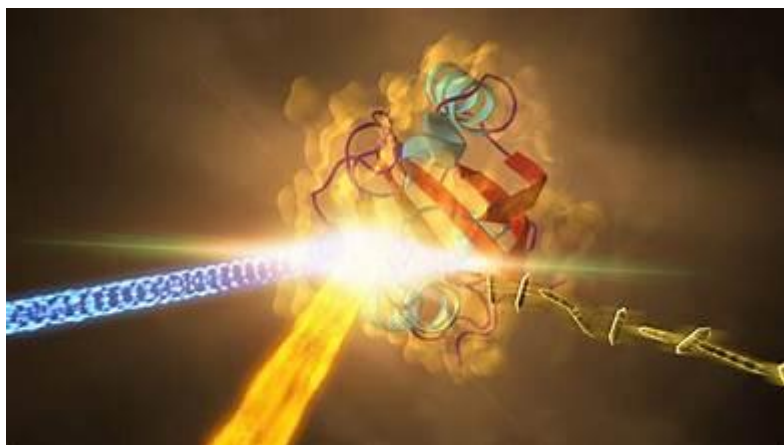




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ

**ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ MALDI-TOF ΚΑΙ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟ
ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ**

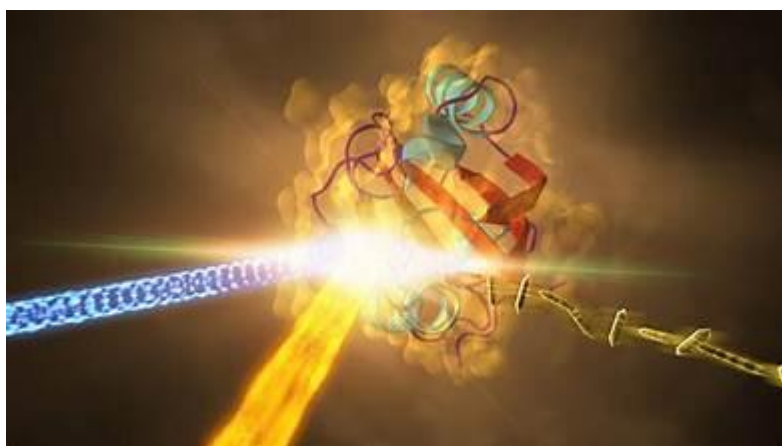


ΑΦΡΟΔΙΤΗ Β. ΗΛΙΑ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ
2025



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ MALDI-TOF ΚΑΙ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟ
ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ**



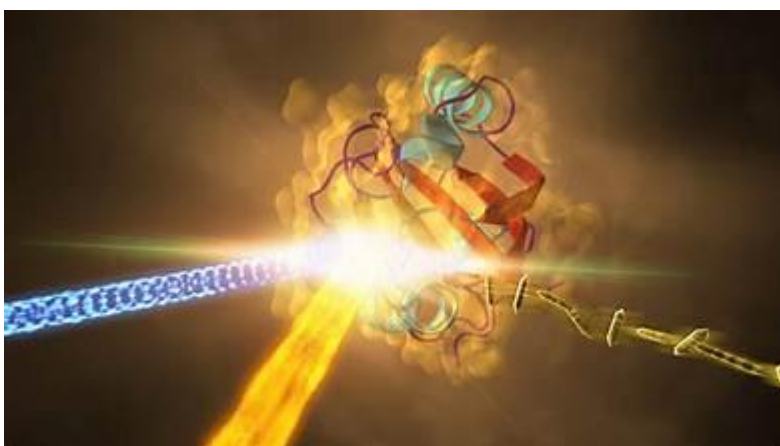
ΑΦΡΟΔΙΤΗ Β. ΗΛΙΑ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια
ΓΚΑΡΤΖΟΝΙΚΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ



POSTGRADUATE THESIS

**MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY FOR
IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL
RESISTANCE OF ENTEROBACTERALES**



AFRODITI V. ILIA

Supervisor

GARTZONIKA KONSTANTINA

Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μέλη

1. Βρυώνη Γεωργία, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ
2. Μποζίδης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

2025

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες» και κατεύθυνση την Εφαρμοσμένη Βιοϊατρική. Υπεύθυνη καθηγήτρια, που έχει αναλάβει την επίβλεψη της εργασίας, είναι η κα. Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Επίσης, τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής είναι η κα. Βρυώνη Γεωργία, Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) και ο κ. Μποζίδης Πέτρος, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η παρούσα διατριβή πραγματεύεται τη μελέτη της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF και τις εφαρμογές της στην ταυτοποίηση και στον έλεγχο της αντοχής των Εντεροβακτηριοειδών. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις δυνατότητες της μεθόδου ως εργαλείο μικροβιολογικής διάγνωσης και επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, υπεύθυνη καθηγήτρια μου, που με εμπιστεύτηκε εξ' αρχής και μου ανέθεσε το συγκεκριμένο θέμα και που καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής μου πρόσφερε σημαντική επιστημονική καθοδήγηση, κατανόηση και συμπαράσταση. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την κα. Βεζυράκη Πατρώνα, Ομότιμη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τέλος, ευχαριστώ την κα. Νάκα Κατερίνα, Καθηγήτρια Καρδιολογίας και Διευθύντρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες» για την στήριξη και την κατανόηση που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου, καθώς και όλους τους υπόλοιπους καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, την κα. Βρυώνη Γεωργία, Καθηγήτρια και τον κ. Μποζίδη Πέτρο, Επίκουρο Καθηγητή, για την πολύτιμη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Ξανθούλα και Βασίλη και στον αδερφό μου Θωμά, που στάθηκαν στο πλευρό μου και πίστεψαν σε μένα, από την έναρξη των μεταπτυχιακών σπουδών έως και το τέλος τους.

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	18
2. Αρχή Μεθόδου Φασματομετρίας.....	20
2.1 Φασματομετρία Μάζας.....	20
2.2 Εκρόφηση με Laser (Laser Desorption).....	22
2.3 MALDI MS.....	23
2.4 MALDI-TOF MS.....	24
2.4.1 Μηχανισμός Ιονισμού.....	26
2.4.2 Μηχανισμός TOF (Time of Flight).....	28
2.4.3 Είδη Laser.....	29
2.4.4 Μήτρα (matrix) - Χαρακτηριστικά, Είδη Μήτρας, Περιορισμοί.....	30
2.4.5 Συστήματα MALDI-TOF MS.....	33
3. Προετοιμασία και Διαχείριση Δείγματος προς Ανάλυση.....	35
3.1 Πρωτόκολλο Άμεσης Εφαρμογής του Δείγματος στον Αναλυτή.....	36
3.2 Επί-Στόχου Εκχύλιση.....	37
3.3 Πλήρης Διαδικασία Εκχύλισης.....	38
4. Εντεροβακτηριακά - Εντεροβακτηριοειδή.....	40
4.1 Μηχανισμοί Αντοχής Εντεροβακτηριακών.....	41
4.1.1 Παραγωγή Καρβαπενεμασών.....	42
4.1.1.1 β-λακταμάσες Τάξης A.....	43
4.1.1.2 β-λακταμάσες Τάξης B.....	44
4.1.1.3 β-λακταμάσες Τάξης C.....	45
4.1.1.4 β-λακταμάσες Τάξης D.....	46

4.1.2 Τροποποίηση Διαπερατότητας Εξωτερικής Μεμβράνης - Αναστολή ή Τροποποίηση Πρωτεϊνών Μεμβράνης.....	46
4.1.3 Υπερέκφραση Αντλιών Εκροής (Efflux Pumps).....	47
4.1.4 Μεταβολές στις Πενικιλινοδεσμευτικές Πρωτεΐνες (PBPs).....	48
4.1.5 Τροποποίηση Σύνθεσης Βιοϋμενίου (biofilm).....	48
4.2 Τρόποι Απόκτησης και Μεταφοράς Αντοχής.....	48
4.2.1 Κάθετη Μεταφορά.....	48
4.2.2 Οριζόντια Μεταφορά.....	49
4.2.2.1 Σύζευξη.....	50
4.2.2.2 Μετασχηματισμός.....	51
4.2.2.3 Μεταγωγή.....	51
5. Εφαρμογές MALDI-TOF MS.....	53
5.1 Ταυτοποίηση Βακτηρίων και Μυκήτων.....	54
5.2 Ταυτοποίηση Αναερόβιων Βακτηρίων.....	56
5.3 Ταυτοποίηση Πρωτεϊνών.....	57
6. Ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών από Απομονωθέν Στέλεχος.....	58
6.1 Προετοιμασία Δείγματος.....	58
6.1.1 Αξιοπιστία Μεθόδου.....	58
6.1.2 Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί Μεθόδου.....	59
7. Ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών από Κλινικό Δείγμα.....	59
7.1 Άμεση Ταυτοποίηση από Δείγμα Ούρων.....	59
7.1.1 Επεξεργασία Δείγματος Ούρων.....	60
7.1.2 Αξιολόγηση MALDI-TOF MS στην Άμεση Ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών από Δείγματα Ούρων.....	62
7.1.3 Περιορισμοί Ταυτοποίησης Εντεροβακτηριοειδών σε Δείγματα Ούρων.....	63

7.2 Άμεση Ταυτοποίηση από Θετική Αιμοκαλλιέργεια.....	64
7.2.1 Επεξεργασία Δείγματος Θετικής Αιμοκαλλιέργειας.....	65
7.2.1.1 Ταυτοποίηση Θετικής Αιμοκαλλιέργειας μετά από Ανακαλλιέργεια.....	65
7.2.1.2 Ταυτοποίηση Θετικής Αιμοκαλλιέργειας μέσω Εμπορικά Διαθέσιμων Μεθοδολογιών MALDI-TOF.....	66
7.2.1.3 Ταυτοποίηση Θετικής Αιμοκαλλιέργειας μέσω in-house Μεθόδου.....	67
7.2.2 Αξιολόγηση MALDI-TOF MS στην Άμεση Ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών από Θετική Αιμοκαλλιέργεια.....	68
7.2.3 Περιορισμοί Ταυτοποίησης Εντεροβακτηριοειδών από Θετική Αιμοκαλλιέργεια.....	70
7.3 Εφαρμογή και Αξιολόγηση της MALDI-TOF MS στην Άμεση Ταυτοποίηση από Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό.....	70
7.3.1 Επεξεργασία Δείγματος ENY.....	72
8. MALDI-TOF MS και Έλεγχος Αντιμικροβιακής Αντοχής.....	73
8.1 Ανίχνευση Δραστικότητας β-λακταμάσης.....	78
8.1.1 Περιορισμοί Ανίχνευσης Δραστικότητας β-λακταμασών.....	81
8.2 Ανίχνευση Πορινών.....	82
9. Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί MALDI-TOF MS.....	83
Συμπέρασμα.....	86
Περίληψη.....	88
Abstract.....	89
Συντομεύσεις.....	90
Βιβλιογραφία.....	91

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1. Πρωτότυπος αναλυτής φασματομετρίας μάζας του Aston.....	20
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του 1 ^{ου} linear MALDI-TOF.....	25
Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση ήπιου ιονισμού δείγματος.....	27
Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση μηχανισμού TOF.....	29
Εικόνα 5. Μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων.....	36
Εικόνα 6. Οικογένεια Εντεροβακτηριοειδών.....	40
Εικόνα 7. Κύριοι μηχανισμοί αντοχής στα αντιμικροβιακά, συμπεριλαμβανομένης της αντοχής στις καρβαπενέμες, στα Enterobacteriaceae.....	42
Εικόνα 8. Εγγενείς και επίκτητες β-λακταμάσες στα Εντεροβακτηριοειδή.....	43
Εικόνα 9: Παγκόσμια κατανομή των MBLs.....	45
Εικόνα 10. Λειτουργία αντλίας εκροής εντεροβακτηριοειδών.....	47
Εικόνα 11. Κάθετη μεταφορά γενετικού υλικού σε βακτήρια.....	49
Εικόνα 12. Κινητά γενετικά στοιχεία και οι κύριοι μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων.....	50
Εικόνα 13. Παρουσίαση μεθόδων επεξεργασίας του υπό μελέτη δείγματος, Α) απευθείας τοποθέτηση δείγματος στην πλάκα-στόχο και Β) επεξεργασία δείγματος πριν την τοποθέτηση στην πλάκα-στόχο του αναλυτή.....	61
Εικόνα 14. Μεθοδολογία επεξεργασίας δείγματος μετά από θετική αιμοκαλλιέργεια.....	66
Εικόνα 15. Ανάλυση φάσματος (m/z) <i>E. coli</i>	69
Εικόνα 16. Ανάλυση φάσματος (m/z) <i>K. pneumoniae</i>	70
Εικόνα 17. Φάσμα MALDI-TOF MS δείγματος εγκεφαλονωτιαίου υγρού από ασθενή με βακτηριακή μηνιγγίτιδα.....	72
Εικόνα 18. Παραδείγματα φασμάτων μάζας MALDI TOF MS.....	76
Εικόνα 19. Ανάλυση φάσματος (m/z) <i>K. pneumoniae</i>	80

Εικόνα 20. Προσεγγίσεις MALDI-TOF MS για αντιμικροβιακή αντοχή.....	82
---	----

Πίνακες

Πίνακας 1.Είδη μήτρας και εφαρμογές τους (matrix).....	32
Πίνακας 2. Γένη & Είδη Εντεροβακτηριακών που αποικίζουν τον άνθρωπο ή σχετίζονται με λοιμώξεις που προκαλούν σε αυτόν.....	41
Πίνακας 3. Μελέτες αναφοράς ταυτοποίησης Εντεροβακτηριοειδών σε δείγμα ούρων μέσω MALDI-TOF MS.....	63
Πίνακας 4. Βαθμολογίες Ταυτοποίησης MALDI-TOF MS.....	68
Πίνακας 5. Σύγκριση μεθόδων ταυτοποίησης, παρουσίαση πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων.....	85

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Η ταχεία εξάπλωση πολυανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, ειδικότερα σε δομές πρωτοβάθμιας υγείας, έχει οδηγήσει στην επιτακτική ανάγκη ανάπτυξης νέων και αξιόπιστων μεθόδων, τόσο σε επίπεδο ταυτοποίησης αυτών, όσο και στην ανίχνευση της αντοχής, οι οποίες θα δίνουν ταχύτερα αποτελέσματα (Palacios-Baena et al., 2017). Μέχρι πρόσφατα, οι φαινοτυπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ταυτοποίηση των βακτηρίων βασίζονται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά και τις βιοχημικές τους ιδιότητες και απαιτούν τουλάχιστον 3 έως 5 ημέρες μέχρι την ολοκλήρωσή τους (Porovic et al., 2017). Στη συνέχεια, μια σειρά από μοριακές μεθόδους, όπως η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR ή rt-PCR), η ανάλυση της 16S rRNA και ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε γουανίνη-κυτοσίνη (G-C), αντικατέστησαν σε μεγάλο βαθμό τις συμβατικές διαγνωστικές προσεγγίσεις (Feucherolles, 2022). Μερικές από τις μοριακές τεχνικές δεν απαιτούν βακτηριακές καλλιέργειες, ωστόσο οι μέθοδοι αυτές είναι δαπανηρές, χρονοβόρες και στις περισσότερες των περιπτώσεων απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό (Braga et al., 2013).

Η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry), είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος, που παρέχει με αξιοπιστία, ταχύτητα και χαμηλό κόστος, την ταυτοποίηση των βακτηρίων, για την οποία χρειάζονται μόνο λίγα λεπτά (Fenselau, 2012). Παρόλ'αυτά, η ακρίβεια και η εξειδίκευση της ταυτοποίησης με MALDI-TOF MS εξαρτώνται σε ένα μεγάλο βαθμό από το βακτηριακό είδος που αναλύεται ή/και από το φάσμα μάζας του αναλυόμενου δείγματος (van Belkum et al., 2017).

Παρά το γεγονός ότι η μεθοδολογία της φασματομετρίας μάζας αναπτύχθηκε στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, χρησιμοποιήθηκε αρχικά μόνο για τη μέτρηση μάζας των ατόμων. Το 1975, δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά αναφορά, στην οποία παρουσιάστηκε η ταυτοποίηση των βακτηρίων μέσω φασματομετρίας μάζας (Anhalt and Fenselau, 1975). Παρ' όλα αυτά, όταν εμφανίστηκε η μέθοδος MALDI, τη δεκαετία του '80, βελτίωσε τη χρηστικότητα της φασματομετρίας μάζας σε βιολογικά μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες (Cain et al., 1994). Σχεδόν δέκα χρόνια αργότερα, το 1988, οι Tanaka et al., προχώρησαν σε ιονισμό πρωτεϊνών χωρίς την καταστροφή ή τον κατακερματισμό τους (Tanaka et al., 1988). Τα έτη 1994 και 1996, αποτέλεσαν ορόσημο για τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF, διότι επιτεύχθηκε

για πρώτη φορά η μελέτη ακέραιων βακτηριακών κυττάρων, χωρίς να προηγηθεί ειδική προετοιμασία των δειγμάτων (Cain et al., 1994; Holland et al., 1996; Claydon et al., 1996). Παρά την πληθώρα πλεονεκτημάτων της μεθόδου, η εισαγωγή της σε μικροβιολογικά εργαστήρια έγινε σχεδόν μια δεκαετία αργότερα, από την αρχική εφαρμογή της στην ταυτοποίηση βακτηρίων και τα αποτελέσματα από τα ερευνητικά στάδια δεν έγιναν κλινικά εφαρμόσιμα μέχρι αρκετά χρόνια αργότερα (Seng et al., 2009; Tsuchida and Nakayama, 2022). Χρειάστηκε χρόνος για να μετατραπουν τα εργαστηριακά ερευνητικά δεδομένα και να προσαρμοστούν σε κλινικές εφαρμογές, όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι οι πρωτογενείς πληροφορίες από το εργαστήριο ήταν διαθέσιμες μόλις το 2009. Υπάρχουν διάφορες αιτίες για αυτή την προφανή καθυστέρηση, οι οποίες περιλαμβάνουν: (1) την ανησυχία ότι η πρωτεΐνη μεταβάλλεται προσαρμοστικά in-vivo και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες καλλιέργειας, (2) την αβεβαιότητα σχετικά με το κατά πόσο οι αποκλίσεις στα φάσματα MS είναι απολύτως συμβατές με τις επί του παρόντος γνωστές κατηγοριοποιήσεις, (3) την πλήρη απουσία μιας βάσης δεδομένων μοριακών βαρών (MB), (4) την πραγματικότητα ότι, από την άποψη του βακτηριολόγου, ο μικροβιολογικός χαρακτηρισμός είναι ένα δύσκολο έργο που απαιτεί ένα ορισμένο επίπεδο προετοιμασίας στην μικροβιολογία (σε αντίθεση με τις εφαρμογές) (Tsuchida and Nakayama, 2022). Τέλος, μετά το 2009 και έπειτα από πολλές ερευνητικές μελέτες, η τεχνολογία MALDI-TOF MS (Mass Spectrometry) εξελίχθηκε τόσο ώστε να επιτρέπει την άμεση ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών σε κλινικά δείγματα, χωρίς την ανάγκη αρχικής καλλιέργειας ή ανακαλλιέργειας (Seng et al., 2009; Scott et al., 2016).



Εικόνα 1. Πρωτότυπος αναλυτής φασματομετρίας μάζας του Aston (Sutton, 2022)

2. Αρχή Μεθόδου Φασματομετρίας

2.1 Φασματομετρία Μάζας

Η φασματομετρία μάζας ανήκει στις αναλυτικές μεθόδους, όπου οι χημικές ενώσεις ιονίζονται σε φορτισμένα μόρια, και έπειτα παρουσιάζεται η αναλογία μάζας προς το φορτίο τους (m/z) [$m/z = 2eV(t/L)$], ώστε στη συνέχεια να υπολογιστεί το ακριβές μοριακό τους βάρος (Griffiths, 2008). Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές του 19^{ου} αιώνα, ωστόσο το πεδίο εφαρμογής της ήταν περιορισμένο στις χημικές επιστήμες (Singhal et al., 2016). Οι παλαιότερες (συμβατικές) τεχνικές φασματομετρίας μάζας πραγματοποιούνταν μέσω του ιονισμού, με βομβαρδισμό του υπό ανάλυση δείγματος με δέσμες ηλεκτρονίων. Αυτή η μέθοδος ιονισμού συνήθως έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του δείγματος σε χιλιάδες φορτισμένα θραύσματα (Kumar, 2008). Τα μόρια του υπό ανάλυση δείγματος ταυτοποιούνται στη συνέχεια με τη συσχέτιση των γνωστών μαζών με τα προκύπτοντα πρότυπα των θραυσμάτων. Αν και οι συμβατικές τεχνικές

φασματομετρίας μάζας ήταν αρκετά διαδεδομένες και εφαρμόσιμες σε πολλούς διαφορετικούς τομείς της έρευνας, είχαν το μειονέκτημα ότι μπορούσαν να προκαλούν μόνο «σκληρό ιονισμό» (hard ionization). Ως εκ τούτου, δεν υπήρχε διαθέσιμη τεχνική για τη διατήρηση της ακεραιότητας των μορίων κατά τη διάρκεια του ιονισμού ή για την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας του κατακερματισμού τους (Kumar, 2008). Το 1985, η τεχνική του «ήπιου-απαλού ιονισμού» (soft ionization), που επιτρέπει τον ιονισμό και την εξάτμιση μεγάλων, μη πτητικών βιομορίων, όπως οι αέριες πρωτεΐνες, καθιερώθηκε από δύο Γερμανούς επιστήμονες, τους Hillenkamp και Karas (Khademhosseini et al., 2006). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές ανακάλυψαν ότι το αμινοξύ αλανίνη μπορούσε εύκολα να ιονιστεί όταν αναμιγνυόταν με το αμινοξύ τρυπτοφάνη και ακτινοβολούνταν από λέιζερ μήκους 266 nm. Διαπιστώθηκε επίσης, ότι και άλλοι τύποι πεπτιδίων θα μπορούσαν να ιονιστούν μετά από ανάμειξη με το ίδιο είδος "μήτρας" (matrix) (Djordjevic et al., 2011). Η επιτυχία της φασματομετρίας μάζας, οφείλεται λοιπόν στις πολυάριθμες σημαντικές ανακαλύψεις, συμπεριλαμβανομένων του «ιονισμού ηλεκτροψεκασμού» (electrospray ionization) από τον John Fenn και του MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) από τον Koichi Tanaka (Tanaka et al., 1988; Fenn et al., 1989).

Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, παρουσιάστηκε η πρωτοπόρος εφαρμογή της φασματομετρίας μάζας στον τομέα της μικροβιολογίας (Griffiths, 2008). Το πρώτο βήμα στη φασματομετρική ανάλυση μαζών των ενώσεων είναι η παραγωγή ιόντων της ένωσης σε αέρια φάση, για παράδειγμα με ιονισμό ηλεκτρονίων. Αυτό το μοριακό ιόν υπόκειται κανονικά σε κατακερματισμό. Επειδή είναι κατιόν με περιττό αριθμό ηλεκτρονίων, μπορεί να κατακερματιστεί δίνοντας είτε μια ρίζα είτε ένα ιόν με ζυγό αριθμό ηλεκτρονίων, είτε ένα μόριο και ένα νέο κατιόν. Αυτοί οι δύο τύποι ιόντων έχουν διαφορετικές χημικές ιδιότητες. Κάθε πρωτογενές ιόν προϊόντος που προέρχεται από το μοριακό ιόν μπορεί, με τη σειρά του, να υποστεί κατακερματισμό (Cooks and Rockwood, 1991). Όλα αυτά τα ιόντα διαχωρίζονται στο φασματομέτρο μάζας ανάλογα με τον λόγο μάζας προς το φορτίο τους. Έτσι παράγεται το φάσμα μάζας του μορίου. Το αποτέλεσμα αυτού παρουσιάζεται ως διάγραμμα της αφθονίας ιόντων σε σχέση με το λόγο μάζας προς φορτίο. Σε κάθε παρουσίαση, η πιο έντονη κορυφή ονομάζεται βασική κορυφή και της αποδίδεται αυθαίρετα η σχετική αφθονία 100 % (Solouki et al., 1995; Morris et al., 1997). Οι αφθονίες όλων των άλλων κορυφών λαμβάνουν τις ανάλογες τιμές τους, ως ποσοστά της βασικής κορυφής. Σε πολλές επιστημονικές δημοσιεύσεις αναφέρεται ο άξονας y του φάσματος μάζας ως

αριθμός ιόντων ή σχετική ένταση. Όμως, ο όρος σχετική αφθονία είναι προτιμότερο να χρησιμοποιείται για την αναφορά στον αριθμό των ιόντων στο φάσμα μάζας. Τα περισσότερα από τα θετικά ιόντα έχουν φορτίο που αντιστοιχεί στην απώλεια ενός μόνο ηλεκτρονίου (Chen et al., 1995). Για τα μεγάλα μόρια, μπορούν επίσης να ληφθούν πολλαπλά φορτισμένα ιόντα. Το συνολικό φορτίο των ιόντων αντιπροσωπεύεται από τη σχέση q , το φορτίο των ηλεκτρονίων e και τον αριθμό των φορτίων των ιόντων z και από εκεί προκύπτει η εξίσωση $q = ze$. Ο άξονας x του φάσματος μάζας που αντιπροσωπεύει τον λόγο μάζας προς φορτίο συνήθως χαρακτηρίζεται ως m/z . Όταν το m δίνεται ως η σχετική μάζα και το z ως ο αριθμός φορτίου, τα οποία είναι και τα δύο χωρίς μονάδες, το m/z χρησιμοποιείται για να δηλώσει μια ποσότητα χωρίς διαστάσεις. Γενικά, στη φασματομετρία μάζας, το φορτίο αναφέρεται σε πολλαπλάσια του στοιχειώδους φορτίου ή του φορτίου ενός ηλεκτρονίου σε απόλυτη τιμή ($1 e = 1,602\ 177 \times 10^{-19} C$) και η μάζα αναφέρεται σε μονάδες ατομικής μάζας ($1 u = 1,660\ 540 \times 10^{-27} kg$). Οι μονάδες ατομικής μάζας (MB) u (atomic mass unit ή amu) ή Da (Dalton) έχουν τον ίδιο θεμελιώδη ορισμό: $1 u = 1 Da = 1.660\ 540 \times 10^{-27} kg \pm 0.59\ ppm$. Ωστόσο, χρησιμοποιούνται σε διαφορετικά πλαίσια. Όταν για παράδειγμα πρόκειται για μέσες ισοτοπικές μάζες, όπως στους στοιχειομετρικούς υπολογισμούς, προτιμάται το Da (Dalton) στη φασματομετρία μαζών, ενώ όταν χρησιμοποιούνται μάζες που αναφέρονται στο κύριο ισότοπο του κάθε στοιχείου τότε προτιμάται οι ατομικές μάζες να εκφράζονται σε u (atomic mass unit ή amu) (Naylor and Kumar, 2003, Villas-Boas et al., 2005).

2.2 Εκρόφηση με Laser (Laser Desorption)

Ο ιοντισμός εκρόφησης με λέιζερ (Laser Desorption-LD) είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την παραγωγή αέριων ιόντων. Οι παλμοί λέιζερ που αποδίδουν από 10^6 έως $10^{10} W$ ανά τετραγωνικό εκατοστό (cm^2) εστιάζουν σε επιφάνεια δείγματος περίπου $10^{-3} - 10^{-4} cm^2$. Αυτοί οι παλμοί λέιζερ αφαιρούν υλικό από την επιφάνεια και δημιουργούν μια δέσμη ιόντων και ουδέτερων μορίων που μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους στην πυκνή φάση ατμών κοντά στην επιφάνεια του δείγματος. Οι ακτίνες παλμικού λέιζερ πραγματοποιούν τόσο την εξάτμιση, όσο και τον ιονισμό του δείγματος. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται στη μελέτη επιφανειών και στην ανάλυση της σύνθεσης δειγμάτων, όπως τα κυτταρικά οργανίδια.

Συνήθως, επιτρέπει τον επιλεκτικό ιονισμό με τη ρύθμιση του μήκους κύματος του λέιζερ. Ωστόσο, στους περισσότερους συμβατικούς υπέρυθρους τρόπους, το λέιζερ δημιουργεί μια θερμική αιχμή και, επομένως, δεν είναι απαραίτητο να προσαρμοστεί το μήκος κύματός του σύμφωνα με το δείγμα. Δεδομένου ότι τα σήματα είναι πολύ σύντομα, απαιτούνται αναλυτές ταυτόχρονης ανίχνευσης ή αναλυτές χρόνου πτήσης (Time of flight-TOF). Η λήψη αξιόπιστου φάσματος μάζας εξαρτάται κρίσιμα από τις ειδικές φυσικές ιδιότητες του δείγματος προς μελέτη (π.χ. φωτοαπορρόφηση, πτητικότητα κ.λπ.). Επιπλέον, τα παραγόμενα ιόντα είναι πάντα προϊόντα κατακερματισμού του αρχικού μορίου, εάν το μοριακό βάρος (MB) του είναι πάνω από περίπου 500 Da. Η κατάσταση αυτή άλλαξε θεαματικά με την ανάπτυξη του ιονισμού εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενο από μήτρα (MALDI) (Karas and Hillenkamp, 1988; Hillenkamp et al., 1990).

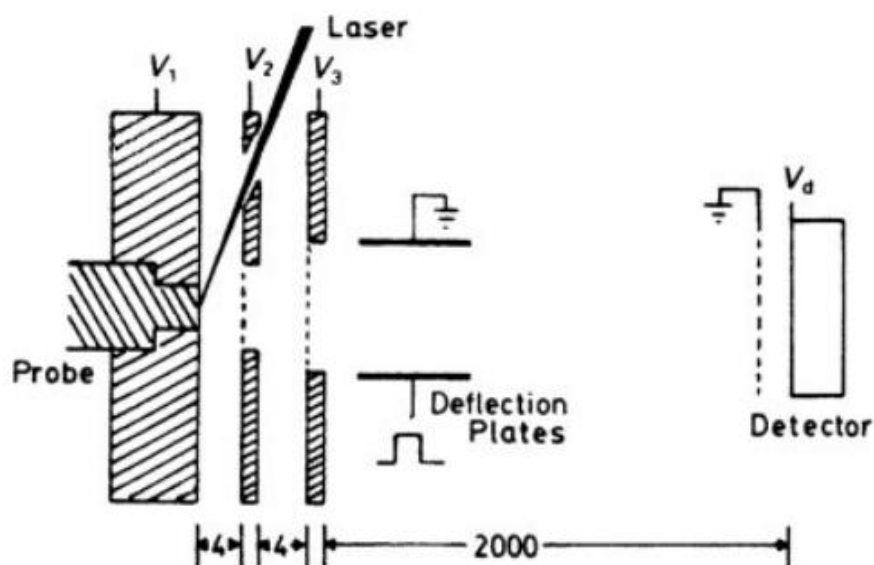
2.3 MALDI MS

Η μεθοδολογία MALDI είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της μάζας πρωτεϊνών, πεπτιδίων ή πολυμερών, σακχάρων, μεγάλων οργανικών μορίων και άλλων μακρομορίων (Karas and Hillenkamp, 1998). Ιδιαίτερα οι πρωτεϊνικές μάζες που αποτελούν την ταυτότητα των πρωτεϊνών συμβάλλουν στην εξέλιξη του τομέα της πρωτεομικής (proteomics). Η προετοιμασία του δείγματος, το οποίο θα μελετηθεί μέσω της μεθόδου φασματομετρίας MALDI είναι σχετικά γρήγορη και εύκολη, όπου αρχικά το δείγμα καλύπτεται με ειδικό διάλυμα που ονομάζεται matrix, το οποίο κρυσταλλοποιείται μαζί με το δείγμα. Η μέθοδος MALDI αποτελεί την πρώτη επιλογή όταν πρόκειται για τη μελέτη πρωτεϊνών, δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες, τα πεπτίδια και τα πολυμερή είναι εύθραυστα και τείνουν να κατακερματίζονται όταν ιονίζονται με άλλες τεχνικές ιονισμού, όπως ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (Patterson and Aebersold, 1995). Οι πολύτιμες πληροφορίες που μπορούν να αντληθούν από αυτή την ταχεία αναλυτική τεχνική επιτρέπουν στους ερευνητές την κατανόηση των διαφορών υλικών. Επίσης, παρέχει βασικές πληροφορίες που αφορούν σημαντικές παραμέτρους, όπως το MB και η πολυπλοκότητα της ουσίας, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για ποικίλες εφαρμογές, όπως για τη μελέτη των μονοπατιών σύνθεσης, για την επιβεβαίωση των μηχανισμών αποικοδόμησης, για τη μέτρηση των

πρόσθετων και των προσμίξεων, για τις συνθέσεις των προϊόντων και για την ταυτοποίηση της σύνθεσης του υπό ανάλυση δείγματος (Hosseini et al, 2017).

2.4 MALDI-TOF MS

Στην αρχική εργασία των Karas και Hilenkamp χρησιμοποιήθηκε ένας αντανakλαστικός αναλυτής με στατικά ηλεκτρικά πεδία (Karas and Hilenkamp, 1988). Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, στο Bordeaux, στο Διεθνές Συνέδριο Φασματομετρίας Μάζας το 1988 σηματοδότησαν την αρχή μιας νέας εποχής στην μεθοδολογία TOF-MS (Time of flight mass spectrometry) (Hillenkamp, 1989). Το φάσμα που ελήφθη από β-γαλακτοσιδάση (MB=116.900) αποτέλεσε το πρώτο φάσμα μάζας ενός μορίου με μάζα μεγαλύτερη από 100.000Da και που εμφανίζει μονό φορτισμένα μοριακά ιόντα. Η διακριτική ικανότητα που επιτεύχθηκε σε αυτή την αρχική εργασία ήταν μάλλον χαμηλή και γρήγορα έγινε αντιληπτό ότι ο κύριος περιορισμός οφειλόταν στον κατακερματισμό των ιόντων κατά την πτήση (Time of flight). Μέσα σε λίγους μήνες, μετά την ανακάλυψη του MALDI κατασκευάστηκε το πρώτο φασματόμετρο μάζας MALDI-TOF για υψηλό λόγο m/z από τους Beavis και Chait (Beavis and Chait, 1989a; Beavis and Chait, 1989b; Beavis and Chait, 1989c). Πρόκειται για ένα απλό γραμμικό TOF με στατικό ενιαίο πεδίο πηγής, σωλήνα ολίσθησης και ανιχνευτή (Εικόνα 2). Το όργανο αυτό λειτουργούσε σε τάσεις επιτάχυνσης έως και 30 kV με μια περιοχή 2m και ένα πεδίο επιτάχυνσης όσο το δυνατόν μικρότερο (10mm) χωρίς να προκληθεί ηλεκτρική εκκένωση (Vestal and Hayden, 2007).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του 1^{ου} linear MALDI-TOF (Beavis and Chait, 1989b)

Τέσσερις δεκαετίες πριν από τη δημιουργία του MALDI, στα τέλη της δεκαετίας του 1950, η τεχνολογία του χρόνου της πτήσης (TOF) είχε ήδη εφευρεθεί και αφορούσε μια τεχνική κατά την οποία φορτισμένα ιόντα «αναγκάζονταν» να μετακινηθούν από μια πηγή στον ανιχνευτή, ώστε να μπορέσουν να ταυτοποιηθούν με βάση το χρόνο της πτήσης τους προς τον ανιχνευτή ιόντων. Όμως η μέθοδος TOF, δεν παρουσίαζε αυτούσια ικανοποιητικά αποτελέσματα και δεν βρήκε εφαρμογή στις τεχνικές φασματομετρίας μάζας. Έπειτα από μια μεγάλη περίοδο, έγινε αντιληπτό ότι ο συνδυασμός της τεχνολογίας MALDI-MS και της τεχνολογίας TOF θα μπορούσε να οδηγήσει σε μια ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική που σήμερα γνωρίζουμε ως MALDI-TOF-MS και η εφαρμογή της να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάλυση δειγμάτων (Tran et al., 2015; Hosseini et al., 2017).

Ειδικότερα η MALDI-TOF-MS είναι μια σημαντική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό βιομορίων και μακρομορίων βιολογικής προέλευσης. Αυτή η στρατηγική, βασίζεται στην ανάλυση χαρακτηριστικών προφίλ πεπτιδίων και πρωτεϊνών βακτηριακής ή μυκητιασικής προέλευσης για την ταυτοποίηση μικροβίων μέσω φασματομετρίας μάζας. Η τεχνική MALDI-TOF MS χρησιμοποιείται επίσης σε τακτική βάση για την ανίχνευση μεταβολών στη νουκλεοτιδική αλληλουχία (π.χ. μεταλλάξεις, πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου,

προσθήκες/διαγραφές), ποσοτικών διαφορών (π.χ. παραλλαγές στον αριθμό αντιγράφων, γονιδιακή έκφραση, έκφραση αλληλίων), καθώς και για την ταυτοποίηση τροποποιήσεων (π.χ. μεθυλίωση του γονιδιώματος, μεταγραφικές τροποποιήσεις tRNA και rRNA). Έτσι, επιτρέπει την ανάλυση θραυσμάτων DNA (δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος) και RNA (ριβονουκλεϊκού οξέος) με υψηλή ταχύτητα, ακρίβεια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κλινική διάγνωση λόγω της ευαισθησίας και των χαρακτηριστικών μέτρησης που παρουσιάζει. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα είναι ότι επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων (Duncan, 2016). Εκτός από αυτό το χαρακτηριστικό που έχει μεγάλη σημασία για τις αναλύσεις γονοτύπων, υπάρχει και η δυνατότητα μελέτης της γονιδιακής έκφρασης των επιγενετικών. Σημαντικό επίσης να αναφερθεί, είναι πως επιτυγχάνει την ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού μορίων DNA / γονιδιακών περιοχών σε μία μόνο αντίδραση με πολύ μικρό όγκο δείγματος, περίπου τα 15ml. Τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα μειώνουν το κόστος της έρευνας, όπως επίσης επιτρέπουν και την εξοικονόμηση χρόνου (Ng, 2013). Μία από τις σημαντικότερες αναλυτικές εφαρμογές της μεθόδου MALDI-TOF-MS είναι η αποτύπωση μάζας πεπτιδίων. Έχει συχνά αναφερθεί η χρησιμότητα της μεθόδου όσον αφορά την ταυτοποίηση αλληλουχίας αμινοξέων των πεπτιδίων με στόχο την αποσύνθεση μετά την υψηλή ενέργεια διάσπασης που προκαλείται από τη σύγκρουση (Tajiri et al., 2009).

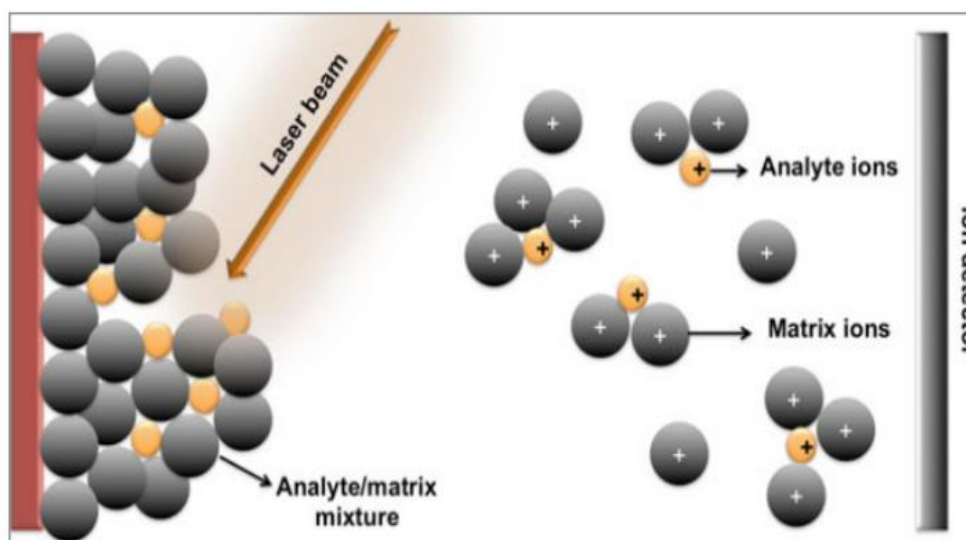
Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από i) μία πηγή ιόντων, η οποία θα ιονίσει και θα μεταφέρει τα ιονισμένα μόρια του δείγματος στην αέρια φάση ii) έναν αναλυτή χρόνου πτήσης iii) έναν αναλυτή μάζας που θα διαχωρίσει τα ιόντα ανάλογα με το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z) και iv) μια συσκευή ανίχνευσης των διαχωρισμένων ιονισμένων μορίων.

2.4.1 Μηχανισμός Ιονισμού

Για πρώτη φορά στην ιστορία των τεχνικών MS, η μεθοδολογία MALDI εισήγαγε τον ήπιο ιονισμό των αναλυόμενων δειγμάτων. Όταν η δέσμη λέιζερ ακτινοβολείται στο σημείο στόχευσης, όπου είναι τοποθετημένο το δείγμα, το παλμικό λέιζερ με στόχο τη μήτρα (και τον ιοντίζοντα παράγοντα σε ορισμένες περιπτώσεις) απορροφά και ιονίζει το υπό εξέταση δείγμα με έμμεσο τρόπο. Ως αποτέλεσμα, μπορεί να παραχθεί ένα ιόν υψηλής μάζας με αυτή την τεχνική (ήπιος

ιονισμός). Για να επιτευχθεί επιτυχής ιονισμός του δείγματος, η επιλεγμένη μήτρα πρέπει να έχει σημαντικό συντελεστή απορρόφησης στο συγκεκριμένο εφαρμοζόμενο μήκος κύματος (Wu and Odom, 1998).

Η μήτρα λειτουργεί αρχικά ως διαχωριστής για τον αναλύτη (δείγμα), καθώς μειώνει τις διαμοριακές δυνάμεις κατά ένα φαινόμενο που ονομάζεται απομόνωση μήτρας (Wu and Odom, 1998). Ως εκ τούτου, αποτρέπει το σχηματισμό συσσωματωμάτων στο εσωτερικό του αναλύτη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Κατά την ακτινοβολήση με λέιζερ, η μήτρα αρχίζει τον πραγματικό της ρόλο στον ήπιο ιονισμό του αναλύτη, ο οποίος είναι η απορρόφηση της πλειονότητας της ενέργειας των φωτονίων. Κατά συνέπεια, η μήτρα διαφυλάσσει το δείγμα από την άμεση ακτινοβολία του λέιζερ. Η απορροφηθείσα ενέργεια οδηγεί στη διέγερση της μήτρας. Μέσω αυτής της διέγερσης, η μήτρα αλλάζει τη φάση από στερεή σε αέρια και ένα πυκνό νέφος αερίου εκλύεται στο θάλαμο κενού. Συνεπώς η μήτρα (matrix) απορροφά ενέργεια από το laser γεγονός που προκαλεί εκρόφηση των βιομορίων του δείγματος, τα οποία στη συνέχεια εξατμίζονται κι ιονίζονται στην αέρια φάση. Το τελικό προϊόν του ιονισμένου αναλύτη σχηματίζεται ως αποτέλεσμα της σύγκρουσης των ουδέτερων μορίων του αναλύτη και των ιόντων της μήτρας (Wu and Odom, 1998).

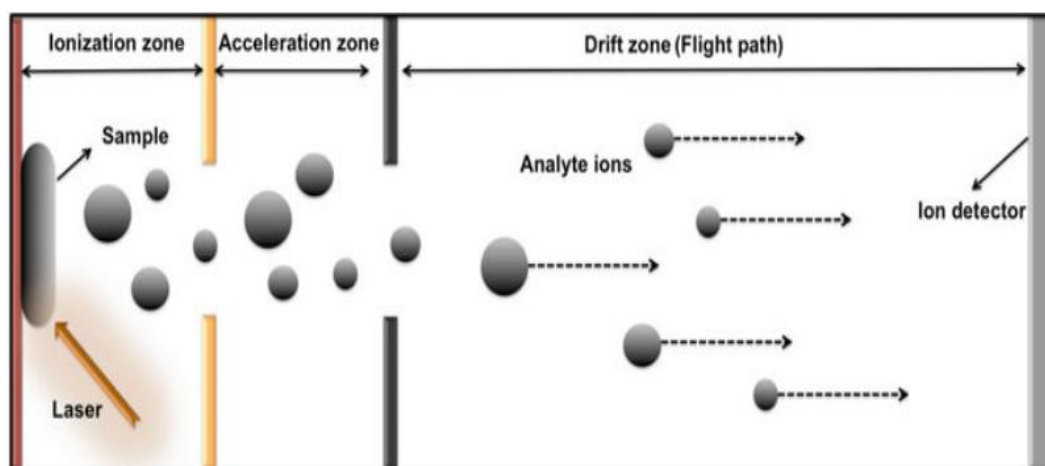


Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση ήπιου ιονισμού δείγματος (Wu and Odom, 1998)

2.4.2 Μηχανισμός TOF (Time of Flight)

Η έννοια των αναλυτών χρόνου πτήσης (TOF) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Stephens το 1946 (Stephens, 1946). Η ανάπτυξη του υποβοηθούμενου από μήτρα ιονισμού με λέιζερ TOF άνοιξε το δρόμο για νέες εφαρμογές όχι μόνο για βιομόρια αλλά και για συνθετικά πολυμερή και συζεύξεις πολυμερών/βιομορίων. Οι αναλυτές TOF μελετήθηκαν από τον Cotter (Cotte, 1999), Guilhaus (Guilhaus, 1995), Mann (Mann et al., 1996), Mamyrin (Mamyrin, 2001) και Weickhardt (Weickhardt et al., 1996). Ο ήπιος ιονισμός των μορίων του αναλύτη πραγματοποιείται με ακτινοβολία λέιζερ, όπως περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα. Αυτά τα ιονισμένα μόρια, που μπορεί να είναι ιόντα μήτρας ή ιονισμένα θραύσματα των μορίων του αναλύτη (δείγματος), επιταχύνονται αρχικά μέσω ενός ηλεκτροστατικού πεδίου και στη συνέχεια παρασύρονται ελεύθερα διαμέσου ενός σωλήνα υπό κενό αέρος (ζώνη ολίσθησης/μετατόπισης), ώστε να καταλήξουν σε έναν ανιχνευτή (Εικόνα 4). Η περιοχή μετατόπισης είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με την περιοχή ιονισμού ή τη ζώνη επιτάχυνσης. Στο τέλος αυτής της διαδρομής πτήσης, ο ανιχνευτής ιόντων, καταγράφει το χρόνο πτήσης και την ένταση των μεμονωμένων ιόντων που φτάνουν σε αυτόν (Ruotolo et al., 2004). Όπως είναι αναμενόμενο, τα ιόντα μορίων με υψηλό MB χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να φθάσουν στον ανιχνευτή, ενώ αυτά με χαμηλό MB διανύουν την ίδια απόσταση σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Με βάση τις πληροφορίες που καταγράφονται από το όργανο, ο λόγος μάζας ανά φορτίο (m/z) μπορεί να προσδιοριστεί προσεκτικά ακολουθώντας την παρακάτω εξίσωση:

- $m/z = 2eE(t/d)^2$. Στην εξίσωση αυτή, m είναι η μάζα του ιονισμένου μορίου και z είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων που έχουν αφαιρεθεί από το μόριο. Το E στην εξίσωση είναι η επιταχυνόμενη τάση, e είναι το στοιχειώδες φορτίο, t είναι ο χρόνος πτήσης και d είναι το μήκος της ζώνης ολίσθησης (Markides and Graslund 2013).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση μηχανισμού TOF (Markides and Graslund, 2013)

2.4.3 Είδη Laser

Μεταξύ των διαφόρων ειδών λέιζερ που χρησιμοποιούνται, τα υπεριώδους ακτινοβολίας λέιζερ (UV, ultraviolet) είναι τα πιο συνηθισμένα λόγω της ευκολίας τους στη λειτουργία και του χαμηλού τους κόστους. Τα λέιζερ N₂ ($\lambda = 337 \text{ nm}$) θεωρούνται ως το πρότυπο, αν και χρησιμοποιούνται επίσης τα λέιζερ Nd:YAG ($\lambda = 266$ ή 355 nm). Στη μεθοδολογία MALDI μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί λέιζερ υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR, infrared radiation), όπως Er:YAG laser ($\lambda = 2,94 \text{ }\mu\text{m}$) ή CO₂ laser ($\lambda = 10,6 \text{ }\mu\text{m}$). Δεν είναι η ισχύς / πυκνότητα που είναι η κύρια παράμετρος για την παραγωγή σημαντικού ρεύματος ιόντων, αλλά η συνολική ενέργεια του παλμικού λέιζερ σε δεδομένο μήκος κύματος (Demirev et al., 1992). Συνολικά, η ποσότητα ισχύος που απαιτείται αντιστοιχεί σε ροή ενέργειας 20 mJ cm^{-2} . Τα πλάτη παλμών των λέιζερ ποικίλλουν από μερικές δεκάδες νανοδευτερόλεπτα έως μερικές εκατοντάδες μικροδευτερόλεπτα. Η διάμετρος της κηλίδας λέιζερ στην επιφάνεια του δείγματος κυμαίνεται από 5 έως $200 \mu\text{m}$. Εξίσου σημαντικός είναι ο προσδιορισμός του κατωφλίου ακτινοβολίας, η ισχύς του παλμού λέιζερ που έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της απορρόφησης της μήτρας. Τα μοριακά είδη του προς ανάλυση δείγματος παρατηρούνται γενικά σε ελαφρώς υψηλότερες ακτινοβολίες αλλά η υψηλότερη ισχύς του λέιζερ οδηγεί σε πιο εκτεταμένο κατακερματισμό και προκαλεί απώλεια μάζας ανάλυσης. Τα φάσματα MALDI που λαμβάνονται με λέιζερ UV ή IR είναι ουσιαστικά πανομοιότυπα για τα περισσότερα αναλυόμενα δείγματα, υπάρχουν βέβαια ελάχιστες, πολύ μικρές διαφορές. Πράγματι, όταν χρησιμοποιείται λέιζερ IR,

παρατηρείται λιγότερης έκτασης κατακερματισμός, υποδεικνύοντας ότι το IR-MALDI είναι σχετικά ψυχρότερο (χαμηλή θερμοκρασία). Από την άλλη πλευρά, το IR-MALDI προκαλεί μεγαλύτερο βάθος εξαέρωσης ανά βολή, το οποίο οδηγεί σε μικρότερο χρόνο ημιζωής του δείγματος. Συγκριτικά με το UV-MALDI, το IR-MALDI παρουσιάζει χαμηλότερη ευαισθησία (Talrose et al., 1999).

1. UV-MALDI: Τα λέιζερ UV είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο λέιζερ στην ανάλυση MALDI. Το UV MALDI εφαρμόζει δέσμη υπεριώδους λέιζερ, όπως τα λέιζερ αζώτου στα 337 nm.
2. IR-MALDI: Αν και η χρήση των υπέρυθρων ακτίνων λέιζερ δεν είναι τόσο συνηθισμένη όπως η UV, βρίσκει την εφαρμογή της καθώς προσφέρει πιο ήπιο ιονισμό. Το IR-MALDI είναι επίσης προτιμητέο όσον αφορά την απομάκρυνση υλικού (στην περίπτωση των βιολογικών εφαρμογών) και κυρίως λόγω της μεγαλύτερης συμβατότητας με άλλα φασματόμετρα μάζας, που ανήκουν στην κατηγορία των τεχνικών εκρόφησης με λέιζερ χωρίς μήτρα (Murray et al., 2011).

2.4.4 Μήτρα (matrix)-Χαρακτηριστικά, Είδη Μήτρας, Περιορισμοί

Η μήτρα ή matrix αφορά την ουσία/ένωση με την οποία αναμιγνύεται το υπό μελέτη δείγμα σε κατάλληλο διαλύτη. Ανάλογα με το είδος του δείγματος και τα μόρια που θα αναλυθούν χρησιμοποιούνται διαφορετικές μήτρες (Πίνακας 1). Ο ρόλος της είναι βοηθητικός, για να ολοκληρωθεί η κρυσταλλοποίηση του δείγματος και προστατευτικός από την δράση του ισχυρού λέιζερ (Yoon and Jeong, 2021).

Το είδος της μήτρας επιλέγεται με βάση την εκπλήρωση του στόχου της, δηλαδή την ικανότητα απορρόφησης υπεριώδους μήκος κύματος συνήθως στα 237nm, τη χαμηλή πτητικότητα και τη μεταφορά πρωτονίων στα μόρια του δείγματος. Για δείγματα πρωτεϊνών, η τυπική μήτρα MALDI αποτελείται από παράγωγα κινναμωμικού οξέος και υδροξυλιωμένου βενζοϊκού οξέος. Το 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ είναι πιο ανεκτικό στις προσμίξεις του δείγματος, επειδή τις αποκλείει κατά τη διαδικασία κρυστάλλωσης (Patterson and Aebersold, 1995).

Η χρήση ειδικά προετοιμασμένων λεπτών στρωμάτων μήτρας συμβάλλει στη ρύθμιση ταχείας εξατμικής, η οποία όχι μόνο βελτιώνει την ευαισθησία και την

ανάλυση, αλλά επιτρέπει επίσης την εκτεταμένη πλύση των δειγμάτων, αφαιρώντας τα άλατα και τα απορρυπαντικά. Δεδομένου ότι η ευαισθησία εξαρτάται από τη συγκέντρωση του δείγματος στην πλάκα-στόχο (target plate), τα δείγματα μπορούν να συμπυκνωθούν χρησιμοποιώντας PR-HPLC (Reversed-phase chromatography) ή συγκέντρωση πεπτιδίων με σφαιρίδια. Στη συγκέντρωση σφαιριδίων-πεπτιδίων προστίθενται RP-χρωματογραφικά σφαιρίδια στα δείγματα πρωτεϊνών ή πεπτιδίων και τα δείγματα αυτά δεσμεύονται κατά προτίμηση στα σφαιρίδια μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ενώ οι προσμίξεις όπως τα άλατα και τα χαοτροπικά, όχι (Vorm et al., 1994).

Για να θεωρηθεί κατάλληλη η μήτρα θα πρέπει να πληροί αρκετές προϋποθέσεις κάποιες από τις οποίες είναι οι εξής: i) να είναι μη πτητικό υλικό με δομή αρωματικού δακτυλίου ώστε να απορροφά την ενέργεια της ακτινοβολίας λέιζερ, ii) να ελαχιστοποιεί τη ζημία του δείγματος κατά τη διαδικασία εξάτμισης (χαμηλότερο βαθμό κατακερματισμού), iii) να έχει χαμηλό βαθμό εξάχνωσης, ώστε να εγγυάται σταθερότητα και iv) να έχει χαμηλή αλληλεπίδραση και μη χημική αλληλεπίδραση (αδρανής) με τα μόρια του αναλύτη (Batoz et al., 2008; Darie-Ion et al., 2022) v) να έχουν ισχυρή οπτική απορρόφηση είτε στην υπεριώδη είτε στην υπέρυθη περιοχή για να απορροφούν την ακτινοβολία λέιζερ γρήγορα και αποτελεσματικά, και (iv) να είναι ένας εξαιρετικός δότης πρωτονίων που οδηγεί τον ιονισμό του αναλύτη (Yoon and Jeong, 2021).

Πίνακας 1. *Είδη μήτρας και εφαρμογές τους (matrix)*

Είδη Μήτρας	Εφαρμογές (ανάλυση μορίων)	Αναφορές
α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)	μικρά μόρια, πεπτίδια/ πρωτεΐνες	(Guerrera and Kleiner, 2005; Wang et al., 2017; Leopold et al., 2018)
2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)	μικρά μόρια, πεπτίδια/πρωτεΐνες <6kDa, πολυμερή, υδατάνθρακες	(Guerrera and Kleiner, 2005; Wang et al., 2017; Leopold et al., 2018)
α -cyano-5-phenyl-2,4-pentadienic acid (CPPA)	πρωτεΐνες	(Monopoli et al., 2020; Cadene and Chait, 2000)
3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (SA)	πρωτεΐνες	(Cadene and Chait, 2000; Monopoli et al., 2020)
2-(4-Hydroxyphenylazo) benzoic acid (HABA)	πεπτίδια, πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες	(Clark et al., 2013)
9-aminoacridine (9-AA)	μικρά μόρια, λιπίδια	(Vermillion-Salsbury and Hercules, 2002)

Από την άλλη, έχουν παρατηρηθεί κάποιοι περιορισμοί/μειονεκτήματα κατά την χρήση της μήτρας στην διαδικασία εφαρμογής της φασματομετρίας MALDI-TOF:

1. Συγκεκριμένες μήτρες σε συνδυασμό με συγκεκριμένους ιονίζοντες παράγοντες προσφέρουν περιορισμένη σταθερότητα, η οποία συνήθως διαρκεί μόνο για λίγα λεπτά (Nielen, 1999).
2. Εμφάνιση ασάφειας στο φάσμα μάζας, καθώς ορισμένες από τις μήτρες παρουσιάζουν αυτοπολυμερισμό όταν αναμιγνύονται με το δείγμα προς ανάλυση και τον ιονίζοντα παράγοντα (Nielen, 1999).
3. Οι υγρές μήτρες, σε ειδικές περιπτώσεις, ενδέχεται να προκαλέσουν έντονη επιμόλυνση της πηγής ιονισμού (Williams et al., 1996).

4. Στην ανάλυση πεπτιδίων, μήτρες με χαμηλές τιμές πρωτεϊνικής συγγένειας προκαλούν υψηλότερο ποσοστό κατακερματισμού από ό,τι μήτρες με υψηλές τιμές πρωτεϊνικής συγγένειας (Jorgensen et al., 1998).

2.4.5 Συστήματα MALDI-TOF MS

Τρία εκ των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων συστημάτων που αξιοποιούν την τεχνολογία MALDI-TOF MS είναι τα Bruker Biotyper (Bruker Daltonics), VITEK MS (bioMérieux) και Autof MS 1000 (Autobio Diagnostics), καθένα εκ των οποίων διαθέτει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και εφαρμογές.

Το σύστημα Bruker Biotyper αποτελεί πρωτοπόρο εργαλείο στη διάγνωση και ταυτοποίηση βακτηριών και μυκήτων. Χρησιμοποιεί ως μήτρα το α -κυανο-4 υδροξυναμικό οξύ (HCCA) και υποστηρίζεται από το λογισμικό MBT Compass, το οποίο επιτρέπει τον συνδυασμό των φασματικών δεδομένων με μια εκτενή και επεκτάσιμη βάση δεδομένων. Η δυνατότητα των χρηστών να επικαιροποιούν τη βάση δεδομένων και να προσθέτουν νέους μικροοργανισμούς στη δυνατότητα ταυτοποίησης αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα του συστήματος, καθιστώντας το κατάλληλο για ερευνητικά και εξειδικευμένα διαγνωστικά εργαστήρια. Παρόλα αυτά, η διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων απαιτεί περισσότερη εργασία από το προσωπικό του εργαστηρίου σε σύγκριση με νεότερα συστήματα, και ορισμένες μελέτες έχουν καταδείξει υψηλότερη συχνότητα ταυτοποιήσεων σε συγγενικά είδη, όπως *Bacillus spp* (Zhou et al., 2021). Για να γίνει αναγνώριση των ειδών το σύστημα ταξινομεί τα είδη σύμφωνα με λογαριθμικές βαθμολογίες. Τα φάσματα που αποδίδουν αναλογία άνω του 2,0 χαρακτηρίζονται ως «αναγνώριση υψηλής αξιοπιστίας». Στα φάσματα με βαθμολογία κάτω από 1,7 αποδίδεται η ένδειξη «δεν είναι δυνατή η ταυτοποίηση του οργανισμού» (Cuenod et al., 2021). Το σύστημα αυτό έχει παρουσιάσει ευαισθησία που ξεπερνά το 95% για κοινά παθογόνα, αλλά περιορίζεται ελαφρώς σε πιο σπάνια συγγενικά στελέχη (Li et al., 2023).

Το VITEK MS ξεχωρίζει για τον υψηλό βαθμό αυτοματοποίησης και την ενσωμάτωση του στο συνολικό εργαστηριακό περιβάλλον του συστήματος VITEK. Η χρήση μιας πιστοποιημένης για διαγνωστική χρήση βάσης δεδομένων προσφέρει

αυξημένη αξιοπιστία και αναπαραγωγιμότητα στην ταυτοποίηση μικροοργανισμών, ακόμη και σε επίπεδο υποείδους (Chen et al., 2022). Η βάση δεδομένων Vitek MS αποδίδει μια βαθμολογία σε κάθε προσπάθεια ταξινόμησης είδους. Παράλληλα, για κάθε ταυτοποίηση παρέχονται ένα ποσοστό εμπιστοσύνης και ένας χαρακτηρισμός του τύπου ταυτοποίησης, ο οποίος μπορεί να είναι είτε «Μονή επιλογή» είτε «Χαμηλή διάκριση». Ο χαρακτηρισμός αυτός δείχνει κατά πόσο η ταυτοποίηση θεωρείται ξεκάθαρη ή εάν το σύστημα δεν κατάφερε να διακρίνει με σαφήνεια ανάμεσα σε δύο ή περισσότερα είδη. Όταν το επίπεδο εμπιστοσύνης πέφτει κάτω από το προκαθορισμένο όριο (60%), δεν αποδίδεται συγκεκριμένη ονομασία είδους. Αντί αυτού, το σύστημα χαρακτηρίζει την ταυτοποίηση ως «Χωρίς ταυτοποίηση» ή «Χαμηλή διάκριση», εξαιτίας της χαμηλής αξιοπιστίας (Cuenod et al., 2021). Το σύστημα αυτό υιοθετεί ένα πλήρως αυτοματοποιημένο μοντέλο τύπου “load and go”, μειώνοντας την ανάγκη για παρεμβάσεις από το εργαστηριακό προσωπικό. Αν και δεν προσφέρει την ίδια ευελιξία επέκτασης της βάσης δεδομένων από τον χρήστη όπως το Bruker Biotyper, παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα στην ταχύτητα και αξιοπιστία. Ιδιαίτερα αξιόλογη είναι η απόδοση του στην ταυτοποίηση δύσκολων ομάδων, όπως οι στρεπτόκοκκοι *viridans* και του *Streptococcus pneumoniae* (Li et al., 2023). Η συνολική του ευαισθησία ταυτοποίησης σε επίπεδο είδους αγγίζει το 98% για βακτηριακά στελέχη.

Το Autof MS 1000 είναι ένα νεότερο σύστημα, το οποίο έχει αναπτυχθεί από την κινέζικη εταιρία Autobio Diagnostics. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ταχύτητα ανάλυσης (έως 96 δείγματα σε περίπου 14 λεπτά), εκτεταμένη και συνεχώς ανανεούμενη βάση δεδομένων που περιλαμβάνει πάνω από 15.000 φασματικά προφίλ και προσιτό κόστος κτήσης και λειτουργίας (Park et al., 2021). Πρόσφατες ανεξάρτητες μελέτες επιβεβαιώνουν την ακρίβειά του στην ταυτοποίηση κλινικά απομονωμένων βακτηρίων και μυκήτων, με ποσοστά επιτυχίας που κυμαίνονται στο ίδιο ή και ανώτερο επίπεδο από τα συστήματα Bruker και VITEK (Ao et al., 2023; Park et al., 2021), ενώ από την άλλη δεν διαθέτει εγκεκριμένα πρωτόκολλα επεξεργασίας απευθείας από κλινικό δείγμα ή θετική αιμοκαλλιέργεια. Στην περίπτωση των νηματοειδών μυκήτων, το σύστημα αυτό, απέδωσε με ακρίβεια ταυτοποίησης σε επίπεδο γένους και είδους σε ποσοστά που θεωρούνται αποδεκτά για κλινική χρήση, πάνω από 93% (Ao et al., 2023). Ένα ακόμη πλεονέκτημα του

είναι η δυνατότητα σύνδεσης με λογισμικά ανάλυσης αντιμικροβιακής ευαισθησίας, ανοίγοντας τον δρόμο για ολοκληρωμένες διαγνωστικές εφαρμογές.

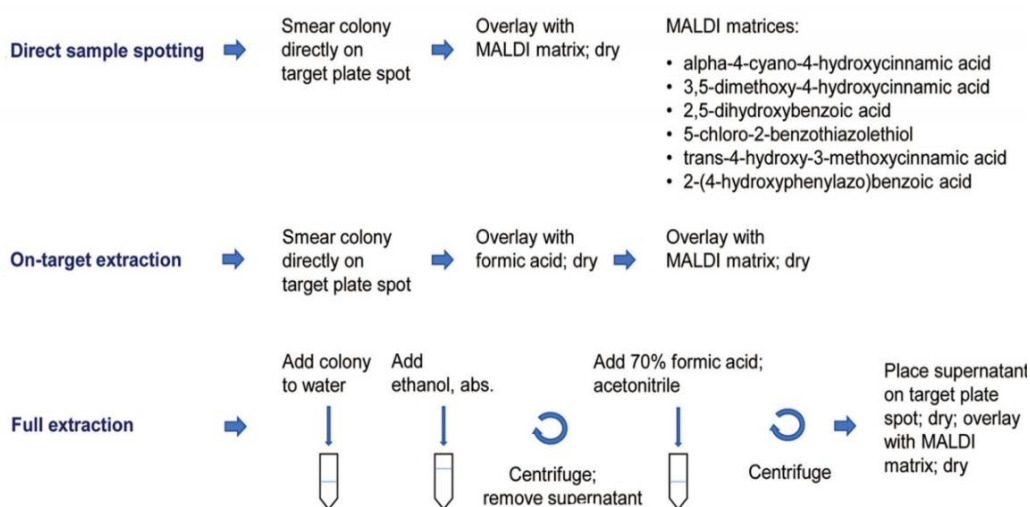
Οι επιλογές μεταξύ των συστημάτων αυτών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ανάγκες του εκάστοτε εργαστηρίου. Το Bruker Biotyper προσφέρει σημαντική ευελιξία και δυνατότητες παραμετροποίησης, ιδανικές για ερευνητικά περιβάλλοντα. Το VITEK MS υπάρχει σε πλήρως αυτοματοποιημένα κλινικά εργαστήρια με αυξημένες απαιτήσεις απόδοσης και σταθερότητας. Το Autof MS 1000, αν και λιγότερο διαδεδομένο σε παγκόσμιο επίπεδο, αποτελεί μια ελκυστική εναλλακτική με εξαιρετικές επιδόσεις και χαμηλό κόστος για χώρους και περιορισμένους πόρους και υψηλή διαγνωστική ζήτηση.

3. Προετοιμασία και Διαχείριση Δείγματος προς Ανάλυση

Σε κλινικά και ιδιαίτερα σε περιβαλλοντικά δείγματα, τα βακτήρια εμφανίζονται κυρίως σε μείγματα και βιοφίλμ, γεγονός που αποτελεί πρόκληση για την ακριβή ταυτοποίησή τους. Ένα από τα πολλά εμπόδια είναι η απομόνωση και η καλλιέργεια αμιγών στελεχών από τέτοια πολυβακτηριακά δείγματα (Sandrin and Demirev, 2018). Επιπλέον, τα πρότυπα έκφρασης των πρωτεϊνών ποικίλλουν ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας των δειγμάτων (Reeve and Bachmann, 2019), τα οποία μπορεί επίσης να περιέχουν μη καλλιεργήσιμα βακτήρια, για τα οποία δεν υπάρχουν φάσματα αναφοράς μαζών (Stewart, 2012). Για τους λόγους αυτούς, έχει εκδηλωθεί σημαντικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη διαδικασιών MALDI-TOF MS για την ταυτοποίηση βακτηριακών μειγμάτων χωρίς απομονώσεις καθαρών καλλιεργειών (Wahl et al., 2002; Mandrell et al., 2005; Yang et al., 2018; Mörtelmaier et al., 2019; Reeve and Bachmann, 2019).

Η πειραματική ακολουθία της μεθόδου του MALDI-TOF MS μπορεί να συνοψιστεί στα παρακάτω. Πρώτον, το δείγμα αναμιγνύεται με κατάλληλο υλικό μήτρας και τοποθετείται σε καθαρή πλάκα δείγματος (target plate) MALDI. Μετά την ξήρανση/αφυδάτωση, τα δείγματα τοποθετούνται και αναλύονται στον φασματογράφο μάζας MALDI-TOF MS. Υπό την ακτινοβολία λέιζερ, τα μόρια των αναλυτών-δειγμάτων ιονίζονται με πρωτονίωση ή αποπρωτονίωση σε ένα θερμικό νέφος αερίου εκτοξεύσεως και επιταχύνονται στους αναλυτές μάζας ή στους

υβριδικούς αναλυτές μάζας για διαχωρισμό και ανίχνευση (Karas and Kruger, 2003; Patel, 2015). Για να καταστεί, όμως, δυνατή η εκχύλιση πρωτεϊνών από βακτηριακά κύτταρα, οι γενικές προσεγγίσεις προετοιμασίας του δείγματος περιλαμβάνουν τρεις δυνατότητες: i) την απευθείας τοποθέτηση του δείγματος και της μήτρας (matrix) στην πλάκα στόχο (target plate), ii) την εκχύλιση επί του στόχου (on-target extraction) και iii) την πλήρη διαδικασία εκχύλισης (full extraction) (Εικόνα 5) (Kazazić et al., 2019).



Εικόνα 5. Μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων (Kazazić et al., 2019)

3.1 Πρωτόκολλο Άμεσης Εφαρμογής του Δείγματος στον Αναλυτή

Η μέθοδος της απευθείας τοποθέτησης του δείγματος στον αναλυτή χωρίς καμία επιπλέον προεργασία είναι η απλούστερη. Για τα περισσότερα βακτήρια, η μέθοδος περιλαμβάνει την επάλειψη μιας μονήρους βακτηριακής αποικίας, από το τρυβλίο με το καλλιεργητικό μέσο, απευθείας στο σημείο της πλάκας-στόχου χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα ή μπατονέτα/βαμβακοφόρο στυλεό, αφήνοντάς την να στεγνώσει και τέλος την προσθήκη της μήτρας (matrix) (Anderson et al., 2012; Popović et al., 2017; Hou et al., 2019). Η επιλογή της μήτρας μπορεί να έχει καθοριστική επίδραση στην ανίχνευση της κορυφής m/z (Nilsson, 1999; Šedo et al., 2011), διότι είναι γνωστό ότι μια μήτρα μπορεί να προάγει τον ιονισμό συγκεκριμένων οικογενειών ενώσεων, όπως τα φωσφολιπίδια, τα πεπτίδια ή τις

πρωτεΐνες (Ruelle et al., 2004). Αξιόπιστες μετρήσεις μπορούν να επιτευχθούν με την προσθήκη του α-4-κυανο-4-υδροξυκινναμωμικό οξέος (CHCA), μετά την εναπόθεση βακτηρίων (είτε πρόκειται για άθικτα κύτταρα, είτε για λυμένα, είτε για εκχύλισματα) στην πλάκα-στόχο (Hou et al., 2019). Χρησιμοποιείται συνήθως για πεπτίδια στην περιοχή χαμηλότερων μαζών (<2500 Da) και οδηγεί σε μικρούς ομοιογενείς κρυστάλλους (Jang & Kim, 2018). Εκτός από το CHCA, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μήτρες για την ταυτοποίηση βακτηρίων είναι το σιναπινικό οξύ (3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυκινναμωμικό οξύ), το 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ, η 5-χλωρο-2-βενζοθειαζολαιθόλη (CMBT), το φερουλικό οξύ (trans-4-υδροξυ-3-μεθοξυκινναμωμικό οξύ, FA) και το 2-(4-υδροξυφαινυλαζο) βενζοϊκό οξύ (Beavis and Chait, 1989a, Beavis et al., 1992; Strupat et al., 1991; Pennanec et al., 2010). Το CMBT είναι μια κατάλληλη μήτρα για τα Gram θετικά βακτήρια (Walker et al., 2002; Giebel et al., 2008). Στην περίπτωση των Gram-αρνητικών ραβδόμορφων βακτηρίων, η μέθοδος της απευθείας μελέτης είναι αυτή που συνήθως επιλέγεται (Tsuchida et al., 2020). Για πολλά περιβαλλοντικά στελέχη, όπως το βακτήριο *Legionella* spp, τα οποία μπορεί να παρουσιάζουν κίνδυνο βιοασφάλειας και συνεπώς πρέπει να αδρανοποιηθούν, η άμεση δειγματοληψία σε σύγκριση με τις διαδικασίες εκχύλισης δεν έχει σημαντικές διαφορές όσον αφορά την ταυτοποίηση και την ποιότητα της μάζας φασμάτων (Pascale et al., 2020). Ωστόσο, για τα αναερόβια βακτήρια, η μέθοδος αυτή δεν παρουσιάζει τα επιθυμητά αποτελέσματα και προτιμάται η μέθοδος της επί του στόχου και της πλήρους εκχύλισης (Velo et al., 2014). Η απευθείας μελέτη του δείγματος χωρίς προεργασία, παρουσιάζει συνήθως χαμηλότερα ποσοστά ταυτοποίησης, ωστόσο έχει την ικανότητα να ταυτοποιεί Gram θετικά βακτήρια και ορισμένα μυκοβακτηρίδια, τα οποία έχουν απομονωθεί σε κλινικά εργαστήρια (Wang et al., 2021).

3.2 Επί-Στόχου Εκχύλιση

Η εκχύλιση επί του στόχου απαιτεί επίσης μια βακτηριακή αποικία, η οποία έχει τοποθετηθεί επάνω σε ένα σημείο της πλάκας-στόχου. Για βακτήρια με ανθεκτικά κυτταρικά τοιχώματα ή με ικανότητα παραγωγής εξωπολυσακχαριτικής μήτρας (βιοϋμένιο), όπως ορισμένα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία (Anderson et al., 2012). Σε κάθε αποικία προστίθεται 70%

φορμικού οξέος (formic acid-FA) και στη συνέχεια ακολουθεί ξήρανση/αφυδάτωση, με μήτρα MALDI (Kazazić et al., 2019). Η απευθείας εναπόθεση βακτηρίων συχνά περιλαμβάνει την επεξεργασία των κυττάρων με αιθανόλη 40% για την εξάλειψη του σχηματισμού κυτταρικών συστάδων και την ενίσχυση της ομοιογένειας του δείγματος και της επαναληψιμότητας από λήψη σε λήψη (Madonna et al., 2000; Šedo et al., 2011). Είναι επίσης, δυνατή η επεξεργασία των κυττάρων με 100% αιθανόλη πριν από την προσθήκη της μήτρας (Ruelle et al., 2004). Ορισμένες μελέτες έχουν παρουσιάσει την τοποθέτηση άθικτων (ακέραιων) κυττάρων σε μείγμα διαλύτη και μήτρας πριν από τη εναπόθεση τους στο σημείο της πλάκας-στόχου, με αποτέλεσμα την υψηλή ανάλυση σε επίπεδο στελέχους (Moura et al., 2008). Παρατηρήθηκε, ότι οι μετρήσεις που πραγματοποιούνται σε γραμμική λειτουργία θετικών ιόντων οδηγούν σε υψηλότερη ευαισθησία από ότι στη λειτουργία ανακλαστήρα (reflector mode), παράγοντας φάσματα μάζας με επαρκή ακρίβεια και ανάλυση (Freiwald and Sauer, 2009). Περιβαλλοντικά δείγματα του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της εκχύλισης επί του στόχου ταυτοποιήθηκαν καλύτερα από ότι με την άμεση δειγματοληψία και τη μέθοδο της πλήρους εκχύλισης, αποδίδοντας αξιόπιστη ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, σε όλα τα εξεταζόμενα μέσα καλλιέργειας, για όλους τους χρόνους επώασης και σε όλες τις επαναλήψεις (Kazazić et al., 2019). Ομοίως, για τα κλινικά δείγματα με *Streptococcus salivarius* και *Lactobacillus* spp., όλες οι απομονώσεις ταυτοποιήθηκαν μετά την διαδικασία εκχύλισης επί του στόχου. Οι Tsuchida et al. (2021) διαπίστωσαν ότι η διαδικασία εκχύλισης επί στόχου σε συνθήκες ελεγχόμενης υγρασίας μπορεί να οδηγήσει σε υψηλά αποτελέσματα ταυτοποίησης, ιδίως για τα δείγματα που παρασκευάστηκαν σε συνθήκες υγρασίας 30%-40%. Ωστόσο, αν και ο έλεγχος της υγρασίας αυξάνει αποτελεσματικά την ακρίβεια ταυτοποίησης τόσο για τα θετικά όσο και για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, δεν επιτρέπει την οριστική ταυτοποίηση βακτηρίων σε όλες τις περιπτώσεις (Tsuchida et al., 2021).

3.3 Πλήρης Διαδικασία Εκχύλισης

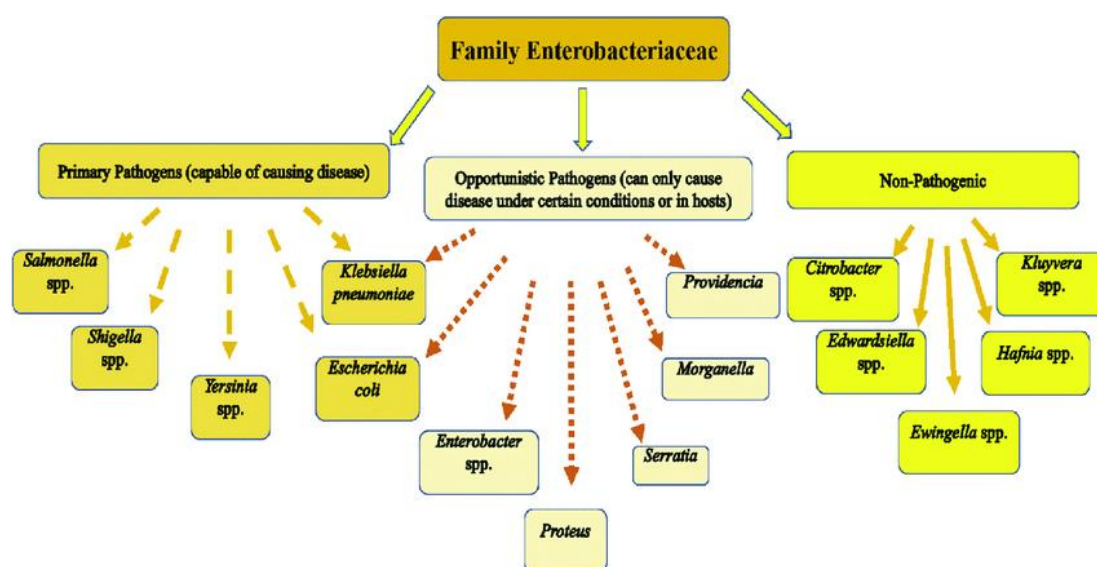
Η προσέγγιση της πλήρους εκχύλισης είναι πιο πολύπλοκη, αλλά η καταλληλότερη διαδικασία για την αδρανοποίηση των παθογόνων βακτηρίων χωρίς σχηματισμό σπορίων. Οι μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων παρουσιάζουν σημαντική

ποικιλομορφία στις διαδικασίες (Sandrin et al., 2013). Μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες παραλλαγές είναι η επεξεργασία μιας βακτηριακής αποικίας κατά την οποία αρχικά ομογενοποιείται με ανάδευση σε νερό, έπειτα ακολουθεί η προσθήκη αιθανόλης στο εναιώρημα και τέλος πραγματοποιείται μια σύντομη φυγοκέντρωση. Το υπερκείμενο, στη συνέχεια, απορρίπτεται και το ίζημα φυγοκεντρείται εκ νέου, ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επανατοποθετείται σε φορμικό οξύ (FA). Μετά την προσθήκη του φορμικού οξέος, προστίθεται ακετονιτρίλιο (ACN), αναμιγνύεται και φυγοκεντρείται για μικρό χρονικό διάστημα. Πριν από την προσθήκη της μήτρας MALDI στο δείγμα προς ανάλυση, το υπερκείμενο προστίθεται σε κάθε σημείο της πλάκας και αφήνεται να στεγνώσει (Kazazić et al., 2019). Για τη διαδικασία αυτή απαιτούνται περίπου 10^6 - 10^7 βακτηριακά κύτταρα (Freiwald & Sauer, 2009). Η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης, όπως το TFA ή το ACN, μπορεί να επηρεάσει το ποιοι βιοδείκτες που αφορούν συγκεκριμένα στελέχη θα ανιχνευθούν (Nilsson, 1999), αν και οι δύο αυτοί διαλύτες βελτιώνουν την ποιότητα του προφίλ όλων των τύπων βακτηρίων που μελετήθηκαν (Šedo et al., 2011). Παρόλο που η μέθοδος πλήρους εκχύλισης αναφέρεται ότι οδηγεί σε αποτελεσματικότερο ιονισμό και ποιοτικότερες ταυτοποιήσεις (Anderson et al., 2012), ορισμένα περιβαλλοντικά στελέχη που ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της εκχύλισης επί του στόχου, παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά ταυτοποίησης από ό,τι με την πλήρη εκχύλιση (Kazazić et al., 2019).

Συνοψίζοντας, η επιλογή της προετοιμασίας του δείγματος με άμεση κηλίδωση-απευθείας τοποθέτηση του δείγματος στον αναλυτή ή εκχύλιση βασίζεται σε διάφορα κρίσιμα δεδομένα: έχει φανεί ότι τα αποτελέσματα ταυτοποίησης είναι λιγότερο ικανοποιητικά για τα θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως ο σταφυλόκοκκος και ο εντερόκοκκος (Goldstein et al., 2013; Tsuchida et al., 2020). Αυτή η διαφορά στην ασφαλή ταυτοποίηση πιθανόν να οφείλεται στην ανεπαρκή εκχύλιση των πρωτεϊνών λόγω των διαφορών στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ των θετικών κατά Gram και των αρνητικών βακτηρίων (Tsuchida et al., 2020). Η εκχύλιση επί του στόχου χρησιμοποιείται για την επίτευξη της διάσπασης του κυτταρικού τοιχώματος, όπου η αιθανόλη/FA εφαρμόζεται πάνω στο βακτηριακό επίχρισμα (McElvania TeKippe et al., 2013). Τέλος η διαδικασία πλήρους εκχύλισης είναι η καταλληλότερη για την ταυτοποίηση παθογόνων βακτηρίων χωρίς σχηματισμό σπορίων (Sandrin et al., 2013).

4. Εντεροβακτηριακά-Εντεροβακτηριοειδή

Τα Εντεροβακτηριοειδή αποτελούν μία από τις σημαντικότερες ομάδες προκαρυωτικών βακτηρίων, η οποία έχει τεράστιο ιατρικό ενδιαφέρον και υγειονομικό αντίκτυπο στην παγκόσμια κοινότητα (Farmer et al., 2005; Janda and Abbott, 2006; Janda and Abbott, 2015). Η πλειονότητα των οικογενειών, γενών και ειδών που περιλαμβάνονται σήμερα στην τάξη των Εντεροβακτηριακών (Order Enterobacterales), έχουν αναγνωριστεί εδώ και 50 χρόνια (Brenner and Farmer, 2005), με σημαντικότερη την οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών (Family Enterobacteriaceae). Η νεότερη προσπάθεια αναταξινόμησης των επιμέρους οικογενειών της τάξης φαίνεται στην Εικόνα 6 (Janda and Abbott, 2021). Τα μέλη που έχουν προστεθεί στην ομάδα μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά, όπως τον φαινότυπο, το περιβάλλον και τα μοτίβα ασθενειών (Farmer et al., 2005; Brenner and Farmer, 2005; Janda and Abbott, 2006; Janda and Abbott, 2021).



Εικόνα 6. Οικογένεια Εντεροβακτηριοειδών (Ebomah and Okoh, 2020)

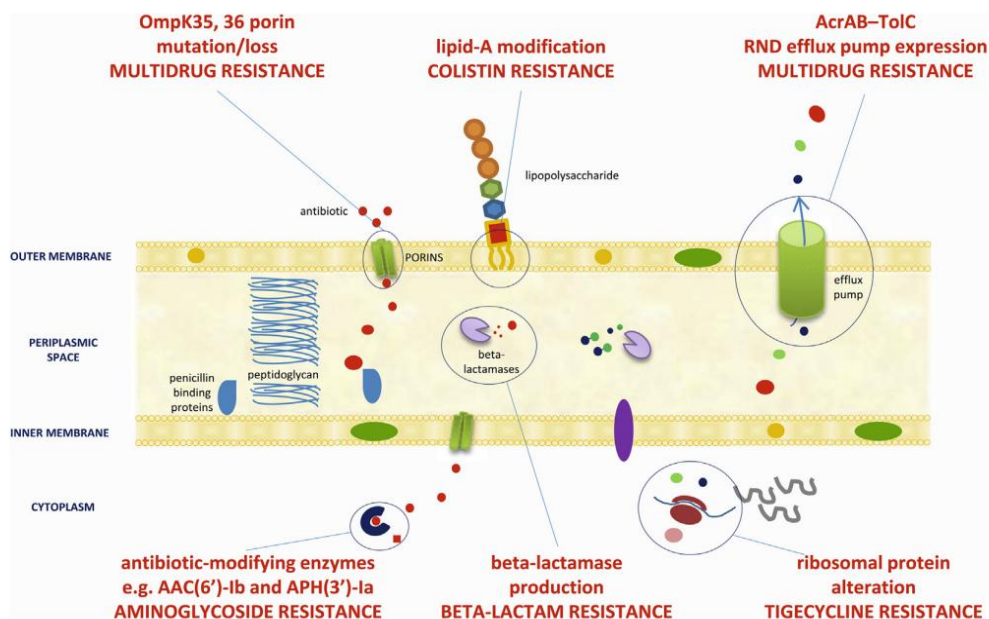
Σημαντικό να αναφερθεί πως η τάξη των Εντεροβακτηριακών και ιδιαίτερα η οικογένεια των Εντεροβακτηριοειδών ευθύνεται για τις περισσότερες νοσοκομειακές και εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις (Πίνακας 2). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται επιπρόσθετα και στην πολυαντοχή που εμφανίζουν τα στελέχη αυτών των ειδών.

Πίνακας 2. Γένη & Είδη Εντεροβακτηριακών που αποικίζουν τον άνθρωπο ή σχετίζονται με λοιμώξεις που προκαλούν σε αυτόν (Χατζηδημητρίου, 2006)

<i>Citrobacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Edwardsiella</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella, all serotypes</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Citrobacter koseri</i>			
<i>Citrobacter amanolaticus</i>			
<i>Klebsiella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Klebsiella ozaenae</i>			<i>Enterobacter agglomerans</i>
			<i>Enterobacter gegoviae</i>
			<i>Enterobacter sazaiki</i>
			<i>Enterobacter amnigenus</i>
			<i>Enterobacter taylorae</i>
<i>Shigella</i>	<i>Morganella</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Proteus</i>
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Shigella flexneri</i>		<i>Yersinia enterocolotica</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Shigella boydii</i>		<i>Yersinia frederiksenii</i>	<i>Proteus penneri</i>
<i>Shigella sonnei</i>		<i>Yersinia intermedia</i>	
		<i>Yersia pseudotuberculosis</i>	
<i>Providencia</i>			
<i>Providencia rettgeri</i>			
<i>Providencia stuartii</i>			

4.1 Μηχανισμοί Αντοχής Εντεροβακτηριακών

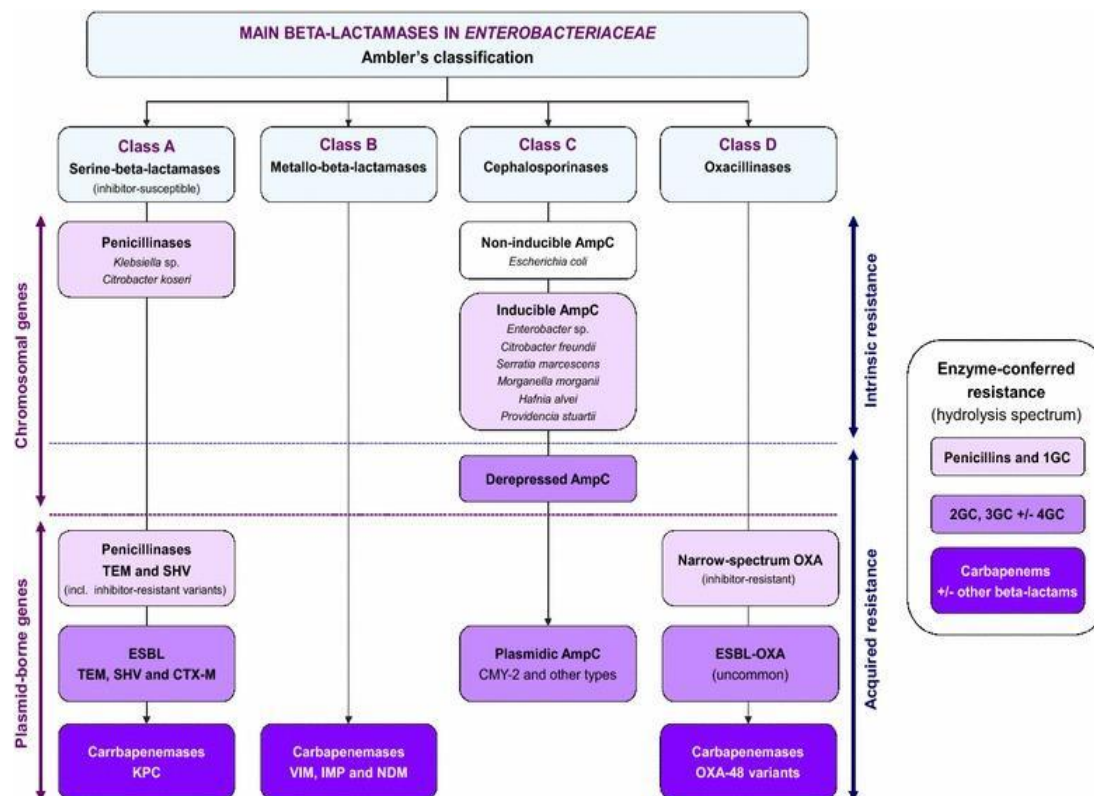
Οι λοιμώξεις από Εντεροβακτηριακά (Carbapenem Resistant Enterobacterales, CRE) και ιδιαίτερα Εντεροβακτηριοειδή ανθεκτικά στις καρβαπενέμες οδηγούν σε παρατεταμένη νοσηλεία, αυξημένο κόστος θεραπείας καθώς και υψηλή θνησιμότητα (Patel et.al., 2008; Ben-David et.al., 2012; Bartsch et.al., 2017). Υπάρχουν δυο κατηγορίες CRE, η πρώτη αφορά στελέχη ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, τα οποία παράγουν καρβαπενεμάσες (Carbapenemase CRE, CP-CRE) και η δεύτερη τα στελέχη, τα οποία δεν παράγουν καρβαπενεμάσες (non CP-CRE) (Tamma et al., 2017). Η αντοχή των στελεχών αυτών οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς (Εικόνα 7) που προσδίδουν ανθεκτικότητα και αναλύονται εκτενέστερα παρακάτω.



Εικόνα 7. Κύριοι μηχανισμοί αντοχής στα αντιμικροβιακά, συμπεριλαμβανομένης της αντοχής στις καρβαπενέμες, στα *Enterobacteriaceae* (Durante-Mangoni et al., 2019)

4.1.1 Παραγωγή Καρβαπενεμασών

Η σημαντικότερη μορφή αντοχής αφορά την παραγωγή β-λακταμασών, ενζύμων που έχουν τη δυνατότητα να υδρολύουν τον β-λακταμικό δακτύλιο των β-λακταμικών αντιβιοτικών, καθιστώντας τα ανενεργά (Εικόνα 8). Μέσα σε αυτά τα ένζυμα ανήκουν οι καρβαπενεμάσες, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να υδρολύουν συγκεκριμένα τις καρβαπενέμες, προκαλώντας αντοχή των βακτηρίων σε όλα τα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Μέχρι πρόσφατα, οι β-λακταμάσες ταξινομούνται με βάση τη μοριακή τους δομή, ταξινόμηση κατά Ambler, και με βάση τη λειτουργία τους, ταξινόμηση κατά Bush-Jacobi-Medeiros (Ambler, 1980; Bush et al., 1995; Bush and Jacoby, 2010). Στην ταξινόμηση κατά Ambler, οι β-λακταμάσες ταξινομούνται σε 4 κατηγορίες, οι οποίες είναι η A, B, C και D. Τα κύρια κοινά χαρακτηριστικά τους είναι ότι οι β-λακταμάσες των κατηγοριών A, C και D χρησιμοποιούν μια σερίνη ως ενεργό τους κέντρο, ενώ αυτές της κατηγορίας B χρησιμοποιούν τον ψευδάργυρο (Stover et al., 2000).



Εικόνα 8. Εγγενείς και επίκτητες β-λακταμάσες στα Εντεροβακτηριοειδή (Ruppe et al., 2015)

4.1.1.1 β-λακταμάσες Τάξης A

Στην κατηγορία αυτή κατανέμονται οι β-λακταμάσες, οι οποίες ως ενεργό κέντρο τους έχουν εστέρα σερίνης. Πρόκειται κυρίως για πενικιλινάσες και κεφαλοσπορινάσες (Samaha and Aradj, 2003). Τα υπεύθυνα γονίδια εντοπίζονται κυρίως σε πλαμίδια, αλλά σε ορισμένες πειπτώσεις εντοπίζονται και στο χρωμόσωμα του βακτηριακού στελέχους (Bonomo, 2017). Στα τέλη της δεκαετίας του 90', εμφανίστηκαν και οι καρβαπενεμάσες, που προκαλούσαν την διάσπαση των καρβαπενεμών (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2007).

Υπάρχουν 6 είδη καρβαπενεμασών της τάξης A:

1. GES (Guiana Extended Spectrum): Αρχικά κατατάχθηκαν στις εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs). Ωστόσο, ορισμένες παραλλαγές, όπως η GES-2, έχουν την ικανότητα υδρόλυσης της ιμιπενέμης, αν και με σχετικά χαμηλή δραστηριότητα (Queenan & Bush, 2007).
2. SME (*Serratia marcescens* enzyme): Απομονώθηκε για πρώτη φορά στο Λονδίνο από στέλεχος *Serratia marcescens*. Η παρουσία της είναι σπάνια και έχει καταγραφεί σε περιορισμένες γεωγραφικές περιοχές (Naas et al., 2016).

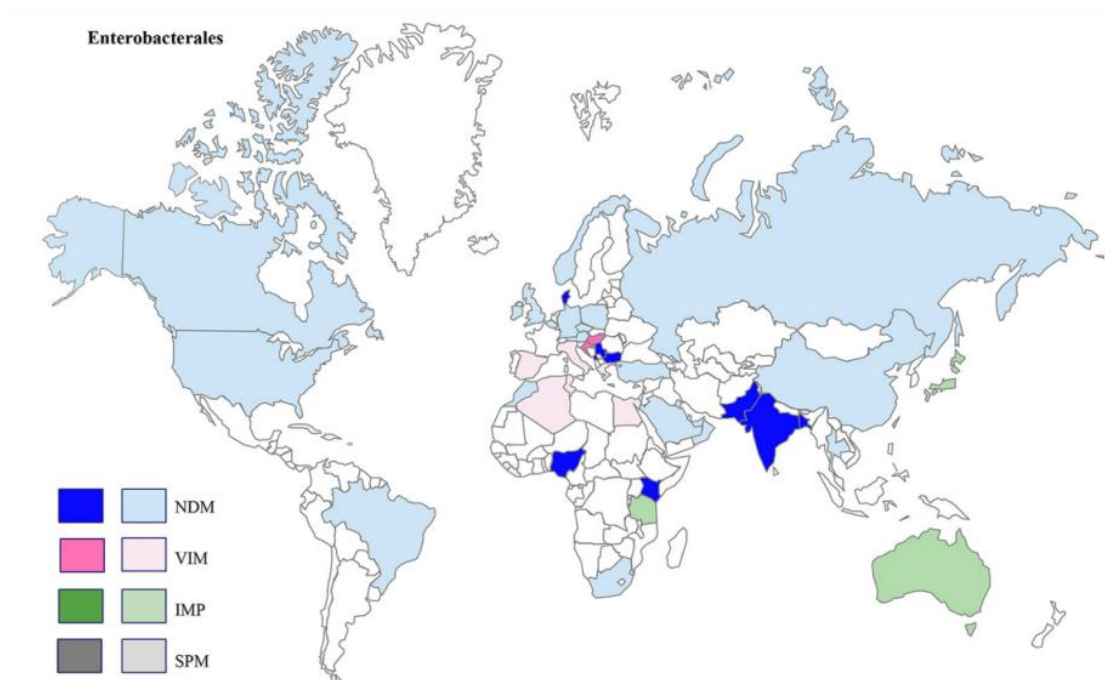
3. SHV (Sulfhydryl Variable): Αν και αρχικά περιγράφηκε ως ESBL, ορισμένες παραλλαγές του ενζύμου SHV εμφανίζουν περιορισμένη δράση καρβαπενεμάσης.
KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase): Πρόκειται για τη συχνότερα ανιχνευόμενη καρβαπενεμάση παγκοσμίως. Δεν αναστέλλεται από το κλαβουλανικό οξύ, την ταζομπακτάμη ή τη σουλμπακτάμη (Nguyen et al., 2016). Το γονίδιο bla_{KPC} που την κωδικοποιεί φέρει υψηλή κινητικότητα, καθώς εντοπίζεται σε πλασμίδια και άλλα κινητά γενετικά στοιχεία, γεγονός που διευκολύνει την μεταφορά του και ιδιαίτερα στα CP-CRE που αποτελούν παγκόσμια απειλή για τη δημόσια υγεία (Logan & Weinstein, 2017).
4. IMI/NMC-A (Imipenemase/Non-Metallo Carbapenemase-A): Σπάνιες καρβαπενεμάσες που πρωτοανιχνεύθηκαν σε *Enterobacter cloacae* στη Γαλλία, με περιορισμένη δράση στην υδρόλυση ορισμένων καρβαπενεμών (Naas et al., 2016).
5. SFC (*Serratia fonticola* carbapenemase): Σπάνιο ένζυμο που έχει αναφερθεί σε περιβαλλοντικά στελέχη *Serratia fonticola*, με περιορισμένα δεδομένα σχετικά με την κλινική του σημασία.

4.1.1.2 β-λακταμάσες Τάξης B

Οι μεταλλο-β-λακταμάσες (MBLs) είναι ένζυμα της τάξης B κατά Ambler, των οποίων η καταλυτική δράση εξαρτάται από την παρουσία ιόντων ψευδαργύρου στο ενεργό τους κέντρο. Έχουν την ικανότητα να υδρολύουν ευρύ φάσμα β-λακταμικών αντιβιοτικών, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών, εξαιρουμένων των μονοβακταμών. Σε αντίθεση με άλλες καρβαπενεμάσες, αναστέλλονται από EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ), ιδιότητα που αξιοποιείται διαγνωστικά για την ανίχνευσή τους (Gharoufian et al., 2015).

Παρότι οι πρώτες MBLs (όπως τα ένζυμα IMP) περιγράφηκαν ήδη από τη δεκαετία του 1960, η ευρεία εξάπλωσή τους ως μηχανισμός επίκτητης αντοχής αναγνωρίστηκε μόλις από τη δεκαετία του 1990, όταν κλινικές επιδημίες ανέδειξαν τη συμβολή μεταφερόμενων γονιδίων bla_{MBL} σε Gram-αρνητικά παθογόνα. Τα γονίδια που κωδικοποιούν MBLs συχνά εντοπίζονται εντός ιντεγκρονίων, τα οποία με τη σειρά τους βρίσκονται ενσωματωμένα σε τρανσποζόνια ή πλασμίδια με πολλαπλά γονίδια αντοχής, διευκολύνοντας την οριζόντια μεταφορά τους μεταξύ διαφορετικών ειδών (Cornaglia et al., 2011; Patel & Bonomo, 2013).

Αξιοσημείωτη είναι η περίπτωση της Ελλάδας, η οποία υπήρξε η πρώτη ευρωπαϊκή χώρα με εκτεταμένη διασπορά Εντεροβακτηριοειδών που φέρουν MBLs, και κυρίως καρβαπενεμάσες τύπου VIM. Στελέχη *K. pneumoniae* που φέρουν bla_{MBL} καταγράφηκαν σε νοσοκομεία από το 2003 έως το 2007 (Hasan et al., 2014). Παρά τις αρχικές και πρότερες αναφορές ανίχνευσης των ενζύμων IMP και VIM στην Ιταλία (Luzzaro et al., 2004), η έκταση και η ταχύτητα εξάπλωσης των MBLs στην Ελλάδα ήταν μεγαλύτερη. Ωστόσο, από το 2010 και εξής, η καρβαπενεμάση KPC ανέλαβε κυρίαρχο ρόλο στην ελληνική επιδημιολογία, εκτοπίζοντας τις MBLs, κυρίως λόγω της εξάπλωσης του κλώνου ST258 της *K. pneumoniae* (Giakoupi et al., 2009).



Εικόνα 9: Παγκόσμια κατανομή των MBLs (Boyd et al., 2020)

4.1.1.3 β-λακταμάσες Τάξης C

Το πρώτο βακτηριακό ένζυμο που αναφέρθηκε ότι αναστέλλει τη δράση της πενικιλίνης ήταν η AmpC-λακταμάση του στελέχους *E. coli* (Abraham and Chain, 1940). Μια μελέτη που ξεκίνησε από Σουηδούς ερευνητές το 1965 σε *E. coli*, κατέληξε στο συμπέρασμα πως τα στελέχη AmpC παρήγαγαν ελάχιστη ή καθόλου λακταμάση, γεγονός που υποδηλώνει πως το AmpC αποτελεί το δομικό γονίδιο του ενζύμου (Burman et al., 1973). Σε μια πληθώρα Εντεροβακτηριοειδών, η έκφραση του γονιδίου είναι χαμηλή, όμως σε περιπτώσεις έκθεσης σε λακτάμες, επάγεται η δράση

του, λαμβάνοντας χώρα ένας πολύπλοκος μηχανισμός (Jacobs et al., 1994; Jacobs et al., 1997; Hanson and Sanders, 1999). Το γονίδιο *AmpC* κωδικοποιείται σε πλασμίδια κάτι που είναι γνωστό από το 1989 (Philippon et al., 2002; Walther-Rasmussen and Høiby, 2002). Πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο *bla_{AmpC}*, φέρουν συνήθως και γονίδια αντοχής έναντι άλλων αντιμικροβιακών, όπως οι αμινογλυκοσίδες, η χλωραμφαινικόλη, οι κινολόνες, καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν άλλες β-λακταμάσες. Οι β-λακταμάσες στην κατηγορία αυτή είναι οι CMY, ACT, FOX και MIR (Philippon et al., 2002).

4.1.1.4 β-λακταμάσες Τάξης D

Οι μοριακές οξακιλλινάσες OXA της τάξης D αποσπάστηκαν από την αρχική τους τάξη A, δεδομένου ότι εκτός του συντηρημένου ενεργού άκρου Ser-X-X-Lys παρουσιάζουν χαμηλή ομολογία αλληλουχίας (Huoninen et al., 1988). Όπως και στις τάξεις A και C, το ενεργό κέντρο είναι μια σερίνη (Hall et al., 1993; Danel et al., 1997). Η κωδικοποίησή τους γίνεται πάνω σε πλασμίδια ή/και ιντεγκρόνια (Antunes and Fisher, 2014). Παράγονται κυρίως από *E. coli*, *P. mirabilis*, αλλά και άλλα μη εντεροβακτηριακά, όπως *Pseudomonas aeruginosa* και *Acinetobacter baumannii* (Leonard et al., 2013).

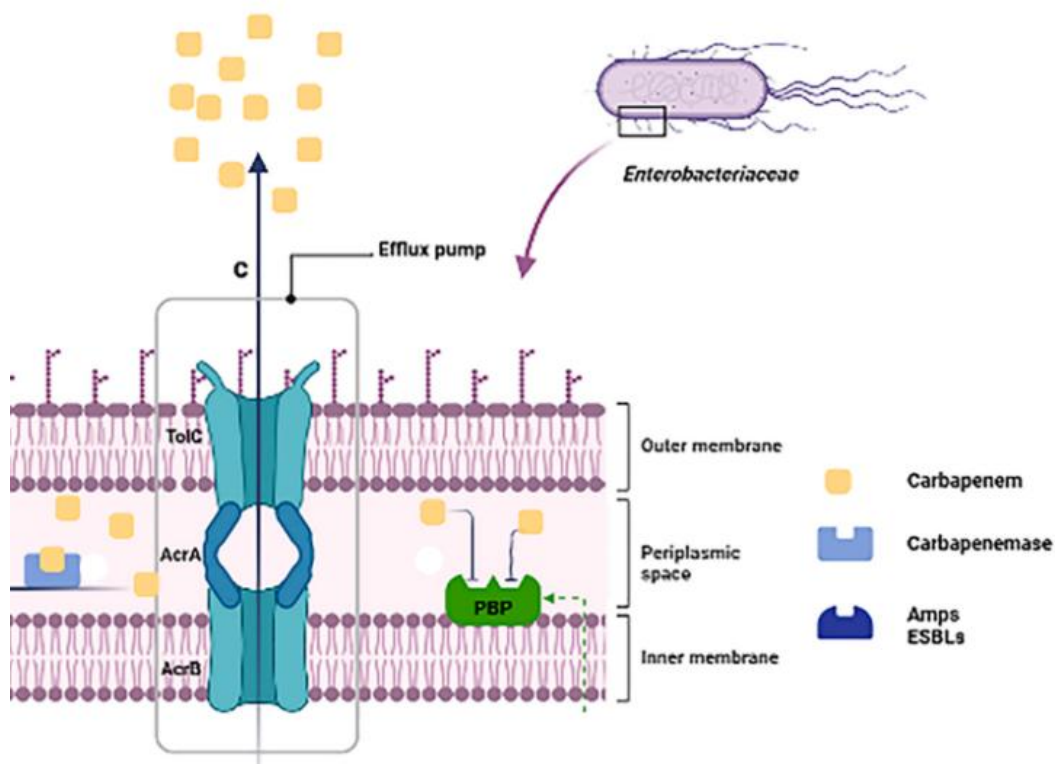
4.1.2 Τροποποίηση Διαπερατότητας Εξωτερικής Μembrάνης - Αναστολή ή Τροποποίηση Πρωτεϊνών Μembrάνης

Η πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης (Outer membrane protein, Omp) χαρακτηρίζεται ως ένα μη ειδικό κανάλι με τη μορφή διαμεμβρανικού σωλήνα, μέσω του οποίου εισέρχονται τόσο τα θρεπτικά συστατικά στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου όσο και τα αντιβιοτικά. Σε περίπτωση όπου η πρωτεΐνη αυτή τροποποιηθεί ή απενεργοποιηθεί, τα αντιβιοτικά δε θα είναι σε θέση να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου, με συνέπεια αδυναμία δράσης τους (Masi et al., 2019). Η απώλεια των κύριων πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης, OmpK36 και OmpK35, παρατηρείται συχνά στα CRE, με αποτέλεσμα τη μειωμένη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης λόγω δομικών αλλαγών στα κανάλια πορίνης, που περιορίζουν την πρόσληψη φορτισμένων μορίων μέσω του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Αυτές οι δομικές αλλαγές οφείλονται σε μεταλλάξεις που είτε μείωσαν το μέγεθος του καναλιού των πορινών είτε τροποποίησαν την ηλεκτροστατική τους. Πρωτεΐνες επίσης της κατηγορίας αυτής είναι οι OmpF, OmpC, LamB και PhoE (Mmatli et al.,

2020). Ρυθμιστικό ρόλο παίζουν αρκετοί παράγοντες με σημαντικότερο αυτόν της μετάλλαξης του ενεργοποιητή του E, RseA, και της απώλειας του τροποποιητικού παράγοντα του λιποπολυσακχαρίτη GmhB, όπου σύμφωνα με τους Alzayn et al., οι τροποποιήσεις αυτές οδηγούν σε αποδόμηση των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης και ως επακόλουθο μειωμένη ευαισθησία στις καρβαπενέμες (Alzayn et al., 2021). Αναφορικά με την *K. pneumoniae*, οι αντιπροσωπευτικές πρωτεΐνες είναι οι OmpK35 και OmpK36. Σημειακές μεταλλάξεις, διαγραφές ή προσθήσεις στα γονίδια τους θα μπορούσαν να μεταβάλουν τη λειτουργικότητά τους και να τους προσδώσουν αντοχή στα αντιβιοτικά, λόγω απενεργοποίησης των πρωτεϊνών (Wu et al., 2020).

4.1.3 Υπερέκφραση Αντλιών Εκροής (Efflux Pumps)

Η εκροή των αντιβιοτικών από τα βακτηριακά κύτταρα μέσω των αντλιών εκροής είναι ένας από τους σημαντικούς μηχανισμούς αντοχής των Εντεροβακτηριοειδών (Εικόνα 10). Ο κυριότερος τύπος αντλιών είναι αυτός των RND (Resistance-Nodulation-Division), ενώ η πιο κοινή αντλία εκροής στα CRE είναι η AcrAB-TolC (Mmatli et al., 2020).



Εικόνα 10. Λειτουργία αντλίας εκροής Εντεροβακτηριοειδών (Jiayue et al., 2022)

4.1.4 Μεταβολές στις Πενικιλινοδεσμευτικές Πρωτεΐνες (PBPs)

Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν την πενικιλίνη [Penicillin-binding proteins, (PBPs)] είναι απαραίτητες για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Τα αντιβιοτικά και συγκεκριμένα οι καρβαπενέμες δεσμεύουν ομοιοπολικά τις PBPs, σχηματίζουν σταθερές δομές και αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (Siting et al., 2017). Σύμφωνα με σχετικές μελέτες, αν και οι μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες δέσμευσης πενικιλίνης συσχετίζονται με αυξημένες τιμές της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC), δεν φαίνεται να αποτελούν από μόνες τους καθοριστικό παράγοντα για την εκδήλωση κλινικής αντοχής στα αντιβιοτικά. Εντούτοις, η παρουσία τέτοιων μεταλλάξεων σε συνδυασμό με μείωση της έκφρασης πορινών, υπερπαραγωγή AmpC ή/και παραγωγή καρβαπενεμασών, δύναται να ενισχύσει σημαντικά την ανθεκτικότητα των Εντεροβακτηριοειδών (Lange et al., 2019).

4.1.5 Τροποποίηση Σύνθεσης Βιοϋμενίου (βιοφίλμ)

Το βιοφίλμ (biofilm) αποτελεί έναν μηχανισμό άμυνας των βακτηρίων απέναντι σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, με βασικά συστατικά της σύνθεσής του να περιλαμβάνουν λιποπολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες σηματοδότησης μεταξύ άλλων (Fang et al., 2021). Η διαφοροποίηση των επιμέρους συστατικών του βιοφίλμ μπορεί να επηρεάσει καθοριστικά τη διαδικασία σχηματισμού του, ενισχύοντας την ικανότητα των βακτηρίων να προσαρμόζονται σε φαρμακευτικές πιέσεις και να αναπτύσσουν μηχανισμούς αντοχής. Σε στελέχη *K. pneumoniae*, οι κυριότερες επιφανειακές δομές που συμμετέχουν στον σχηματισμό του βιοφίλμ είναι τα φιμπρίδια τύπου III και ο καψικός πολυσακχαρίτης (CPS) (Wang et al., 2020).

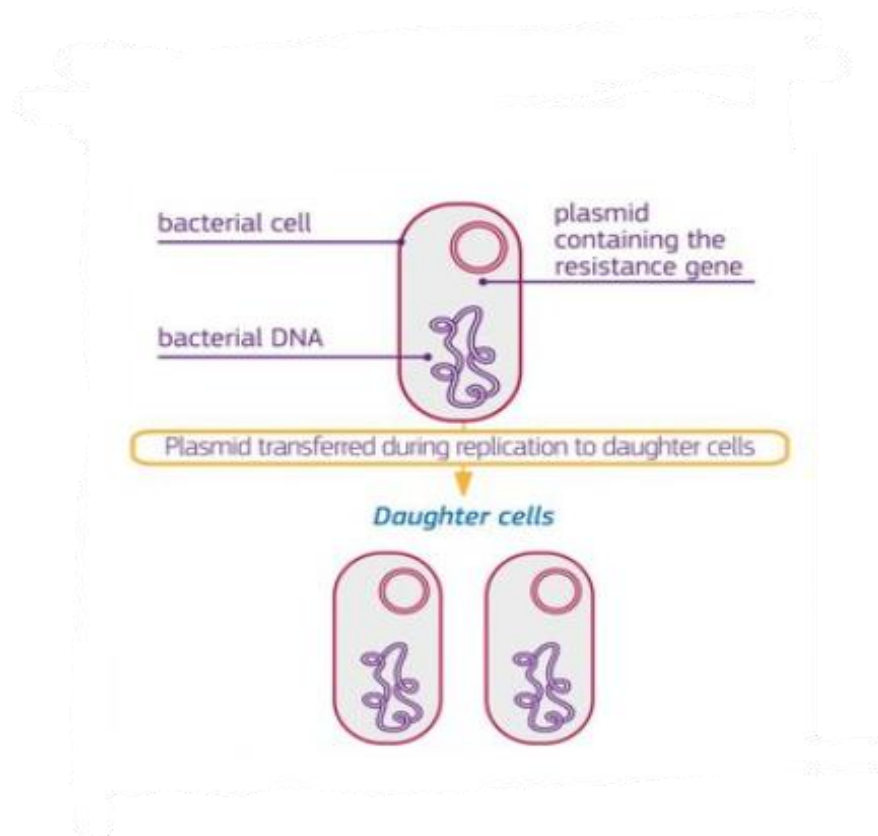
4.2 Τρόποι Απόκτησης και Μεταφοράς Αντοχής

Τα βακτήρια με την πάροδο του χρόνου ανέπτυξαν μηχανισμούς που συμβάλλουν στην επιβίωση και την εξέλιξή τους. Στη συνέχεια περιγράφονται οι τρόποι απόκτησης και μεταφοράς της αντοχής.

4.2.1 Κάθετη Μεταφορά

Η γενετική πληροφορία μεταδίδεται από γενιά σε γενιά μέσω του πολλαπλασιασμού των βακτηρίων, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση των χαρακτηριστικών τους (Εικόνα 11) (Syvanen, 2012; Lorenzo-Diaz et al., 2017). Η

επίκτητη ανθεκτικότητα αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα γενετικών μεταλλάξεων στο χρωμόσωμα, οι οποίες, υπό την πίεση της φυσικής επιλογής που ασκείται από την παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων, οδηγούν στην επικράτηση ανθεκτικών στελεχών. Ο τρόπος αυτός αποτελεί παράδειγμα απόκτησης αντοχής και κάθετης μεταβίβασης ανθεκτικών χαρακτηριστικών μέσω εξελικτικών διαδικασιών (Tenover, 2006).



Εικόνα 11. Κάθετη μεταφορά γενετικού υλικού σε βακτήρια (Sanseverino et al., 2018)

4.2.2 Οριζόντια Μεταφορά

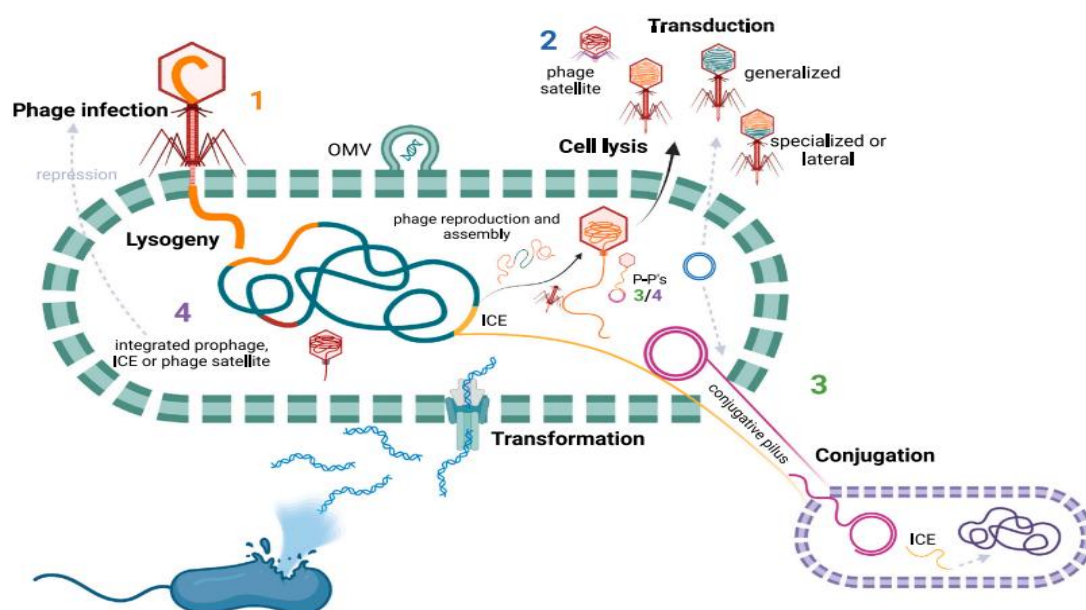
Η οριζόντια μεταφορά αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς μικροβιακής αντοχής (Lorenzo-Diaz et al., 2017). Η μεταφορά της πληροφορίας συμβαίνει μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους αλλά και διαφορετικών (Tenover, 2006; Liu et al., 2022). Το εξωγενές υλικό μεταφέρεται από είδος σε είδος κυρίως μέσω τριών τρόπων (Εικόνα 12).

4.2.2.1 Σύζευξη

Αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο μεταφοράς γενετικού υλικού και απαιτείται άμεση κυτταρική επαφή για να πραγματοποιηθεί. Κατά τη σύζευξη, μεταφέρονται γονίδια αντοχής που βρίσκονται σε πλασμίδια ή μεταθετά στοιχεία, μέσω μιας πρωτεϊνικής δομής που ονομάζεται συζευκτικό ινίδιο και ενώνει τα δυο κύτταρα (Tenover, 2006; Holmes et al, 2016; Christaki et al, 2020; Liu et al, 2022).

4.2.2.2 Μετασχηματισμός

Ο μετασχηματισμός αφορά την ενσωμάτωση του γενετικού υλικού από το εξωτερικό περιβάλλον. Το γενετικό υλικό αυτό προέρχεται από βακτηριακά κύτταρα στα οποία έχει επέλθει λύση. Αποτελεί τον πιο απλό τρόπο και ταυτόχρονα τον πιο σπάνιο στην επίκτητη αντοχή (Tenover, 2006; Holmes et al., 2016; Christaki et al., 2020; Liu et al., 2022).



Εικόνα 12. Κινητά γενετικά στοιχεία και οι κύριοι μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Moura de Sousa et al., 2023)

4.2.2.3 Μεταγωγή

Η μεταγωγή γενετικού υλικού αποτελεί έναν από τους βασικούς μηχανισμούς οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς και συμβάλλει καθοριστικά στην εξελικτική ποικιλομορφία και προσαρμοστικότητα των βακτηρίων (Madigan et al., 2018). Πρόκειται για μια διαδικασία κατά την οποία γενετικό υλικό μεταφέρεται από ένα βακτήριο σε ένα άλλο μέσω βακτηριοφάγων, δηλαδή ιών που προσβάλλουν βακτήρια (Snyder and Champness, 2007). Υπάρχουν δύο τρόποι μεταγωγής, η γενικευμένη, κατά την οποία οποιοδήποτε τμήμα του βακτηριακού γονιδιώματος μπορεί να μεταφερθεί τυχαία και η ειδική μεταγωγή, κατά την οποία η μεταφορά περιορίζεται σε γονίδια που βρίσκονται πλησίον του σημείου ενσωμάτωσης του φάγου στο χρωμόσωμα του ξενιστή (Thomas and Nielsen, 2005).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Εφαρμογές MALDI-TOF MS

Η ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών είναι το κυρίαρχο και ζητούμενο αντικείμενο στις μικροβιολογικές εφαρμογές του MALDI-TOF MS. Στην κλινική πρακτική, πολλές λοιμώξεις και ιδιαίτερα οι ενδονοσοκομειακές, όπως οι λοιμώξεις της αιματικής κυκλοφορίας και του ουροποιητικού συστήματος, προκαλούνται από ποικίλους παθογόνους αιτιολογικούς παράγοντες. Ορισμένα βακτήρια είναι ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά και το επίπεδο ανθεκτικότητας αυξάνεται, υπό την πίεση κυρίως των αντιβιοτικών, με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που μπορεί να αποτελέσει σημαντική απειλή για τον έλεγχο των λοιμώξεων στους ασθενείς, ιδίως στον Χειρουργικό Τομέα, την Αιματολογική, Ογκολογική Κλινική και τις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας.

Το εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας συμβάλλει στη διερεύνηση του λοιμογόνου παράγοντα που προκαλεί την λοίμωξη και παρέχει επίσης δεδομένα ελέγχου ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά. Η καλλιέργεια και οι βιοχημικές δοκιμασίες θεωρούνταν οι κύριες μέθοδοι για την ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων και μυκήτων, με διαφορετικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Η ταυτοποίησή των μικροβίων επιπρόσθετα βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά ή διαφορές της δομής του κυτταρικού τους τοιχώματος που αναδεικνύονται με συμβατικές τεχνικές, όπως οι χρώσεις. Λόγω των μεγάλων χρόνων διεκπεραίωσης και των δύσκολων πρωτοκόλλων, αυτές οι μέθοδοι δεν μπορούν να συντελέσουν σε γρήγορη και ακριβή ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων λαμβάνοντας υπόψη την τρέχουσα απαίτηση των κλινικών μικροβιολογικών εργαστηρίων. Από τη δεκαετία του 1960, έχουν χρησιμοποιηθεί μοριακές διαγνωστικές μέθοδοι, όπως η αλληλουχία γονιδίων 16S ή 18S rRNA, οι δοκιμασίες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time polymerase chain reaction, rt-PCR), όπως επίσης και η μέθοδος τυποποίησης Multilocus Sequence Typing (MLST) (Wang et al., 2018) για την ταυτοποίηση βακτηρίων. Αν και οι μέθοδοι που βασίζονται στη μοριακή τεχνολογία έχουν μειώσει σε μεγάλο βαθμό τον χρόνο ανίχνευσης, υπάρχει ανάγκη να μειωθεί και το κόστος με απλούστερες διαδικασίες, για κλινικές εφαρμογές μεγάλης κλίμακας. Με αυτό το κίνητρο και τα χαρακτηριστικά της τεχνικής MALDI-TOF MS, τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί το δακτυλικό αποτύπωμα μοριακής μάζας βακτηριακών κυττάρων με MALDI-TOF MS για την πραγματοποίηση ταχείας και ακριβέστερης ταυτοποίησης

των βακτηρίων και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια. Η ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών με MALDI-TOF MS είναι μία από τις πιο επιτυχημένες εφαρμογές της τεχνικής στην κλινική πράξη (Wang et al., 2018).

5.1 Ταυτοποίηση Βακτηρίων και Μυκήτων

Οι πρώτες προσπάθειες ταυτοποίησης βακτηρίων με φασματομετρία μάζας έγιναν από τους Anhalt et al., το 1975. Στη δεκαετία του 1990, η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF εισήχθη στην ταυτοποίηση βακτηρίων. Έκτοτε, μελέτες αξιολόγησαν τη σκοπιμότητα της μεθόδου για την ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών (Claydon et al., 1996; Demirev et al., 1999; Hettick et al., 2004). Το 1994, οι Cain et al. διαπίστωσαν ότι τα βακτήρια μπορούσαν να διαφοροποιηθούν χρησιμοποιώντας δακτυλικά αποτυπώματα MALDI-TOF MS υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών (Cain et al., 1994). Το 1996, οι Holland et al. πρότειναν ότι τα άθικτα αρνητικά κατά Gram βακτήρια μπορούσαν να ανιχνευθούν και ταυτοποιηθούν με MALDI-TOF MS χωρίς την ανάγκη πρωτεϊνικής εκχύλισης (Holland et al., 1996). Εμπνευσμένοι από αυτή τη μελέτη, οι Claydon et al. έδειξαν στη συνέχεια ότι το MALDI-TOF MS μπορούσε να παράγει χαρακτηριστικά φάσματα αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων, στην άθικτη κατάσταση, μέσα σε λίγα λεπτά (Claydon et al., 1996). Έκτοτε, η ταυτοποίηση με βάση το MALDI-TOF MS έχει αναπτυχθεί και εξελιχθεί πλήρως όσον αφορά την προετοιμασία του δείγματος και τη βελτιστοποίηση της βάσης δεδομένων και του λογισμικού. Έτσι και σύμφωνα με την παραπάνω περιγραφή της διαδικασίας, κατά την ταυτοποίηση βακτηρίων με MALDI-TOF MS, ολόκληρα βακτηριακά κύτταρα ή εκχυλίσματα αυτών εναποτίθενται σε ένα σημείο της πλάκας-στόχου, επικαλύπτονται με μια μήτρα και στη συνέχεια υποβάλλονται σε ανάλυση MS. Λαμβάνονται δακτυλικά αποτυπώματα κυτταρικής μοριακής μάζας, κυρίως από πολυπεπτίδια ή τις άφθονες πολύ μικρές πρωτεΐνες, ιδίως τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Διαπιστώθηκε ότι διαφορετικά είδη μπορούν να έχουν ένα διακριτό πρότυπο μάζας. Με την αντιστοίχιση προτύπων, είναι δυνατή η ταυτοποίηση βακτηρίων σε επίπεδο είδους.

Με την αρχική εστίαση της ταυτοποίησης με βάση το MALDI-TOF MS στα βακτήρια, η εφαρμογή επεκτάθηκε στη συνέχεια στην ταυτοποίηση ζυμομυκήτων και

μυκήτων, όπως νηματοειδείς μύκητες, με παρόμοιο τρόπο αποτύπωσης. Τα περισσότερα είδη ζυμομυκήτων που προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο έχουν συμπεριληφθεί στην βάση δεδομένων και οι αξιολογήσεις της MALDI TOF MS ταυτοποίησης των ζυμομυκήτων έχουν δείξει καλή απόδοση (Bader et al., 2011; Chen et al., 2013; Chao et al., 2014). Σε μια μελέτη των Zhang et al. αξιολογήθηκε η απόδοση του συστήματος VITEK MS v2.0 για την ταυτοποίηση ζυμομυκήτων που απομονώθηκαν από δείγματα ασθενών με διεισδυτικές μυκητιασικές λοιμώξεις. Στην εν λόγω μελέτη, αναλύθηκαν συνολικά 1243 στελέχη που αντιπροσώπευαν 31 είδη ζυμομυκήτων και το 97,3% των απομονώσεων ταυτοποιήθηκαν σωστά σε επίπεδο είδους. Με δεδομένα αυτά τα αποτελέσματα, αναπτύχθηκε ένας αλγόριθμος ελέγχου που συνδυάζει το σύστημα VITEK MS με επιλεγμένη συμπληρωματική αλληλουχία ριβοσωμικού DNA, ο οποίος θα μπορούσε να εφαρμοστεί πρακτικά σε προγράμματα επιτήρησης μυκητιασικών λοιμώξεων (Zhang et al., 2014). Επιπρόσθετα, με βάση αυτό το πρόγραμμα, οι Wang et al. διεξήγαγαν μια συνολική αξιολόγηση των συστημάτων Bruker MS (v3.1) και VITEK MS (v2.0), με το δεύτερο σύστημα να ταυτοποιεί με ακρίβεια το 95,4% των απομονωμένων στελεχών (2559/2683) και το πρώτο σύστημα να ταυτοποιεί με ακρίβεια το 98,8% (2651/2683) των στελεχών (Wang et al., 2016). Στην εν λόγω μελέτη, κανένα από τα συστήματα MALDI-TOF MS δεν διαφοροποίησε τα απομονωθέντα στελέχη του συμπλέγματος *M. guilliermondii*, μεταξύ των *Meyerozyma caribbica* και *M. guilliermondii* (Wang et al., 2016). Το Autof MS 1000, ένα εμπορικό σύστημα MALDI-TOF MS, είναι διαθέσιμο για την ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών ρουτίνας σε πολλά κλινικά εργαστήρια στην Κίνα από το 2018 και η ακρίβειά του συγκρίθηκε με του VITEK MS για την ταυτοποίηση 1228 απομονωθέντων στελεχών που αντιπροσώπευαν 14 διαφορετικά είδη ζυμομυκήτων εντός πέντε στενά συνδεδεμένων συμπλεγμάτων. Για τις απομονώσεις των *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* και *C. neoformans*, η ακρίβεια της ταυτοποίησης σε επίπεδο είδους ήταν 99,4% έναντι 96,3%, 98,9% έναντι 94,7%, 99,0% έναντι 79,1% και 99,4% έναντι 95,2% κατά τη χρήση των Autof MS 1000 και VITEK MS, αντίστοιχα για τους παραπάνω μύκητες (Yi et al., 2021). Επιπλέον, τα συστήματα Autof MS 1000 και VITEK MS είχαν και τα δύο καλή απόδοση στην ταυτοποίηση του ζυμομύκητα *C. auris* (Yi et al., 2021). Η μεθοδολογία MALDI-TOF MS φαίνεται να είναι πολύτιμη για την ταυτοποίηση ρουτίνας ειδών ζυμομυκήτων. Οι Wang et al. ανέφεραν βέβαια ότι τα διαφορετικά μέσα καλλιέργειας επηρέασαν την ακρίβεια ταυτοποίησης των συστημάτων Bruker

Biotyper MALDI-TOF MS και VITEK MS για την ταυτοποίηση του *C. tropicalis* (Wang H, et al., 2019). Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τον προσδιορισμό της επίδρασης των διαφορετικών μέσων καλλιέργειας στην απόδοση του MS στην ταυτοποίηση γενικά των μικροοργανισμών.

5.2 Ταυτοποίηση Αναερόβιων Βακτηρίων

Η απομόνωση και η ταυτοποίηση των αναερόβιων βακτηρίων από κλινικά δείγματα, είναι επίπονη και χρονοβόρα λόγω της αργής ανάπτυξης και των ιδιαίτερων θρεπτικών και ατμοσφαιρικών απαιτήσεων αυτών των μικροοργανισμών. Συνήθως, τα αναερόβια βακτήρια ταυτοποιούνται με μορφολογικά χαρακτηριστικά και βιοχημικές μεθόδους, καθώς και με υγρή-αέρια χρωματογραφική ανάλυση των μεταβολικών λιπαρών οξέων (Jousimies-Somer et al., 2002; Citron, 2012). Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη δυνατότητα του MALDI-TOF MS στην ταυτοποίηση αναερόβιων βακτηρίων. Οι πρώτες μελέτες για την ταυτοποίηση αναερόβιων με MALDI TOF MS ανέφεραν χαμηλού βαθμού ταυτοποίηση για ορισμένα αναερόβια είδη και γένη λόγω του περιορισμένου εύρους των βάσεων δεδομένων αναφοράς (La Scola et al., 2011; Nagy et al., 2012; Li et al., 2019). Αργότερα, οι μελέτες έδειξαν ότι το ποσοστό ταυτοποίησης του MALDI-TOF MS υπερέβαινε το 80%.

Το MALDI-TOF MS μπορεί να ταυτοποιήσει κοινά αναερόβια και η ακρίβεια της ταυτοποίησης είναι υψηλότερη από εκείνη των κλασικών βιοχημικών μεθόδων εξέτασης. Έτσι, οι Garner et al. έδειξαν ότι με την εφαρμογή του MALDI-TOF MS ταυτοποιήθηκε σωστά και με ακρίβεια το 92,5% (602/651) των αναερόβιων βακτηρίων σε επίπεδο γένους και 91,2% (591/651) σε επίπεδο είδους (Garner et al., 2014). Σε μια άλλη μελέτη αναφέρεται ότι τα ποσοστά ταυτοποίησης του MALDI-TOF MS ήταν 99,3% και 89,1% σε επίπεδο γένους και είδους, αντίστοιχα (Jamal et al., 2013). Οι Rodríguez-Sánchez et al. κατέγραψαν επίσης 97,0% ορθή ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και 85,8% σε επίπεδο είδους (Rodriguez-Sanchez et al., 2016).

Σε μια μετα-ανάλυση, οι Li et al., αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα της MALDI-TOF MS μεθοδολογίας στην ταυτοποίηση κλινικών παθογόνων αναερόβιων, συμπεριλαμβανομένων των *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Parabacteroides* spp., *Clostridium* spp, *Propionibacterium* spp., *Prevotella* spp., *Veillonella* spp. και *Peptostreptococcus* spp. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η μέθοδος MALDI-TOF MS

ταυτοποίησε σωστά τα αναερόβια σε επίπεδο γένους και είδους σε ποσοστό 92% και 84%, αντίστοιχα. Η ακρίβεια ταυτοποίησης του *Bacteroides* spp. ήταν η υψηλότερη, ενώ τα μεγαλύτερα σφάλματα ταυτοποίησης αφορούσαν σπάνια είδη (Li et al., 2019). Οι Wang et al. ανέφεραν την ακρίβεια τριών συστημάτων MALDI-TOF MS για την ταυτοποίηση 138 κλινικών ομάδων *B. fragilis*. Συνολικά, 94,2%, 94,2%, 98,6% και 94,9% ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους χρησιμοποιώντας τα VITEK MS, Clin-ToF-II MS, Autof MS 1000 και VITEK 2 ANC (αυτοματοποιημένη κλασική μέθοδος), αντίστοιχα (Wang Y, et al., 2019). Συμπερασματικά, η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF αποτελεί μια τεκμηριωμένα αποτελεσματική μέθοδο για την ταυτοποίηση αναερόβιων βακτηρίων. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, η διακριτική ικανότητα της τεχνικής είναι περιορισμένη, ιδίως όταν πρόκειται για στελέχη με παρόμοια προφίλ, γεγονός που καθιστά δυσχερή την ταυτοποίησή τους σε επίπεδο είδους (Ulger et al., 2018).

5.3 Ταυτοποίηση Πρωτεϊνών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός και η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις αποτελούν έναν ακόμη σημαντικό τομέα εφαρμογής της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF-MS. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στην αρχή του σχηματισμού «χαρτών» μάζας πεπτιδίων, καθώς και στα χαρακτηριστικά φασματικά αποτυπώματα των πεπτιδίων (peptide mass fingerprints). Για τον σκοπό αυτό, οι πρωτεΐνες υπόκεινται σε πρωτεολυτική επεξεργασία, προκειμένου να παραχθούν ειδικές αλληλουχίες αμινοξέων. Το MALDI-TOF-MS επιτρέπει την ακριβή ανάλυση αυτών των πεπτιδικών θραυσμάτων, με βάση τις διαφορές στη μάζα τους. Τα φάσματα που προκύπτουν είναι ειδικά και μοναδικά για κάθε πρωτεΐνη, καθιστώντας δυνατή την ταυτοποίησή της ως ένα είδος «μοριακού δακτυλικού αποτυπώματος». Η διαλογή της βάσης δεδομένων σύμφωνα με τα λαμβανόμενα δεδομένα μάζας καθιστά εφικτή την ταυτοποίηση πολλών πρωτεϊνών (Zanders, 2012).

6. Ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών από απομονωθέν στέλεχος

Η φασματομετρία μάζας τύπου MALDI-TOF MS αποτελεί πλέον ακρογωνιαίο λίθο στην ταχεία μικροβιακή ταυτοποίηση. Ιδιαίτερα για τα Εντεροβακτηριοειδή, η τεχνολογία αυτή επιτρέπει την άμεση ταυτοποίησή τους απευθείας από βακτηριακή αποικία, προσφέροντας αξιοπιστία και ταχύτητα συνδυάζοντας και το χαμηλό κόστος (Oviano and Bou, 2019).

6.1 Προετοιμασία Δείγματος

Η διαδικασία ξεκινάει με την επιλογή της κατάλληλης αποικίας από το θρεπτικό υλικό, συνήθως αιματούχο ή MacConkey άγαρ, έπειτα από 18-24 ώρες επώαση. Για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα επιλέγεται πάντα αμιγής, «καθαρή» αποικία, χωρίς εμφανή μόλυνση ή προσμίξεις και με αποστειρωμένο κρικοφόρο στυλεό συλλέγεται και εναποτίθενται στην μεταλλική πλάκα του αναλυτή (Richter et al., 2013).

Για τα περισσότερα Εντεροβακτηριοειδή, η μέθοδος απευθείας τοποθέτησης (on-plate extraction) έχει αποδειχθεί κατάλληλη, μειώνοντας την ανάγκη για προεργασία του δείγματος με αιθανόλη ή φορμικό οξύ. Η αποδέσμευση επιτυγχάνεται μέσω της ανάμειξης 1-2μl διαλύματος μήτρας, κυρίως α-κυανο-4-υδροξυκινναμικού οξέος (HCCA). Η πλάκα αφήνεται να στεγνώσει πλήρως πριν την ανάλυση. Μολονότι, η απευθείας μέθοδος είναι εξαιρετικά αποτελεσματική για κοινά είδη όπως τα βακτήρια *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* και *C. freundii*, η εφαρμογή του διπλού πρωτοκόλλου, δηλαδή προηγηθείσα εκχύλιση με φορμικό οξύ και στη συνέχεια τοποθέτηση επί της μήτρας συνιστάται σε περιπτώσεις ασθενών σημάτων ή για ακριβέστερη διάκριση στελεχών (Sparbier et al., 2012).

6.1.1 Αξιοπιστία Μεθόδου

Πολυάριθμες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την αξιοπιστία της μεθόδου. Μια από αυτές είναι των Richter et al., (2013) όπου αναφέρθηκαν ποσοστά ορθής ταυτοποίησης σε επίπεδο είδους πάνω από 97% για τα Εντεροβακτηριοειδή, με σκόρ >2.0, χρησιμοποιώντας το σύστημα VITEK MS απευθείας σε αποικίες. Αντίστοιχα, οι Lasch et al., επιβεβαίωσαν τη σταθερότητα των φασμάτων και την αναπαραγωγιμότητα των αποτελεσμάτων. Η μέθοδος παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία

στη διαφοροποίηση κοινών Εντεροβακτηριοειδών όπως *E. coli*, *K. pneumoniae* και *E. cloacae* (Lasch et al., 2016).

6.1.2 Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί Μεθόδου

Η μέθοδος της απευθείας ταυτοποίησης Εντεροβακτηριοειδών από αποικία προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε επίπεδο χρόνου αποτελέσματος, καθώς η πλήρη ταυτοποίηση μπορεί να επιτευχθεί εντός 10 λεπτών από την τοποθέτηση της αποικίας στον αναλυτή (Oviano and Bou, 2019). Ταυτόχρονα, η χρήση της μεθόδου αυτής συμβαδίζει με την ανάγκη για πρόωμη έναρξη εμπειρικής θεραπείας, σε λοιμώξεις από πολυανθεκτικά Εντεροβακτηριοειδή. Παρά τα πλεονεκτήματα, η μέθοδος απαιτεί υψηλό επίπεδο καθαρότητας αποικίας, καθώς μικτές αποικίες ή παρουσία μεταβολιτών, φέρουν την πιθανότητα αλλοίωσης του αποτελέσματος. Επιπλέον, ορισμένα συγγενικά είδη παραμένουν δυσδιάκριτα και ίσως απαιτηθεί ενσωμάτωση επιπλέον μεθόδων για βελτιωμένη ακρίβεια (Sparbier et al., 2012).

7. Ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών από Κλινικό Δείγμα

7.1 Άμεση Ταυτοποίηση από Δείγμα Ούρων

Οι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος συγκαταλέγονται στις συχνότερες βακτηριακές λοιμώξεις τόσο στον γενικό πληθυσμό όσο και στους νοσηλευόμενους ασθενείς, με εκτιμώμενη επίπτωση που αγγίζει τα 150 εκατομμύρια περιστατικά παγκοσμίως κάθε χρόνο (Foxman et al., 2000; Nicolle, 2013; Flores-Mireles et al., 2015; McLellan and Hunstad, 2016). Αποτελούν περίπου το 25% όλων των βακτηριακών λοιμώξεων, με το βακτήριο *E. coli* να ευθύνεται για το 60-80% των περιπτώσεων. Το δεύτερο πιο συχνά απομονωθέν στέλεχος αποτελεί η *K. pneumoniae* (Foxman et al., 2010).

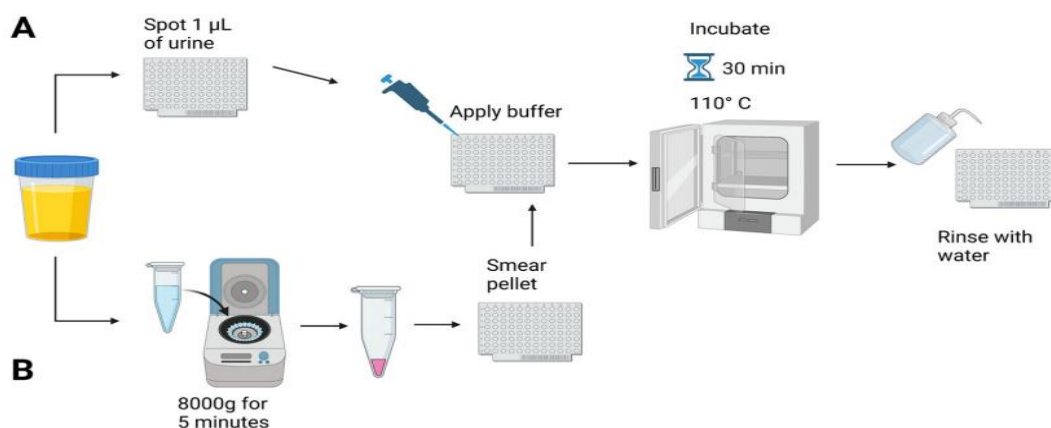
Η καλλιέργεια ούρων παραμένει το καθιερωμένο πρότυπο (gold standard) για τη διάγνωση των ουρολοιμώξεων, καθώς επιτρέπει την ταυτοποίηση του παθογόνου, όπως επίσης και τη διενέργεια ελέγχου ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά (Antimicrobial susceptibility testing, AST). Εντούτοις, η διαδικασία είναι χρονοβόρα, με την αρχική καλλιέργεια και την ταυτοποίηση να χρειάζονται 18-48 ώρες και τον έλεγχο ευαισθησίας να απαιτεί επιπλέον 18-24 ώρες (Íñigo et al., 2016). Η

ύπαρξη $>10^5$ CFU/mL ενός μόνο μικροοργανισμού σε δείγμα ούρων παρουσιάζει συνήθως κλινική ευαισθησία και διαγνωστική αξία (Burd et al., 2011). Παρόλο που μέθοδοι, όπως η χρώση κατά Gram, η κυτταρομετρία ροής και η βιοχημική εκτίμηση με ταινίες (stick) ούρων παρέχουν ταχεία προκαταρκτική εκτίμηση, δεν επαρκούν για τεκμηριωμένη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων (Davenport et al., 2017).

Η ανάγκη για ταχύτερες και αξιόπιστες διαγνωστικές τεχνικές έχει οδηγήσει στην αξιοποίηση μεθόδων μοριακής και πρωτεομικής ανάλυσης. Η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF, όπως αναφέρθηκε, έχει αναδειχθεί ως καινοτόμο εργαλείο για την ταχεία και ακριβή ταυτοποίηση βακτηρίων. Πρόσφατες μελέτες τεκμηριώνουν τη δυνατότητα άμεσης εφαρμογής της τεχνικής σε δείγματα ούρων, παρακάμπτοντας τη φάση της καλλιέργειας (Ferreira et al., 2010; Ferreira et al., 2010b; Wang et al., 2013; Burillo et al., 2014; Íñigo et al., 2016; Zboromyrska et al., 2016; Huang et al., 2017; Zboromyrska et al., 2018). Επιπλέον, η μεθοδολογία MALDI-TOF MS έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την ανίχνευση ενζυμικής δραστηριότητας, όπως αυτή των β-λακταμασών, γεγονός που ενισχύει τη διαγνωστική της αξία (Papagiannitsis et al., 2015; Lasserre et al., 2015; Oviano et al., 2016).

7.1.1 Επεξεργασία Δείγματος Ούρων

Υπάρχουν 2 τρόποι επεξεργασίας του δείγματος ούρων κατά την ανάλυση μέσω MALDI-TOF MS. Η πρώτη μέθοδος αφορά την απευθείας τοποθέτηση του δείγματος στην πλάκα του αναλυτή, ενώ η δεύτερη μέθοδος αφορά την προ-επεξεργασία του δείγματος πριν την τοποθέτησή του στην πλάκα του αναλυτή (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Παρουσίαση μεθόδων επεξεργασίας του υπό μελέτη δείγματος, *A)* απευθείας τοποθέτηση δείγματος στην πλάκα-στόχο και *B)* επεξεργασία δείγματος πριν την τοποθέτηση στην πλάκα-στόχο του αναλυτή (Hyojik et al., 2022)

Για την άμεση ταυτοποίηση, χρησιμοποιείται μια μικρή ποσότητα του δείγματος ούρων (~1µL) και εφαρμόζεται ως λεπτός υμένος/ταπήτιο επί της πλάκας στόχου του MALDI-TOF. Το δείγμα επέρχεται σε πλήρη ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η επιφάνεια της πλάκας επικαλύπτεται με 1µL διαλύματος μήτρας (HCCA). Τέλος, το δείγμα επωάζεται έως ότου ξηρανθεί πλήρως και τοποθετείται στον αναλυτή (Hyojik et al., 2022).

Στη δεύτερη περίπτωση, δείγμα ούρων (~10µL) φυγοκεντρείται αρχικά στις 2.500 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 30 δευτερόλεπτα με σκοπό την απομάκρυνση κυτταρικών στοιχείων, κυρίως λευκοκυττάρων. Στη συνέχεια, συλλέγεται το υπερκείμενο προσεκτικά και φυγοντρεύεται εκ νέου στις 6.000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά ώστε να καθιζάνουν τα βακτηριακά κύτταρα. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 500µL απιονισμένου νερού. Έπειτα, προστίθενται 40µL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (ενδεικτικά Sepsityper Kit, Bruker Daltonik), και ακολουθεί ομογενοποίηση του δείγματος χρησιμοποιώντας αναδευτή. Ακολουθούν 2 διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 14.000 στροφές για 2 λεπτά με τη μόνη διαφορά ότι πριν τη δεύτερη φυγοκέντρωση το ίζημα υποβάλλεται σε ένα πλύσιμο με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (1mL). Τέλος, μετά την τελευταία φυγοκέντρωση, 1µL του δείγματος τοποθετείται στην πλάκα και ακολουθεί την ίδια διαδικασία με την απευθείας τοποθέτηση του δείγματος χωρίς επεξεργασία στην πλάκα του αναλυτή (Oviano et al., 2017).

7.1.2 Αξιολόγηση MALDI-TOF MS στην Άμεση Ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών από Δείγματα Ούρων

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου έχει αξιολογηθεί σε διάφορες ανεξάρτητες μελέτες με ποικίλες πειραματικές διατάξεις, δείγματα και τεχνικές προετοιμασίας. Σε μία μελέτη, τα αποτελέσματα της εφαρμογής της μεθόδου MALDI-TOF MS για την άμεση ταυτοποίηση βακτηρίων από δείγματα ούρων χωρίς προηγούμενη καλλιέργεια κρίνονται ιδιαίτερα ικανοποιητικά. Η μέθοδος εμφάνισε υψηλή διαγνωστική απόδοση όταν ο αριθμός των βακτηρίων υπερέβαινε τα 10^5 CFU/ml και ο παθογόνος μικροοργανισμός ήταν Gram-αρνητικός. Σε αυτή την υποομάδα, το ποσοστό αποτυχίας δεν ξεπέρασε το 5,4%. Σε σύνολο 220 θετικών δειγμάτων με υψηλό βακτηριακό φορτίο, παρατηρήθηκε συμφωνία με την παραδοσιακή καλλιέργεια σε ποσοστό 91,8% σε επίπεδο είδους και 92,7% σε επίπεδο γένους ή είδους. Ο συχνότερα ανιχνευόμενος μικροοργανισμός ήταν το *E. coli*, με τη MALDI-TOF MS να επιτυγχάνει επιτυχή ταυτοποίηση στο 94,2% απευθείας από τα ούρα. Σε μικτές καλλιέργειες, η τεχνική απέτυχε να ταυτοποιήσει μικροοργανισμούς σε δύο περιπτώσεις, ενώ παρείχε ταυτοποίηση σε τρεις, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στην αναλογία μεταξύ των εμπλεκόμενων βακτηριακών πληθυσμών (Ferreira et al., 2010b).

Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη, το *E.coli* αναδείχθηκε ως το συχνότερα απομονωμένο από τα Εντεροβακτηριοειδή (43,2%), ακολουθούμενο από την *K. pneumoniae* (15,3%) (Zboromyrska et al., 2019).

Σε μελέτη των Wang et al., αξιολογήθηκε η ικανότητα της μεθόδου MALDI-TOF MS να ανιχνεύει δύο διαφορετικά βακτήρια σε μικτά δείγματα ούρων. Για τον σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν πειραματικά μίγματα αποστειρωμένων αλατούχων διαλυμάτων με δύο είδη βακτηρίων σε διαφορετικές αναλογίες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ταυτοποίηση και των δύο ειδών ήταν δυνατή μόνο όταν οι αναλογίες τους ήταν 1:1 ή 1:2. Από το σύνολο 1.456 κλινικών δειγμάτων, σε 44 απομονώθηκαν δύο διαφορετικά είδη βακτηρίων από την καλλιέργεια. Σε 4 από αυτά, η μεθοδολογία MALDI-TOF MS ταυτοποίησε και τα δύο είδη και σε 20 δείγματα, ταυτοποιήθηκε μόνο ένα από τα δύο. Στα υπόλοιπα 20 δείγματα, η ταυτοποίηση ήταν μη αξιόπιστη και ανακριβής, γεγονός που αναδεικνύει ότι η αποτελεσματικότητα της MALDI-TOF MS σε μικτές καλλιέργειες περιορίζεται σημαντικά από την αναλογία των μικροοργανισμών στο δείγμα (Wang et al., 2013).

Τέλος, οι Oviano et al., εστίασαν στην ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει καρβαπενεμάσες. Η ευαισθησία και η ειδικότητα έφτασαν το 100% με αποτελέσματα διαθέσιμα εντός 90 λεπτών (Oviano et al., 2017). Τα δεδομένα συγκρίθηκαν και επιβεβαιώθηκαν με PCR επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία της τεχνικής για φαινοτυπικό έλεγχο αντοχής (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Μελέτες αναφοράς ταυτοποίησης Εντεροβακτηριοειδών σε δείγμα ούρων μέσω MALDI-TOF MS.

Μελέτη	Αριθμός δειγμάτων	Ποσοστό Επιτυχούς Ταυτοποίησης και αντοχής	Βασικά Παθογόνα
Ferreira et al., (2010b)	260	91,8% (<i>E. coli</i> 94,2%)	<i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i>
Oviano et al., (2017)	105	100% (Oxa-48 ανίχνευση)	Πολυανθεκτικά Εντεροβακτηριοειδή
Zboromyska et al., (2019)	1638	86,4%	<i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i>
Oros et al., (2020)	16	87% (μονοβακτηριακά δείγματα)	<i>Klebsiella</i> ; <i>Proteus</i> ; <i>Citrobacter</i>
Neuenschwander et al., (2023)	230	>90%	Gram-αρνητικά βακτήρια

7.1.3 Περιορισμοί Ταυτοποίησης Εντεροβακτηριοειδών σε Δείγμα Ούρων

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματά της, η εφαρμογή της μεθόδου MALDI-TOF MS στην άμεση ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών συνοδεύεται από ορισμένους περιορισμούς. Ειδικότερα, η τεχνική παρουσιάζει δυσκολία στη διακριτική ικανότητα μεταξύ στενά συγγενικών ειδών, όπως το *E. coli* και τα είδη *Shigella* spp., λόγω της υψηλής ομοιότητας στα φασματογραφικά τους προφίλ, γεγονός που ενδέχεται να οδηγήσει σε σφάλματα στην ταυτοποίηση (Bizzini & Greub, 2010). Σε δείγματα με περισσότερους από έναν μικροοργανισμούς, η μεθοδολογία MALDI-TOF MS μπορεί να ταυτοποιήσει μόνο το κυρίαρχο είδος ή να αποτύχει συνολικά λόγω επικαλυπτόμενων φασμάτων (Clark et al., 2013).

Ειδικότερα για δείγματα ούρων, η ευαισθησία της τεχνικής μειώνεται σε δείγματα με χαμηλό αριθμό βακτηρίων ($<10^5$ CFU/mL), με αποτέλεσμα την αποτυχία ταυτοποίησης χωρίς να προηγηθεί εμπλουτισμός (Ferreira et al., 2010; Ferreira et al., 2010b). Σε άλλες μελέτες όπου συνδυάστηκε η χρώση Gram μαζί με MALDI-TOF MS σε δείγματα ούρων, ο συνδυασμός των δύο διαγνωστικών τεχνικών παρείχε πληροφορίες που προέβλεπαν το αποτέλεσμα της καλλιέργειας σε ποσοστό 82,7% των περιπτώσεων και σημαντικά υψηλότερο απ' ότι με την εφαρμογή μόνο της φασματομετρίας. Σε ποσοστό 13,4% παρατηρήθηκαν ελάσσονος σημασίας αποκλίσεις, ενώ σοβαρά σφάλματα καταγράφηκαν στο 3,9% των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα ήταν διαθέσιμα εντός μίας ώρας. Συνολικά, ο αλγόριθμος διάγνωσης με τον συνδυασμό των μεθόδων παρείχε πληροφορίες πλήρως συμβατές ή με μικρές αποκλίσεις σε ποσοστό 96,1% των δειγμάτων ούρων από ασθενείς με υποψία ουρολοίμωξης (Burillo et al., 2014). Η κατανόηση και η τεχνική αντιμετώπιση των περιορισμών αυτών είναι απαραίτητη για την ασφαλή κλινική εφαρμογή της.

7.2 Άμεση Ταυτοποίηση από Θετική Αιμοκαλλιέργεια

Οι λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος (Bloodstream Infections-BSI) αποτελούν ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα δημόσιας υγείας παγκοσμίως, καθώς συνδέονται με υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας (Fleischmann et al., 2016). Επιπλέον, επηρεάζουν σημαντικά τη διάρκεια νοσηλείας και επιβαρύνουν οικονομικά τα υγειονομικά συστήματα (Delport et al., 2017). Οι λοιμώξεις αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε σηψαιμία, σηπτικό σοκ και πολυοργανική ανεπάρκεια εάν δεν διαγνωστούν και δεν αντιμετωπιστούν έγκαιρα (Kern and Reg, 2020).

Η ανάγκη για ταχεία και αξιόπιστη διάγνωση των υπεύθυνων μικροοργανισμών στις βακτηριαιμίες είναι ιδιαίτερα επιτακτική. Η έγκαιρη ταυτοποίηση του παθογόνου παράγοντα σε περιστατικά BSI είναι καθοριστικής σημασίας για την έναρξη στοχευμένης και αποτελεσματικής αντιμικροβιακής θεραπείας (Idelevich et al., 2014; Verroken et al., 2015; Kohlmann et al., 2015). Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα, κάθε ώρα καθυστέρησης στη χορήγηση κατάλληλης αγωγής σε ασθενείς με σηπτικό σοκ συνεπάγεται μείωση ποσοστού επιβίωσης έως και 7,6% (Kumar et al., 2006). Επομένως, η πρώιμη ανίχνευση τόσο των παθογόνων όσο και των μηχανισμών ανθεκτικότητας που φέρουν, αποτελεί βασική στρατηγική για τη βελτίωση της πρόγνωσης των ασθενών. Η καλλιέργεια αίματος αποτελεί το “χρυσό πρότυπο” για τη διάγνωση των λοιμώξεων αυτών (Jiajia

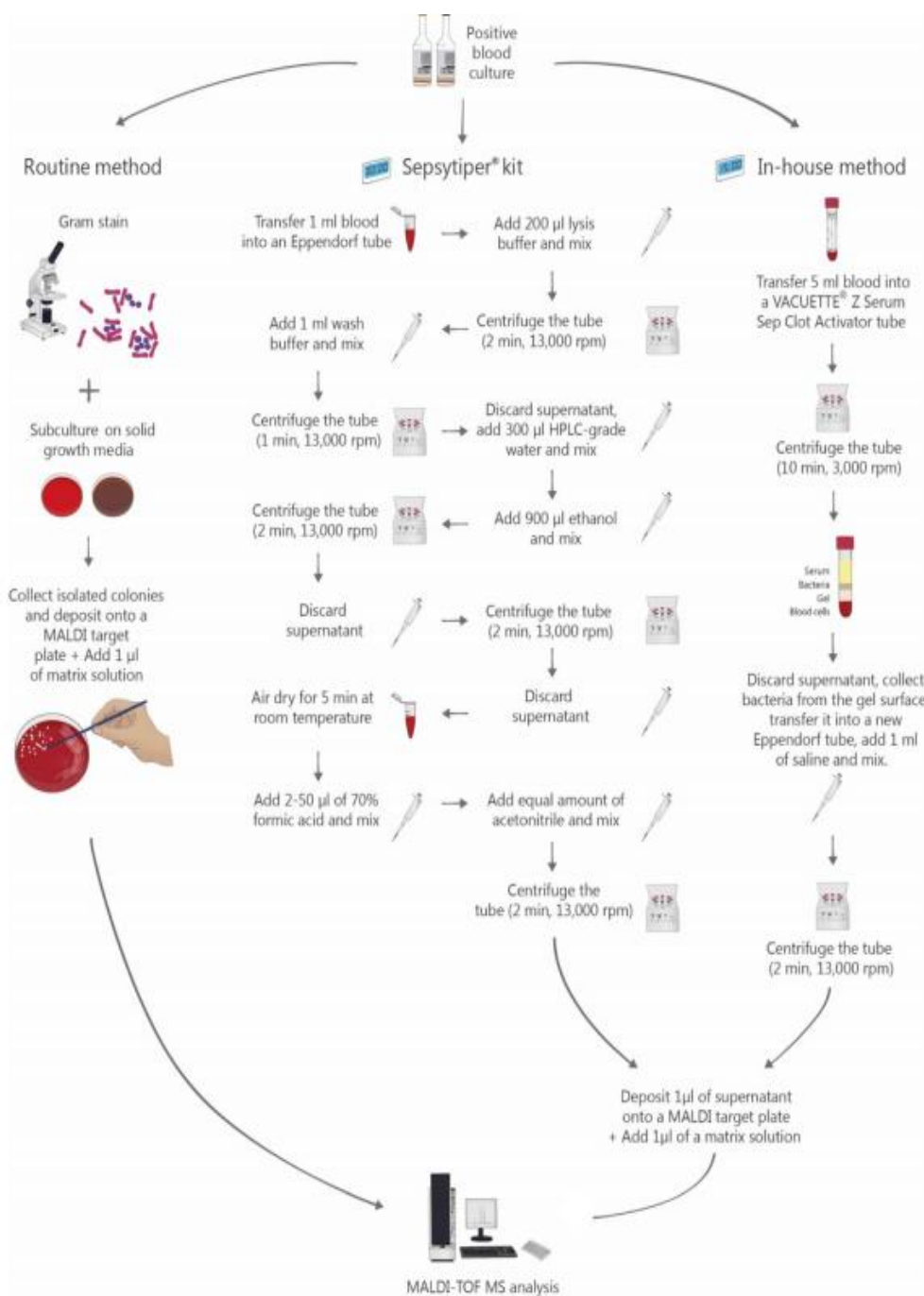
et al., 2018). Στη συνήθη μικροβιολογική πρακτική, οι θετικές φιάλες αιμοκαλλιέργειας επανακαλλιεργούνται σε στερεά θρεπτικά μέσα. Μετά την επώαση, οι αναπτυχθείσες αποικίες υποβάλλονται σε διαδικασία ταυτοποίησης. Οι συχνότεροι αιτιολογικοί παράγοντες βακτηριαιμίας (BSI) είναι Gram-αρνητικά βακτήρια, με κυρίαρχα είδη τα *E. coli* και *K. pneumoniae*, τα οποία ευθύνονται για ποσοστό άνω του 50% αυτών των λοιμώξεων (Lawandi, 2023). Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί η ραγδαία αύξηση στελεχών Εντεροβακτηριοειδών που φέρουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες. Η ταχεία ανίχνευση των CRE σε θετικές καλλιέργειες αίματος είναι κρίσιμη (Rhee et al., 2020). Εδώ, η μέθοδος MALDI-TOF MS μπορεί να διαδραματίσει διττό ρόλο, καθώς πέραν της ταχείας ταυτοποίησης του παθογόνου, παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης της ενζυμικής δραστηριότητας των καρβαπενεμασών. Μελετώντας το προφίλ υδρόλυσης της ερταπενέμης, είναι δυνατός ο εντοπισμός της παρουσίας ενζύμων που υδρολύουν το φάρμακο, χωρίς να απαιτείται η απομόνωση καθαρών αποικιών (Roncarati et al., 2021).

7.2.1 Επεξεργασία Δείγματος Θετικής Αιμοκαλλιέργειας

Σύμφωνα με τα πειραματικά πρωτόκολλα διακρίνονται τρεις μέθοδοι επεξεργασίας δείγματος έπειτα από την θετικοποίηση της αιμοκαλλιέργειας. Η πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει την ανακαλλιέργεια του δείγματος σε θρεπτικό υπόστρωμα, ακολουθούμενη από ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών με χρήση της τεχνικής MALDI-TOF MS. Η δεύτερη βασίζεται στην άμεση επεξεργασία του δείγματος με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμου κιτ (π.χ. Sepsityper kit). Τέλος, η τρίτη προσέγγιση αφορά την εφαρμογή μιας εναλλακτικής, εργαστηριακά ανεπτυγμένης ('in-house') μεθόδου (Εικόνα 14).

7.2.1.1 Ταυτοποίηση Θετικής Αιμοκαλλιέργειας μετά από Ανακαλλιέργεια

Μετά την ανίχνευση ανάπτυξης μικροοργανισμών στην αιμοκαλλιέργεια και την αρχική εκτίμηση με χρώση Gram, τα θετικά δείγματα για Gram αρνητικά βακτήρια υποβάλλονται σε ανακαλλιέργεια σε επιλεγμένα θρεπτικά μέσα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνται Blood agar, MacConkey agar και Chocolate agar, τα οποία επωάζονται στους $36 \pm 1^\circ\text{C}$, σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 για 18-24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, οι αναπτυγμένες αποικίες απομονώνονται και, εφόσον διαπιστωθεί καθαρότητα της καλλιέργειας, μεταφέρονται στην πλάκα-στόχο για ταυτοποίηση με τη μέθοδο MALDI-TOF MS (Εικόνα 14) (Azrad et al., 2019).



Εικόνα 14. Μεθοδολογία επεξεργασίας δείγματος μετά από θετική αιμοκαλλιέργεια (Azrad *et al.*, 2019)

7.2.1.2 Ταυτοποίηση Θετικής Αιμοκαλλιέργειας μέσω Εμπορικά Διαθέσιμων Μεθοδολογιών MALDI-TOF

Η μέθοδος αυτή αναλύεται και περιγράφεται από τους κατασκευαστές του εμπορικά διαθέσιμου κιτ προκειμένου να εφαρμοστεί άμεσα σε θετική αιμοκαλλιέργεια μετά από σύντομη επεξεργασία του δείγματος, (π.χ. Sepsityper kit).

Από τη θετική καλλιέργεια αίματος συλλέγεται 1mL και μεταφέρεται σε σωληνάρια τύπου Eppendorf. Στο δείγμα προστίθενται 200μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και το μείγμα αναδεύεται έντονα για 10 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές ανά λεπτό (rpm), μετά την οποία το υπερκείμενο απορρίπτεται και το προκύπτον δείγμα επαναιωρείται σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Η διαδικασία φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται για 1 λεπτό στις 13.000 στροφές και μετά την απόρριψη του υπερκείμενου, το δείγμα επαναιωρείται σε 300μL ύδατος υψηλής καθαρότητας (τύπου HPLC). Στο εναίωρημα προστίθενται 900μL αιθανόλης και ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το δείγμα φυγοκεντρείται ξανά υπό τις ίδιες συνθήκες. Μετά την τελική απόρριψη του υπερκείμενου, το ίζημα αφήνεται να ξηρανθεί στον αέρα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, επαναιωρείται σε 2-50μL διαλύματος 70% μυρμηκικού οξέος και ίσο όγκο ακετονιτριλίου. Μετά την τελική φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές, 1μL του υπερκείμενου τοποθετείται στην πλάκα-στόχο και υποβάλλεται σε φασματομετρική ανάλυση (Εικόνα 14) (Azrad et al., 2019).

7.2.1.3 Ταυτοποίηση Θετικής Αιμοκαλλιέργειας μέσω in-house Μεθόδου

Από κάθε θετική καλλιέργεια αίματος συλλέγονται 5mL και μεταφέρονται σε σωληνάρια VACUETTE® Z Serum Sep Clot Activator tube (Greiner Bio-One, North Carolina, USA), τα οποία περιέχουν αδρανές διαχωριστικό πήκτωμα. Μετά από φυγοκέντρηση 10 λεπτών στις 3000 στροφές, το πήκτωμα σχηματίζει φραγμό μεταξύ του ορού και των κυττάρων του αίματος. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται με προσοχή και συλλέγεται μικρή ποσότητα κυτταρικού υλικού από την επιφάνεια της διαχωριστικής πηκτής. Το υλικό αυτό επαναιωρείται σε 1mL ισοτονικού φυσιολογικού ορού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές και 1μL από το υπερκείμενο τοποθετείται στην πλάκα-στόχο MALDI για ανάλυση φάσματος (Εικόνα 14) (Azrad et al., 2019).

7.2.2 Αξιολόγηση MALDI-TOF MS στην Άμεση Ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών από Θετική Αιμοκαλλιέργεια

Η ανάλυση δεδομένων από πολυάριθμες ερευνητικές μελέτες υποστηρίζει την υψηλή απόδοση της μεθόδου MALDI-TOF MS στην ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών απευθείας από θετικές αιμοκαλλιέργειες. Τα ποσοστά επιτυχούς ταυτοποίησης κυμαίνονται σε αρκετά υψηλά επίπεδα, με συγκεκριμένες αναφορές να φτάνουν έως και το 96%, σύμφωνα με μετα-αναλύσεις και συστηματικές ανασκοπήσεις (Florio et al., 2018; Morgenthaler and Kostrzewa, 2021). Βάσει των δεδομένων από έρευνες τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μέθοδο ταυτοποίησης MALDI-TOF MS και αυτών από τις συμβατικές μεθόδους ανέρχονται σε συμφωνία άνω του 95%, γεγονός που υποδηλώνει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (Florio et al., 2018).

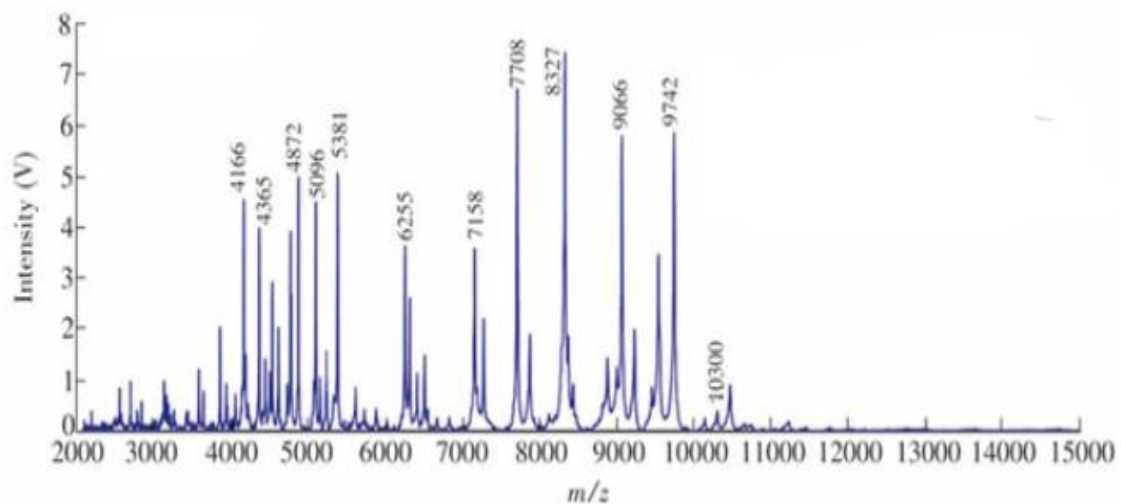
Λαμβάνοντας υπόψιν προηγούμενες μελέτες, ο χρόνος ταυτοποίησης μειώνεται σημαντικά σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Η μέθοδος επιτρέπει την ταυτοποίηση στελέχους Εντεροβακτηριοειδών εντός 1-3 ωρών από τη λήψη σήματος θετικής αιμοκαλλιέργειας, έναντι των 24-48 ωρών που απαιτούνται για την ταυτοποίηση μέσω συμβατικών κλασικών μεθόδων (Morgenthaler and Kostrzewa, 2021). Αναφορικά με την ποιότητα ταυτοποίησης, η ανάλυση βαθμολογιών για τα Εντεροβακτηριοειδή λαμβάνει τιμές μεγαλύτερες του 2.3, η οποία τιμή θεωρείται ως ασφαλής ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους (Πίνακας 4) (Florio et al., 2018).

Πίνακας 4. Βαθμολογίες Ταυτοποίησης MALDI-TOF MS (Florio et al., 2018)

ΒΑΘΜΟΛΟΓΙΕΣ (SCORE)	ΑΝΑΛΥΣΗ
<1.7	Μη αξιόπιστη ταυτοποίηση (απαιτείται συμπληρωματική ανάλυση)
2.0 - 2.3	Πιθανή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους (περαιτέρω επιβεβαίωση)
>2.3	Ασφαλής ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους

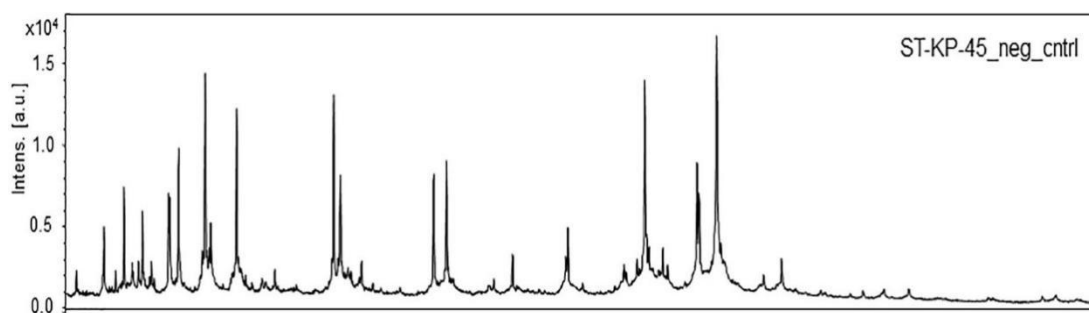
Τα πιο συχνά είδη των Εντεροβακτηριοειδών που προκαλούν λοιμώξεις αιματικής ροής, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, είναι τα βακτήρια *E. coli* και *K. pneumoniae*, όπως και άλλα Εντεροβακτηριοειδή (Florio et al., 2018; Morgenthaler and Kostrzewa, 2021).

Το ποσοστό επιτυχούς ταυτοποίησης του βακτηρίου *E. coli* μέσω της μεθόδου MALDI-TOF MS κυμαίνεται μεταξύ 96,5% και 98,2%. Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται ενδεικτικά το φάσμα μαζών που λαμβάνεται για το συγκεκριμένο είδος (Yu et al., 2018). Σε άλλη μελέτη οι χαρακτηριστικές κορυφές παρουσιάζονται στις τιμές m/z 4365, 5030, 6310 και 9060 Da. Οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν σε ριβοσωμικές πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν το ειδικό φασματογραφικό αποτύπωμα (fingerprint) του είδους (Florio et al., 2018).



Εικόνα 15. Ανάλυση φάσματος (m/z) *E. coli* (Yu et al., 2018)

Το ποσοστό επιτυχίας ταυτοποίησης για το είδος *K. pneumoniae* κυμαίνεται μεταξύ 95,8% και 97,6%. Στην Εικόνα 16 παρουσιάζεται ενδεικτικά το φάσμα μαζών που λαμβάνεται για το συγκεκριμένο είδος (Cordonana et al., 2018). Με βάση άλλη μελέτη οι κορυφές που ελήφθησαν και αφορούσαν την *K. pneumoniae* ήταν οι 4450 Da, 6105 Da, 7250 Da και 10400 Da. Οι κορυφές αυτές θεωρούνται χαρακτηριστικές και χρησιμοποιούνται για την διάκριση μεταξύ των *Klebsiella* spp (Morgenthaler and Kostrzewa, 2021).



Εικόνα 16. Ανάλυση φάσματος (m/z) *K. pneumoniae* (Cordovana et al., 2018)

7.2.3 Περιορισμοί Ταυτοποίησης Εντεροβακτηριοειδών από Θετική Αιμοκαλλιέργεια

Παρά τα πλεονεκτήματά της, η εφαρμογή της μεθόδου στην ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών από θετικές αιμοκαλλιέργειες παρουσιάζει και ορισμένους σημαντικούς περιορισμούς. Η παρουσία περισσότερων του ενός παθογόνου σε θετική καλλιέργεια αίματος επηρεάζει αρνητικά την ακρίβεια ταυτοποίησης. Η τεχνική βασίζεται στην παραγωγή ενός μοναδικού αποτυπώματος φασμάτων, γεγονός που καθιστάται δύσκολο όταν υπάρχουν πολυμικροβιακές λοιμώξεις (Idelevich et al., 2018; Calderano et al., 2020). Στις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των βακτηρίων στην καλλιέργεια δεν είναι επαρκής, ενδέχεται να παρουσιαστεί λανθασμένη ταυτοποίηση (Delport et al., 2022). Επιπλέον, βακτηριακά υπολείμματα από το θρεπτικό υλικό του φιαλιδίου μπορεί να παρεμποδίσουν την ιοντοποίηση των βακτηριακών πρωτεϊνών. Τέλος, η ακρίβεια της τελικής ταυτοποίησης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την έκταση και ποιότητα της φασματικής βάσης δεδομένων της μεθόδου. Περιορισμένη εκπροσώπηση κάποιων Εντεροβακτηριοειδών στη βιβλιοθήκη ενδέχεται να οδηγήσει σε χαμηλή βαθμολόγηση (Πίνακας 4) ή λάθος ταυτοποίηση (Oviano and Bou, 2019).

7.3 Εφαρμογή και αξιολόγηση της MALDI-TOF MS στην Άμεση Ταυτοποίηση από Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό

Η βακτηριακή μηνιγγίτιδα είναι μια κρίσιμη κατάσταση, που απαιτεί ταχεία παρέμβαση. Επί του παρόντος, το πρώτο βήμα για την ανίχνευση των βακτηριακών παθογόνων παραγόντων που ευθύνονται για τη μηνιγγίτιδα είναι η μικροσκοπήση δείγματος εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY), πραγματοποιώντας αρχικά μια χρώση

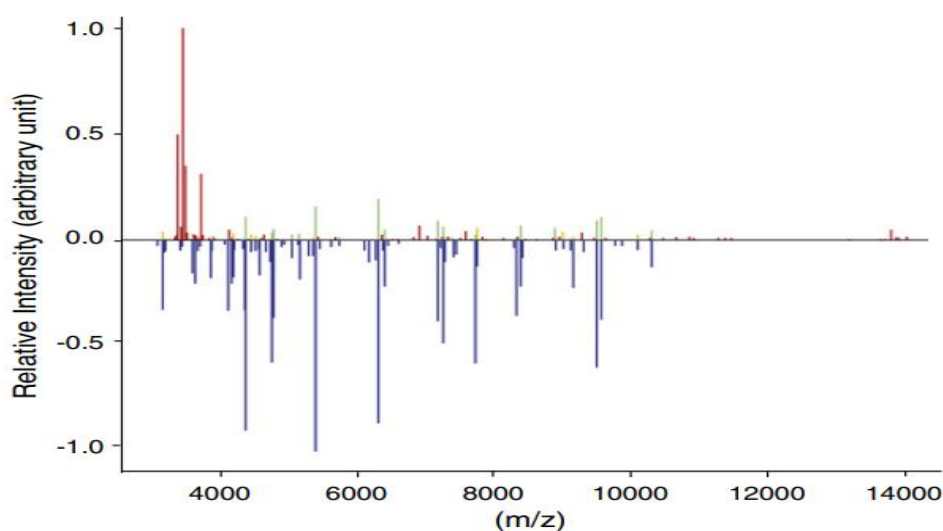
κατά Gram για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν βακτήρια. Οι ασθενείς με θετικά επιχρίσματα λαμβάνουν θεραπεία με αντιβιοτικά ευρέος φάσματος με βάση τα αποτελέσματα της χρώσης κατά Gram. Μέχρι σήμερα, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μελετών έχει περιγράψει τη χρήση του MALDI-TOF MS για την άμεση ανίχνευση μικροοργανισμών που προκαλούν βακτηριακή μηνιγγίτιδα (Tsuchida et al., 2020). Διάφορες αναφορές έχουν περιγράψει την ταυτοποίηση *Streptococcus pneumoniae* (Nyvang et al., 2010), *K. pneumoniae* (Segawa et al., 2014) και *Pasteurella multocida* (Bardou et al., 2015), με εφαρμογή της μεθόδου απευθείας σε δείγμα εγκεφαλονωτιαίου υγρού.

Η τεχνική MALDI-TOF MS εφαρμόστηκε σε 44 δείγματα ENY, εκ των οποίων τα 10 προέρχονταν από ασθενείς με μηνιγγίτιδα της κοινότητας και τα 34 από ασθενείς με μετεγχειρητική μηνιγγίτιδα. Η μεθοδολογία επέδειξε ικανοποιητική διαγνωστική απόδοση για Gram-αρνητικά βακτήρια και Εντεροβακτηριοειδή αναγνωρίζοντας σωστά 17 από τα 21 δείγματα με θετικό άμεσο επίχρισμα (ευαισθησία 81%, 95% CI: 64,2%–97,7%). Όλα τα δείγματα αυτής της ομάδας προέρχονταν από ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε νευροχειρουργική επέμβαση. Αντιθέτως, η ταυτοποίηση Gram-θετικών κόκκων ήταν περιορισμένη, ενώ η ανίχνευση *Candida* spp. απέτυχε και στα δύο θετικά δείγματα. Στην ομάδα της μηνιγγίτιδας της κοινότητας, η τεχνική απέτυχε να ανιχνεύσει *Streptococcus pneumoniae* σε όλα τα εξετασθέντα δείγματα (Bishop et al., 2018). Σε μια άλλη μελέτη, όπου αναλύθηκε δείγμα ENY μέσω MALDI-TOF MS, παρουσιάστηκαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα καθώς έγινε ταχεία διάγνωση βακτηριακής μηνιγγίτιδας που προκλήθηκε από *K. pneumoniae* (Εικόνα 17) (Segawa et al., 2014).

Συμπερασματικά, η άμεση εφαρμογή της MALDI-TOF MS σε δείγματα ENY δεν φαίνεται να βελτιώνει τη διαγνωστική ακρίβεια σε λοιμώξεις που αποκτώνται στην κοινότητα ή σε Gram-θετικά βακτήρια που προκαλούν μηνιγγίτιδα. Εντούτοις, παρουσιάζει υψηλή χρησιμότητα στην ταχεία ταυτοποίηση Gram-αρνητικών βακτηρίων σε περιβάλλοντα όπου τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι διαδεδομένοι. Σε τέτοιες περιπτώσεις, ο συνδυασμός της μεθόδου με την παραδοσιακή χρώση Gram μπορεί να συνεισφέρει στην έγκαιρη έναρξη στοχευμένης εμπειρικής αντιβιοτικής θεραπείας, πριν την έκδοση των τελικών αποτελεσμάτων καλλιέργειας (Bishop et al., 2018).

Σύμφωνα με τους Christner et al. (2010), για την αξιόπιστη ταυτοποίηση βακτηρίων σε θετικές αιμοκαλλιέργειες μέσω φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF

απαιτείται ελάχιστη συγκέντρωση της τάξεως των 10^6 CFU/mL. Αντίστοιχες μελέτες που εστίασαν στην άμεση ταυτοποίηση Εντεροβακτηριοειδών σε δείγματα ούρων από λοιμώξεις του ουροποιητικού, προσδιόρισαν το κατώφλι ευαισθησίας περίπου στα 10^4 – 10^6 CFU/mL (Ferreira et al., 2010b; Veron et al., 2015; Kim et al., 2015). Εκτιμάται ότι απαιτείται παρόμοιο βακτηριακό φορτίο και για την αξιόπιστη ανάλυση δειγμάτων εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY).



Εικόνα 17. Φάσμα MALDI-TOF MS δείγματος εγκεφαλονωτιαίου υγρού από ασθενή με βακτηριακή μηνιγγίτιδα. Το φάσμα του δείγματος παρουσιάζεται στην επάνω στήλη και το αντίστοιχο φάσμα της βάσης δεδομένων για την *Klebsiella pneumoniae* στην κάτω στήλη. Οι πράσινες ράβδοι στην άνω στήλη υποδεικνύουν τις ταυτοποιημένες κορυφές με τη βάση δεδομένων, οι κόκκινες τις μη ταυτοποιημένες κορυφές και οι κίτρινες τις ενδιάμεσες κορυφές (Segawa et al., 2014)

7.3.1 Επεξεργασία Δείγματος ENY

Για την απευθείας ταυτοποίηση από ENY, 1 ml του δείγματος φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στις 2.000 στροφές ανά λεπτό. Το υπερκείμενο, στη συνέχεια, φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές (rpm) για 5 λεπτά και ακολουθεί πλύση για το προκύπτον ίζημα με 1 mL απιονισμένου νερού τύπου HPLC. Έπειτα, το εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Το ξηρό ίζημα υποβάλλεται σε επεξεργασία με ίσες

ποσότητες μυρμηκικού οξέος 70% και ακετονιτριλίου (20-50μL του καθενός από τα αντιδραστήρια), για 1 λεπτό ώστε να πραγματοποιηθεί εκχύλιση του πρωτεϊνών των βακτηριακών κυττάρων. Το εκχύλισμα φυγοκεντρείται εκ νέου στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 2 λεπτά και ένα 1 μl από το υπερκείμενο τοποθετείται στην πλάκα-στόχο MALDI-TOF-MS και αφήνεται να στεγνώσει. Οι κηλίδες επικαλύπτονται με 1 μL διαλύματος μήτρας (HCCA) και, μετά την ξήρανση, η πλάκα τοποθετείται στον αναλυτή MALDI-TOF-MS. Για την απόδοση αποτελέσματος χρειάζεται περίπου 1 ώρα για κάθε δείγμα (Bishop et al., 2018) .

8. MALDI-TOF MS και Έλεγχος Αντιμικροβιακής Αντοχής

Η αξιολόγηση της αντοχής των παθογόνων στα αντιμικροβιακά αποτελεί βασικό στοιχείο για την επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, καθώς και την ταυτοποίησή τους. Η ανθεκτικότητα στα αντιμικροβιακά μπορεί να προκύψει, όπως αναφέρθηκε, λόγω διαφόρων μηχανισμών, όπως η παραγωγή ενζύμων που αδρανοποιούν τα αντιβιοτικά (Shakil et al., 2008), η υπερέκφραση αντλιών εκροής (Nikaido, 2003), η τροποποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και η παραγωγή προστατευτικών πρωτεϊνών στα σημεία δράσης των αντιμικροβιακών (Strahilevitz et al., 2009). Επιπλέον, η τροποποίηση των ενζύμων που μειώνουν την ευαισθησία των βακτηρίων και η προσαρμογή των μεταβολικών οδών που εμπλέκονται στην απόκριση στα αντιμικροβιακά παίζουν καθοριστικό ρόλο. Η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF αποτελεί μια καινοτόμο τεχνολογία που έχει φέρει επανάσταση στον τομέα της μικροβιολογικής διαγνωστικής, επιταχύνοντας τη διαδικασία ταυτοποίησης παθογόνων, αλλά και την ανίχνευση της αντοχής στα αντιβιοτικά σε σύγκριση με τις κλασικές μεθόδους, όπως οι δοκιμασίες ευαισθησίας (AST) και οι τεχνικές μοριακής ανάλυσης (π.χ. PCR) (Vrioni et al., 2018).

Η φασματομετρία MALDI-TOF MS έχει τη δυνατότητα να επιταχύνει σημαντικά την ανίχνευση της αντοχής σε σύγκριση με τις κλασικές AST μεθόδους. Συγκεκριμένα, τέσσερις διαφορετικές μεθοδολογίες (Vrioni et al., 2018) έχουν περιγραφεί:

1. Φασματική Ανάλυση Αντοχής: Ανίχνευση μοτίβων φασμάτων σε ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη και σύγκριση αυτών (Kostrzewa et al., 2013; Sparbier et al., 2016). Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στην αναγνώριση διακριτών

διαφορών στα φάσματα μάζας MALDI-TOF μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών ενός δεδομένου μικροοργανισμού, χρησιμοποιώντας την κλασική προσέγγιση τυποποίησης.

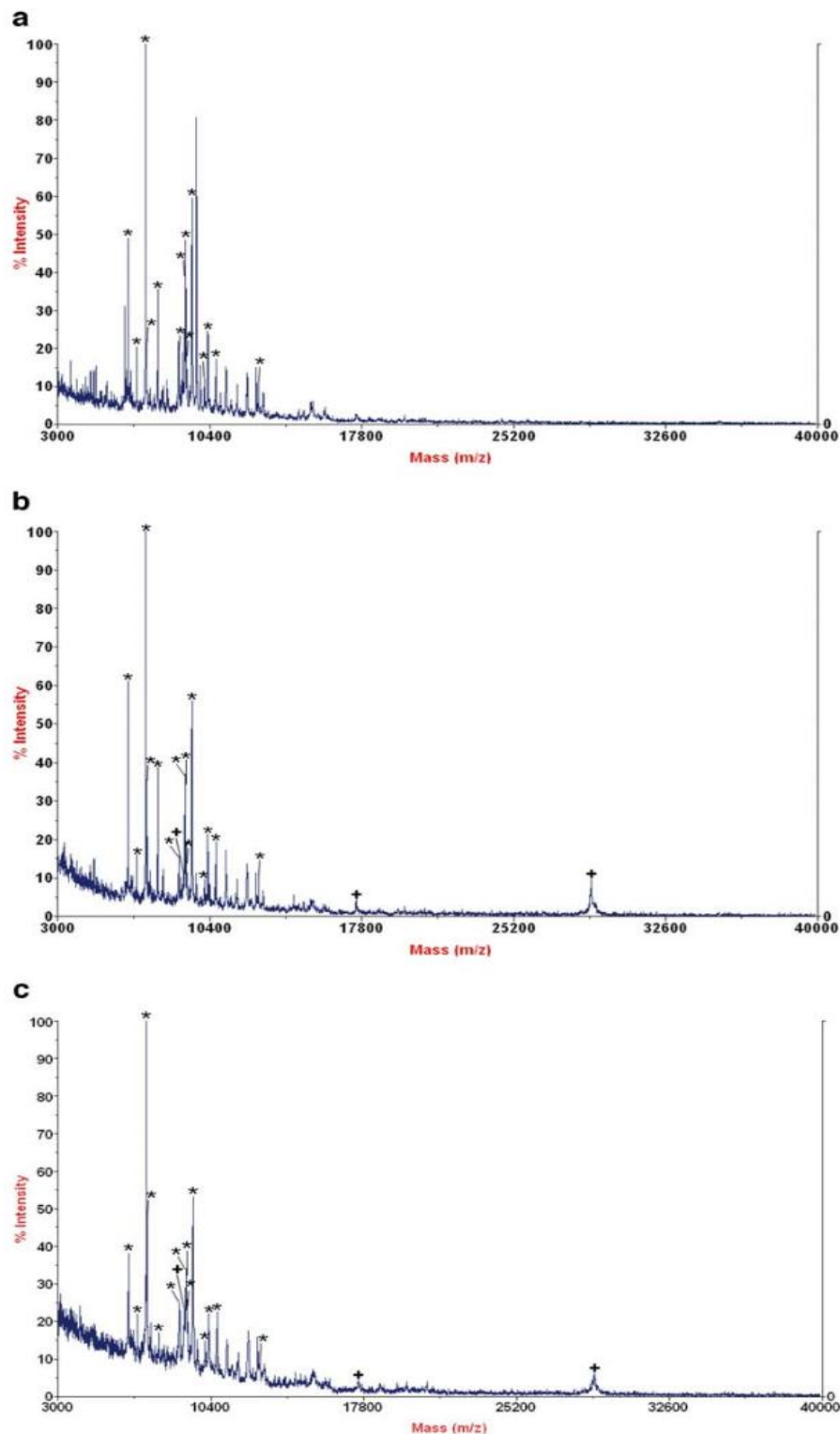
2. Υδρόλυση β-λακταμών (MBT-STAR-BL Assay): Παρακολούθηση της υδρόλυσης των αντιβιοτικών μετά από επώαση με το βακτηριακό παθογόνο. Η υδρόλυση των β-λακταμών ανιχνεύεται μέσω της παρατήρησης ειδικών μετατοπίσεων μάζας μετά από επώαση 30–180 λεπτών του παθογόνου με το προς εξέταση αντιβιοτικό. Η παρουσία αυτών των μεταβολών υποδηλώνει την ύπαρξη δραστηριότητας β-λακταμάσης.

3. Χρήση ισοτοπικά επισημασμένων αμινοξέων (MBT-RESIST Assay) για την εκτίμηση της σύνθεσης νέων πρωτεϊνών υπό την επόδραση αντιβιοτικού. Η τεχνική βασίζεται στην ενσωμάτωση σημασμένων αμινοξέων σε νεοσυντιθέμενες βακτηριακές πρωτεΐνες. Η ποσότητα των σημασμένων αμινοξέων που ενσωματώνονται σε συνθήκες παρουσίας αντιβιοτικού χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η ευαισθησία ή η αντοχή του στελέχους (Hrabak et al., 2011; Sparbier et al., 2012).

4. Αξιολόγηση της βακτηριακής ανάπτυξης με και χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού με χρήση εσωτερικού προτύπου (MBT-ASTRA), μέσω ποσοτικής φασματομετρικής σύγκρισης. Τα βακτήρια επωάζονται για σύντομο χρονικό διάστημα, το οποίο εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού και το αντιβιοτικό. Στη συνέχεια, λύονται και το προκύπτον φάσμα συγκρίνεται με το εσωτερικό πρότυπο. Η απουσία ανάπτυξης (ευαισθησία) εκδηλώνεται με χαμηλής έντασης κορυφές μάζας, ενώ η κανονική ανάπτυξη (αντοχή) αντιστοιχεί σε υψηλής έντασης πρωτεϊνικές κορυφές (Lange et al., 2014).

Μια ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία ανθεκτικών βακτηρίων είναι αυτά που παράγουν β-λακταμάσες, ικανά να υδρολύουν τα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Η τεχνική MALDI-TOF MS έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της δραστηριότητας των β-λακταμασών μέσω διαφορών στη μοριακή μάζα πριν και μετά την υδρόλυση, όπως απεικονίζεται στα φάσματα μάζας (Hrabak et al., 2013). Ενδεικτική είναι η μελέτη των Camara et al. (2007), όπου οι ερευνητές εντόπισαν ένα διακριτό φάσμα μάζας — χαρακτηριστική κορυφή β-λακταμάσης - σε ανθεκτικά στελέχη *E.coli*, συγκρίνοντάς το με τα φάσματα ευαίσθητων στελεχών. Μετά από συγκαλλιέργεια του ανθεκτικού στελέχους με αμπικιλίνη σε ζωμό Luria-Bertani και εξαγωγή πρωτεϊνών με διάλυμα μυρμηκικού οξέος–ισοπροπυλικής αλκοόλης–ύδατος, το δείγμα υποβλήθηκε σε

ανάλυση με MALDI-TOF MS με χρήση SA ως μήτρα και ανιχνεύθηκε μέσω MALDI-TOF MS μια κορυφή β-λακταμάσης (Εικόνα 18) περίπου στα 29 kDa (Camara et al., 2007).



Εικόνα 18. Παραδείγματα φασμάτων μάζας MALDI TOF MS α) κυττάρων άγριου στελέχους *E.coli* που αναπτύχθηκε σε υγρό μέσο Luria-Bertani (LB), β) κυττάρων στελέχους *E.coli* ανθεκτικού στην αμικικιλίνη που αναπτύχθηκε σε υγρό μέσο LB-αμικικιλίνης και γ) κυττάρων στελέχους *E.coli* ανθεκτικού στην αμικικιλίνη που αναπτύχθηκε σε υγρό μέσο LB. Οι κορυφές που είναι κοινές σε όλα τα δείγματα επισημαίνονται με αστερίσκους και οι κορυφές που είναι κοινές μόνο σε δείγματα ανθεκτικά στην αμικικιλίνη επισημαίνονται με σταυρούς (Camara *et al.*, 2007).

Παρότι η ταυτοποίηση βακτηρίων μέσω MALDI-TOF είναι ακριβής σε επίπεδο είδους, η διάκριση ανθεκτικών από ευαίσθητα στελέχη παραμένει δύσκολη, απαιτώντας την εφαρμογή επιπλέον δοκιμασιών ευαισθησίας στα αντιβιοτικά (AST). Η ακρίβεια της μεθόδου MALDI-TOF ενισχύεται με την ανάπτυξη βάσεων δεδομένων πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων ανθεκτικών στελεχών, την ανάλυση τροποποιήσεων στους στόχους δράσης των αντιβιοτικών και την ποσοτική μελέτη των μηχανισμών εκροής και εισροής φαρμάκων (Hrabak et al., 2013).

Η άμεση ανίχνευση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αντιμικροβιακή αντοχή θεωρείται ιδανική προσέγγιση και ερευνάται διαρκώς. Παρόλα αυτά, δεν είναι πάντοτε επιτυχής, καθώς η μέθοδος δεν χρησιμοποιείται ευρέως, λόγω συγκεκριμένων περιορισμών. Τα μεγάλα μοριακά βάρη των προσδιοριστών αντοχής καθιστούν δύσκολη την ανίχνευσή τους στο φάσμα ρουτίνας για την ταυτοποίηση ειδών, ενώ η χαμηλή παραγωγή των σχετικών πρωτεϊνών οδηγεί σε αδύναμα σήματα και δυσδιάκριτες κορυφές. Η επιτυχής ανίχνευση απαιτεί συχνά ενίσχυση των προσδιοριστών αντιμικροβιακής αντοχής (Schaumann et al., 2012) ώστε να αυξηθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης και να γίνει ανιχνεύσιμη. Επιτυχημένα παραδείγματα εφαρμογής του MALDI-TOF MS περιλαμβάνουν την ανίχνευση της πενικιλλινάσης TEM-1 (Camara et al., 2007), της πλασμιδιακής AmpC β-λακταμάσης CMY-2 στα 39800 m/z και της καρβαπενεμάσης της *K. pneumoniae* KPC-2 στα 28544 m/z (Espinosa et al., 2018). Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν την ύπαρξη εναλλακτικών κορυφών μάζας για την KPC, πιθανώς λόγω διαφοροποιήσεων των υποτύπων της (Yoon et al., 2020). Σύμφωνα με τη μελέτη των Oviano and Bou, για την ανίχνευση φάσματος β-λακταμασών παρουσιάζεται ευαισθησία 91,1% και ειδικότητα 92%, ενώ για καρβαπενεμάσες 96,2% και 99,2% αντίστοιχα (Oviano and Bou, 2019).

Η τεχνική MALDI-TOF MS μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση απώλειας πορινών, όπως η OmpK36 σε στελέχη *K. pneumoniae*, μέσω απουσίας χαρακτηριστικών κορυφών στα 38000 m/z και 19000 m/z (Hu et al., 2015).

Τέλος, η υπερέκφραση συστημάτων εκροής, που συσχετίζεται με πολυανθεκτικότητα σε Gram-αρνητικά βακτήρια, αποτελεί έναν ακόμη πιθανό στόχο (Cai et al., 2012), αν και αν και η ποσοτική ανάλυσή τους μέσω MALDI-TOF MS παραμένει αναποτελεσματική. Εναλλακτικά, η υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS) παρέχει αυξημένη ευαισθησία και αξιοπιστία (Cecchini et al., 2018).

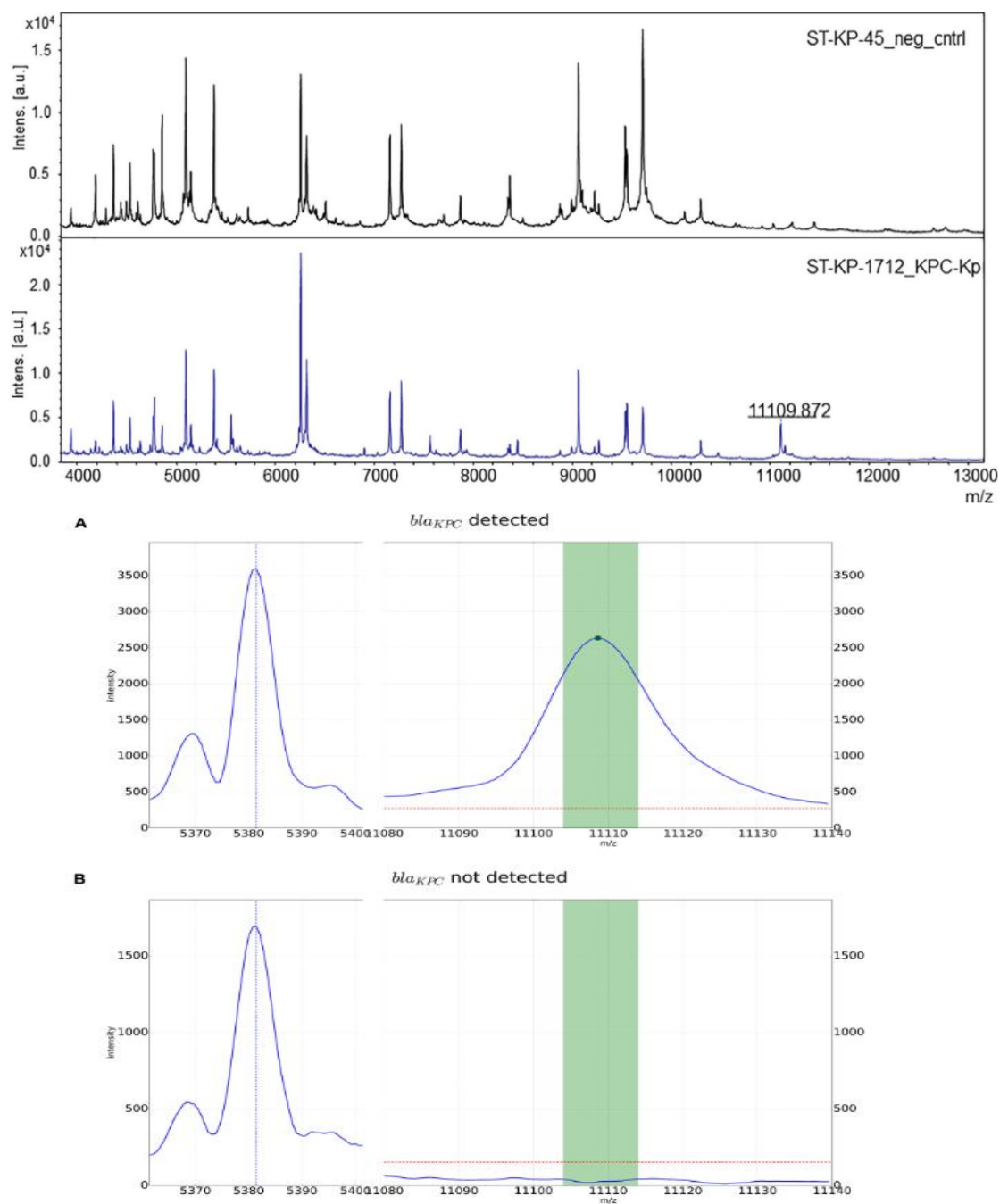
Παρόλο που οι μελέτες με το σύστημα VITEK MS είναι ακόμη περιορισμένες, η χρήση του επικεντρώνεται κυρίως στην ανάλυση της υδρόλυσης καρβαπενεμών που επάγεται από Εντεροβακτηριοειδή όταν παράγουν καρβαπενεμάσες (Carvalho et al., 2015).

8.1 Ανίχνευση Δραστικότητας β-λακταμάσης

Η τεχνική MALDI-TOF, όπως αναφέρθηκε, έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην ανίχνευση της ευαισθησίας στα β-λακταμικά αντιβιοτικά, εντοπίζοντας το υδρολυμένο αντιβιοτικό που παραμένει μετά τη δράση της β-λακταμάσης (Kostrzewa et al., 2013). Η εφαρμογή αυτής της μεθοδολογίας έχει αποδειχθεί για διάφορα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όπως *E.coli*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii* και *E.cloacae*, καθώς και για αντιβιοτικά όπως η αμπικιλίνη, η πιπερακιλλίνη, η κεφοταξίμη, η κεφταζιδίμη, η ερταπενέμη, η ιμιπενέμη και η μεροπενέμη. Ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον έχει η ανίχνευση της αντοχής στις καρβαπενέμες με MALDI-TOF MS, καθώς αποτελεί ένα από τα πλέον μελετημένα θέματα. Οι Hrabák et al. ανέπτυξαν μια καινοτόμο μέθοδο που επιτρέπει την ανίχνευση των προϊόντων αποικοδόμησης των καρβαπενεμών από ανθεκτικά στις καρβαπενέμες παθογόνα (Hrabak et al., 2011). Αντίστοιχα, οι Sakarikou et al. πραγματοποίησαν μελέτη για την ταχεία ανίχνευση της παραγωγής καρβαπενεμάσης από στελέχη *K. pneumoniae* απευθείας από καλλιέργειες αίματος χρησιμοποιώντας MALDI-TOF και απέδειξαν ότι το σύστημα μπορεί να ανιχνεύσει την υδρόλυση των β-λακταμών μετά από σύντομη επώαση των Gram-αρνητικών στελεχών με το αντιβιοτικό (Sakariku et al., 2017). Παράλληλα, οι Oniaño et al. ανέπτυξαν μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο για την ανίχνευση Enterobacteriaceae που παράγουν β-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος (ESBL) απευθείας από θετικές καλλιέργειες αίματος με τη χρήση MALDI-TOF. Σε αυτή τη μελέτη, η δραστικότητα της β-λακταμάσης αξιολογήθηκε μέσω του προφίλ των κορυφών που σχετίζονται με τα αντιβιοτικά κεφοταξίμη και κεφταζιδίμη και τις υδρολυμένες μορφές τους. Επιπλέον, προστέθηκε κλαβουλανικό οξύ για την εξακρίβωση της παρουσίας μη-ESBL μηχανισμών, ενώ η συνολική ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε στο 99% με χρόνο ανάλυσης περίπου 90 λεπτά (Oniano et al., 2014).

Τέλος σε μεταγενέστερη μελέτη, οι ερευνητές παρουσιάζουν μια πλήρη προσέγγιση βασισμένη στο MALDI για την ανίχνευση στελεχών *K. pneumoniae* που

παράγουν KPC, καρβαπενεμάσης που κωδικοποιείται σε πλασμίδιο, η οποία επιτυγχάνεται με την αυτοματοποιημένη ανίχνευση μιας κορυφής ειδικής για KPC (στα 11109 m/z) από έναν ειδικό αλγόριθμο ενσωματωμένο στο σύστημα MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) και την επιβεβαίωση της δραστηριότητας της καρβαπενεμάσης με τη δοκιμασία υδρόλυσης ιμιπενέμης STAR-Carba (Εικόνα 19). Η εν λόγω μέθοδος, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε υλικό αποικίας όσο και απευθείας σε θετικές αιμοκαλλιέργειες, προσφέρει το μοναδικό πλεονέκτημα της ταυτόχρονης ανίχνευσης, σε πραγματικό χρόνο, δεικτών αντοχής στα αντιβιοτικά και της ταυτοποίησης μικροβιακών ειδών. Η συνδυαστική αυτή προσέγγιση καθιστά τη μέθοδο ένα ιδιαίτερα πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο, ικανό να προσφέρει έγκαιρη προειδοποίηση για την παρουσία στελεχών που παράγουν καρβαπενεμάσες τύπου KPC (Cordovana et al., 2018).



Εικόνα 19. Ανάλυση φάσματος (m/z) *K. pneumoniae*. Η κορυφή που σχετίζεται με το πλασμίδιο *pKpQIL* στα φάσματα μάζας MALDI του *K. pneumoniae*. Το άνω φάσμα δείχνει αρνητικό δείγμα, χωρίς τη συγκεκριμένη κορυφή. Το κάτω φάσμα δείχνει στέλεχος που παράγει KPC και εμφανίζει την συγκεκριμένη κορυφή (11109 m/z)

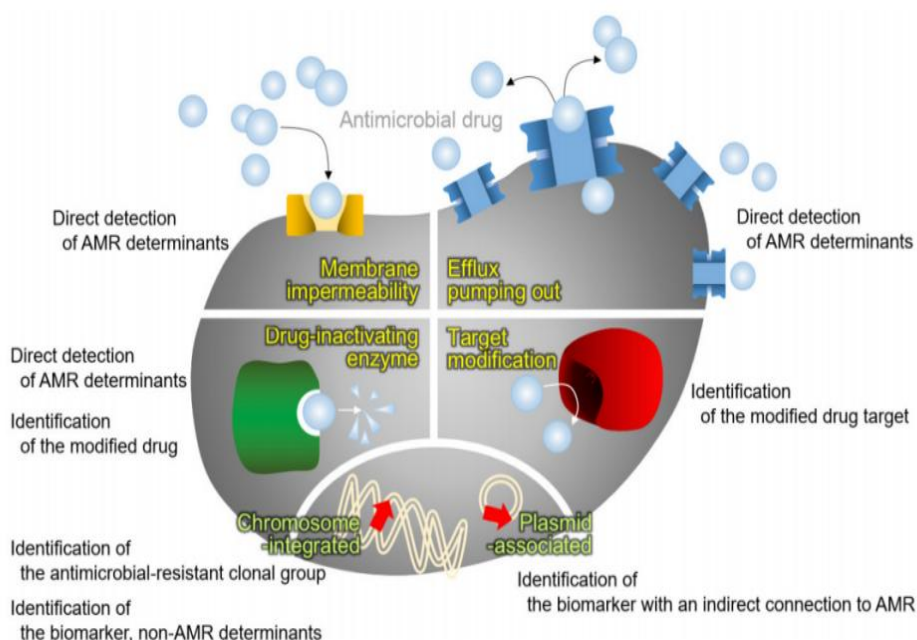
Βάσει αλγορίθμου (Α) KPC-θετικό στέλεχος *K. pneumoniae* με κορυφή για το πλασμίδιο *pKpQIL*. (Β) KPC-αρνητικό στέλεχος (Cordovana et al., 2018).

8.1.1 Περιορισμοί Ανίχνευσης Δραστικότητας β-λακταμασών

Παρά την πληθώρα πλεονεκτημάτων που προσφέρει η MALDI-TOF MS, η εφαρμογή της στην ανίχνευση μηχανισμών αντοχής και συγκεκριμένα η ανίχνευση β-λακταμασών, συνοδεύεται από σημαντικά μειονεκτήματα που περιορίζουν τη διαγνωστική της αξία ως αυτόνομη τεχνική (Anantharajah et al., 2019). Ένας από τους κυριότερους περιορισμούς είναι το γεγονός ότι η τεχνική δεν ανιχνεύει άμεσα τις β-λακταμάσες. Αντίθετα, βασίζεται στην παρακολούθηση της υδρόλυσης των β-λακταμικών αντιβιοτικών καταγράφοντας τη μεταβολή της μοριακής τους μάζας. Η διαδικασία αυτή προϋποθέτει την ενεργή έκφραση της εκάστοτε β-λακταμάσης από το βακτήριο κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, ενώ πρέπει να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητά της στην ανίχνευση β-λακταμάσης με χαμηλό επίπεδο έκφρασης (Sparbier et al., 2012). Επιπλέον, η τεχνική αδυνατεί να διαχωρίσει με ακρίβεια μεταξύ διαφορετικών τύπων ή υποτύπων β-λακταμασών, καθώς πολλά από αυτά τα ένζυμα προκαλούν παρόμοια πρότυπα υδρόλυσης. Έτσι, η MALDI-TOF MS δεν επαρκεί για την ταυτοποίηση του ακριβούς τύπου β-λακταμάσης, κάτι που είναι κρίσιμο για την επιδημιολογική παρακολούθηση και επιλογή θεραπείας (Oviano and Bou, 2019). Παράλληλα, η μέθοδος δεν παρέχει γενετική πληροφορία, καθώς δεν εντοπίζει τα υπεύθυνα γονίδια αντοχής όπως *bla_{KPC}* ή *bla_{NDM}*, κάτι που επιτυγχάνεται μόνο μέσω μοριακών τεχνικών ή αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Ένα ακόμη πρακτικό ζήτημα αφορά το χρόνο ανάλυσης, όπου για την ανίχνευση β-λακταμασών απαιτούνται 1-3 ώρες επώαση, ώστε να πραγματοποιηθεί επαρκής υδρόλυση του αντιβιοτικού. Όσον αφορά την ευαισθησία και την ειδικότητα, έχει διαπιστωθεί πως η μέθοδος αποδίδει ικανοποιητικά στην ανίχνευση ορισμένων κατηγοριών β-λακταμασών, όπως οι καρβαπενεμάσες, ενώ παρουσιάζει μειωμένη απόδοση σε άλλες, όπως οι εκτεταμένου φάσματος β-λακταμάσες (Cordovana et al., 2018). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως, ενώ έχουν αναπτυχθεί εμπορικά διαθέσιμα πρωτόκολλα ή κιτ για την ανίχνευση ορισμένων τύπων καρβαπενεμασών, δεν υπάρχει επαρκής ταυτοποίηση για άλλες κατηγορίες, όπως οι OXA-48, ESBLs και AmpC, γεγονός που περιορίζει την ευρεία εφαρμογή της τεχνικής (Oviano and Bou, 2019).

8.2 Ανίχνευση Πορινών

Μεταξύ των μηχανισμών που συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα έναντι των αντιμικροβιακών (Εικόνα 20) είναι η διαφοροποίηση της δομής ή η απώλεια των πορινών. Οι Cai et al. κατάφεραν να ανιχνεύσουν την αλλοίωση των πορινών σε στελέχη *Klebsiella* spp. χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MALDI-TOF (Cai et al., 2012). Στη μελέτη τους ανέλυσαν πέντε απομονωμένα στελέχη *K. pneumoniae* ευαίσθητα στις καρβαπενέμες και επτά ανθεκτικά στις καρβαπενέμες, εξάγοντας και μελετώντας τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης. Η ανάλυση με MALDI-TOF κατέδειξε την απώλεια συγκεκριμένων πορινών στα ανθεκτικά στελέχη, στοιχείο που σχετίζεται με τον μηχανισμό αντοχής. Αντίστοιχα, οι Hu et al. το 2015, πραγματοποίησαν παρόμοια μελέτη, εξετάζοντας στελέχη *E. coli* και *K. pneumoniae*. Από τα δείγματα που αναλύθηκαν, ένα στέλεχος *E. coli* βρέθηκε ευαίσθητο στις καρβαπενέμες, ενώ οκτώ εμφάνισαν ανθεκτικότητα ή μειωμένη ευαισθησία (Hu et al., 2015). Παράλληλα, ένα στέλεχος *K. pneumoniae* ήταν ευαίσθητο στις καρβαπενέμες, ενώ έξι παρουσίασαν αντοχή ή μειωμένη ευαισθησία, επιβεβαιώνοντας την επίδραση των αλλαγών της δομής των πορινών στον μηχανισμό ανθεκτικότητας (Hu et al., 2015).



Εικόνα 20. Προσεγγίσεις MALDI-TOF MS για αντιμικροβιακή αντοχή (Yoon and Jeong, 2021)

9. Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί MALDI-TOF MS

Η μεθοδολογία MALDI-TOF MS αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών, προσφέροντας σημαντικά οφέλη, αλλά και ορισμένους περιορισμούς. Στον Πίνακα 5 παρατίθεται συγκριτική επισκόπηση των σημαντικότερων πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων των διαθέσιμων μεθόδων ταυτοποίησης μικροβίων. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της MALDI-TOF MS είναι το χαμηλό κόστος, που την καθιστά προσιτή τόσο για διαγνωστικές όσο και για ερευνητικές εφαρμογές. Επιπλέον, ο χρόνος επεξεργασίας των απομονωμένων στελεχών και των δειγμάτων από το εργαστηριακό προσωπικό είναι μικρός, γεγονός που συμβάλλει στην ταχεία λήψη αποτελεσμάτων. Η μέθοδος προσφέρει υψηλή ακρίβεια στην ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, φτάνοντας έως και 95% σε επίπεδο είδους, κάτι που ενισχύει την αξιοπιστία της στην κλινική πράξη (Darie-Ion et al., 2022).

Ωστόσο, η τεχνική παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς που επηρεάζουν την ευρύτερη εφαρμογή της. Ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματά της είναι η χαμηλή αναλυτική ευαισθησία, η οποία περιορίζει την ικανότητά της να διακρίνει μεταξύ συγγενικών ειδών που παρουσιάζουν γενετικές ομοιότητες. Επιπλέον, δεν είναι σε θέση να ανιχνεύει μικρές συγκεντρώσεις βακτηρίων σε στείρα βιολογικά υγρά, όπως το ΕΝΥ, κάτι που αποτελεί σημαντικό περιορισμό στη διαγνωστική της εφαρμογή (Darie-Ion et al., 2022). Ένα ακόμη κρίσιμο ζήτημα αφορά την εξάρτηση της μεθόδου από τη βάση δεδομένων των φασμάτων, η οποία, μέχρι σήμερα, βρίσκεται σε στάδιο πειραματικής ανάπτυξης. Ο βαθμός κάλυψης των μικροβιακών ειδών εντός της βάσης καθορίζει άμεσα τόσο την ακρίβεια όσο και το εύρος των ταυτοποιήσεων που μπορούν να επιτευχθούν μέσω της τεχνολογίας MALDI-TOF MS (Han et al., 2021). Επιπλέον, για τη σωστή λειτουργία της μεθόδου απαιτούνται βακτηριακές αποικίες, οι οποίες πρέπει να έχουν ληφθεί μέσω καλλιέργειας που έχει προηγηθεί. Δεδομένου ότι ο συνολικός ρυθμός θετικής καλλιέργειας από κλινικά δείγματα είναι γενικά χαμηλός, αυτό το χαρακτηριστικό μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητα της τεχνικής στην κλινική διάγνωση (Yi et al., 2018). Τέλος, περιορισμοί που σχετίζονται με την ανίχνευση αντοχής είναι ο περιορισμένος αριθμός μηχανισμών αντοχής που μπορούν να αναγνωριστούν με MALDI-TOF MS εάν επιλεγούν μόνο δοκιμασίες που περιλαμβάνουν ενζυμική δραστηριότητα βακτηρίων και καθυστερημένος χρόνος απόκρισης εάν μετρηθούν οι επιδράσεις των

αντιβιοτικών στην βακτηριακή ανάπτυξη, όπως επίσης και η δυσκολία της μεθόδου να ταυτοποιεί το είδος της β-λακταμάσης, γεγονός που περιορίζει το θεραπευτικό σχήμα, καθώς βασίζεται κυρίως στον τύπο των β-λακταμασών που παράγονται από τα βακτηριακά κύτταρα (Oviano and Bou, 2019).

Για την αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών, έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές βελτίωσης. Ο εμπλουτισμός βακτηρίων με μαγνητικά σφαιρίδια επιτρέπει την καλύτερη ανίχνευση μικροοργανισμών στο αίμα, ενώ οι τεχνικές μικρορευστότητας μπορούν να μειώσουν ή ακόμα και να καταργήσουν την ανάγκη για καλλιέργεια (Zhu et al., 2018). Παράλληλα, η ανάπτυξη νέων υποστρωμάτων ή τεχνικών ενίσχυσης επιφανείας επιτρέπει την ανίχνευση περισσότερων μοριακών πληροφοριών, αυξάνοντας έτσι την ακρίβεια της ταυτοποίησης. Επιπλέον, η συνδυαστική χρήση της MALDI-TOF MS με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης μπορεί να προσφέρει μεγαλύτερη ειδικότητα, ενώ η εξέλιξη των αλγορίθμων ανάλυσης δεδομένων διευκολύνει την ταυτοποίηση μικτών βακτηριακών πληθυσμών, την ανίχνευση ανθεκτικών στα αντιμικροβιακά βακτηρίων, καθώς και την αναγνώριση παραγόντων παθογένειας (Yang et al., 2017). Με τη συνεχή εξέλιξη αυτών των τεχνολογιών, η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF αναμένεται να καταστεί ακόμη πιο αξιόπιστο και αποτελεσματικό εργαλείο στη μικροβιολογική διάγνωση, διευρύνοντας τις εφαρμογές της και συμβάλλοντας σημαντικά στη βελτίωση των διαγνωστικών διαδικασιών.

Πίνακας 5. Σύγκριση μεθόδων ταυτοποίησης, παρουσίαση πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων

Μέθοδος Ανίχνευσης	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Συμβατική Καλλιέργεια	-Ευαίσθητη -Οικονομική	-Χρονοβόρα -Απαιτούνται 24-48h
Ανοσολογικές Μέθοδοι	-Ταχύτερες από συμβατικές -Ανίχνευση μικροοργανισμών και τοξινών τους	-Λιγότερο ευαίσθητες και ειδικές -Περιορισμένη εφαρμογή
Υβριδισμός φθορισμού in situ (FISH)	-Ταχεία ανίχνευση και ταυτοποίηση απευθείας από δείγμα	-Περιορισμός λόγω διαθεσιμότητας ειδικών αντιγόνων
Μοριακές Μέθοδοι -Real-time PCR -Multiplex PCR	-Όχι προαπαιτούμενη καλλιέργεια -Μειωμένος κίνδυνος μόλυνσης -Ανίχνευση πολλών παθογόνων ταυτόχρονα	-Ακριβός εξοπλισμός -Απαιτεί εκπαιδευμένο προσωπικό
Αλληλούχηση DNA	-Ανίχνευση δύσκολων μικροοργανισμών	-Εκπαιδευμένο προσωπικό -Κοστοβόρα -Ακατάλληλη για ρουτίνα
Μικροσυστοιχίες (Microarrays)	-Μαζική ανίχνευση και ταυτοποίηση πολλών παθογόνων ταυτόχρονα	-Εκπαιδευμένο προσωπικό -Ακριβή
Αντίδραση Ισόθερμης Ενίσχυσης Βρόχου (LAMP assay)	-Εύχρηστη -Όχι εξειδικευμένος εξοπλισμός	-Περιορισμένος αριθμός μικροοργανισμών
Μεταγενωματική Ανάλυση (Metagenomic assay)	-Ταχεία ανίχνευση παθογόνων	-Χρονοβόρα -Εκπαιδευμένο προσωπικό
MALDI-TOF MS	-Ταχεία -Ακριβής -Χαμηλό κόστος -Όχι εκπαιδευμένο προσωπικό	-Υψηλό κόστος αρχικού εξοπλισμού

Συμπέρασμα

Η παρούσα διπλωματική εργασία εξέτασε σε βάθος τη χρήση της φασματομετρίας μάζας τύπου MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) ως εργαλείου ταυτοποίησης και ελέγχου της αντιμικροβιακής αντοχής σε στελέχη Εντεροβακτηριοειδών, εστιάζοντας τόσο στη μεθοδολογική τεκμηρίωση όσο και στις δυνατότητες εφαρμογής της τεχνικής στην καθημερινή μικροβιολογική πρακτική.

Σε ένα περιβάλλον όπου η ταχεία εξάπλωση πολυανθεκτικών βακτηρίων, και ειδικότερα των ανθεκτικών στις καρβαπενέμες Εντεροβακτηριοειδών, αποτελεί μείζονα απειλή για τη δημόσια υγεία, η ανάγκη για διαγνωστικές μεθόδους υψηλής απόδοσης, ταχύτητας και αξιοπιστίας καθίσταται επιτακτική. Η μέθοδος MALDI-TOF MS ανταποκρίνεται σε αυτήν την ανάγκη, προσφέροντας τη δυνατότητα άμεσης ταυτοποίησης μικροοργανισμών σε επίπεδο γένους και είδους εντός λίγων λεπτών, με χαμηλό κόστος ανά δείγμα και χωρίς την ανάγκη σύνθετων προπαρασκευαστικών διαδικασιών. Το θεμελιώδες πλεονέκτημα της τεχνικής έγκειται στην αξιοποίηση του πρωτεϊνικού προφίλ κάθε βακτηριακού στελέχους, το οποίο λειτουργεί ως μοναδικό «φασματικό αποτύπωμα». Μέσω της σύγκρισης με βιβλιοθήκες αναφοράς, καθίσταται δυνατή η γρήγορη και ακριβής ταυτοποίηση, ακόμη και σε περιπτώσεις που οι συμβατικές φαινοτυπικές, βιοχημικές ή μοριακές μέθοδοι παρουσιάζουν περιορισμούς. Επιπλέον, η τεχνική MALDI-TOF μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε θετικές αιμοκαλλιέργειες ή δείγματα ούρων, εξαλείφοντας την ανάγκη για προηγηθείσα καλλιέργεια και επιταχύνοντας την κλινική λήψη αποφάσεων. Η ανάλυση των στρατηγικών προετοιμασίας δείγματος (απευθείας τοποθέτηση, εκχύλιση επί στόχου, πλήρης εκχύλιση) κατέδειξε ότι η επιλογή της κατάλληλης μεθοδολογίας επηρεάζει καθοριστικά την απόδοση της τεχνικής. Σε Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως τα Εντεροβακτηριοειδή, η απευθείας μέθοδος προσφέρει ικανοποιητικά ποσοστά ταυτοποίησης, ενώ για Gram-θετικά ή αναερόβια στελέχη, η εφαρμογή επιπλέον επεξεργασίας (π.χ. φορμικό οξύ, ακετονιτρίλιο) ενισχύει σημαντικά την ακρίβεια και τη διακριτική ικανότητα του φάσματος. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ικανότητα της MALDI-TOF MS μεθοδολογίας να συμβάλλει και στον έλεγχο αντιμικροβιακής αντοχής, πέραν της ταυτοποίησης. Οι σύγχρονες προσεγγίσεις για την ανίχνευση παραγωγής καρβαπενεμασών, όπως μέσω φασματομετρικής καταγραφής της υδρόλυσης αντιβιοτικών, παρέχουν τη δυνατότητα

λειτουργικής αξιολόγησης των μηχανισμών αντοχής σε πραγματικό χρόνο. Αυτό αποτελεί σημαντική καινοτομία, ιδίως σε περιβάλλοντα με περιορισμένους πόρους, όπου η χρήση μοριακών μεθόδων δεν είναι πάντα εφικτή.

Παρά τα πολλαπλά πλεονεκτήματα, η τεχνική παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς. Η διακριτική της ικανότητα είναι στενά συνδεδεμένη με την πληρότητα και ποιότητα των φασματικών βιβλιοθηκών. Ελλείψεις στη βάση δεδομένων μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά ή ασαφή αποτελέσματα, ιδιαίτερα για σπάνια ή περιβαλλοντικά στελέχη. Επίσης, η διαφοροποίηση συγγενών ειδών, όπως *Escherichia coli* και *Shigella* spp., παραμένει προβληματική λόγω υψηλής ομοιότητας στα προφίλ φασμάτων τους. Επιπλέον, η απόδοση της τεχνικής μπορεί να επηρεάζεται από εξωγενείς παράγοντες, όπως οι συνθήκες καλλιέργειας, η φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού, ή η παρουσία επιμολυντικών ουσιών. Επομένως, απαιτείται τυποποίηση των διαδικασιών και επαρκής εκπαίδευση του προσωπικού, ώστε να διασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Η εισαγωγή αλγορίθμων τεχνητής νοημοσύνης για την επεξεργασία και ερμηνεία των φασμάτων προβάλλει ως μία προοπτική που μπορεί να ενισχύσει περαιτέρω τη διαγνωστική ακρίβεια. Η συστηματική ενσωμάτωση της MALDI-TOF MS στην κλινική μικροβιολογία έχει τη δυνατότητα να αλλάξει το τοπίο της διαγνωστικής προσέγγισης. Προσφέρει ουσιαστική συμβολή στην επιτάχυνση της θεραπευτικής απόφασης, στη μείωση της εμπειρικής χρήσης ευρέως φάσματος αντιβιοτικών και στη συγκράτηση της διασποράς ανθεκτικών στελεχών. Η αξιοποίηση της τεχνικής στο πλαίσιο εθνικών και διεθνών δικτύων επιτήρησης μικροβιακής αντοχής μπορεί να συμβάλει καθοριστικά στη βελτιστοποίηση της δημόσιας υγείας.

Συνοψίζοντας, η MALDI-TOF MS δεν αποτελεί πλέον μία πειραματική τεχνολογία, αλλά μία ώριμη, ευρέως εφαρμόσιμη και καθοριστική διαγνωστική προσέγγιση, με αποδεδειγμένη αξία στην ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών και την επιτήρηση της αντιμικροβιακής αντοχής. Η πλήρης αξιοποίησή της προϋποθέτει τη συνέργεια τεχνολογίας, εκπαίδευσης και διαρκούς επιστημονικής αξιολόγησης. Υπό αυτές τις προϋποθέσεις, η MALDI-TOF MS μπορεί να καταστεί αναπόσπαστο εργαλείο για ένα σύστημα υγείας που στοχεύει στη γρήγορη, ορθολογική και τεκμηριωμένη διαχείριση των λοιμώξεων.

Περίληψη

Η αντιμικροβιακή αντοχή (AMA) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα δημόσιας υγείας του 21ου αιώνα. Η εμφάνισή της συνδέεται στενά με παράγοντες όπως η αλόγιστη ή εσφαλμένη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων στην ιατρική και κτηνιατρική πράξη, καθώς και με την περιβαλλοντική ρύπανση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βακτηριακές λοιμώξεις που προκαλούνται από εντεροβακτηριακά ή εντεροβακτηριοειδή στελέχη, καθώς τα παθογόνα αυτά εμπλέκονται σε ποικιλία νοσημάτων. Ευθύνονται για γαστρεντερικές λοιμώξεις και εξωγαστρεντερικές, όπως λοιμώξεις του ουροποιητικού και αναπνευστικού συστήματος, σηψαιμία/βακτηραιμία, λοιμώξεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, αλλά και νοσοκομειακές λοιμώξεις. Μέχρι σήμερα, η ανίχνευση και ταυτοποίηση αυτών των στελεχών, καθώς και η διερεύνηση της αντοχής τους στα αντιμικροβιακά φάρμακα, βασίζονταν κυρίως σε φαινοτυπικές και μοριακές τεχνικές. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η βιβλιογραφική παρουσίαση μιας σύγχρονης και καινοτόμου μεθόδου, της φασματομετρίας μάζας τύπου MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight). Η μέθοδος αυτή αναδεικνύεται ως μια ταχεία, αξιόπιστη, οικονομική και υψηλής ακρίβειας τεχνική για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής εντεροβακτηριακών στελεχών, με ιδιαίτερη έμφαση στα στελέχη που παράγουν καρβαπενεμάσες.

Λέξεις κλειδιά: Εντεροβακτηριακά/Εντεροβακτηριοειδή, καρβαπενεμάσες, φασματομετρία μάζας MALDI-TOF, αντιμικροβιακή αντοχή, αντιμικροβιακά.

Abstract

«MALDI-TOF mass spectrometry for identification and antimicrobial resistance of *Enterobacteriaceae*»

Antimicrobial resistance (AMR) is the most significant public health issue of the 21st century, and its emergence is closely linked to factors related to the irrational or incorrect use of antimicrobials in medical and veterinary practice, as well as environmental pollution. Bacterial infections, especially those caused by enterobacterial strains, have aroused the interest of healthcare professionals. These pathogens are responsible for a wide range of infections, including gastrointestinal and extraintestinal diseases such as urinary tract infections, respiratory tract infections, bloodstream infections, and meningitis. Moreover, a considerable number of *Enterobacteriaceae* species are frequently implicated in healthcare-associated (nosocomial) infections. The techniques used so far for the detection and identification of those strains, as well as the investigation of their resistance to antimicrobials, have been primarily based on phenotypic approaches and molecular (gene-based) techniques.

The present postgraduate thesis aims to provide a comprehensive literature-based overview of a novel and promising method: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). This technique has emerged as a rapid, cost-effective, user-friendly, and highly accurate tool for the identification and resistance profiling of *Enterobacteriaceae*, with particular emphasis on strains producing carbapenemases.

Keywords: *Enterobacteriaceae*/Enterobacterales, carbapenemase, MALDI-TOF MS, antibiotic, antimicrobial resistance.

Συντομεύσεις

AMA → Αντιμικροβιακή Αντοχή

ENY → Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό

MB → Μοριακό Βάρος

AST → Antimicrobial Susceptibility Testing

ACN → Acetonitrile

CPS → Capsule Polysaccharides

CRE → Carbapenem Resistant Enterobacterales

Da → Dalton

EDTA → Ethylenediaminetetraacetic Acid

ESBL → Extended Spectrum beta-lactamase Producing Enterobacterales

FA → Formic Acid

GES → Guiana Extended Spectrum

IMI/NMC-A → Imipenemase / Non-Metallo Carbapenemase A

IR → Infrared Radiation

KPC → *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MALDI-TOF → Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time Of Flight

MBL → Metallo-β- lactamases

MIC → Minimum Inhibitory Concentration

MS → Mass Spectrometry

PBPs → Penicillin-binding-proteins

SA → Sinapic Acid

SFC → *Serratia fonticola* carbapenemase

SHV → Sulfhydryl Variable

SME → *Serratia Marcescens* Enzyme

TFA → Trifluoroacetic Acid

UV → Ultra Violet

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abraham, E.P., Chain, E., (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146:837.
2. Alam, S.I., Kumar, B., Kamboj, D.V., (2012). Multiplex detection of protein toxins using MALDI-TOF-TOF tandem mass spectrometry: application in unambiguous toxin detection from bioaerosol, *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 23, pp. 10500-10507.
3. Alizadeh, M., Yousefi, L., Pakdel, F., Ghotaslou, R., Ahangarzadeh-Rezaee, M., Khodadadi, E., Ahangar-Oskouei, M., Sorouh-Barhaghi, M.H., Samadi-Kafil, H., (2021). MALDI-TOF Mass Spectroscopy Applications in Clinical Microbiology.
4. Alzayn, M., Dulyayangkul, P., Satapoomin, N., Heesom, K.J., Avison, M.B., (2021). OmpF downregulation mediated by sigma E or OmpR activation confers cefalexin resistance in *Escherichia coli* in the absence of acquired beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 65 (11), e0100421.
5. Ambler, R.P., (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci.* 289:321–31.
6. Anantharajah, A., Anantharajah, A., Decré, D., & Rottman, M., (2019). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for rapid detection of resistance mechanisms: From research to routine use. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(8), 1036–1043.
7. Anderson, N.W., Buchan, B.W., Riebe, K.M., Parsons, L.N., Gnacinsky, S., Ledebor, N.A., (2012). Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 50(3): 1008-1013.
8. Anhalt, J.P., Fenselau, C., (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem.* 47:219–25.
9. Antunes, N.T., Fisher, J.F., (2014). Acquired class D beta-lactamases. *Antibiotics (Basel)*. 3:398–434.
10. Ao, K., Li, X., Zhang, W., & et al. (2023). Evaluation of the Autof MS1000 mass spectrometry for rapid clinical identification of filamentous fungi. *BMC Microbiology*, 23, 228.

11. Azrad, M., Keness, Y., Nitzan, O., Pastukh, N., Tkhawkho, L., Freidus, V., Peretz, A., (2019). Cheap and rapid in-house method for direct identification of positive blood cultures by MALDI-TOF MS technology.
12. Bachli, P., Baars, S., Simmler, A., Zbiden, R., Schulthess, B., (2022). Impact of MALDI-TOF MS identification on anaerobic species and genus diversity in routine diagnostics.
13. Baharvand, H., Hajheidari, S., Ashtiani, S.K., Salekdeh, G.H., (2006). "Proteomic signature of human embryonic stem cells," *Proteomics*, vol. 6, no. 12, pp. 3544–3549.
14. Bader, O., Weig, M., Taverne-Ghadwal, L., Lugert, R., Gross, U., Kuhns, M., (2011). Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 1359–1365.
15. Bardou, M., Honnorat, E., Dubourg, G., Couderc, C., Fournier, PE., Seng, P., et al., (2015). Meningitis caused by *Pasteurella multocida* in a dog owner without a dog bite: clonal lineage identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Res Notes*;8:626.
16. Bartsch, SM., McKinnell, JA., Mueller, LE., Miller, LG., Gohil, SK., Huang, SS., Lee, BY., (2017). Potential economic burden of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the United States. *Clin Microbiol Infect.* 23(48): e9–48 e16.
17. Batoy, S.M.A.B., Akhmetova, E., Miladinovic, S., Smeal, J., Wilkins, C.L., (2008). Developments in MALDI mass spectrometry: The quest for the perfect matrix. *Appl. Spectrosc. Rev.* 43, 485–550.
18. Beavis, R.C., Chait, B.T., (1989a). Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 3, 233.
19. Beavis, R.C., Chait, B.T., (1989b). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3, 432.
20. Beavis, R.C., Chait, B.T., (1989c). Matrix-assisted Laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3, 436.
21. Beavis, R.C., Chaudhary, T., & Chait, B.T., (1992). α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption MS. *Org. Mass Spectrom.* 27(2): 156-158.

22. Ben-David, D., Kordevani, R., Keller, N., Tal, I., Marzel, A., Gal-Mor, O., Maor, Y., Rahav, G., (2012). Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect.* 18:54–60.
23. Bishop, B., Geffen, Y., Plaut, A., Kassis, O., Bitterman, R., Paul, M., Neuberger, A., (2017). The Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry for Rapid Bacterial Identification in Patients with Smear-Positive Bacterial Meningitis, *Clin. Microbiol. Infect.*, 24,171-174.
24. Bizzini, A., Greub, G., (2010). Matrix-assisted laser desorption time - of- flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification, *FEMS Microbiology Reviews*, 34(3). 416-431.
25. Blair, J. M. A., & Piddock, L. J. V., (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: An update. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 512–519.
26. Bonomo, R.A., (2017). β -Lactamases: A focus on current challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(1):a025239.
27. Boyd, SE., Livermore, DM., Hooper, DC., Hope, WW., (2020). Metallo- β -lactamases: structure, function, epidemiology, treatment options, and the development pipeline. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e00397-20.
28. Braga, P.A., Tata, A., dos Santos, V.G., Barreiro, J.R., Schwab, N.V., dos Santos, M.V., Eberlin, M.N., Ferreira, C.R., (2013). Bacterial identification: from the agar plate to the mass spectrometer. *RSC Adv.* 3, 994–1008.
29. Brenner, DJ., Farmer, JJ., (2005). Family 1. Enterobacteriaceae Rahn 1937, Nom. Fam. Cons. Opin. 15, Jud. Comm. 1958a, 73; Ewing, Farmer, and Brenner 1980, 674; Judicial Commission 1981, 104, p 587–607. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed, vol 2. Springer, New York, NY.
30. Bryson, A.L., Hill, E.M., & Doern, C.D., (2019). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight: the revolution in progress. *Clin. Lab. Med.* 39: 391-404.
31. Buchan, BW., Riebe, KM., Ledebøer, NA., (2012). Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 50:346–52.

32. Burd, EM., Kehl, KS., (2011). A critical appraisal of the role of the clinical microbiology laboratory in the diagnosis of urinary tract infections. *J Clin Microbiol.* 49(9):34–8.
33. Burillo,A., Rodríguez-Sánchez, B., Ramiro, A., Cercenado, E., RodríguezCréixems, M., and Bouza, E., (2014). Gram-stain plus MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) for a rapid diagnosis of urinary tract infection. *PLoS One* 9:e86915.
34. Burman, L.G., Park, J.T., Lindstrom, E.B., Boman, H.G., (1973). Resistance of *Escherichia coli* to penicillins: identification of the structural gene for the chromosomal penicillinase. *J. Bacteriol.* 116:123–130.
35. Bush, K., Jacoby, GA., Medeiros, AA., (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:1211–33.
36. Bush, K., Jacoby, GA., (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:969–76.
37. Cadene, M., Chait, B.T., (2000). A robust, detergent-friendly method for mass spectrometric analysis of integral membrane proteins. *Anal. Chem.* 72, 5655–5658.
38. Cai, J.C., Hu, Y.Y., Zhang, R., Zhou, H.W., Chen, G.X., (2012) Detection of *OmpK36* porin loss in *Klebsiella* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2179–2182.
39. Cain, TC., Lubman, DM., Weber, WJ Jr., (1994). Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8:1026–30.
40. Calderano, A., Arcangeletti, M.-C., Rodighieto, I., et.al., (2014). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Scientific Reports.* 4(1): 1–10.
41. Calderaro, A., Buttrini, M., Piccolo, G., Montecchini, S., Gorrini, C., & Arcangeletti, M. C., (2020). MALDI-TOF mass spectrometry for direct microbial identification from positive blood cultures: Evaluation of the new Sepsityper® kit. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(2), e23059.
42. Camara, J. E., Hays, F. A., (2007). Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1633–1638

43. Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.L., Ferroni, A., Gutmann, L., Nassif, X., (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin. Biochem.* 44, 104–109.
44. Caruso, G., Cavaliere, C., Guarino, C., Gubbiotti, R., Foglia, P., Lagana, A., (2008). Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, no. 1, pp. 381–390.
45. Carvalhaes, CG., da Silva, AC., Streling, AP., et al., (2015). Detection of carbapenemase activity using VITEK MS: interplay of carbapenemase type and period of incubation. *J Med Microbiol*; 64:946-7.
46. Cassagne, C., Normand, A.-C., L’Ollivier, C., Ranque, S., Piarroux, R., (2016). Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification,” *Mycoses*, vol. 59, no. 11, pp. 678–690.
47. Cecchini, T., Yoon, E.J., Charretier, Y., Bardet, C., Beaulieu, C., Lacoux, X., Docquier, J.D., Lemoine, J., Courvalin, P.,GrillotCourvalin, C., et al., (2018). Deciphering Multifactorial Resistance Phenotypes in *Acinetobacter baumannii* by Genomics and Targeted Label-free Proteomics. *Mol. Cell. Proteom.* 17, 442–456.
48. Chao, Q.T., Lee, T.F., Teng, S.H., Peng, L.Y., Chen, P.H., Teng, L.J., Hsueh, P.R., (2014) Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. *PLoS ONE* 9, e109376.
49. Chen, R., Cheng, X., Mitchell, D., & et al., (1995). Tandem time-of-flight mass spectrometry for biomolecule analysis. *Analytical Chemistry*, 67(8), 1159–1163.
50. Chen, Y., Sun, J., Yang, Y., & Xu, Y., (2022). Multicenter evaluation of three MALDI-TOF MS systems for identification of clinically relevant filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 60(12), e00812-22.
51. Cobo, F., (2013). Application of maldi-tof mass spectrometry in clinical virology: a review,” 4e *Open Virology Journal*, vol. 7, no. 1, pp. 84–90. Cotter, R.J., (1999). *Anal. Chem.*, 71, 445A.
52. Cordovana, M., Kostrzewa, M., Glandorf, J., Bienia, M., & Ambretti, S., (2018). A full MALDI-based approach to detect plasmid-encoded KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2854.

53. Chen, J.H., Yam, W.C., Ngan, A.H., Fung, A.M., Woo, W.L., Yan, M.K., Choi, G.K., Ho, P.L., Cheng, V.C., Yuen, K.Y., (2013) Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3981–3987.
54. Chen, X.-F.; Hou, X.; Xiao, M.; Zhang, L.; Cheng, J.-W.; Zhou, M.-L.; Huang, J.-J.; Zhang, J.-J.; Xu, Y.-C.; Hsueh, P.-R., (2021). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis for the Identification of Pathogenic Microorganisms: A Review.
55. Chikh, L., Tessier, M., Fradet, A., (2007). NMR and MALDI-TOF MS study of side reactions in hyperbranched polyesters based on 2,2-bis(hydroxymethyl)propanoic acid. *Polymer.* 48:1884–92.
56. Chikh, L., Tessier, M., Fradet, A., (2008). Polydispersity of hyperbranched polyesters based on 2,2-bis (hydroxymethyl)propanoic acid: SEC/MALDI-TOF MS and ¹³C NMR/kinetic-recursive probability analysis. *Macromolecules.* 41:9044–50.
57. Christaki, E., Markou, M., Tofarides, A., (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution and Persistence. *Journal of molecular evolution*, 88(1):26-40.
58. Christner, M., Rohde, H., Wolters, M., Sobottka, I., Wegscheider, K., Aepfelbacher, M., (2010). Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1584–1591.
59. Citron, D.M., (2012). Pre-molecular identification: ignorance was bliss? *Anaerobe* 18, 189-191.
60. Clark, A.E.; Kaleta, E.J.; Arora, A.; Wolk, D.M., (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 547–603.
61. Claydon, MA., Davey, SN., Edwards-Jones, V., Gordon, DB., (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 14:1584–6.
62. Cooks, R.G., Rockwood, A.L., (1991). The ‘Thomson’. A suggested unit for mass spectroscopists. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 5, 93.
63. Cornaglia, G., Giamarellou, H., Rossolini, GM., (2011). Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* ; 11:381–93.

64. CLSI, (2017). *Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption*, 1st ed.; CLSI: Annapolis Junction, MD, USA.
65. Croxatto, A., Prod'homme, G., Greub, G., (2011). *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. Institute of Microbiology, University Hospital Center and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland.
66. Cuenod, A., Foucault, F., Pflüger, V., Egli, A., (2021). Factors Associated With MALDI-TOF Mass Spectral Quality of Species Identification in Clinical Routine Diagnostics. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:646648.
67. Danel, F., Hall, LM., Gur, D., Livermore, DM., (1997). OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:785–90.
68. Davenport, M., Mach, K. E., Shortliffe, L. M. D., Banaei, N., Wang, T. H., and Liao, J. C., (2017). New and developing diagnostic technologies for urinary tract infections. *Nat. Rev. Urol.* 14, 296–310. doi: 10.1038/nrurol.2017.20.
69. Darie-Ion, L., Whitham, D., Jayathirtha, M., Rai, Y., Neagu, A.-N., Darie, C.C., Petre, B.A., (2022). Applications of MALDI-MS/MS-Based Proteomics in Biomedical Research. *Molecules*; 27,6196.
70. De Carolis, E., Vella, A., Vaccaro, L., Torelli, R., Spanu, T., Fiori, B., Posteraro, B., Sanguinetti, M., (2014). Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *The Journal of Infection in Developing Countries* 8, 1081–1088.
71. Delport, JA., Strikwerda, A., Armstrong, A., Schaus, D., John, M., (2017). MALDI-TOF short incubation identification from blood cultures is associated with reduced length of hospitalization and a decrease in bacteremia associated mortality. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36:1181–1186.
72. Delport, J. A., Rautenbach, C., & Moodley, C., (2022). Diagnostic accuracy of MALDI-TOF MS for identifying bacterial pathogens in bloodstream infections: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 17(4), e0266743.
73. Demirev, P. A., Ho, Y. P., Ryzhov, V., Fenselau, C., (1999). Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. *Anal. Chem.* 71, 2732–2738.
74. Djordjevic, I., Choudhury, NR., Dutta, NK., Kumar, S., (2011). Poly [octanediol-co - (citric acid) - co - (sebacic acid)] elastomers: novel bio-elastomers for tissue engineering. *Polym. Int.* 60:333–43.

75. Doellinger, J., Schneider, A., Stark, T.D., Ehling-Schultz, M., & Lasch, P., (2020). Evaluation of MALDI-ToF mass spectrometry for rapid detection of cereulide from *Bacillus cereus* cultures. *Front. Microbiol.* 11: 511674.
76. Dortet, L., Tandé, D., de Briel, D., Bernabeu, S., Lasserre, C., & Gregorowicz, G., (2018). MALDI-TOF for the rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Comparison of the commercialized MBT STAR-Carba IVD Kit with two in-house MALDI-TOF techniques and the RAPIDEC CARBA NP test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(9), 2352–2359.
77. Duncan, M.W., (2016). Applications of MALDI Mass Spectrometry in Clinical Chemistry, Volume 62, Issue 1, 134–143.
78. Durante-Mangoni, E., Andini, R., Zampino, R., (2019). Management of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections.
79. Ebomah, K.E., Okoh, A.I., (2020). An African perspective on the prevalence, fate and effects of carbapenemresistance genes in hospital effluents and wastewater treatment plant(WWTP) final effluents: A critical review (PDF) An African perspective on the prevalence, fate and effects of carbapenem resistance genes in hospital effluents and wastewater treatment plant (WWTP) final effluents: A critical review.
80. Espinosa, R.F., Rumi, V., Marchisio, M., Cejas, D., Radice, M., Vay, C., Barrios, R., Gutkind, G., Di Conza, J., (2018). Fast and easy detection of CMY-2 in *Escherichia coli* by direct MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* 148, 22–28.
81. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Stockholm: ECDC;, (2017). Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
- Exner, M., (2017). Antibiotic Resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? pp. 1-24.
82. Fang, R., Liu, H., Zhang, X., Dong, G., Li, J., Tian, X., Wu, Z., Zhou, J., Cao, J., Zhou, T., (2021). Difference in biofilm formation between carbapenem-resistant and carbapenem-sensitive *Klebsiella pneumoniae* based on analysis of mrkH distribution. *Micro Pathog.* 152, 104743.
83. Farmer JJ, III, Farmer MK, Holmes B., (2005). The Enterobacteriaceae: general characters, p 1317–1359. In Borriello SP, Murray PR, Funke G (ed), Topley &

Wilson's microbiology & microbial infections, 10th ed, vol 2. Hodder Arnold, London, United Kingdom.

84. Fenn, JB., Mann, M., Meng, CK., Wong, SF., Whitehouse, CM., (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*; 246:64-71.

85. Fenselau, C., (2012). Rapid characterization of microorganisms by mass spectrometry—what can Be learned and how? *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 24, 1161–1166.

86. Fernandez-Olmos, A., Garcia-Castillo, M., Morosini, M.-I., Lamas, A., Maiz, L., Canton, R., (2012). MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram-negative isolates from cystic fibrosis patients,” *Journal of Cystic Fibrosis*, vol. 11, no. 1, pp. 59-62.

87. Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Munoz-Bellido, J.L., Gonzalez-Buitrago, J.M., (2010). Rapid identification of urinary tract pathogens by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 92(3), 231,236.

88. Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Munoz-Bellido, J.L., Gonzalez-Buitrago, J.M., (2010a). Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect* 17: 1007–1012.

89. Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Gonzalez-Avila, M., CembreroFucinos, D., Herrero-Hernandez, A., Gonzalez-Buitrago, JM., Munoz-Bellido, JL., (2010b). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48: 2110–2115.

90. Feucherolles, M., (2022). MALDI-TOF-Enabled Subtyping and Antimicrobial Resistance Screening of the Food and Waterborne Pathogen *Campylobacter*

91. Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, NKJ., Hartog, CS., Tsaganos, T., Schlattmann, P., (2016). Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med* ;193:259–72.

92. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., and Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 269–284. doi: 10.1038/nrmicro3432

93. Florio, W., Morici, P., Ghelardi, E., Barnini, S., Lupetti, A., & Ghelardi, E., (2018). Recent advances and applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(15), 4311–4324.
94. Foxman, B., Barlow, R., D'Arcy, H., et al., (2000). Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol*; 10: 509–15.
95. Foxman, B., (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol*. 7(12):653–60.
96. Freiwald, A., Sauer, S., (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat. Protoc*. 4(5): 732-742.
97. Fukuyama, Y., Nakaya, S., Yamazaki, Y., Tanaka, K., (2008). Ionic liquid matrixes optimized for MALDI-MS of sulfated/sialylated/neutral oligosaccharides and glycopeptides. *Anal Chem*. 80:2171–9.
98. Fumio, N., Sachio, T., Syota, M., Mamoru, S., Kazuyuki, M., (2020). Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection.
99. Garner, O., Mochon, A., Branda, J., Burnham, C.A., Bythrow, M., Ferraro, M., Ginocchio, C., Jennemann, R., Manji, R., Procop, G.W., (2014). Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK(R) MS system. *Clin. Microbiol. Infect*. 20, 335–339.
100. Giakoupi, P., Maltezou, H., Polemis, M., Pappa, O., Saroglou, G., Vatopoulos, A., (2009). Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. *Eurosurveillance* 14:19218.
101. Giebel, R.A., Fredenberg, W., & Sandrin, T.R., (2008). Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Water Res*. 42: 931-940.
102. Ghafourian, S., Nourkhoda S., Soheili, S., Sekawi, Z., (2015). Extended Spectrum
Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*, 17:11-22.
103. Goldstein, J.E., Zhang, L., Borror, C.M., Rago, J.V., & Sandrin, T.R., (2013). Culture conditions and sample preparation methods affect spectrum quality and reproducibility during profiling of *Staphylococcus aureus* with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Lett. Appl. Microbiol*. 57(2): 144-150.

104. Guerrero, I.C.; Kleiner, O., (2005). Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci. Rep.* 25, 71–93.
105. Guilhaus, M., (1995). Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 30(12), 1519.
106. Guo, B., Chen, H., Rashidzadeh. H., Liu, X., (1997). Observation of varying molecular weight distributions in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight analysis of polymethyl methacrylate. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 11:781–5.
107. Hall, LM., Livermore, DM., Gur, D., Akova, M., Akalin, HE., (1993). OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:1637–44.
108. Han, S.-S.; Jeong, Y.-S.; Choi, S.-K., (2021). Current Scenario and Challenges in the Direct Identification of Microorganisms Using MALDI TOF MS.
109. Hanson, N.D., Sanders, C.C., (1999). Regulation of inducible AmpC -lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Curr. Pharm. Des.* 5:881–894.
110. Harvey, DJ., (1999). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates. *Mass Spectrom Rev.* 18:349–450.
111. Hasan, CM., Turlej-Rogacka, A., Vatsopoulos, AC., Giakkoupi, P., Maâtallah, M., Giske, CG., (2014). Dissemination of blaVIM in Greece at the peak of the epidemic of 2005–2006: clonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 147. *Clin Microbiol Infect* 20:34 –37.
112. Hegmans, J.P.J.J., Bard, M.P.L., Hemmes, A., et.al., (2004). “Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells,” 4e American Journal of Pathology, vol. 164, no. 5, pp. 1807–1815.
113. Hettick, J. M., Kashon, M. L., Simpson, J. P., Siegel, P. D., Mazurek, G. H., Weissman, D. N., (2004). Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76, 5769–5776.
114. Hillenkamp, F., (1989). Laser desorption mass spectrometry: mechanisms, techniques, and applications. *Advances in Mass Spectrometry Vol. 11A*, P. Longevialle (ed). Heyden & Son: London, pp 354; Proceeding of the 11th International Mass Spectrometry Conference held at Bordeaux 29 August-2September 1988.
115. Holland, RD., Wilkes, JG., Rafi, F., Sutherland, JB., Persons, CC., Voorhees, KJ., et al., (1966). Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral

patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 10:1227–32.

116. Holmes, A.H., Moore L.S.P., Sundsford, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J, Piddock, L.J.V., (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387:176-187.

117. Hou, T.-Y., Chiang-Ni, C., Teng, S.-H., (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J. Food Drug Anal.* 27, 404–414.

118. Hrabák, J., Walkova, R., Studentova, V., et al., (2011). Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*; 49:3222-7.

119. Hrabak, J., Chudackova E., Walkova, R., (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 26, no. 1, pp. 103–114.

120. Huang, B., Zhang, L., Zhang, W., Liao, K., Zhang, S., Zhang, Z., et al., (2017). Direct detection and identification of bacterial pathogens from urine with optimized specimen processing and enhanced testing algorithm. *J. Clin. Microbiol.* 55, 1488–1495. doi: 10.1128/JCM.02549-16.

121. Hu, Y.Y., Cai, J.C., Zhou, H.W., Zhang, R., Chen, G.X., (2015). Rapid detection of porins by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Front. Microbiol.* 6, 784.

122. Huberty, MC., Vath, JE., Yu, W., Martin, SA., (1993). Site-specific carbohydrate identification in recombinant proteins using MALD-TOF MS. *Anal Chem.* 65:2791–800.

123. Huguenin, A., Depaquit, J., Villena, I., Ferte, H., (2019). MALDI-TOF mass spectrometry: a new tool for rapid identification of cercariae (Trematoda, Digenea),” *Parasite*, vol. 26.

124. Huovinen, P., Huovinen, S., Jacoby, GA., (1988). Sequence of PSE-2 beta β lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 32(1):134–136. Assignment of the PSE-2/OXA-10 β -lactamase into a new molecular class D.

125. Idelevich, EA., Schüle, I., Grünastel, B., Wüllenweber, J., Peters, G., Becker, K., (2014). Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect* 20:1001–1006.

126. Idelevich, E. A., Sparbier, K., Kostrzewa, M., & Becker, K. (2018). Rapid detection of bloodstream pathogens by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel on-plate extraction method. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(6), 738–743.
127. Íñigo, M., Coello, A., Fernández-Rivas, G., Rivaya, B., Hidalgo, J., Quesada, M. D., et al., (2016). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples, combining urine screening methods and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 54, 988–993.
128. Jacobs, C., Huang, L., Bartowsky, E., Normark, S., Park, J.T., (1994). Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effector for β -lactamase induction. *EMBO J.* 13:4684–4694.
129. Jacobs, C., Fre`re, J.M., Normark, S., (1997). Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* 88:823–832.
130. Jamal, W.Y., Shahin, M., Rotimi, V.O., (2013). Comparison of two matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry methods and API 20AN for identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *J. Med. Microbiol.* 62, 540–544.
131. Janda, JM., Abbott, SL., (2006). *The enterobacteria*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
132. Janda, JM., Abbott, SL., (2015). The family Enterobacteriaceae. In Goldman E, Green LH (ed), *Practical handbook of microbiology*, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. p 307–319.
133. Janda, JM., Abbott, SL., (2021). The changing face of the family Enterobacteriaceae (order: “Enterobacterales”): new members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. *Clin Microbiol Rev* 34: e00174-20.
134. Jang, K.S., Kim, Y.H., (2018). Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *J. Microbiol.* 56(4): 209-2016.
135. Jiajia, Y., Jingxian, L., Yuanrui, L., Jing, Y., Weinan, Z., Ying, L., Lisong, S., (2018). Rapid detection of carbapenemase activity of Enterobacteriaceae isolated from positive blood cultures by MALDI-TOF MS
136. Jiayue, M., Xiaorui, S., Mingchao, L., Zengyuan, Y., Weyland, C., Zhidan Yu., Wancun, Z., Yaodong, Z., Adong, S., Huiqing, S., Lifeng, L., (2022). Global spread

of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy.

137. Jorgensen, T.J., Bojesen, G., Rahbek-Nielsen, H., (1998). The proton affinities of seven matrix-assisted laser desorption/ionization matrices correlated with the formation of multiply charged ions. *Eur Mass Spectrom.* 4:39–46.
138. Jousimies-Somer, H., Summanen, P., Citron, D., Baron, E., Wexler, H., Finegold, S., Wadsworth, KTL., (2002). *Anaerobic Bacteriology Manual*, sixth ed., Star Publishing Company, Belmont, CA.
139. Jussiaux, F., Miot-Sertier, C., Nguyen-Lopez, D., & Badet, C., (2021). Reliability of MALDI-TOF mass spectrometry to identify oral isolates of *Streptococcus salivarius* and *Lactobacillus* spp. *Arch. Oral Biol.* 121: 104983.
140. Karas, M., Hillenkamp, F., (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60, 2299.
141. Karas, M., et al., (1998). Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60: 2299-2301.
142. Karas, M., Krüger, R., (2003). Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem. Rev.* 103, 427–440.
143. Kazazić, S.P., Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Babić, S., Florio, D., Fioravanti, M., Bojanić, K., & Čož-Rakovac, R., (2019). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry identification of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* isolated from sea bass and sea bream. *PLOS One.* 14(11): e0225343.
144. Kern, WV., Rieg, S., (2020). Burden of bacterial bloodstream infection-a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens[J]. *Clin Microbiol Infect.* 26(2):151–7.
145. Khademhosseini, A., Langer, R., Borenstein, J., Vacanti, JP., (2006). Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad. Sci USA.* 103:2480–7.
146. Kim, Y., Park, K.G., Lee, K., Park, Y.J., (2015). Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples using the Vitek MS system based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Ann. Lab. Med.* 35, 416–422.

147. Kim, E., Cho, E.J., Yang, S.M., Kim, M.J., Kim, H.Y., (2021). Novel approaches for the identification of microbial communities in kimchi: MALDI-TOF MS analysis and high-throughput sequencing. *Food Microbiol.* 94, 103641.
148. Kohlmann, R., Hoffmann, A., Geis, G., Gatermann, S., (2015). MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int J Med Microbiol* 305:469–479.
149. Kollef, MH., (2000). Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 31(suppl 4): S131–S138.
150. Kostrzewa, M., Sparbier, K., Maier, T., Schubert, S., (2013). “MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms,” *PROTEOMICS–Clinical Applications*, vol. 7, no. 11-12, pp. 767–778.
151. Kostrzewa, M., Nagy, E., Schrottner, P., Pranada, A.B., (2019). How MALDI-TOF mass spectrometry can aid the diagnosis of hard-to-identify pathogenic bacteria - the rare and the unknown, *Expert Rev. Mol. Diagn* 19, 667-682.
152. Knox, J., Jadhav, S., Sevier, D., et al., (2014). Phenotypic detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Carba NP test. *J Clin Microbiol*; 52:4075-7.
153. Kumar, A., Roberts, D., Wood, KE., Light, B., Parrillo, JE., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 34(6):1589–96.
154. La Scola, B., Fournier, P.E., Raoult, D., (2011). Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era, *Anaerobe* 17, 106-112.
155. Lange, C., Schubert, S., Jung, J., et al., (2014). M. Quantitative matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol*;52:4155-62.
156. Lange, F., Pfennigwerth, N., Hofken, L.M., Gatermann, S.G., Kaase, M., (2019). Characterization of mutations in *Escherichia coli* PBP2 leading to increased carbapenem MICs. *J. Antimicrob. Chemother.* 74 (3), 571–576.
157. Lattová, E., Chen, VC., Varma, S., Bezabeh, T., Perreault, H., (2007). Matrix-assisted laser desorption/ionization on-target method for the investigation of

oligosaccharides and glycosylation sites in glycopeptides and glycoproteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 21:1644–50.

158. Lasch, P., Jacob, D., Grunow, R., Nattermann, H., Stämmler, M., Hipp, K., Naumann, D., (2016). Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Results of an interlaboratory ring trial. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 2016–2024.

159. Lasserre, C., De Saint Martin, L., Cuzon, G., (2015). Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30minutes. *J Clin Microbiol*; 53: 2163–71.

160. Lawandi, A., (2023). Bloodstream infections in Sepsis: better the Devil you Know[J]. *Crit Care Med.* 51(9):1261–3.

161. Leibovici, L., Shraga, I., Drucker, M., Konigsberger, H., Samra, Z., Pitlik, SD., (1998). The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med* 244: 379–386.

162. Leonard, D.A., Bonomo, R.A., Powers, R.A. (2013). Class D β -lactamases: A reappraisal after five decades. *Acc Chem Res*, 46:2407-2415.

163. Leopold, J., Popkova, Y., Engel, K.M., Schiller, J., (2018). Recent Developments of Useful MALDI Matrices for the Mass Spectrometric Characterization of Lipids. *Biomolecules*, 8, 173.

164. Li, Y., Shan, M., Zhu, Z., Mao, X., Yan, M., Chen, Y., Zhu, Q., Li, H., Gu, B., (2019). Application of MALDI-TOF MS to rapid identification of anaerobic bacteria, *BMC Infect. Dis.* 19, 941.

165. Li, Y., Zhao, J., & Wu, J., (2023). Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS systems in identifying Streptococcus species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, Article 1018319.

166. Liu, G., Thomsen, L.E., Olsen, G.E., (2022). Antimicrobial-induced of horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: a mini review. *J Antimicrob Chemother*, 77:556-567.

167. Logan, LK., Weinstein, RA., (2017). The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis.*;215:S28–36.

168. Lorenzo-Díaz, F., Fernández-López, C., Lurz, R., Bravo, A., Espinosa, M., (2017). Crosstalk between vertical and horizontal gene transfer: plasmid replication control by a conjugative relaxase. *Nucleic Acids Res*, 45(13):7774-7785.
169. Luzzaro, F., Docquier, J-D., Colinon, C., Endimiani, A., Lombardi, G., Amicosante, G., Rossolini, GM., Toniolo, A., (2004). Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo--lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 648–650.
170. Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A., (2018). *Brock biology of microorganisms* (15th ed.). Pearson.
171. Madonna, A.J., Basile, F., Ferrer, I., Meetani, M.A., Rees, J.C., Voorhes, K.J., (2000). On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 kDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14: 2220-2229.
172. Mamyrin, B. A., (2001). Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). *International Journal of Mass Spectrometry*, 206(3), 251–266.
173. Mann, M., Talbo, G., (1996). Developments in matrix-assisted laser desorption/ionization peptide mass spectrometry. *Curr. Opin Biotechnol.*, 7, 11–9.
174. Mandrell, R.E., Harden, L.A., Bates, A., Miller, W.G., Haddon, W.F., Fagerquist, C.K., (2005). Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10): 6292-6307.
175. Markides, K., Gräslund, A., (2013). Advanced information on the nobel prize in chemistry 2002. *Royal Swedish Academy of Sciences*. p. 1–13.
176. Masi, M., Winterhalter, M., Pages, J.M., (2019). Outer membrane porins. *Subcell. Biochem.* 92, 79–123.
177. McElvania TeKippe, E., Shuey, S., Winkler, D.W., Butler, M.A., & Burnham, C.A.D., (2013). Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper spectrometry system. *J. Clin. Microbiol.* 51(5): 1421-1427.
178. McLellan, L. K., and Hunstad, D. A., (2016). Urinary tract infection: pathogenesis and outlook. *Trends Mol. Med.* 22, 946–957. doi: 10.1016/j.molmed.2016. 09.003

179. Mmatli, M., Mbelle, N.M., Maningi, N.E., Osei Sekyere, J., (2020). Emerging transcriptional and genomic mechanisms mediating carbapenem and polymyxin resistance in enterobacteriaceae: a systematic review of current reports. *mSystems* 5 (6).
180. Mohammad, Y., Ashfaq, Dana A., Da'na Mohammad, A., Al-Ghouti., (2021). Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review.
181. Morgenthaler, N. G., & Kostrzewa, M. (2021). Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: Review and meta-analysis of the performance of the Sepsityper kit. *International Journal of Microbiology*, 2021, 6687010.
182. Monopoli, A., Nacci, A., Cataldi, T.R.I., Calvano, C.D., (2020). Synthesis and Matrix Properties of alpha-Cyano-5-phenyl-2,4-pentadienic Acid (CPPA) for Intact Proteins Analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Molecules*. 25, 6054.
183. Morris, H.R., Paxton, T., Panico, M., et al., (1997). A novel geometry mass spectrometer the Q-TOF, for low-femtomole/attomole-range biopolymer sequencing. *J. Protein Chem.*, 16, 469–79.
184. Mörtelmaier, C., Panda, S., Robertson, I., Krell, M., Christodoulou, M., Reichardt, N., Mulder, I., (2019). Identification performance of MALDI-ToF-MS upon mono- and bi-microbial cultures is cell number and culture proportion dependent. *Anal. Bioanal. Chem.* 411: 7027-7038.
185. Moura, H., Woolfitt, A.R., Carvalho, M.G., Pavlopoulos, A., Teixeira, L.M., Satten, G.A., Barr, J.R., (2008). MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53: 333-342.
186. Moura de Sousa, J., Lourenço, M., & Gordo, I., (2023). Horizontal gene transfer among host-associated microbes. *Cell Host & Microbe*, 31(4), 513–527.
187. Munson, EL., Diekema, DJ., Beekmann, SE., Chapin, KC., Doern, GV., (2003). Detection and treatment of bloodstream infection: laboratory reporting and antimicrobial management. *J Clin Microbiol* 41: 495–497.
188. Murray Group, (2011). Infrared MALDI, Louisiana State University.
189. Naas, T., Dortet, L., Iorga, B.I., (2016). Structural and functional aspects of class A carbapenemases. *Curr Drug Targets*, 17:1006-1028.

190. Nagy, E., Becker, S., Kostrzewa, M., Barta, N., Urban, E., (2012). The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories,” *Journal of Medical Microbiology*, vol. 61, no. 10, pp. 1393–1400.
191. Nagy, E., (2014). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new possibility for the identification and typing of anaerobic bacteria, *Future Microbiol.* 9, 217-233.
192. Naylor, S., Kumar, R., (2003). Emerging role of mass spectrometry in structural and functional proteomics. *Adv. Protein Chem.*, 65, 217–48.
193. Neuenschwander, F.R., Gross, B., Schubert, S., Mauder, N., Schulze, M.H., Gunther, S., Biebl, M., Bloch, W., (2023). Rapid antibiologic susceptibility testing of Gram-negative bacteria directly from urine samples of UTI patients using MALDI_TOF MS. *Antibiotics*, 12(6), 1042.
194. Ng, E.W., (2013). Advances in MALDI Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Applications, *Chemical Diagnostics*, Volume 336, 139–175.
195. Nguyen, N.Q., Krishnan, N.P., Rojas, L.J., Prati, F., Caselli, E., Romagnoli, C.,
196. Bonomo, R.A., Akker F.V.D., (2016). Crystal structures of KPC-2 and SHV-1 β -lactamases in complex with the boronic acid transition state analog S02030. *Antimicrob Agents Chemother*, 60:1760-1766.
197. Nielen, MW., Malucha, S., (1997). Characterization of polydisperse synthetic polymers by size-exclusion chromatography/matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 11:1194–204.
198. Nicolle, LE., (2013). Urinary tract infection. *Crit Care Clin*; 29: 699–715. Nielen, MWF., (1999). MALDI time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers. *Mass Spectrom. Rev.* 18:309–44.
199. Nikaido, H., (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593–656.
200. Nyvang Hartmeyer, G., Kvistholm Jensen, A., Bocher, S., Damkjaer Bartels, M., Pedersen, M., Engell Clausen, M., et al., (2010). Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand J Infect Dis* ;42:716e8.

201. Oros, D., Borda, A., Kelemen, R., Ionescu, I.R., Pall, E., Oprean, R., Muntean, D., (2020). Identification of pathogens from native urine samples by MALDI-TOF/TOF MS and bottom-up proteomics. *Clinical Proteomics*, 17, 25.
202. Ouedraogo, R., Daumas, A., Ghigo, E., Capo, C., Mege, J.-L., Textoris, J., (2012). Whole-cell MALDI-TOF MS: a new tool to assess the multifaceted activation of macrophages,” *Journal of Proteomics*, vol. 75, no. 18, pp. 5523–5532.
203. Oviano, M., Fernandez, B., Fernandez, A., et al., (2014). Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*; 20:1146-57.
204. Oviano, M., Sparbier, K., Barba, MJ., et al., (2016). Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). *Int J Antimicrob Agents*; 48: 655–60.
205. Oviano, M., Ramirez, C.L., Barbeyto, L.P., Bou, G., (2017). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae directly from urine samples by MALDI-TOF MS. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(5), 1350-1354.
206. Oviano, M., & Bou, G. (2019). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(1), e00037-18.
207. Palacios-Baena, Z. R., Gutierrez-Gutierrez, B., De Cueto, M., Viale, P., Venditti, M., Hernandez-Torres, A., et al. (2017). Development and validation of the INCREMENT-ESBL predictive score for mortality in patients with bloodstream infections due to extended-spectrum-beta-lactamase.
208. Park, J. H., Choi, S. H., Hwang, S. M., Hong, Y. J., Kim, T. S., & Park, K. U., (2021). Comparison of Autof MS1000 and Bruker Biotyper MALDI-TOF MS platforms for routine identification of clinical microorganisms. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(1), e23667.
209. Papac, DI., Wong, A., Jones, AJS., (1996). Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 68:3215–23.
210. Papagiannitsis, CC., Studentova, V., Izdebski, R., et al., (2015). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis

assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for the direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol*; 53: 1731–5.

211. Patel ,G., Huprikar, S., Factor, SH., Jenkins, SG., Calfee, DP., (2008). Outcomes of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 29:1099–1106.

212. Patel, G., Bonomo, RA., (2013). “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol*; 4:1–17.

213. Patel, R., (2015). MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin. Chem*. 61, 100–111.

214. Patel, R.A., (2019). A moldy application of MALDI: MALDI-TOF mass spectrometry for fungal identification,” *Journal of Fungi*, vol. 5, no. 1, p. 4.

215. Patterson, SD., Aebersold, R., (1995). Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis* 16: 1791-1814.

216. Peeters, B., Magerman, K., Waumans, L., Cartuyvels, R., (2016). Laboratory survey and literature review of anaerobic bacteriology: foundations of a clinically orientated and evidence-based workup for anaerobic cultures, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 86, 15-22.

217. Pennanec, X., Dufour, A., Haras, D., & Réhel, K., (2010). A quick and easy method to identify bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 24(3): 384-392.

218. Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G.A., (2002). Plasmid-determined AmpC-type -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 46:1–11.

219. Popovic, N.T., Kazazic, S.P., Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., (2017). Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS.

220. Prow, TW., Grice, JE., Lin, LL., et al., (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 63:470–91.

221. Queenan, A.M., Bush, K., (2007). Carbapenemases: the Versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3):440-458.

222. Ravi Kumar M., (2008). Handbook of particulate drug delivery (2-Volume Set). American Scientific Publishers ISBN.

223. Reeve M.A., Bachmann D., (2019). A method for filamentous fungal growth and sample preparation aimed at more consistent MALDI-TOF MS spectra despite variations in growth rates and/or incubation times. *Biol Methods Protoc*. 4:1–14.

224. Rhee, C., Kadri, SS., Dekker, JP., (2020). Prevalence of antibiotic-resistant pathogens in Culture-Proven Sepsis and outcomes Associated with inadequate and broad-spectrum empiric antibiotic Use. *JAMA Netw Open*. 3(4):e202899.
225. Richter, S. S., Sercia, L., Branda, J. A., Burnham, C. D., Bythrow, M., Ferraro, M. J., Procop, G. W., (2013). Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32(12), 1571–1578.
226. Rijal, N., (2023). MALDI-TOF Mass Spectrometry: Principle, Applications in Microbiology. *Microbe online*.
227. Rodríguez-Bano, J., Gutierrez-Gutierrez, B., Machuca, I., Pascual, A., (2018). Treatment of infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*; 31.
228. Rodriguez-Sanchez, B., Alcala, L., Marin, M., Ruiz, A., Alonso, E., Bouza, E., (2016). Evaluation of MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) for routine identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe*. 42, 101–107.
229. Roncarati, G., Foschi, C., Ambretti, S., Carla Re, M., (2021). Rapid identification and detection of β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from positive blood cultures by MALDI-TOF/MS.
230. Ruelle, V., El Moualij, B., Zorzi, W., Ledent, P., & Fontaine, V., (2004). Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(18), 2013–2019.
231. Ruotolo, BT., Gillig, KJ., Woods, AS., et al., (2004). Analysis of phosphorylated peptides by ion mobility-mass spectrometry. *Anal Chem*. 76:6727–33.
232. Ruppe, E., Woerther, P.L., Barbier, F., (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in gram negative bacilli. *Ann Intensive Care*, 5:21
233. Sakarikou, C., Ciotti M, Dolfa C, et al., (2017). Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *BMC Microbiol*; 17:54.
234. Samaha-Kfoury, J.M., Araj, G.F., (2003). Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. *BMJ*, 327:1209-1213.

235. Sandrin, T. R., Goldstein, J. E., & Schumaker, S., (2013). MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrometry Reviews*, 32(3), 188–217.
236. Sandrin, T.R., & Demirev, P.A., (2018). Characterization of microbial mixtures by mass spectrometry. *Mass Spec. Rev.* 37(3): 321-349.
237. Sanseverino, I., Navarro Cuenca, A., Loos, R., Marinov, D., & Lettieri, T., (2018). State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance (EUR 29592 EN, JRC 114775). Publications Office of the European Union.
238. Satlin, MJ., Kubin, CJ., Blumenthal, JS., Cohen, AB., Furuya, EY., Wilson, SJ., et al., (2011). Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. *Antimicrob Agents Chemother*; 55:5893-9.
239. Sato, K., Yoshida, K., Takahashi, S., Anzai, J-I., (2011). pH-and sugar-sensitive layer-by-layer films and microcapsules for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 63:809–21.
240. Sawa, T., Kooguchi, K., Moriyama, K., (2020). Molecular diversity of extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J. Intensive Care* 8, 13.
241. Schaumann, R., Knoop, N., Genzel, G.H., Losensky, K., Rosenkranz, C., Stingu, C.S., Schellenberger, W., Rodloff, A.C., Eschrich, K., (2012). A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Med. Sci. Monit.* 18, MT71–MT77.
242. Segawa, S., Sawai, S., Murata, S., Nishimura, M., Beppu, M., Sogawa, K., Watanabe., M., Satoh, M., Matsutani, T., Kobayashi, M., et al., (2014). Direct Application of MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY to Cerebrospinal Fluid for Rapid Pathogen Identification in a Patient with Bacterial Meningitis, *Clin. Chim. Acta*, 435,59-61.
243. Seng, P., Drancourt, M., Gourié, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, J.M., Raoult, D., (2009). Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix - assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543-551.
244. Scott JS, Sterling SA, To H, Seals SR, Jones AE., (2016). Diagnostic performance of matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass

- spectrometry in blood bacterial infections: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis.* 48:530–6.
245. Sedo, O., Sedlaek, I., Zdrahal, Z., (2011). Sample preparation methods for MALDI-MS profiling of bacteria. *Mass Spectrom. Rev.* 30 (3), 417–434.
 246. Sekiya, S., Wada, Y., Tanaka, K., (2005). Derivatization for stabilizing sialic acids in MALDI-MS. *Anal.Chem.* 77:4962–8.
 247. Seng, P.; Drancourt, M.; Gouriet, F.; La Scola, B.; Fournier, P.E.; Rolain, J.M.; Raoult, D., (2009). Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49, 543–551.
 248. Shah, H.N., Keys, C.J., Schmid, O., Gharbia, S.E., (2002). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology, *Clin. Infect. Dis.* 35; S58-S64.
 249. Shakil, S., Khan, R., Zarrilli, R., Khan, A.U., (2008). Aminoglycosides versus bacteria—a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J. Biomed. Sci.* 15, 5–14.
 250. Shannon, S., Kronemann, D., Patel, R., Schuetz, A.N., (2018). Routine use of MALDI-TOF MS for anaerobic bacterial identification in clinical microbiology, *Anaerobe* 54, 191-196.
 251. Simmon, K.E., Mirrett, S., Reller, L.B., Petti, C.A., (2008). Genotypic diversity of anaerobic isolates from bloodstream infections, *J. Clin. Microbiol.* 46, 1596-1601.
 252. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, PK., Viridi, JS., (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6:791.
 253. Singhal, N., Kumar, M., Viridi, J.S., (2016). MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects,” *Parasitology*, vol. 143, no. 12, pp. 1491–1500.
 254. Siting, S., Dandan, M., Shiwen, X., Chenjie, Y., Zhenya, Y., HongYu, W., (2017). Research progress in penicillin binding proteins and their mediated bacterial resistance. *Microbiology* 44 (4), 902–910.
 255. Snyder, L., and Champness, W., (2007). *Molecular genetics of bacteria* (3rd ed.). ASM Press.

256. Solouki, T., Marto, J.A., White, F.M., et al., (1995). Attomole biomolecule mass analysis by matrix-assisted-laser-desorption ionization Fourier-transform ion-cyclotron resonance. *Anal. Chem.*, 67, 4139–44.
257. Soro-Yao, A.A., Schumann, P., Thonart, P., Dje, K.M., Pukall, R., (2014). The use of MALDI-TOF mass spectrometry, ribotyping and phenotypic tests to identify lactic acid bacteria from fermented cereal foods in abidjan (cote d'Ivoire). *The Open Microbiology Journal*, vol. 8, no. 1, pp. 78–86.
258. Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., & Kostrzewa, M., (2012). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 927–937.
259. Sparbier K, Lange C, Jung J, et al., (2013). MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *J Clin Microbiol* ;51:3741-8.
260. Sparbier K, Schubert S, Kostrzewa M., (2016). MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? *Methods* 104:48-54.
261. Sparbier, K., Schubert, S., & Kostrzewa, M. (2020). MBT-ASTRA: A novel protocol for detection of antibiotic susceptibility by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(12), 1611–1617.
262. Stewart, E.J., (2012). Growing unculturable bacteria. *J. Bacteriol.* 194(16): 4151-4160.
263. Stover, CK., Pham, XQ., Erwin, AL., Mizoguchi, SD., Warrenner, P., Hickey, MJ., Brinkman, FS., Hufnagle, WO., Kowalik, DJ., Lagrou, M., Garber, RL., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, LL., Coulter, SN., Folger, KR., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, GK., Wu, Z., Paulsen, IT., Reizer, J., Saier, MH., Hancock, RE., Lory, S., Olson, MV., (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406:959–64.
264. Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., Robicsek, A., (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 664–689.
265. Strupat, K., Karas, M., & Hillenkamp, F., (1991). 2,5-dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption ionisation MS. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 111: 89-102.
266. Sutton, M., (2022). The discovery of mass spectrometry. *Chemistry World*.

267. Syvanen, M., (2012). Evolutionary implications of horizontal gene transfer. *Ann Rev Genet*, 46:341-358.
268. Tajiri, M., Takeuchi, T., Wada, Y., (2009). Distinct features of matrix-assisted 6 lm infrared laser desorption/ionization mass spectrometry in biomolecular analysis. *Anal Chem*. 81:6750–5.
269. Talrose, V. L., Person, M.D., Whittall, R.M. et al., (1999). *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 13, 2191.
270. Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, Tekle T, Roberts A, Taiwo A, Simner PJ., (2017). Comparing the outcomes of patients with carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia. *Clin Infect Dis*. 64:257–264.
271. Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T., (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2, 151–153.
272. Tenover, F.C., (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6 Suppl 1): S3-10.
273. Thomas, C. M., and Nielsen, K. M., (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711–721.
274. Torres-Sangiao, E.; Leal Rodriguez, C.; García-Riestra, C., (2021). Application and Perspectives of MALDI–TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories.
275. Tsuchida, S., Umemura, H., Nakayama, T., (2020). Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology.
276. Tsuchida, S., Umemura, H., Murata, S., Miyabe, A., Satoh, M., Matsushita, K., Nakayama, T., Nomura, F., (2021). Effect of humidity during sample preparation on bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1176:122780.
277. Tsuchida, S., Nakayama, T., (2022). MALDI-based Mass Spectrometry in Clinical Testing: Focus on Bacterial Identification. *Appl. Sci*. 12,2814.
278. Tsung-Yun Hou., Chuan Chiang-Ni., Shih-Hua Teng., (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology.

279. Ulger Toprak, N., Alida, C.M.V., Urban, E., Wybo, I., Justesen, U.S., Jean-Pierre, H., Morris, T., Akgul, O., Kulekci, G., Soyletir, G., (2018). Performance of mass spectrometric identification of clinical *Prevotella* species using the VITEK MS system: A prospective multi-center study. *Anaerobe*. 54, 205–209.
280. Veloo, A.C.M., Elgersma, P.E., Friedrich, A.W., Nagy, E., & van Winkelhoff, A.J., (2014). The influence of incubation time, sample preparation and exposure to oxygen on the quality of the MALDI-TOF MS spectrum of anaerobic bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 0(12): 1091-1097.
281. Vermillion-Salsbury, R.; Hercules, D., (2002). General equation for calculating the dissociation constants of polyprotic acids and bases from measured retention factors in high-performance liquid chromatography. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1575–1581.
282. Verroken, A., Defourny, L., Lechgar, L., Magnette, A., Delmée, M., Glupczynski, Y., (2015). Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34:405–413.
283. Veron, L., Mailler, S., Girard, V., Muller, B.H., L’Hostis, G., Ducruix, C., Lesenne, A., Richez, A., Rostaing, H., Lanet, V., et al., (2015). Rapid urine preparation prior to identification of uropathogens by MALDI-TOF MS. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 1787–1795.
284. Vestal, M.L., Hayden, K., (2007). High-performance MALDI-TOF mass spectrometry for proteomics. *International Journal of Mass Spectrometry*, 268, 83.
285. Villas-Boas, S.G., Mas, S., Akesson, M., et al., (2005). Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom. Rev.*, 24, 613–46.
286. Vorm, O., Roepstroff, P., Mann, M., (1994). Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Anal Chem* 66: 3281-3287.
287. Vrioni, G., Tsiamis, C., Oikonomidis, G., Theodoridou, K., Kapsimali, V., Tsakris, A., (2018). MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives Review *Ann Transl Med*; 6(12):240.
288. Wahl, K.L., Wunschel, S.C., Jarman, K.H., Valentine, N.B., Petersen, C.E., Kingsley, M.T., Zartolas, K.A., Saenz, A.J., (2002). Analysis of microbial mixtures

- by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74(24): 6191-6199.
289. Walker, J., Fox, A.J., Edwards-Jones, V., & Gordon, D.B., (2002). Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J. Microbiol. Methods.* 48: 117-126.
290. Walker, M., Moore, E.R.B., (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 965-974.
291. Walther-Rasmussen, J., Høiby, N., (2002). Plasmid-borne AmpC β -lactamases. *Can. J. Microbiol.* 48:479–493.
292. Walther-Rasmussen, J., Høiby, N., (2007). Class A carbapenemases. *J. Antimicrob Chemother*; 60:470–82.
293. Wang, X. H., Zhang, G., Fan, Y. Y., Yang, X., Sui, W. J., and Lu, X. X., (2013). Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 92, 231–235.
294. Wang, H., Fan, Y.Y., Kudinha, T., Xu, Z.P., Xiao, M., Zhang, L., Fan, X., Kong, F., Xu, Y.C., (2016). A Comprehensive Evaluation of the Bruker Biotyper MS and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Yeasts, Part of the National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study, 2012 to 2013. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1376–1380.
295. Wang, Y.-H.L.a.Y.-S., (2017). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry: Mechanistic Studies and Methods for Improving the Structural Identification of Carbohydrates. *Mass Spectrom.* 6, S0072.
296. Wang, Y., Chen, X. F., Xie, X. L., Xiao, M., Yang, Y., & Zhang, G. et al., (2023). Evaluation of the Autof MS1000 mass spectrometry system for rapid clinical identification of filamentous fungi. *BMC Microbiology*, 23, Article 201.
297. Wang, K., Shu, C., Soberon, M., Bravo, A., Zhang, J., (2018). Systematic characterization of *Bacillus* Genetic Stock Center *Bacillus thuringiensis* strains using Multi-Locus Sequence Typing. *J. Invertebr. Pathol.* 155, 5–13.
298. Wang, H., Li, Y., Fan, X., Chiueh, T.S., Xu, Y.C., Hsueh, P.R., (2019). Evaluation of Bruker Biotyper and Vitek MS for the identification of *Candida tropicalis* on different solid culture media. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 52, 604–611.

299. Wang, Y., Chen, X.F., Xie, X.L., Xiao, M., Yang, Y., Zhang, G., Zhang, J.J., Duan, S.M., Zhang, Q., Zhang, P., (2019). Evaluation of VITEK MS, Clin-ToF-II MS, Autof MS 1000 and VITEK 2 ANC card for identification of *Bacteroides fragilis* group isolates and antimicrobial susceptibilities of these isolates in a Chinese university hospital. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 52, 456–464.
300. Wang, J., Wang, H., Cai, K., Yu, P., Liu, Y., Zhao, G., Chen, R., Xu, R., & Yu, M., (2021). Evaluation of three sample preparation methods for the identification of clinical strains by using two MALDI-TOF MS systems. *J Mass Spectrom.* 56: e4696.
301. Weickhardt, C., Moritz, F., Grotemeyer, J., (1996). Time-of-flight mass spectrometry: state-of-the-art in chemical analysis and molecular science. *Mass Spectrom. Rev.*, 15(3), 139–62.
302. Westphal, Y., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., Gruppen, H., (2010). MALDI-TOF MS and CE-LIF fingerprinting of plant cell wall polysaccharide digests as a screening tool for *Arabidopsis* cell wall mutants,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 8, pp. 4644–4652.
303. Williams, JB., Gusev, AI., Hercules, DM., (1996). Use of liquid matrices for matrix-assisted laser desorption ionization of polyglycols and poly (dimethylsiloxanes). *Macromolecules.* 29:8144–50.
304. Wu, KJ., Odom, RW., (1998). Peer reviewed: characterizing synthetic polymers by MALDI MS. *Anal Chem.* 70:456A–61A.
305. Wu, L.T., Guo, M.K., Ke, S.C., Lin, Y.P., Pang, Y.C., Nguyen, H.V., Chen, C.M., (2020). Characterization of the genetic background of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* with insertion elements disrupting the ompK36 Porin Gene. *Micro Drug Resist* 26 (9), 1050–1057.
306. Yang, Y., Lin, Y., Chen, Z., Gong, T., Yang, P., Girault, H., Liu, B., Qiao, L., (2017). Bacterial Whole Cell Typing by Mass Spectra Pattern Matching with Bootstrapping Assessment. *Anal. Chem.*, 89, 12556–12561
307. Yang, Y., Lin, Y., Qiao, L., (2018). Direct MALDI-TOF MS identification of bacterial mixtures. *Anal. Chem.* 90: 10400-10408.
308. Yi, J., Qin, Q., Wang, Y., Zhang, R., Bi, H., Yu, S., Liu, B., Qiao, L., (2018). Identification of pathogenic bacteria in human blood using IgGmodified FeO magnetic beads as a sorbent and MALDI-TOF MS for profiling. *Mikrochim. Acta*, 185, 542.

309. Yi, Q., Xiao, M., Fan, X., Zhang, G., Yang, Y., Zhang, J.J., Duan, S.M., Cheng, J.W., Li, Y., Zhou, M.L., (2021). Evaluation of Autof MS 1000 and Vitek MS MALDI-TOF MS System in Identification of Closely-Related Yeasts Causing Invasive Fungal Diseases. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 11, 628828.
310. Yoon, E.J., Lee, E.H., Hwang, D.H., Lee, H., Baek, J.H., Jeong, S.H., (2020). Direct detection of intact *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases produced by Enterobacterales using MALDI-TOF MS. *J. Antimicrob. Chemother.* 75, 1174–1181.
311. Yoon, E.-J., Jeong, S.H., (2021). MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology as a Tool for the Rapid Diagnosis of Antimicrobial Resistance in Bacteria.
312. Yu, J., Liu, P., Zeng, Z., Chen, Y., Gao, W., Li, M., Wang, C.G., Huang, Z.X., Zhou, Z., Li, L., (2018). Development and Characterization of A Linear Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometer.
313. Zanders, E.D., (2012). Chemical Genomics and Proteomics Reviews and Protocols, Humana Press Publications, Royston, United Kingdom, 227–239.
314. Zbinden, R., Gunziger, S., Simmler, A., Voit, A., Bloemberg, G.V., (2010). Molecular versus Conventional Methods for Identification of Anaerobic Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory, Abstr 69th Annual Assembly of the Swiss Society of Microbiology, Zurich, Switzerland.
315. Zboromyrska, Y., Rubio, E., Alejo, I., Vergara, A., Mons, A., Campo, I., et al., (2016). Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 561.
316. Zboromyrska, Y., Bosch, J., Aramburu, J., Cuadros, J., García-Riestra, C., GuzmánPuche, J., et al., (2018). A multicentre study investigating parameters which influence direct bacterial identification from urine. *PLoS One* 13:e0207822.
317. Zboromyska, Y., Rubio, E., Fernandez-Rivas, G., Llorente, A., Dominguez, M.J., Garcia-Tapia, A., Esteban, J., Vila, J., Pujol, M., (2019). Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing for urinary tract pathogens by direct analysis of urine samples using a MALDI-TOF MS-based combined protocol. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1182.
318. Zhang, L., Xiao, M., Wang, H., Gao, R., Fan, X., Brown, M., Gray, T.J., Kong, F., Xu, Y.C., (2014). Yeast identification algorithm based on use of the Vitek MS system selectively supplemented with ribosomal DNA sequencing: Proposal of a reference assay for invasive fungal surveillance programs in China. *J. Clin. Microbiol.* 52, 572–577.

319. Zhao, Y., (2017). Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI-TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting, *Medical Mycology*, Volume 56, Issue 7; 816–827.
320. Zhou, H., Sun, Z., & Zhang, T. (2021). Performance of MALDI- TOF MS in the identification of closely related species: A comparative study. *Journal of Mass Spectrometry*, 56(9), e4696
321. Zhou, H., Sun, Z., & Zhang, T., (2021). Performance of MALDI- TOF MS in the identification of closely related species: A comparative study. *Journal of Mass Spectrometry*, 56(9), e4696
322. Zhu, Y., Gasilova, N., Jovic, M., Qiao, L., Liu, B., Lovey, L. T., Pick, H., Girault, H. H., (2018). Detection of antimicrobial resistance associated proteins by titanium dioxide-facilitated intact bacteria mass spectrometry. *Chem. Sci.*, 9, 2212–2221.
323. Χατζηδημητρίου, Μ., (2006). Διερεύνηση Μηχανισμών Αντοχής Εντεροβακτηριακών στην Τριμεθοπρίμη.