrebujemo kolonije zrastle na trdnem gojišču, kar tudi zahteva nekaj časa - identifikacija omejena z referenčnimi spektri v zbirki, slabša možnost identifikacije redkih vrst katerih ni v zbirki spektrov standardnih izolatov - starost kulture lahko vpliva na identifikacijo - nedelovanje sistema v primeru okvare le enega dela naprave - nezmožnost razlikovanja med nekaterimi sorodnimi organizmi - lahko je potrebna ponovna analiza ali analiza v sočasnih ponovitvah

2.6 PRINCIP TER DELOVANJE MALDI-TOF MASNE SPEKTROMETRIJE

Masna spektrometrija je semikvantitativna analitska metoda s katero lahko določamo molekulsko/masno sestavo neznanega vzorca. Analiza preiskovanega vzorca poteka s posebno napravo, ki se imenuje masni spektrometer. Pri analizi vzorca določamo maso in naboj posamezne ionizirane molekule vzorca (Theel, 2013).



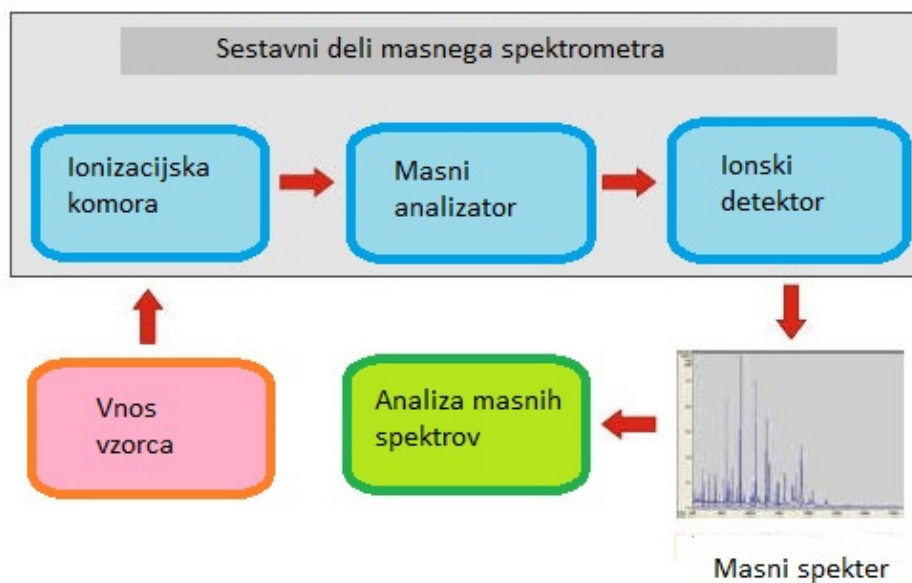
Slika 3: Shematski prikaz MALDI-TOF masnega spektrometra (Theel, 2013; Bader, 2013)

Na levi strani slike je jeklena ploščica na katero nanese vzorec ter matriks. Laser ionizira in uplini molekule vzorca, zato ioni potujejo skozi električno polje po cevi, kjer se ločijo glede na čas potovanja oziroma velikost iona. Večji potujejo počasneje, kot manjši. Ioni po določenem času pridejo do detektorja, ki glede na čas potovanja določi njihovo maso.



Slika 4: Zunanji izgled MALDI-TOF masnega spektrometra (foto: Cirman S.)

Aparat je povezan z računalnikom ter računalniškim programom Flex Analysis, Biotyper RTC (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Nemčija). Ta program nam po masni spektrometriji izriše masni spekter preiskovanega vzorca ter ga primerja z masnimi spektri v svoji knjižnici masnih spektrov.



Slika 5: Sestavni deli MALDI-TOF masnega spektrometra (Theel, 2013: 156)

Masni spektrometer je sestavljen iz treh glavnih delov:

- ionizacijske komore
- masnega analizatorja
- ionskega detektorja (Theel, 2013).

Vzorec katerega molekulska sestava nas zanima je lahko v tekočem ali trdnem stanju (Bader, 2013). Prvi korak je vstavitve vzorca v ionizacijsko komoro, kjer ga izpostavimo energijskemu viru, laserju. Laser ionizira posamezne molekule vzorca ter spremeni vzorec iz tekočega ali trdnega stanja v plinasto stanje. Uplinjen vzorec nato potuje skozi masni analizator, v katerem se ioni ločijo glede na njihovo razmerje med maso (m) in nabojem (z). Hitrost potovanja ionov je namreč odvisna od njihovega m/z razmerja. Na koncu analizatorja je ionski detektor, ki določa maso in naboj vsake ionizirane molekule. Maso določa glede na silo trka s katero molekula trči na površino detektorja in čas potovanja. Ionski detektor nato pridobljene vrednosti mase in naboja pretvori v masne spektre. Masni spekter na y prikazuje gostoto oziroma številčnost posamezne ionizirane molekule, na x osi pa razmerje m/z . Iz tako pridobljenega masnega spektra glede na število in lego vrhov sklepamo o sestavi preiskovanega neznanega vzorca (Theel, 2013).

Poznamo več različic masnih spektrometrov, ki se razlikujejo glede načina ionizacije ter vrste masnega analizatorja (Theel, 2013). Izbira pravega načina masne spektrometrije je odvisna od lastnosti vzorca, molske mase, toplotne stabilnosti in prisotnosti stranskih verig na molekulah (Theel, 2013). Pred letom 1980 je bila masna spektrometrija omejena le na analizo majhnih, toplotno stabilnih molekul, ki so bile sposobne prenesti močno in robustno ionizacijo, kakršna je bila takrat na voljo. Veliki polipeptidi ter ostale biomolekule so pod takimi pogoji spremenile strukturo ter se razgradile. Prav za takšne potrebe se je razvila milejša oblika ionizacije, kakršno poznamo pri MALDI-TOF masni spektrometriji. MALDI-TOF MS zato omogoča ionizacijo velikih biomolekul ter spremembo vzorca v plinasto fazo brez spremembe strukture samih biomolekul. Ta oblika masne spektrometrije je zato prva izbira pri identifikaciji velikih polipeptidov ter celotnih mikroorganizmov (Theel, 2013; Marklein in sod., 2009).

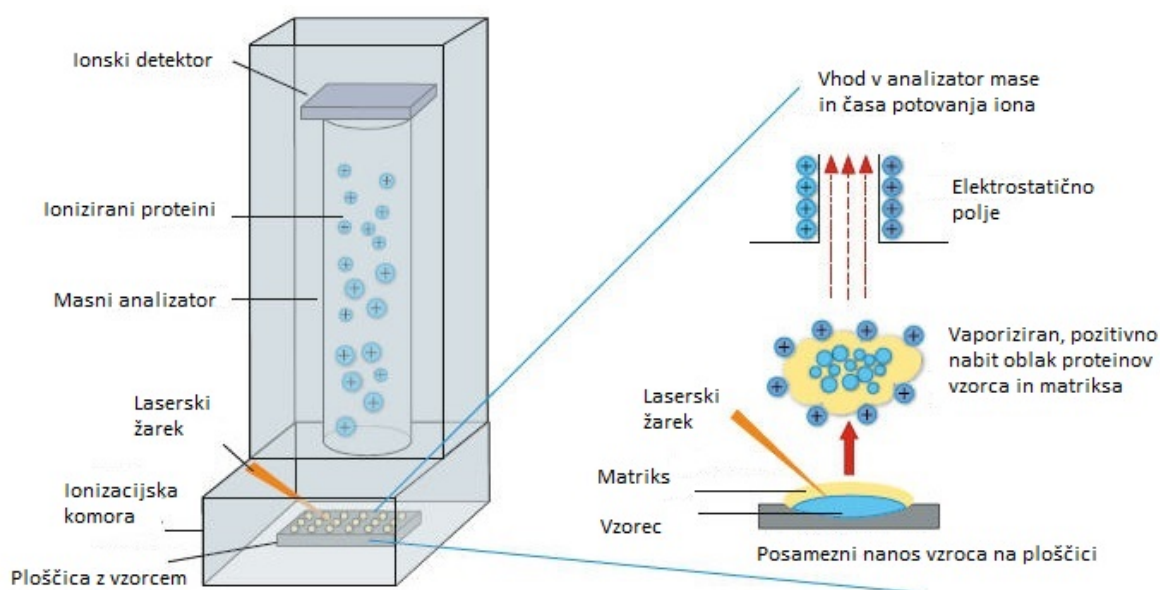
2.6.1 Postopek

Postopek pričnemo s pravilnim nanašanjem vzorca na jekleno MALDI ploščico. Nanešeni material so lahko očiščene beljakovine, ki jih pridobimo z ekstrakcijo ali celotni mikroorganizmi. To je odvisno od naše izbire predobdelave vzorca. Nanos nato dobro posušimo ter prekrijemo z matriksom, ki vsebuje α -ciano-4-hidroksicinamsko kislino (angl. α -ciano-4hydroxycinnamic acid; HCCA) (Bader, 2013; Cassagne in sod., 2013), 50 % acetonitril in 2,5 % trifluoroocetno kislino (angl. trifluoroacetic acid (TFA) (Cassagne in sod., 2013). Pred samo analizo ploščico z nanosom popolnoma posušimo na zraku. Matriks je potreben za omenjeno milejšo obliko ionizacije, ki ne poškoduje velikih polipeptidov (angl. "soft ionization"). Naloga matriksa je absorbcija večine pulzirajoče ionizacijske energije kateri izpostavimo vzorec. Tako obvaruje molekule vzorca pred fragmentacijo. Matriks je sestavljen iz majhnih (velikosti manj kot 1000 Daltonov) ter kislih molekul, raztopljenih v organskem topilu (Theel, 2013). Matriks je ionizacijsko sredstvo, ki omogoča energijski prenos med laserjem in vzorcem (Bader, 2013).

Z vzorcem ter matriksom pripravljeno ploščico nato vstavimo v ionizacijsko komoro, vzpostavimo vakuum ter obsevamo z 240 laserskimi pulzi valovne dolžine 337 nm. Matriks absorbira večino izsevane energije ter postane enkrat pozitivno nabit (1+). Med ionizacijo se celoten vzorec uplini. Pozitivni naboj (1+) se nato iz molekul matriksa z

naključnimi trki, ki so značilni za snov v plinastem stanju, prenese tudi na beljakovine vzorca. Ionizirane beljakovine nato potujejo skozi pozitivno nabito elektrostatsko polje. Hitrost potovanja molekule je odvisna od razmerja med maso in nabojem delca, ker pa imajo vsi ioni enak naboj torej (1+), se ločujejo le glede na razlike v masi. Težje in večje molekule potujejo počasneje kot manjše in lažje molekule. Na koncu analizatorja ioni trčijo v detektor, ki določa njihov naboj, maso ter čas potovanja ter glede na te podatke izriše masni spekter celotnega vzorca (Theel, 2013).

Vsak vzorec ali mikroorganizem ima glede na vsebnost različnih beljakovin svoj lasten unikatni masni spekter, zato je metoda uporabna za identifikacijo mikroorganizmov. Beljakovine, ki jih z MALDI-TOF masno spektrometrijo določamo so velike od 2 do 20 kDa. Večinoma so to znotrajcelične, hidrofilne, strukturne ali ribosomalne beljakovine. Pridobljene masne spektre beljakovin računalnik primerja s spektri znanih ter okarakteriziranih izolatov v računalniški zbirki (Theel, 2013).



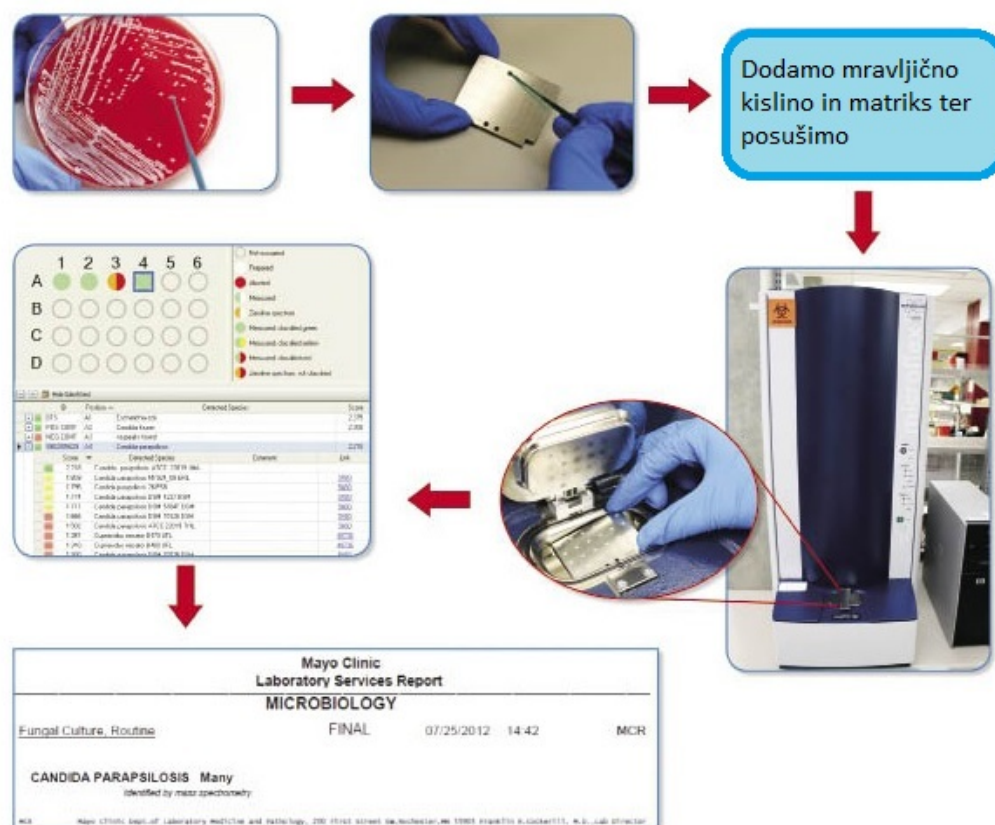
Slika 6: Shematski prikaz postopka in delovanja MALDI-TOF masnega spektrometra (Theel, 2013: 156)

Trije osnovni deli so ionizacijska komora, masni analizator in ionski detektor. Vzorec, ki ga prekriva matriks obsevamo z laserskim žarkom. Tako dobimo uplinjen pozitivno nabito oblak beljakovin vzorca in matriksa. Ionizirane beljakovine nato potujejo po masnem analizatorju skozi pozitivno nabito elektrostatsko polje do ionskega detektorja, ki analizira njihovo maso, naboj ter čas potovanja.

2.6.2 Vzorci oziroma material primeren za analizo z MALDI-TOF masno spektrometrijo

Kot material za analizo z masnim spektrometrom se lahko uporabljajo kolonije čiste kulture zrasle na trdnih gojiščih, vsebina pozitivnih hemokultur ali celo klinični material kot je npr. urin (Bader, 2013; Theel, 2013). Agar na katerem izoliramo kolonije je Sabouraud, Columbia krvni agar ali Chromagar (Bader, 2013).

Takoj ko opazimo rast na gojišču lahko kolonijo identificiramo z MALDI-TOF masno spektrometrijo. Za analizo zadostuje že ena kolonija, ki pa jo lahko pred samo analizo z MALDI-TOF obdelamo na več različnih načinov (Theel, 2013). Na voljo imamo več različic ekstrakcije beljakovin iz celic ter neposreden razmaz kolonij na MALDI ploščico. Za sprostitvev znotrajceličnih beljakovin se pri obeh načinih uporablja mravljična kislina. Sledi nanos matriksa ter sušenje. Hkrati lahko analiziramo do 24 različnih vzorcev (Theel, 2013).



Slika 7: Celoten postopek identifikacije mikroorganizma od kolonije do masne spektrometrije (Theel, 2013: 158)

Nekaj kolonij iz ustreznega gojišča prenesemo na kovinsko ploščico (postopek brez ekstrakcije beljakovin) nato dodamo mravljično kislino ter posušimo. Za tem dodamo še matriks ter ponovno posušimo. Popolnoma suho ploščico vnesemo v masni spektrometer zapremo pokrov ter vzpostavimo vakuum. Po končanem postopku masne spektrometrije nam računalnik izpiše podatke o identificirani vrsti. Zelena barva pomeni zanesljivo identifikacijo do nivoja vrste, rumena zanesljivo identifikacijo do nivoja rodu, rdeča barva pa pomeni da ni zanesljive identifikacije.

2.6.3 Interpretacija rezultatov

Interpretacija rezultatov temelji na programu Biotyper RTC (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Nemčija), ki vsebuje knjižnico bakterijskih in glivnih izolatov ter njihovih masnih spektrov. Identifikacija teh izolatov je bila preverjena s sekvenciranjem 16S rRNA gena *gyrB*, *rpoB* pri bakterijah, pri glivah D2 regije 28S rRNA (Theel, 2013). Računalnik glede na primerjavo spektrov standardnih izolatov s preiskovanimi, določi stopnjo podobnosti med njimi. Program Biotyper RTC glede na primerjavo spektrov priredi številčno vrednost podobnosti med sevom, katerega identificiramo in sevi v zbirki. Dobljeno vrednost

imenujemo vrednost ujemanja masnih spektrov (angl. score value; ker program izračuna vrednost z uporabo logaritma sta v uporabi tudi izraza "log score" oz. "log (score) value"). Ta vrednost nam nato služi kot informacija o veljavnosti ter zanesljivosti identifikacije (Wieser in sod., 2012).

Proizvajalec je postavil določene meje na intervalu 0,0-3,0 za interpretacijo rezultatov. Vrednost ujemanja masnih spektrov "score value" 0,0 pomeni da ni podobnosti z nobenim od standardnih izolatov, vrednost ujemanja 3,0 "perfect match" pa pomeni popolno ujemanje med standardnim in preiskovanim izolatom (Theel, 2013).

Vrednost ujemanja nad 2,0 pomeni veljavno identifikacijo do nivoja vrste, vrednost ujemanja med 2,0 in 1,7 predstavlja zanesljivo identifikacijo do nivoja rodu. Vrednost ujemanja pod 1,7 pomeni, da preiskovanega mikroorganizma ne moremo zanesljivo identificirati (Wieser in sod., 2012). V kolikor v dveh zaporednih ponovitvah za isti sev dobimo vrednost ujemanja med 1,7 in 1,9, ter pri obeh ponovitvah ime iste vrste, nam to omogoča zanesljivo identifikacijo preiskovanega seva do nivoja vrste (Goyer in sod., 2012).

Priporočila so sledeča, za po Gramu negativne bakterije zadostuje direkten razmaz na ploščico za po Gramu pozitivne bakterije in glive pa je za uspešnejšo identifikacijo potrebna ekstrakcija, ker se pri po Gramu pozitivnih bakterijah in glivah tako v večji meri sprostijo znotrajcelične beljakovine (Wieser in sod., 2012).

Čas trajanja celotne metode identifikacije z MALDI-TOF MS vključno z ekstrakcijo beljakovin je za 24 vzorcev od 45 minut do 1 ure (Yan in sod., 2011).

2.6.4 Primerjava uspešnosti štirih različic predobdelave vzorca pred samo identifikacijo z masno spektrometrijo

Cassagne in sod. (2013) so primerjali uspešnosti identifikacije vzorcev pridobljenih s štirimi različnimi postopki pred-obdelave pred samo MALDI-TOF MS po 48 urah rasti gliv kvasovk na dveh različnih gojiščih. Načini pred-obdelave, ki so jih uporabili so bili štirje in sicer direkten nanos kolonije na jekleno ploščico, hitra metoda ekstrakcije z

metanojsko kislino s sočasnim nanosom kolonije in metanojske kisline na kovinsko ploščico ter dve metodi popolne ekstrakcije z metanojsko kislino in acetonitrilom. Uporabili so 103 klinične izolate različnih vrst kvasovk rodu *Candida*. Deleži pravilno identificiranih gliv kvasovk so bili pri vseh štirih metodah različni in sicer manjši kot 40 % pri prvih dveh metodah ter večji kot 77 % pri izvedeni polni ekstrakciji beljakovin. Iz teh rezultatov so sklepali, da prvi dve metodi nista primerni za diagnostične namene.

Zaključili so, da ima pravilna izbira metode predobdelave vzorca vpliv na uspešnost identifikacije z MALDI-TOF MS.

2.6.5 Identifikacija gliv kvasovk neposredno iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk

Glive rodu *Candida* so med glivami najpogostejši povzročitelj seps. Odgovorne so za 10-15 % okužb povezanih z bolnišnično oskrbo ter 5 % seps in septičnih šokov (Delaloye in Calandra, 2014).

Hemokulture imajo v medicinski mikrobiologiji pomembno vlogo, saj jih ponavadi odvzamejo najbolj kritično bolnim ljudem, pri katerih je prisotna sepsa ali celo septični šok. Prav zaradi tega sta še toliko bolj pomembna čim hitrejša identifikacija in pričetek zdravljenja (Bader, 2013).

Celoten proces identifikacije nikakor ne sme biti zamuden in dolgotrajen, ker gre pri hemokulturah ponavadi za bolnike s hudimi oblikami invazivnih ali sistemskih glivičnih okužb, pri katerih je še toliko bolj izrednega pomena hitra in zanesljiva identifikacija povzročitelja (Yan in sod., 2011). Le s hitro in učinkovito pravilno identifikacijo povzročitelja lahko pravi čas pričnemo z ustreznim zdravljenjem, lahko se izognemo izbiri neustreznih antimikotikov in s tem razvoju novih rezistenc, skrajšamo pa tudi čas zdravljenja posameznika ter posledično stroške celotne hospitalizacije. Smrtnost bolnikov s kandidemijo je v primerih pravočasnega pričetka zdravljenja bistveno nižja od tiste pri katerih pride do uvedbe zdravljenja z zakasnitvijo (Spanu in sod., 2012).

Za vrste rodu *Candida* je značilna vrstno specifična občutljivost za antimikotike, zato je zelo pomembna identifikacija do nivoja vrste in ne le do rodu (Yan in sod., 2011).

Klasičen postopek posredne identifikacije gliv kvasovk iz hemokultur ponavadi traja več dni, saj je najprej potrebna izolacija in kultivacija mikroorganizmov na ustreznih trdnih gojiščih, nato sledi identifikacija čistih kultur s klasičnimi metodami, bodisi biokemijskimi testi, mikroskopijo ali molekularnimi tehnikami. Pri kultivaciji medij pozitivne hemokulture običajno nacepimo na trdno gojišče ter ga inkubiramo 24 do 72 ur odvisno od hitrosti rasti naših kvasovk (Yan in sod., 2011). Razvoj MALDI-TOF MS v kombinaciji s Sepsityper kit sistemom za identifikacijo kvasovk neposredno iz hemokulturnih stekleničk brez vmesnega koraka kultivacije ima velik potencial pri skrajšanju procesa identifikacije povzročiteljev invazivnih ali sistemskih okužb (Yan in sod., 2011).

Identifikacija z masno spektrometrijo neposredno iz hemokulturne stekleničke ni enostavna, saj je v mediju prisotnih veliko snovi, ki lahko motijo potek masne spektrometrije. V pozitivnih hemokulturah je poleg različnih gliv ali bakterij prisotnih veliko kationov, hemoglobina, albumina ter krvnih celic bolnika, ki ob nepopolni odstranitvi le- teh lahko zelo motijo izris masnega spektra iskanega patogenega organizma. Ključni koraki pravilne identifikacije neposredno iz hemokulturne stekleničke morajo zato vsebovati ustrezna spiranja bodisi z destilirano vodo ter dodatke surfaktantov, kot sta SDS ali Tween 80, ki nam s svojim delovanjem olajšajo odstranitev odvečnih komponent (Yan in sod., 2011; Spanu in sod., 2012). Postopek neposredne identifikacije iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk je preverjen in optimiziran za bakterijske patogene, kjer daje zadovoljive rezultate, nekoliko drugače pa je z glivami, kjer bi bilo potrebnih še nekaj dodatnih modifikacij in optimizacij postopkov, da bi dosegli rezultate primerljive bakterijskim (Yan in sod., 2011).

Celoten postopek identifikacije direktno iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk traja približno 1 uro, zato vsaj glede hitrosti predstavlja primerno orodje za identifikacijo kvasovk (Stevenson in sod., 2010). Ostale metode, ki so na voljo npr. testi ki temeljijo na morfoloških značilnostih, kot so biokemijski testi so dolgotrajnejše, trajajo od 48 do 72 ur, saj zahtevajo kultivacijo ter dodatne inkubacije. Molekularne tehnike kot so PCR, fluorescentna *in situ* hibridizacija in pirosekvenciranje so hitrejše vendar cenovno neugodne in prezahtevne za vsakodnevno uporabo v rutinskih kliničnih laboratorijih. Metoda posredne identifikacije iz hemokulturnih stekleničk, ki se že dlje časa uporablja in

vključuje MALDI-TOF masno spektrometrijo poteka tako, da vsebino pozitivnih hemokulturnih stekleničk nacepimo na trdna gojišča, nato sledi kultivacija, ki običajno traja od 24 do 48 ur (odvisno od hitrosti rasti kvasovk), nato pa ji sledi identifikacija kolonije čiste kulture z MALDI-TOF MS (Yan in sod., 2011).

Danes je za identifikacijo povzročiteljev okužb neposredno iz hemokulturnih stekleničk na voljo komercialno dostopen kit Sepsityper (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Nemčija), ki se uporablja za obdelavo vsebine pozitivne hemokulture pred samo identifikacijo z masno spektrometrijo. Kit vsebuje vse reagente in pripomočke, ki jih potrebujemo za obdelavo medija. Vsebuje raztopino 1, pufer za lizo (ang. Lysis Buffer), ki lizira človeške krvne celice, ne poškoduje pa bakterijske in glivne celične stene. Med centrifugiranjem pri visokih obratih tako precipitirajo le nepoškodovane celice mikroorganizmov, ki so zaščitene z robustno celično steno, ostalo lahko po centrifugiranju enostavno odlijemo. Naslednja raztopina, ki je sestavni del kita je raztopina 2, pufer za spiranje (angl. Washing Buffer), ki očisti željeni vzorec mikrobnih celic, spere ostanke krvnih celic ter vzorec pripravi na identifikacijo z MALDI-TOF MS (Yan in sod., 2011).

Yan in sod. (2011) so v svojem delu poskušali postopek optimizirati za glivne celice, zato so pred samo obdelavo s kitom Sepsityper dodali še dva koraka spiranja z destilirano vodo in centrifugiranjem vzorca, z namenom čim boljše odstranitve rdečih in belih krvnih celic ter beljakovin iz medija hemokulture že pred samo lizo z raztopino 1.

Za uspešno identifikacijo glive je ključnega pomena da popolnoma odstranimo vse krvne celice, beljakovine seruma, hemoglobin in peptide iz levkocitov, ker bi drugače ti med masno spektrometrijo v masnih spektrih tvorili močne vrhove ter tako otežili zaznavanje vrhov značilnih za določeno vrsto kvasovke (Yan in sod., 2011). Yan in sod. (2011) so v svojem delu uporabili 42 pozitivnih hemokultur, ki so vsebovale kvasovke rodu *Candida* ter rezultate identifikacije posameznih vrst primerjali z rezultati pridobljenimi s klasično metodo. Z MALDI Biotyper sistemom v kombinaciji z modificiranim Sepsityper kitom jim je uspelo do nivoja vrste pravilno identificirati vseh 42 izolatov. Med njimi 28 izolatov vrste *C. albicans*, 8 izolatov vrste *C. parapsilosis*, 5 izolatov vrste *C. tropicalis* in en izolat *C. neoformans*.

Spanu in sod. (2012) pa so v svojem delu postopek še malo spremenili in namesto kita uporabili 0,1 % surfaktant Tween 80. Tween 80 povzroča lizo krvnih celic, ne pa tudi mikrobnih celic. Največji problem pri identifikaciji predstavljajo mešane hemokulture, kjer je v istem vzorcu prisotnih več različnih gliv ali bakterij hkrati, saj v takšnem primeru masni spektri običajno niso zadosti značilni za določitev posamezne vrste (Spanu in sod., 2012). Spanu in sod. (2012) so za direktno identifikacijo gliv iz pozitivnih hemokultur uporabili 346 inokuliranih hemokultur, v katere so inokulirali 102 različnih vrst rodu *Candida*.

Prednost obeh neposrednih metod (Yan in sod., 2011; Spanu in sod., 2012) je skrajšanje časa do identifikacije mikroorganizma, kajti kultivacija od 48 do 72 ur ni potrebna. Pomanjkljivost pa je ta, da je predhodno potrebna čim boljša odstranitev krvnih celic bodisi s spiranjem z destilirano vodo bodisi v kombinaciji s surfaktantom. Prisotne pa so tudi težave pri identifikaciji v primeru mešanih hemokultur.

Uspešnost metode direktne identifikacije iz pozitivnih hemokultur je rahlo vrstno specifična. Delež pravilno identificiranih gliv kvasovk iz rodu *Candida* je največji za *C. albicans*, za ostale je nekoliko nižji. Pri *C. albicans* je ta odstotek 95,9 %, za ostale glive rodu *Candida* pa znaša 86,5 % (Spanu in sod., 2012).

Poudariti je potrebno tudi, da je občutljivost metode močno odvisna od koncentracije inokuluma. Eksperimenti z načrtno nacepljenimi hemokulturami z bakterijama *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* so pokazali, da je koncentracija, ki je še primerna za pravilno identifikacijo mikroorganizma 10^7 - 10^8 CFU/ml. Če je bila ta koncentracija nižja, npr. 10^6 CFU/ml je bilo vrhove mikroorganizma v masnem spektru nemogoče ločiti od vrhov ozadja, pridobljenih z negativno kontrolo, saj niso bili dovolj visoki in izraziti (Yan in sod., 2011).

Pri glivah je optimalna koncentracija inokuluma za uspešno identifikacijo okoli $0,5 \cdot 10^6$ celic/ml (Qian in sod., 2008; Spanu in sod., 2012). Pri koncentracijah nižjih od 10^4 CFU/ml je identifikacija glive običajno neuspešna (Spanu in sod., 2012). Drugi vir kot

minimalno koncentracijo gliv kvasovk za uspešno identifikacijo navaja koncentracijo $5,9 \cdot 10^5$ CFU/ml (Yan in sod., 2011).

Metoda identifikacije gliv kvasovk neposredno iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk je v nekaterih primerih uspešna metoda za identifikacijo gliv kvasovk, vendar pa v primerjavi z metodo polne ekstrakcije običajno daje slabše rezultate torej nižje vrednosti ujemanja masnih spektrov "log score" (Spanu in sod., 2012).

Eden izmed opisanih primerov neuspešne identifikacije gliv kvasovk z metodo identifikacije neposredno iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk je primer Ferreira in sod. (2011). V njihovem primeru identifikacija ni bila uspešna pri sedemnajstih od osemnajstih testiranih predstavnic rodu *Candida*, v enem primeru pa jim je identifikacija uspela le do nivoja rodu. V svojem delu so uporabili skupno 318 pozitivnih hemokultur, med njimi 300 bakterijskih, 61 s po Gramu negativnimi bakterijami, 239 s po Gramu pozitivnimi bakterijami in 18 hemokultur z glivami. Med glivami je bilo 8 predstavnic *C. albicans*, 9 *C. parapsilosis* in 1 *C. tropicalis*. Identifikacija je bila uspešna pri večini po Gramu negativnih bakterij in sicer je znašala 96,6 %. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je bil delež uspešno identificiranih nižji, le 64,8 %. Od uporabljenih osemnajstih so uspeli pravilno identificirati le eno, kar še dodatno nakazuje na to, da je metoda identifikacije z masno spektrometrijo neposredno iz hemokulturnih stekleničk najuspešnejša za po Gramu negativne bakterije, sledijo po Gramu pozitivne bakterije, ne daje pa zadovoljivih rezultatov pri glivah (Ferreira in sod., 2011).

Schubert in sod. (2011) so v svojem delu uporabili 483 pozitivnih hemokultur, med njimi 98 s po Gramu negativnimi bakterijami, 358 s po Gramu pozitivnimi bakterijami in 17 z glivami. Pri njih je bil delež pravilno identificiranih po Gramu negativnih bakterij 89,8 %, delež pravilno identificiranih po Gramu pozitivnih bakterij 86,3 % in delež pravilno identificiranih gliv 70,6 %. Vendar navajajo, da so predhodno dobili drugačne rezultate, ki pa jih niso objavili, saj so bili rezultati dokaj slabi. Deleži pravilno identificiranih mikroorganizmov so bili nižji predvsem pri glivah in po Gramu pozitivnih bakterijah. Zato so namesto meje pri vrednosti ujemanja "log score" 1,7 kot jo priporoča proizvajalec MALDI-TOF MS, uporabili mejo pri "log score" 1,5. Tako so pri po Gramu negativnih

bakterijah namesto deleža pravilno identificiranih 85,7 %, dobili 89,8 %, pri po Gramu pozitivnih namesto 54,5 %, kar 86,3 % in pri glivah namesto 47 % kar 70,6 %. Torej bi dobljeni rezultati, z upoštevanjem meje pri "log score" 1,7, nakazovali na neuspešnost metode pri glivah, uspešnost metode pri po Gramu negativnih bakterijah ter malo slabšo uspešnost metode pri po Gramu pozitivnih bakterijah.

Preglednica 4: Prednosti in slabosti identifikacije z masno spektrometrijo neposredno iz pozitivnih hemokultur (Yan in sod., 2011; Spanu in sod., 2012)

<u>PREDNOSTI:</u>	<ul style="list-style-type: none">- identifikacija mikroba direktno iz pozitivne hemokulture je enostavna in hitra, vzame nam le 30-60 minut.- priprava vzorca ni zahtevna, ter potrebujemo le 1 ml vzorca pozitivne hemokulture- identifikacija je zanesljiva, v kolikor nam uspe priti do nje- reagenti in določen material so priloženi v kitu
<u>SLABOSTI:</u>	<ul style="list-style-type: none">- občutljivost metode je odvisna od koncentracije inokuluma- potrebna popolna odstranitev krvnih celic ter beljakovin gojišča- identifikacija je slabša ali ni uspešna pri mešanih hemokulturah

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIMERJAVA DVEH METOD EKSTRAKCIJE BELJAKOVIN IZ GLIVNIH CELIC - METODE POLNE EKSTRAKCIJE IN POLNE EKSTRAKCIJE S SEGREVANJEM

Uporabili smo 101 izolat gliv kvasovk večinoma pripadnic rodu *Candida*, pridobljenih ter shranjenih med letoma 2012 in 2013 v laboratoriju za diagnostiko glivičnih infekcij Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani. Med njimi je bilo 21 izolatov *C. albicans*, 26 izolatov *C. glabrata*, 5 izolatov *Saccharomyces cerevisiae*, 13 izolatov *Candida krusei*, 2 izolata *Candida tropicalis*, 3 izolati *Candida kefyr*, 6 izolatov *Candida lusitanae*, 9 izolatov *Candida parapsilosis*, 5 izolatov *Candida dubliniensis*, 2 izolata *Candida utilis*, 1 izolat *Candida pelliculosa*, 1 izolat *Candida valida*, 1 izolat *Cryptococcus neoformans*, 1 izolat *Exophiala dermatitidis*, 1 izolat *Candida orthopsilosis*, 2 izolata *Pichia cactophila*, 1 izolat *Geotrichum silvicola*, in 1 izolat *Candida metapsilosis*.

Na kromogenem trdnem gojišču (MAST ID CHROMagar CANDIDA, MAST DIAGNOSTICA, Merseyside, Velika Britanija) smo nacepljene kulture inkubirali čez noč, oziroma 24 ur.

Pred samo identifikacijo z MALDI-TOF MS (BRUKER DALTONICS GmbH, Bremen, Nemčija) smo primerjali dva načina ekstrakcije proteinov iz glivnih celic. Prva metoda je bila metoda polne ekstrakcije, druga pa je bila njena modificirana oblika z dodanim vmesnim korakom segrevanja glivnih celic 1 minuto pri 99 °C (naša lastna metoda).

3.1.1 Metoda polne ekstrakcije

Polno 1 µl zanko kulture smo raztopili v 300 µl sterilne destilirane vode (Služba za pripravo gojišč in reagentov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija), dodali 900 µl absolutnega etanola (Etanol brezvodni, KEFO, Ljubljana, Slovenija) ter nato centrifugirali pri 9000 rpm 2 minuti. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant ter sediment ponovno centrifugirali 2 minuti pri 9000 rpm. Supernatant smo odstranili z odlivanjem ter preostanek s pipeto. Sedimentu smo nato dodali 50 µl 70 % mravljične kisline (služba za pripravo gojišč in reagentov na

Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija) in vorteksirali približno 1 minuto. Dodali smo še 50 µl acetonitrila (Acetonitril, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Nemčija) ter centrifugirali pri maksimalnih obratih, 13400 rpm 2 minuti. 30 µl supernatanta smo prenesli v novo epico ter vsebino do uporabe shranili na -20 °C.

3.1.2 Metoda polne ekstrakcije s segrevanjem

Polno 1 µl zanko kulture smo raztopili v 300 µl sterilne destilirane vode, segrevali 1 minuto v vodni kopeli pri 99 °C, ohladili ter dodali 900 µl absolutnega etanola. Zatem smo centrifugirali pri 9000 rpm 2 minuti. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant ter sediment ponovno centrifugirali 2 minuti pri 9000 rpm. Supernatant smo odstranili z odlivanjem ter preostanek s pipeto. Sedimentu smo nato dodali 50 µl mravljične kisline in vorteksirali približno 1 minuto. Dodali smo še 50 µl acetonitrila ter centrifugirali pri maksimalnih obratih, 13400 rpm 2 minuti. 30 µl supernatanta smo prenesli v novo epico ter vsebino do uporabe shranili na -20 °C.

3.2 PRIMERJAVA DVEH METOD EKSTRAKCIJE BELJAKOVIN IZ GLIVNIH CELIC - METODE POLNE EKSTRAKCIJE IN HITRE EKSTRAKCIJE

Uporabili smo 98 izolatov gliv kvasovk večinoma pripadnic rodu *Candida*, pridobljenih ter shranjenih med letoma 2012 in 2013. Med njimi je bilo 15 izolatov *C. albicans*, 27 izolatov *C. glabrata*, 3 izolatov *Saccharomyces cerevisiae*, 12 izolatov *Candida krusei*, 6 izolatov *Candida tropicalis*, 3 izolati *Candida kefyr*, 5 izolatov *Candida lusitaniae*, 9 izolatov *Candida parapsilosis*, 5 izolatov *Candida dubliniensis*, 2 izolata *Candida utilis*, 2 izolata *Candida guilliermondii*, 3 izolati *Magnusomyces capitatus*, 1 izolat *Exophiala dermatitidis*, 1 izolat *Candida palmiophila*, 2 izolata *Pichia cactophila*, 1 izolat *Geotrichum silvicola*, 1 izolat *Rhodotorula mucilaginosa*, 1 izolat *Pichia kluyveri*, 1 izolat *Candida sphaerica*, 1 izolat *Candida metapsilosis*, 1 izolat *Candida dubliniensis*, in 1 izolat *Candida orthopsilosis*.

Na kromogenem trdnem gojišču smo nacepljene kulture inkubirali čez noč oziroma do 24 ur.

Pred samo identifikacijo z MALDI-TOF MS smo primerjali dva načina ekstrakcije beljakovin iz glivnih celic. Metoda polne ekstrakcije je bila prva metoda, druga je bila njena modificirana oblika tega protokola, naša lastna hitra metoda.

3.2.1 Metoda polne ekstrakcije

Polno 1 μ l zanko kulture smo raztopili v 300 μ l sterilne destilirane vode, dodali 900 μ l absolutnega etanola ter nato centrifugirali pri 9000 rpm 2 minuti. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant ter sediment ponovno centrifugirali 2 minuti pri 9000 rpm. Supernatant smo odstranili z odlivanjem ter preostanek s pipeto. Sedimentu smo nato dodali 50 μ l mravljične kisline in vorteksirali približno 1 minuto. Dodali smo še 50 μ l acetonitrila ter centrifugirali pri maksimalnih obratih, 13400 rpm 2 minuti. 30 μ l supernatanta smo prenesli v novo epico ter vsebino do uporabe shranili na -20 °C.

3.2.2 Hitra metoda

Polno 1 μ l zanko kulture smo raztopili v 100 μ l mravljične kisline. Vorteksirali smo približno 1 minuto, nato smo inkubirali pri sobni temperaturi 15 minut. Zatem smo vzorec ponovno 1 minuto vorteksirali ter 30 μ l supernatanta do uporabe shranili na -20 °C.

3.3 PRIEMRJAVA DVEH METOD IDENTIFIKACIJE GLIV KVASOVK NEPOSREDNO IZ POZITIVNIH HEMOKULTURNIH STEKLENIČEK - METODE S KITOM SEPSITYPER IN MODIFICIRANE METODE S SPIRANJEM

Uporabili smo 96 izolatov gliv kvasovk večinoma pripadnic rodu *Candida*, pridobljenih ter shranjenih med letoma 2012 in 2013. Med njimi je bilo 31 izolatov *C. albicans*, 29 izolatov *C. glabrata*, 11 izolatov *Candida parapsilosis*, 11 izolatov *Candida krusei*, 10 izolatov *Candida tropicalis*, 2 izolata *Candida dubliniensis*, 1 izolat *Candida lusitaniae* in 1 izolat *Rhodotorula mucilaginosa*. Z vbrizgavanjem izbranih izolatov smo pridobili pozitivne aerobne hemokulturne stekleničke (BacT/Alert FA Plus BioMérieux, Durham, Velika Britanija), tako, da smo jih napolnili s 5 ml ovčje krvi ter jih inokulirali z raztopino celic s koncentracijo $0,5 \cdot 10^6$ CFU/ml. Inokulirane hemokulturne stekleničke smo nato vstavili v aparat za hemokulture (BacT/Alert 3D BioMérieux, Durham, Velika Britanija) dokler nam

aparatus ni javil pozitivnosti hemokulturnih stekleničk. Inkubacija je običajno potekala čez noč od 6 do 24 ur oziroma do pozitivnosti posamezne hemokulture.

3.3.1 Metoda s kitom Sepsityper

Pri tej metodi smo uporabili kit Sepsityper proizvajalca BRUKER DALTONICS GmbH, Bremen, Nemčija. V mikrocentrifugirko smo prenesli 1 ml pozitivne hemokulture iz stekleničke (BacT/Alert FA Plus BioMeri  ux, Durham, Velika Britanija), dodali 200 µl pufra 1, pufer za lizo (angl. Lysis Buffer) ter vorteksirali približno 10 sekund. Nato smo vzorec 1 minuto centrifugirali pri 13000 rpm ter po končanem centrifugiranju s pipeto odstranili supernatant. Pelet smo resuspendirali v 1 ml pufra 2, pufera za spiranje (angl. Washing Buffer). Mešanico smo 1 minuto centrifugirali pri 13000 rpm in s pipeto odstranili supernatant. Sedimentu smo dodali 300 µl deionizirane vode, resuspendirali ter dodali 900 µl etanola. Zatem smo postopek nadaljevali po standardnem postopku polne ekstrakcije proteinov iz glivnih celic in sicer smo mešanico 2 minuti centrifugirali pri 9000 rpm. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant ter sediment ponovno centrifugirali 2 minuti pri 9000 rpm. Supernatant smo odstranili z odlivanjem ter preostanek s pipeto. Sedimentu smo nato dodali 50 µl mravljične kisline in vorteksirali približno 1 minuto. Dodali smo še 50 µl acetonitrila ter centrifugirali pri maksimalnih obratih, 13400 rpm 2 minuti. 30 µl supernatanta smo prenesli v novo epico ter vsebino do uporabe shranili na - 20   C.

3.3.2 Metoda s spiranjem

Metodo smo povzeli in priredili po člankih Yan in sod., 2011 in Spanu in sod., 2011. V mikrocentrifugirko smo prenesli 1 ml pozitivne hemokulture ter 2 minuti centrifugirali pri 10900 rpm. S pipeto smo odstranili supernatant in pelet suspendirali v 1 ml surfaktanta Tween 80 (Služba za pripravo gojišč in reagentov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija). Ponovno smo 2 minuti centrifugirali pri 10900 rpm in s pipeto odstranili supernatant. K sedimentu smo dodali 1 ml destilirane vode, resuspendirali ter vorteksirali. Nato smo 2 minuti centrifugirali pri 10900 rpm ter s pipeto odstranili supernatant. K sedimentu smo dodali 1 ml destilirane vode, resuspendirali ter vorteksirali. Sledilo je ponovno centrifugiranje 2 minuti pri 10900 rpm in odstranjevanje supernatanta s pipeto. K sedimentu smo dodali 1 ml destilirane vode,

resuspendirali ter vorteksirali. Zatem smo dodali 200 μ l pufra 1, pufra za lizo (angl. Lysis Buffer), vorteksirali približno 2 minuti in prav tako 2 minuti centrifugirali pri 10900 rpm. S pipeto smo nato odstranili supernatant in pelet resuspendirali v 1 ml pufra 2, pufra za spiranje (angl. Washing Buffer). Ponovno smo 2 minuti centrifugirali pri 10900 rpm ter s pipeto odstranili supernatant. Dodali smo 300 μ l destilirane vode, resuspendirali ter dodali 900 μ l etanola. Zatem smo postopek nadaljevali po standardnem postopku polne ekstrakcije proteinov iz glivnih celic in sicer smo mešanico 2 minuti centrifugirali pri 9000 rpm. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant ter sediment ponovno centrifugirali 2 minuti pri 9000 rpm. Supernatant smo odstranili z odlivanjem ter preostanek s pipeto. Sedimentu smo nato dodali 50 μ l mravljične kisline in vorteksirali približno 1 minuto. Dodali smo še 50 μ l acetonitrila ter centrifugirali pri maksimalnih obratih, 13400 rpm 2 minuti. 30 μ l supernatanta smo prenesli v novo epico ter vsebino do uporabe shranili na -20 °C.

3.4 ANALIZA VZORCEV Z MASNIM SPEKTROMETROM

Po končani ekstrakciji beljakovin iz glivnih celic je sledila masna spektrometrija z MALDI-TOF masnim spektrometrom BRUKER DALTONICS GmbH, Bremen, Nemčija. 1 μ l ekstrakta proteinov smo s pipeto nanесли na jekleno ploščico. Ploščico z nanešenimi ekstrahiranimi proteini glivnih celic smo nato posušili na zraku, nato vsak vzorec prekrili z 1 μ l matriksa. Kot matriks smo uporabili raztopino sestavljeno iz α -ciano-4-hidroksicinamske kisline (angl. α -ciano-4hydroxycinnamic acid; HCCA), 50 % acetonitrila (angl. acetonitrile) in 2,5 % trifluoroocetne kisline (angl. trifluoroacetic acid (TFA) (Služba za pripravo gojišč in reagentov na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani). Nanešen matriks smo ponovno posušili na zraku in ploščico vstavili v odprtino MALDI-TOF masnega spektrometra. S pokrovom in pritiskom na gumb smo vzpostavili vakuum ter s pomočjo računalniškega programa zagnali pričetek masne spektrometrije. Računalnik nam je nato izrisal dobljene masne spektre ter podatke o uspešni ali neuspešni identifikaciji glive kvasovke.

3.5 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Dobljene rezultate smo statistično preverili z izračunom Hi-kvadrat statistike.

Vrednost hi-kvadrat smo izračunali iz enačbe

$$(h_i)^2 = \sum ((f_u - f_p)^2 / f_p) \quad \dots\dots\dots(1)$$

kjer je f_u ugotovljena frekvenca in f_p pričakovana frekvenca.

Če je izračunana vrednost hi-kvadrat večja od tabelarične vrednosti 3,841 (odčitano iz tabele za porazdelitev hi-kvadrat pri SP=1; $\alpha=0,05$) sledi da je $p < \alpha$. V tem primeru lahko s 95 % zanesljivostjo trdimo, da sta metodi statistično različni. In obratno, v kolikor je izračunana vrednost hi-kvadrat manjša od tabelarične vrednosti 3,841 (odčitane iz tabele za porazdelitev hi-kvadrat pri SP=1; $\alpha=0,05$) sledi da je $p > \alpha$. V tem primeru lahko s 95 % zanesljivostjo trdimo, da med metodama ni statistično značilnih razlik.

4 REZULTATI

4.1 PRIMERJAVA DVEH METOD EKSTRAKCIJE BELJAKOVIN IZ GLIVNIH CELIC-METODE POLNE EKSTRAKCIJE IN POLNE EKSTRAKCIJE S SEGREVANJEM

Med skupno uporabljenimi 101 kvasovkami smo z obema metodama, metodo polne ekstrakcije in metodo polne ekstrakcije s segrevanjem pridobili rezultate, ki se na prvi pogled ne razlikujejo dosti, a vendar obstajajo manjše razlike v številu pravilno identificiranih kvasovk z eno in drugo metodo (Preglednica 5). Kot kaže je bila malce uspešnejša metoda polne ekstrakcije s katero smo pravilno identificirali kar 99,01 % gliv. Z metodo polne ekstrakcije s segrevanjem pa 89,11 %.

Preglednica 5: Primerjava števila pravilno identificiranih gliv kvasovk z metodo polne ekstrakcije in metodo polne ekstrakcije s segrevanjem ter pripadajoči deleži ter izračunana vrednost hi-kvadrat, kot orodje za statistično obdelavo podatkov

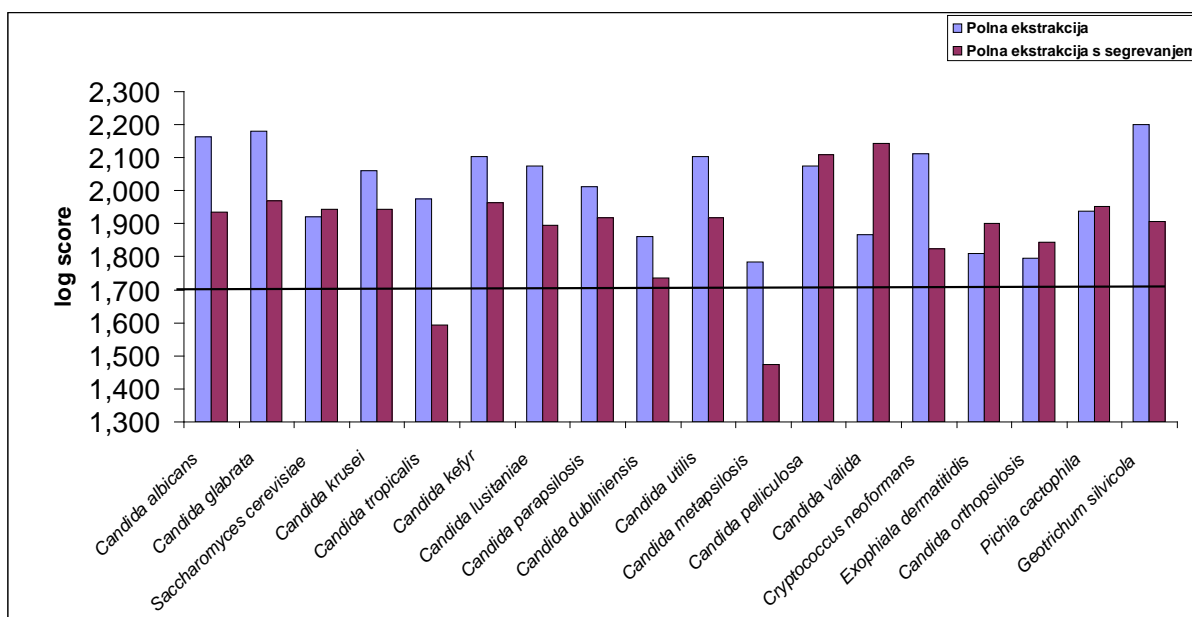
Gliva kvasovka	Število uporabljenih izolatov	Število pravilno identificiranih z metodo polne ekstrakcije	Število pravilno identificiranih z metodo polne ekstrakcije s segrevanjem
<i>Candida albicans</i>	21	20	18
<i>Candida glabrata</i>	26	26	25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5	5	5
<i>Candida krusei</i>	13	13	12
<i>Candida tropicalis</i>	2	2	1
<i>Candida kefyr</i>	3	3	2
<i>Candida lusitanae</i>	6	6	5
<i>Candida parapsilosis</i>	9	9	8
<i>Candida dubliniensis</i>	5	5	4
<i>Candida utilis</i>	2	2	2
<i>Candida metapsilosis</i>	1	1	0
<i>Candida pelliculosa</i>	1	1	1
<i>Candida valida</i>	1	1	1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	1	1
<i>Exophiala dermatitidis</i>	1	1	1
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	1	1
<i>Pichia cactophila</i>	2	2	2
<i>Geotrichum silvicola</i>	1	1	1
Skupaj	101	100	90
Delež	100	99,01	89,11
hi-kvadrat	Izračunana vrednost hi-kvadrat je 7,18; kar je večje od tabelarične vrednosti 3,841 (SP=1; $\alpha=0,05$); $p<\alpha$. Torej lahko s 95 % zanesljivostjo trdimo, da sta metodi statistično različni		

S statistično obdelavo smo pokazali statistično različnost obeh metod, kar dodatno nakazuje na morebitno večjo uspešnost ene metode, v tem primeru metode polne ekstrakcije.

Nadalje nam primerjava vrednosti ujemanja masnih spektrov naših izolatov z masnimi spektri izolatov v referenčnih zbirkah ter grafični prikaz le-teh jasno kažeta na večinoma nekoliko nižje vrednosti ujemanja pri metodi s segrevanjem. Vendar pa iz grafičnega prikaza (Slika 8) vidimo, da te vrednosti pri obeh metodah skoraj v vseh primerih presegajo mejo, določeno za uspešno identifikacijo. To mejo smo tudi grafično nakazali, poteka pa pri "log score" 1,7. Meje uspešne identifikacije z metodo s segrevanjem ne dosežemo le v dveh primerih.

Preglednica 6: Primerjava povprečnega "log score" pri metodi polne ekstrakcije in metodi polne ekstrakcije s segrevanjem

Gliva kvasovka	Povprečni log score pri metodi polne ekstrakcije	Povprečni log score pri metodi polne ekstrakcije s segrevanjem
<i>Candida albicans</i>	2,163	1,935
<i>Candida glabrata</i>	2,181	1,969
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,921	1,944
<i>Candida krusei</i>	2,061	1,943
<i>Candida tropicalis</i>	1,975	1,594
<i>Candida kefyr</i>	2,103	1,963
<i>Candida lusitaniae</i>	2,074	1,895
<i>Candida parapsilosis</i>	2,013	1,919
<i>Candida dubliniensis</i>	1,862	1,737
<i>Candida utilis</i>	2,103	1,918
<i>Candida metapsilosis</i>	1,783	1,473
<i>Candida pelliculosa</i>	2,075	2,108
<i>Candida valida</i>	1,868	2,142
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,113	1,825
<i>Exophiala dermatitidis</i>	1,809	1,900
<i>Candida orthopsilosis</i>	1,797	1,844
<i>Pichia cactophila</i>	1,939	1,952
<i>Geotrichum silvicola</i>	2,201	1,907



Slika 8: Grafični prikaz primerjave povprečnega "log score" pri metodi polne ekstrakcije in polne ekstrakcije s segrevanjem

Črta pri "log score" 1,700 označuje mejo, kjer še lahko zanesljivo identificiramo glivo kvasovko.

4.2 PRIMERJAVA DVEH METOD EKSTRAKCIJE BELJAKOVIN IZ GLIVNIH CELIC - METODE POLNE EKSTRAKCIJE IN HITRE METODE

Med metodama polne ekstrakcije in hitre metode pri skupno 98 uporabljenimi glivami kvasovkami smo zaznali še nekaj več razlik v številu pravilno identificiranih kvasovk, kot pri predhodni primerjavi polne ekstrakcije in polne ekstrakcije s segrevanjem. Nekoliko slabše rezultate smo pridobili s hitro metodo. V preglednici št. 8 vidimo očitno razliko med pridobljenimi povprečnimi vrednostmi ujemanja masnih spektrov naših izolatov z masnimi spektri izolatov v referenčnih zbirkah. Pri hitri metodi se večji del vrednosti "log score" giblje okoli 1,7 oziroma rahlo nad to mejo. Podobno je v grafičnem prikazu (Slika 9), ki prikazuje primerjavo povprečnih "log score". Tu je razvidno, da pri hitri metodi meje za uspešno identifikacijo (1,7) celo ne dosežemo pri skupno osmih vrstah kvasovk.

Preglednica 7: Primerjava pravilno identificiranih gliv kvasovk z metodo polne ekstrakcije in hitro metodo ter pripadajoči deleži, ter izračunana vrednost hi-kvadrat, kot orodje za statistično obdelavo podatkov

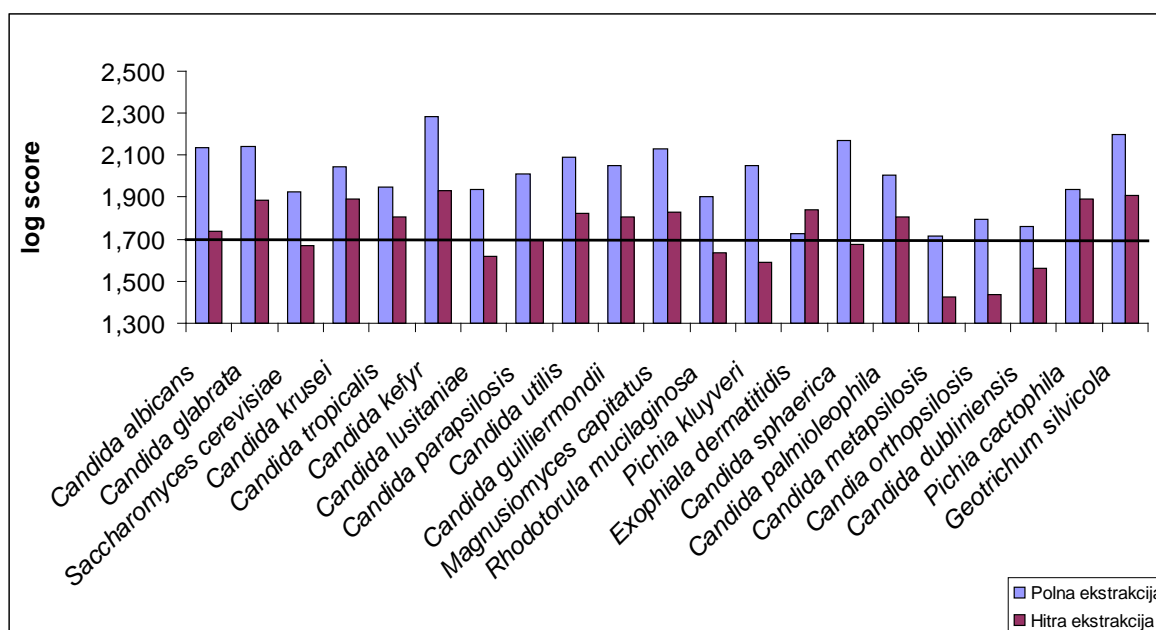
Gliva kvasovka	Število uporabljenih izolatov	Število pravilno identificiranih z metodo polne ekstrakcije	Število pravilno identificiranih s hitro metodo
<i>Candida albicans</i>	15	15	11
<i>Candida glabrata</i>	27	27	26
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	3	2
<i>Candida krusei</i>	12	12	12
<i>Candida tropicalis</i>	6	6	6
<i>Candida kefyr</i>	3	3	3
<i>Candida lusitanae</i>	5	5	2
<i>Candida parapsilosis</i>	9	9	5
<i>Candida utilis</i>	2	2	2
<i>Candida guilliermondii</i>	2	2	2
<i>Magnusiomyces capitatus</i>	3	3	3
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	1	0
<i>Pichia kluyveri</i>	1	1	0
<i>Exophiala dermatitidis</i>	1	1	1
<i>Candida sphaerica</i>	1	1	0
<i>Candida palmiophila</i>	1	1	1
<i>Candida metapsilosis</i>	1	1	0
<i>Candida dubliniensis</i>	1	1	0
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	1	0
<i>Pichia cactophila</i>	2	2	2
<i>Geotrichum silvicola</i>	1	1	1
Skupaj	98	98	79
Delež	100	100	80,61
hi-kvadrat	Izračunana vrednost hi-kvadrat je 18,88; kar je večje od tabelarične vrednosti 3,841 (SP=1; $\alpha=0,05$); $p<\alpha$ Torej lahko s 95 % zanesljivostjo trdimo, da sta metodi statistično različni		

Tudi na podlagi statistične obdelave lahko trdimo, da so rezultati pridobljeni z eno in drugo metodo različni. To lahko trdimo s 95 % zanesljivostjo oziroma 5 % tveganjem.

Preglednica 8: Primerjava povprečnega "log score" pri metodi polne ekstrakcije in hitri metodi

Gliva kvasovka	Povprečni log score pri metodi polne ekstrakcije	Povprečni log score pri metodi hitre ekstrakcije
<i>Candida albicans</i>	2,137	1,739
<i>Candida glabrata</i>	2,142	1,885
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,928	1,668
<i>Candida krusei</i>	2,044	1,891
<i>Candida tropicalis</i>	1,950	1,805
<i>Candida kefyr</i>	2,284	1,933
<i>Candida lusitaniae</i>	1,936	1,616
<i>Candida parapsilosis</i>	2,011	1,700
<i>Candida utilis</i>	2,088	1,822
<i>Candida guilliermondii</i>	2,052	1,808
<i>Magnusiomyces capitatus</i>	2,133	1,829
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,905	1,633
<i>Pichia kluyveri</i>	2,050	1,592
<i>Exophiala dermatitidis</i>	1,729	1,841
<i>Candida sphaerica</i>	2,170	1,674
<i>Candida palmiophila</i>	2,007	1,807
<i>Candida metapsilosis</i>	1,718	1,423
<i>Candia orthopsilosis</i>	1,797	1,438
<i>Candida dubliniensis</i>	1,763	1,563
<i>Pichia cactophila</i>	1,939	1,889
<i>Geotrichum silvicola</i>	2,201	1,906

Povprečni "log score" je pri rezultatih pridobljenih s hitro metodo nižji od 1,7 pri *S. cerevisiae*, *C. lusitaniae*, *R. mucilaginosa*, *P. kluyveri*, *C. sphaerica*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. dubliniensis*. Pri metodi polne ekstrakcije je višji od 1,7 pri vseh testiranih kvasovkah.



Slika 9: Grafični prikaz primerjave povprečnega "log score" pri metodi polne ekstrakcije in hitre ekstrakcije

Črta pri "log score" 1,700 označuje mejo, kjer še lahko zanesljivo identificiramo glivo kvasovko.

4.3 PRIMERJAVA DVEH METOD IDENTIFIKACIJE GLIV KVASOVK NEPOSREDNO IZ POZITIVNIH HEMOKULTURNIH STEKLENIČK-METODE S KITOM SEPSITYPER IN MODIFICIRANE METODE S SPIRANJEM

Nobena od obeh metod obdelave pozitivnih hemokulturnih stekleničk, ki smo jih uporabili, ne zagotavlja visokega deleža pravilno identificiranih kvaskovk. Pri metodi s kitom je ta delež 53,13 %, pri modificirani metodi s spiranjem pa 30,21 %. Pri metodi s kitom, ki zagotavlja nekoliko višje deleže pravilne identifikacije smo navedli še deleže znotraj posameznih vrst.

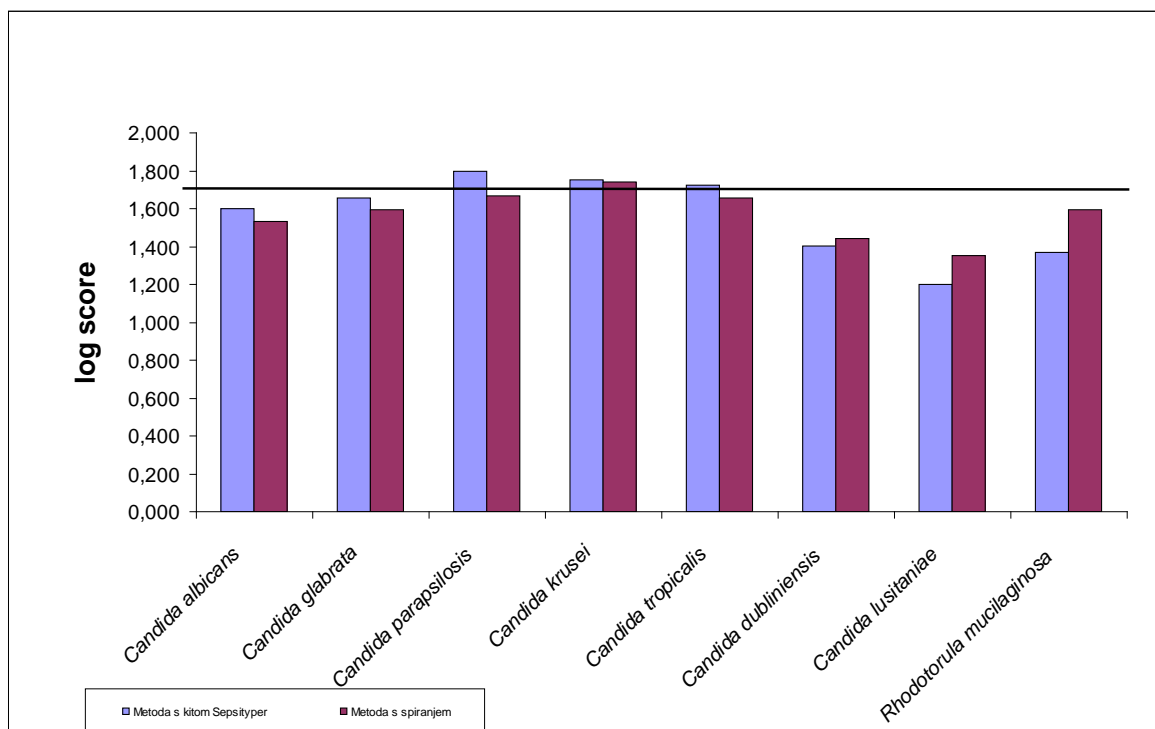
Preglednica 9: Primerjava pravilno identificiranih gliv kvasovk s kitom Sepsityper in z modificirano metodo s spiranjem. Pri metodi s spiranjem je vključeno večkratno spiranje ter dodatek surfaktanta.

Gliva kvasovka	Število uporabljenih izolatov	Število pravilno identificiranih metoda s kitom Sepsityper	Število pravilno identificiranih metoda s spiranjem
<i>Candida albicans</i>	31	15 (48 %)	7
<i>Candida glabrata</i>	29	12 (41 %)	7
<i>Candida parapsilosis</i>	11	10 (90 %)	5
<i>Candida krusei</i>	11	7 (63 %)	6
<i>Candida tropicalis</i>	10	7 (70 %)	4
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0	0
<i>Candida lusitaniae</i>	1	0	0
<i>Candida dubliniensis</i>	2	0	0
Skupaj	96	51	29
Delež (%)	100	53,13	30,21

Povprečni "log score" pri nobeni vrsti ne znaša več kot 1,8. V nekaterih primerih sicer preseže mejo za zanesljivo identifikacijo (1,7) (Preglednica 10; Slika 10) vendar gre tu bolj za posamezne primere iz določne vrste in ne splošno pravilo celotnega testiranega vzorca.

Preglednica 10: Primerjava povprečnega "log score" pri metodi s kitom Sepsityper in metodi s spiranjem. Pri metodi s spiranjem je vključeno večkratno spiranje ter dodatek surfaktanta.

Gliva kvasovka	Povprečni log score z metodo s kitom Sepsityper	Povprečni log score z metodo s spiranjem
<i>C.albicans</i>	1,599	1,531
<i>C.glabrata</i>	1,659	1,597
<i>C.parapsilosis</i>	1,795	1,668
<i>C.krusei</i>	1,754	1,739
<i>C.tropicalis</i>	1,724	1,658
<i>C.dubliniensis</i>	1,402	1,443
<i>C.lusitaniae</i>	1,198	1,352
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,368	1,595



Slika 10: Grafični prikaz primerjave povprečnega "log score" pri metodi s kitom Sepsityper in metodi s spiranjem

Črta pri "log score" 1,700 označuje mejo, kjer še lahko zanesljivo identificiramo glivo kvasovko.

5 RAZPRAVA

Trend mikrobioloških testov za zgodnjo diagnostiko glivičnih okužb je usmerjen v razvoj nekultivacijskih metod, predvsem v detekcijo glivnih antigenov, ki naj bi napovedovali grozečo sistemsko glivično bolezen že pred pojavom kliničnih simptomov in v razvoj molekularnih testov za detekcijo glivičnih nukleinskih kislin v telesnih tekočinah in tkivih, ki so hitrejše in občutljivejše od klasičnih kultivacijskih metod. Razvijajo pa se tudi nove metodologije, ki so zanesljivejše in hitrejše od znanih, med katere zagotovo sodi tudi masna spektrometrija. Metoda masne spektrometrije je primerna metoda za identifikacijo povzročitelja bolezni, saj ima visoko specifičnost in občutljivost, je hitro in enostavno izvedljiva ter relativno poceni diagnostična metoda.

Cilj prvega dela magistrske naloge je bil primerjati učinkovitost različnih postopkov ekstrakcije znotrajceličnih beljakovin gliv kvasovk, v postopku priprave za identifikacijo z masno spektrometrijo MALDI-TOF MS. V drugem delu naloge smo želeli ugotoviti učinkovitost identifikacije gliv z masno spektrometrijo neposredno iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk ter oceniti njeno uporabnost v okviru laboratorijske diagnostike glivičnih okužb.

5.1 METODA POLNE EKSTRAKCIJE IN POLNE EKSTRAKCIJE S SEGREVANJEM

Rezultati identifikacije glivnih povzročiteljev okužb z masno spektrometrijo so ponavadi nekoliko slabši od rezultatov identifikacije bakterijskih povzročiteljev. Za celice gliv je značilno, da imajo kompaktnjšo celično steno, ki nam otežuje želeno ekstrakcijo znotrajceličnih beljakovin (Bader, 2013).

Z modificirano metodo polne ekstrakcije, kot jo priporoča proizvajalec, z dodanim korakom segrevanja, smo želeli izboljšati ekstrakcijo beljakovin iz glivnih celic.

Rezultati pridobljeni z metodo s segrevanjem niso pokazali znatnega izboljšanja v identifikaciji pri metodi z dodanim korakom segrevanja. Število pravilno identificiranih kvasovk je bilo celo nekoliko nižje, kot v primeru polne ekstrakcije. Od identificiranih 101 gliv kvasovk rodu *Candida* smo s polno ekstrakcijo pravilno identificirali 100 (99,01 %) kvasovk, s polno ekstrakcijo s segrevanjem pa 90 (89,11 %) kvasovk.

Med obema načinoma ekstrakcije smo ugotovili statistično značilne razlike, saj je izračunana vrednost hi-kvadrat (7,18) večja od tabelarične vrednosti 3,841 (SP=1; $\alpha=0,05$), p -vrednost pa je manjša od α . Metodi se na prvi pogled v praksi sicer ne razlikujeta dosti, vendar pa glede na statistično obdelavo lahko z manj kot 5 % tveganjem trdimo, da sta metodi statistično različni.

Podobno je razvidno iz povprečne vrednosti ujemanja masnih spektrov "log score", ki je nekoliko nižja pri metodi polne ekstrakcije s segrevanjem, vendar še vedno zadostna, da pri večini gliv kvasovk presega mejo zanesljive identifikacije, ki je pri vrednosti "log score" 1,7. Iz slike 8 je razvidno, da sta izjemi *C. tropicalis* in *C. metapsilosis*, kjer povprečni "log score" ne preseže meje 1,7, kar pomeni, da pri teh dveh glivah identifikacija s polno ekstrakcijo s segrevanjem ni uspešna. Vendar pa moramo upoštevati, da smo ravno za obe omenjeni vrsti *C. tropicalis* in *C. metapsilosis* uporabili le enega oziroma dva izolata, kar je premalo, da bi lahko zanesljivo sklepali o lastnostih celotne vrste. Pri vrstah kjer smo uporabili več izolatov pa lahko sklepamo, da je metoda polne ekstrakcije s segrevanjem prav tako kot metoda polne ekstrakcije brez segrevanja ustrezna metoda za identifikacijo. Metoda polne ekstrakcije brez segrevanja se je izkazala za zanesljivejšo.

Pri našem delu smo iskali boljšo metodo od polne ekstrakcije. Vendar se modifikacija metode s segrevanjem ni izkazala za ustrežnejšo. Razlog za celo nekoliko slabše rezultate ekstrakcije s segrevanjem, lahko morda pripišemo denaturaciji znotrajceličnih beljakovin, do katere je verjetno prišlo pri postopku segrevanja.

5.2 METODA POLNE EKSTRAKCIJE IN HITRA METODA

Identifikacija bakterij in gliv, ki temelji na osnovi biokemijskih značilnosti izolatov in se je uporabljala v mikrobioloških laboratorijih pred dobo masne spektrometrije, je dolgotrajna, saj do rezultatov pridemo komaj po 24-72 urah. Pri nekaterih počasi rastočih organizmih, kot je *C. neoformans* pa je potrebna celo podaljšana inkubacija, dodatnih 24 ur (Buesching in sod., 1979). Biokemijski testi so tudi nizko specifični, saj temeljijo na fenotipskih lastnostih. Pogoste so napake v identifikaciji zaradi fenotipske podobnosti ter nerazločevanje znotraj kompleksov (Buesching in sod., 1979). Za razliko od teh so molekularni testi hitri in zanesljivi, vendar pa tudi dragi in zahtevnejši za izvedbo. Zaradi

teh lastnosti niso primerni za uporabo v rutinske namene in vsakodnevne masovne bolnišnične potrebe.

Masna spektrometrija združuje prednosti obeh. Je zanesljiva, hitra, enostavna in cenovno ugodna metoda (Bader, 2013). Kljub temu, da je masna spektrometrija že hitra metoda, smo želeli ugotoviti če obstoječo izvedbo lahko še dodatno optimiziramo in skrajšamo. To smo izvedli z našo lastno hitro metodo ekstrakcije beljakovin iz glivnih celic ter rezultate identifikacije primerjali z rezultati pridobljenimi s polno ekstrakcijo, kot jo priporoča proizvajalec.

Poleg časa identifikacije smo želeli zmanjšati tudi obseg dela laborantov, zato je bil namen modifikacije metode poleg skrajšanja časa do identifikacije povzročitelja tudi zmanjšanje korakov postopka identifikacije.

Z metodo polne ekstrakcije smo od 98 uporabljenih pravilno identificirali vse izolate, s hitrejšo modificirano metodo pa smo od 98 izolatov pravilno identificirali 79 izolatov, kar predstavlja 80,61 % delež. Med obema načinoma ekstrakcije smo ugotovili statistično značilne razlike, saj je izračunana vrednost hi-kvadrat (18,88) večja od tabelarične vrednosti 3,841 (SP=1; $\alpha=0,05$), p -vrednost pa je manjša od α . Metodi se na prvi pogled v praksi sicer ne razlikujeta dosti, vendar pa glede na statistično obdelavo lahko z manj kot 5 % tveganjem trdimo, da sta metodi statistično različni.

Iz grafikona na sliki 9 je razvidno, da so "log score" vrednosti nekoliko nižje pri metodi hitre ekstrakcije v primerjavi s polno. Pri polni ekstrakciji so te vrednosti večinoma okoli 2, pri hitri metodi pa se gibljejo okoli 1,7 tik nad to mejo ali pri nekaterih vrstah celo pod njo. Pri skupno osmih od enainvajsetih vrst smo dobili "log score" nižji od 1,7. Pri teh vrstah torej predvidevamo, da ne moremo uporabiti hitre metode za zanesljivo identifikacijo vrste. Vrste, ki nam jih s hitro metodo ni uspelo identificirati so *R. mucilaginosa*, *P. kluyveri*, *C. sphaerica*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* in *C. dubliniensis*. Skupno jim je, da smo ravno pri njih za testiranje metode uporabili le po en izolat iz vsake vrste, zaradi česar z gotovostjo ne moremo trditi, da hitra metoda ni ustrežna metoda. Če bi za te vrste uporabili večje število izolatov, bi lahko dobili tudi tu

morda drugačne rezultate. Kljub temu, da pri nekaterih vrstah ne dobimo rezultata identifikacije, pa je lahko hitra metoda pomembno orodje za skrajšanje časa in dela v laboratorijski diagnostiki. Ostale vrste, katerih v prvem koraku ne uspemo identificirati s hitro metodo lahko še vedno identificiramo s polno ekstrakcijo in na ta način zmanjšamo število vzorcev za dolgotrajnejši postopek.

Neposredni nanos glivnih izolatov (brez postopka ekstrakcije beljakovin) na jekleno ploščico in analiza z masno spektrometrijo ne dajeta tako dobrih rezultatov, kot jih dobijo pri po Gramu negativnih bakterijah (Bader, 2013). Delež pravilno identificiranih gliv je s tem načinom v raziskavi Cassagne in sod. (2013) dosegel le 40 %. Iz tako pridobljenih rezultatov so sklepali, da metoda ni primerna za diagnostične laboratorijske namene. V svoji raziskavi so nato podobno kot mi primerjali tudi več načinov ekstrakcije beljakovin. Cassagne in sod. (2013) so glede na svoje raziskave sklepali, da ima predobdelava vzorca pred masno spektrometrijo velik vpliv na uspešnost identifikacije.

Če primerjamo naše deleže uspešno identificiranih gliv kvasovk z deleži ostalih avtorjev vidimo, da pri polni ekstrakciji navajajo zelo različne deleže uspešne identifikacije gliv z masno spektrometrijo in sicer 77 % (Cassagne in sod., 2013), 85,2 % (van Veen in sod., 2010), 92,5 % (Marklein in sod., 2009) in 94 % (Goyer in sod., 2012). Pri nas je ta delež znašal 99,5 % za polno ekstrakcijo. Pri ostalih dveh metodah smo dobili nekoliko nižje deleže uspešne identifikacije kvasovk in sicer 89,1 % s polno ekstrakcijo s segrevanjem in 80,6 % s hitro metodo.

Cassagne in sod. (2013) so uporabili skupno 103 izolate kvasovk, med katerimi je bilo 27 različnih vrst. Uporabili so tri različne načine ekstrakcije beljakovin. Prva je bila nekoliko skrajšana oblika ekstrakcije, kjer so kolonije nanесли neposredno na jekleno ploščico, posušili na zraku in prekrili z 1 μ l 70 % mravljične kisline, spet posušili na zraku in nanесли še matriks. Ta metoda bi bila lahko dokaj primerljiva naši hitri modificirani obliki ekstrakcije, vendar smo mi za razliko od njih glivne celice zmešali z mravljično kislino v mikrocentrifugirki in vse skupaj še dodatno vorteksirali, kar je po našem mnenju povečalo stično površino celic in mravljične kisline. Predvidevamo, da so zato v našem primeru tudi rezultati identifikacije precej boljši. Pri njih je namreč delež uspešnosti te metode znašal

manj kot 40 %, pri nas pa 80,6 %. V isti raziskavi so primerjali tudi dve obliki polne ekstrakcije, prva je bila identična naši metodi polne ekstrakcije, drugo pa so nekoliko spremenili in dodali 5 minutno inkubacijo po dodatku mravljične kisline in 5 minutno inkubacijo po dodatku acetonitrila. Pri obeh metodah so dobili dokaj podobne rezultate, delež pravilne identifikacije 77-79 %, v primerjavi z našim deležem, ki je bil 99,5 % z metodo polne ekstrakcije in 89,1 % z metodo polne ekstrakcije s segrevanjem. Razlog za slabše rezultate pri njih bi lahko bil ta, da so namesto nekaj kolonij vzeli le po eno kolonijo ter namesto 50 µl dodali le 10 µl mravljične kisline in acetonitrila. Sami pa kot razloge zaradi katerih po njihovem mnenju prihaja do velikih razlik v deležih različnih avtorjev, navajajo uporabo treh različnih sistemov MALDI-TOF MS pri različnih avtorjih in sicer Bruker/Biotyper, Shimadzu/Saramis, Shimadzu/Andromas. Prav tako kot mi so tudi oni uporabili sistem Bruker/Biotyper. Kot drugi razlog navajajo uporabo različnih meja zanesljivosti identifikacije kvasovke in sicer od 1,7 do 2. Tako mi, kot oni smo uporabili mejo 1,7. Tretji razlog pa so po njihovem mnenju razlike v številu in vrsti izolatov v zbirki masnih spektrov referenčnih organizmov med posameznimi programi in različicami programov. Nekateri avtorji, kot so Marklein in sod. (2009), Seyfarth in sod. (2012) in Bille in sod. (2012) so celo predhodno sestavili svojo zbirko referenčnih izolatov ali v obstoječo zbirko dodali izbrane izolate. Razlike naj bi se pojavljale tudi glede na izbiro testiranih izolatov. Raziskovalci, ki so uporabili glive iz petih najpogostejših klinično pomembnih vrst, ki so *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* in *C. parapsilosis* naj bi imeli boljše možnosti za uspešnost masne spektrometrije, saj so te glive bolj raziskane, posledično so njihovi masni spektri dostopnejši v zbirkah referenčnih izolatov (Cassagne in sod., 2013). Večina kvasovk, ki smo jih uporabili, je predstavnic ravno teh petih vrst, kar bi lahko bil še eden od razlogov za uspešnejšo identifikacijo pri nas.

Van Veen in sod. (2010), Marklein in sod. (2009) in Goyer in sod. (2012) imajo med seboj dokaj primerljive deleže pravilno identificiranih gliv (85,2 %; 92,5 %; 94 %). Poleg identifikacije gliv so se nekateri ukvarjali tudi z identifikacijo bakterij. Van Veen in sod. (2010) so se držali podobnega protokola kot tudi mi, s tem da so podobno kot Cassagne in sod. (2013) dodali manj mravljične kisline in acetonitrila kot mi. Hitro metodo neposrednega nanosa kolonije na jekleno ploščico so izvajali le pri bakterijah, saj se po njihovem mnenju pri glivah ne bi obnesla najbolje. Uporabili so 327 izolatov, od tega 19

izolatov kvasovk vrst: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* in *S. cerevisiae*. Podobno kot pri nas je najverjetneje razlog za nekoliko boljše rezultate van Veen in sod. (2010) od rezultatov Cassagne in sod. (2013), uporaba kvasovk, ki spadajo med pet najpogostejših vrst. Vendar pa je njihov delež pravilno identificiranih gliv nekoliko nižji od našega, morda zato, ker so tudi oni podobno kot Cassagne in sod. (2013), uporabili manj mravljične kisline in acetonitrila kot mi (25 µl namesto 50 µl). Vse ostalo so izvedli z enakim postopkom ter enako strojno in računalniško opremo. Po našem mnenju je edina stvar za katero predvidevamo, da bi se lahko razlikovala, zbirka referenčnih izolatov v programu Biotyper, glede na to, da je bila njihova raziskava objavljena leta 2010, tri leta pred pričetkom našega dela. Zato obstaja možnost da bi v tem času bile lahko zbirke že močno spremenjene in posodobljene, dodani pa bi lahko bili tudi masni spektri nekaterih novih izolatov.

Marklein in sod. (2009) so uporabili 267 gliv, med njimi *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. neoformans* in *S. cerevisiae*. Pravilno so identificirali 92,5 % gliv. Identifikacija ni bila uspešna pri vrstah ki se v klinični mikrobiologiji redkeje pojavljajo. To so *Candida norvegensis*, *Candida rugosa*, *C. dubliniensis* in *Candida ciferrii*. Sami pravijo, da so te vrste izključili iz rezultatov, saj naj jih ne bi bilo v zbirki referenčnih izolatov verzije programa Biotyper, ki so jo uporabili. Tudi Goyer in sod. (2012) navajajo podobne ugotovitve, le da je pri njih to veljalo za nekatere druge redke kvasovke, kot so *Candida famata*, *Candida lambica*, *Candida magnoliae* in vrste rodu *Trichosporon*. Tudi pri nas je identifikacija nekoliko manj uspešna pri vrstah, ki se redkeje pojavljajo, kot povzročitelji bolezni. Pri nas se še bolj izrazito to kaže pri metodi hitre ekstrakcije. Vendar pa lahko upoštevamo tudi to, da smo pri teh glivah uporabili manjše število izolatov. Za uspešnost identifikacije z MALDI je torej pomembna kakovost knjižnice masnih spektrov.

Goyer in sod. (2012) so v raziskavi uporabili 335 izolatov gliv, med njimi 284 rodu *Candida*, 22 *Pichia*, 14 *Geotrichum*, 13 *S. cerevisiae* in 2 rodu *Trichosporon*. Postopek so želeli optimizirati, tako da so namesto petih kolonij, kot priporoča proizvajalec vzeli le eno kolonijo in dobili dokaj dobre rezultate (delež uspešne identifikacije 94 %). Menimo, da je ta optimizacija koristna le v primeru mešanih kultur, saj se z odvzemom posamezne

kolonije izognemo odvzemu različnih navidez podobnih kolonij, pri nas pa ta korak ne bi imel tolikšnega pomena, ker smo uporabljali le čiste kulture, delež pravilne identifikacije je bil pri nas najverjetneje zato tudi višji (99,5 %).

V našem primeru imajo vse metode dokaj visoke deleže pravilne identifikacije gliv zato lahko zaključimo, da vse tri metode dajejo zadovoljive rezultate, vendar pa sta obe modificirani metodi nekoliko slabši od metode priporočene s strani proizvajalca, še posebej za nekatere redkeje izolirane vrste kvasovk. Predvidevamo, da je glavni razlog za slabše rezultate pri metodi s segrevanjem denaturacija beljakovin, pri hitri metodi pa bi bil razlog lahko to, da smo zaradi skrajšanja postopka izpustili pomemben korak obdelave z etanolom ter tako glivnim celicam nismo preprečili tvorbe agregatov v vodni raztopini, s tem pa smo najverjetneje nekoliko zmanjšali celično površino na katero bi delovala mravljična kislina. Menimo, da smo celice premalo časa izpostavili delovanju mravljične kisline in bi morali le podaljšati čas inkubacije, da bi dobili boljše rezultate. Obstaja pa tudi možnost, da smo v celotnem delu uporabili premalo izolatov, v tem primeru bi povečanje vzorca morda dalo lahko tudi drugačne rezultate. Poleg tega so masni spektri referenčnih izolatov zbirke programa Biotyper verjetno bili v celoti pridobljeni z metodo polne ekstrakcije beljakovin, kar ima za posledico najboljše ujemanje masnih spektrov naših izolatov pridobljenih z enako metodo. Pri metodi s segrevanjem smo morda celice predolgo segrevali, čeprav smo čas segrevanja že na začetku skrajšali iz dveh na eno minuto. Verjetno bi bilo učinkoviteje, če bi celice izpostavili le kratkotrajnemu toplotnemu šoku, ki bi trajal le nekaj sekund. Pomemben dejavnik, ki bi vplival na izboljšanje ekstrakcije pa bi lahko bil tudi znižanje temperature ali kombinacija toplotnega in hladnega šoka v več zaporednih ponovitvah. Vse tri metode so primerne za diagnostične metode, vendar metoda s segrevanjem ni najbolj praktična, saj imamo z njo več dela, daje pa slabše rezultate od polne ekstrakcije, oziroma glede na naše domneve bi morda bilo potrebnih še nekaj optimizacijskih popravkov za popolno uspešnost in uporabnost metode. Hitra metoda bi glede na naše rezultate že sedaj lahko bila priročna in uspešna metoda vsaj v večini primerov klinično pogostejših kvasovk, kjer je še posebej pomembna hitra diagnostika.

5.3 IDENTIFIKACIJA GLIV KVASOVK NEPOSREDNO IZ HEMOKULTUR

Med glivami sepo največkrat povzročajo prav glive iz rodu *Candida* (Delaloye in Calandra, 2014). Pomembno orodje pri identifikaciji povzročiteljev seps predstavljajo hemokulture, ki jih ponavadi odvzamejo najbolj kritično bolnim ljudem z znaki sepse (Bader, 2013). Če želimo zmanjšati smrtnost zaradi kandidemije moramo poskrbeti za čim hitrejšo in zanesljivo identifikacijo povzročitelja okužbe, saj to omogoča izbiro najprimernejšega zdravljenja.

Poleg identifikacije bakterij in gliv iz čistih kultur, nam MALDI-TOF MS omogoča tudi neposredno identifikacijo mikroorganizmov iz kužnin, kar je že precej utečeno pri bakterijah (Yan in sod., 2011). Za identifikacijo gliv neposredno iz kužnine, v našem primeru iz hemokulturnih stekleničk pa še ni bilo narejenih veliko raziskav. V drugem delu naše raziskave smo zato skušali primerjati dve metodi neposredne identifikacije iz hemokulturnih stekleničk.

Vendar pa nam identifikacijo z MALDI-TOF MS otežujejo sestavine krvi in gojišča, ki so prisotne v sami hemokulturni steklenički. Te sestavine moramo na nek način ločiti od glivnih ali bakterijskih celic, kar smo v našem delu tudi poskušali kar najbolje storiti. V primerjavi z bakterijami to veliko težje storimo pri glivah. O tem poročajo tudi v ostalih raziskavah (Yan in sod., 2011; Ferreira in sod., 2011; Schubert in sod., 2011). Predvidevamo, da si podobno, kot so pri bakterijah opisali Ferroni in sod. (2010), z dodatkom detergenta (surfaktanta) olajšamo odstranjevanje krvnih celic. Detergent uspešno raztaplja celične membrane krvnih celic, ne pa tudi bakterijskih (Ferroni in sod. 2010).

V našem delu smo želeli kar najbolje optimizirati postopek identifikacije gliv neposredno iz hemokulturnih stekleničk. To so pred nami na več načinov želeli že nekateri drugi avtorji. V naši nalogi smo upoštevali njihove izsledke in metodo še dodatno prilagodili (Yan in sod., 2011, Spanu in sod., 2012). Z metodo, katere postopek je priložen v navodilih kita Sepsityper smo od 96 pravilno identificirali 51 (53,1 %) izolatov gliv kvasovk. Z modificirano metodo pa smo od 96 pravilno identificirali 29 (30,21 %) izolatov, čeprav so

avtorji člankov iz katerih smo povzeli in kombinirali novo metodo ugotovili, da naj bi bila njihova metoda uspešnejša od tiste, ki jo priporoča proizvajalec kita Sepsityper (Yan in sod., 2011; Spanu in sod., 2012). Z nobeno od izbranih metod nam ni uspelo identificirati treh vrst: *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* in *R. mucilaginosa*. Kljub nizkim vrednostim "log score" nam je ostale vrste vsaj uspelo identificirati. Vendar pa povprečni "log score" nakazuje na to, da nobena metoda ni primerna za diagnostične laboratorijske namene, saj mejo 1,7 preseže le enkrat pri metodi s spiranjem (pri *C. krusei*) in trikrat pri metodi s kitom Sepsityper (pri *C. parapsilosis*, *C. krusei* in *C. tropicalis*).

Yan in sod. (2011) so v postopek priprave vzorca vključili dodatna dva koraka spiranja z destilirano vodo in centrifugiranjem z namenom čim boljše odstranitve krvnih celic in beljakovin vzorca že pred samo lizo s pufrom za lizo kita Sepsityper. Delež pravilno identificiranih gliv kvasovk je pri njih znašal 100 %, pravilno so identificirali vseh 42 testiranih izolatov. Spanu in sod. (2012) so v svoj postopek dodali korak obdelave vzorca s surfaktantom Tween 80, ki naj bi povzročal lizo krvnih celic zaradi raztapljanja njihovih membran. Delež uspešne identifikacije s to metodo je bil pri njih 95,9 % za *C. albicans* in 86,5 % za ostale vrste. Mi smo združili oba omenjena postopka ter postopek nadaljevali po protokolu kita Sepsityper in dobili delež uspešne identifikacije 30,21 %. S postopkom brez upoštevanja dodatnih korakov spiranja pa smo pravilno identificirali 53,1 % izolatov.

Razlog za naše nekoliko slabše rezultate je po našem mnenju ta, da nam z metodo, ki jo priporoča proizvajalec najverjetneje ni uspelo v celoti odstraniti ostankov krvnih celic in sestavin gojišča, pri modificirani metodi pa smo verjetno z dodatnimi spiranji nehote odstranili tudi nekaj glivnih celic/beljakovin. Ena od možnosti, bi lahko bila tudi ta, da kljub dodatku pufra za lizo, liza krvnih celic ni bila uspešna, vendar predvidevamo, da če je bila liza uspešna v nekaterih primerih, s pufrom za lizo ni bilo nič narobe. Mogoče nam je liza celic uspela, vendar smo kasneje v koraku spiranja nezadostno odstranili vsebino liziranih celic. Možno je tudi, da imajo nekatere kvasovke bolj rigidno celično steno od drugih in da nam le te ni uspelo predreti v pravem trenutku. Če smo jo predrli prezgodaj, smo lahko beljakovine sprali ali pa ekstrakcija beljakovin sploh ni uspela prav zaradi rigidne celične stene. V tem primeru bi morali poiskati še dodatno sredstvo za razgradnjo celične stene kvasovk.

Večina avtorjev poudarja, da je ključnega pomena za ustrezno občutljivost metode zadostna koncentracija inokuluma. Ta koncentracija naj bi za glive znašala okoli $0,5 \cdot 10^6$ celic/ml (Qian in sod., 2008; Spanu in sod., 2012). Drugi vir kot optimalno navaja koncentracijo $5,9 \cdot 10^5$ CFU/ml (Yan in sod., 2011). Mi smo hemokulturne stekleničke inokulirali z raztopino celic s koncentracijo $0,5 \cdot 10^6$ CFU/ml, potem pa pustili glive v hemokulturah rasti še preko noči, oziroma dokler nam aparat za hemokulture ni javil pozitivnosti posamezne hemokulture, tako da predvidevamo, da je bila koncentracija celic zadosti velika za uspešno identifikacijo.

Če naše rezultate primerjamo z ostalimi avtorji ugotovimo, da nekaj avtorjev sicer navaja tudi pri glivah zadovoljive rezultate neposredne identifikacije iz hemokultur (Yan in sod., 2011, Spanu in sod., 2012), nekaj objavljenih raziskav pa navaja slabe rezultate pri glivah ter boljše rezultate pri bakterijah (Ferreira in sod., 2011; Schubert in sod., 2011). Predvidevajo, da je celična stena gliv in po Gramu pozitivnih bakterij kompaktnjša, bolj rigidna in sestavljena iz več plasti kot celična stena po Gramu negativnih bakterij, zato naj bi bila pri teh skupinah mikroorganizmov otežena ekstrakcija beljakovin.

Uspešnost identifikacije gliv neposredno iz pozitivnih hemokultur je pri različnih avtorjih različna ter rahlo vrstno specifična. Delež pravilno identificiranih gliv kvasovk iz rodu *Candida* je običajno pri vseh največji za *C. albicans*, 95,9 % in nekoliko nižji za ostale vrste 86,9 % (Spanu in sod., 2012). Mi smo z metodo s kitom Sepsityper dobili najvišji delež uspešne identifikacije za *C. parapsilosis*, kar 90 %, relativno visoka sta tudi deleža za glivi *C. krusei* (63 %) in *C. tropicalis* (70 %). Ti rezultati nakazujejo na to, da bi bila metoda neposredne identifikacije iz hemokultur v primeru seps z glivami *C. parapsilosis*, *C. krusei* in *C. tropicalis* morda lahko uporabna metoda tudi v diagnostičnih rutinskih laboratorijih. *C. albicans* ima pri nas nekoliko nižji delež uspešnosti metode (48 %). Razlog za razlike z ostalimi avtorji, bi lahko bil premajhno število ostalih (ne *C. albicans*) izolatov, ob povečanju tega števila bi morda pridobili rezultate primerljive ostalim avtorjem.

Niso pa vsi poskusi identifikacije gliv z omenjeno metodo identifikacije neposredno iz hemokultur le uspešni. Eden izmed objavljenih neuspešnih poskusov je primer Ferreira in sod. (2011), kjer navajajo zelo dobre rezultate za po Gramu negativne bakterije, delež pravilno identificiranih gram negativnih bakterij je pri njih znašal 96,6 %, dokaj zadovoljiv je tudi delež za po Gramu pozitivne bakterije, ki je znašal 64,8 %. Identifikacija gliv pa je bila pri njih uspešna le pri 5,6 %. Od 18 uporabljenih so pravilno identificirali le eno glivo, kar kaže na neustreznost metode za identifikacijo gliv. Podobne rezultate so dobili tudi Schubert in sod. (2011), za katere sami pravijo, da jih niso objavili, ker so bili rezultati dokaj slabi, nato pa so znižali mejo "log score" iz 1,7 na 1,5 ter dobili nekoliko boljše rezultate, ki so jih kasneje tudi objavili. Namesto 85,7 % uspešnosti so tako pri po Gramu negativnih bakterijah dobili 89,8 % uspešnost, pri po Gramu pozitivnih namesto 54,5 %, kar 86,3 % in pri glivah namesto 47 % kar 70,6 %. Če bi upoštevali pravo mejo "log score" pri 1,7 bi bili rezultati slabi za glive in po Gramu pozitivne bakterije. V kolikor bi, seveda neutemeljeno tudi mi znižali mejo zanesljive identifikacije iz 1,7 na 1,5, bi prav tako lahko kot uspešno za identifikacijo odobrili metodo skoraj pri vseh vrstah, razen pri *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* in *R. mucilaginosa*.

Zaključimo lahko, da nobena od metod identifikacije neposredno iz pozitivnih hemokulturnih stekleničk ni primerna za diagnostične laboratorijske namene, pač pa se lahko metoda s kitom Sepsityper uporablja, kot dodatna metoda, za hitro določanje nekaterih povzročiteljev seps iz rodu *Candida* pri določenih bolnikih, saj je hitra in ni zamudna metoda, ki ne potrebuje kultivacije in inkubacije. Je zanesljiva metoda, kar pomeni, da v kolikor dobimo rezultat identifikacije, je ta rezultat popolnoma zanesljiv. Pri ostalih, kjer je identifikacija s to metodo neuspešna pa še vedno lahko opravimo daljši postopek posredne identifikacije s kultivacijo. Na ta način bi lahko dosegali čimprejnjše zdravljenje vsaj pri nekaterih bolnikih, ker pa bi manj vzorcev ostalo za dolgotrajnejši postopek posredne identifikacije, bi tudi ta potekala hitreje. V prihodnje pa bomo morali še počakati na razvoj novih metod priprave vzorca za neposredno identifikacijo pozitivnih glivičnih seps, ki bodo imele večjo občutljivost in omogočale pridobitev boljših rezultatov identifikacije.

6 SKLEPI

1. del:

- Identifikacija gliv kvasovk z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF z vsemi tremi metodami ekstrakcije beljakovin iz kulture gliv kvasovk je bila uspešna.
- Z metodo polne ekstrakcije smo identificirali 99,5 % izolatov (število testiranih 199, število pravilno identificiranih 198), z modificiranima metodama (metoda s segrevanjem, hitra metoda) pa 89,1 % (število testiranih 101, število pravilno identificiranih 90) ter 80,6 % (število testiranih 98, število pravilno identificiranih 79).
- Med vsemi tremi načini priprave izolatov za identifikacijo z MALDI-TOF smo določili statistično značilne razlike. Vrednost funkcije hi-kvadrat je v primeru polne in ekstrakcije s segrevanjem 7,18, v primeru polne in hitre ekstrakcije pa 18,88. Obe vrednosti sta višji od 0,05, kar pomeni, da so med vsemi tremi metodami statistično značilne razlike. Kljub razlikam pa so vse tri metode primerne za diagnostične namene.
- Specifičnost: povprečni "log score" pri metodi polne ekstrakcije za vse uporabljene vrste gliv presega mejo 1,7. Povprečni "log score" pri metodi s segrevanjem meje 1,7 ne doseže le pri dveh vrstah, *C. tropicalis* in *C. metapsilosis*. Povprečni "log score" pri hitri metodi meje 1,7 ne doseže pri vrstah *S. cerevisiae*, *C. lusitaniae*, *R. mucilaginosa*, *P. kluyveri*, *C. sphaerica*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* in *C. dubliniensis*.
- Pri metodi s segrevanjem od uporabljenih osemnajstih različnih vrst kvasovk, identifikacija ni bila uspešna le pri eni vrsti, to je *C. metapsilosis*. Pri metodi hitre ekstrakcije od uporabljenih enaindvajsetih različnih vrst kvasovk, identifikacija ni bila uspešna pri šestih vrstah (*C. dubliniensis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. sphaerica*, *R. mucilaginosa*, *P. kluyveri*).

2. del

- Identifikacija gliv kvasovk neposredno iz hemokulturnih stekleničk z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF ni bila zadovoljiva.

- Z metodo s kitom Sepsityper smo identificirali 53,1 % izolatov (število testiranih 96, število pravilno identificiranih 51), z modificirano metodo pa 30,2 % (število testiranih 96, število pravilno identificiranih 29).
- Specifičnost: povprečni "log score" pri metodi s kitom Sepsityper ni dosegel meje 1,7 pri vrstah *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* in *R. mucilaginosa*, enako velja za metodo s spiranjem in dodatkom detergenta, s tem da meje še dodatno ne dosegel pri vrstah *C. parapsilosis* in *C. tropicalis*. Delež uspešne identifikacije z metodo s kitom Sepsityper je višji od 60 % pri treh vrstah (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis* in *C. krusei*).
- Identifikacija neposredno iz hemokulturnih stekleničk je bila najuspešnejša pri treh vrstah *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* in *C. krusei*. Od uporabljenih osmih različnih vrst gliv kvasovk pri treh vrstah identifikacija ni bila uspešna (*C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *R. mucilaginosa*).

7 POVZETEK

Glive se vse pogosteje pojavljajo tudi kot povzročiteljice bolnišničnih okužb, med katerimi predstavljajo 15 %. Najpogostejše so kvasovke iz rodu *Candida*. Še posebej pogoste so *C. albicans*, pa tudi ostale: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* in *C. parapsilosis*. Delež smrtnosti ima širok razpon, od 5 do 71 %, saj je odvisen od sočasne prisotnosti drugih bolezni. V primerih, kjer se sepsa razvije v septični šok je smrtnost višja od 60 %. Zaradi visoke smrtnosti je izjemnega pomena hitra in zanesljiva identifikacija povzročitelja okužbe. Pri klasičnih metodah, se je za identifikacijo kvasovk večinoma uporabljalo biokemijske teste, ki ne dajejo vedno zanesljivih rezultatov, so dolgotrajni in ne razločujejo gliv znotraj nekaterih kompleksov, kot je kompleks *C. parapsilosis*/*C. ortopsilosis*/*C. metapsilosis*. Ob napredku molekularnih metod, so se pričele raziskave tudi v tej smeri, vendar zaradi visokih stroškov, niso najprimernejše za rutinske diagnostične namene. Masna spektrometrija je najprimernejša, saj je natančnejša od biokemijskih testov ter cenejša in lažje izvedljiva od molekularnih testov. Omogoča pa nam tudi identifikacijo neposredno iz hemokulturnih stekleničk. V tej raziskavi smo želeli z MALDI-TOF masno spektrometrijo, ter s pomočjo različnih načinov predobdelave vzorca poiskati metodo, ki bi pri glivah zagotavljala dovolj uspešno identifikacijo za primernost metode v diagnostične namene. V prvem delu raziskave smo primerjali tri načine ekstrakcije beljakovin iz glivnih celic s pomočjo mravljične kisline in acetonitrila: metodo polne ekstrakcije, metodo polne ekstrakcije s segrevanjem in hitro metodo. S segrevanjem smo skušali celično steno gliv narediti prepustnejšo za nadaljne korake ekstrakcije, s hitro metodo pa smo želeli skrajšati čas dela. V drugem delu raziskave smo primerjali dva načina identifikacije gliv kvasovk z masno spektrometrijo neposredno iz hemokulturnih stekleničk. Pri prvi metodi, smo za odstranitev neželenih sestavin krvi in gojišča uporabili kit Sepsityper, pri drugi metodi, pa smo čiščenje vzorca želeli še izboljšati, zato smo dodali dva koraka spiranja z destilirano vodo in surfaktantom Tween 80. V prvem delu naše raziskave so se vse tri metode izkazale za uspešne in uporabne v rutinske diagnostične namene. Postopek čiščenja vzorca za identifikacijo neposredno iz hemokultur pa bi v prihodnosti potreboval še nekaj dodatnih izboljšav in raziskav, da bi ga lahko uporabili kot samostojno metodo za identifikacijo gliv, zaenkrat je lahko uporaben le kot dopolnilna metoda.

8 VIRI

- Bader O. 2013. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, 13, 5: 788-799
- Barnett J. A. 2008. A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast*, 25, 6: 385-417
- Bille E., Dauphin B., Leto J., Bougnox M. E., Beretti J. L., Lotz A., Suarez S., Meyer J., Join-Lambert O., Descamps P., Grall N., Mory F., Dubreuil L., Berche P., Nassif X., Ferroni A. 2012. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus spp.* and positive blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 11: 1117-1125
- Buesching W. J., Kurek K., Roberts G. D. 1979. Evaluation of the modified API 20 C system for identification of clinically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 9, 5: 565-569
- Cassagne C., Cella A. L., Suchon P., Normand A. C., Ranque S., Piarroux R. 2013. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Medical Mycology*, 51, 4: 371-377
- Chaffin W. L. 2008. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 3: 495-544
- Chaffin W. L., Lopez Ribot J. L., Casanova M., Gozalbo D., Martinez J. P. 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1: 130-180
- Delaloye J., Calandra T. 2014. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patients. *Virulence*, 5, 1: 161-169

- Eisenstein B. I. 1990. The polymerase chain reaction-a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. *New England Journal of Medicine*, 322, 3: 178-183
- Ferreira L., Sánchez-Juanes F., Porras-Guerra I., García-García M. I., García-Sánchez J. E., González-Buitrago J. M., Muñoz-Bellido J. L. 2011. Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 4: 546-551
- Ferroni A., Suarez S., Beretti J. L., Dauphin B., Bille E., Meyer E., Bougnoux M. E., Alanio A., Berche P., Nassif X. 2010. Real-Time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 5: 1542-1548
- Goyer M., Lucchi G., Ducoroy P., Vagner O., Bonnin A., Dalle F. 2012. Optimization of the preanalytical steps of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification provides a flexible and efficient tool for identification of clinical yeast isolates in medical laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 9: 3066-3068
- Marklein G., Josten M., Klanke U., Müller E., Horré R., Maier T., Wenzel T., Kostrzewa M., Bierbaum G., Hoerauf A., Sahl H. G. 2009. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 9: 2912-2917
- Matos T. 2002. Oportunistične glive. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 481-499

- McCullough M. J., Ross B. C., Reade P. C. 1996. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 25, 2: 136-144
- Pfaller M. A. 1996. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clinical Infectious Diseases*, 22, 2: 89-94
- Qian J., Cutler J. E., Cole R. B., Cai Y. 2008. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 3: 439-449
- Rigby S., Procop G. W., Haase G., Wilson D., Hall G., Kurtzman C., Oliveira K., Von Oy S., Hyldig-Nielsen J. J., Coull J., Stender H. 2002. Fluorescence *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 6: 2182-2186
- Ruiz-Herrera J., Elorza M. V., Valentin E., Sentandreu R. 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Research*, 6, 1: 14-29
- Schubert S., Weinert K., Wagner C., Gunzl B., Wieser A., Maier T., Kostrzewa M. 2011. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Journal of Molecular Diagnostics*, 13, 6: 701-706
- Seyfarth F., Wiegand C., Erhard M., Gräser Y., Elsner P., Hipler U. C. 2012. Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mycoses*, 55, 3: 276-280

- Spanu T., Posteraro B., Fiori B., D'Inzeo T., Campoli S., Ruggeri A., Tumbarello A., Canu G., Treçarichi E. M., Parisi G., Tronci M., Sanguinetti M., Fadda G. 2012. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of candida species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 1: 176-179
- Stevenson L. G., Drake S. K., Murray P. R. 2010. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 2: 444-447
- Theel E. S. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacterial and yeast isolates. *Clinical Microbiology Newsletter*, 35, 19: 155-161
- van Veen S. Q., Class E. C., Kuijper E. J. 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 3: 900-907
- Wieser A., Schneider L., Jung J., Schubert S. 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 3: 965-974
- Yan Y., He Y., Maier T., Quinn C., Shi G., Li H., Stratton C. W., Kostrzewa M., Tang Y. W. 2011. Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining sepsityper specimen processing and microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization biotyper system. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 7: 2528-2532
- Zalar P., Jančič S., Gunde-Cimerman N. 2012. Izbrana poglavja pri predmetu Mikologija, Priročnik za vaje s teoretičnimi osnovami pri izbirnem predmetu za študente

Biologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 47 str.

<http://web.bf.uni-lj.si/bi/biologija->

[mikroorganizmov/Datoteke/mikologija_skripta_biologi_1112.pdf](http://web.bf.uni-lj.si/bi/biologija-mikroorganizmov/Datoteke/mikologija_skripta_biologi_1112.pdf) (januar 2014)

ZAHVALA

Posebna zahvala gre doc. dr. Tadeji Matos, dr. med, za sprejetje mentorstva, navdušitev za opravljanje magistrske naloge, vso izkazano podporo, usmerjanje in sodelovanje, odgovore na moja vprašanja, nasvete, predvsem pa zaupanje in spodbudo.

Zahvaljujem se prof. dr. Kristini Sepčič za hiter in strokoven pregled magistrskega dela ter odlične predloge.

Iskreno se zahvaljujem Roku za usmerjanje pri praktičnem delu v laboratoriju, potrpežljivost pri odgovarjanju na moja vprašanja, pomoč pri reševanju težav, večni optimizem in spodbudo.

Hvala tudi Janji, Tatjani in Roku iz laboratorija za glivične infekcije za vse lepe trenutke, ki smo jih v laboratoriju in izven njega preživeli skupaj, zabavno popestritev delavnih dni, spodbudo, pomoč in tolažbo v težkih trenutkih. Hvala vam, da ste me sprejeli za svojo in mi pomagali na moji nadaljni karierni poti. Čas, ki smo ga preživeli skupaj mi bo za vedno ostal v lepem spominu.

Iz srca sem hvaležna mami Adriani in očetu Gabrijelu, da sta mi omogočila študij, za njuno neomajno ljubezen ter nesebično podporo, pomoč tekom študija, koristne nasvete, vlivanje optimizma in samozavesti ter spodbudo v težkih trenutkih. Hvala sestri Nini in bratu Davidu za spodbudo in nasvete. Hvala tudi Borutu, ki mi je stal ob strani, me spodbujal in znal nasmejati tudi ob najtežjih trenutkih. Prestajanje vseh preizkušenj je bilo z vami vsemi veliko lažje.