

NOTA APLIKACYJNA – JAGIELLOŃSKIE CENTRUM INNOWACJI

IDENTYFIKACJA IZOLATÓW KLINICZNYCH GRZYBÓW DROŹDZOPODOBNYCH PRZY UŻYCIU ANALIZATORA MALDI-TOF-MICROFLEX FIRMY BRUKER

Małgorzata Głowacka-Twardokęs*, Iwona Żak**

*Laboratorium Mikrobiologii, Jagiellońskie Centrum Innowacji, ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków

**Zakład Mikrobiologii Klinicznej, Uniwersytecki Szpital Dziecięcy w Krakowie, ul. Wielicka 265, 30-633 Kraków

WSTĘP

Postępowi, jaki odnotowuje się w wielu dziedzinach współczesnej medycyny, towarzyszy wzrost liczby inwazyjnych zakażeń grzybiczych (IZG), które komplikują proces leczenia choroby podstawowej oraz powodują powstanie wielu groźnych dla życia powikłań. Wzrost częstości zakażeń grzybiczych jest wynikiem powszechnego stosowania antybiotyków o szerokim spektrum, przedłużającej się hospitalizacji krytycznie chorych i wzrastającej liczby pacjentów z obniżoną odpornością. Dlatego problem ten dotyka w szczególności pacjentów leczonych na oddziałach intensywnej opieki medycznej, transplantologii, onkologii, hematologii oraz oparzeniowych.

Najczęściej wymieniane grupy ryzyka rozwoju IZG obejmują pacjentów z wrodzonymi lub nabytymi niedoborami odporności, leczonych lekami immunosupresyjnymi, poddanych długotrwałej antybiotykoterapii, a także chorych w skrajnych grupach wiekowych (wcześniaki i noworodki, osoby starsze), pacjentów obciążonych chorobami przewlekłymi (np. cukrzyca) oraz z wszczepionymi biomateriałami. Wagę problemu podkreśla fakt, że pomimo postępu również w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej, inwazyjne zakażenia grzybicze są rozpoznawane za życia chorego jedynie w 20-30% przypadków.

Obecnie ponad 100 gatunków grzybów drożdżopodobnych izolowanych z różnych miejsc ciała człowieka jest znanych jako patogeny ludzkie. Drożdżaki z rodzaju *Candida* są czynnikiem etiologicznym zakażeń w około 72,8 milionach przypadków rocznie na całym świecie, a śmiertelność z nimi związana sięga 33,9%. Chociaż *Candida albicans* pozostaje wiodącym i najważniejszym patogennym gatunkiem, to w ostatnich latach wzrasta częstość izolacji gatunków innych niż *C.albicans* [1]. Identyfikacja grzybów spośród coraz liczniejszej i bardziej różnorodnej grupy przy użyciu konwencjonalnych metod fenotypowych jest trudna i czasochłonna, a ustalenie gatunku może być niejednoznaczne, szczególnie w przypadku rzadziej spotykanych grzybów drożdżopodobnych. Ponadto należy pamiętać, że gatunki grzybów w różnym stopniu są wrażliwe na leki przeciwgrzybicze, dlatego szybka i niezawodna identyfikacja tych drobnoustrojów ma kluczowe znaczenie w jak najwcześniejszym włączeniu leczenia uwzględniającego naturalną oporność wyizolowanego szczepu [1].

Spektrometr masowy typu MALDI-TOF identyfikuje mikroorganizmy porównując widma mas białek rybosomalnych (tzw. molekularny „odcisk palca”) z widmami zgromadzonymi w bazie danych, obejmującymi około 2600 gatunków. Większość testów identyfikujących drobnoustroje oparta jest na analizie ich właściwości biochemicznych, co trwa od 24 do 48 godzin. Technika spektrometrii mas umożliwia szybką, kilkuminutową identyfikację drobnoustrojów, nawet tych, które wykazują słabe właściwości biochemiczne. Pozwala to skrócić czas oczekiwania na wynik badania mikrobiologicznego o jedną lub dwie doby, a przez to wcześniej wdrożyć terapię empiryczną, która jest potwierdzana zgodnie z rekomendacjami EUCAST.

CEL

Celem pracy była identyfikacja izolatów klinicznych grzybów drożdżopodobnych metodą spektrometrii masowej (Maldi-Tof) przy użyciu analizatora MALDI-TOF-microflex firmy Bruker i porównanie tej metody z metodami rutynowo stosowanymi w Uniwersyteckim Szpitalu Dziecięcym w Krakowie (ocena preparatu bezpośredniego, identyfikacja manualna w oparciu o mikromorfologię szczepu w połączeniu z opisami gatunków w atlasach i monografiach, identyfikacja przy użyciu automatycznego systemu mikrobiologicznego BD Phoenix™).

MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowiły szczepy grzybów drożdżopodobnych uzyskane z posiewów materiałów klinicznych, których nie udało się zidentyfikować przy zastosowaniu rutynowo dostępnych metod diagnostycznych.

Hodowlę prowadzono w temperaturze 30/37°C na agarze Sabouraud przez 7 dni. Po uzyskaniu wzrostu szczepu wykonano preparat barwiony metodą Grama, a następnie do identyfikacji wykorzystywano metodę hodowli na podłożach zubożonych w technice Dalmau oraz analizator mikrobiologiczny BD Phoenix™. Izolaty poddano analizie przy użyciu oprogramowania MBT Compass IVD i MBT Compass metodą spektrometrii masowej (MALDI-TOF MS firmy Bruker) według instrukcji producenta metodą rozciągniętego transferu bezpośredniego i – w celu uzyskania lepszego wskaźnika identyfikacji (score) – metodą ekstrakcji kwasem mrówkowym i acetonitrylem.

WYNIKI

W ciągu 11 miesięcy w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej USD wykonano 3055 badań mikologicznych (klasyczna diagnostyka mikologiczna i badania mykoserologiczne), w tym:

- hodowli poddano 1897 materiałów klinicznych;
- wzrost grzybów drożdżopodobnych stwierdzono w 745 materiałach;
- wyizolowano łącznie 1008 szczepów grzybów drożdżopodobnych należących do różnych gatunków;
- 30 szczepów (2,98%) nie udało się zidentyfikować przy użyciu rutynowo dostępnych metod diagnostycznych (test filamentacji, ocena mikromorfologii na podłożach zubożonych,

identyfikacja w oparciu o wyniki testów biochemicznych wykonywanych na analizatorze BD Phoenix™) – szczepy te przekazano do dalszej diagnostyki do Laboratorium Mikrobiologii Jagiellońskiego Centrum Innowacji (JCI).

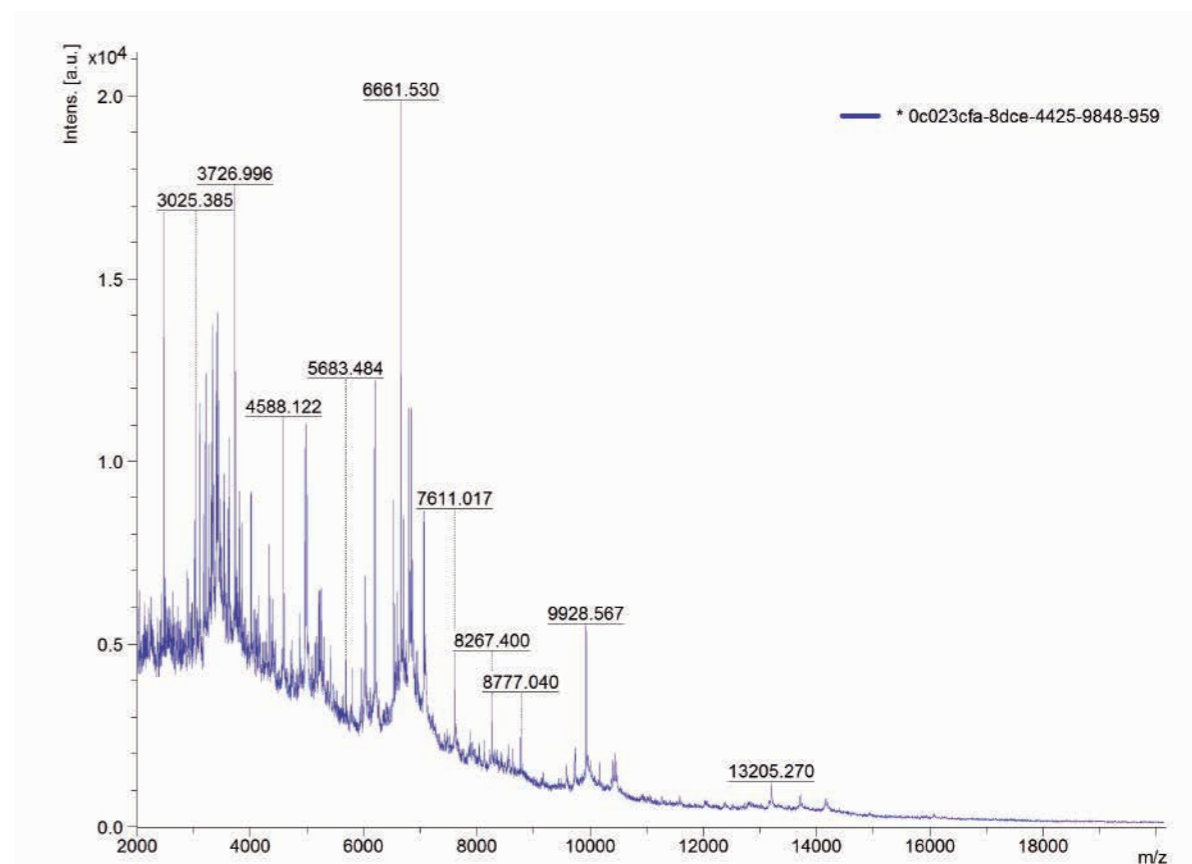
W JCI otrzymane izolaty grzybów drożdżopodobnych poddano analizie metodą spektrometrii masowej (Maldi-Tof) przy użyciu analizatora MALDI-TOF-microflex firmy Bruker. W badanej grupie 28 szczepów (93,3%) zostało zidentyfikowanych uzyskując wskaźnik (score) powyżej 2.00 (wiarygodna identyfikacja drobnoustroju). Dwa izolaty (6,66% populacji) nie udało się zidentyfikować.

WNIOSKI

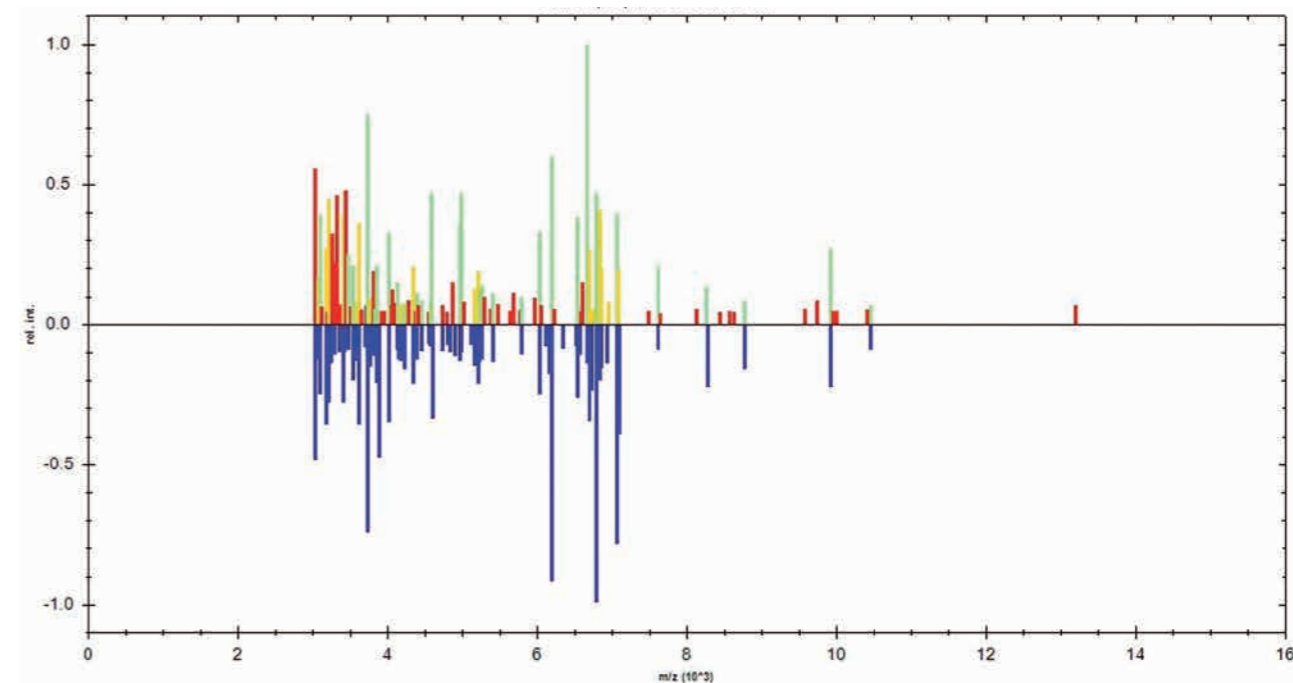
Spektrometr masowy typu MALDI-TOF to urządzenie, które umożliwia uzyskanie identyfikacji analizowanych mikroorganizmów w najkrótszym czasie (od 10 do 30 minut) w porównaniu z innymi metodami stosowanymi rutynowo w diagnostyce mikrobiologicznej, np.:

- analizator mikrobiologiczny BD Phoenix™ – 12 do 24 godzin,
- identyfikacja na podstawie hodowli i preparatu (ocena mikromorfologii badanego szczepu na podłożu kukurydzianym) – 48 godzin.

Wyniki badań potwierdzają tezę przedstawioną w załączonej literaturze, że identyfikacja wykonana przy użyciu analizatora MALDI-TOF-microflex firmy Bruker jest szybsza i bardziej wiarygodna niż metody tradycyjne¹⁻⁵.



Rysunek 1. Widmo mas białek rybosomalnych uzyskane dla *Candida parapsilosis*, jednego z 30 szczepów grzybów drożdżopodobnych, których nie udało się zidentyfikować tradycyjnymi metodami.



Rysunek 2. Porównanie widma uzyskanego dla *Candida parapsilosis* (górna połowa wykresu) z widmem wzorcowym dla tego szczepu w bazie danych firmy Bruker (dolna połowa wykresu).

LITERATURA

1. G. Marklein, M. Josten, U. Klanke, E. Müller, R. Horr , T. Maier, T. Wenzel, M. Kostrzewa, G. Bierbaum, A. Hoerauf, and H.-G. Sahl, *J. Clin. Microbiol.*, 2009, 47, 2912-2917;
2. L. G. Stevenson, S. K. Drake, Y. R. Shea, A. M. Zelazny, and P. R. Murray, *J. Clin. Microbiol.*, 2010, 48, 3482-3486;
3. A. Pinto, C. Halliday, M. Zahra, S. van Hal, T. Olma, K. Maszewska, J. R. Iredell, W. Meyer, S. C.-A. Chen, *Plos One*, 2011, e25712;
4. B. Sendid, P. Ducoroy, N. Fran ois, G. Lucchi, S. Spinali, O. Vagner, S. Damiens, A. Bonnin, D. Poulain, F. Dalle, *Med. Mycol.*, 2013, 51, 25-32;
5. Q. T. Chao, T. F. Lee, S. H. Teng, L. Y. Peng, P. H. Chen, L. J. Teng, P. R. Hsueh, *Plos One*, 2014, e109376.

KONTAKT

Małgorzata Głowacka-Twardokęs
Kierownik Laboratorium Mikrobiologii

K: +48 502 085 815

E: malgorzata.glowacka.twardokes@jci.pl

Jagiellońskie Centrum Innowacji Sp. z o.o.
ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków

Projekt został zrealizowany w ramach programu
Krajowy Naukowy O rodek Wiodący (KNOW)



Treść niniejszej noty jest rozpowszechniana na
licencji Creative Commons Użycie niekomercyjne
– Bez Utworów Zależnych 4.0 (CC BY-NC-ND 4.0)
[https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/
legalcode.pl](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode.pl)

Listopad 2018 r.