



UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU

Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych

Academia Scientiarum Thoruniensis

Wydział Chemii

Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky

mgr Daria Tarkowska

Rozprawa doktorska

**Analiza leków przeciwdrobnoustrojowych i klinicznych izolatów
bakteryjnych przy użyciu łączonych technik analitycznych
opartych na spektrometrii mas**

Praca wykonana
w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky
oraz Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii
Promotor: dr hab. Małgorzata Szultka-Młyńska, prof. UMK



Toruń 2026

**Analysis of antimicrobial drugs and clinical bacterial isolates using
hyphenated analytical techniques based on mass spectrometry**

Niniejsza praca doktorska powstała przy wsparciu finansowym w ramach poniższych projektów:



Projekt NCBR TANGO V (TANGO-V-A/0014/2021-0)
“Nowe podejście w identyfikacji mikroorganizmów w matrycach środowiskowych i klinicznych dla rutynowych laboratoriów mikrobiologicznych”



Projekt IDUB: BioSep Centrum Doskonałości ToPerMed
„W kierunku medycyny spersonalizowanej”

Wszystkie badania stanowiące podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej realizowane były w laboratoriach Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych technologii UMK w Toruniu oraz Wydziału Chemii UMK w Toruniu



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Interdyscyplinarne Centrum
Nowoczesnych Technologii

Ta praca powstawała w czasie, którego nie da się opisać jedną prostą narracją — był to proces pełen prób, wątpliwości, korekt i powrotów do początku, ale także momentów, w których chaos stopniowo ustępował miejsca sensowi.

W tej drodze niezwykle ważni byli ludzie, którzy towarzyszyli jej na różnych etapach, często w sposób cichy i nienarzucający się.

Mojej Promotorce, dr hab. Małgorzacie Szultka-Młyńskiej, prof. UMK, dziękuję za sposób prowadzenia, który nie polegał na wyznaczaniu jednej właściwej ścieżki, lecz na uważnym towarzyszeniu w jej poszukiwaniu. Za zaufanie do procesu, cierpliwość w momentach, gdy odpowiedzi wymagały czasu, oraz za umiejętność przywracania kierunku wtedy, gdy łatwo było go zgubić.

Dziękuję dr hab. Pawłowi Pomastowskiemu, prof. UMK, oraz dr hab. Michałowi Złochowi za merytoryczne wsparcie, rozmowy i pytania, które pomagały porządkować sposób myślenia o wynikach — zwłaszcza w chwilach, gdy ich interpretacja nie była oczywista.

Koleżankom, Kolegom oraz wszystkim pracownikom Katedry Chemii Środowiska i Bioanalityki oraz Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii dziękuję za codzienność, w której praca naukowa była wspólnym doświadczeniem, a nie zamkniętym światem. Za życzliwość, obecność, rozmowy i wymianę doświadczeń, które budowały znacznie więcej niż tylko kolejne etapy badań.

Mojej Mamie dziękuję za fundamenty — za wartości, które mnie ukształtowały, za konsekwencję i wytrwałość w dążeniu do celu oraz za wsparcie, które było niezmiennie, niezależnie od okoliczności.

Mojemu Mężowi, Bartkowi, dziękuję za obecność, która nie musiała być głośna, by miała znaczenie. Za cierpliwość w momentach, gdy wszystko działo się jednocześnie, oraz za spokój, który porządkował więcej niż jakiegokolwiek słowa czy rozwiązania.

Na końcu dziękuję Róży — za cichą obecność, codzienny rytm i chwile zatrzymania, które przypominały, że nie wszystko musi być zaplanowane, by miało sens.

*„Trzeba mieć wytrwałość i przede wszystkim wiarę w siebie.”
— Maria Skłodowska-Curie*

Spis treści

Wykaz skrótów i oznaczeń	6
Wprowadzenie	8
Cel i założenia pracy	12
Problem badawczy	15
1. Rola i znaczenie mikroorganizmów w mikrobiologii klinicznej i przemysłowej	15
2. Antybiotyki i antybiotykooporność	18
2.1. Antybiotyki – klasyfikacja i mechanizmy działania	19
2.2. Zjawisko antybiotykooporności	23
3. MALDI-TOF MS jako zaawansowana technika spektrometrii	27
3.1. MALDI-TOF MS w badaniach mikrobiologicznych	30
3.1.1. Badania dotyczące identyfikacji mikroorganizmów wyizolowanych z próbek rzeczywistych od pacjentów z infekcjami górnych dróg oddechowych [B1]	37
3.1.2. Badania dotyczące zastosowania testów MBT-STAR-BL oraz MBT-ASTRA, opartych na technice MALDI-TOF MS, do analizy antybiotykooporności bakterii [B2]	46
4. Terapeutyczne monitorowanie leków	63
4.1. Oznaczanie i identyfikacja antybiotyków oraz ich metabolitów w płynach ustrojowych	63
4.2. Techniki przygotowania próbek w terapeutycznym monitorowaniu leków	71
Bibliografia	79
Publikacje wchodzące w skład dysertacji	89
[P1] „Omic approaches to bacteria and antibiotic resistance identification	90
[P2] Identification of bacteria associated with post-operative wounds of patients with use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry approach	124
[P3] Implications of sample preparation methods on the MALDI-TOF MS identification of spore-forming <i>Bacillus</i> species from food samples: a closer look at <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> , <i>Peribacillus simplex</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> , <i>Bacillus flexus</i> , and <i>Bacillus marisflavi</i>	147
[P4] Analityka antybiotyków β -laktamowych w układzie in silico, in vitro oraz in vivo	161
[P5] Molecularly imprinted polymers as solid phase microextraction fibers for the isolation of selected antibiotics from human plasma	181
[P6] Zastosowanie techniki MIP-SPME to terapeutycznego monitorowania leków w próbkach biologicznych	204
Podsumowanie i wnioski	214
Dorobek naukowy	217
Oświadczenia współautorów	223
Streszczenie	232
Abstract	233

Wykaz skrótów i oznaczeń

AMR	<i>Antimicrobial Resistance</i>	Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe
AST	<i>Antimicrobial Susceptibility Testing</i>	Badanie wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe
ASTRA	<i>Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay</i>	Szybki test oceny wrażliwości na antybiotyki
AUC	<i>Area Under Curve</i>	Obszar pod krzywą
BTS	<i>Bacterial Test Standard</i>	Bakteryjny wzorzec
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>	Elektroforeza kapilarna
CRAB	<i>Carbapenem-Resistant A. baumannii</i>	Szczep <i>A. baumannii</i> oporny na karbapenemy
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Kwas deoksyrybonukleinowy
DHB	<i>2,5-Dihydroxybenzoic acid</i>	Kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy
EC	<i>Electrochemical Detection</i>	Detektor elektrochemiczny
ESBL	<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamase</i>	Beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania
FA	<i>Formic Acid</i>	Kwas mrówkowy
FLD	<i>Fluorescence Detector</i>	Detekcja fluorescencyjna
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>	Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
HCCA	<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>	kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>	Właściwości hydrofilowo-lipofilowe
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPP	<i>High Pressure Processing</i>	Obróbka wysokociśnieniowa
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>	Screening wysokoprzepustowy
ICU	<i>Intensive Care Unit</i>	Oddział intensywnej terapii
IVD	<i>in vitro diagnostics</i>	Test do diagnostyki <i>in vitro</i>
KPC	<i>K. pneumoniae carbapenemase</i>	Karbapenemaza <i>K. pneumoniae</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>	Chromatografia cieczowa
LDI	<i>Laser desorption/ionization</i>	Laserowa desorpcja/ionizacja
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i>	Ekstrakcja ciecz-ciecz
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i>	Lipopolisacharydy
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption /Ionization</i>	Laserowa jonizacja/desorpcja wspomagana matrycą
MBT	<i>MALDI Biotyper</i>	System identyfikacji mikroorganizmów za pomocą spektrometrii mas MALDI
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>	Minimalne stężenie hamujące
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>	Polimery z odciskiem molekularnym

MOFs	<i>Metal-Organic Frameworks</i>	Sieci metalo-organiczne
MSP	<i>Main Spectrum Profile</i>	Główny profil widma
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>	Gronkowiec złocisty oporny na metycylinę
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	Spektrometria mas
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>	Tandemowa spektrometria mas
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>	Informacyjny kwas rybonukleinowy
MWCNTs	<i>Multi-Walled Carbon Nanotubes</i>	Wielościennie nanorurki węglowe
NDM	<i>New Delhi metallo-beta-lactamase</i>	Metalo-beta-laktamaza New Delhi
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
OXA	<i>Oxacillinase</i>	Oksacylinaza
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PBP	<i>Penicillin-Binding Protein</i>	Białka wiążące penicylinę
POPs	<i>Porous Organic Polymers</i>	Porowate polimery organiczne
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>	Rybosomalny kwas rybonukleinowy
RUO	<i>Research Use Only</i>	Tylko do użytku badawczego
SA	<i>Sinapic acid</i>	Kwas synapinowy
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>	Drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego
SAXS	<i>Small-Angle X-ray Scattering</i>	Rozpraszanie rentgenowskie w małych kątach
SEM	<i>Scanning Electron Microscope</i>	Skaningowa mikroskopia elektronowa
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>	Ekstrakcja do fazy stacjonarnej
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
STAR	<i>Selective Testing of Antibiotic Resistance</i>	Selektywne badanie oporności na antybiotyki
SWCNTs	<i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i>	Jednościennie nanorurki węglowe
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>	Transmisyjna mikroskopia elektronowa
TOF	<i>Time-of-Flight</i>	Analizator czasu przelotu
tRNA	<i>Transfer Ribonucleic Acid</i>	Transportowy kwas rybonukleinowy
UHPLC	<i>Ultra High-Performance/Pressure Liquid Chromatography</i>	Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa
WAXS	<i>Wide-Angle X-ray Scattering</i>	Rozpraszanie rentgenowskie w dużych kątach
VRE	<i>Vancomycin-Resistant Enterococci</i>	Enterokoki odporne na wankomycynę

Wprowadzenie

Medycyna spersonalizowana, będąca jednym z kluczowych osiągnięć współczesnej nauki, łączy osiągnięcia chemii, biologii, genetyki, biotechnologii, bioinformatyki i farmakologii w celu opracowania terapii dostosowanych do indywidualnych potrzeb pacjenta. Rozwój tej interdyscyplinarnej dziedziny ma szczególne znaczenie w kontekście infekcji bakteryjnych, które stanowią poważne wyzwanie dla zdrowia publicznego z uwagi na ich złożoność, powszechność oraz narastającą oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (ang. *Antimicrobial Resistance*, AMR).

W mikrobiologii klinicznej tradycyjnie stosowane metody identyfikacji mikroorganizmów, takie jak testy biochemiczne, serologiczne czy molekularne, choć powszechne, często okazują się czasochłonne i niewystarczające w przypadku drobnoustrojów o zbliżonych fenotypach. Nowoczesne metody analityczne, takie jak spektrometria mas z desorpcją/ionizacją laserową wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*, MALDI-TOF MS), odegrały istotną rolę w przyspieszeniu i uproszczeniu procesów identyfikacji patogenów oraz interpretacji mechanizmów oporności na antybiotyki. Technika ta opiera się na analizie widm masowych, głównie białek rybosomalnych, co umożliwia precyzyjną identyfikację mikroorganizmów na poziomie gatunku. Oprócz identyfikacji drobnoustrojów technika ta znajduje szerokie zastosowanie w wykrywaniu mechanizmów antybiotykooporności, umożliwiając szybką i precyzyjną analizę właściwości bakterii. Dzięki temu można nie tylko zidentyfikować patogen, ale również ocenić jego potencjalną oporność, co stanowi podstawę do wdrożenia celowanej terapii. Technologia MALDI-TOF MS oferuje przewagę nad tradycyjnymi metodami, skracając czas potrzebny na uzyskanie wyników z kilku dni do zaledwie kilku godzin, co jest kluczowe w leczeniu zakażeń zagrażających życiu, takich jak sepsa lub zakażenia szpitalne wywołane przez patogeny wielolekooporne.

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie łączeniem techniki MALDI-TOF MS z innymi podejściami „-omicznymi”, takimi jak proteomika, metabolomika czy genomika, co pozwala na bardziej kompleksową analizę mikroorganizmów. Takie podejście umożliwia uzyskanie pełniejszego obrazu funkcjonowania mikroorganizmów w różnych warunkach oraz ich interakcji z otoczeniem. Integracja MALDI-TOF MS z proteomiką pozwala na identyfikację białek i peptydów, które są kluczowe dla rozwoju danego mikroorganizmu, jego patogenności czy oporności na leki. Z kolei połączenie tej techniki z metabolomiką daje możliwość śledzenia zmian w metabolitach, co może dostarczyć informacji o reakcjach

metabolicznych mikroorganizmów w odpowiedzi na stresy środowiskowe lub terapeutyczne. Dzięki takim wieloaspektowym badaniom możliwe staje się szybsze diagnozowanie chorób infekcyjnych, lepsze zrozumienie mechanizmów oporności na antybiotyki oraz rozwój nowych strategii terapeutycznych.

W kontekście terapii antybiotykowej kluczową rolę odgrywa również monitorowanie stężenia leków w płynach ustrojowych pacjentów, określane jako terapeutyczne monitorowanie leków (ang. *Therapeutic Drug Monitoring*, TDM). Podejście to oparte jest na precyzyjnych wynikach uzyskanych za pomocą zaawansowanych technik analitycznych, które umożliwiają personalizację terapii farmakologicznej, dostosowaną do indywidualnych potrzeb pacjenta, co w konsekwencji przyczynia się do poprawy skuteczności leczenia oraz zwiększenia bezpieczeństwa stosowanych leków. Takie podejście jest nazywane często "terapią szytą na miarę" i stanowi istotny element w kontekście leczenia infekcji, zwłaszcza w przypadku antybiotyków, gdzie precyzyjne dostosowanie dawki ma kluczowe znaczenie w walce z opornością mikroorganizmów. Innowacyjnym podejściem jest wykorzystanie zaawansowanych materiałów, takich jak polimery z odciskiem molekularnym (ang. *Molecularly Imprinted Polymers*, MIP), w połączeniu z nowoczesnymi technikami przygotowania próbek, takimi jak mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (ang. *Solid Phase Microextraction*, SPME). Metody te umożliwiają selektywną izolację i wzbogacanie docelowych związków złożonych z próbek biologicznych, co znacząco poprawia precyzję dalszych analiz. Połączenie ich z chromatografią cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (ang. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) pozwala na dokładne oznaczanie zarówno substancji aktywnych, jak i ich metabolitów, wspierając rozwój nowoczesnej diagnostyki i terapii. Połączenie MIP, SPME i LC-MS otwiera nowe możliwości personalizacji leczenia, oferując bezpieczniejsze i bardziej efektywne strategie, szczególnie w intensywnej terapii, gdzie dokładne dawkowanie jest kluczowe.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej skupiłam się na rozwijaniu i integracji nowoczesnych technik analitycznych, mających na celu lepsze zrozumienie mechanizmów oporności mikroorganizmów oraz optymalizację metod monitorowania terapii antybiotykowej. Zastosowałam spektrometrię mas MALDI-TOF MS umożliwiającą szybką i precyzyjną identyfikację klinicznych izolatów bakteryjnych. Technika ta została również wykorzystana przeze mnie do oceny mechanizmów oporności zidentyfikowanych bakterii na antybiotyki, w tym antybiotyki beta-laktamowe, makrolidowe czy chemioterapeutyki z grupy chinolonów. W ramach pracy wykorzystałam testy MBT-STAR-BL i MBT-ASTRA do kompleksowej oceny oporności bakterii na antybiotyki. Ponadto przeprowadziłam kompleksowe badania nad przygotowaniem próbek, walidacją zastosowanych metod oraz adaptacją i testowaniem

systemów Zybio pod kątem ich przydatności w diagnostyce mikrobiologicznej i analizie antybiotyków. W literaturze brak jest doniesień dotyczących zastosowania MBT-ASTRA do analizy azytromycyny czy lewofloksacyny, zwłaszcza w kontekście bakterii *S. aureus*. Jako jedna z pierwszych podjęłam się analizy oporności na imipenem przy użyciu spektrometru Zybio EX2600 i porównania otrzymanych wyników z tymi uzyskanymi za pomocą spektrometru liniowego - Microflex LT/SH (Bruker, Daltonik).

Opracowałam także metodę ekstrakcji antybiotyków z osocza ludzkiego z zastosowaniem MIP w technice mikroekstrakcji w fazie stacjonarnej. Celem badania było przygotowanie nowych włókien SPME pokrytych MIP metodą polimeryzacji elektrochemicznej, z użyciem odpowiednich związków jako matryc. W związku z tym przeprowadzono szczegółową charakterystykę fizyko-chemiczną otrzymanych materiałów, stosując różnorodne techniki instrumentalne. Uzyskane próbki poddano analizie przy użyciu chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrią mas (ang. *High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry*, HPLC-MS/MS) oraz spektrometrii mas z wykorzystaniem kwadropolowego pomiaru czasu przelotu (ang. *Quad Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Q-TOF). Opracowana metoda umożliwiła selektywne wyizolowanie takich antybiotyków, jak amoksycylina, cefotaksym oraz metronidazol, z próbek biologicznych pochodzących od pacjentów intensywnej terapii. Należy zaznaczyć, że brak jest dostępnych prac badawczych dotyczących mechanizmów rozpoznawania amoksycyliny, cefotaksymu i metronidazolu jako matryc do ekstrakcji przy użyciu włókien SPME pokrytych MIP z rzeczywistych próbek pobranych od pacjentów. Ponadto, w niniejszym opracowaniu opisano zastosowanie metody SPME-LC-MS/MS do oznaczania i identyfikacji trzech antybiotyków w próbkach osocza ludzkiego pobranych od pacjentów na oddziałach intensywnej terapii. Po raz pierwszy zastosowano tę technikę do ekstrakcji antybiotyków z osocza ludzkiego, co stanowi istotny wkład w rozwój bardziej precyzyjnych narzędzi diagnostycznych oraz monitorowania terapii antybiotykowej w kontekście intensywnej opieki medycznej.

Niniejsza rozprawa doktorska obejmuje zbiór sześciu publikacji naukowych (P1–P6) oraz prezentuje wyniki badań własnych przeprowadzonych w ramach realizacji pracy doktorskiej. Badania te obejmują badania pilotażowe oraz analizy prowadzone na materiale klinicznym i zostały uwzględnione w rozprawie w celu pełniejszego zaprezentowania zastosowanych metod badawczych, kompetencji metodologicznych oraz potencjalnych możliwości implementacji opisanych technik w diagnostyce mikrobiologicznej. Uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę dalszych analiz i przyszłych publikacji naukowych.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

- [P1] **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, P. Pomastowski, B. Buszewski, „Omic” approaches to bacteria and antibiotic resistance identification, *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, 23: 1-33. (IF₂₀₂₂ = 5.600 PM = 140)
- [P2] M. Szultka-Młyńska, **D. Janiszewska**, P. Pomastowski, M. Złoch, W. Kupczyk, B. Buszewski, Identification of bacteria associated with post-operative wounds of patients with use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry approach, *Molecules* **2021**, 26: 1-24. (IF₂₀₂₁ = 4.927 PM = 140)
- [P3] **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Szultka-Młyńska, Implications of sample preparation methods on the MALDI-TOF MS identification of spore-forming *Bacillus* species from food samples: a closer look at *Bacillus licheniformis*, *Peribacillus simplex*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus flexus*, and *Bacillus marisflavi*, *ACS Omega* **2023**, 8: 34196-35441. (IF₂₀₂₃ = 3,700 PM = 70)
- [P4] **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, Analityka antybiotyków beta-laktamowych w układzie in vitro vs. in vivo, *Wiadomości Chemiczne* **2022**, 76: 109–127. (PM = 20)
- [P5] M. Szultka-Młyńska, **D. Janiszewska**, B. Buszewski, Molecularly imprinted polymers as solid phase microextraction fibers for the isolation of selected antibiotics from human plasma, *Materials* **2021**, 14: 1-24 (IF₂₀₂₁ = 3.748 PM = 140)
- [P6] **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, Zastosowanie techniki MIP-SPME do terapeutycznego monitorowania leków w próbkach biologicznych, *Analityka: nauka i praktyka* **2022**, 23: 11-19. (PM = 20)

Σ IF = 17,975 Σ PM = 530

Badania własne wykonane w ramach realizacji rozprawy doktorskiej:

- [B1] Badania dotyczące identyfikacji mikroorganizmów wyizolowanych z próbek rzeczywistych (wymazy płytkie oraz głębokie z nosogardzieli, ślina) pobranych od pacjentów z infekcjami górnych dróg oddechowych.
- [B2] Badania dotyczące zastosowania testów MBT-STAR-BL oraz MBT-ASTRA, opartych na technice MALDI-TOF MS, do analizy antybiotykooporności bakterii.

Cel i założenia pracy

Nadrzędnym celem rozprawy była analiza mikroorganizmów klinicznych oraz detekcja antybiotykooporności bakterii, a także opracowanie nowych metod przygotowania próbek do monitorowania stężeń antybiotyków w terapii pacjentów. Ponadto, w ramach pracy skoncentrowano się na optymalizacji procesu identyfikacji szczepów bakterii pochodzących z różnych źródeł, w tym żywności, poprzez skrócenie czasu inkubacji. Celem tych badań było poprawienie efektywności diagnostycznej, co może przyczynić się do szybszego wykrywania patogenów oraz skuteczniejszego zarządzania opornością na antybiotyki w różnych środowiskach.

Realizacja celu rozprawy doktorskiej obejmuje następujące cele szczegółowe:

- Przedstawienie roli nowoczesnych technik i podejścia „-omicznego” do identyfikacji mikroorganizmów oraz wykrywaniu antybiotykooporności, ze szczególnym uwzględnieniem ich znaczenia w diagnostyce i badaniach mikrobiologicznych [P1]
- Ocena możliwości wykorzystania metody proteomicznej z zastosowaniem techniki MALDI-TOF MS do oznaczania i identyfikacji bakterii izolowanych z próbek trudno gojących się ran pooperacyjnych oraz próbek pobranych od pacjentów cierpiących na choroby układu oddechowego [P2, B1]
- Walidacja metody skracającej czas inkubacji bakterii przetrwalnikujących, zapewniającej jednocześnie dokładność i wiarygodność ich identyfikacji za pomocą techniki MALDI-TOF MS [P3]
- Opracowanie, adaptacja i walidacja metod oceny mechanizmów antybiotykooporności na antybiotyki powszechnie stosowane w terapii zakażeń bakteryjnych, w tym wykorzystywanych w leczeniu pacjentów z COVID-19, jak i rozwój zaawansowanych narzędzi diagnostycznych opartych na technice MALDI-TOF MS [P2, B2]
- Zgłębienie mechanizmów biotransformacji antybiotyków beta-laktamowych poprzez zastosowanie współczesnych metod analizy, obejmujących techniki *in vitro*, *in vivo* oraz modelowanie *in silico* [P4]
- Opracowanie selektywnej metod przygotowania próbek biologicznych do izolacji antybiotyków beta-laktamowych z wykorzystaniem techniki MIP-SPME [P5, P6]
- Rozwój metod identyfikacji i oznaczania leków oraz ich metabolitów za pomocą chromatografii ciekowej połączonej ze spektrometrią mas, uwzględniający optymalizację warunków chromatograficznych i walidację procedur analitycznych [P5].

W realizacji celów szczegółowych zastosowałam następujące instrumenty:

- Spektrometr mas UltrafleXtreme MALDI-TOF MS wyposażony w laser Nd:YAG o $\lambda = 355$ nm, tryb jonizacji dodatni/ujemny (BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Niemcy)
- Spektrometr mas Microflex LT MALDI-TOF MS wyposażony w laser N₂ o $\lambda = 337$ nm, tryb jonizacji dodatni (BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Niemcy)
- Spektrometr mas EXS2600 MALDI-TOF MS wyposażony w laser N₂ o $\lambda = 337$ nm, tryb jonizacji dodatni/ujemny (Zybio Inc., Choqing, Chiny)
- Mastercycler PRO S thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy)
- Spektrofotometr UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Zestaw do elektroforezy żelowej poziomej
- Wirówka z blokiem grzewczym Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy)
- Mikroskop Axio Observer D1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)
- System HPLC Agilent 1290 Series z interfejsem ESI (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy)
- Chromatograf cieczowy 1100 (Agilent, Waldbronn, Niemcy) wyposażony w pompę binarną (G1310A), degazer, autosampler (G1313A), detektor UV-Vis (G1314A)
- Detektor masowy Q-TOF o rozdzielczości 6540 UHD (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy)
- Kolumna chromatograficzna XDB-C18 1,8 μ m 4,6 $\times$ 50 mm (Agilent Technologies, Waldbronn, Niemcy)
- Spektrometr mas LC-MS/MS 8050 (Shimadzu, Kioto, Japonia)
- Potencjostat/galwanostat Autolab PGSTAT128N (Utrecht, Holandia)
- Reaktor elektrochemiczny ROXYTM (Antec, Zoeterwoude, Niemcy)
- Komputer wraz z oprogramowaniem DialogueTM do kontroli systemu ROXYTM (Antec, Zoeterwoude, Niemcy)
- Komputer z oprogramowaniem MassHunter Qualitative Analysis, MassHunter Quantitative Analysis
- Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) LEO 1430VP (LEO Electron Microscopy, Londyn, Anglia) z systemem Carl Zeiss SMT (Oberkochen, Niemcy)
- Mikroskop stereoskopowy SZX16 (Olympus, Tokio, Japonia) wyposażony w kamerę CCD (Olympus, Tokio, Japonia)
- Spektrometr Spectrum 2000 (Perkin Elmer, Waltham, Winter St, MA, USA)
- Dyfraktometr proszkowy SAXS (Nanostar, Bruker AXS, Karlsruhe, Niemcy)

- Transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM) Tecnai F20 X-Twin (Hillsboro, OR, USA)
- Spektrometr jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) AVANCE II (BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Niemcy)
- Wirówka próżniowa z pułapką mrozącą oraz możliwością jednoczesnego odparowania próbek firmy Labconco (CentriVap DNA, Kansas City, USA)
- Termomikser (Grant Instruments, Cambridge, Wielka Brytania)
- Łaźnia ultradźwiękowa (Polsonic, Warszawa, Polska)
- pH-metr laboratoryjny (IKA POL, Warszawa, Polska)
- Zestaw do filtrowania rozpuszczalników (SartoriusStedim, Göttingen, Niemcy)
- Zestaw do mikroekstrakcji z wykorzystaniem złoża sorbentu: strzykawka oraz igły z wypełnieniem – BIN (SGE, Melbourne, Australia)
- Waga analityczna, elektroniczna AS220/C/2 (Radwag, Radom, Polska)
- Mieszadło Vortex3 (IKAPOL, Warszawa, Polska)
- Mieszadło magnetyczne z termostatem (IKAPOL, Warszawa, Polska)

W celu realizacji celów szczegółowych wykorzystałam metody badawcze obejmujące zastosowanie:

- Podejścia kulturomicznego
- Zestawu QIAamp DNA Microbiome Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy)
- Zestawu primerów 16S rDNA (27F, 1492R)
- Zestawu MBT STAR-BL IVD (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Niemcy)
- Metody MBT-ASTRA

Metodyki badań zostały szczegółowo opisane w publikacjach [P2–P3], [P5] oraz w badaniach własnych ([B1–B2]), stanowiących całość niniejszej dysertacji.

Problem badawczy

1. Rola i znaczenie mikroorganizmów w mikrobiologii klinicznej i przemysłowej

Mikroorganizmy, choć niewidoczne gołym okiem, odgrywają fundamentalną rolę w funkcjonowaniu ekosystemów na Ziemi. W środowisku naturalnym uczestniczą w szeregu procesów biologicznych o kluczowym znaczeniu, takich jak biodegradacja materii organicznej, obieg pierwiastków biogennych, w tym węgla, azotu i fosforu, czy wspomaganie wzrostu roślin poprzez symbiotyczne interakcje, jak w przypadku bakterii z rodzaju *Rhizobium*. Mikroorganizmy są również integralnym elementem ekosystemów człowieka, gdzie pełnią zarówno funkcje wspierające, takie jak udział w procesach trawiennych czy modulacja układu odpornościowego, jak i patogenne, prowadząc do rozwoju infekcji i chorób [1].

Choć mikroorganizmy są nieodłączną częścią ludzkiego życia i stanowią źródło wielu korzyści, ich potencjał patogenny czyni je istotnym zagrożeniem w kontekście zdrowia publicznego. Bakterie patogenne mogą wywoływać szeroki zakres chorób – od łagodnych infekcji skórnych po zagrażające życiu zakażenia układowe, takie jak sepsa, stopa cukrzycowa [2,3] czy trudno gojące się rany pooperacyjne [P2]. Infekcje bakteryjne obejmują również choroby układu oddechowego, takie jak zapalenie płuc wywołane przez patogeny szpitalne, w tym *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*, które są szczególnie niebezpieczne dla pacjentów z osłabionym układem odpornościowym [B1]. W 2019 roku infekcje bakteryjne były bezpośrednią przyczyną śmierci ponad 7,7 miliona osób, co odpowiadało za około 12% wszystkich zgonów globalnie. Oznacza to, że bakterie odpowiadają za drugą najczęstszą przyczynę zgonów na świecie, ustępując jedynie chorobom niedokrwiennym serca. Dalsza analiza danych epidemiologicznych wskazuje, że ponad trzy czwarte tych przypadków było spowodowanych infekcjami wywołanymi przez pięć kluczowych gatunków bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *K. pneumoniae* oraz *P. aeruginosa*. Każdy z tych patogenów charakteryzuje się wysoką zdolnością do adaptacji, często prowadzącą do rozwoju oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, co dodatkowo komplikuje proces leczenia [4]. Co więcej, zakażenia wywoływane przez bakterie wielolekooporne stanowią poważne wyzwanie dla zdrowia publicznego, przyczyniając się do około 700 000 zgonów rocznie na całym świecie, a prognozy wskazują, że liczba ta może wzrosnąć do 10 milionów do roku 2050 [5]. Dane statystyczne wykazują, że globalna liczba szczepów opornych na znaczącą ilość leków zwiększyła się czterokrotnie, co potwierdza narastający problem antybiotykooporności [6]. Tak alarmujące dane podkreślają konieczność wdrażania skutecznych strategii prewencji i leczenia infekcji bakteryjnych, które powinny obejmować zarówno działania na poziomie globalnym, jak i lokalnym. Kluczowe znaczenie

mają kampanie edukacyjne promujące racjonalne stosowanie antybiotyków, co pozwala ograniczyć rozwój oporności drobnoustrojów, a także rozwój zaawansowanych technologii diagnostycznych umożliwiających szybkie i precyzyjne wykrywanie patogenów.

Identyfikacja mikroorganizmów oraz detekcja antybiotykooporności są kluczowymi etapami w zrozumieniu ich roli w danym środowisku lub chorobie oraz w doborze odpowiedniego sposobu ich eliminacji lub kontroli. Tradycyjne metody identyfikacji opierały się głównie na charakterystyce fenotypowej, takiej jak morfologia kolonii i komórek, właściwości biochemiczne czy barwienia mikroskopowe. Pomimo swojej diagnostycznej wartości, są one często czasochłonne, pracochłonne i mogą być niewystarczające w przypadku mikroorganizmów trudnych w hodowli [7]. W związku z tym rozwój nowoczesnych technik, takich jak spektrometria masowa MALDI-TOF MS, zrewolucjonizował diagnostykę mikrobiologiczną, oferując wysoką czułość, specyficzność oraz znaczne skrócenie czasu potrzebnego na identyfikację drobnoustrojów. W diagnostyce mikrobiologicznej technika MALDI-TOF MS umożliwia szybkie i precyzyjne różnicowanie mikroorganizmów na poziomie gatunku, co jest szczególnie istotne w przypadku fenotypowo podobnych drobnoustrojów [8].

Zastosowanie technik spektrometrii mas z podejściami „-omicznymi” oferuje nowe możliwości w diagnostyce, monitorowaniu terapii oraz w badaniach podstawowych. Dzięki temu można nie tylko precyzyjnie identyfikować mikroorganizmy, ale także badać ich biologiczne funkcje i właściwości adaptacyjne, co przyczynia się do opracowywania skuteczniejszych strategii terapeutycznych. Takie zaawansowane podejścia technologiczne wspierają walkę z narastającym problemem antybiotykooporności oraz poprawiają skuteczność leczenia zakażeń bakteryjnych [9,10]. Możliwości zastosowania technik „-omicznych” w identyfikacji mikroorganizmów oraz detekcji antybiotykooporności zostały szczegółowo opisane w pracy przeglądowej **P1**, która jest częścią zbioru artykułów stanowiących podstawę niniejszej pracy doktorskiej. Dodatkowo technologia ta wspiera identyfikację mikroorganizmów trudnych w hodowli, które są niewykrywalne za pomocą tradycyjnych metod [11]. Jednym z bardziej wymagających i szczególnych typów mikroorganizmów są bakterie wytwarzające przetrwalniki, które ze względu na swoje unikalne właściwości biologiczne stanowią zarówno istotne wyzwanie diagnostyczne, jak i cenny obiekt badań w mikrobiologii klinicznej i przemysłowej [12]. Przetrwalniki są odporne na wysokie temperatury, promieniowanie UV, wysychanie oraz działanie wielu środków chemicznych, co czyni je szczególnie trudnymi do wyeliminowania zarówno w środowisku klinicznym, jak i przemysłowym. Z drugiej strony mikroorganizmy oferują unikalne możliwości zastosowania w procesach przemysłowych i biotechnologicznych, co czyni je kluczowymi elementami

współczesnej gospodarki i technologii [13]. W mikrobiologii klinicznej mikroorganizmy są przedmiotem intensywnych badań w kontekście ich roli jako patogenów oraz ich wpływu na zdrowie publiczne. Dzięki zdolności do wytwarzania przetrwalników, bakterie takie jak *Clostridium difficile*, będące jedną z głównych przyczyn zakażeń szpitalnych związanych z biegunkami poantybiotykowymi, mogą utrzymywać się w środowisku szpitalnym, co zwiększa ryzyko transmisji i reinfekcji [14]. Długotrwałe przetrwanie w glebie przetrwalników *Bacillus anthracis*, stanowi dodatkowe zagrożenie w kontekście bioterroryzmu [15].

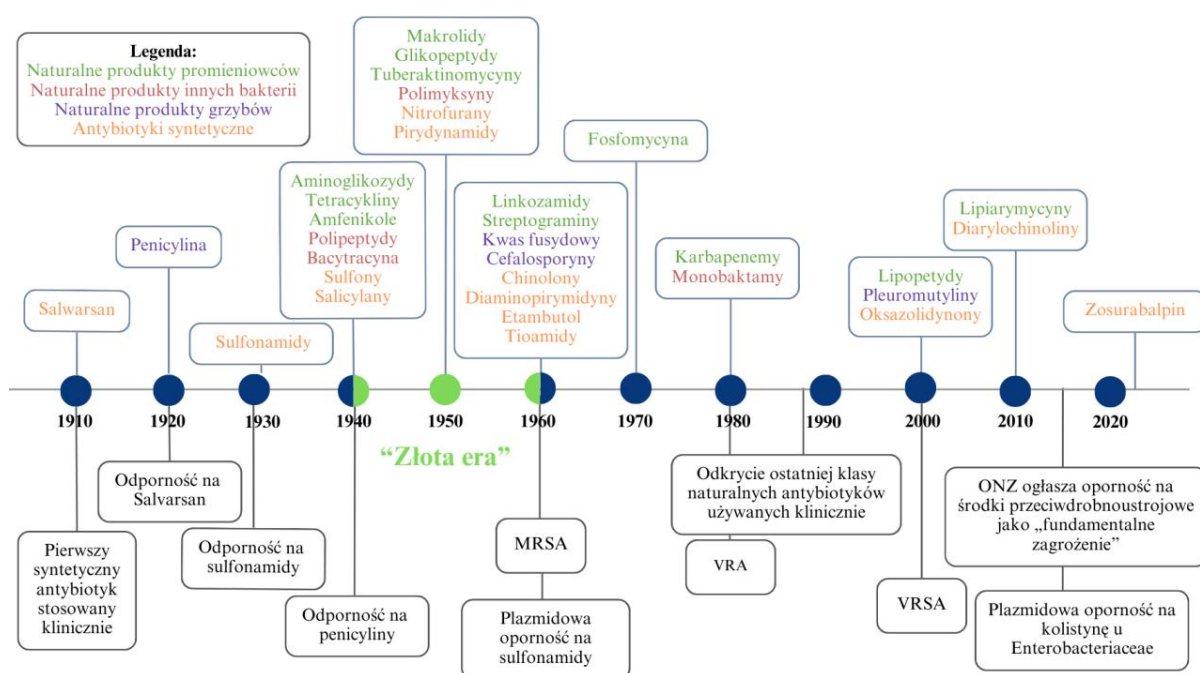
W mikrobiologii przemysłowej mikroorganizmy, w tym bakterie przetrwalnikujące, są wykorzystywane w szerokim zakresie procesów technologicznych, takich jak produkcja enzymów, biopaliw, antybiotyków, witamin, szczepionek czy żywności fermentowanej. Szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus*, takie jak *Bacillus subtilis*, są wykorzystywane w biotechnologii do produkcji enzymów proteolitycznych i amylolitycznych, które znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym, detergentowym oraz farmaceutycznym [16]. Ich zdolność do przetrwania w trudnych warunkach środowiskowych sprawia, że są one idealnymi organizmami do procesów przemysłowych wymagających wysokiej trwałości i niezawodności. Jednakże obecność bakterii przetrwalnikujących w produktach spożywczych czy farmaceutycznych, takich jak *Clostridium botulinum*, stanowi poważne wyzwanie w kontekście bezpieczeństwa żywności i produktów medycznych [17,18]. Dla zdolności do przetrwania standardowych procesów sterylizacji, takich jak pasteryzacja, wymagane jest opracowanie bardziej zaawansowanych metod eliminacji, takich jak obróbka wysokociśnieniowa (ang. *High Pressure Processing*, HPP), zastosowanie technologii plazmowych czy nowych środków chemicznych [19].

Skracanie czasu inkubacji mikroorganizmów, w tym bakterii przetrwalnikujących, jest kolejnym istotnym obszarem badań [P3]. W mikrobiologii klinicznej umożliwia to szybszą diagnostykę, co ma kluczowe znaczenie dla wczesnego wdrożenia terapii, zwłaszcza w przypadku infekcji zagrażających życiu, takich jak sepsa. Skrócenie czasu detekcji mikroorganizmów ma kluczowe znaczenie dla diagnostyki klinicznej, bezpieczeństwa epidemiologicznego, ograniczania rozprzestrzeniania się zakażeń, jak również pozwala na przyspieszenie procesów produkcyjnych, zmniejszenie ryzyka kontaminacji, poprawę efektywności technologicznej. Moje badania po raz pierwszy dowiodły możliwości skrócenia czasu inkubacji *Priesta flexa* w pożywce płynnej, redukując go do zaledwie jednej godziny, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej skuteczności identyfikacji mikroorganizmu na poziomie gatunku. Analiza parametrów hodowlanych dla szerokiego spektrum badanych bakterii wykazała, że optymalny czas inkubacji, umożliwiający ich efektywną detekcję oraz precyzyjną identyfikację, wynosił 6 godzin. Wydłużenie czasu inkubacji prowadziło do

progresywnego wzrostu liczby form przetrwalnikujących, co w konsekwencji znacząco utrudniało proces identyfikacji mikroorganizmów, wpływając na dokładność i wiarygodność uzyskiwanych wyników analitycznych [P3].

2. Antybiotyki i antybiotykooporność

Wprowadzenie salwarsanu w 1910 roku jako pierwszego antybiotyku zapoczątkowało nową erę w medycynie, która w ciągu kolejnych dekad znacząco wpłynęła na rozwój terapii infekcji bakteryjnych i przyczyniła się do wydłużenia średniej długości życia ludzkiego o 23 lata (Rysunek 1). Odkrycie penicyliny przez Alexandra Fleminga w 1928 roku otworzyło drogę do intensywnych badań nad antybiotykami pochodzenia naturalnego, których największy rozwój przypadł na lata 50. XX wieku [20].



Rysunek 1.Przełomowe odkrycia w historii antybiotyków.

W latach 1940–1960 okres intensywnego odkrywania antybiotyków był uważany za "złoty wiek", przynosząc liczne przełomowe osiągnięcia, które znacząco wpłynęły na rozwój współczesnej medycyny. W tym okresie, dzięki intensywnej eksploracji naturalnych metabolitów bakterii i grzybów oraz ich chemicznym modyfikacjom, opracowano liczne klasy antybiotyków, w tym związki takie jak streptomycyna, erytromycyna czy tetracykliny. Odkrycia te przyczyniły się do wydłużenia średniej długości życia i znacznego ograniczenia śmiertelności z powodu chorób zakaźnych [21].

Jednak od lat 70. XX wieku tempo odkrywania nowych antybiotyków zaczęło wyraźnie maleć. Powody tego spowolnienia były złożone i obejmowały zarówno wyczerpanie najbardziej oczywistych źródeł naturalnych, jak i spadek zainteresowania badaniami w tej

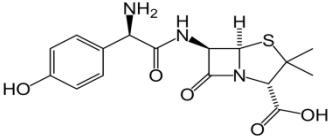
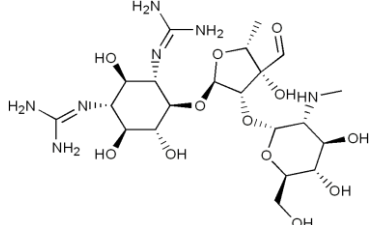
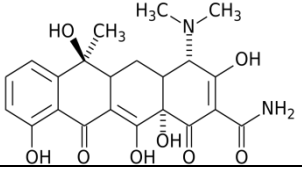
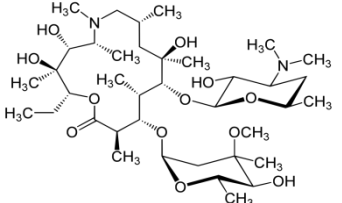
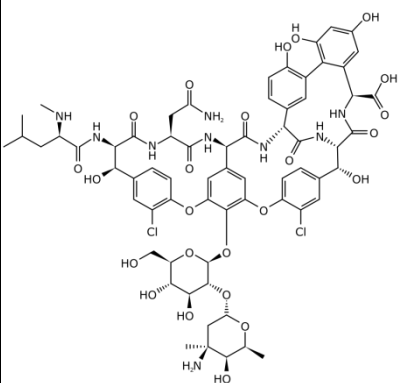
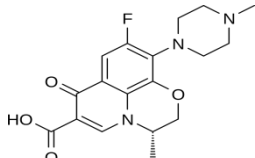
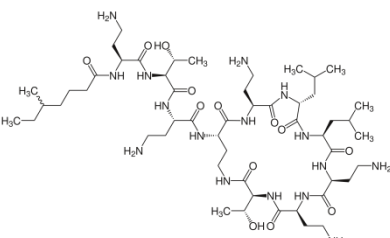
dziedzinie ze strony przemysłu farmaceutycznego. Zjawisko to zbiegło się z coraz większym problemem niewłaściwego stosowania antybiotyków, co doprowadziło do gwałtownego wzrostu przypadków antybiotykooporności [22]. Kryzys antybiotykooporności stał się jednym z największych wyzwań zdrowia publicznego XXI wieku, zagrażając skuteczności terapii bakteryjnych i podważając osiągnięcia medycyny nowoczesnej. Pomimo stosowania zaawansowanych technik badawczych, takich jak wysokoprzepustowy screening (ang. *High-Throughput Screening*, HTS) czy sekwencjonowanie genomowe, wiele kampanii badawczych nie przyniosło oczekiwanych rezultatów. Jednym z głównych problemów jest wysoka złożoność biologiczna mechanizmów oporności oraz konieczność opracowania związków o nowatorskich mechanizmach działania, które mogłyby ominąć istniejące mechanizmy obronne bakterii [23].

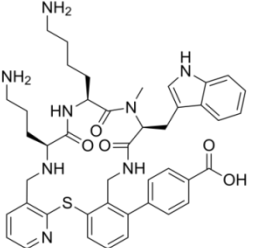
W ostatnich latach zaobserwowano istotny przełom w tej dziedzinie. Przykładem jest zosurabalpin – nowy, eksperymentalny antybiotyk opracowany we współpracy firmy Roche i Uniwersytetu Harvarda. Zosurabalpin charakteryzuje się unikalnym mechanizmem działania, który polega na inhibicji transportu lipopolisacharydów (ang. *Lipopolysaccharides*, LPS) do błony komórkowej bakterii. Mechanizm ten jest szczególnie skuteczny wobec karbapenemoopornych szczepów *Acinetobacter baumannii* (ang. *Carbapenem-Resistant A. baumannii*, CRAB), jednych z najbardziej problematycznych patogenów szpitalnych. Odkrycie to daje nadzieję na opracowanie nowych leków, które będą skuteczne w walce z najtrudniejszymi przypadkami zakażeń bakteryjnych [24].

2.1. Antybiotyki –klasyfikacja i mechanizmy działania

Antybiotyki to związki chemiczne o zróżnicowanej budowie, wykazujące zdolność do inhibicji wzrostu lub eliminacji mikroorganizmów. Z chemicznego punktu widzenia antybiotyki należą do różnych klas związków organicznych, takich jak beta-laktamy, tetracykliny, aminoglikozydy czy makrolity. Ich struktura chemiczna determinuje mechanizm działania na poziomie molekularnym, zakres aktywności wobec drobnoustrojów oraz właściwości farmakokinetyczne, w tym rozpuszczalność, biodostępność i metabolizm [25]. W Tabeli 1 zamieściłam podział najpowszechniejszych klas antybiotyków.

Tabela 1. Podział antybiotyków ze względu na spektrum przeciwbakteryjne.

Klasa chemiczna	Mechanizm działania	Spektrum działania	Wzór chemiczny
Beta-laktamy: amoksycylina cefotaksym	Hamowanie syntezy ściany komórkowej przez blokowanie transpeptydazy	Bakterie Gram-dodatnie Gram-ujemne	
Aminoglikozydy: streptomycyna gentamycyna	Hamowanie syntezy białek poprzez wiązanie się z podjednostką 30S rybosomu	Bakterie Gram-ujemne, gruźlica	
Tetracykliny: tetracyklina oksytetracyklina	Blokowanie przyłączania tRNA do miejsca akceptorowego rybosomu	Szerokie Spektrum	
Makrolidy: azytromycyna erytromycyna	Hamowanie elongacji peptydu poprzez wiązanie z podjednostką 50S rybosomu	Bakterie Gram-dodatnie	
Glikopeptydy: wankomycyna teikoplanina	Blokowanie syntezy ściany komórkowej przez wiązanie się z peptydoglikanem	Bakterie Gram-dodatnie, MRSA	
Chinolony: lewofloksacyna ciprofloksacyna	Inhibicja gyrazy DNA i topoizomerazy IV	Bakterie Gram-ujemne, niektóre bakterie Gram-dodatnie	
Polimyksyny: kolistyna polimyksyna B	Interakcja z lipopolisacharydami (LPS) obecnymi w zewnętrznej błonie komórkowej bakterii	Bakterie Gram-ujemne	

Makrocycliczne peptydy z przyłączonymi grupami: zosurabalpin	Inhibicja transportu LPS do błony komórkowej	Karbapenemazooporne <i>A.baumannii</i>	
---	--	---	---

Antybiotyki działają poprzez selektywne oddziaływanie na struktury lub procesy metaboliczne bakterii, co minimalizuje ich toksyczność dla organizmu gospodarza [21]. Mechanizmy te obejmują hamowanie syntezy ściany komórkowej, zaburzenie funkcji błony komórkowej, inhibicję syntezy białek, zakłócenie replikacji DNA oraz ingerencję w szlaki metaboliczne bakterii.

Jednym z podstawowych mechanizmów jest hamowanie syntezy ściany komórkowej bakterii, która pełni kluczową rolę w utrzymaniu integralności strukturalnej komórki. Antybiotyki beta-laktamowe, takie jak penicyliny, cefalosporyny i karbapenemy, hamują transpeptydazy, znane jako białka wiążące penicylinę (ang. *Penicillin-Binding Protein*, PBP), enzymy odpowiedzialne za syntezę peptydoglikanu – głównego składnika ściany komórkowej. Kluczowym elementem ich struktury jest pierścień beta-laktamowy, który reaguje z centrum aktywnym PBP, prowadząc do inhibicji enzymu i zahamowania tworzenia wiązań krzyżowych w peptydoglikanie [27,28]. Penicyliny i cefalosporyny pierwszej generacji skutecznie leczą zakażenia wywołane przez *Streptococcus* i *Staphylococcus*, podczas gdy karbapenemy, mimo szerokiego spektrum działania, w tym aktywności przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, są głównie stosowane w leczeniu infekcji wywołanych przez patogeny odporne na inne antybiotyki. Monobaktamy, takie jak aztreonam, są efektywne wobec tlenowych bakterii Gram-ujemnych, bez wpływu na patogeny Gram-dodatnie. Cefalosporyny wyższych generacji i karbapenemy dominują w leczeniu zakażeń Gram-ujemnych, w tym szczepów opornych [27,29,30]. Z kolei glikopeptydy, takie jak wankomycyna, wykazują działanie poprzez formowanie wiązań wodorowych z końcowymi resztami D-Ala-D-Ala prekursorów peptydoglikanu, co hamuje dalszą syntezę ściany komórkowej. Z tego względu glikopeptydy wykazują wysoką aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich. Antybiotyki glikopeptydowe skutecznie działają na bakterie Gram-dodatnie, takie jak *S. aureus*, *Enterococcus spp.* i *C. difficile*, ze względu na wysoką zawartość peptydoglikanu w ich ścianie komórkowej. Bakterie Gram-ujemne są naturalnie odporne na te leki z powodu obecności zewnętrznej błony komórkowej, która uniemożliwia dostęp do miejsca docelowego [31].

Polimyksyny, takie jak polimyksyna B i kolistyna, działają poprzez interakcję z lipopolisacharydami w zewnętrznej błonie komórkowej bakterii Gram-ujemnych

(*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*). Dzięki ich kationowym właściwościom amfipatycznym, polimyksyny wiążą się z LPS, co prowadzi do destabilizacji błony i jej nadmiernej przepuszczalności, a w konsekwencji do śmierci bakterii [32,33].

Kolejnym mechanizmem jest hamowanie syntezy białek bakteryjnych i opiera się na zakłócaniu różnych etapów translacji oraz syntezy kwasów nukleinowych. Antybiotyki aminoglikozydowe, takie jak streptomycyna, wchodzi w interakcję z podjednostką 30S rybosomu, blokując poprawny odczyt mRNA i zakłócając proces translacji, co prowadzi do wytwarzania nieprawidłowych białek i śmierci bakterii. Aminoglikozydy, ze względu na bakteriobójcze działanie, stosowane są w leczeniu ciężkich infekcji Gram-ujemnych. Często łączone są z antybiotykami beta-laktamowymi lub glikopeptydowymi w celu zwiększenia skuteczności leczenia, szczególnie w sepsie czy zapaleniu wsierdza [34,35]. Z kolei makrolidy, takie jak azytromycyna, oddziałują na podjednostkę 50S rybosomu, blokując przesuwanie się rybosomu wzdłuż mRNA, co prowadzi do zahamowania procesu translacji. Antybiotyki z grupy oksazolidynonów, na przykład linezolid, działają poprzez uniemożliwienie powstania kompleksu inicjacyjnego translacji, co blokuje rozpoczęcie syntezy białek [36].

Chinolony, takie jak ciprofloksacyna czy lewofloksacyna, hamują gyrazę DNA i topoizomerazę IV, uniemożliwiając replikację DNA i prowadząc do śmierci bakterii. Antybiotyki te charakteryzują się szerokim spektrum działania, obejmującym zarówno bakterie Gram-ujemne, takie jak *Escherichia coli* czy *P. aeruginosa*, jak i niektóre Gram-dodatnie, w tym *S. aureus* [37,38]. Rifamycyny, w tym ryfampicyna, hamują syntezę RNA poprzez wiązanie się z polimerazą RNA [39]. Inne antybiotyki, jak sulfonamidy i trimetoprim, zakłócają syntezę kwasu foliowego, niezbędnego do produkcji puryn i tymidyn [40,41].

W swoich badaniach uwzględniłam szereg antybiotyków, które charakteryzują się szerokim zastosowaniem terapeutycznym oraz różnorodnymi mechanizmami działania. W badaniach dotyczących detekcji i analizy antybiotykooporności zastosowałam imipenem, cefotaksym, piperacylinę, ciprofloksacynę, lewofloksacynę oraz azytromycynę [B2]. Ich wybór wynika z ich skuteczności w leczeniu zakażeń szpitalnych oraz w kontekście narastającej oporności na antybiotyki. Imipenem i cefotaksym są szczególnie istotne w leczeniu zakażeń wywołanych przez oporne szczepy *K. pneumoniae*. Dodatkowo imipenem klasyfikowany jest jako antybiotyk ostatniej szansy i jako antybiotyk o szerokim spektrum działania jest stosowany w terapii najcięższych zakażeń szpitalnych, a jego skuteczność w leczeniu opornych szczepów czyni go istotnym w kontekście analizy antybiotykooporności. Piperacylina, ciprofloksacyna i lewofloksacyna są stosowane w terapii zakażeń wywołanych przez bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie, w tym *S. aureus*, w tym szczepy oporne na metycylinę (ang. *methicillin-resistant S. aureus*, MRSA), ze względu na swoje szerokie spektrum działania, jest

wykorzystywana w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie atypowe, w tym także te związane z zakażeniami układu oddechowego, co czyni ją ważnym narzędziem w kontekście szerokiego zakresu antybiotykooporności. Dodatkowo azytromycyna była szeroko stosowana u pacjentów w pierwszych miesiącach pandemii COVID-19 celem zwalczania bakteryjnych koinfekcji i infekcji wtórnych. W literaturze brakuje badań dotyczących badań nad detekcją antybiotykooporności na azytromycynę z zastosowaniem techniki MALDI-TOF MS, co czyni ją interesującym obiektem badań w kontekście oporności.

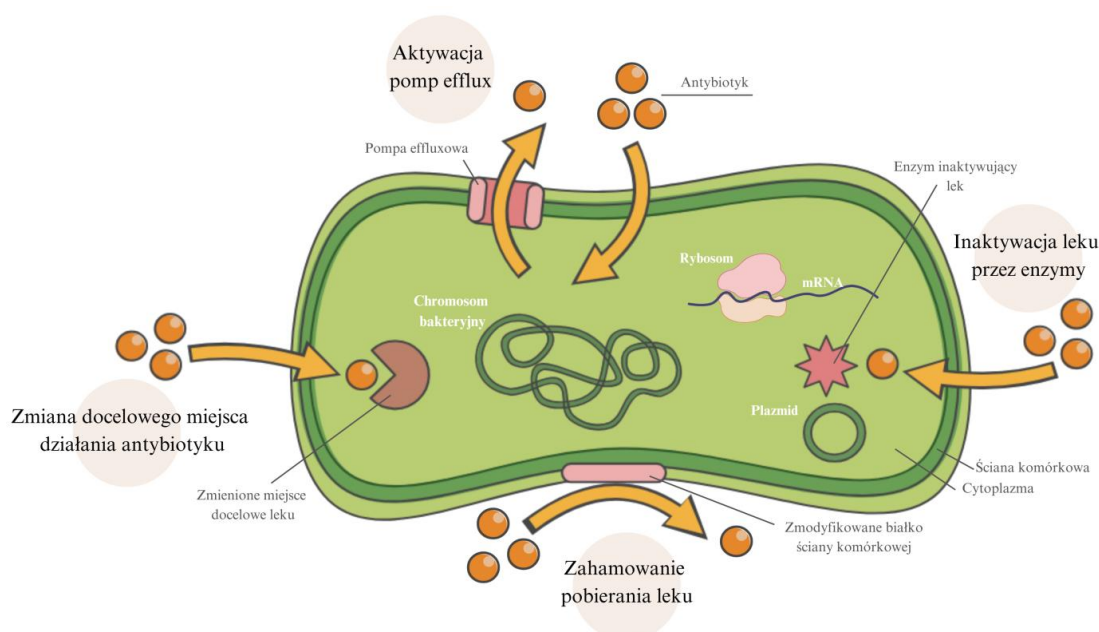
Co więcej, w trakcie realizacji badań podjęłam się analizy mechanizmów antybiotykooporności na klindamycynę oraz piperacylinę z tazobaktamem z wykorzystaniem MALDI-TOF MS oraz bazy UniProt. Próbkę pochodziły od pacjentów hospitalizowanych, a decyzje o doborze antybiotykoterapii podejmowali lekarze. Celem mojej analizy było zrozumienie mechanizmów oporności w kontekście stosowanej terapii [P2].

W badaniach nad wykorzystaniem techniki MIP-SPME do izolacji leków, zastosowałam amoksycylinę, cefotaksym oraz metronidazon, ponieważ nie ma dostępnych artykułów badających mechanizmy rozpoznawania tych leków jako szablonów do ekstrakcji przy użyciu włókien SPME pokrytych MIP z rzeczywistych próbek od pacjentów [P5]. Amoksycylina i cefotaksym są szeroko stosowane w leczeniu zakażeń wywołanych przez *Enterobacteriaceae*, w tym *K. pneumoniae*, a ich monitorowanie ma kluczowe znaczenie w kontekście precyzyjnego dawkowania. Metronidazon jest natomiast wykorzystywany w leczeniu zakażeń beztlenowych, a brak dostępnych badań nad jego rozpoznawaniem jako szablonu do ekstrakcji z próbek biologicznych stanowi istotny punkt wyjścia dla moich badań [42-44]. Zastosowanie tych antybiotyków w MIP-SPME ma na celu rozwój nowych metod wykrywania i monitorowania ich stężenia w rzeczywistych próbkach pacjentów, co może przyczynić się do poprawy jakości terapii.

2.2. Zjawisko antybiotykooporności

Mechanizmy warunkujące oporność na antybiotyki są złożone i wieloaspektowe, a wynikają z cech wrodzonych, czyli naturalnych lub nabytych. Oporność naturalna jest związana z brakiem naturalnych celów molekularnych, takich jak receptory leku, bądź obecnością barier fizycznych utrudniających dostęp antybiotyku do wnętrza komórki bakteryjnej. Wewnętrzna odnosi się do naturalnych cech niektórych gatunków bakterii, które nadają oporność na określone antybiotyki. Jest to cecha stała, charakterystyczna dla określonych gatunków lub grup bakterii. Przykładem są bakterie Gram-ujemne, których zewnętrzna błona komórkowa stanowi barierę ograniczającą penetrację substancji aktywnych. Z kolei bakterie takie jak

Mycobacterium tuberculosis wykazują unikalną budowę ściany komórkowej, która skutecznie chroni je przed działaniem wielu antybiotyków [45,46].



Rysunek 2. Schemat przedstawiający mechanizmy bakteryjnej oporności na antybiotyki [23].

Oporność nabyta może wynikać z mutacji genów bakterii lub horyzontalnego transferu genów, takich jak koniugacja, transdukcja czy transformacja. Przykładem jest rozwój oporności na metycylinę u *S. aureus* wskutek nabycia genu *mecA*, kodującego zmodyfikowane białko PBP2a, odporne na beta-laktamy, lub oporność na fluorochinolony, wynikającą z mutacji w genach kodujących gyrazę DNA lub topoizomerazę IV [47]. Mechanizmy oporności nabytej przedstawiono na Rysunku 2.

Oporność nabyta może przyjmować różne formy, takie jak:

- **Produkcja enzymów inaktywujących antybiotyki:** beta-laktamazy, które hydrolizują pierścień beta-laktamowy, przykładem są bakterie produkujące beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ang. *Extended-Spectrum Beta-Lactamase*, ESBL) takie jak *E. coli*, bakterie MRSA oraz bakterie wytwarzające karbapenemazy, np.: karbapenemaza *K. pneumoniae* (ang. *K. pneumoniae carbapenemase*, KPC), metallo-beta-laktamaza New Delhi (ang. *New Delhi metallo-beta-lactamase*, NDM) i oksycylinaza (ang. *Oxacillinase*, OXA),
- **Zmiana miejsca docelowego działania:** Mutacje w rybosomach, gyrazie DNA lub transpeptydazach zmniejszają powinowactwo antybiotyków, co jest szczególnie ważne w przypadku MRSA, *S. pneumoniae* i enterokokach opornych na wankomycynę (ang. *Vancomycin-Resistant Enterococcus*, VRE),
- **Aktywny wypływ antybiotyku:** Aktywne usuwanie cząsteczek antybiotyku z wnętrza komórki bakteryjnej przy użyciu specyficznych pomp białkowych zlokalizowanych w

błonie komórkowej. Pompy te są napędzane energią z gradientu protonowego lub ATP i mogą usuwać różne klasy antybiotyków, w tym tetracykliny, makrolidy, fluorochinolony i chloramfenikol u bakterii *P. aeruginosa* czy *E. coli*,

- **Zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej:** Ograniczenie liczby kanałów w błonie zewnętrznej (poryn) odpowiedzialnych na transport antybiotyków do wnętrza komórek bakterii Gram-ujemnych, takich jak *Enterobacteriaceae* czy *P. aeruginosa*,
- **Tworzenie biofilmu:** Bakterie występujące w formie biofilmu są mniej dostępne dla antybiotyku dzięki obecności zewnętrznej matrycy biopolimerowej. Przykładami bakterii tworzących biofilm mogą być *Staphylococcus epidermidis* oraz *P. aeruginosa* [48,49].

W odpowiedzi na rosnące zagrożenie opornością na antybiotyki, opracowanie i wdrożenie efektywnych metod detekcji mechanizmów antybiotykooporności jest kluczowe dla skutecznego zarządzania terapią antybiotykową i zwalczania rozprzestrzeniania się szczepów opornych [50,51]. Do najczęściej stosowanych metod oceny antybiotykooporności należą testy fenotypowe, molekularne i spektrometryczne. Testy fenotypowe, takie jak dyfuzyjny test krążkowy Kirby-Bauera, umożliwiają ocenę podatności mikroorganizmów na działanie antybiotyków. Istotnym ograniczeniem jest jednak brak możliwości precyzyjnego określenia minimalnego stężenia hamującego (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) oraz czasochłonność analizy, co może opóźniać podjęcie optymalnej strategii terapeutycznej. W badaniach **B2** nad antybiotykoopornością bakterii wyizolowanych od pacjentów z infekcjami dróg oddechowych, zastosowałam test krążkowy jako metodę referencyjną. W bardziej zaawansowanych testach fenotypowych, takich jak test gradientowy E-test, możliwe jest dokładne określenie MIC, jednak wymaga to precyzyjnego przygotowania oraz większych kosztów. Metody molekularne, takie jak reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) i sekwencjonowanie, pozwalają na identyfikację genów oporności, jednak wymagają one znajomości sekwencji docelowych genów, a także są czasochłonne i kosztowne.

Szczególną uwagę w tym kontekście należy zwrócić na testy szybkiej diagnostyki, takie jak te oparte na spektrometrii masowej z wykorzystaniem technologii MALDI-TOF MS. Techniki te rewolucjonizują diagnostykę mikrobiologiczną dzięki możliwości jednoczesnej identyfikacji drobnoustrojów na poziomie gatunkowym oraz oceny ich wrażliwości na antybiotyki w znacznie krótszym czasie niż metody tradycyjne, takie jak hodowle mikrobiologiczne czy testy biochemiczne. Skrócenie czasu diagnostyki z kilku dni do kilku godzin jest szczególnie istotne w przypadkach zakażeń zagrażających życiu, takich jak sepsa czy zakażenia szpitalne wywoływane przez bakterie wielolekooporne [52–54]. W pracy

przeglądowej **P1** dokonałam meta-analizy dotyczącej zastosowania różnych technik w analizie mechanizmów antybiotykooporności, ze szczególnym uwzględnieniem metod opartych na spektrometrii mas MALDI-TOF MS. W swoich badania technologię tę wykorzystałam do precyzyjnej identyfikację drobnoustrojów [**P2, P3, B1**], ale również do wykrywania mechanizmów antybiotykooporności, obejmujących różnorodne strategie unikania działania leków przez bakterie, w tym enzymatyczną inaktywację antybiotyków oraz modyfikację ich celów molekularnych. Analiza opierała się na identyfikacji charakterystycznych sygnatur molekularnych białek, jak również ocenie zmian w aktywności metabolicznej drobnoustrojów pod wpływem antybiotyków, co pozwoliło na fenotypową ocenę antybiotykooporności [**P2, B2**].

Zawarte w *Tabeli 2* porównanie różnych metod detekcji antybiotykooporności, ma na celu podkreślenie różnic w skuteczności, precyzji oraz dostępności poszczególnych metod, co może stanowić cenną wskazówkę przy wyborze odpowiedniej strategii diagnostycznej w konkretnych warunkach klinicznych. Analiza ta pokazuje, że nowoczesne techniki, takie jak MALDI-TOF MS, stanowią niezwykle obiecujące narzędzie w walce z narastającym problemem antybiotykooporności.

Tabela 2. Przegląd metod do oceny antybiotykooporności [**P1**][55,56].

Metoda		Zalety	Wady
Fenotypowe	Metoda Kirby-Bauera IVD, RUO	niskie koszty, łatwość wykonania, szeroka dostępność, standaryzacja (CLSI, EUCAST), wizualna interpretacja, możliwość badania wielu antybiotyków jednocześnie	brak oznaczenia dokładnego MIC, długi czas inkubacji, ograniczona skuteczność dla niektórych, mechanizmów oporności
	Test gradientowy (E-test) IVD, RUO	dokładne oznaczenie MIC, prosta interpretacja wyników, możliwość, analizy różnych drobnoustrojów, wykrywanie ESBL i karbapenemaz	wyższe koszty, ograniczona liczba, antybiotyków na jednej płytce, podatność na warunki hodowli
Molekularne	PCR: Multiplex PCR: Real-Time PCR (qPCR) RT-PCR (Reverse Transcription PCR) IVD, RUO	wysoka czułość i specyficzność, krótki czas analizy, wykrywanie genów oporności	brak informacji fenotypowej, konieczna znajomość sekwencji docelowej, niewykrywanie nowych mechanizmów
	Sekwencjonowanie IVD, RUO	kompleksowa analiza genomu, identyfikacja znanych i nowych genów oporności, analiza mutacji	wysokie koszty, złożoność analizy danych, długi czas opracowania wyników
MALDI-TOF MS	Bezpośrednie wykrywanie wpływu antybiotyku za pomocą MALDI-TOF MS RUO	krótki czas analizy, minimalna obróbka próbki, możliwość równoczesnej identyfikacji drobnoustroju	brak pełnej standaryzacji, trudności dla bakterii wolnorosnących, konieczność interpretacji widm

	MBT-STAR-BL MBT-STAR-CARBA - IVD MBT-STAR-Cepha - IVD RUO	Krótki czas analizy, analiza fenotypowa, prosta interpretacja wyników	wysokie koszty aparatury i eksploatacji, ograniczona specyficzność, analiza tylko bakterii G(-), ograniczenie do antybiotyków beta-laktamowych, krótka trwałość próbki
	MBT-ASTRA RUO	krótki czas analizy, możliwość badania bakterii G(+) i G(-), szeroki zakres antybiotyków, analiza fenotypowa	wysokie koszty aparatury i eksploatacji, brak pełnej standaryzacji, konieczność optymalizacji protokołów, prototypowe oprogramowanie
IVD – ang. <i>In Vitro Diagnostic</i> , diagnostyka <i>in vitro</i> RUO – ang. <i>Research Use Only</i> , tylko do użytku badawczego			

W kontekście regulacji badań i diagnostyki kluczowe znaczenie ma rozróżnienie pomiędzy testami przeznaczonymi do celów badawczych (ang. *Research Use Only*, RUO) a testami posiadającymi certyfikację do diagnostyki klinicznej (ang. *In Vitro Diagnostic*, IVD). Testy RUO, mimo że dostarczają cennych informacji na temat mechanizmów oporności, nie mogą być wykorzystywane do podejmowania decyzji terapeutycznych bez dodatkowej walidacji klinicznej. Z kolei testy oznaczone jako IVD spełniają określone standardy jakości i są zgodne z regulacjami, takimi jak europejskie rozporządzenie IVDR (ang. *In Vitro Diagnostic Regulation*), które weszło w życie 26 maja 2022 roku, zastępując wcześniejszą dyrektywę IVDD (ang. *In Vitro Diagnostic Directive*). Nowe przepisy nakładają na producentów testów diagnostycznych obowiązek bardziej rygorystycznej oceny skuteczności oraz bezpieczeństwa metod diagnostycznych, co ma na celu poprawę jakości wyników i zwiększenie ich wiarygodności w praktyce klinicznej [57,58].

Integracja nowoczesnych technologii diagnostycznych, w tym spektrometrii masowej MALDI-TOF MS, z wytycznymi IVDR stanowi kluczowe wyzwanie w obszarze detekcji antybiotykooporności. Wprowadzenie bardziej precyzyjnych metod opartych na MALDI-TOF MS może znacząco poprawić skuteczność terapii antybiotykowej i ograniczyć rozprzestrzenianie się szczepów wielolekoopornych. Jednocześnie, dynamiczny rozwój technologii wymaga dalszych badań nad ich optymalizacją oraz wdrażaniem do rutynowej diagnostyki klinicznej, co może przyczynić się do skuteczniejszej walki z globalnym problemem antybiotykooporności.

3. MALDI-TOF MS jako zaawansowana technika spektrometrii

W latach 80. XX wieku technika jonizacji z desorpcją laserową (ang. *Laser Desorption/Ionization*, LDI) zrewolucjonizowała spektrometrię mas, umożliwiając efektywne generowanie jonów o niskim stopniu fragmentacji z polimerów oraz makrocząsteczek

biologicznych. Dzięki temu możliwe stało się badanie substancji nielotnych i nietrwałych, które wcześniej nie mogły być analizowane za pomocą tradycyjnych metod jonizacji. Zastosowanie LDI miało istotne znaczenie dla bioanalitiky, szczególnie w badaniach mikrobiologicznych, gdzie umożliwiło precyzyjną analizę biomolekuł budujących komórki organizmów żywych. Technika ta pozwala na identyfikację i charakterystykę peptydów, białek, węglowodanów, lipidów oraz metabolitów, co znacząco wpłynęło na rozwój metod identyfikacji mikroorganizmów oraz ocenę ich cech fenotypowych, takich jak aktywność enzymatyczna [59].

Techniką, która w znacznym stopniu przyczyniła się do usprawnienia badań mikrobiologicznych, była technika MALDI-TOF MS, stanowiąca metodę miękkiej jonizacji umożliwiającą analizę makrocząsteczek biologicznych oraz związków o wysokiej masie cząsteczkowej przy minimalnej fragmentacji. Metoda MALDI składa się z trzech głównych etapów. W pierwszej fazie analizowana próbka jest homogenizowana z odpowiednio dobraną matrycą i nanoszona na powierzchnię metalowej płytki (ang. *target plate*). Następnie zastosowanie impulsowego promieniowania laserowego, zwykle przy użyciu lasera azotowego o długości fali 337 nm lub rzadziej lasera neodymowo-yagowego (Nd:YAG) o długości fali 355 nm, indukuje proces ablacji i desorpcji zarówno analitu, jak i matrycy. Czas trwania impulsu i jego energia wpływają na skład pióropusza jonów (ang. *plume*). Długie impulsy nanosekundowe powodują łagodną, ale mniej efektywną desorpcję, podczas gdy krótkie, piko- i femtosekundowe impulsy mogą prowadzić do gwałtownej dezintegracji próbki, utrudniając jonizację [60, 61]. Optymalizacja tych parametrów jest kluczowa dla uzyskania odpowiedniej ilości jonów i wysokiej jakości widm. Regulację natężenia promieniowania zapewnia atenuator wiązki, który dostosowuje się do rodzaju próbki, zwiększając elastyczność metody MALDI. Cząsteczki matrycy pochłaniają energię fotonów, co prowadzi do wzbudzenia elektronowego i konwersji energii w stan wzbudzenia. W wyniku tego procesu, stała mieszanka matrycy i analitu zostaje przekształcona w fazę gazową. Po desorpcji materiału próbki, w wyniku oddziaływań pomiędzy neutralnymi cząsteczkami, jonami matrycy, protonami, elektronami oraz kationami metali, dochodzi do procesu jonizacji analitu. Następnie, powstałe jony są przyspieszane w polu elektrycznym i kierowane do analizatora masy w celu dokonania pomiaru stosunku masy do ładunku (m/z). W spektrometrii mas MALDI-TOF MS wyróżnia się dwa główne tryby jonizacji: pozytywny i negatywny. W trybie pozytywnym (ang. *positive ion mode*) cząsteczki analizowanej próbki przechodzą w formę jonów dodatnich, co jest powszechnie stosowane w analizie biomolekuł takich jak białka, peptydy czy kwasy nukleinowe. W trybie negatywnym (ang. *negative ion mode*) jonizacja zachodzi w sposób, który prowadzi do wytworzenia jonów ujemnych, co jest szczególnie użyteczne w analizie

kwasów organicznych, lipidów i metabolitów. Ten tryb pozwala na badanie modyfikacji chemicznych cząsteczek z tendencją do tworzenia ujemnych jonów. Wybór trybu jonizacji zależy od charakterystyki chemicznej analizowanej substancji, a często stosuje się oba tryby w jednej analizie, aby uzyskać pełniejszy obraz składu próbki. Chociaż dokładny mechanizm jonizacji w procesie MALDI pozostaje przedmiotem intensywnych badań, powszechnie uznaje się, że matryca pełni kluczową rolę w przebiegu tego procesu [62-64].

Matryce stosowane w technice MALDI-TOF MS charakteryzują się niskim ciśnieniem pary, łatwo ulegają sublimacji, tworząc dużą ilość jonów, głównie protonów, niezbędnych do jonizacji próbki. Kluczową rolą matrycy jest absorpcja energii impulsowego promieniowania laserowego, prowadząca do desorpcji oraz odparowania cząsteczek próbki, co stanowi warunek konieczny dla dalszej jonizacji. Matryce powinny charakteryzować się wysoką absorpcją promieniowania o długości fali stosowanej w analizie. Ponadto, stabilność matrycy w warunkach próżniowych jest kluczowa dla zapewniania powtarzalności analizy, a jej dobra rozpuszczalność w odpowiednich rozpuszczalnikach umożliwia uzyskanie jednorodnej mieszaniny próbki z matrycą, co bezpośrednio wpływa na jakość otrzymywanego w spektrometrii masowej sygnału. Istotnym wymaganiem względem stosowanej matrycy jest jej obojętność względem analizowanych związków. Reaktywność matrycy mogłaby prowadzić do niepożądanych przemian chemicznych lub degradacji analitu. Jest to szczególnie istotne w przypadku substancji o dużej masie cząsteczkowej, takich jak białka. Matryca nie powinna wykazywać reaktywności chemicznej względem próbki, aby uniknąć niepożądanych zmian lub uszkodzeń analizowanych cząsteczek, takich jak peptydy czy białka. Lista dostępnych matryc jest szeroka, a jej wybór zależy od substancji poddawanej analizie. Do najczęściej stosowanych matryc należą kwas α -cyano-4-hydroksycynamonowy (ang. *α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid*, HCCA), kwas sinapinowy (ang. *Sinapinic acid*, SA) oraz kwas 2,5-dihydrobenzoesowy (ang. *2,5-Dihydroxybenzoic acid*, DHB). HCCA jest jedną z najczęściej używanych matryc, szczególnie w analizie mikroorganizmów, ze względu na swoją wysoką efektywność w ionizacji zarówno białek, jak i peptydów [65-67]. W moich badaniach zastosowałam jednak jedynie matrycę HCCA, zarówno do identyfikacji mikroorganizmów [**P2**, **P3**, **B1**], jak i do analizy oporności na antybiotyki [**P2**, **B2**], co pozwoliło uzyskać wysokiej jakości spektra białkowe i szczegółową charakterystykę mikroorganizmów oraz ocenę ich oporności na różne substancje lecznicze.

Po przeprowadzeniu desorpcji próbek za pomocą lasera jony powstałe z matrycy oraz analitu muszą zostać przeanalizowane celem określenia ich masy cząsteczkowej i identyfikacji sygnałów. Do tego celu wykorzystywany jest analizator mas, którego wybór zależy od specyficznych potrzeb eksperymentu. Technika MALDI, która wykorzystuje impulsowe źródło

jonizacji, najczęściej łączy się z analizatorem mas typu TOF. Działa na zasadzie pomiaru czasu, jaki potrzebują jony do przebycia określonego dystansu w próżni, od momentu ich wyemitowania przez źródło jonizacji do detektora. W analizatorze TOF jony, po przyspieszeniu przez pole elektryczne, trafiają do rury przelotowej, gdzie ich czas przelotu zależy od wartości m/z . Analizator TOF charakteryzuje się bardzo szerokim zakresem mas, co sprawia, że jest idealny do analizy cząsteczek o wysokim stosunku masy do ładunku, typowych dla techniki MALDI [68]. Wyróżnia się dwa główne tryby pracy opisywanego analizatora – tryb liniowy i reflektromowy. W trybie liniowym analizatora TOF, który stosowałam w swoich badaniach [**P2**, **P3**, **B1**, **B2**], jony o różnych masach osiągają detektor w różnych momentach czasowych. Jony o większej masie wymagają dłuższego czasu na dotarcie, co skutkuje wyższymi wartościami m/z dla jonów cięższych. Jednak różnice w sposobie absorpcji energii przez jony tej samej masy prowadzą do nierównomiernego rozkładu energii kinetycznej, co ogranicza rozdzielczość widma. Aby rozwiązać ten problem, stosuje się reflektrom, który wyposażony jest w zwierciadła jonowe i pole elektryczne, które ponownie skupiają jony o tej samej masie. Dzięki temu poprawia się rozdzielczość, a reflektrom skutecznie kompensuje różnice w energiach kinetycznych jonów, kierując je z powrotem do strefy dryfu w stronę detektora. Wybór trybu pracy analizatora TOF zależy od rodzaju analizowanego materiału oraz celu badania. W przypadku związków małowielkocząsteczkowych, takich jak peptydy czy metabolity, tryb reflektromowy jest często preferowany, ponieważ pozwala na uzyskanie lepszej rozdzielczości i precyzyjniejsze pomiary mas cząsteczek. Natomiast w analizach związków o większych masach, jak białka, tryb liniowy może być bardziej efektywny, ponieważ eliminuje problem fragmentacji jonów, który może wystąpić w trybie reflektromowym. Dodatkowo, tryb liniowy zapewnia wyższą przepustowość, co czyni go odpowiednim w badaniach, które wymagają analizy dużej liczby próbek w krótkim czasie. Ostateczny wybór trybu zależy od specyfiki analizy, co pozwala na optymalizację rozdzielczości i czułości pomiaru [69-71].

3.1. MALDI-TOF MS w badaniach mikrobiologicznych

Technika MALDI-TOF MS jest nowoczesnym podejściem do identyfikacji mikroorganizmów, opierającym się na analizie profili białkowych, ze szczególnym uwzględnieniem białek rybosomalnych. Ich wysoka zawartość, wynosząca około 50% całkowitej puli białek mikroorganizmów, odpowiada za dużą powtarzalność oraz wysoką wiarygodność identyfikacji gatunkowej [52]. Widma masowe uzyskiwane dla bakterii obejmują poza sygnałami pochodzącymi od białek rybosomalnych, również te pochodzące od białek innych niż rybosomalne, przy czym ekspresja tych ostatnich jest w różnym stopniu zależna od stanu metabolicznego komórek oraz warunków środowiskowych. Zmiany w

składzie chemicznym pożywki hodowlanej lub parametrach środowiskowych mogą modyfikować poziom syntezy białek nierybosomalnych, co wpływa na kształtowanie profili molekularnych mikroorganizmów. Przyjmuje się, że wpływ tego zjawiska na skuteczność identyfikacji mikroorganizmów zależy nie tylko od specyfiki badanego drobnoustroju, ale również od charakteru zmian w środowisku hodowlanym. Mechanizm ten wynika z dynamicznych zmian w proporcjach białek nierybosomalnych, podlegających regulacji metabolicznej, względem stabilnych ewolucyjnie białek rybosomalnych [72,73].

W badaniu **P2** przeprowadziłam analizę wpływu składu chemicznego podłoża hodowlanego na identyfikację *S. aureus* za pomocą MALDI-TOF MS. Wykazałam, że jakość widm masowych oraz skuteczność identyfikacji zależą od użytej pożywki. Mimo że wszystkie zastosowane podłoża pozwalają na wiarygodną identyfikację, to najwyższe wartości wskaźnika identyfikacji uzyskałam dla szczepów hodowanych na agarze selektywnym vancomycin-resistant enterococci agar VRE i agarze mózgowo-sercowym BHI, natomiast zastosowanie selektywnego agaru bromokrezolowego z glukozą BCP obniżało skuteczność identyfikacji, co może wynikać z obecności soli i pigmentów tłumiących proces jonizacji. Dodatkowo, analiza dendrogramów MSP wykazała, że różnice w składzie chemicznym pożywek determinowały zmienność profili proteomicznych analizowanych izolatów bakterii, które zostały wyizolowane od pacjentów z wymazów pobranych z trudnogojących się ran pooperacyjnych, co może mieć istotne implikacje w kontekście ich klasyfikacji filoproteomicznej. W szczególności w przypadku podłoży BHI i BCP zaobserwowano tendencję do grupowania izolatów z rodzajów *Escherichia*, *Klebsiella* i *Enterobacter* w jeden klaster, co może sugerować, że skład medium hodowlanego wpływa na poziom ekspresji białek istotnych dla identyfikacji tych mikroorganizmów.

Proces identyfikacji polega na analizie stosunku masy do ładunku zjonizowanych białek, co pozwala na uzyskanie unikalnych dla każdego mikroorganizmu profili białkowych. MALDI-TOF MS osiąga dokładność porównywalną z tradycyjnymi metodami biologii molekularnej, takimi jak sekwencjonowanie regionu 16S rRNA, uznawanym za złoty standard identyfikacji prokariotów, co obrazują wyniki moich badań opisane w pracy **P3**. Metoda ta wyróżnia się niezwykle krótkim czasem analizy, pozwalając na uzyskanie wyników w ciągu kilku minut. Ponadto cechuje się wysoką czułością, co oznacza, że do przeprowadzenia wiarygodnej identyfikacji wystarczy niewielka liczba komórek mikroorganizmów ($<10^4$) [74].

Istotnym atutem tej technologii jest różnorodność metod przygotowania próbek, które są znacznie prostsze w porównaniu z innymi technikami. Możliwe jest bezpośrednio wykorzystanie całych, nieuszkodzonych komórek (ang. *intact/whole cells method*), jak również szybka ekstrakcja na powierzchni płytki (ang. *on-target extraction*) lub bardziej zaawansowana

procedura obejmująca pełną izolację białek (ang. *in-tube/full extraction*) [67,75]. W badaniu **P2** zastosowałam metodę pełnej izolacji białek, natomiast w pracy **P3** dokonałam porównania pełnej ekstrakcji z ekstrakcją na powierzchni płytki. Analiza wyników wykazała, że różnice między tymi podejściami w kontekście identyfikacji bakterii tworzących zarodniki były statystycznie nieistotne. Oznacza to, że obie metody prowadziły do porównywalnych rezultatów w zakresie identyfikacji mikroorganizmów. Wyniki te sugerują, iż wybór konkretnej metody może zależeć od innych czynników, takich jak dostępność zasobów laboratoryjnych, czasochłonność procedury czy wygoda jej stosowania. W badaniach **B1** zastosowano metodę ekstrakcji na powierzchni płytki ze względu na jej prostotę, szybkość oraz minimalne wymagania dotyczące przygotowania próbki. Ta technika pozwala na bezpośrednią analizę mikroorganizmów, eliminując konieczność skomplikowanych procedur izolacji białek, co znacząco skraca czas potrzebny na uzyskanie wyników. Ponadto metoda ta jest mniej pracochłonna i nie wymaga dodatkowych odczynników, co czyni ją bardziej ekonomiczną i dostępną w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej. W kontekście badań **B1** była to najbardziej efektywna strategia, umożliwiająca uzyskanie wiarygodnych wyników w krótkim czasie.

Metoda MALDI-TOF MS została już wykorzystana do szybkiej identyfikacji wielu grup mikroorganizmów, obejmujących zarówno bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, jak i różne gatunki grzybów z różnych matryc [**P2**, **P3**, **B1**]. Efektywne i szybkie analizowanie uzyskanych profili białkowych, zwłaszcza poprzez ich zestawienie z widmami referencyjnymi, wymaga zastosowania specjalistycznego oprogramowania wspierającego proces identyfikacji. Obecnie dostępnych jest wiele komercyjnych systemów spektrometrii masowej przeznaczonych do klinicznej identyfikacji mikroorganizmów. Do najbardziej znanych platform należą MALDI Biotyper firmy BrukerDaltonics z Niemiec [76,77], VITEK MS opracowany przez bioMérieux z Francji [78,79], Axima japońskiej firmy Shimadzu [80] oraz MicroIDSys opracowany przez ASTA z Korei Południowej [81]. Aby ułatwić wdrażanie i walidację systemów, Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) opracował wytyczne, które wspierają laboratoria w procesie implementacji technologii MALDI-TOF MS [82]. Wysoka wiarygodność systemów MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) oraz VITEK MS (bioMérieux) została potwierdzona poprzez uzyskanie zatwierdzenia Amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA). Dzięki temu systemy te zostały dopuszczone do rutynowego stosowania w klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych w Stanach Zjednoczonych. Co więcej, oba systemy posiadają certyfikaty IVD-CE, co oznacza, że są zatwierdzone do stosowania w diagnostyce *in vitro* na terenie Unii Europejskiej. Ich zastosowanie obejmuje identyfikację kluczowych mikroorganizmów o

znaczeniu medycznym, co znacząco wspiera diagnostykę mikrobiologiczną i usprawnia procesy laboratoryjne. W ostatnim czasie na rynku globalnym pojawiło się coraz więcej tego typu urządzeń, w tym systemy chińskich producentów, takich jak Autobio [83,84], Xiamen [85] i Zybio [86], które sukcesywnie zyskują na popularności.

W swoich badaniach stosowałam dwie komercyjnie dostępne platformy do identyfikacji mikroorganizmów i analizy antybiotykooporności: (1) MALDI Biotyper firmy Bruker (Bremen, Niemcy) z zastosowaniem aparatu MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme [P2] oraz MALDI microflex LT/SH [P3, B1], jak również EXS2600 firmy Zybio Inc. (Chongqing, Chiny) [B2].

Aparat MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme to zaawansowany spektrometr mas przeznaczony do zaawansowanych analiz badawczych w obszarach biochemii, proteomiki [P2], metabolomiki [87,88] i lipidomiki [89,90]. Dzięki wykorzystaniu trybu analizatora czasu przelotu TOF/TOF umożliwia szczegółową analizę fragmentacji jonów, co znajduje zastosowanie w sekwencjonowaniu białek [91] oraz badaniu modyfikacji post-translacyjnych [92]. Aparat charakteryzuje się wysoką rozdzielczością i dokładnością masy, co pozwala na precyzyjną identyfikację związków oraz szerokim zakresem dynamicznym dzięki technologii FlashDetector™. Wyposażony w laser Smartbeam-II, zapewnia efektywną desorpcję i jonizację próbek, oferując szybkie i powtarzalne wyniki [93]. Z kolei aparat MALDI microflex LT to kompaktowy spektrometr masowy zaprojektowany głównie do rutynowych analiz mikrobiologicznych, biochemicznych oraz diagnostycznych. Urządzenie to wyróżnia się prostotą obsługi, kompaktową konstrukcją oraz możliwością szybkiej analizy próbek, co sprawia, że doskonale sprawdza się w codziennej pracy laboratoryjnej. Microflex LT wykorzystuje zoptymalizowaną bazę danych MALDI Biotyper, umożliwiając szybką i precyzyjną identyfikację szerokiego spektrum mikroorganizmów na podstawie ich profili białkowych. Jest to system dedykowany głównie do identyfikacji bakterii, drożdży i pleśni. System ten posiada certyfikaty IVD i IVDR (ang. *In Vitro Diagnostic Regulation*), co oznacza, że spełnia odpowiednie normy regulacyjne i jest zatwierdzony do stosowania w diagnostyce *in vitro*. Certyfikaty te są dowodem na to, że urządzenie przeszło rygorystyczne testy jakościowe i bezpieczeństwa, zgodne z wymogami unijnych regulacji, a także przepisami FDA w przypadku rynku amerykańskiego [94–96].

Ostatni z systemów, Zybio EXS2600, dedykowany jest do szybkiej i automatycznej identyfikacji mikroorganizmów, której dokładność porównywalna jest z innymi systemami MALDI-TOF MS [94]. Niemniej jednak system ten nie posiada zaawansowanych funkcji badawczych, takich jak te dostępne w modelach firmy Bruker, i obecnie nie jest dopuszczony do stosowania w laboratoriach diagnostycznych [97]. W Polsce znajduje się obecnie jeden

aparat Zybion EXS2600 i zlokalizowany jest w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu, gdzie pod kierownictwem dr hab. Pawła Pomastowskiego, prof. UMK, biorę udział w prowadzeniu badań walidacyjnych mających na celu opracowanie metod zastosowania tego urządzenia do analizy próbek mikrobiologicznych, pod kątem identyfikacji mikroorganizmów oraz detekcji antybiotykooporności [B2]. Projekt realizowany jest we współpracy z polskim dystrybutorem Zybion EXS2600, firmą POLGEN MACHEJKO z Łodzi, w ramach międzynarodowego partnerstwa z Chińską Ludową Republiką.

Technikę MALDI-TOF MS zastosowałam w swoich badaniach zarówno do identyfikacji mikroorganizmów [P2, P3, B1], jak i do oznaczania antybiotykooporności [P2, B2]. Mikroorganizmy w środowisku naturalnym, w tym w organizmach ludzkich, rzadko występują jako monokultury, a najczęściej tworzą mieszkanki różnych gatunków. Tego rodzaju złożoność utrudnia dokładną i wiarygodną analizę składu mikrobiologicznego, stanowiąc wyzwanie zarówno dla badaczy, jak i laboratoriów diagnostycznych, zwłaszcza w kontekście diagnostyki klinicznej. Przykładami trudnych i złożonych matryc biologicznych, których skład mikrobiologiczny analizowałam w ramach badań do niniejszej rozprawy, są trudne gojące się rany pooperacyjne [P2], ślina i wymazy z górnych dróg oddechowych pacjentów cierpiących na infekcje dróg oddechowych [B1].

Poza dużą złożonością gatunkową mikroorganizmów w matrycach biologicznych, innym kluczowym elementem wiarygodnej diagnostyki jest zdolność systemu do rozróżniania komórek bakteryjnych o zbliżonych profilach molekularnych, tzw. gatunków blisko spokrewnionych. W badaniach opisanych w pracy P3 napotkałam trudności w jednoznacznej identyfikacji wytwarzających przetrwalniki bakterii z rodzaju *Lysinibacillus*. Pomimo zastosowania sekwencjonowania genu 16S rDNA, jako metody referencyjnej uznawanej za „złoty standard” w identyfikacji drobnoustrojów, nie pozwoliło mi to na uzyskanie jednoznacznych wyników, co podkreśla wyzwania związane z różnicowaniem blisko spokrewnionych gatunków. Z kolei w badaniach B1 zaobserwowałam trudności w jednoznacznej identyfikacji gatunków z rodzajów *Neisseria* i *Streptococcus*, zwłaszcza blisko spokrewnionych taksonomicznie, co wskazuje na ograniczenia techniki MALDI-TOF MS w precyzyjnym rozróżnianiu tych gatunków ze względu na ich zbliżone profile białkowe.

Technika MALDI-TOF MS, oprócz skuteczności w identyfikacji taksonomicznej patogenów klinicznych, stała się również cennym narzędziem w analizie antybiotykooporności. Dzięki rozwojowi tej metody możliwe jest wykrywanie nie tylko bakterii produkujących -laktamazy, w tym cefalosporynaz i karbapenemaz, ale także określanie oporności na szeroką gamę innych antybiotyków. Technika ta umożliwia identyfikację mechanizmów oporności we wszystkich rodzajach mikroorganizmów, co stanowi przełom w diagnostyce

mikrobiologicznej, pozwalając na szybsze i dokładniejsze określenie profilu oporności [98][**P2**, **B2**]. Moje badania wykazały, że technika MALDI-TOF MS skutecznie rozróżnia patogeny wrażliwe i odporne na antybiotyki, identyfikując specyficzne białka związane z mechanizmami oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe [**P2**]. Porównując profile białkowe bakterii od pacjentów nieleczonych antybiotykami z tymi, którzy otrzymali terapię, oraz wykorzystując publicznie dostępną bazę danych UniProt (ang. Universal Protein Resource), zidentyfikowałam specyficzne sygnały wskazujące na mechanizmy działania antybiotyków oraz potencjalne mechanizmy oporności. Przykładem może być obecność moduliny PSM- α -3 (sygnał m/z = 2656,8), która jest powiązana z wirulencją i opornością na antybiotyki, zwłaszcza w szczepach MRSA, oraz obecność sygnałów ~ 6355 m/z i ~ 6590 m/z powiązanych z występowaniem białek transportujących antybiotyki mogących przyczyniać się do wystąpienia oporności. Należy jednak podkreślić, że profile białkowe drobnoustrojów dostarczają jedynie informacji o masach i względnych intensywnościach pików, co utrudnia jednoznaczną identyfikację konkretnych białek odpowiedzialnych za oporność. W takich przypadkach konieczne jest zastosowanie dodatkowych metod, takich jak spektrometria mas tandemowa (MS/MS) lub analiza genomowa, które pozwalają na bardziej szczegółowe badania. Dodatkowo, przeszukiwanie baz danych i interpretacja wyników są procesami czasochłonnymi, co ogranicza możliwości szybkiego wdrożenia wyników w warunkach klinicznych.

Podjęciem, które obecnie znajduje zastosowanie w laboratoriach diagnostycznych, jest selektywne wykrywanie oporności na antybiotyki beta-laktamowe za pomocą MALDI Biotyper (ang. *MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance- β -Lactamase assay* (MBT STAR-BL). W ramach opisanego podejścia dostępne są również dwa dedykowane, komercyjnie dostępne testy MBT-STAR-Carba służący do wykrywania oporności na karbapenemazy oraz MBT-STAR-Cepha, wykrywający aktywność cefalosporynaz. Opisana metoda bazuje na analizie spektrometrycznej, której celem jest ocena poziomu hydrolizy zastosowanego antybiotyku beta-laktamowego. Stopień degradacji leku określa się poprzez porównanie mas cząsteczkowych jego form – zarówno niehydrolizowanej, jak i poddanej hydrolizie – a wynik tej analizy wyrażany jest za pomocą wartości logRQ [99, 100]. Co więcej, oba testy posiadają certyfikację IVD, jednak umożliwiają analizę jedynie bakterii Gram-ujemnych oraz antybiotyków beta-laktamowych. Mimo swojej prostoty i krótkiego czasu analizy (około 1,5 h) pozwala jedynie na ocenę jakościową oporności na karbapenemy, bazując na zmianach intensywności sygnału dla imipenemu (300,20 m/z) oraz jego adduktu z matrycą HCCA (489,00 m/z), a także dla zhydrolizowanych cząsteczek (254,10 m/z)[101]. Ogranicza to możliwość dokładnego określenia rodzaju beta-laktamaz odpowiedzialnych za oporność, co jest istotne dla precyzyjnego ustalenia poziomu wrażliwości bakterii. Dodatkowo, użycie

nieokreślonej ilości biomasy komórkowej utrudnia porównanie wyników, ponieważ liczba komórek bakteryjnych może się różnić pomiędzy próbkami, a obecność interferujących substancji, takich jak składniki pożywki, może wpływać na wyniki.

Dalsze badania nad rozwojem technologii doprowadziły do opracowania przez firmę Bruker Daltonics nowych podejść, takich jak MBT-ASTRA czy MBT-RESIST, których szczegółowe zastosowanie opisałam w pracy **P1**. W podejściu MBT-ASTRA analiza opiera się na ocenie wartości pola pod krzywą (ang. *Area Under the Curve*, AUC) sygnałów widma bakterii inkubowanej z antybiotykiem ($AUC_{BAC+ATB}$) w porównaniu do pola pod krzywą sygnałów widma bakterii inkubowanej bez antybiotyku (AUC_{BAC}). Stosunek $(AUC_{BAC+ATB})/(AUC_{BAC})$ daje wartość określaną jako względny wzrost (ang. *Relative Growth*, RG). Metoda bazuje na zasadzie, że bakterie ekspozycjonowane na skuteczny antybiotyk nie syntetyzują wystarczającej ilości biocząsteczek, co skutkuje obniżoną intensywnością lub brakiem charakterystycznych sygnałów w widmie masowym. Główną zaletą MBT-ASTRA jest, podobnie jak w przypadku podejścia MBT-STAR-BL, szybka analiza widm, umożliwiającą uzyskanie wyniku testu AST w 2–3 godziny [102]. Co więcej, możliwa jest analiza wszystkich klas antybiotyków i wszystkich rodzajów bakterii. Mimo szybkiej analizy, oprogramowanie wymaga umiejętności programistycznych, które są rzadko dostępne w laboratoriach mikrobiologicznych. Firma Bruker Daltonics opracowała prototyp oprogramowania, które nie jest jeszcze dostępne. Dlatego ważne jest opracowanie adaptacji tego testu, zwłaszcza dla laboratoriów szpitalnych dążących do szybszych wyników AST.

W moich badaniach zastosowałam zarówno podejście MBT-STAR-BL, a dokładniej test MBT STAR-Carba, jak i – we współpracy oraz przy wsparciu Pani Katrin Sparbier z firmy Bruker Daltonics – podejście MBT-ASTRA. Jako pierwsza zastosowałam test MBT-ASTRA do identyfikacji oporności u *S. aureus*, w tym szczepów opornych na metycylinę, oraz przeprowadziłam analizę oporności na lewofloksacynę i azytromycynę u tych bakterii. Jako jedna z pierwszych przeprowadziłam analizy oporności *K. pneumoniae* na imipenem z wykorzystaniem spektrometru MALDI-TOF MS Zybio EXS2600, porównując uzyskane wyniki z podejściem MBT-STAR-BL. Ponadto, po raz pierwszy zestawiałam wyniki uzyskane za pomocą spektrometru Zybio z testem MBT-ASTRA oraz oprogramowaniem CLOVER BioSoft [B2].

Kluczową rolę w analizach antybiotykooporności przy wykorzystaniu techniki MALDI-TOF MS odgrywa również standard wewnętrzny. W przypadku metody MBT-STAR-BL jest to MBT STAR ACS Standard, natomiast w metodzie MBT-ASTRA wykorzystywana jest RNAza B. Zastosowanie standardu wewnętrznego pozwala na normalizację wyników, co jest istotne w kontekście zmienności eksperymentalnej, takiej jak różnice w jakości matrycy, czasie

pomiaru czy gęstości inokulum, co umożliwia ich korelację, zapewniając spójność i porównywalność wyników. Stosowanie standardu zwiększa dokładność, precyzyjność i wiarygodność analizy, co ma kluczowe znaczenie w diagnostyce.

3.1.1. Badania dotyczące identyfikacji mikroorganizmów wyizolowanych z próbek rzeczywistych od pacjentów z infekcjami górnych dróg oddechowych [B1]

Materiały i metodologia

Podczas badań analizowałam próbki rzeczywiste pobrane od pacjentów w ramach współpracy z Panią dr Marzeną Kociołek ze Szpitala Chorób Płuc w Siewierzu oraz Panem dr Wojciechem Kupczykiem z Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. Rydygiera w Toruniu (zgody Komisji Bioetycznej CM UMK w Toruniu nr 585/2017 oraz nr 477/2021). Próbki obejmowały wymazy z nosa (wymaz płytki), nosogardzieli (wymaz głęboki) oraz próbki śliny i pochodziły od 85 pacjentów w wieku 20–92 lat (32 kobiet i 53 mężczyzn) cierpiących na choroby układu oddechowego, takie jak gruźlica, zapalenie płuc oraz nowotwory. Wymazy z nosogardzieli nosa pobierano przy użyciu sterylnych wymazówek, które następnie umieszczano w płynnym podłożu transportowym (AmiesSwab, Deltalab, Barcelona, Hiszpania). Próbki śliny zbierano bezpośrednio do sterylnych probówek. Wszystkie pobrane materiały były przechowywane w temperaturze -80°C , co zapewniało stabilność próbek.

W celu izolacji mikroorganizmów dokonałam posiewu na cztery rodzaje stałych podłoży mikrobiologicznych: Agar Brain Heart Infusion Agar (BHI; Sigma Aldrich, Steinheim, Niemcy), Glucose Bromocresol Purple Agar (BCP; Sigma Aldrich, Steinheim, Niemcy), Columbia Blood Agar (COL; Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania) oraz MacConkey Agar (MAC; Sigma Aldrich, Steinheim, Niemcy). Wszystkie podłoża były przygotowane w formie gotowych do użycia pudrów, z wyjątkiem Columbia Blood Agar, który przygotowałam poprzez dodanie odwłóknionej krwi owczej (GRASO Biotech, Starogard Gdański, Polska) do wysterylizowanej i rozpuszczonej bazy agaru Columbia, uzyskując końcowe stężenie 5% (v/v).

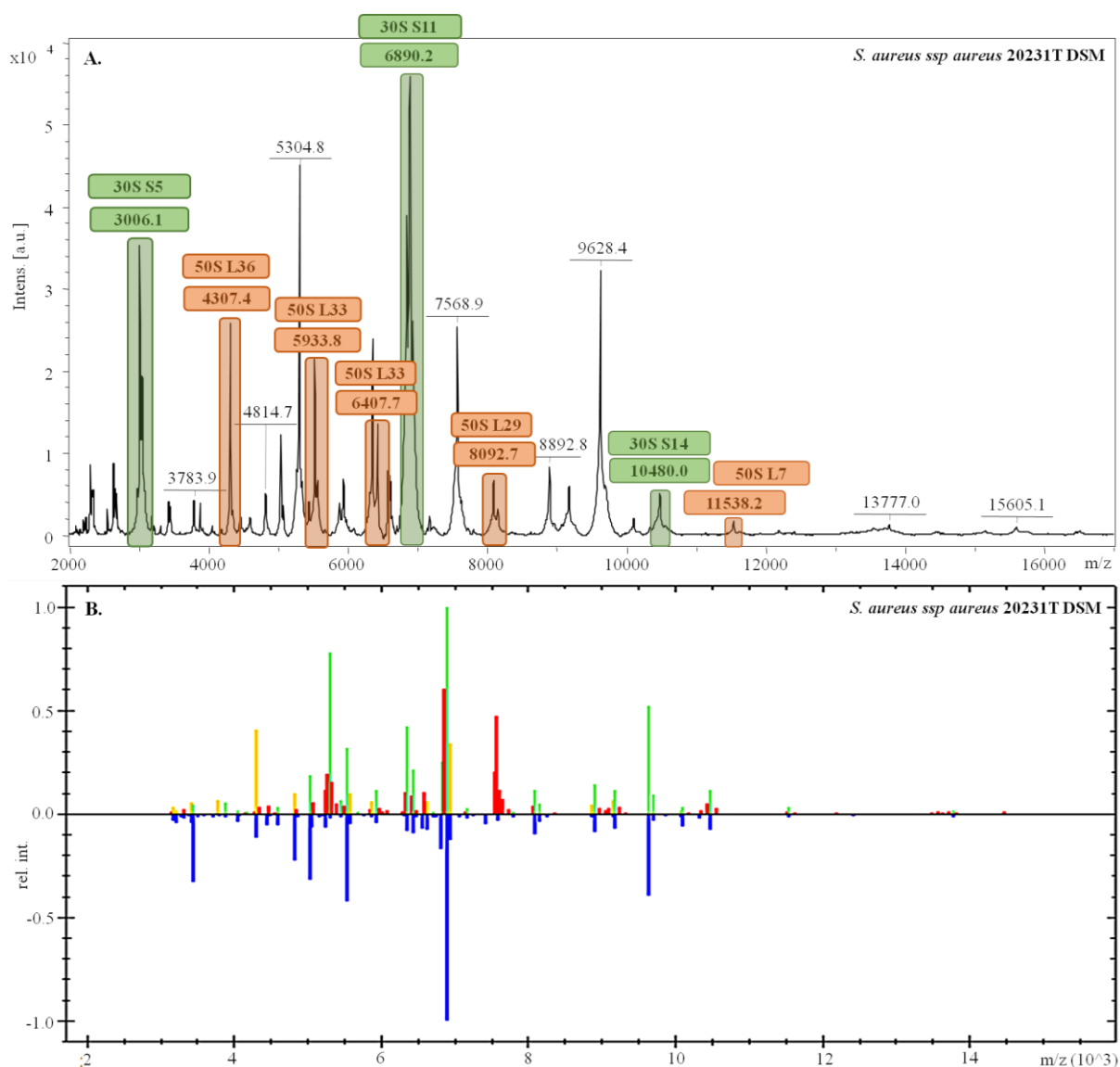
Kultury bakteryjne inkubowałam w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a następnie wybrałam pojedyncze kolonie charakteryzujące się różnymi cechami morfologicznymi w celu uzyskania czystych kultur i wykonałam posiew redukcyjny na takim samym podłożu (inkubacja w temperaturze 37°C przez 18–24 godziny).

Wszystkie izolaty mikroorganizmów zidentyfikowałam przy użyciu metody bezpośredniej ekstrakcji kolonii na płytce MALDI zgodnie z procedurą przedstawioną w pracy **P3**. Świeżo wyhodowaną kolonię, inkubowaną przez noc, naniosłam w niewielkich ilościach na 96-punktową stalową płytkę docelową i pokrywałam 1 μl 70% roztworu kwasu mrówkowego (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy). Po wysuszeniu wszystkie próby

pokrywałam 1 µl roztworu matrycy, którym był kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy (ang. *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*, HCCA) (10 mg/ml, BrukerDaltonics GmbH, Bremen, Niemcy). Po całkowitym wyschnięciu preparatu płytkę docelową umieściłam w spektrometrze mas MALDI. Próbkę analizowano trzykrotnie w celu oceny powtarzalności wyników oraz walidacji metody ekstrakcji i dokładności identyfikacji mikroorganizmów przy użyciu MALDI-TOF MS

Wyniki badań

Analiza mikrobiologiczna materiału biologicznego pobranego z nosa, nosogardzieli oraz śliny u pacjentów z infekcjami dróg oddechowych pozwoliła na identyfikację dominujących grup mikroorganizmów. Analizy MALDI-TOF MS skupiają się na analizie podstawowych białek, głównie w zakresie mas molowych od 2000 do 20 000 Da, które stanowią od 60% do 70% suchej masy komórkowej bakterii. Większość biomarkerów wykrywanych w widmach MALDI-TOF MS to białka wewnątrzkomórkowe, głównie w przedziale mas molowych od 4000 do 15 000 Da. Liza komórek mikroorganizmów przy użyciu rozpuszczalników organicznych w środowisku kwaśnym sprzyja ekstrakcji zasadowych białek cytoplazmatycznych, w szczególności białek rybosomalnych. Są to wysoce konserwatywne białka, pełniące kluczowe funkcje w komórce, stanowiące idealne biomarkery do identyfikacji i charakteryzowania poszczególnych gatunków. Proces identyfikacji polega na porównaniu uzyskanego profilu masowego z bazą danych zawierającą wzorce białek rybosomalnych, co umożliwia precyzyjne określenie tożsamości mikroorganizmu na poziomie rodzaju, a w wielu przypadkach także na poziomie gatunku i szczepu. Na *Rysunku 3* przedstawiłam przykładowe widma dla bakterii *S. aureus*. Widmo górne przedstawia surowe dane uzyskane w wyniku analizy, natomiast widmo górne ilustruje stopień dopasowania uzyskanych sygnałów do widm referencyjnych dostępnych w bazie danych.



Rysunek 3. Przykładowe widmo uzyskane dla bakterii *S. aureus* z zaznaczonymi charakterystycznymi sygnałami - A oraz zestawienie uzyskanego widma z widmem referencyjnym - B

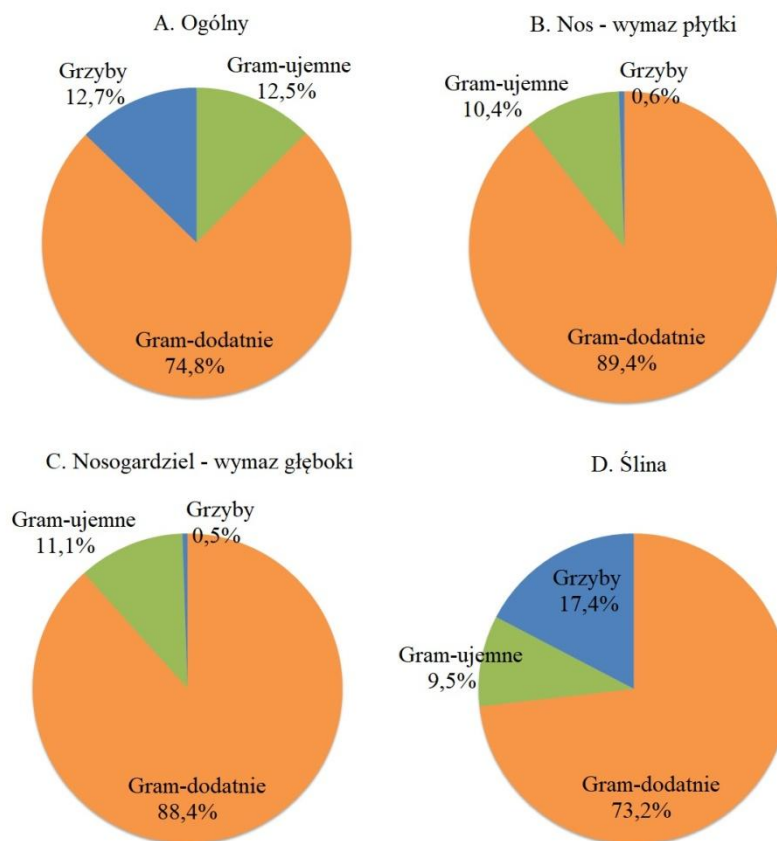
Widmo przedstawione na *Rysunku 3A* ukazuje liczne sygnały w zakresie 2000–16000 m/z , które z dużym prawdopodobieństwem można przypisać białkom rybosomalnym na podstawie porównania z danymi z bazy UniProt. Wśród przypisanych sygnałów wyróżniłam prawdopodobne białka podjednostki 30S (oznaczone kolorem zielonym), takie jak S5 – 3006,1 m/z , S11 – 6890,237 m/z oraz S14 – 10480,0 m/z , a także białka podjednostki 50S (oznaczone kolorem pomarańczowym), w tym L36 – 5304,7 m/z oraz L7 – 11538,2 m/z . Białka rybosomalne, ze względu na swoją wysoką konserwatywność i obecność w spektrach uzyskiwanych dla drobnoustrojów, są powszechnie wykorzystywane jako markery referencyjne w technice MALDI-TOF MS, choć przypisanie poszczególnych sygnałów do konkretnych białek opiera się na analizie teoretycznej i obarczone jest pewnym stopniem niepewności. Oprócz białek rybosomalnych, w widmie mogą być obecne także inne białka charakterystyczne dla *S. aureus*, w tym enzymy lub białka strukturalne. Przykładem może być

białko RF2 (*ang. Release Factor 2*), uczestniczące w procesie translacji, którego sygnał (5304,7 *m/z*) także z dużym prawdopodobieństwem przypisałam na podstawie danych teoretycznych.

Z kolei *Rysunek 3B* ilustruje dopasowanie uzyskanych sygnałów do widm referencyjnych z bazy danych, co umożliwia ocenę stopnia zgodności analizowanej próbki z widmami referencyjnymi. Kolorystyka pików odzwierciedla jakość dopasowania: piki zielone odpowiadają sygnałom wykazującym wysoki stopień dopasowania z bazą danych, piki żółte wskazują na umiarkowane dopasowanie, natomiast piki czerwone oznaczają brak zgodności.

Różnice pomiędzy widmem próbki a widmami referencyjnymi mogą wynikać z różnorodności szczepów, różnic w poziomie ekspresji białek, zmienności warunków hodowli mikroorganizmu, jak również z ograniczeń metodycznych, w tym rozdzielczości i czułości analizy widmowej.

Wyniki uzyskane w trakcie analizy mikrobiomu pacjentów z infekcjami dróg oddechowych przedstawiłam na poniższych wykresach (*Rysunek 4*). Ogółem w badanych próbkach wykryto 74,8% bakterii Gram-dodatnich, 12,5% bakterii Gram-ujemnych oraz 12,7% grzybów (*Rysunek 4A*), ze zmiennym udziałem wynikającym z rodzaju pobranego materiału.



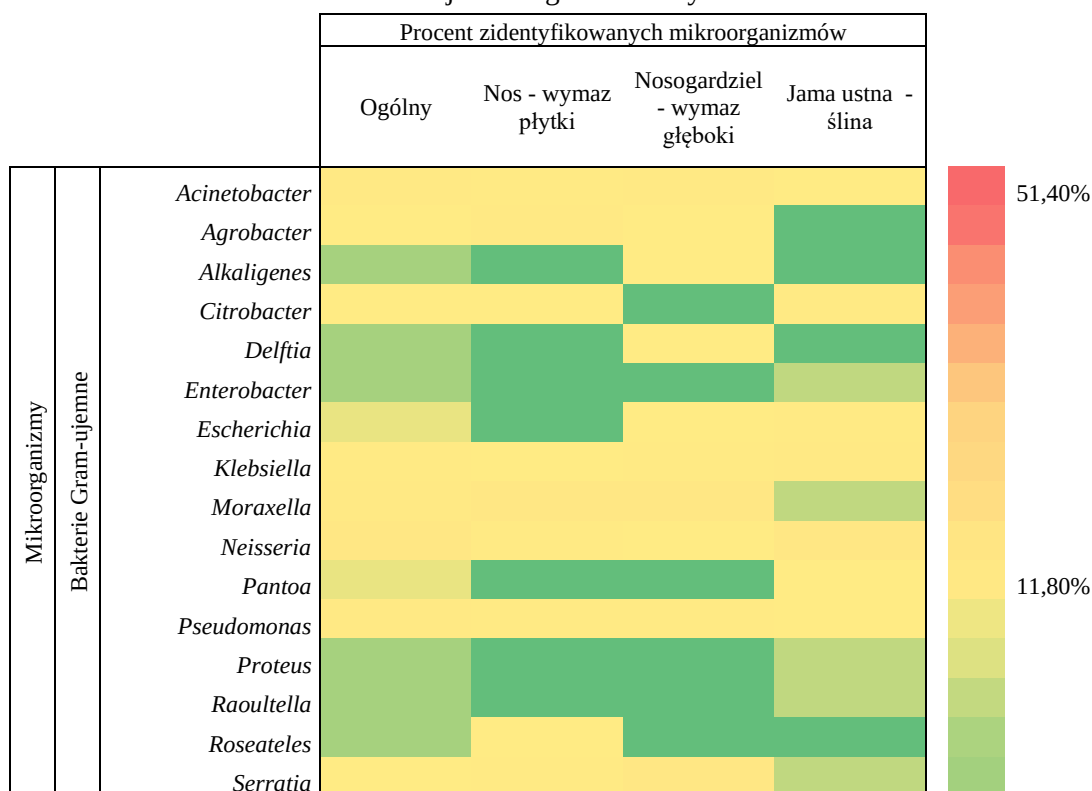
Rysunek 4. Procentowy udział mikroorganizmów wyizolowanych z próbek klinicznych.

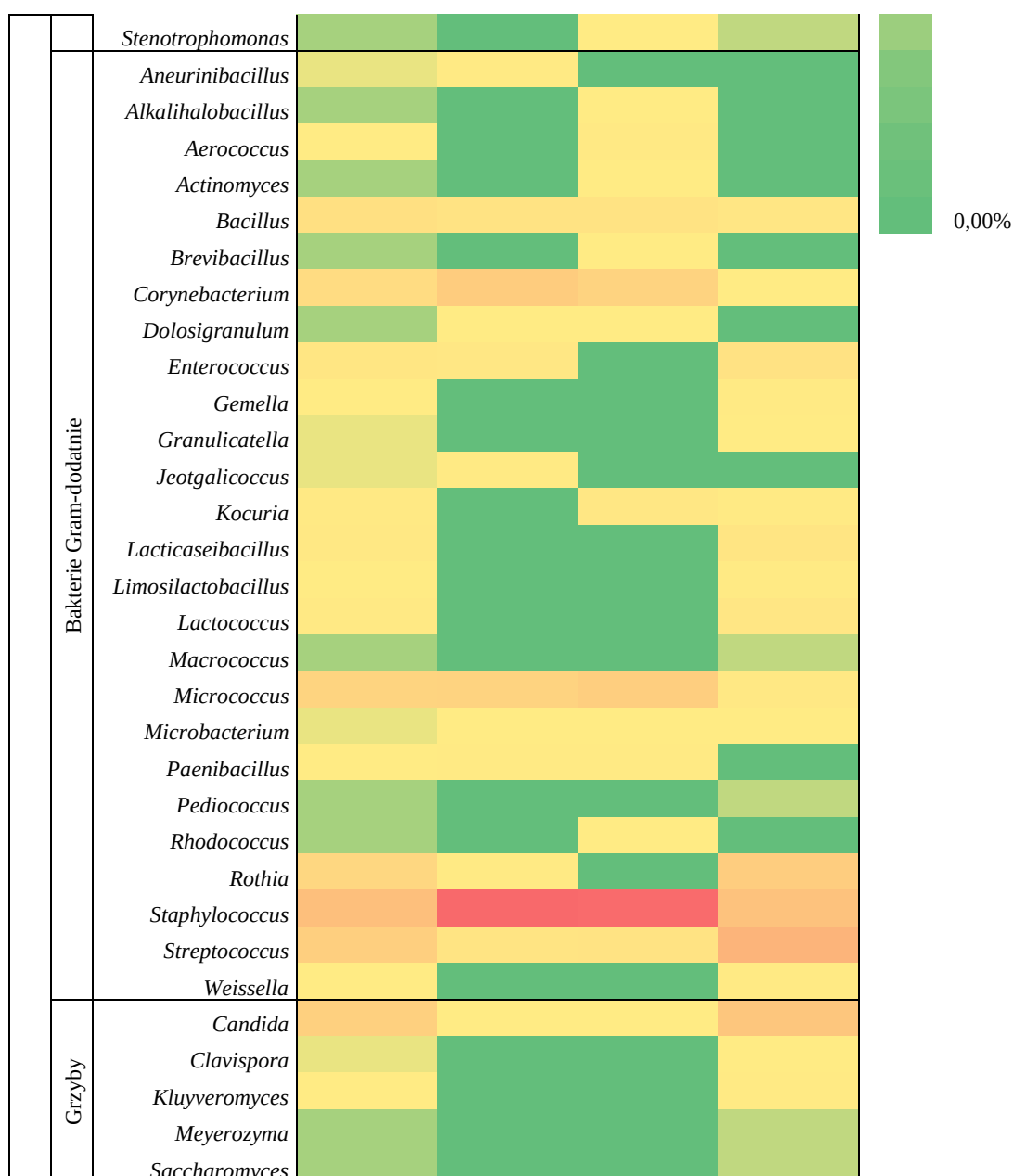
- A – ogólny procent zidentyfikowanych grup mikroorganizmów;
- B. procent grup mikroorganizmów zidentyfikowanych w wymazie płytkim z nosa;
- C. procent grup mikroorganizmów zidentyfikowanych w wymazach głębokich z nosogardzieli;
- D. procent grup mikroorganizmów wyizolowanych z próbek śliny

W wymazach z nosa bakterie Gram-dodatnie stanowiły 89,4%, bakterie Gram-ujemne 10,1%, a grzyby 0,6% (Rysunek 4B). Wysoki udział bakterii Gram-dodatnich wskazuje na ich rolę w naturalnej kolonizacji błon śluzowych nosa, a niewielka liczba grzybów sugeruje niesprzyjające warunki dla ich wzrostu. Podobne proporcje zaobserwowano w nosogardzieli: 88,4% bakterii Gram-dodatnich, 11,1% Gram-ujemnych oraz 0,5% grzybów (Rysunek 4C). Wskazuje to na zbliżone warunki dla wzrostu mikroorganizmów panujące w nosie i nosogardzieli wynikającą z ich powiązania anatomicznego i funkcjonalnego. Próbkę śliny wykazały większą różnorodność (Rysunek 4D). Bakterie Gram-dodatnie stanowiły 74,8%, bakterie Gram-ujemne 12,5%, a grzyby 12,7%. Wyższy udział grzybów jest związany z warunkami jamy ustnej, takimi jak wilgotność, obecność resztek pokarmowych i zmienne pH, które sprzyjają ich rozwojowi.

Mikrobiota błon śluzowych człowieka stanowi dynamiczny ekosystem, w którym współistnienie różnych grup mikroorganizmów – bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów – opiera się na złożonych interakcjach, mających kluczowe znaczenie dla utrzymania homeostazy. Wyniki identyfikacji poszczególnych rodzajów mikroorganizmów przedstawiłam w formie mapy ciepła (*heatmap*) w Tabeli 3, co umożliwiło mi szczegółową analizę różnorodności oraz częstości występowania mikroorganizmów w badanych lokalizacjach: nos, nosogardziel oraz jama ustna (ślina).

Tabela 3. Mapa ciepła przedstawiająca procentowy udział wszystkich zidentyfikowanych rodzajów mikroorganizmów z wymazów z nosa, nosogardzieli oraz śliny pobranych od pacjentów z infekcjami dróg oddechowych.





W badanych próbkach skład mikrobioty charakteryzował się dominacją bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, oraz obecnością grzybów, z przewagą rodzaju *Candida*. Zróżnicowane interakcje pomiędzy tymi mikroorganizmami, w tym konkurencja o zasoby, produkcja substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz regulacja wzrostu, wpływają na stabilność ekosystemu błon śluzowych, co jest kluczowe dla zdrowia gospodarza.

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* stanowiły 51,4% mikroorganizmów wyizolowanych z nosa, 50,8% z nosogardzieli oraz 16,7% ze śliny, natomiast *Streptococcus* odpowiednio 3,4%, 3,7% i 22,4%. Najczęściej identyfikowanym gatunkiem był *S. epidermidis*, ogólnie stanowiący 12,37% wszystkich wyizolowanych mikroorganizmów. Ten gatunek, będący elementem fizjologicznej mikrobioty skóry, w warunkach obniżonej odporności może prowadzić do

zakażeń oportunistycznych, szczególnie w środowiskach szpitalnych [78]. W badanej populacji pacjentów *S. epidermidis* występował u 71 osób. W zależności od lokalizacji, jego procentowy udział w poszczególnych próbkach wynosił: 28,9% w nosie, 31,7% w nosogardzieli oraz 8,4% w ślinie. Innymi identyfikowanymi przez mnie gatunkami z rodzaju *Staphylococcus* były *Staphylococcus haemolyticus* (4,36%), *Staphylococcus hominis* (2,09%) oraz *S. aureus* (1,92%). Choć częstość występowania tych drobnoustrojów była niższa, ich obecności nie należy bagatelizować, ponieważ stanowią one potencjalne zagrożenie jako patogeny w infekcjach dróg oddechowych, zwłaszcza u pacjentów z chorobami współistniejącymi, takimi jak cukrzyca, przewlekła obturacyjna choroba płuc - POChP czy nowotwory. Pacjenci cierpiący na te schorzenia wykazują osłabioną odpowiedź immunologiczną, co zwiększa ich podatność na zakażenia wywołane przez wspomniane bakterie. Dodatkowo, upośledzenie funkcji układu odpornościowego, często towarzyszące tym chorobom, w połączeniu z innymi czynnikami ryzyka, takimi jak hospitalizacja czy stosowanie urządzeń medycznych, sprzyja kolonizacji dróg oddechowych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, co może prowadzić do poważnych powikłań klinicznych [103,104]. *S. aureus*, choć mniej licznie reprezentowany w tej próbie, jest znanym patogenem odpowiedzialnym za szeroki zakres infekcji, od zapalenia płuc po sepsę. Szczególną uwagę należy zwrócić na szczepy MRSA, które mogą komplikować leczenie ze względu na ograniczone możliwości terapeutyczne [105]. Warto zauważyć, że udział *S. haemolyticus* i *S. hominis* w mikrobiocie nosa i nosogardzieli był wyższy niż w innych próbkach, co sugeruje ich większe znaczenie w zakażeniach tych obszarów. Natomiast *S. aureus*, choć rzadziej identyfikowany niż inne gatunki, również pojawiał się w nosie i nosogardzieli, co potwierdza jego rolę jako potencjalnego patogenu w infekcjach dróg oddechowych. Z uzyskanych danych wynika, że dominacja *S. epidermidis* w badanych próbkach, zwłaszcza z nosogardzieli, wskazuje na jego kluczową rolę w kolonizacji tych obszarów, a także na jego potencjał w wywoływaniu zakażeń, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością.

Streptococcus salivarius (5,05%) oraz *Streptococcus parasanguinis* (3,14%) były najczęściej identyfikowanymi przedstawicielami rodzaju *Streptococcus*, co potwierdza ich rolę jako dominujących bakterii w jamie ustnej i gardle. Ich obecność w próbkach sugeruje migrację mikroorganizmów do dolnych dróg oddechowych w trakcie infekcji. Podobnie, *Rothia mucilaginosa* (6,5%) i *Micrococcus luteus* (7,3%) są istotnymi składnikami mikrobioty dróg oddechowych, zdolnymi do adaptacji w tym środowisku. Oba gatunki należą do komensalnej mikrobioty błon śluzowych, które w warunkach immunosupresji mogą wywoływać infekcje oportunistyczne, takie jak zapalenia płuc czy bakteriemie [106,107]. Co więcej bakterie te wykazują zdolność do przetrwania w trudnych warunkach środowiskowych, a ich potencjalna

rola w patogenezie infekcji wymaga dalszych badań, zwłaszcza nad mechanizmami przejścia z mikrobioty komensalnej w patogenną.

W grupie bakterii Gram-ujemnych często identyfikowano *K. pneumoniae* (1,0%) oraz *Moraxella osloensis* (1,6%), które są znane ze swojej zdolności do wywoływania infekcji dróg oddechowych, szczególnie u pacjentów hospitalizowanych. *E. coli* oraz inne enterobakterie, takie jak *Enterobacter cloacae* i *Citrobacter freundii*, były izolowane z mniejszą częstotliwością (0,3%-0,5%), co wskazuje na ich potencjalne znaczenie w zakażeniach oportunistycznych.

Grzyby z rodzaju *Candida* stanowiły 15,1% wszystkich wyizolowanych drobnoustrojów w ślinie, ale ich obecność potwierdziłam także na błonach śluzowych nosa (0,6%) i nosogardzieli (0,5%). Wśród nich najczęściej identyfikowanym gatunkiem był *Candida albicans*, stanowiący 0,5% wszystkich innych mikroorganizmów błon śluzowych nosa i nosogardzieli oraz 10,2% śliny. Gatunki *Candida* pełnią rolę komensalnych kolonizatorów ludzkiego ciała, a jednocześnie są najczęściej występującymi oportunistycznymi patogenami grzybiczymi [108]. Ich nadmierny wzrost może być hamowany przez bakterie kolonizujące te same środowiska. Szczególnie istotne w tym kontekście są bakterie Gram-dodatnie, takie jak *Streptococcus* i *Staphylococcus*, które konkurują z *Candida* o miejsca adhezji na komórkach nabłonkowych. Gatunki obu rodzajów bakterii wykazują zdolność do produkcji bakteriocyn i innych substancji przeciwdrobnoustrojowych, które ograniczają rozwój *Candida*, jednocześnie wspomagając utrzymanie równowagi mikrobiologicznej [109,110]. Z drugiej jednak strony dane literaturowe wskazują, że *Streptococcus spp.* W warunkach *in vitro* zwiększają ekspresję genów wirulencji, rozwój strzępek oraz biofilmu *C. albicans* [111].

Bakterie *Corynebacterium* również odgrywają ważną rolę w interakcjach z *Candida*. W obrębie nosa *Corynebacterium* stanowiło 12,8% mikroorganizmów, a w nosogardzieli 10,1%, podczas gdy *Candida* odpowiednio 0,6% i 0,5%. Takie proporcje sugerują, że bakterie te mogą pełnić rolę w hamowaniu kolonizacji *Candida*, co przyczynia się do utrzymania równowagi mikrobiologicznej w tych obszarach. Potwierdzają to dane literaturowe wskazujące, że *Corynebacterium* uczestniczy w regulacji przemiany drożdżaków w bardziej inwazyjną postać strzępkową poprzez wytwarzanie metabolitów hamujących tę transformację [112]. Warto również zauważyć, że bakterie Gram-ujemne, w tym *Pseudomonas* (1,4%) i *Klebsiella* (1,1%), mogą tworzyć biofilmy mieszane z *Candida*, co zwiększa odporność mikroorganizmów na mechanizmy obronne gospodarza oraz na leczenie przeciwdrobnoustrojowe. Tego rodzaju interakcje mogą prowadzić do rozwoju przewlekłych zakażeń i utrudniać leczenie [113,114].

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowałam trudności w jednoznacznej identyfikacji gatunków z rodzajów *Neisseria* i *Streptococcus*, zwłaszcza w przypadku blisko

spokrewnionych taksonów, takich jak *N. subflava*, *N. flava*, *N. perflava* oraz *S. mitis* i *S. oralis*. Powtórne analizy tej samej próbki często prowadziły do rozbieżnych wyników identyfikacyjnych, co sugeruje podobieństwa w profilach mas cząsteczek białek między tymi gatunkami.

Analiza jakościowa uzyskanych widm wykazała, że różnice w identyfikacji *Neisseria* spp. są związane z liczbą oraz intensywnością sygnałów białkowych. Chociaż detekcja sygnałów obejmowała zakres 2–20 kDa, na zarejestrowanych widmach widoczne były jedynie sygnały w przedziale 2–16 kDa, a średnia liczba wykrytych sygnałów wynosiła $21,4 \pm 6$ (przy $S/N \geq 10$). Ograniczenie zakresu uwidocznionych sygnałów może wynikać z niskiej intensywności pików w wyższych przedziałach masowych, co uniemożliwiało ich skuteczną rejestrację, lub z niskiej obfitości białek o większej masie cząsteczkowej. W przypadku bakterii z rodzaju *Streptococcus* zaobserwowałam średnio $47,2 \pm 7,6$ sygnałów (przy $S/N \geq 10$) i pomimo wysokich wartości stosunku sygnału do szumu dla pików odpowiadających białkom rybosomalnym, profil białkowy *S. mitis* i *S. oralis* pozostaje wysoce zbliżony. Sygnały o odpowiadające białkom konserwatywnym, takim jak np. białko L34 dużej podjednostki rybosomalnej, występują w widmach obu gatunkach bakterii *Streptococcus*, co utrudnia ich jednoznaczną identyfikację przy zastosowaniu MALDI-TOF MS.

Istotnym ograniczeniem w analizie była także szerokopasmowa zdolność rozdzielcza masy spektrometru, która wynosiła 15 000 (w trybie liniowym dla modelu Microflex LT). Taka rozdzielczość mogła utrudniać jednoznaczne rozróżnienie gatunków o zbliżonych profilach białkowych, zwłaszcza w przypadku bakterii, które wykazują podobieństwo w masach cząsteczek białek. W przypadku bardziej wymagających analiz, takich jak identyfikacja mikroorganizmów o bliskich taksonomicznie profilach, spektrometr o wyższej rozdzielczości, jak UltrafleXtreme, który osiąga rozdzielczość do 40 000 w trybie reflektromowym, mógłby znacząco poprawić precyzję identyfikacji, umożliwiając lepsze rozróżnianie białek o bardzo zbliżonych masach. W celu zwiększenia dokładności identyfikacji, konieczne jest dalsze doskonalenie baz danych referencyjnych oraz optymalizacja parametrów akwizycji widm, w tym poprawa stosunku sygnału do szumu oraz dokładności kalibracji.

Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na dominację bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Corynebacterium*, a także na obecność grzybów z rodzaju *Candida*, w mikrobiocie badanych próbek. Interakcje między tymi mikroorganizmami, obejmujące konkurencję o zasoby, produkcję substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz regulację wzrostu, mają kluczowe znaczenie dla utrzymania homeostazy mikrobioty błon

śluzowych, co w konsekwencji wpływa na zdrowie gospodarza. W szczególności, bakterie z rodzaju *Staphylococcus* i *Streptococcus* stanowiły dominujący składnik mikrobioty w próbkach z nosa, nosogardzieli oraz jamy ustnej, gdzie ich obecność może przyczyniać się do rozwoju infekcji oportunistycznych, szczególnie u pacjentów z obniżoną odpornością. Ponadto, identyfikacja grzybów z rodzaju *Candida*, w tym *Candida albicans*, podkreśla ich rolę jako patogenów oportunistycznych, których nadmierny wzrost może być hamowany przez bakterie Gram-dodatnie, wspomagając tym samym utrzymanie równowagi mikrobiologicznej w badanych środowiskach.

W toku analiz, stwierdziłam również istotne trudności w jednoznacznej identyfikacji gatunków z rodzaju *Neisseria* oraz *Streptococcus*, szczególnie w przypadkach bliskopokrewnych gatunków. Powtarzane analizy tych samych próbek prowadziły do uzyskania różnych wyników identyfikacyjnych, co wskazuje na istotne wyzwania związane z precyzyjnym rozróżnianiem tych gatunków, w kontekście ich podobieństw fenotypowych i molekularnych, szczególnie w odniesieniu do zastosowania technologii MALDI-TOF MS. Zjawisko to podkreśla potrzebę dalszej optymalizacji baz danych oraz udoskonalenia metod diagnostycznych, w celu zapewnienia dokładnej identyfikacji mikroorganizmów, zwłaszcza w przypadku gatunków blisko spokrewnych, które mogą wykazywać niewielkie różnice w profilach białkowych.

Przeprowadzone analizy stanowią istotny wkład w rozwój zaawansowanych metod diagnostycznych, a także w pogłębienie wiedzy na temat roli mikrobioty błon śluzowych w utrzymaniu zdrowia oraz w patogenezie chorób infekcyjnych. Wyniki te mogą także stanowić podstawę do przyszłych badań nad udoskonaleniem narzędzi identyfikacyjnych, w tym za pomocą technologii masowej spektrometrii, w celu zwiększenia precyzji diagnoz klinicznych.

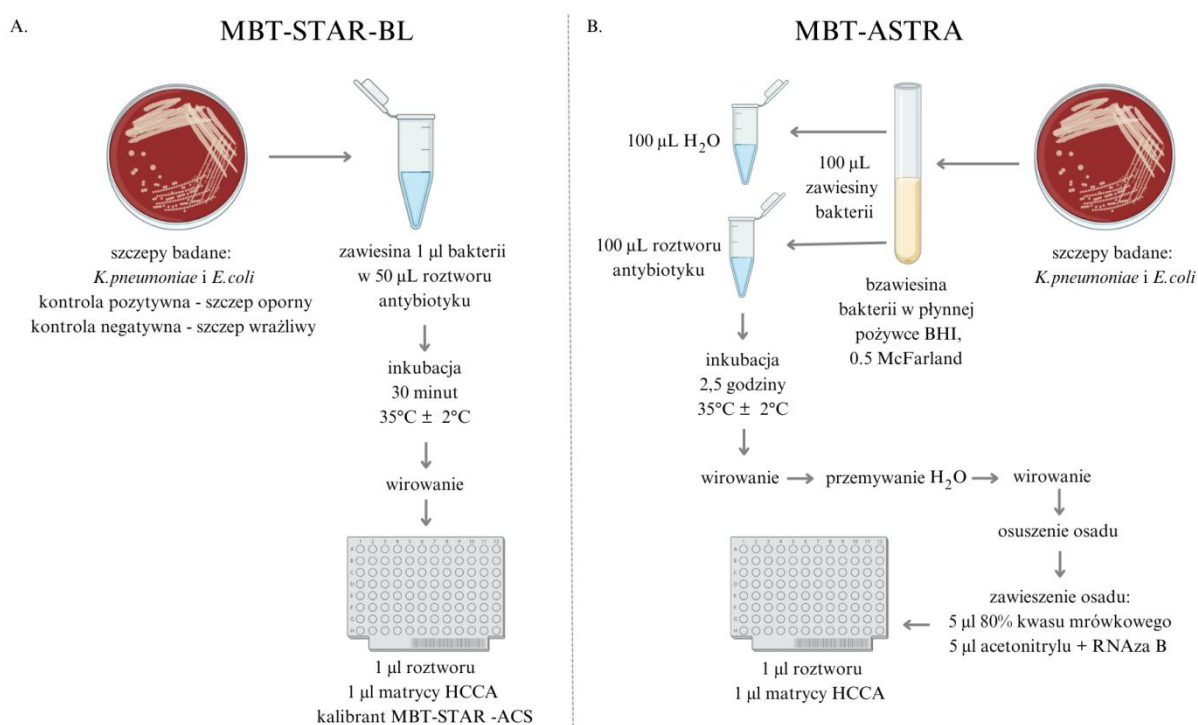
3.1.2. Badania dotyczące zastosowania testów MBT-STAR-BL oraz MBT-ASTRA, opartych na technice MALDI-TOF MS, do analizy antybiotykooporności bakterii [B2]

Materialy i metodologia

Aby sprostać wyzwaniom długotrwałych analiz, podjęłam się opracowania i doboru parametrów szybkich testów do analizy antybiotykooporności opartych na technice MALDI-TOF MS. W moich badaniach skupiałam się na zastosowaniu podejścia MBT-STAR-BL, wykorzystując dostępny komercyjnie zestaw MBT-STAR-Carba IVD, oraz metody MBT-ASTRA. W ramach prowadzonych badań przeprowadziłam walidację oraz opracowanie nowej metody detekcji antybiotykooporności z zastosowaniem spektrometrometru Zybio EXS2600 znajdującego się w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w

Toruniu, co stanowiło pionierskie podejście w tym zakresie. W celu oceny skuteczności tej metody opracowałam układ testowy do walidacji, który obejmował analizę wybranych szczepów bakteryjnych, warunki eksperymentalne oraz porównanie wyników uzyskanych na Zybio z referencyjnym systemem BrukerMicroflex LT/SH.

Układ testowy został przeze mnie zaprojektowany w oparciu o zestaw szczepów referencyjnych o znanym profilu wrażliwości lub oporności na antybiotyki, co umożliwiło ocenę zgodności uzyskanych wyników oraz szczepów klinicznych. W badaniach uwzględniłam 52 szczepy referencyjne *K. pneumoniae* pochodzące z kolekcji dr Michała Złocha z Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu, a także 14 szczepów *S. aureus* wyizolowanych w wyżej opisanych badaniach z próbek klinicznych [B1]. Próby przygotowywano zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta, a szczegóły procedury przedstawiono na Rysunku 5.



Rysunek 5. Schemat przedstawiający protokoły dla przebiegu testów: A. MBT-STAR-BL oraz B. MBT-ASTRA opartych na technice MALDI-TOF MS.

W pierwszym etapie badania oceniłam aktywność bakteryjnego enzymu beta-laktamazy wobec imipenemu dla szczepów *K. pneumoniae* za pomocą metody MBT-STAR-BL. Zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta (Rysunek 5A), zawiesiłam jedno oczko ezy (1 μ L) zawierające od 1 do 5 czystych kolonii bakteryjnych, w roztworze antybiotyku o końcowym stężeniu 0,5 mg/ml. Oprócz bakterii badanych przygotowałam także zawiesiny bakteryjne szczepu z potwierdzoną opornością (kontrola pozytywna - *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705) oraz szczepu wrażliwego na imipenem (kontrola negatywna - *E. coli* ATCC 25922). Przygotowane w ten sposób bakterie inkubowałam w temperaturze $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ przez 30 minut,

przy stałym mieszaniu z prędkością 900 obr./min, z wykorzystaniem wirówki z blokiem grzewczym Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Niemcy). Po zakończeniu inkubacji próbki odwirowałam przez 2 minuty z prędkością 13 000 obr./min w celu oddzielenia komórek od supernatantu. Następnie 1 µl supernatantu nanosiłam na stalową płytkę MALDI w dwóch powtórzeniach, suszyłam płytkę na powietrzu, a próbki pokrywałam 1 µl matrycy MBT-STAR-BL. Dodatkowo dla każdej analizy przygotowałam wzorzec masy kalibracyjnej antybiotyku, MBT STAR-ACS, dedykowany dla mas poniżej 1000 m/z , który aplikowałam w dwóch powtórzeniach na płytkę.

Analiza spektrometryczna przeprowadzona została za pomocą spektrometru mas Microflex LT/SH MALDI-TOF MS w dodatnim trybie liniowym. Widma zbierano automatycznie, korzystając z trybu AutoXecute, przy użyciu oprogramowania flexControl (BrukerDaltonik GmbH, Brema, Niemcy). Proces kalibracji przeprowadzano metodą kalibracji kwadratowej za pomocą oprogramowania flexAnalysis (BrukerDaltonik GmbH, Brema, Niemcy), co zapewniało precyzyjne dopasowanie wyników. Dla każdej próbki uzyskano łącznie cztery widma, które następnie analizowano za pomocą oprogramowania MBT BiotyperPrototype. Wyniki wyrażano jako znormalizowane wartości logRQ, które obliczano na podstawie stosunku intensywności sygnałów form zhydrolizowanego antybiotyku do sygnałów form niezhydrolizowanych. Proces normalizacji wyników uwzględniał odpowiednie kontrole negatywne i pozytywne. Wyższe wartości logRQ wskazywały na wyższy poziom hydrolizy antybiotyku przez enzymy bakteryjne. Znormalizowane wartości $\log RQ \leq 0,2$ oznaczały wyniki ujemne, wartości $\geq 0,4$ wyniki dodatnie, natomiast wartości w przedziale pomiędzy progami były klasyfikowane jako wskazujące na niejasną hydrolizę.

Dodatkowo uzyskane widma analizowano z zastosowaniem oprogramowania CloverBioSoft, we współpracy z dr Oleksandrą Pryshchepą z Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii UMK w Toruniu. Pozwoliło to na szczegółowe porównanie wyników i ich dodatkową weryfikację za pomocą alternatywnego narzędzia analitycznego.

Ze względu na kompatybilność płytek MALDI (identyczny kształt, rozmiar i rozmieszczenie spotów) pomiędzy aparatami MALDI BrukerMicroflex LT oraz Zybio EXS2600 możliwe było wykonanie analiz na dokładnie tych samych próbkach. Taka procedura pozwoliła na bezpośrednie porównanie wyników uzyskanych z obu platform, co zwiększyło wiarygodność przeprowadzonej analizy i umożliwiło ocenę zgodności między stosowanymi metodami. Widma, za pomocą spektrometru firmy Zybio, również zbierane były w trybie automatycznym za pomocą oprogramowania EX-Accuspec, a następnie kalibrowane względem zastosowanej matrycy. Celem analizy widm i detekcji antybiotykooporności zastosowałam oprogramowanie do analizy hydrolizy antybiotyków EX-AHA, które określa, czy bakteria jest

oporna na antybiotyk, poprzez wykrywanie masy cząsteczkowej produktu powstałego w wyniku inkubacji bakterii z tym antybiotykiem. W przypadku oprogramowania stosowanego w spektrometrze MALDI wartości graniczne wykrywania sygnałów odpowiednich dla zhydrolizowanych i niezhydrolizowanych form antybiotyku są stałe i nie mogą być zmieniane przez użytkownika. Z kolei oprogramowanie Zybion pozwala na manipulację wartościami m/z identyfikowanych sygnałów. W celu dostosowania metody zmodyfikowano wartości m/z sygnałów pochodzących od jonów niezhydrolizowanych $M+H = 300,40 \text{ } m/z$ oraz $M+C+H = 489,40 \text{ } m/z$, odpowiednio na $300,12 \text{ } m/z$ oraz $498,20 \text{ } m/z$. Taka modyfikacja pozwoliła na zwiększenie precyzji i dokładności detekcji, co jest szczególnie istotne w przypadku próbek o niskiej intensywności sygnału. Wynikiem takiej analizy jest informacja o obecności lub braku sygnału pochodzącego od enzymu hydrolizującego antybiotyk beta-laktamowy.

W drugim etapie przeprowadziłam analizę z zastosowaniem testu MBT-ASTRA oraz systemu MALDI Microflex LT, którego schemat przedstawiłam na Rysunku 5B. Wykonałam analizy dla *K. pneumoniae* oraz *S. aureus* wobec antybiotyków beta-laktamowych (imipenem - IMI, cefotaksym - CTX, piperacylina - PIP), chinolonowych (ciprofloksacyna - CIP, lewofloksacyna - LEV) oraz makrolidowych (azytromycyna - AZI) tylko dla *S. aureus*, gdyż *K. pneumoniae* wykazuje naturalną oporność na ten antybiotyk. Izolaty bakteryjne przechowywałam w temperaturze -80°C w próbkach Microbank (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada). Celem przywrócenia wzrostu bakterii z przechowywanej próbki bakterie zaszczerpiłam na agarze z 5% krwią baranią, a następnie inkubowałam w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Antybiotyki w formie proszku rozpuściłam w sterylnej wodzie o jakości HPLC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy), uzyskując roztwory robocze o końcowych stężeniach odpowiadających wartościom MIC dla szczepów bakteryjnych wykazujących oporność. Dane dotyczące MIC pozyskałam z bazy danych Europejskiego Komitetu ds. Testowania Wrażliwości na Leki Przeciwdrobnoustrojowe (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) [115]. Wartości stężeń końcowych przygotowanych roztworów roboczych antybiotyków przedstawiłam w Tabeli 4.

Tabela 4. Stężenia końcowe antybiotyków użytych w badaniu dla szczepów *K. pneumoniae* i *S. aureus*, odpowiadające wartościom MIC szczepów opornych.

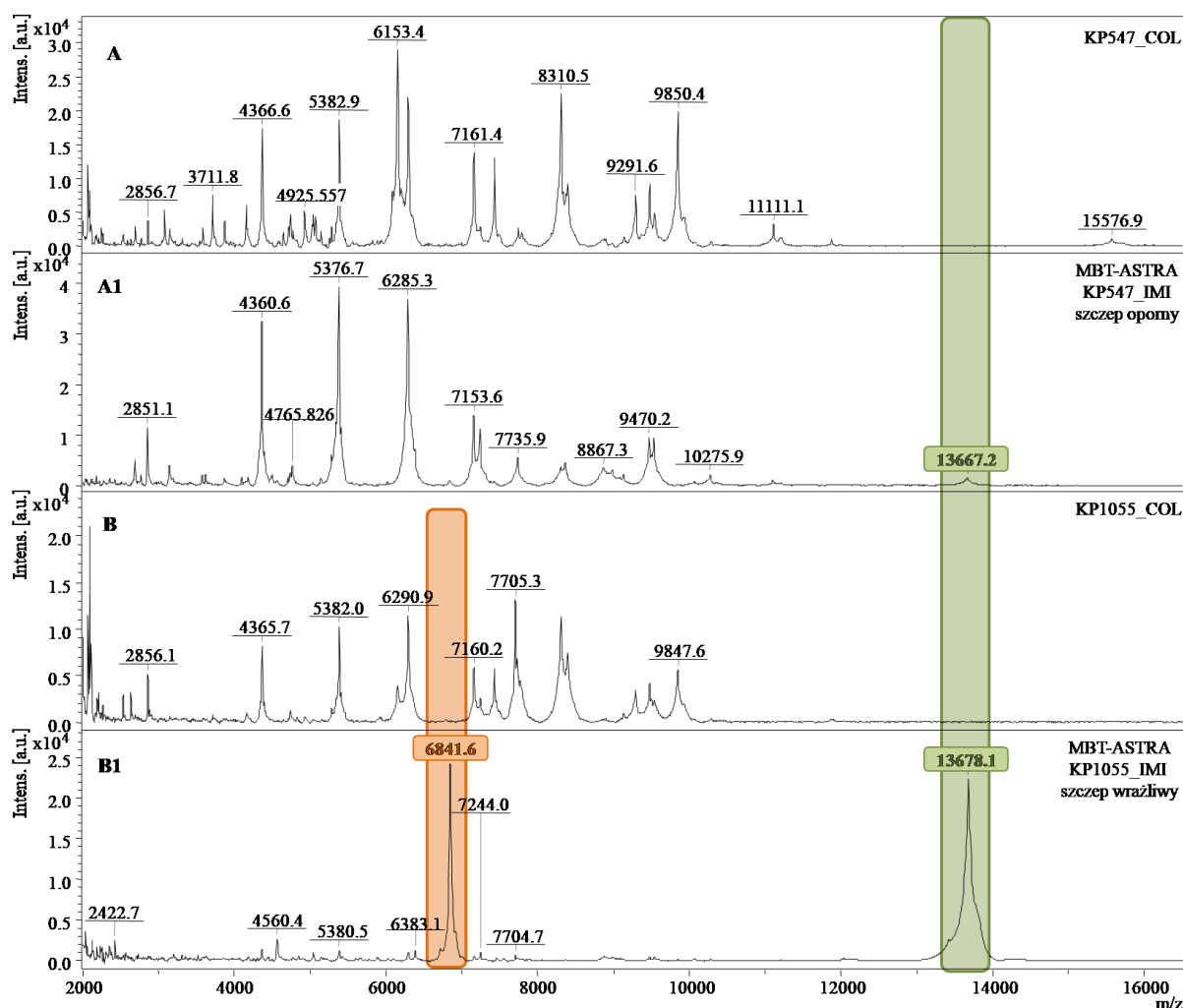
Antybiotyk	<i>K. pneumoniae</i> (mg/L)	<i>S. aureus</i> (mg/L)
Imipenem	8	4
Cefotaksym	2	4
Piperacylina	16	16
Ciprofloksacyna	0,5	4
Lewofloksacyna	2	4
Azytromycyna	-	2

Bakterie zawieszono w płynnej pożywce BHI Broth (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy) do uzyskania gęstości optycznej odpowiadającej 0,5 w skali McFarlanda. Następnie odmierzoną objętość 100 μ l przygotowanej zawiesiny przeniosłam do dwóch probówek typu Eppendorf: jednej zawierającej 100 μ l sterylnej wody (próba kontrolna), a drugiej zawierającej 100 μ l roztworu odpowiedniego antybiotyku (próba badana). Bakterie inkubowałam w 35 °C przez 2,5 godziny przy stałym mieszaniu z prędkością 700 obr./min, z wykorzystaniem wirówki z blokiem grzewczym Thermomixer. Po tym czasie próby zwirowałam (5 min, 14000 obr./min), przemyłam wodą, a następnie wysuszyłam otrzymany osad na powietrzu. Następnie do każdej z probówek dodałam równe objętości kwasu mrówkowego oraz acetonitrylu z dodatkiem wzorca wewnętrznego, którym, według zaleceń producenta, jest RNAza B.

Standard wewnętrzny w analizie MBT-ASTRA odgrywa kluczową rolę w zapewnieniu dokładności i wiarygodności wyników, kompensując zmienność warunków eksperymentalnych oraz różnice w wydajności analitycznej. Wykorzystanie RNAzy B jako standardu wewnętrznego wynika z jej wysokiej stabilności chemicznej i fizycznej, co czyni ją idealnym odniesieniem w procesach analitycznych. Białko to generuje charakterystyczne i dobrze zdefiniowane widmo w technice MALDI-TOF MS, umożliwiając precyzyjną kalibrację urządzenia i porównywanie wyników między próbkami. Dodatkowo RNAza B, dzięki swojej neutralności w analizach mikrobiologicznych, nie zakłóca wyników badanych próbek, a jej dostępność i niski koszt czynią ją praktycznym wyborem w zastosowaniach rutynowych. W efekcie wykorzystanie RNAzy B znacząco zwiększa powtarzalność i jakość wyników, co ma szczególne znaczenie w kontekście badań naukowych i diagnostyki klinicznej.

Wyniki badań

W przeprowadzonych badaniach skupiałam się na ocenie antybiotykooporności oraz identyfikacji charakterystycznych sygnatur białkowych w próbkach poddanych działaniu antybiotyku. W tym celu uzyskałam widma masowe, które następnie porównałam pod kątem obecności i intensywności wybranych pików. Analiza pozwoliła mi określić różnice pomiędzy badanymi próbkami oraz ocenić skuteczność zastosowanego podejścia w detekcji mechanizmów oporności. Poniżej, na *Rysunku 6*, przedstawiłam porównanie uzyskanych widm dla przykładowych szczepów oraz ich interpretację w kontekście mechanizmów działania imipenemu i bakteryjnych mechanizmów obronnych.

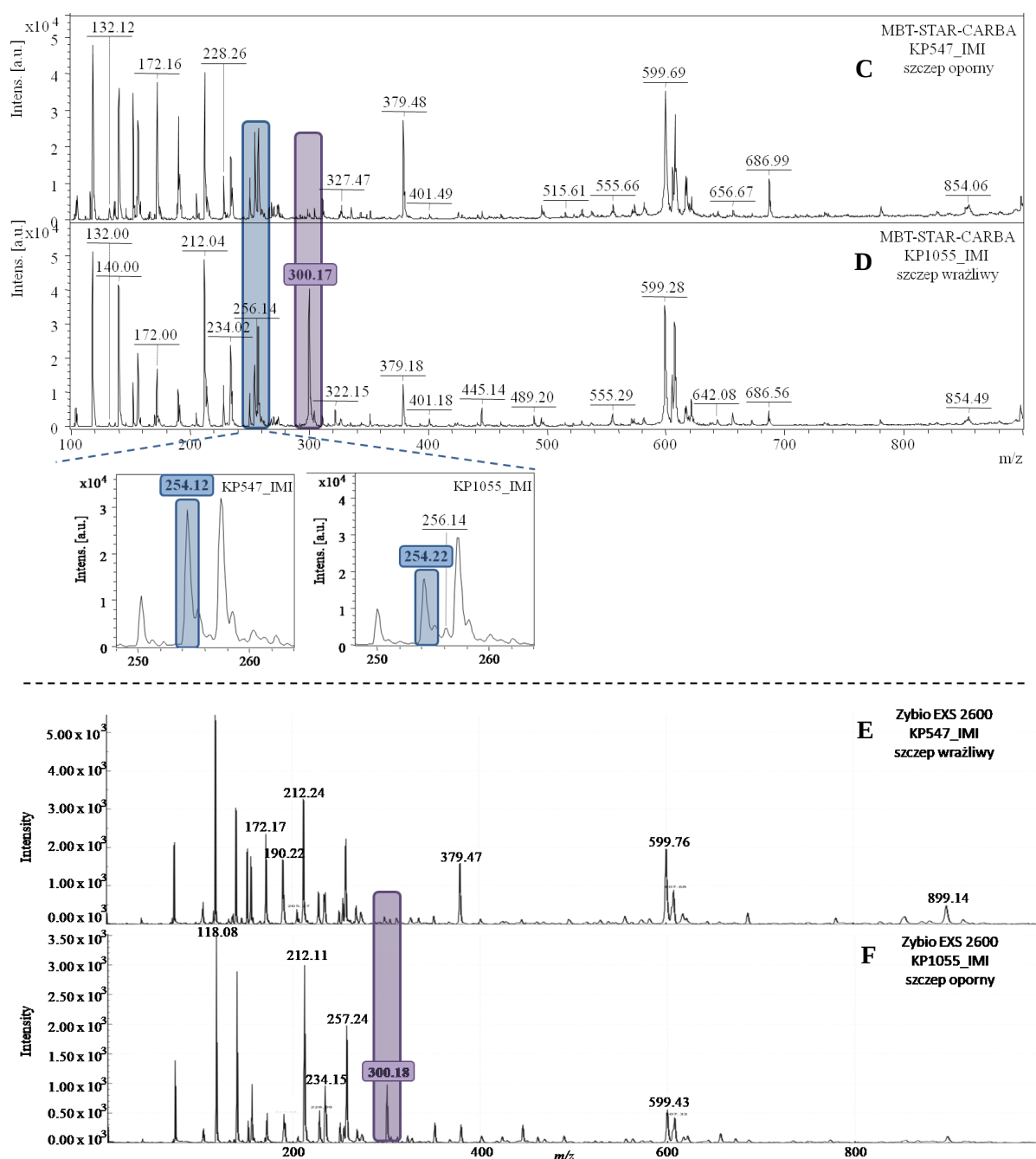


Rysunek 6. Widma uzyskane dla *K. pneumoniae* po inkubacji z imipenemem dla testu MBT-STAR-CARBA (A1, B1) w równaniu do widm referencyjnych uzyskanych dla bakterii nie poddanej działaniu antybiotyku (A, B)

Widma A1 i B1 uzyskałam dla podejścia MBT-ASTRA, które pozwala na ocenę profilu białkowego bakterii i identyfikację zmian związanych z działaniem antybiotyku. Widma A i B na Rysunku 6 to widma referencyjne uzyskane dla bakterii bez dodatku antybiotyku. Porównując widmo referencyjne A z widmem uzyskanym po inkubacji z antybiotykiem bakterii odpornej A1, można wykazać liczne intensywne sygnały w zakresie od 2000 do 10000 m/z , co odpowiada obecności białek bakteryjnych. Brak istotnych zmian w profilu białkowym wskazuje na brak odpowiedzi komórkowej na imipenem, co stanowi potwierdzenie oporności bakterii na ten antybiotyk. Zanik kilku sygnałów, takich jak np. 8310,5 m/z czy 9850,4 m/z , co może sugerować obniżony metabolizm komórki bakteryjnej. Tego typu zmiany w widmach są często związane z adaptacyjnymi odpowiedziami bakterii na działanie antybiotyku, szczególnie w przypadku bakterii opornych, które zmieniają swoje mechanizmy metaboliczne, aby zminimalizować skutki działania leku. Zanik tych sygnałów może wskazywać na zmniejszoną produkcję określonych białek lub zredukowaną aktywność enzymatyczną, co jest charakterystyczne dla oporności, w której bakteria przechodzi w stan "spoczynkowy" lub

obniża tempo metabolizmu, aby przetrwać w obecności antybiotyku. Takie zmiany w profilach białkowych mogą być wykorzystywane jako wskaźnik skuteczności antybiotyków oraz w badaniach mechanizmów oporności na leki.

Z kolei widmo B1 odpowiadające szczepowi wrażliwemu, wykazuje znaczące zmniejszenie liczby sygnałów, względem widma referencyjnego oznaczonego jako B, co wskazuje na degradację białek w wyniku działania imipenemu. Dominującym sygnałem w tym widmie jest pik o wartości 6841,6 m/z , który prawdopodobnie odzwierciedla obecność lipoproteiny, co ustaliłam na podstawie analizy porównawczej z danymi dostępnymi w bazie UniProt. Obecność sygnału lipoproteiny może sugerować, że błona zewnętrzna bakterii pozostaje w dużej mierze nienaruszona, co koreluje z jej wrażliwością na imipenem, wskazując na brak aktywności enzymatycznej rozkładającej karbapenemy [116]. Brak całkowitej lizy komórkowej może natomiast wskazywać na ograniczoną degradację błony zewnętrznej, pomimo oddziaływania antybiotyku na ścianę komórkową. Dodatkowo na obu widmach obserwuje się charakterystyczny sygnał w rejonie ~ 14000 m/z , pochodzący od standardu wewnętrznego RNAzy B. Standardy wewnętrzne, takie jak RNaza B, są stosowane w spektrometrii mas w celu zapewnienia precyzyjnej kalibracji wartości m/z , co pozwala na kompensację ewentualnych odchyłek instrumentalnych. Dodatkowo umożliwiają normalizację intensywności sygnałów, co jest kluczowe przy porównywaniu wyników różnych analiz, oraz monitorowanie jakości pomiaru, wskazując, czy analiza została przeprowadzona prawidłowo. Obecność sygnału standardu wewnętrznego w widmie potwierdza poprawność uzyskanych danych i pozwala na bardziej wiarygodną interpretację wyników, co stanowi potwierdzenie prawidłowości przeprowadzonej analizy [98].



Rysunek 7. Widma dla bakterii *K. pneumoniae* uzyskane dla metody MBT-STAR-BL za pomocą spektrometru Bruker Microflex LT (widma C, D) oraz Zybio EXS 2600 (widma E, F).

Powyższe widma zostały uzyskane przy zastosowaniu testu MBT-STAR-BL, której głównym celem jest identyfikacja produktów degradacji imipenemu, stanowiących wskaźnik obecności enzymów beta-laktamowych, takich jak karbapenemazy oraz spektrometru Bruker microflex LT (widma C i D) oraz Zybio EXS 2600 (widma E i F) (Rysunek 7). Analizowane sygnały w przypadku obu spektrometrów mieszczą się w zakresie niskoczęstotkowym 100–1000 m/z .

Analiza widm wykazała istotne różnice w profilach m/z , wskazujące na aktywność enzymatyczną charakterystyczną dla bakterii produkujących karbapenemazy. W widmie szczepu wrażliwego (widmo D i E) obserwowany jest sygnał o $m/z \sim 300.20$, odpowiadający

nienaruszonemu imipenemowi [101]. W widmie szczepu opornego (widmo C i E) intensywność tego sygnału ulega znacznemu osłabieniu lub całkowitemu zanikowi, co jednoznacznie wskazuje na enzymatyczną hydrolizę antybiotyku. Jednocześnie na widmie bakterii opornej pojawia się intensywniejszy sygnał pochodzący od produktu hydrolizy imipenemu o $m/z \sim 254$, co potwierdza aktywność enzymatyczną karbapenemaz. Sygnał ten został przezem nie zidentyfikowany jedynie na widmie uzyskanym za pomocą spektrometru Bruker microflex LT. Należy również zaznaczyć, że obecność sygnału o $m/z \sim 254$ w widmie szczepu wrażliwego może wynikać ze spontanicznej hydrolizy imipenemu w warunkach analizy [117]. Niestabilność tego antybiotyku beta-laktamowego w środowisku wodnym może prowadzić do jego abiotycznego rozpadu, skutkując obecnością produktów degradacji niezależnie od działania enzymów bakteryjnych. Jednak znacznie większa intensywność tego sygnału w widmie szczepu opornego wskazuje, że w tym przypadku jego występowanie jest efektem katalitycznej hydrolizy przez karbapenemazy [118].

W Tabeli 5 przedstawiłam wyniki analiz antybiotykooporności dla *K. pneumoniae* wobec imipenemu i porównanie wszystkich zastosowanych metod.

Tabela 5. Zestawienie uzyskanych wyników dla oceny antybiotykooporności *K. pneumoniae* wobec imipenemu.

<i>K. pneumoniae</i>	Mechanizm oporności	Zybio	CLOVER BioSoft	MBT-STAR-BL	MBT-ASTRA
				logRQ	GR
1M	OXA-48	niepewny	pozytywny	1,730	1,544
2M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,450	0,010
3M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,318	0,790
4M	OXA-48	nie istnieje	niepewny	0,950	0,006
5M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,840	0,086
6M	KPC-3	istnieje	pozytywny	1,985	1,492
51	OXA-245	istnieje	pozytywny	1,593	0,446
52	OXA-245	istnieje	pozytywny	1,663	0,009
66	IMP-22-like	istnieje	pozytywny	2,158	1,223
71	IMP-22-like	istnieje	pozytywny	1,408	0,993
90	VIM	istnieje	pozytywny	0,980	1,084
91	VIM	nie istnieje	pozytywny	1,148	1,084
92	VIM	istnieje	pozytywny	1,733	1,146
94	VIM	istnieje	pozytywny	1,170	0,554
130	CTX-M-15	nie istnieje	negatywny	-0,083	0,006
132	CTX-M-15	nie istnieje	negatywny	0,058	0,004
133	CTX-M-15	nie istnieje	negatywny	-0,280	0,006
134	NDM-7	istnieje	pozytywny	1,335	0,881
135	NDM-7	istnieje	pozytywny	1,753	0,856
261M	OXA-48	niepewny	pozytywny	0,685	0,010
262M	OXA-48	nie istnieje	niepewny	0,298	0,010

268M	OXA-48	istnieje	pozytywny	0,863	Niepewny
271M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,808	1,061
306M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,248	Niepewny
369M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,718	0,698
372M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,650	0,021
398M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,455	0,007
409M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,460	0,920
429M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,910	1,461
440M	OXA-48	istnieje	pozytywny	1,460	0,008
539	KPC-2	istnieje	pozytywny	2,045	0,900
540	KPC-2	istnieje	pozytywny	2,120	1,147
542	KPC-2	istnieje	pozytywny	1,765	1,080
547	KPC-3	istnieje	pozytywny	1,430	0,794
548	KPC-3	istnieje	pozytywny	1,315	0,988
1024	-	nie istnieje	negatywny	-0,233	0,006
1027	-	nie istnieje	negatywny	0,070	0,006
1028	-	nie istnieje	negatywny	-0,088	0,129
1030	-	nie istnieje	negatywny	-0,173	0,018
1031	-	nie istnieje	niepewny	0,225	0,005
1049	-	nie istnieje	negatywny	-0,330	0,060
1050	-	nie istnieje	negatywny	-0,060	0,018
1053	-	nie istnieje	negatywny	-0,018	0,005
1055	-	nie istnieje	negatywny	-0,190	0,006
1056	-	nie istnieje	negatywny	-0,068	0,010
A	ESBL	nie istnieje	negatywny	-0,153	0,009
B	KPC	istnieje	pozytywny	1,750	1,060
C	NDM, OXA-48	istnieje	pozytywny	1,320	1,487
D	NDM	istnieje	pozytywny	1,448	0,861
E		nie istnieje	negatywny	-0,295	0,006

A - KP_ESBL; B - KP_KPC_BAA_1705; C - KP_NDM_OXA48; D - KP_NDM; E - KP_ATCC_1031

2,158
pozytywny
enzym istnieje
0,900
negatywny
enzym nie istnieje
-0,330

OXA – Oxacillinaza (ang. *Oxacillinase*); **KPC** - *K. pneumoniae*produkująca karbapenemazy(ang. *K. pneumoniaecarbapenemase*); **BAA** – aktywność beta-laktamazy (ang. *Beta-lactamase Activity*); **IMP** – Imipenemaza (ang. *Imipenemase*); **VIM** - beta-laktamazametaloenzymatyczna kodowana przez integron Verona (ang. *Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase*); **CTX-M** - Cefotaksymaza z Monachium (ang. *Cefotaximase-Munich*); **NDM** - Metallo-beta-laktamaza Nowego Delhi (ang. *New Delhi Metallo-beta-lactamase*); **ATCC** – American Type Culture Collection; **ESBL** - beta-laktamazy o rozszerzonymspektrumdziałania (ang. *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*)

Przeprowadzona przeze mnie analiza wyników dotyczących szczepów *K. pneumoniae* z wykorzystaniem metod Zybio, CLOVER BioSoft, MBT-STAR-BL oraz MBT-ASTRA pozwala na ocenę ich zgodności, różnic w interpretacji wyników oraz powiązania z obecnością genów oporności i mechanizmów beta-laktamaz. Należy dodać, że jako jedna z pierwszych wykazałam możliwość zastosowania spektrometru MALDI produkowanego przez firmę Zybio

do analizy antybiotykooporności. Obecnie w literaturze naukowej istnieje jedynie jedna pozycja przedstawiająca zastosowanie tego urządzenia w analizie mechanizmów oporności na antybiotyki [119]. Wyniki wskazują na dużą spójność metod w klasyfikacji szczepów jako opornych lub wrażliwych, szczególnie w odniesieniu do genotypów wykazujących obecność enzymów takich jak OXA-48, KPC czy NDM.

Metoda Zybio bazuje na detekcji enzymów beta-laktamaz, gdzie obecność enzymu („enzym istnieje”) jednoznacznie wskazuje na oporność, natomiast jego brak na wrażliwość szczepu. Wyniki tej metody są w dużej mierze zgodne z metodą CLOVER BioSoft, która klasyfikuje szczepy na podstawie wyników pozytywnych (oporność) lub negatywnych (wrażliwość). Przykładem jest szczep 2M z mechanizmem OXA-48, który w obu metodach został jednoznacznie uznany za oporny. W niektórych przypadkach Zybio wskazuje wyniki niepewne, co może wynikać z granicznej detekcji enzymu lub niejednoznacznych wyników analitycznych, jak w przypadku szczepu 1M, gdzie wynik różni się od jednoznacznej klasyfikacji w CLOVER BioSoft.

Metody MBT-STAR-BL i MBT-ASTRA, bazujące na wartościach logRQ i GR, pozwalają na bardziej szczegółową interpretację oporności. Wartości logRQ powyżej 0,4 oraz GR powyżej 0,4 wskazują na oporność, natomiast wartości poniżej 0,2 na wrażliwość. Wyniki graniczne (pomiędzy 0,2 a 0,4) są jednak trudniejsze do interpretacji, co prowadzi do różnic między metodami, szczególnie w przypadkach takich jak szczep 261M (OXA-48), który w MBT-STAR-BL uzyskał logRQ=0,685 (oporność), podczas gdy wynik GR=0,010 w MBT-ASTRA sugeruje brak jednoznacznej klasyfikacji. Przykłady takie podkreślają potencjalne ograniczenia tych metod w przypadku wyników granicznych, co może wymagać potwierdzenia za pomocą dodatkowych testów genotypowych.

Wszystkie metody wykazują dużą zgodność w przypadkach szczepów wysoce opornych, takich jak te posiadające mechanizmy KPC-3 (np. szczep 6M), gdzie wartości logRQ=1,985 i GR=1,492 jednoznacznie wskazują na oporność. Podobnie w przypadku mechanizmów NDM, jak u szczepów 134 i 135, obecność enzymu oraz wyniki pozytywne w CLOVER BioSoft potwierdzają fenotypową oporność na karbapenemy. W przypadku szczepów, dla których brak jest genów oporności (np. szczepy 1024 i 1030), wszystkie metody zgodnie klasyfikują je jako wrażliwe, co jest widoczne zarówno w wynikach negatywnych CLOVER BioSoft, jak i w wartościach logRQ poniżej 0,2 oraz GR poniżej 0,4.

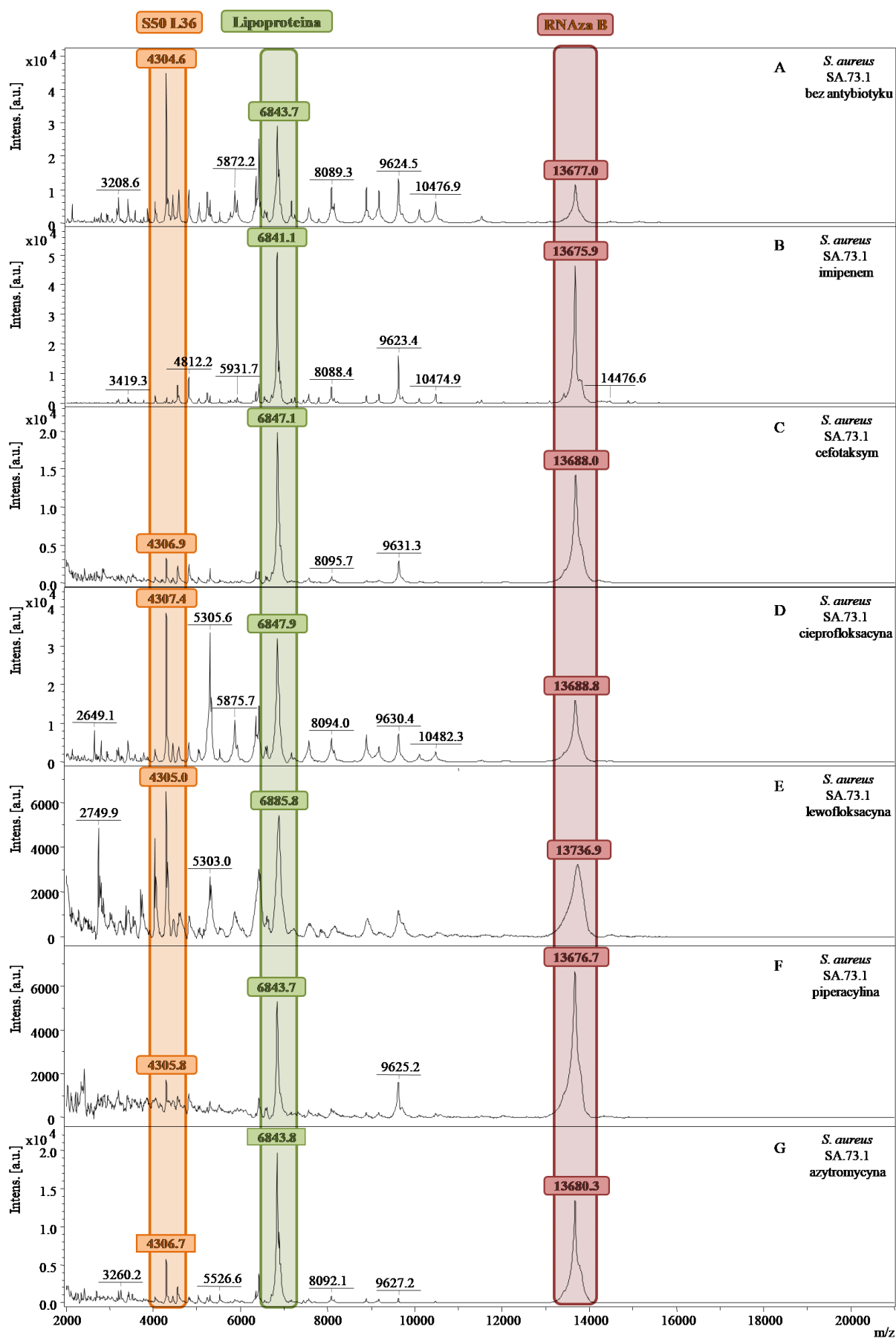
Różnice między metodami uwidaczniają się głównie w przypadkach wyników granicznych lub niepewnych. Metoda CLOVER BioSoft nie przewiduje wyników niepewnych, co odróżnia ją od Zybio oraz MBT-ASTRA, gdzie tego typu klasyfikacja występuje. MBT-STAR-BL i MBT-ASTRA wyróżniają się większą szczegółowością w analizie fenotypowej,

jednak różnice w przyjętych progach klasyfikacji mogą prowadzić do rozbieżności w ocenie wyników. Przykładem jest szczep 369M (OXA-48), który w MBT-STAR-BL uzyskał $\log RQ = 1,718$ (oporność), natomiast w MBT-ASTRA $GR = 0,698$, co sugeruje niższy poziom oporności w porównaniu z wynikami $\log RQ$.

Związek wyników z obecnością genów oporności jest wyraźny. Szczepy wykazujące obecność genów OXA-48, KPC-3 czy NDM są konsekwentnie klasyfikowane jako odporne we wszystkich metodach, co potwierdza zależność pomiędzy genotypem a fenotypem oporności. Na przykład szczep 6M z mechanizmem KPC-3 uzyskał pozytywne wyniki w CLOVER BioSoft, wysokie wartości $\log RQ$ oraz GR , co jednoznacznie wskazuje na oporność. Podobnie w przypadku szczepów NDM-7, takich jak 134 i 135, wyniki wszystkich metod są spójne i jednoznaczne.

Zastosowane metody wykazują wysoką zgodność w klasyfikacji szczepów opornych, szczególnie w przypadku szczepów z potwierdzonymi genami oporności. MBT-STAR-BL i MBT-ASTRA, dzięki szczegółowej analizie fenotypowej, oferują większą precyzję w ocenie oporności, choć różnice w interpretacji wyników granicznych podkreślają konieczność komplementarnych testów genotypowych. Metody Zybion i CLOVER BioSoft są prostsze w interpretacji, ale mogą być mniej precyzyjne w przypadkach wyników niejednoznacznych. Podsumowując, zastosowanie różnych technik pozwala na uzyskanie pełniejszego obrazu fenotypu oporności i podkreśla znaczenie wielokierunkowego podejścia w diagnostyce mikrobiologicznej.

Na Rysunku 7 przedstawiłam widma uzyskane techniką MALDI-TOF MS dla testu MBT-ASTRA ilustrujące profile masowe szczepu *S. aureus* SA.73.1 hodowanego zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w obecności antybiotyków o zróżnicowanych mechanizmach działania, obejmujących imipenem, cefoksytynę, piperacylinę, cyprofloksacynę, lewofloksacynę oraz azytromycynę. Analiza jonów molekularnych pozwala na wyróżnienie kilku charakterystycznych sygnałów m/z , które można przypisać konkretnym biomolekułom występującym w komórkach bakteryjnych.



Rysunek 7. Widma MS dla *S. aureus* uzyskanych po 2,5 godzinnej inkubacji A-bez antybiotyku, B-z imipenemem, C-z cefotaksymem, D-z ciprofloksacyną, E-z lewofloksacyną, F-z piperacyliną, G-z azytromycyną.

Analizowane widma charakteryzują się obecnością trzech kluczowych grup sygnałów, które na podstawie bazy danych UniProt zostały przeze mnie przypisane do określonych klas molekuł: sygnały w zakresie $m/z \sim 4306\text{--}4396$, to przypuszczalnie pochodzi od białka dużej podjednostki rybosomalnej L36, którego znacznie obniżona intensywność lub zanik, jak w przypadku widma B, C, F i G, pod wpływem działania antybiotyku stanowi istotny wskaźnik zakłócenia procesów translacyjnych oraz globalnych zaburzeń metabolizmu białkowego komórki bakteryjnej, co może sugerować podatność bakterii na stosowane antybiotyki. Sygnały w zakresie $m/z \sim 6841\text{--}6885$, które zostały zidentyfikowane jako lipoproteiny, prawdopodobnie pochodzą od bakteryjnych lipoprotein. Ich obecność sugeruje, że są to białka związane z błoną komórkową *S. aureus*. Co istotne, w szczepach wrażliwych na antybiotyk obserwowany jest zanik wszystkich innych sygnałów, a jedynym widocznym pozostaje ten w zakresie $m/z \sim 6841\text{--}6885$. Może to wynikać z metabolicznego efektu antybiotyku, zahamowania syntezy innych białek lub degradacji komórek, przez co w widmie dominuje sygnał tej konkretnej lipoproteiny [120]. Aby potwierdzić to przypuszczenie, należałoby przeprowadzić analizę LC-MS/MS i sprawdzić ekspresję białek w warunkach z i bez antybiotyku. Ostatnie sygnały, zaznaczone na bordowo, odpowiadają sygnałowi standardu wewnętrznego – RNazy B.

Co więcej, zastosowanie piperacyliny i lewofloksacyny przeciwko szczepom *S. aureus* skutkowało zmniejszoną intensywnością sygnałów uzyskiwanych na widmach masowych. Oba te antybiotyki mają silne działanie bakteriobójcze, które prowadzi do lizy bakterii, syntezowane białka bakteryjne są ograniczane, co prowadzi do zmniejszenia liczby molekuł zidentyfikowanych w spektrometrii masowej [28,38,121].

Oprogramowanie MBT-ASTRA wykorzystuje algorytm oparty na analizie obszaru pod krzywą dla zakresu m/z 2000 – 10 000, który stanowi miarę ilościową sygnału generowanego przez komórki bakteryjne. Wartości AUC uzyskane dla próbek inkubowanych w obecności i braku antybiotyku są poddawane automatycznej normalizacji względem kontroli wewnętrznej, co pozwala na eliminację zmienności wyników wynikającej z parametrów instrumentalnych lub warunków przygotowania próbki. Istotnym elementem analizy jest obliczenie względnego współczynnika wzrostu (ang. *Growth Ratio*, GR), który wyznacza stosunek wartości AUC dla warunków z i bez antybiotyku. Wstępne analizy wykazały, że wartość $GR = 0,4$ stanowi próg klasyfikacyjny, pozwalający na odróżnienie izolatów wrażliwych od opornych [98,102].

Walidacja metody obejmowała porównanie wyników uzyskanych z MBT-ASTRA z wynikami testu krążkowego. Przeprowadzona analiza wykazała wysoką zgodność między wynikami uzyskanymi metodą spektrometrii mas a metodami referencyjnymi, jednak wymagała optymalizacji algorytmów przetwarzania danych dla różnych szczepów bakteryjnych oraz klas antybiotyków [98].

W Tabeli 6A i 6B zamieściłam wartości GR dla wszystkich stosowanych antybiotyków odpowiednio dla *K. pneumoniae* i *S. aureus*.

Tabela 6.Wartości GR obliczone dla bakterii *K. pneumoniae* (A) oraz *S. aureus* (B) po inkubacji z badanymi antybiotykami.

A.	Antybiotyk				
Szczep bakteryjny	IMI	CEF	CIP	LEV	PIP
KP_ATCC_1031	0,01	0,80	0,02	0,01	0,67
KP_ESBL	0,01	1,41	1,47	0,74	0,87
KP_KPC_BAA_1705	1,06	1,02	0,71	0,81	0,87
KP1024	0,01	0,44	1,25	0,03	1,22
KP1027	0,01	0,85	0,85	0,03	0,72
KP1028	0,13	0,98	1,09	0,43	1,23
KP1030	0,02	0,22	0,88	0,12	0,71
KP1031	0,02	0,92	1,12	1,04	0,02
KP1032	0,00	0,68	0,25	0,03	0,47
KP1033	0,00	0,07	0,05	0,08	0,67
KP1049	0,06	0,78	0,58	0,03	0,49
KP1050	0,02	0,68	0,85	0,49	0,95
KP1052	0,01	0,55	1,50	1,03	1,10
KP1053	0,01	0,58	0,81	0,59	1,41
KP1054	0,01	1,63	1,04	0,35	0,26
KP1055	0,01	0,20	0,72	0,40	0,89
KP1056	0,01	0,19	2,06	0,24	2,53
KP130	0,01	1,01	1,00	1,11	0,81
KP132	0,00	1,34	0,99	0,79	1,04
KP133	0,01	0,01	1,22	1,44	0,85
KP134	0,88	1,36	0,97	1,18	0,22
KP135	0,86	1,30	1,37	1,25	0,34
KP1M	1,54	0,84	1,00	0,98	1,27
KP268M		1,05	1,04	1,26	1,09
KP271M	1,06	1,02	0,64	1,42	0,84
KP306M		1,52	1,34	1,61	1,63
KP369M	0,67	0,88	0,91	0,69	0,78
KP372M	0,02	1,21	1,15	1,26	1,10
KP398M	0,01	1,45	1,15	1,51	1,41
KP3M	0,79	0,72	1,61	1,08	1,16
KP409M	0,92	0,97	0,89	0,82	1,13
KP429M	1,46	1,61	1,51	1,07	0,99
KP440M	0,01	1,36	1,30	1,48	1,34
KP4M	0,01	1,26	1,39	1,60	1,36
KP50	0,04	1,14	1,32	1,01	1,50
KP51	0,45	0,82	0,74	0,73	0,86
KP52	0,01	0,15	2,04	1,89	1,68
KP539	0,90	0,59	0,81	0,85	0,78
KP540	1,15	0,19	1,23	0,93	1,11
KP542	1,08	0,80	1,13	0,76	0,92
KP547	0,79	0,63	0,87	0,86	0,70
KP548	0,99	1,65	1,69	1,88	1,38

KP5M	0,09	0,38	0,62	1,12	0,91
KP66	1,22	0,51	1,08	1,70	1,09
KP6M	1,49	0,57	1,61	1,32	1,04
KP71	0,99	0,98	1,33	0,53	1,00
KP90	1,08	0,74	0,77	0,93	1,08
KP91	0,88	0,87	1,15	1,22	0,95
KP92	1,15	0,35	1,09	0,66	1,30
KP94	0,55	1,52	1,51	1,31	1,160

2,53 1,23 0,00

brak wyniku

KP – *K. pneumoniae*; **ATCC** – American Type Culture Collection; **ESBL** -beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ang. *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*); **KPC** – *K. pneumoniae* produkująca karbapenemazy(ang. *K. pneumoniae carbapenemase*); **BAA** – aktywność beta-laktamazy (ang. *beta-lactamase Activity*)

B.	Antybiotyk					
Szczep bakteryjny	IMI	CEF	CIP	LEV	PIP	AZI
SA_19S	0,23	0,13	0,93	1,87	0,19	0,66
SA_20_1	0,06	0,04	0,18	0,09	0,08	0,37
SA_20_3	0,02	0,03		0,65	0,69	0,13
SA_20S	0,11	0,21	0,73	2,07	0,66	0,64
SA_21S	0,012	0,03	0,88	1,04	0,07	0,12
SA_24_4	0,03	0,02	0,63	0,30	0,08	0,32
SA_24S	0,71	1,49	0,98		0,58	0,43
SA_33S	0,12	0,04	0,65	1,77	0,12	5,79
SA_61_3	0,01	0,20	1,41	1,58	0,17	0,78
SA_71_2	0,02	0,03	0,72	1,98	0,10	0,03
SA_71S	0,02	0,03	0,30	0,64	0,66	0,04
SA_73_1	0,04	0,04	1,24	1,81	0,10	0,03
SA_79_1	0,02	0,06	0,26	0,31	0,02	0,18
SA_81_1	0,03	0,05	0,30	0,96	0,43	0,56
SA_81_3	0,07	0,08	0,57	0,26	0,07	0,32
SA_81S	0,01	0,12	0,69	17,55	0,15	0,05
SA_ATCC1026	0,37	1,62	0,56	3,52	2,67	1,14
SA_MRSA_1		1,28	1,78	2,57	3,10	2,05
SA_MRSA_2		0,11	1,10	1,07	0,51	2,21

17,56 3,52 0,01

brak wyniku

SA – *S. aureus*; **ATCC** – American Type Culture Collection; **MRSA** – *S. aureus* opornym na metycylinę (ang. *Methicillin-Resistant S. aureus*); **_1, _2** – szczep wyizolowany z nosogardzieli; **_3, _4** – szczep wyizolowany z nosa; **S** – szczep wyizolowany ze śliny

Uzyskane wyniki analizy fenotypowej z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI zostały zweryfikowane za pomocą testu krążkowego, który stanowi klasyczną metodę oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki. Test krążkowy, oparty na metodzie dyfuzyjnej Kirby-Bauera [122], umożliwia ocenę stref zahamowania wzrostu wokół krążków nasączonych określonymi antybiotykami, co pozwala na porównanie wyników z uzyskanymi metodami spektrometrycznymi. Zbieżność wyników obu metod potwierdza wiarygodność zastosowania spektrometru MALDI do analizy antybiotykooporności, jednocześnie podkreślając jego potencjał jako szybszej i bardziej zaawansowanej alternatywy dla testów konwencjonalnych.

Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonej analizy wskazują na wysoką skuteczność techniki MALDI-TOF MS w identyfikacji mikroorganizmów oraz analizy antybiotykooporności przy użyciu różnorodnych narzędzi, takich jak MBT-STAR-BL, MBT-ASTRA, CLOVER BioSoft i spektrometr Zybio. Jako jedna z pierwszych, niezależnie od badaczy z Austrii, przeprowadziłam szczegółowe analizy antybiotykooporności u *K. pneumoniae* na imipenem z zastosowaniem spektrometru Zybio EXS2600 oraz porównałam otrzymane wyniki z wynikami testu MBT-STAR-BL. Co więcej, jako pierwsza porównałam wyniki uzyskane na Zybio z testem MBT-ASTRA oraz oprogramowaniem CLOVERBioSoft. Jako pierwsza również zastosowałam test MBT-ASTRA do identyfikacji antybiotykooporności u *S. aureus*, w tym szczepów opornych na metycylinę. Moje badania były również pionierskie pod względem analizy antybiotykooporności na lewofloksacynę i azytromycynę u tych bakterii z wykorzystaniem tego innowacyjnego narzędzia. Moje badania stanowią cenny wkład w rozwój metod diagnostycznych służących do monitorowania oporności bakterii nie tylko na antybiotyki beta-laktamowe, co ma kluczowe znaczenie w walce z zakażeniami wielolekoopornymi.

W zakresie analizy antybiotykooporności, zastosowanie narzędzi takich jak MBT-STAR-BL i MBT-ASTRA umożliwiło ocenę fenotypowej aktywności enzymatycznej szczepów opornych na antybiotyki, takich jak karbapenemy. MBT-STAR-BL, dzięki wartościom logRQ, pozwolił na dokładną klasyfikację szczepów jako wrażliwych, opornych lub o niepewnym statusie. Z kolei MBT-ASTRA, wykorzystując współczynnik wzrostu wykazał wysoką zgodność w identyfikacji szczepów opornych, przy czym w przypadkach granicznych wymagane było potwierdzenie wyników innymi metodami. Jako pierwsza wykazałam możliwość zastosowanie tego podejścia do analizy antybiotykooporności *S. aureus* w tym szczepów MRSA. Test MBT-ASTRA został również niedawno zastosowany w kilku badaniach mających na celu wykrywanie oporności bakterii zarówno w izolatach klinicznych, jak i

bezpośrednio w dodatnich posiewach krwi [102,123]. Analizie poddano bakterie Gram-ujemne, takie jak *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* sp. oraz *Acinetobacter* sp., w połączeniu z różnymi klasami antybiotyków, w tym penicylinami, cefalosporynami, karbapenemami, fluorochinolonami i aminoglikozydami [98,124].

CLOVER BioSoft, dzięki swojej prostocie interpretacyjnej, dostarczył wyników zgodnych z narzędziami fenotypowymi, ale brak wyników niepewnych wskazuje na mniejszą szczegółowość analizy. Spektrometr Zybio okazał się obiecującą alternatywą w analizie antybiotykooporności, jednak wyniki wskazały na pewne ograniczenia. Uitz i współpracownicy w swoich badaniach skupili się na analizie bakterii *Enterobacterales* opornych na karbapenemazy porównując testy firmy Bruker oraz te produkowane przez Zybio [119]. Badacze wskazują na istotne różnice między systemami, a test MBT-STAR dał mniej fałszywie dodatnich wyników, co również potwierdzają wyniki badań zamieszczone w niniejszej rozprawie. Wykrycie enzymów o niskiej aktywności, takich jak OXA-48, również pozostaje wyzwaniem, co podkreśla konieczność dalszej optymalizacji protokołów dla tego systemu. Analiza porównawcza metod wskazuje na dużą zgodność w klasyfikacji szczepów opornych, szczególnie w przypadku mechanizmów takich jak KPC, NDM i VIM. Narzędzia MBT-STAR i MBT-ASTRA, dzięki możliwości szczegółowej oceny fenotypowej, wyróżniają się precyzją w analizie oporności, natomiast spektrometr Zybio i CLOVER BioSoft zapewniają prostszą, choć mniej szczegółową ocenę. Technika MALDI-TOF MS jako całość umożliwia szybkie i precyzyjne wykrywanie mechanizmów oporności, co czyni ją niezastąpionym narzędziem w diagnostyce mikrobiologicznej. Wyniki wskazują także na konieczność stosowania komplementarnych metod, zwłaszcza w przypadkach wyników granicznych lub niepewnych. Dalsze badania z większą liczbą próbek, uwzględniające różnorodność mechanizmów oporności i gatunków bakterii, są niezbędne do dalszego udoskonalenia narzędzi diagnostycznych i zapewnienia ich szerokiej użyteczności w rutynowej diagnostyce klinicznej.

4. Terapeutyczne monitorowanie leków

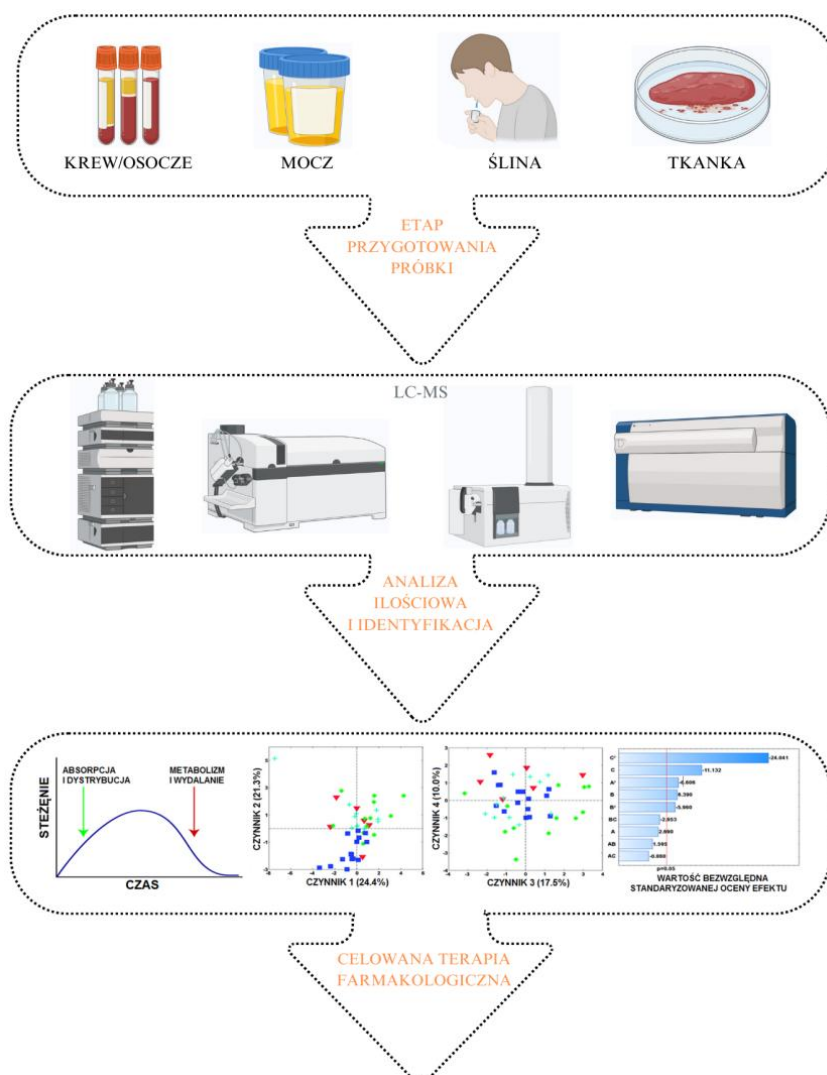
4.1. Oznaczanie i identyfikacja antybiotyków oraz ich antybiotyków w płynach ustrojowych

Podejście terapeutycznego monitorowania leków (ang. *Therapeutic Drug Monitoring*, TDM) opiera się na precyzyjnym oznaczeniu stężenia leków w próbkach biologicznych, najczęściej w surowicy krwi, moczu lub ślinie, co umożliwia optymalizację dawkowania i dostosowanie terapii do indywidualnych potrzeb pacjenta [125]. TDM jest szczególnie istotne w przypadku leków charakteryzujących się wąskim indeksem terapeutycznym, znacznym ryzykiem działań niepożądanych, długim czasem trwania terapii, indywidualnymi różnicami w

odpowiedzi na dawkę oraz trudnościami w odróżnieniu skutków terapeutycznych od niepożądanych. Monitorowanie wymaga również uwzględnienia czynników takich jak wiek pacjenta, budowa ciała, stan metaboliczny, zaburzenia funkcji wątroby lub nerek oraz potencjalne interakcje z innymi [126]. W kontekście antybiotykoterapii, monitorowanie stężenia leków jest szczególnie istotne w terapii długoterminowej, gdzie na efektywność leczenia wpływa szereg czynników, takich jak interakcje lekowe, stan narządów (np. nerek i wątroby), ogólny stan zdrowia pacjenta oraz różnice w farmakokinetyce wynikające z indywidualnych predyspozycji. Kluczowym elementem TDM w przypadku antybiotyków jest analiza ich metabolizmu, który zachodzi głównie w wątrobie. Proces ten obejmuje reakcje fazy I (oksydacja, redukcja, hydroliza) oraz fazy II (sprzęganie z kwasem glukuronowym, siarczanem lub glutationem), prowadząc do powstania metabolitów o zróżnicowanej aktywności biologicznej. Produkty biotransformacji mogą być całkowicie nieaktywne, toksyczne lub farmakologicznie aktywne, co wpływa na skuteczność leczenia i potencjalne ryzyko działań niepożądanych [127]. Zrozumienie tych procesów pozwala nie tylko na ocenę biodostępności leku i jego dystrybucji w organizmie, ale także na lepsze dostosowanie terapii do zmiennych warunków fizjologicznych pacjenta, takich jak niewydolność narządów czy polimorfizm enzymów metabolizujących. Włączenie monitorowania metabolitów do TDM dostarcza dodatkowych informacji, które mogą być kluczowe dla modyfikacji terapii, zwiększając jej efektywność przy jednoczesnej minimalizacji ryzyka działań niepożądanych [128].

Strategie TDM coraz częściej opierają się na precyzyjnych i niezawodnych metodach analitycznych, co jest szczególnie istotne przy analizie próbek o niskich stężeniach. Automatyzacja procesów, urządzenia o dużej przepustowości, solidność oraz niskie koszty operacyjne są kluczowymi kryteriami przy wyborze odpowiednich technik analitycznych. Tradycyjnie w TDM stosowano metody immunoenzymatyczne, jednak ich ograniczenia, takie jak podatność na interferencje ze strony związków pokrewnych, metabolitów czy składników matrycy, zmniejszają ich wiarygodność. Obecnie coraz częściej wykorzystuje się bardziej zaawansowane techniki analityczne, takie jak chromatografia cieczowa sprzężona z detektorami UV, detekcją fluorescencyjną (ang. *Fluorescence Detector*, FLD) czy spektrometrią mas [129]. Chromatografia cieczowa (ang. *Liquid Chromatography*, LC) wyróżnia się zdolnością do skutecznego oddzielania docelowych analitów od innych leków oraz ich metabolitów obecnych w złożonych matrycach biologicznych. Połączenie tej techniki z selektywnymi metodami detekcji, takimi jak MS, zapewnia wysoką czułość i specyficzność oznaczeń. Kluczowymi aspektami w TDM są odpowiedni wybór techniki przygotowania próbek, technologii kolumn chromatograficznych, wzorców wewnętrznych oraz warunków

detekcji, aby uniknąć interferencji pochodzących z matrycy lub metabolitów leków [98]. Obecnie metodą referencyjną w terapii monitorowanej stężeniem leku we krwi czy innych płynach ustrojowych jest chromatografia cieczowa w połączeniu z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) (Rysunek 8) [130-133].



Rysunek 8. Bioanalityczne podejście w terapeutycznym monitorowaniu leków.

Monitorowanie stężenia leków w płynach ustrojowych jest szeroko stosowane w wielu specjalnościach klinicznych, na przykład neurologii, kardiologii, psychiatrii. Najczęściej monitorowane są stężenia takich leków jak antybiotyki, leki przeciwpadaczkowe, leki antyarytmiczne, leki przeciwbólowe, związki immunosupresyjne, leki przeciwnowotworowe czy trójpierścieniowe leki antydepresyjne [134-136]. Terapia celowana polega na doborze odpowiedniego leku, dostosowanego do rodzaju infekcji i charakterystyki patogenu. W przypadku antybiotykoterapii, dobór leku możliwy jest na podstawie wyników badania mikrobiologicznego, takiego jak posiew z materiału pobranego od pacjenta (np. mocz, krew, wydzielina przyranna). Optymalnym rozwiązaniem jest sytuacja, w której wskazania kliniczne są potwierdzone wynikami badań bakteriologicznych, co jednak nie zawsze jest możliwe w

praktyce. Dodatkowym utrudnieniem jest oporność na antybiotyki, czyli zjawisko ograniczające skuteczność leczenia, co stanowi wyzwanie w diagnostyce biomedycznej [134, 137].

W przypadkach, gdy stężenia leków w płynach biologicznych są stosunkowo wysokie, detekcja UV może być wystarczająca, pod warunkiem, że selektywność metody została odpowiednio zweryfikowana, a potencjalne interferencje pochodzące z współpodawanych leków i składników matrycy zostały wykluczone. W ostatnich latach chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) lub tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) zyskała miano złotego standardu w TDM. Techniki te zapewniają wyjątkową czułość i selektywność, umożliwiając precyzyjne oznaczanie leków należących do różnych klas. LC-MS zmniejsza również ryzyko koelucji interferentów, co jest szczególnie istotne przy oznaczaniu leków w niskich stężeniach. Dodatkowo zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) lub wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (ang. *Ultra High-Performance/Pressure Liquid Chromatography*, UHPLC) sprzężonej ze spektrometrią mas zapewnia wyjątkowo niską granicę wykrywalności, wysoką selektywność, precyzję, dokładność pomiarów oraz możliwość jednoczesnego oznaczania wielu analitów w złożonych matrycach biologicznych. Dzięki temu opisane techniki stają się niezastąpionym narzędziem w badaniach farmakokinetycznych i farmakodynamicznych, które dostarczają danych niezbędnych do optymalizacji terapii lekowej.

W ostatnich latach opublikowane zostały liczne opracowania dotyczące metod analitycznych wykorzystywanych w TDM, ze szczególnym uwzględnieniem chromatografii cieczowej. Większość z tych publikacji skupia się na metodach opracowanych dla konkretnych, często wąsko zdefiniowanych grup leków. W jednym z przeglądów omówiono zastosowanie LC-MS/MS w TDM różnych leków przeciwwskazanych, z naciskiem na bioanalityczne wyzwania związane z ich oznaczaniem [138]. W pracy **P4** opisałam współczesne metody badania metabolizmu antybiotyków beta-laktamowych, uwzględniając podejścia *in silico*, *in vitro* oraz *in vivo*. Szczegółowo przedstawiłam mechanizmy biotransformacji tych związków, w tym procesy enzymatyczne fazy I i II, oraz techniki analityczne, takie jak LC-MS/MS, stosowane do identyfikacji i oznaczania metabolitów. Uzyskane podczas badań eksperymentalnych wyniki pozwoliły na opracowanie alternatywnej metody badania metabolizmu leków należących do różnych grup terapeutycznych wykorzystującej elektrochemiczne utlenianie za pomocą reaktora elektrochemicznego połączanego *on-line/off-line* z tandemowym spektrometrem mas (EC MS/MS). Podczas badania procesów utleniania zaobserwowałam tworzenie się produktów elektrochemicznych (potencjalnych metabolitów),

które były zgodne z danymi literaturowymi, jak również powstających przez utlenienie za pomocą izoenzymów cytochromu P450 obecnych we frakcji mikrosomalnej ludzkich komórek wątroby (HLMs). Podczas badań przetestowałam cztery rodzaje elektrod pracujących: elektrodę platynową (Pt), złotą (Au), węglową (GC) oraz diamentową (MD). Elektrody platynowa i węglowa przystosowane są do pracy w zakresie wartości potencjałów 0-2000 mV. Zakres potencjału elektrody MD jest wyższy i wynosi 0-3000 mV. Procesy elektrochemiczne badanych analitów prowadziłam przy wzrastającej wartości potencjału (10 mV/s) oraz przepływie fazy ruchomej 10 μ l/min. Kryterium wyboru elektrody roboczej opierało się na liczbie oraz intensywności sygnałów zarejestrowanych w widmie masowym. W ramach próby symulacji ludzkiego metabolizmu założono, że eksperyment będzie przeprowadzany w środowisku o pH fizjologicznym (pH = 7,4). Niemniej jednak, część badanych związków nie wykazała reakcji utleniania w tym obojętnym środowisku, co można przypisać ich strukturze oraz właściwościom fizykochemicznym analitów. Procesy utleniania badanych związków w celi elektrochemicznej monitorowałam za pomocą woltamogramów masowych. Potencjał elektrody roboczej zwiększałam w sposób liniowy, co umożliwiło mi rejestrację zmian sygnałów widma masowego w zależności od wartości przyłożonego napięcia oraz uzyskanie charakterystycznych woltamogramów masowych. W celu dalszej analizy struktur produktów utlenienia badanych związków, przeprowadziłam fragmentację potencjalnych metabolitów uzyskując odpowiednie widma fragmentacyjne. Otrzymane widma fragmentacyjne produktów utlenienia badanych związków porównywałam z widmem fragmentacyjnym związku macierzystego. Struktury chemiczne dla zidentyfikowanych produktów elektrochemicznych zostały przeze mnie zaproponowane na podstawie eksperymentów EC/ESI-MS/MS oraz programu komputerowego Mass Hunter Metabolite ID, jak również informacji dostępnych w literaturze. Za pomocą tego narzędzia analitycznego sygnały pochodzące od badanego analitu w odniesieniu do próbek kontrolnych określałam poprzez porównanie ich czasów retencji, widm MS oraz pól powierzchni. Przy dobranych wcześniej warunkach analizy za pomocą spektrometru mas, sygnały dla badanych leków zidentyfikowałam jako $[M+H]^+$ o charakterystycznych wartościach m/z oraz współczynnikach retencji (k). Oznaczenia analitów za pomocą spektrometru mas przebiegały w polaryzacji dodatniej w tzw. trybie pełnego przemiatania widma (*Full Scan*), monitorowania pojedynczego jonu (*SIM*), poszukiwania jonów potomnych (*Product Ion*) oraz monitorowania reakcji następnych fragmentacji (*MRM*). Skanowanie w pełnym trybie przeprowadziłam celem wyznaczenia wartości ilorazu m/z jonu pseudomolekularnego, czyli cząsteczki analitu o masie powiększonej o masę przyłączonego protonu. Za pomocą trybu monitorowania wybranego jonu dobrałam wartość napięcia na fragmentorze, czyli napięcia na końcu kapilary kierującej jony do analizatora Q1. Z kolei za

pomocą trybu *Product Ion* dla każdego jonu macierzystego na skutek jego fragmentacji uzyskałam jony potomne. Na tym etapie skorzystałam z wcześniej dobranej wartości napięcia na fragmentorze, temperatury gazu suszącego oraz dobrałam odpowiednie wartości energii zderzeń w zależności od badanego związku. Wielostopniową fragmentację badanych leków przeprowadziłam celem uzyskania danych do interpretacji widm MS/MS dla potencjalnych metabolitów wybranych związków. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż metoda ta może być skutecznie stosowana w celu przewidywania procesów utleniania, które zapoczątkowane zostają utlenieniem jednoelektronowym, takim jak *N*-dealkilacja, *S*-oksydacja, *P*-oksydacja, utlenienie alkoholi, hydroksylacja układów aromatycznych oraz dehydrogenacja. Nie jest korzystna w przypadku reakcji zapoczątkowanych przez bezpośrednie pozyskiwanie atomu wodoru, jak na przykład *O*-dealkilacja czy alifatyczna hydroksylacja niepodstawionych pierścieni aromatycznych, z powodu zbyt wysokiego potencjału utleniającego wymaganego dla reakcji elektrochemicznego utlenienia. Ponadto, dokonałam korelacji otrzymanych wyników z danymi uzyskanymi dla próbek rzeczywistych pobranych od pacjentów z oddziałów klinicznych. Poznanie szlaków przemian metabolicznych mogących mieć miejsce w organizmie różnych pacjentów jest niezbędne dla każdego związku biologicznie aktywnego. Wynika to ze zjawiska polimorfizmu genu enzymu metabolizującego, który powoduje, że metabolizm leków u każdego pacjenta przebiega w sposób odmienny i specyficzny [139]. Przeprowadzone badania *in vitro* oraz *in vivo* nad metabolizmem wybranych leków zachodzących wobec enzymu metabolizującego obecnego w komórkach wątroby, a także implementacji elektrochemicznego reaktora do generowania potencjalnych metabolitów stwarzają podstawy do poznania możliwych kierunków przemian aktywacyjnych i/lub detoksykacyjnych jakim związki te ulegają *in vivo* w organizmie pacjenta.

Dane literaturowe opisują także metody bioanalityczne służące do monitorowania leków terapeutycznych z grupy antybiotyków beta-laktamowych u pacjentów w stanie krytycznym [140]. Patel i Kothari dokonali przeglądu metod analitycznych stosowanych do ilościowego oznaczania statyn i ich metabolitów w próbkach biologicznych [141]. W 2019 roku opublikowano przegląd dotyczący techniki LC-MS/MS stosowanej w TDM leków przeciwgruźliczych [142], natomiast Zheng i Wang przeanalizowali postępy w zastosowaniu LC-MS do oznaczania leków przeciwgrzybiczych w próbkach biologicznych [143]. Zastosowanie LC-MS/MS w TDM leków immunosupresyjnych zostało szczegółowo opisane w artykule przeglądowym z 2016 roku [144]. W tym samym roku ukazał się również przegląd dotyczący różnych metod analitycznych, takich jak immunoanaliza, chromatografia cieczowa i spektrometria mas, w kontekście monitorowania leków immunosupresyjnych. Autorzy przeanalizowali zalety i wady każdej z tych technik [145]. Przeglądy obejmowały również

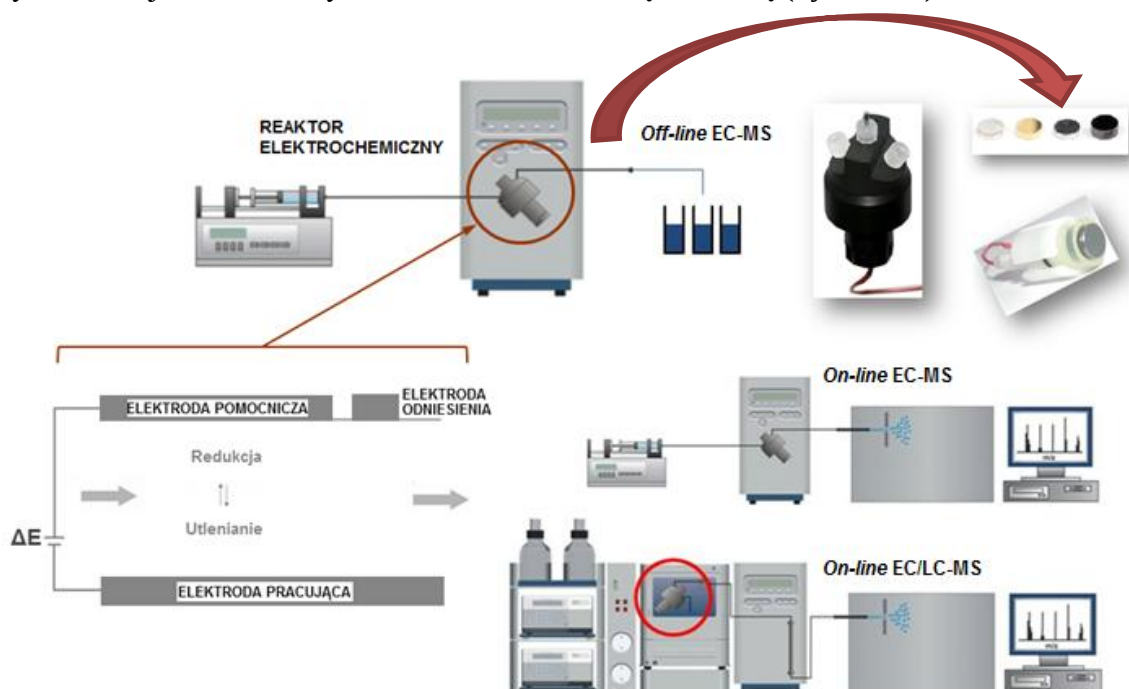
nowoczesne techniki chromatograficzne i elektroforetyczne stosowane do analizy leków przeciwdepresyjnych i ich metabolitów w płynach biologicznych. Do zalet tych metod zaliczono szybkość analizy, wysoką czułość, swoistość oraz możliwości miniaturyzacji. Porównano także chromatografię gazową i elektroforezę kapilarną w kontekście analizy leków przeciwdepresyjnych i ich metabolitów [146]. Saleem i współautorzy opisali metody HPLC stosowane do oznaczania beta-blokerów w próbkach biologicznych [147].

Niektóre przeglądy obejmowały szeroki zakres leków monitorowanych w TDM. Na przykład w 2012 roku opisano zastosowanie LC-MS/MS w analizie leków przeciwgrzybiczych, przeciwwirusowych, immunosupresyjnych, przeciwdrgawkowych, przeciwdepresyjnych, antybiotyków, leków przeciwnowotworowych oraz substancji wpływających na układ sercowo-naczyniowy [129].

Współczesne podejście do TDM, obejmujące zarówno analizę stężenia leku, jak i jego metabolitów, podkreśla interdyscyplinarny charakter tego procesu, który łączy farmakologię, biochemię i chemię analityczną w celu zapewnienia precyzyjnego i bezpiecznego leczenia pacjenta. Rozwój wysoce czułych i szybkich technik detekcji antybiotykooporności stanowi jedno z kluczowych wyzwań współczesnej mikrobiologii i chemii analitycznej. Precyzyjne diagnozowanie oporności bakteryjnej oraz szybka identyfikacja patogenów umożliwiają bardziej efektywne dopasowanie terapii antybiotykowej, co jest szczególnie istotne w obliczu rosnącej liczby zakażeń wywołanych przez szczepy wielolekooporne.

W ostatnich latach podjęto intensywne poszukiwania alternatywnych metod badawczych, które umożliwiłyby symulację metabolizmu leków bez konieczności stosowania zwierząt doświadczalnych. W ramach tych działań szczególną uwagę poświęcono elektrochemii, dziedzinie nauki, która od dawna znajduje zastosowanie w badaniach właściwości utleniająco-redukujących farmaceutyków z różnych grup terapeutycznych. W latach osiemdziesiątych odkryto, że połączenie elektrochemii ze spektrometrią mas (ang. *Electrochemical Mass Spectrometry*, EC/MS) jest odpowiednią techniką do badań dla potrzeb analizy ilościowej i jakościowej, która pozwoliłaby na symulacje metabolizmu leków, peptydów, białek czy DNA w organizmie żywym. Wprowadzenie techniki elektrochemii pozwala na transformację leków w potencjalne metabolity, a wykorzystanie czulej metody oznaczania związków organicznych, jaką jest spektrometria mas, pozwala na ich identyfikację i oznaczenie. Dodatkowo wprowadzenie różnych modyfikacji, między innymi połączenie EC/MS z metodami separacyjnymi, takimi jak chromatografia cieczowa oraz elektroforeza kapilarna (ang. *Capillary Electrophoresis*, CE) *on-line* lub *off-line*, powoduje zwiększenie wydajności procesu oraz skrócenie czasu pomiędzy wytworzeniem a detekcją danego metabolitu. Pozwala to na szybką identyfikację związków reaktywnych o krótkim czasie życia [148-152].

Aparatura stosowana do symulacji przemian fazy I i II, składa się z pompy strzykawkowej, która w strzykawkce zawiera tzw. fazę ruchomą (Rysunek 9).



Rysunek 9. Schemat układu pomiarowego (*off-line/on-line* EC LC-MS/MS).

Faza ruchoma to ciecz, która zawiera analizowany związek (np. lek), bufor oraz rozpuszczalnik organiczny w odpowiednim stosunku objętościowym bufor/roztwór. Detekcja poprzez spektrometrię mas narzuca stosowanie odpowiednich buforów takich jak: octan amonu lub mrówczan amonu. Ustalenie wartości pH dla danego buforu, oraz jego stosunek do rozpuszczalnika organicznego determinuje stopień przemiany elektrochemicznej, który jest indywidualny dla każdego pojedynczego związku. Pompa strzykawkowa tłoczy fazę ruchomą w określonym przepływie bezpośrednio do celki elektrochemicznej wewnątrz reaktora elektrochemicznego. Reaktor elektrochemiczny utrzymuje stałą określoną temperaturę oraz ustala odpowiedni potencjał dla celki elektrochemicznej. W celce elektrochemicznej zachodzą wszystkie przemiany redoks. Wykorzystuje się dwa typy celek elektrochemicznych: kulometryczną i amperometryczną. Oba te typy są wyposażone w zestaw trzech elektrod, składający się z elektrody pracującej, elektrody odniesienia i przeciwelektrody. Potencjał utleniania jest ustalany między przeciwelektrodą a elektrodą roboczą. Główną zaletą amperometrycznej celki jest zastosowanie różnych materiałów elektrody roboczej, między innymi elektrody: złote (Au), platynowe (Pt), wykonane z porowatego szklanego węgla (GC) oraz posiadające ultracienką warstwę krystalicznego diamentu naniesionego na krzemie (MD/BDD).

Metoda ta jest klasyfikowana jako technika instrumentalna, w której nie wykorzystuje się układów biologicznych. Umożliwia ona identyfikację zarówno produktów końcowych, jak i

pośrednich reakcji elektrochemicznych badanych związków. Główną zaletą tej metody jest możliwość natychmiastowej detekcji produktów utleniania tuż po ich powstaniu. Jest to skuteczna technika do przewidywania procesów utleniania, które rozpoczynają się od jednoelektronowego utleniania, obejmującego takie reakcje jak N-dealkilacja, S-oksydacja, P-oksydacja, utlenianie alkoholi, hydroksylacja układów aromatycznych oraz dehydrogenacja. Elektrochemiczne podejście okazuje się jednak mniej efektywne w przypadku reakcji, które wymagają bezpośredniego usunięcia atomu wodoru, takich jak O-dealkilacja czy alifatyczna hydroksylacja niepodstawionych pierścieni aromatycznych. Dzieje się tak z powodu zbyt wysokiego potencjału utleniającego, który jest wymagany do przeprowadzenia tych reakcji elektrochemicznych [153-157].

Elektrochemię wykorzystuje się w technikach „omicznych” takich jak:

- Lipidomika - wykorzystywana, np. podczas utleniania cholesterolu do oksysteroli/symulacji produktów utlenienia lipidów w organizmie [153,154];
- Proteomika - wykorzystywana do:
 - oksydacyjnego cięcia peptydów i białek ("trawienie nieenzymatyczne"),
 - redukcji mostków dwusiarczkowych,
 - znakowania określonych reszt aminokwasowych (głównie cysteiny) z reaktywnymi związkami generowanymi poprzez elektrochemię [153,154,156];
- Genomika – zastosowaniem między innymi w utlenianiu kwasów nukleinowych oraz tworzeniu potencjalnych produktów przyczyniających się do powstawania stresu oksydacyjnego, a także formowanie się adduktów DNA [153,157].

Jednak to w metabolomic technika ta jest najszerzej wykorzystywana. Metoda EC/MS jest szczególnie przydatna do naśladowania reakcji biotransformacji oraz badania właściwości redoks małych cząsteczek bioorganicznych. Liczne publikacje wskazują na to, że najczęściej używa się jej w celu symulacji metabolizmu leków [158-166].

4.2 Techniki przygotowania próbek w terapeutycznym monitorowaniu leków

Biologiczne matryce charakteryzują się wysokim stopniem złożoności, zawierającym białka, lipidy, leki, sole, kwasy, zasady oraz różnorodne związki organiczne i nieorganiczne, które często wykazują podobne właściwości do analitów. Anality te często występują w próbkach w śladowych stężeniach. Chociaż rozwój zaawansowanych technik analitycznych, takich jak spektrofotometria UV–vis, fluorymetria, chromatografia gazowa i cieczowa oraz metody immunoenzymatyczne, znacząco zwiększył możliwości detekcji w próbkach biologicznych, większość z tych metod wymaga wcześniejszego przygotowania próbki, aby

skutecznie przeanalizować złożoną matrycę [167]. Proces ten odgrywa kluczową rolę w zapewnieniu dokładnych, precyzyjnych i wiarygodnych wyników, co jest niezbędne do efektywnego monitorowania stężeń leków w płynach ustrojowych. Obejmuje on etap oczyszczania, rozcieńczania, wzbogacania lub przekształcania analitu w stabilny produkt umożliwiający detekcję [168]. Wybór odpowiedniej techniki przygotowania próbki zależy od właściwości fizykochemicznych badanych substancji, rodzaju matrycy oraz wymagań stosowanej metody analitycznej. Techniki takie jak ekstrakcja ciecz-ciecz (ang. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) [169], ekstrakcja do fazy stacjonarnej (*Solid Phase Extraction*, SPE) [170] czy mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (*Solid Phase Microextraction*, SPME) [171] pozwalają na efektywne usunięcie substancji zakłócających oraz wzbogacenie stężenia analitu, co ma szczególne znaczenie w analizach leków i ich metabolitów. Szczegółowe zastosowania wyżej wymienionych technik omówiłam w publikacji [P5], natomiast ich porównanie zawarłam w Tabeli 7.

Tabela 7. Porównanie technik przygotowania próbek: ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE), ekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPE) oraz mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME).

Kryterium	LLE	SPE	SPME
Zasada działania	Separacja na podstawie różnej rozpuszczalności analitów w dwóch niemieszających się cieczach.	Adsorpcja analitów na stacjonarnej fazie, a następnie ich wymywanie rozpuszczalnikiem.	Adsorpcja analitów na włóknie pokrytym odpowiednim sorbentem.
Rodzaj fazy	Faza wodna i organiczna.	Stała faza sorbentowa np. C18, polimery, węgiel aktywny.	Włókna pokryte sorbentami np. MIP, PDMS, DVB, CAR).
Zużycie rozpuszczalników	Wysokie – wymaga dużych objętości faz organicznych.	Umiarkowane – wymaga rozpuszczalników do elucji analitów.	Minimalne – zazwyczaj nie wymaga dodatkowych rozpuszczalników.
Czas analizy	Długi – zależy od liczby etapów mieszania i rozdziału.	Średni – wymaga kilku etapów (kondycjonowanie, załadunek, elucja).	Krótki – zazwyczaj jednoetapowy proces.
Koszty	Wysokie – kosztowne rozpuszczalniki i odpady.	Umiarkowane – zależne od kosztu sorbentu i rozpuszczalników.	Niskie – włókna mogą być wielokrotnie używane.
Kompatybilność z matrycami	Średnia – wymaga matryc o niewielkiej zawartości substancji zakłócających.	Wysoka – szeroka gama sorbentów dostosowana do różnych matryc.	Bardzo wysoka – szeroki wybór pokryć włókien.
Selektywność	Niska – wymaga optymalizacji faz organicznych.	Umiarkowana – zależna od rodzaju sorbentu.	Wysoka – szczególnie dla włókien MIP-SPME.

Powtarzalność wyników	Średnia – zależna od precyzji procesu mieszania.	Wysoka – kontrolowany przepływ przez fazę stałą.	Wysoka – powtarzalność związana z jednolitą powierzchnią włókien.
Granica wykrywalności (LOD)	Zależna od zastosowanego rozpuszczalnika i warunków analizy.	Zależna od sorbentu, zazwyczaj niskie LOD	Bardzo niskie LOD – odpowiednie do analiz śladowych
Przyjazność środowisku	Niska – generuje duże ilości odpadów organicznych.	Umiarkowana – mniejsze zużycie rozpuszczalników.	Wysoka – niskie zużycie materiałów eksploatacyjnych.
Przykłady zastosowań	Pestycydy, związki organiczne, metabolity w wodach, próbkach biologicznych.	Leki, pestycydy, składniki środowiskowe, analiza śladowych ilości zanieczyszczeń	Lotne związki organiczne, śladowe ilości leków i biomarkerów.
Elastyczność zastosowań	Ograniczona – wymaga dostosowania rozpuszczalników do analitu i matrycy.	Duża – możliwość stosowania różnych sorbentów w zależności od potrzeb analitycznych.	Bardzo duża – szeroki zakres sorbentów i możliwość integracji z różnymi systemami.

Szczególne uznanie zyskała technika SPME, łącząc procesy ekstrakcji i wzbogacania analitów w jednym etapie. Eliminuje to potrzebę stosowania dużych ilości rozpuszczalników organicznych, co czyni ją bardziej przyjazną dla środowiska w porównaniu z tradycyjnymi metodami ekstrakcji. SPME charakteryzuje się prostotą, efektywnością oraz wszechstronnością, dzięki czemu jest szczególnie przydatna w analizie złożonych matryc biologicznych, takich jak krew, osocze czy mocz, które powszechnie stosuje się w analizach klinicznych.

Jednym z najważniejszych aspektów techniki SPME jest możliwość jej zastosowania w warunkach *in vivo*, gdzie włókno ekstrakcyjne jest wprowadzane bezpośrednio do badanej matrycy biologicznej. Dzięki tej procedurze możliwe jest szybkie i efektywne pobieranie analitów bez konieczności stosowania agresywnych metod, które mogłyby wpłynąć na integralność badanego układu. Zdolność SPME do prowadzenia selektywnej ekstrakcji analitów w warunkach *in vivo* ma szczególne znaczenie w badaniach farmakokinetycznych, pozwalając na dynamiczne monitorowanie stężeń leków i ich metabolitów w czasie rzeczywistym [172]. Ponadto technika ta eliminuje potrzebę pobierania dużych objętości próbek biologicznych, co jest istotne w analizach prowadzonych u pacjentów pediatrycznych, osób w stanie krytycznym lub w badaniach przedklinicznych z wykorzystaniem zwierząt. Niewielkie wymagania dotyczące objętości próbki, minimalizacja interferencji matrycy oraz możliwość stosowania w szerokim zakresie matryc biologicznych, takich jak krew, osocze, mocz czy tkanki, czynią SPME niezwykle uniwersalnym narzędziem analitycznym. Dodatkowo, technika ta wyróżnia się wysoką selektywnością, którą można dalej zwiększać poprzez zastosowanie specjalistycznych powłok sorbentowych [173].

Pierwotne zastosowania tej techniki opierały się na wykorzystaniu włókna wykonanego z krzemionki topionej, pokrytego warstwą poliimidu, który pełnił funkcję fazy ekstrakcyjnej [174]. Rozwój nowych powłok o wysokiej selektywności idzie w parze z rozwojem materiałów adsorpcyjnych [172,173]. Mogą to być zarówno nowe materiały syntetyzowane po raz pierwszy, jak i materiały modyfikowane poprzez wprowadzenie docelowych grup funkcyjnych lub kompozytów z innymi materiałami. W porównaniu z tradycyjnymi adsorbentami, nowatorskie adsorbenty posiadają większą liczbę miejsc interakcji, co skutkuje wyższą efektywnością ekstrakcji [175]. Jednym z najczęściej stosowanych materiałów są nanomateriały węglowe, takie jak grafen, nanorurki jednościenne (ang. *Single-Walled Carbon Nanotubes*, SWCNTs) i wielościenne (ang. *Multi-Walled Carbon Nanotubes*, MWCNTs), które cechują się wysoką stabilnością termiczną, chemiczną i mechaniczną, a także dużą powierzchnią właściwą. Poprawa selektywności i stabilności jest możliwa dzięki funkcjonalizacji (np. aminowanie, karboksylowanie) oraz łączeniu z polimerami, co rozszerza ich zastosowanie, m.in. w oznaczaniu węglowodanów i farmaceutyków w organizmach wodnych [176-179].

Innym obiecującym materiałem są metal-organiczne sieci (ang. *Metal-Organic Frameworks*, MOFs), które dzięki dużej powierzchni właściwej, regulowanej porowatości i wysokiej selektywności są szeroko stosowane w technice SPME. Ograniczeniem MOFs jest ich niska stabilność w wodzie, co ogranicza ich praktyczne zastosowanie w analizach biologicznych [180-182].

W kontekście globalnej analizy związków technika SPME jest również wykorzystywana do systematycznego profilowania metabolitów. Powłoki o zrównoważonych właściwościach hydrofilowo-lipofilowych (ang. *Hydrophilic-LipophilicBalance*, HLB) umożliwiają jednoczesną ekstrakcję związków polarnych i niepolarnych, co znalazło zastosowanie w analizie neuroprzekaźników w tkance mózgowej czy metabolitów drobnoustrojów w systemach mikrobiologicznych [183-185]. Z kolei porowate polimery organiczne (ang. *Porous Organic Polymers*, POPs), dzięki wysokiej powierzchni właściwej i odpowiedniej porowatości, pozwalają na selektywną ekstrakcję hydrofobowych związków, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne czy estry ftalanowe [186-188].

Jako pokrycie włókien do SPME z powodzeniem wykorzystywane są także polimery z odciskiem molekularnym (ang. *Molecular Imprinted Polimers*, MIP) [189,190]. MIP to syntetyczne polimery charakteryzujące się zaprogramowaną selektywnością i wysokim powinowactwem do związków docelowych, które są zazwyczaj otrzymywane przez polimeryzację monomerów funkcyjnych i sieciujących [191]. Zastosowanie MIP-SPME umożliwia ukierunkowaną ekstrakcję analitów o złożonych właściwościach

fizykochemicznych, co znajduje zastosowanie w monitorowaniu leków terapeutycznych, analizach farmakokinetycznych oraz badaniach toksykologicznych. Możliwość zastosowania SPME w warunkach *in vivo* otwiera nowe perspektywy w analizach bioanalitycznych, umożliwiając bardziej precyzyjne i dynamiczne badania, które mogą przyczynić się do rozwoju spersonalizowanej medycyny i lepszego zrozumienia mechanizmów farmakologicznych w organizmie. MIP-SPME jest metodą umożliwiającą precyzyjne monitorowanie leków terapeutycznych, zwłaszcza w kontekście farmakokinetyki i toksykologii, dzięki swojej wysokiej czułości i selektywności. Polimery z odciskiem molekularnym zapewniają efektywne wychwytywanie analitów w złożonych próbkach biologicznych, takich jak krew, mocz czy ślina, w których stężenia leków mogą być stosunkowo niskie. Dzięki zastosowaniu MIP-SPME możliwe jest zmniejszenie błędów analitycznych związanych z interferencjami, co pozwala na uzyskanie bardziej dokładnych i wiarygodnych wyników. W pracy [P6] przedstawiłam zastosowanie techniki MIP-SPME do analizy próbek biologicznych w kontekście terapeutycznego monitorowania leków. Publikacja ta koncentruje się na praktycznych aspektach wykorzystania włókien MIP-SPME w rutynowych badaniach klinicznych, z uwzględnieniem możliwości minimalizacji błędów analitycznych oraz poprawy czułości i selektywności oznaczeń. Podczas badań wykorzystałam włókna sorpcyjne ze stali medycznej (Ni-Cr) z naniesioną w wyniku polimeryzacji elektrochemicznej warstwą politiofenu (PTh) oraz poli(3-metylotiofenu) (PMeTh). Polimeryzację przeprowadziłam metodą potencjodynamiczną, opartą na cyklicznych zmianach potencjału w czasie, zgodnie z techniką woltamperometrii cyklicznej. Proces realizowano w układzie trójelektrodowym, składającym się z elektrody referencyjnej (Ag/AgCl), przeciwelektrody wykonanej z platynowej blaszki (Pt) oraz elektrody roboczej w postaci drutu ze stali medycznej (Ni-Cr). Metodę elektrochemicznej polimeryzacji zastosowałam w celu otrzymania włókien bez odcisku oraz z odciskiem molekularnym (NIP/MIP-SPME). Stąd, do elektrolitu podstawowego, obok odpowiedniego monomeru, dodawałam określone stężenie molekuly-szablonu, w tym przypadku odpowiedniego leku. W zsyntezowanej warstwie MIP znajdują się luki molekularne wypełnione wdrukowanym szablonem. Po jego usunięciu w polimerze pozostaje odcisnięty ślad w postaci luki molekularnej z miejscami wiążącymi. Odcisnięcie szablonu w polimerze jest przydatne z punktu widzenia zastosowania do selektywnego zminiaturyzowanego układu sorpcyjnego, jeżeli cząsteczka szablonu oddziałuje odwracalnie z miejscami wiążącymi luki molekularnej polimeru. Ponadto, podczas elektropolimeryzacji niekorzystnym jest proces utleniania analitów (molekuł do odcisnięcia), ponieważ może prowadzić to do wdrukowania produktów tego utlenienia, tzw. substancji przeszkadzających, zamiast pożądanego związku. Wówczas, mogą one tworzyć miejsca wiążące, które są niezdolne do skutecznego

oddziaływania z odpowiednim analitem. Z kolei, oddziaływanie substancji przeszkadzających z lukami molekularnymi MIP jest zróżnicowane w zależności od ich podobieństwa strukturalnego do wdrukowanego szablonu. Jeśli warunki etapu odcisnięcia cząsteczki szablonu (leku) są właściwie dobrane, wówczas luki molekularne warstwy MIP powinny być komplementarne pod względem kształtu oraz wielkości do cząsteczek tych szablonów, a nie do cząsteczek substancji przeszkadzających w ich oznaczaniu [192]. Uzyskane podczas pracy eksperymentalnej polimerowe włókna sorpcyjne z odcisniętą cząsteczką charakteryzują się wysoką selektywnością. Ocenę morfologii oraz właściwości fizykochemicznych nowo otrzymanych włókien MIP-SPME przeprowadziłam z wykorzystaniem m.in. metod skaningowej (ang. *Scanning Electron Microscope*, SEM) i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (ang. *Transmission Electron Microscope*, TEM), woltamperometrii cyklicznej, spektroskopii w podczerwieni, takiej jak ta z transformacją Fouriera (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR), metod dyfrakcyjnych, np. technika rozpraszania promieniowania rentgenowskiego pod małymi (ang. *Small-Angle X-ray Scattering*, SAXS) i dużymi kątami (ang. *Wide-Angle X-ray Scattering*, WAXS) oraz magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Dodatkowo, zbałam chemiczną oraz mechaniczną stabilność zsyntetyzowanych włókien SPME. Nie zaobserwowałam znaczących różnic w strukturze danego włókna sorpcyjnego SPME przed oraz po poddaniu działaniu danym medium wodno-organicznym. Doświadczenie wykonałam przy użyciu optycznego stereomikroskopu, model SZX16 (Olympus, Tokio, Japonia) wyposażonego w kamerę CCD oraz oprogramowanie CELL.

Właściwy etap badań obejmował przeprowadzenie przeze mnie analizy ilościowej i jakościowej badanych leków i ich metabolitów w próbkach rzeczywistych pobieranych w różnych odstępach czasu od momentu podania leku. Przykładowo, w przypadku osocza lub krwi, próbki były pobierane w odstępach 0, 0,5, 1, 2, 4, 6 oraz 8 godzin. Analiza badanych próbek wykazała zróżnicowanie zawartości badanego leku oraz jego metabolitu. Na podstawie uzyskanych ekstraktów określiłam średnie stężenia leku i jego metabolitów. We wszystkich grupach pacjentów przyjmujących dany lek oznaczane substancje wykryłam na poziomach stężeń umożliwiających ich ilościową analizę. Różnice w oznaczonych wielkościach są najprawdopodobniej spowodowane indywidualnymi zdolnościami metabolizowania i wydalania powyższych substancji leczniczych przez organizmy pacjentów. Uzyskane wyniki wskazują, iż opracowane w ramach niniejszej rozprawy metody analityczne pozwalają wyznaczyć podstawowe parametry farmakokinetyczne na podstawie ilościowego oznaczania leku we krwi. Ponadto, opracowane metody chromatograficzne umożliwiają oznaczanie badanych leków wraz z ich metabolitami w jednym układzie chromatograficznym. Czas

potrzebny na wykonanie analizy chromatograficznej nie przekracza 15 minut, ponadto anality są dobrze rozdzielone. Co więcej, nie występują interferencje matrycowe, dzięki odpowiednio dobranej metodzie prekoncentracji.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż technika MIP-SPME stwarza nowe możliwości w zakresie selektywnej ekstrakcji leków i ich potencjalnych metabolitów. Dodatkowo zastosowanie polimerowych włókien sorpcyjnych znacząco poprawia izolację związków biologicznie aktywnych na niskich poziomach stężeń w wyjściowych matrycach. Wysoka selektywność sorbentów SPME z nadrukiem molekularnym umożliwia ich wykorzystanie do izolacji związków z rzeczywistych próbek biologicznych. Podejście to skraca czas przygotowania próbki i minimalizuje ilość (objętość) potrzebnego materiału biologicznego do celów analitycznych.

Od czasu pierwszej publikacji dotyczącej zastosowania MIP jako fazy ekstrakcyjnej w SPME w 2001 roku, technologia ta poczyniła znaczne postępy w efektywnej ekstrakcji analitów docelowych [193]. Moje badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej koncentrowały się na opracowaniu nowatorskich włókien MIP do techniki SPME przygotowanych metodą polimeryzacji elektrochemicznej z wykorzystaniem politiofenu i poli(3-metylotiofenu). W ramach pracy przeprowadziłam szczegółową charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych materiałów za pomocą różnorodnych technik instrumentalnych. Należy podkreślić, że dotychczas brak jest doniesień naukowych dotyczących mechanizmów rozpoznawania amoksycyliny, cefotaksymu i metronidazolu jako szablonów w procesie ekstrakcji za pomocą włókien SPME pokrytych MIP z rzeczywistych próbek biologicznych pochodzących od pacjentów. W prezentowanej pracy opisałam również zastosowanie metody SPME-LC-MS/MS do oznaczania i identyfikacji tych trzech antybiotyków w próbkach osocza ludzkiego pobranych od pacjentów hospitalizowanych na oddziale intensywnej terapii [P5 – P6].

Inni badacze, na przykład Terzopoulou i współpracownicy opracowali nowatorskie włókno MIP-SPME do ekstrakcji leku przeciwwirusowego (Abacavir), osiągając wydajność ekstrakcji w zakresie od 88% do 99%, co wskazuje na wysoką selektywność i skuteczność oczyszczania [194]. Z kolei Mirzajani i współautorzy wykorzystali ciprofloksacynę jako szablon do syntezy MIP stosowanego jako powłoka włókna SPME i ocenili jego potencjał w oznaczaniu czterech fluorochinolonów (ofloksacyny, ciprofloksacyny, lewofloksacyny i norfloksacyny) na poziomach śladowych w próbkach biologicznych. Wyniki wskazały na wysoką wydajność ekstrakcji, selektywność i stabilność tego innowacyjnego włókna [195]. Prowadzone były również badania, w których [44] uproszczono proces syntezy MIP, wykorzystując pojedynczy monomer sieciujący jako fazę ekstrakcyjną w SPME do specyficznego rozpoznawania estrogenów. Następnie włókno to zostało połączone z ultra-

wydajną chromatografią cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (UHPLC-MS/MS), co umożliwiło wykrywanie estrogenów na poziomach śladowych w próbkach mleka [196]. W innym badaniu trifenylofosforan (TPhP) MIP został bezpośrednio osadzony na filmie z tlenku grafenu (GO), tworząc monolityczne włókno SPME TPhP-MIP/GO. Włókno to okazało się praktyczne w wstępnym przygotowaniu skomplikowanych próbek wody środowiskowej dzięki wysokiej selektywności i wydajności ekstrakcji dla TPhP [197].

Rozwój powłok o wysokiej selektywności i zdolności specyficznego rozpoznawania analitów stanowi istotny przełom, umożliwiając efektywną analizę śladowych ilości substancji docelowych oraz poszerzając zakres analizy endogennych związków przy minimalnej interferencji matrycy biologicznych. Dzięki integracji SPME z zaawansowanymi technikami detekcji, takimi jak LC-MS/MS, możliwe jest osiągnięcie wysokiej czułości i specyficzności oznaczeń nawet w przypadku śladowych ilości leków. Ponadto możliwość bezpośredniego zastosowania SPME w warunkach *in vivo* otwiera nowe perspektywy w monitorowaniu farmakoterapii w czasie rzeczywistym. SPME wyróżnia się również zdolnością do analizy szerokiego spektrum leków, w tym antybiotyków, leków przeciwpadaczkowych, immunosupresyjnych i przeciwnowotworowych. Jej zastosowanie w TDM wspiera optymalizację terapii poprzez dostosowanie dawkowania do indywidualnych potrzeb pacjenta, minimalizując ryzyko działań niepożądanych i zwiększając skuteczność leczenia. Dzięki ciągłym innowacjom w zakresie powłok i automatyzacji procesów, SPME ma potencjał, aby stać się standardową techniką w monitorowaniu leków i personalizowanej medycynie.

Bibliografia

- [1] Maraz K.M., Khan R.A. An overview on impact and application of microorganisms on human health, medicine and environment, *GSC Biol. Pharm. Sci.* 2021, 16: 89-104.
- [2] Heravi F.S., Zakrzewski M., Vickery K., Armstrong D.G., Hu H. Bacterial diversity of diabetic foot ulcers: Current status and future perspectives, *J.Clin. Med.* 2019, 8: 1935.
- [3] Soni J., Sinha S., Pandey R., Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes, *Front. Microbiol* 2024, 15: 1370818.
- [4] Ikuta K.S., Swetschinski L.R., Aguilar G.R., Sharara F., Mestrovic T., Gray A.P., *et al.*, Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, *Lancet.* 2022, 400: 2221–2248.
- [5] Ajulo S., Awosile B., Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS 2022): Investigating the relationship between antimicrobial resistance and antimicrobial consumption data across the participating countries, *PLoS One.* 2024, 19: e0297921.
- [6] Cohen M.L., Changing patterns of infectious disease, *Nature.* 2000, 406: 762–767.
- [7] Bochner B.R., Global phenotypic characterization of bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.* 2009, 33:191-205.
- [8] Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Virdi J.S., MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis, *Front. Microbiol.* 2015, 6: 791.
- [9] Alizadeh M., Yousefi L., Pakdel F., Ghotaslou R., Rezaee M.A., Khodadadi E., *et al.*, MALDI-TOF mass spectroscopy applications in clinical microbiology, *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* 2021, 2021: 9928238.
- [10] Oviaño M., Rodríguez-Sánchez B., MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clinim (Engl. Ed).* 2021, 39: 192–200.
- [11] Biswas S., Rolain J.M., Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture, *J. Microbiol. Methods.* 2013, 92: 14–24.
- [12] da Costa L.V., da Silva Lage de Miranda R.V., da Fonseca E.L, Gonçalves N.P., dos Reis C.M.F., Frazão A.M., *et al.*, Assessment of VITEK® 2, MALDI-TOF MS and full gene 16S rRNA sequencing for aerobic endospore-forming bacteria isolated from a pharmaceutical facility, *J. Microbiol. Methods.* 2022, 194: 106419.
- [13] Remize F. Spore-forming bacteria. W: Bevilacqua A., Corbo M.R., Sinigaglia M., red. Microbiology Quality of Food Spoilers. Foggia, Włochy: Elsevier; 2017.p. 99–120.
- [14] Jarrad A.M., Karoli T., Blaskovich M.A.T., Lyras D., Cooper M.A., Clostridium difficile drug pipeline: Challenges in discovery and development of new agents, *J. Med.Chem.* 2015, 58: 5164–5185.
- [15] Lasch, P., Beyer W., Nattermann H., Stämmler M., Siegbrecht E., Grunow R., *et al.*, Identification of Bacillus anthracis by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks, *Appl. Environ. Microbiology* 2009, 75: 7229–7242.
- [16] Setlow P., Spores of Bacillus subtilis: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals, *J. Appl. Microbiol.* 2006, 101: 514–525.
- [17] Borch E., Arinder P., Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures, *Meat Sci.* 2002, 62: 381–390.
- [18] Mallozzi M., Viswanathan V.K., Vedantam G., Spore-forming Bacilli and Clostridia in human disease, *Future Microbiol.* 2010, 5: 1109–1123.
- [19] Munir M.T., Mtimet N., Guillier L., Meurens F., Fravalo P., Federighi M., *et al.*, Physical treatments to control Clostridium botulinum hazards in food, *Foods.* 2023, 12: 1580.
- [20] Hutchings M., Truman A., Wilkinson B., Antibiotics: past, present and future, *Curr. Opin. Microbiol.* 2019, 51: 72–80.
- [21] Fair R.J., Tor Y., Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century, *Perspect. Med. Chem.* 2014, 6: 25–64.
- [22] Abdallah B., Benhassou H.A., Sbabou L., Janel-Bintz R., Choulier L., Pitchon V., *et al.*, History as a source of innovation in antimicrobial drug discovery, *Biomed. Pharmacol. J.* 2023, 16: 739–752.

- [23] Reygaert W.C., An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria, *AIMS Microbiol.* 2018, 4: 482.
- [24] Zampaloni C., Mattei P., Bleicher K., Winther L., Thäte C., Bucher C., *et al.*, A novel antibiotic class targeting the lipopolysaccharide transporter, *Nature*. 2024, 625: 566–571.
- [25] Pancu D.F., Scurtu A., Macaso I.G., Marti D., Mioc M., Soica C., *et al.*, Antibiotics: Conventional therapy and natural compounds with antibacterial activity—A pharmaco-toxicological screening, *Antibiotics*. 2021, 10: 401.
- [26] Pauter K., Szultka-Młyńska M., Buszewski B., Determination and identification of antibiotic drugs and bacterial strains in biological samples, *Molecules*. 2020, 25: 2556.
- [27] Lima L.M., da Silva B.N.M., Barbosa G., Barreiro E.J., β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective, *Eur. J. Med. Chem.* 2020, 208: 112829.
- [28] Bush K., Bradford P.A., β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016, 6: a025247.
- [29] Hellinger W.C., Brewer N.S., Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam, *Mayo Clin. Proc.* 1999, 74: 420–434.
- [30] Tooke C.L., Hinchliffe P., Bragginton E.C., Colenso C.K., Hirvonen V.H.A., Takebayashi Y., *et al.*, β -lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st Century, *J. Mol. Biol.* 2019, 431: 3472.
- [31] Zeng D., Debabov D., Hartsell T.L., Cano R.J., Adams S., Schuyler J.A., *et al.*, Approved glycopeptide antibacterial drugs: Mechanism of action and resistance, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016, 6: a026989.
- [32] Poirel L., Jayol A., Nordmann P., Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes, *Clin. Microbiol. Rev.* 2017, 30: 557–596.
- [33] Velkov T., Roberts K.D., Nation R.L., Thompson P.E., Li J., Pharmacology of polymyxins: New insights into an ‘old’ class of antibiotics, *Future Microbiol.* 2013, 8: 711–724.
- [34] Wohlgemuth I., Garofalo R., Samatova E., Günenç A.N., Lenz C., Urlaub H., *et al.*, Translation error clusters induced by aminoglycoside antibiotics, *Nat. Commun.* 2021, 12: 1830.
- [35] Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J., How antibiotics kill bacteria: from targets to networks, *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8: 423.
- [36] Lohsen S., Stephens D.S., Current macrolide antibiotics and their mechanisms of action. W: Capelo-Martínez J.L., Igrejas G. red. Antibiotic Drug Resistant 1st ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2019. p.97–117.
- [37] Fàbrega A., Madurga S., Giralt E., Vila J., Mechanism of action of and resistance to quinolones, *Microb. Biotechnol.* 2009, 2: 40–61.
- [38] Aldred R.J., Kerns K.J., Osheroff N., Mechanism of quinolone action and resistance, *Biochemistry*. 2014, 53: 1565–1574.
- [39] Adams R.A., Leon G., Miller N.M., Reyes S.P., Thantrong C.H., Thokkadam A.M., *et al.*, Rifamycin antibiotics and the mechanisms of their failure, *J. Antibiot.* 2021, 74: 786–798.
- [40] Zessel K., Mohring S., Hamscher G., Kietzmann M., Stahl J., Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides, *Chemosphere*. 2014, 100: 167–174.
- [41] Lavanya R., Sulphonamides: A pharmaceutical review, *Int. J. Pharm. Sci. Invent.* 2017, 6: 1–3.
- [42] Lin Y.T., Liu C.J., Yeh Y.C., Chen T.J., Fung C.P., Apmicillin and amoxicillin use and the risk of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Taiwan, *J. Infect. Dis.* 2013, 208: 217–217.
- [43] Tzouveleakis L.S., Markogiannakis A., Psychogiou M., Tassios P.T., Daikos G.L., Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions, *Clin. Microbiol. Rev.* 2012, 25: 682–707.
- [44] Löfmark S., Edlund C., Nord C.E., Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections, *Clin. Infect Dis.* 2010, 1: S16–23.
- [45] Olivares J., Bernardini A., Garcia-Leon G., Corona F., Sanchez M.B., Martinez J.L., The intrinsic resistance of bacterial pathogens, *Front. Microbiol.* 2013, 4: 47150.

- [46] Martinez J.L., General principles of antibiotic resistance in bacteria, *Drug Discov. Today Technol.* 2014, 11: 33–39.
- [47] Mancuso G., Midiri A., Gerace E., Biondo C., Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens, *Pathogens*. 2021, 10: 1310.
- [48] Peterson E., Kaur P., Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens, *Front. Microbiol.* 2018, 9: 426686.
- [49] Durão P., Balbontín R., Gordo I., Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance, *TrACTrends Microbiol.* 2018, 26: 677–691.
- [50] Christner M., Rohde H., Wolters M., Sobottka I., Wegscheider K., Aepfelbacher M. 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.* 2010, 48: 1584.
- [51] Deresinski S., Principles of antibiotic therapy in severe infections: optimizing the therapeutic approach by use of laboratory and clinical data, *Clin. Infect. Dis.* 2007, 45: S177–183.
- [52] Złoch M., Pomastowski P., Maślak E., Monedeiro F., Buszewski B., Study on molecular profiles of *Staphylococcus aureus* strains: Spectrometric approach, *Molecules*. 2020, 25: 4894.
- [53] Złoch M., Maślak E., Kupczyk W., Jackowski M., Pomastowski P., Buszewski B., Culturomics approach to identify diabetic foot infection bacteria, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22: 9574.
- [54] Złoch M., Maślak E., Kupczyk W., Pomastowski P., Multi-instrumental analysis toward exploring the diabetic foot infection microbiota, *Curr. Microbiol.* 2023, 80: 271.
- [55] Lax S., Gilbert J.A., Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections, *TrACTrends Mol. Med.* 2015, 21: 427–432.
- [56] Lukovac E., Koluder-Cimic N., Hadzovic-Cengic M., Baljic R., Hadzic A., Gojak R., Analysis of comorbidity of the patients affected by *Staphylococcal* bacteremia/sepsis in the last ten years, *Mater. Sociomed.* 2012, 24: 13–15.
- [57] Lubbers B.R., Schilhabel A., Cobbaert C.M., Gonzalez D., Dombrink I., Bruggemann M., *et al.*, The new EU regulation on in vitro diagnostic medical devices: Implications and preparatory actions for diagnostic laboratories, *HemaSphere*. 2021, 5:e568.
- [58] Kahles A., Goldschmid H., Volckmar A.L., Ploeger C., Kazdal D., Penzel R., *et al.*, Structure and content of the EU-IVDR, *Pathologie*. 2023, 44:73–85.
- [59] Torres-Sangiao E., Rodriguez C.L., García-Riestra C., Application and perspectives of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology laboratories, *Microorganisms*. 2021, 9: 1539.
- [60] Stump M.J., Fleming R.C., Gong W.H., Jaber A.J., Jones J.J., Surber C.W., *et al.*, Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2002, 37: 275–303.
- [61] Pirkel A., Soltwisch J., Draude F., Dreisewerd K., Infrared matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal-time-of-flight mass spectrometry employing a cooling stage and water ice as a matrix. *Anal. Chem.* 2012, 84: 5669–5676.
- [62] Liu B.H., Lee Y.T., Wang Y.S., Incoherent production reactions of positive and negative ions in matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009, 20: 1078–1086
- [63] Karas M., Kruger R., Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism. *Chem. Rev.* 2003, 103: 427–439.
- [64] Karas M., Gluckmann M., Schafer J., Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: Singly charged molecular ions are the lucky survivors, *J. Mass Spectrom.* 2000, 35: 1–12.
- [65] Molin L., Seraglia R., Czarnocki Z., Maurin J.K., Pluciński F.A., Traldi P., One the primary ionization mechanism(s) in matrix-assisted laser desorption ionization. *J. Anal. Methods Chem.* 2012, 1: 161865.
- [66] Horneffer V., Dreisewerd K., Lüdemann H.C., Hillenkamp F., Läge M., Strupat K., Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid. *Int. J. Mass Spectrom.* 1999, 185–187: 859–870.
- [67] Leopold J., Popkova Y., Engel K.M., Schiiler J., Recent development of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of lipids. *Biomolecules*. 2018, 8:173.

- [68] Cotter J.R., Laser mass spectrometry: an overview of techniques, instruments and applications, *Anal. Chim. Acta.* 1987, 195: 45–59.
- [69] Haider A., Ringer M., Kotrocó Z., Mohácsi-Farkas C., Kocsis T., The current level of MALDI-TOF MS applications in the detection of microorganisms: A short review of benefits and limitations. *Microbiol. Res. (Pavia)*. 2023, 14: 80–90.
- [70] Umer A.A., Review on MALDI TOF MS: Modern disease approaches in microbiology and its mechanisms, *J. Microbiol. Mod.* 2023, 7: 102.
- [71] Flensburg J., Haid D., Blomberg J., Bielawski J., Ivansson D., Applications and performance of MALDI-TOF mass spectrometer with quadratic field reflectron technology, *J. Biochem Biophys. Methods*. 2004, 60:19–34.
- [72] Wieme A.D., Spitaels F., Aerts M., De Bruyne K., Van Landschoot A., Vandamme P., Effects of growth medium on matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectra: a case study of acetic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 2014, 80: 1528–1538.
- [73] Anderson N.W., Buchan B.W., Riebe K.M., Parsons L.N., Gnaciński S., Ledebøer N.A., 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.* 2012, 50: 1008–1013.
- [74] Pomastowski P., Szultka-Młyńska M., Kupeczyk W., Jackowski M., Buszewski B., Evaluation of intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry for capillary electrophoresis detection for controlled bacterial clumping, *J. Anal. Bioanal. Tech.* 2015, S13: 008.
- [75] Fuchs B., Schiller J., Recent developments of useful MALDI matrices for the mass spectrometric characterization of apolar compounds, *Curr. Org. Chem.* 2009, 13: 1664–1681.
- [76] Chung Y., Han M., Kim J.S., Comparative evaluation of Bruker Biotyper and ASTA MicroIDSys for species identification in a clinical microbiology laboratory, *Diagnostics*. 2021, 11: 1683.
- [77] Carbonnelle E., Grohs P., Jacquier H., Day N., Tenza S., Dewailly A., *et al.*, Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification, *J. Microbiol. Methods*. 2012, 89: 133–136.
- [78] Bilecen K., Yaman G., Ciftci U., Laleli Y.R., Performances and reliability of Bruker Microflex LT and VITEK MS MALDI-TOF mass spectrometry systems for the identification of clinical microorganisms, *Biomed. Res. Int.* 2015, 2015: 516410.
- [79] Lee M., Chung H.S., Moon H.W., Lee S.H., Lee K., Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems, Vitek MS and Microflex LT, for the identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiology laboratories, *J. Microbiol. Methods*. 2015, 113: 13–15.
- [80] Veloo A.C.M., Knoester M., Degener J.E., Kuijper E.J., Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria, *Clin. Microbiol. Infect.* 2011, 17: 1501–1506.
- [81] Jung J., Kim S.Y., Park Y.J., Lee J., Suk H.S., Ha S., *et al.*, Comparison of the ASTA MicroIDSys and VITEK MS matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry systems for identification of clinical bacteria and yeasts, *J. Infect. Chemother.* 2020, 26: 1328–1333.
- [82] Branda J.A., Methods for the identification of cultured microorganisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, 1st ed. Wayne, *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2017.
- [83] Park J.H., Jang Y., Yoon I., Kim T.S., Park H., Comparison of Autof ms1000 and Bruker Biotyper MALDI-TOF MS platforms for routine identification of clinical microorganisms, *Biomed. Res. Int.* 2021, 2021: 6667623.
- [84] Xiong L., Long X., Ni L., Wang L., Zhang Y., Cui L., *et al.*, Comparison of Autof Ms1000 and EXS3000 MALDI-TOF MS platforms for routine identification of microorganisms, *Infect. Drug Resist.* 2023, 16: 913–921.
- [85] Huang Y., Zhang M., Zhu M., Wang M., Sun Y., Gu H., *et al.*, Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for the identification of clinical filamentous fungi, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 33: 1–7.
- [86] Czeszewska-Rosiak G., Złoch M., Radońska M., Florkiewicz A.B., Tretyn A., Pomastowski P., The usefulness of the MALDI-TOF MS technique in the determination of dairy samples' microbial

- composition: comparison of the new EXS2600 system with MALDI Biotyper platform, *Arch. Microbiol.* 2024, 206: 1–11.
- [87] Liu Y., Xue A., Ding L., Hao Y., Liu H., Cui M., *et al.*, Direct identification and metabolomic analysis of Huanglongbing associated with *Candidatus Liberibacter* spp. in navel orange by MALDI-TOF-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 2020, 412: 3091–3101.
 - [88] Xu J., Li X., Zhang F., Tang L., Wei J., Lei X., *et al.*, Integrated UPLC-Q/TOF-MS technique and MALDI-MS to study of the efficacy of Yixinshu capsules against heart failure in a rat model, *Front. Pharmacol.* 2019, 10: 491138.
 - [89] Walczak-Skierska J., Monedeiro F., Maślak E., Złoch M., Lipidomics characterization of the microbiome in people with diabetic foot infection using MALDI-TOF MS, *Anal. Chem.* 2023, 95: 16251–16262.
 - [90] Arendowski A., Sibińska E., Miśta W., Fijałkowski P., Złoch M., Gabryś D., *et al.*, Study of sample preparation influence on bacterial lipids profile in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Lipids.* 2024, 59: 13–26.
 - [91] Cardamone J.M., Investigating the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR), *J Mol. Struct.* 2010, 969: 97–105.
 - [92] Pei Z.F., Zhu L., Nair S.K., Core-dependent post-translational modifications guide the biosynthesis of a new class of hypermodified peptides, *Nat. Commun.* 2023, 14: 7734.
 - [93] Schäfer R., UltrafleXtreme : Redefining MALDI Mass Spectrometry Performance, Bruker Daltonics Inc.; 2009. Dostępne na: www.bdal.com.
 - [94] Sibińska E., Arendowski A., Fijałkowski P., Gabryś D., Pomastowski P., Comparison of the Bruker Microflex LT and Zybion EXS2600 MALDI TOF MS systems for the identification of clinical microorganisms, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2024, 108: 116150.
 - [95] Marucco A.P., Minervini P., Snitman G.V., Sorge A., Guelfand L.I., Moral L.L., Comparison of the identification results of *Candida* species obtained by BD Phoenix™ and Maldi-TOF (Bruker Microflex LT Biotyper 3.1), *Rev. Argent. Microbiol.* 2018, 50: 337–340.
 - [96] Schulthess B., Ledermann R., Mouttet F., Zbinden A., Bloemberg G. V., Böttger E.C., *et al.*, Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory, *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52: 2797–2803.
 - [97] Calderaro A., Chezzi C., MALDI-TOF MS: A reliable tool in the real life of the clinical microbiology laboratory, *Microorganisms.* 2024, 12: 322.
 - [98] Sparbier K., Schubert S., Kostrzewa M., MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? *Methods.* 2016, 104: 48-54.
 - [99] Cordovana M., Abdalla M., Ambretti S., Evaluation of the MBT STAR-Carba assay for the detection of carbapenemase production in Enterobacteriaceae and Hafniaceae with a large collection of routine isolates from plate cultures and patient-derived positive blood cultures, *Microb. Drug Resist.* 2020, 26: 1298-1306.
 - [100] Ota Y., Furuhashi K., Hirai N., Ishikawa J., Nagura O., Yamanaka K., *et al.*, Evaluation of MBT STAR-Cepha and MBT Star-CARBA kits for the detection of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemase producing microorganisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Microbiol. Methods.* 2021, 183: 106166.
 - [101] Kempf M., Bakour S., Flaudrops C., Meryem B., Brunel J.M., Driddi M., *et al.*, Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight spectrometry, *PLOS One.* 2012, 7: e31676.
 - [102] Lange C., Schubert S., Jung J., Kostrzewa M., Sparbier K., Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection, *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52: 4155–4162.
 - [103] Lukovac E., Koluder-Cimic N., Hadzovic-Cengic M., Baljic R., Hadzic A., Gojak R., Analysis of comorbidity of the patients affected by Staphylococcal bacteremia/sepsis in the last ten years, *Mater. Sociomed.* 2012, 24: 13-15.
 - [104] Sethi S., Infection as a comorbidity of COPD, *Eur. Respir. J.* 2010, 35: 1209–1215.
 - [105] Tong S.Y.C., Davis J.S., Eichenberger E., Holland T.L., Fowler V.G., Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management, *Clin. Microbiol. Rev.* 2015, 28: 603.

- [106] Poyer F., Friesenbichler W., Hutter C., Pichler H., Dworzak M., Peters C., *et al.*, *Rothia mucilaginosa* bacteremia: A 10-year experience of a pediatric tertiary care cancer center, *Pediatr. Blood Cancer*. 2019, 66: e27691.
- [107] Shi X., Qiu S., Ji L., Lu H., Wu S., Chen Q., *et al.*, Pathogenetic characterization of a *Micrococcus luteus* strain isolated from an infant, *Front. Pediatr.* 2023, 11: 1303040.
- [108] Pappas P.G., Lionakis M.S., Arendrup M.C., Ostrosky-Zeichner L., Kullberg B.J., Invasive candidiasis, *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018, 4:18026.
- [109] Wladyka B., Piejko M., Bzowska M., Pieta P., Krzysik M., Mazurek Ł., *et al.*, A peptide factor secreted by *Staphylococcus pseudintermedius* exhibits properties of both bacteriocins and virulence factors, *Sci. Rep.* 2015, 5: 14569.
- [110] Ma S., Ge W., Yan Y., Huang X., Ma L., Li C., *et al.*, Effects of *Streptococcus sanguinis* bacteriocin on deformation, adhesion ability, and Young's modulus of *Candida albicans*, *Biomed Res. Int.* 2017, 2017: 5291486.
- [111] Cavalcanti I.M.G., Del Bel Cury A.A., Jenkinson H.F., Nobbs A.H., Interactions between *Streptococcus oralis*, *Actinomyces oris*, and *Candida albicans* in the development of multispecies oral microbial biofilms on salivary pellicle, *Mol. Oral Microbiol.* 2017, 32: 60–73.
- [112] Gladysheva I.V., Chertkoc K.L., Cherkasov S.V., Khopko Y.A., Kataev V.Y., Valyshev A.V., Probiotic potential, safety properties, and antifungal activities of *Corynebacterium amycolatum* ICIS 9 and *Corynebacterium amycolatum* ICIS 53 strains, *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2023, 15: 588-600.
- [113] Phuengmaung P., Somparn P., Panpetch W., Singkham-In U., Wannigama D.L., Chatsuwan T.*et al.* Coexistence of *Pseudomonas aeruginosa* with *Candida albicans* enhances biofilm thickness through alginate-related extracellular matrix but is attenuated by N-acetyl-l-cysteine, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020, 10: 594336.
- [114] Phuengmaung P., Chongrak C., Saisorn W., Makjaroen J., Singkham-in U., Leelahavanichkul A., The coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans* enhanced biofilm thickness but induced less severe neutrophil responses and less inflammation in pneumonia mice than *K. pneumoniae* alone, *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25: 12157.
- [115] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST: Microbiological Interpretative Criteria. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2025. Dostęp: <https://mic.eucastrg.org/search/>.
- [116] Delcour A.H., Outer membrane permeability and antibiotic resistance, *Biochim. Biophys. Acta*. 2009, 1794: 808-816.
- [117] Chquet M., Guiheneuf R., Castelain S., Cattoir V., Auzou M., Pluquet E., *et al.*, Comparison of MALDI-ToF MS with the rapidec carba NP test for the detection of carbapenemsase-producing Enterobacteriaceae, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 2018, 37: 149-155.
- [118] Złoch M., Pomastowski P.P., Peer M., Spärbier K., Kostrzewa M., Buszewski B., Study on carbapenemase-producing bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization approach, *PLOS One*. 2021, 16: e0247369.
- [119] Uitz C., Luxner J., Friedl S., Leitner E., Grisold A., Zarfel G., *et al.*, A comparison of two MALDI-TOF MS based assays for the detection of carbapenemases in Enterobacterales, *Sci. Reports*. 2024, 14: 1–6.
- [120] Nakayama H., Kurokawa K., Lee B.L., Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways, *FEBS J.* 2012, 279: 4247-4268.
- [121] Sun H., Lai P., Wu W., Heng H., Si S., Ye Y., *et al.*, MALDI-TOF MS based bacterial antibiotics resistance finger print for diabetic pedopathy, *Front. Chem.* 2022, 9: 785848.
- [122] Bauer A.W., Perry D.M., Kirby W.M.M., Single-disk antibiotic-sensitivity testing of Staphylococci: An analysis of technique and results, *AMA. Arch. Intern. Med.* 1959, 104: 208–216.
- [123] Ceyssens P.J., Soetaert K., Timke M., Van Den Bossche A., Spärbier K., De Cremer K., *et al.*, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for combined species identification and drug sensitivity testing in mycobacteria, *J. Clin. Microbiol.* 2017, 55: 624–634.
- [124] Jung J.S., Hamacher C., Gross B., Spärbier K., Lange C., Kostrzewa M., *et al.*, Evaluation of a semiquantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry method for rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures, *J. Clin. Microbiol.* 2016, 54: 2820–2824.

- [125] Tuzimski T., Petruczyński A., Review of chromatographic methods coupled with modern detection techniques applied in the therapeutic drugs monitoring (TDM), *Molecules*. 2020, 25: 4026.
- [126] Fang Z., Zhang H., Guo J., Guo J., Overview of therapeutic drug monitoring and clinical practice, *Talanta*. 2024, 266: 124996.
- [127] Almazroo O.A., Miah M.K., Venkataramanan R., Drug metabolism in the liver, *Clin. Liver Dis.* 2017, 21: 1–20.
- [128] Jackson K.D., Achour B., Lee J., Geffert R.M., Beers J.L., Latham B.D., Novel approaches to characterize individual drug metabolism and advance precision medicine, *Drug Metab. Dispos.* 2023, 51: 1238.
- [129] Adaway J.E., Keevil B.G., Therapeutic drug monitoring and LC–MS/MS, *J. Chromatogr. B.* 2012, 883–884: 33–49.
- [130] Nowak P.M., Woźniakiewicz Ł., Kościelniak P., Simulation of drug metabolism, *Trends in Anal. Chem.* 2014, 59: 42–49.
- [131] Aucella F., Lauriola V., Vecchione G., Tiscia G.L., Grandone E., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method as the golden standard for the therapeutic drug monitoring in renal transplant, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013, 86: 123–126.
- [132] Kang J.S., Lee M.H., Overview of therapeutic drug monitoring, *Korean J. Intern. Med.* 2009, 24: 1–10.
- [133] Szultka M., Papaj K., Rusin A., Szeja W., Buszewski B., Determination of flavonoids and their metabolites by chromatographic techniques, *TrAC Trends Anal. Chem.* 2013, 47: 4–7.
- [134] Szultka-Młyńska M., Pomastowski P., Buszewski B., Application of solid phase microextraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry in the determination of antibiotic drugs and their metabolites in human whole blood and tissue sample, *J. Chromatogr. B.* 2018, 1086: 153–165.
- [135] Dias E., Hachey B., McNaughton C., Nian H., Yu C., Straka B., *et al.*, An LC-MS assay for the screening of cardiovascular medications in human samples, *J. Chromatogr. B* 2013, 937: 44–53.
- [136] Tszysznick W., Borowiec A., Pawłowska E., Jaźwiec R., Zochowska D., Bartłomiejczyk I., Two rapid ultra performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) methods with common sample pretreatment for therapeutic drug monitoring of immunosuppressant compared to immunoassay, *J. Chromatogr. B.* 2013, 928: 9–15.
- [137] Sahi J., Grepper S., Smith C., Hepatocytes as a tool in drug metabolism, transport, and safety evaluations in drug discovery, *Curr. Drug Discov. Technol.* 2010, 7: 188–198.
- [138] Veringa A., Sturkenboom M.G.G., Dekkers B.G.J., Koster R.A., Roberts J.A., Peloquin C.A., *et al.*, LC-MS/MS for therapeutic drug monitoring of anti-infective drugs, *TrAC Trends Anal. Chem.* 2016, 84, 34–40.
- [139] Song Y., Li C., Liu G., Liu R., Chen Y., Li W., *et al.*, Drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes have multifarious influences on treatment outcomes, *Clin. Pharmacokinet.* 2021, 60:585–601.
- [140] Caro Y.S., Cámara M.S., De Zan M.M., A review of bioanalytical methods for the therapeutic drug monitoring of β -lactam antibiotics in critically ill patients: Evaluation of the approaches used to develop and validate quality attributes, *Talanta*. 2020, 210: 120619.
- [141] Patel M., Kothari C., Critical review of statins: A bio-analytical perspective for therapeutic drug monitoring, *TrAC Trends Anal. Chem.* 2017, 86: 206–221.
- [142] Kuhlin J., Sturkenboom M.G.G., Ghimire S., Margineanu I., van den Elsen S.H.J., Simbar N., *et al.* Mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of anti-tuberculosis drugs, *Clin. Mass Spectrom.* 2019, 14: 34–45.
- [143] Zheng Y.Z., Wang S., Advances in antifungal drug measurement by liquid chromatography-mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta.* 2019, 491: 132–145.
- [144] Shipkova M., Valbuena H., Liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs: Achievements, lessons and open issues, *TrAC Trends Anal. Chem.* 2016, 84, 23–33.
- [145] Freudenberg K., Hilbig U., Gauglitz G., Recent advances in therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs, *TrAC Trends Anal. Chem.* 2016, 79: 257–268.
- [146] Plenis A., Bączek T., Modern chromatographic and electrophoretic measurements of antidepressants and their metabolites in biofluids, *Biomed. Chromatogr.* 2011, 25: 164–198.

- [147] Saleem K., Ali I., Kulsum U., Aboul-Enein H.Y., Recent developments in HPLC analysis of β -blockers in biological samples, *J. Chromatogr. Sci.* 2013, 51: 807–818.
- [148] Bussy U., Boisseau R., Thobie-Gautier C., Boujtita M., Electrochemistry-mass spectrometry to study reactive drug metabolites and CYP450 simulations, *TrAC Trends Anal. Chem.* 2015, 70: 67-73.
- [149] Karst U., Electrochemistry/Mass Spectrometry (EC/MS)-A new tool to study drug metabolism and reaction mechanisms, *Angew. Chem.* 2004, 43: 2476-2478.
- [150] Lohmann W., Baumann A., Karst U., Electrochemistry and LC-MS for metabolite generation and identification: Tools, technologies and trends, *LC-GC Europe*. 2010, 32: 8-16.
- [151] Permentier H.P., Bruins A.P., Bischoff R., Electrochemistry-mass spectrometry in drug metabolism and protein research, *Mini-Rev. Med. Chem.* 2008, 8: 46-56.
- [152] Chipiso K., H. Simoyi R., Electrochemistry-coupled to mass spectrometry in simulation of metabolic oxidation of methimazole: Identification and characterization of metabolites, *J. Electroanal. Chem.* 2016, 761: 131-140.
- [153] Oberacher H., Pitterl F., ‘Omics’ applications of electrochemistry coupled to mass spectrometry — A review, *LC-GC Europe*. 2015, 28: 138–150.
- [154] Weber D., Nill Z., Vetter D., Hoffmann R., Fedorova M., Electrochemical oxidation of cholesterol: An easy way to generate numerous oxysterols in short reaction times, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2016, 118: 325–331.
- [155] Jahn S., Karst U., Electrochemistry coupled to (liquid chromatography/) mass spectrometry – Current state and future perspectives, *J. Chromatogr. A* 2012, 1259: 16-49.
- [156] Nicolardi S., Deelder A.M., Palmblad M., van der Burgt Y.E.M., Structural analysis of an intact monoclonal antibody by online electrochemical reduction of disulfide bonds and fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Anal. Chem.* 2014, 86: 5376–5382.
- [157] Wen Looi D., Eyler J.R., Brajter-Toth A., Electrochemistry-electrospray ionization FT ICR mass spectrometry (EC ESI MS) of guanine–tyrosine and guanine–glutathione crosslinks formed on-line, *Electrochim. Acta*. 2011, 56: 2633-2640.
- [158] Chipiso, K., H. Simoyi R., Electrochemistry-coupled to mass spectrometry in simulation of metabolic oxidation of methimazole: Identification and characterization of metabolites”, *J. Electroanal. Chem.* 2016, 761: 131-140.
- [159] Nouri-Nigjeh E., Permentier H.P., Bischoff R., Bruins A.P., Lidocaine oxidation by electrogenerated reactive oxygen species in the light of oxidative drug metabolism, *Anal. Chem.* 2010, 82: 7625-7633.
- [160] van Leeuwen S.M., Blankert B., Kauffmann J.M., Karst U., Prediction of clozapine metabolism by on-line electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382: 742-750.
- [161] Baumann A., Lohmann W., Schubert B., Oberacher H., Karst U., Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to in vivo and in vitro methods, *J. Chromatogr. A* 2009, 1216: 3192-3198.
- [162] Kong C., Christoph M., Wehea A., Sperlingac M., Karst U., Identification and quantification of electrochemically generated metabolites of thyroxine by means of liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry and counter gradient liquid chromatography/inductively coupled plasma-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 2015, 1419: 81-88.
- [163] Kučerová P., Skopalová J., Kučera L., Hrbáč J., Lemra K., Electrochemical oxidation of fesoterodine and identification of its oxidation products using liquid chromatography and mass spectrometry, *Electrochim. Acta*. 2015, 159: 131-139.
- [164] Szultka-Młyńska M., Bajkacz S., Baranowska I., Buszewski B., Structural characterization of electrochemically and in vivo generated potential metabolites of selected cardiovascular drugs by EC-UHPLC/ESI-MS using an experimental design approach, *Talanta*. 2018, 176: 262-276.
- [165] Szultka-Młyńska M., Bajkacz S., Kaca M., Baranowska I., Buszewski B., Electrochemical simulation of three novel cardiovascular drugs phase I metabolism and development of a new method for determination of them by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 2018, 1093-1094: 100-112.

- [166] Szultka-Młyńska M., Buszewski B., Electrochemistry-mass spectrometry for in-vitro determination of selected chemotherapeutics and their electrochemical products in comparison in-vivo approach, *Talanta*. 2016, 160: 694-703.
- [167] Kataoka H., New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 2003, 22: 232–244.
- [168] Nichols Z.E., Geddes C.D., Sample preparation and diagnostic methods for a variety of settings: A comprehensive review, *Molecules*.2021, 26: 5666.
- [169] Wang B., Xie K., Lee K., Veterinary drug residues in animal-derived foods: Sample preparation and analytical methods, *Foods*. 2021, 10: 555.
- [170] Plotka-Wasyłka J., Szczepańska N., de la Guardia M., Namieśnik J., Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, *TrAC Trends Anal. Chem.*2016, 77: 23–43.
- [171] Wianowska D., Gil M., Olszowy M., Miniaturized methods of sample preparation. In: César M, Pumera M, editors. Handbook on miniaturization in analytical chemistry: Application of nanotechnology, 1st ed. Elsevier 2020:99–125.
- [172] Huang S., Chen G., Ye N., Kou X., Zhu F., Shen J., *et al.*, Solid-phase microextraction: An appealing alternative for the determination of endogenous substances - A review, *Anal. Chim. Acta*.2019, 1077: 67–86.
- [173] Yu M., Roszkowska A., Pawliszyn J., In vivo solid-phase microextraction and applications in environmental sciences, *ACS Environ. Au*.2022, 2: 30–41.
- [174] Arthur C.L., Pawliszyn J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 1990, 62: 2145–2148.
- [175] Zheng J., Huang J., Yang Q., Ni C., Xie X., Shi Y., *et al.*, Fabrications of novel solid phase microextraction fiber coatings based on new materials for high enrichment capability, *TrAC Trends Anal. Chem.*2018, 108: 135–153.
- [176] Peng S., Huang Y., Ouyang S., Huang J., Shi Y., Tong Y.J., *et al.*, Efficient solid phase microextraction of organic pollutants based on graphene oxide/chitosan aerogel, *Anal. Chim. Acta*. 2022, 1195: 339462.
- [177] Wang F., Zheng Y., Qiu J., Liu S., Tong Y., Zhu F., *et al.*, Graphene-based metal and nitrogen-doped carbon composites as adsorbents for highly sensitive solid phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Nanoscale*.2018, 10: 10073–10078.
- [178] Song A., Wang J., Lu G., Jia Z., Yang J., Shi E., Oxidized multiwalled carbon nanotubes coated fibers for headspace solid-phase microextraction of amphetamine-type stimulants in human urine, *Forensic Sci. Int.* 2018, 290: 49–55.
- [179] Peng S., Huang X., Huang Y., Huang Y., Zheng J., Zhu F., *et al.* Novel solid-phase microextraction fiber coatings: A review, *J. Sep. Sci.*2022, 45: 282–304.
- [180] Rocío-Bautista P., Pacheco-Fernández I., Pasán J., Pino V., Are metal-organic frameworks able to provide a new generation of solid-phase microextraction coatings? – A review, *Anal. Chim. Acta*. 2016, 939: 26–41.
- [181] Yu L.Q., Yan X.P., Covalent bonding of zeolitic imidazolate framework-90 to functionalized silica fibers for solid-phase microextraction, *Chem. Commun.*2013, 49: 2142-2144
- [182] Moinfar S., Khodayari A., Sohrabnezhad S., Aghaei A., Jamil L.A., MIL-53(Al)/Fe₂O₃ nanocomposite for solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides followed by GC-MS analysis, *Microchim. Acta*.2020, 187: 647.
- [183] Vasiljevic T., Singh V., Pawliszyn J. Miniaturized SPME tips directly coupled to mass spectrometry for targeted determination and untargeted profiling of small samples, *Talanta*. 2019, 199:689–697.
- [184] Reyes-Garcés N., Bojko B., Hein D., Pawliszyn J., Solid phase microextraction devices prepared on plastic support as potential single-use samplers for Bbioanalytical applications, *Anal. Chem.* 2015, 87: 9722–9730.
- [185] Mousavi F., Bojko B., Bessonneau V., Pawliszyn J., Cinnamaldehyde characterization as an antibacterial agent toward E. coli metabolic profile using 96-blade solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Proteome Res.* 2016, 15: 963–975.
- [186] Liu S., Chen D., Zheng J., Zeng L., Jiang J., Jiang R., *et al.*, The sensitive and selective adsorption of aromatic compounds with highly crosslinked polymer nanoparticles, *Nanoscale*. 2015, 7: 16943–16951.

- [187] Wang Z., Huang Y., Hu Y., Peng S., Peng X., Li Z.W., *et al.*, Convenient synthesis of a hyper-cross-linked polymer via knitting strategy for high-performance solid phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Microchem. J.* 2022, 179: 07535.
- [188] Liu S., Fang S., Huang Y., Xiang Z., Ouyang G., A heterogeneous pore decoration strategy on a hydrophobic microporous polymer for high-coverage capture of metabolites, *Chem. Commun.* 2020, 56: 7167–7170.
- [189] Arshad R., Rhouati A., Hayat A., Nawaz M.H., Yameen M.A., Mujahid A., *et al.*, MIP-based impedimetric sensor for detecting dengue fever biomarker, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2020, 191: 1384–1394.
- [190] Selvolini G., Marrazza G. MIP-based sensors: Promising new tools for cancer biomarker determination, *Sensors*. 2017, 17: 718.
- [191] Ye L., Syntetic strategies in molecular imprinting, *Adv., Biochem. Eng. Biotechnol.* 2015, 150: 1-24.
- [192] Li G., Row K.H., Recent Applications of Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) on Micro-extraction Techniques, *Sep. Purif. Rev.* 2018, 47: 1–18.
- [193] Mullett W.M., Martin P., Pawliszyn J., In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol, *Anal. Chem.* 2001, 73: 2383–2389.
- [194] Terzopoulou Z., Papageorgiou M., Kyzas G.Z., Bikiaris D.N., Lambropoulou D.A., Preparation of molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for the selective removal and extraction of the antiviral drug abacavir in environmental and biological matrices, *Anal. Chim. Acta.* 2016, 913: 63–75.
- [195] Mirzajani R., Kardani F., Fabrication of ciprofloxacin molecular imprinted polymer coating on a stainless steel wire as a selective solid-phase microextraction fiber for sensitive determination of fluoroquinolones in biological fluids and tablet formulation using HPLC-UV detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 122: 98–109.
- [196] Wang S., Geng Y., Sun X., Wang R., Zheng Z., Hou S., *et al.*, Molecularly imprinted polymers prepared from a single cross-linking functional monomer for solid-phase microextraction of estrogens from milk, *J. Chromatogr. A.* 2020, 1627: 461400.
- [197] Jian Y., Chen L., Cheng J., Huang X., Yan L., Li H., Molecularly imprinted polymers immobilized on graphene oxide film for monolithic fiber solid phase microextraction and ultrasensitive determination of triphenyl phosphate, *Anal. Chim. Acta.* 2020, 1133: 1–10.

Publikacje wchodzące w skład dysertacji

PUBLIKACJA [P1]

“Omic” approaches to bacteria and antibiotic resistance identification

D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, P. Pomastowski, B. Buszewski

International Journal of Molecular Sciences (2022) 23: 1-33. IF₂₀₂₂ = 5.600 PM = 140

doi:10.3390/ijms23179601



Review

"Omic" Approaches to Bacteria and Antibiotic Resistance Identification

Daria Janiszewska ¹, Małgorzata Szultka-Młyńska ^{1,*} , Paweł Pomastowski ² and Bogusław Buszewski ^{1,2}

¹ Department of Environmental Chemistry and Bioanalytics, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University, Gagarina 7, 87-100 Toruń, Poland

² Centre for Modern Interdisciplinary Technologies, Nicolaus Copernicus University, Wilenska 4, 87-100 Toruń, Poland

* Correspondence: mszultka@umk.pl or szultka.malgorzata@wp.pl

Abstract: The quick and accurate identification of microorganisms and the study of resistance to antibiotics is crucial in the economic and industrial fields along with medicine. One of the fastest-growing identification methods is the spectrometric approach consisting in the matrix-assisted laser ionization/desorption using a time-of-flight analyzer (MALDI-TOF MS), which has many advantages over conventional methods for the determination of microorganisms presented. Thanks to the use of a multiomic approach in the MALDI-TOF MS analysis, it is possible to obtain a broad spectrum of data allowing the identification of microorganisms, understanding their interactions and the analysis of antibiotic resistance mechanisms. In addition, the literature data indicate the possibility of a significant reduction in the time of the sample preparation and analysis time, which will enable a faster initiation of the treatment of patients. However, it is still necessary to improve the process of identifying and supplementing the existing databases along with creating new ones. This review summarizes the use of "omics" approaches in the MALDI TOF MS analysis, including in bacterial identification and antibiotic resistance mechanisms analysis.

Keywords: antibiotic resistance; bacteria identification; MALDI-TOF MS; identification methods; "omic" technique



Citation: Janiszewska, D.; Szultka-Młyńska, M.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. "Omic" Approaches to Bacteria and Antibiotic Resistance Identification. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9601. <https://doi.org/10.3390/ijms23179601>

Academic Editor: Anatoly N. Vereshchagin

Received: 28 July 2022

Accepted: 21 August 2022

Published: 24 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Multi-drug resistant bacterial infections disease cause 700,000 deaths globally every year. It is estimated that this number could increase to 10 million by 2050 [1,2]. According to the statistical data, multi-drug resistant strains have quadrupled worldwide. The recent work by Cassini et al. emphasizes that antibiotic resistance is currently one of the most significant public health challenges. It indicates a strong influence of resistant pathogens on the incidence of clinical infections [3]. The development of fast, accurate, and sensitive methods of identifying pathogenic clinical bacteria is essential for the correct microbiological diagnostics and the implementation of the individual antibiotic therapy. In addition, it reduces the chances of the development of multi-drug resistance [4]. Monitoring biological hazards in the environment and detecting pathogens in foodstuffs, such as *Salmonella* [5], *Listeria monocytogenes* [6], *Bacillus cereus* [7], *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* [8] are also crucial to protect human health. New antibiotics and therapies are urgently needed to control these infections, while new rapid and reliable diagnostic techniques are necessary to characterize strains.

Bacterial infections may lead to the development of diseases that are dangerous to life and health. They include diabetic feet [9], sepsis [10] or gonorrhea [11]. Various techniques are routinely used in clinical microbiology, including biochemical, serological, and chemotaxonomic molecular biology techniques. However, these methods are labor-intensive, time-consuming (lasting up to 3 days), and often inadequate to differentiate phenotypically similar species, particularly when using spectroscopic and spectrometric tools.

Mass spectrometry (MS) was developed in the late 19th century to measure the masses of atoms. The MS technique is an analytical approach used to measure the mass to charge (m/z) ratio of chemicals and to calculate their exact mass. Currently, the most common ionization techniques used to analyze chemical structures in biological systems are the laser desorption/ionization (LDI), matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI), or surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI) and electrospray ionization (ESI). It is becoming increasingly common to combine the MALDI-TOF MS with “-omics” approaches that take a holistic view of the molecules making up an organism. They are primarily aimed at the global detection of genes (genomics), mRNAs (transcriptomics), proteins (proteomics), lipids (lipidomics) and metabolites (metabolomics) in a biological sample.

2. MALDI-TOF MS Technique

The Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) method was developed in the 1980s. The name “MALDI” was first used in 1985 by Hillenkam et al. [12]. At the same time, the work on the MALDI technique and the possibility of its application to the protein analysis was conducted by Tanaka, for which he was awarded the Nobel Prize in 2002 [13]. In the late 1990s, the pioneering use of MS in microbiology showed that intact bacterial cells could be distinguished using the MALDI coupled to a time-of-flight (TOF) analyzer [14].

MALDI is a soft ionization technique in which samples are ionized to charge molecules, while their m/z can be measured. In this method, the analyte is mixed with a small molecule compound known as the matrix before measurement, which mediates the energy transfer to the test substance, facilitates the sample ionization and allows conducting the study of non-volatile, high molecular weight and polar substances. The matrices in the MALDI technique are compounds that absorb UV radiation well, quickly sublime and, after the desorption process, provide large amounts of ions (protons in a positive mode or anions in a negative mode) needed for the ionization of the test substance [5]. The principle of the technique is to deposit the analyte in a huge excess of the matrix compound deposited on a solid surface called a target, usually made of conductive metal and having spots for several different samples to be applied. After a very short laser pulse, the irradiated spot heats up quickly and becomes vibration-excited. The matrix particles energetically removed from the sample surface absorb the laser energy and transfer the analyte particles to the gas phase. During the ablation process, analyte molecules are usually ionized by protonation (positive ion mode $[M + H]^+$) or deprotonation (negative ion mode $[M - H]^-$) with nearby matrix molecules. The most common format for MALDI ionization is that analyte molecules carry a single positive charge [15]. Molecular weight is measured by mass spectrometry, and the detector calculates the time of flight of the ions (TOF). The basic principle of TOF is that ions of different m/z are time-scattered as they fly along a field-less drift path of known length. Assuming all the ions begin their transfer simultaneously, or at least in a short enough time interval, the lighter ions will reach the detector sooner than the heavier ones [16]. The final result of the analysis is the spectrometric spectrum, which shows the masses of the formed ions and non-ionized molecules. The signals are arranged according to the increase in mass.

The selection of an appropriate matrix is one of the key steps in the sample preparation protocol for the analysis. Examples of the matrices used in the MALDI-TOF MS technique are shown in Figure 1.

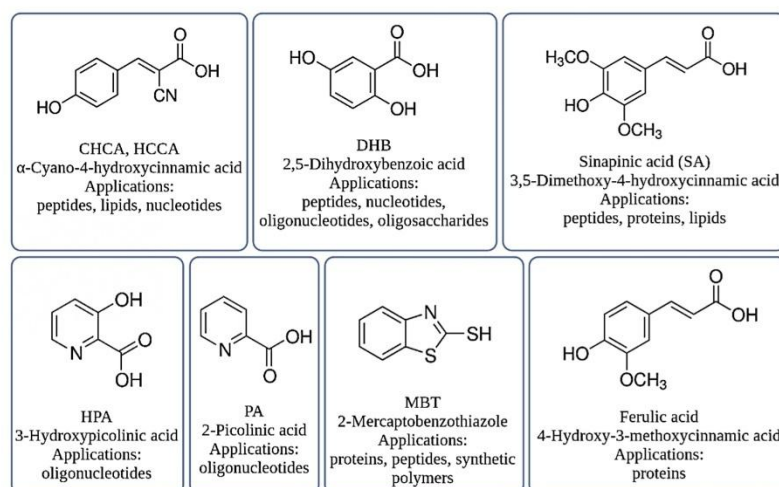


Figure 1. Examples of matrices used in the MALDI-TOF MS technique.

The most commonly used matrices in the MALDI-TOF MS analysis are 2,5-dihydroxy benzoic acid (gentisic acid, DHB), 4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid, SA), and α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA). The DHB matrix enables the analysis of oligosaccharides, glycopeptides and glycoproteins. DHB is more efficient for low-molecular-weight molecules, while SA and HCCA are especially used for protein studies [17]. The application of ferulic acid (FA) allows for proteins to be tested with a molecular weight of up to 70 kDa. For the same species, the mass spectrum fingerprints differ depending on the matrices used, which underlines the need for the careful selection of the appropriate matrix [18]. Despite many advantages of the HCCA matrix, such as better sensitivity and a greater number of signals at the lower mass limits, compared to FA and SA, HCCA shows a lower signal resolution and an increased degree of peak broadening. Moreover, the spectra generated with HCCA also lack mass signals as compared to e.g., ferulic acid. Fagerquis et al. reported that the use of sinapinic acid (SA) revealed more signals on the mass profile of *E. coli* bacterial cell lysates than in the case of HCCA [19]. Additional peaks appear at m/z ~208 greater than the m/z of the more abundant protein ion peak. Importantly, only those proteins containing cysteine showed reactivity with SA. Šedo et al. used a new protocol in which they used FA instead of HCCA as a template. They proved that the new protocol allowed them to extend the range of detected compounds towards a higher molecular weight and to generate signals with better mass resolution. As a result, the differentiation of *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter baumannii* strains was improved, while *A. nosocomialis* strains, incorrectly or ambiguously assigned using the standard protocol, were correctly identified [20]. The main disadvantage of using FA as a matrix, however, is the lack of the automatic acquisition of the mass spectra because it gives a heterogeneous layer of matrix crystals.

The molecules 2-mercaptobenzothiazole (MBT) or 5-Chloro-2-mercaptobenzothiazoles (CMBT) are used as a matrix for the ionization of lipids or phospholipids that make up cell walls and membranes (such as from intact Gram-positive bacterial cells or *Bacillus* spores). Scientists use several matrices to analyze lipid A, including DHB, 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP) and 6-aza-2-thiotimine (ATT) [21]. Although DHB is widely used for peptide analyses, it produces uneven crystals and leads to intra-sample variability (most commonly referred to as point-to-point reproducibility). In addition, low solubility in the lipid A compatible solvent and heterogeneity in the matrix layer (crystals) may lead to changes in the ionization efficiency throughout the sample [22].

Shu et al. investigated the lipid profiles of *Bacillus* spp. spores using the MALDI-TOF MS in silico. They analyzed several matrices: 2,5-DHB, 2,4-DHB, SA, HCCA, THAP and 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid (HABA). They showed that the matrix had no significant effect on the lipid analysis apart from the signal intensity. The mass spectra obtained from 2,5-DHB and HCCA had a lower signal-to-noise ratio and lower signal intensity. This may be due to the lower absorption coefficient of the matrices at the laser wavelength of 266 nm. HABA produced more matrix cluster ions with mass peaks above 900 m/z . These cluster ions can overlap with the mass peaks of the lipids. Therefore, HABA is not suitable for lipid ionization. A similar matrix effect phenomenon was observed in other bacterial mass spectra besides those obtained for 2,4-DHB and THAP, which are better matrices for lipid analyses at a laser wavelength of 266 nm and in a positive mode [23].

Xu et al. proved that CMBT provides excellent point-to-point repeatability due to the homogeneous crystallization of the analyte/matrix mixture over the sample point [24]. Moreover, CMBT is a soluble solvent compatible with the lipid A molecules and, therefore, is widely used for lipid A analysis [25,26]. Liu et al. on the other hand, studied the effect of the HCCA and CMBT matrix on the identification level and quality of the mass spectra of *Yersinia pestis*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus anthracis*, and *Staphylococcus aureus* bacteria. They showed that the best signals were obtained using CMBT. The HCCA matrix has a higher chemical activity than CMBT and is therefore susceptible to reactions with other reagents, which can result in a greater ionization effect and susceptibility to contaminants present in the sample [27]. Elhanany et al. compared HCCA and SA in the analysis of intact *B. cereus* group bacterial spores and observed that HCCA tends to give mass spectra in which characteristic molecules of lower masses are more pronounced, whereas SA seems to be more suitable for those of high masses. This finding was also supported by Horneffer et al. [28,29]. For the fungal spore analysis, inconsistent results were described regarding the effect of matrices on the mass spectrum. Armiri et al. compared SA, HCCA, FA, HPA and DHB, concluding that the use of SA allowed for obtaining the best quality spectra, and DHB the worst [30], while Valentine et al. found that ferulic acid enabled better results than SA [31]. Li et al., who investigated the possibility of using SA and HCCA, proved that both matrices were equally suitable for the analysis of fungal spores [32]. Similar inconsistent observations are described for the analysis of whole bacterial cells [33–35]. It was also observed that different batches, i.e., different suppliers and lots, of the same matrix substance lead to different peak patterns [28]. Nevertheless, these results demonstrate that the matrix selection for the MALDI-MS analysis of complex characteristic molecules is challenging.

Moreover, MALDI-TOF MS works in the positive and negative ion mode, along with the linear and reflectron mode, thus achieving four combinations: LP (linear positive), LN (linear negative), RP (reflectron positive), RN (reflectron negative). The key difference between positive and negative ionization in mass spectrometry is that the positive ionization is the process which leads to the production of positively charged ions, while the negative ionization is the process through which negatively charged ions are generated [36]. The workflow in the reflectron mode is almost the same as in the linear mode. The only difference is that when an ion hits the reflector, it will bounce and fly towards the detector. The reflectron focuses ions with the same m/z values and makes them reach the detector at the same time, resulting in a more accurate detection. By using different MALDI-TOF MS modes, a greater variety of results can be obtained from a single sample analysis [37–39].

The main advantage of the MALDI-TOF MS technique is that the identification time of microorganisms is significantly reduced by 24 to 36 h when compared to conventional techniques, and the analysis time is 5.1 min of hands-on time/identification. Another advantage of MALDI-TOF in microbiological diagnostics is the low unit cost of analysis (\$0.50/sample) [40]. In addition, the use of “soft” ionization in MALDI-TOF allows for the observation of ionized molecules with little or no fragmentation because the resulting ions have a low internal energy. The most significant limitation of MALDI-TOF is its low analytical sensitivity without prior cultivation and the discrimination of phylogenetically

related microorganisms such as *Shigella* and *Escherichia coli* [41]. Consequently, MALDI-TOF is unsuitable for detecting the small number of bacteria in sterile samples. Also, the initial equipment basket, around \$270,000, is a non-tape disadvantage [42]. Currently, it is also impossible to sequence individual bacterial proteins directly during the analysis in a linear mode.

Moreover, there are modifications to the MALDI technique, such as matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry (MALDI-FTMS), matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (MALDI-FT-ICR) or MALDI mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) allowing for the analysis of various types of molecules with often more excellent resolution and accuracy [43–45]. The techniques listed are described in more detail later in the manuscript.

3. Bacteria Identification

3.1. Proteomic

The proteome is the entire set of proteins present in a cell at any given time. Proteomics refers to the experimental analysis of proteins and proteomes, which often entails the protein purification and the mass spectrometry analysis. The amino acid sequences of many proteins differ between microorganisms, and many different analytical techniques are used to characterize and differentiate microorganisms based on the proteome analysis.

The gold standard in the identification and classification of bacteria is the sequencing of the gene encoding 16S rRNA (16S rDNA) due to its high conservation within species, inter-species variability and the stable rate of evolution. The 16S rRNA gene is universal in bacteria so that relationships between all bacteria can be measured, and the comparison of gene sequences enables the differentiation between microorganisms on the genus level and the classification of whippers on the species and subspecies levels.

The MALDI-TOF MS method detects proteins ranging in mass from 2 to 20 kDa, which mainly represent ribosomal proteins and essential metabolism proteins. Ribosomal proteins are among the most conservative proteins in all life forms [46]. The conservativeness of the ribosomal proteins and fragments of the 16S rRNA gene enable the use of the proteomic MALDI-TOF MS and sequencing to obtain comparable identification results [47]. The analysis of ribosomal proteins by means of MALDI-TOF MS allows profiling “fingerprints” that are characteristic of a microorganism and comparing the protein profile with the library of reference spectra. This, in turn, allows for the taxonomic position of the microorganism to be determined according to the level of the genus and, in many cases, also to the species or even strain [48]. The advantage of the MALDI-TOF MS technique over the 16S rDNA sequencing consists of the possibility of not only identification, but also the analysis of the response to environmental conditions, including the antibiotics used, and thus the detection of antibiotic resistance [41].

During the MALDI-TOF analysis, two parameters are assessed for each ion: the mass-to-charge ratio (m/z) and the relative intensity of the ion. The identification of microorganisms by means of MALDI-TOF MS is carried out by comparing the protein profile of an unknown organism with the reference profiles contained in the library. Depending on the degree of the similarity of the obtained spectrum and the reference spectrum, the microorganism is identified to the level of genus, species, subspecies or strain [49]. The procedure for analyzing bacterial proteins by MALDI-TOF MS assumes that using one colony (10^4 – 10^5 CFU/spot) of the tested microorganism is sufficient to obtain mass spectra. In the case of tiny colonies, this is not possible. The study must be retrieved by several colonies [50].

The MALDI-TOF MS analysis of bacterial proteins is possible using one of two strategies: the “bottom-up” methods for peptide mixtures derived from protein digestion (i.e., peptide sequencing) and the “top-down” method for the direct analysis of intact proteins, proteoforms and post-translational protein modifications [51]. The bottom up approach allows for the identification of proteins along with the characterization of amino acid sequences and post-translational modifications. This approach, however, requires the pro-

teolytic digestion of the peptides and often a pre-fractionation step. The digested samples are then analyzed by spectrometry. Differential expression using the bottom up approach often involves labeling the sample with isobaric tags prior to digestion. All bottom-up methods require high-resolution and high-performance instrumentation [52,53]. Dickinson et al. attempted to identify characteristic proteins in the MALDI-TOF MS profiles of *B. subtilis* and noted that assigning the appropriate signals to specific proteins was difficult. They also found that the separation of proteins, prior to using the bottom-up approach, was necessary to increase confidence in linking the identified proteins to signals observed in the MALDI-TOF MS profiles generated from intact bacterial cells [54]. Faqerusta et al. used HPLC and one-dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE) [55] to separate *Compylobacter* sp. protein extracts before identification. Schaller et al. also pre-fractionated proteins prior to identification, but they used two-dimensional gel electrophoresis (2D GE) instead of the simpler 1D approach [56]. A similar labor-intensive approach to profiling *Lactobacillus plantarum* cultures at the strain level with 2D GE and the Peptide Mass Fingerprinting technique (PMF) was described by Sun et al. [57]. Additionally, Schmidt et al. differentiated *Lactobacillus* strains, where they used the trypsin digestion of cells from *Lactobacillus* reference strains and strains from dental patients' teeth. The resulting digestion products were profiled using MALDI-TOF MS and a mass spectral library was created to categorize the unknown strains into their respective subspecies [58]. In contrast, Camara and Hays initially fractionated proteins using 1D SDS-PAGE and identified a PMF protein to confirm the ampicillin resistance (β -lactamase) in an ampicillin-resistant *E. coli* strain [59]. Unlike the bottom-up methods, in which the discovery of specific proteins is based on more specific and limited sample sets, the starting point for top-down proteomics can be hundreds of different complex biological samples. Researchers using top-down approaches are generally interested in solving clinical problems that require a larger number of samples, for example, biomarker discovery using body fluids such as blood, urine, plasma or saliva [60].

3.1.1. Database

In microbiological laboratories, there are mainly two MALDI-TOF systems that analyze intact proteins: microflex[®] LT/SH MS or Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) and VITEK[®] MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) [61]. Both systems are available in the Research Use Only (RUO) and in vitro Diagnostic (IVD) versions. In each case, the detection range of the TOF analyzer is quite similar, but each is based on its own sets and databases [62,63]. Species identification with the commonly used MALDI-TOF MS systems is based on comparing unknown spectra with spectral reference databases through pattern matching. The MALDI-TOF mass spectra consist of peaks from many intracellular proteins, including ribosomal subunit proteins present in high copy numbers in replicating bacterial cells.

The MALDI Biotyper uses a pattern matching approach [3] with a database containing references referred to as the Main Spectrum Profile (MSP). The similarity of the obtained and reference spectra is expressed as "log (scoring)" where the value ≥ 2.3 means "high confidence identification", between 2.0 to 2.3 means "secure genus identification", ≥ 1.7 and < 2 means "low confidence identification", and a score < 1.7 is interpreted as "no reliable identification". Besides this, the consistency of the 10 best results is another parameter to evaluate the identification. In the case of *Mycobacteria*, the following thresholds are adopted: ≥ 1.8 —high confidence level and ≥ 1.6 —low confidence level [64]. The described approach is the same for both RUO and IVD versions. The VITEK[®] MS system with the IVD version uses an algorithm based on machine learning, "Advanced Spectra Classifier". Spectra between 3000 and 17,000 Da are divided into 13,000 segments and then weighted according to their importance for identifying a given bacterial species. Unknown spectra undergo the same process to be compared successively with the Vitek MS database. The obtained results are given in percentages: 99.9%—perfect match, from 60% to 99.8%—good match, while values $< 60\%$ are considered as no identification. In the SARAMIS system (RUO by

Vitek MS), matching is calculated on the basis of typical strains that include intraspecific species diversity. The identification of unknown strains is made by a comparison with the spectra in the “SuperSpectra” database, and the confidence levels are given from high (>98%) to medium (85% to 98%) to low (75% to 85%) [65]. The research shows that both systems reveal similar identification rates [66,67].

MALDI-TOF MS analysis based on the database matching algorithm relies on fewer spectral attributes, such as the area under the peak and peak height, which are related to microbial species [68]. Consequently, there is much information contained in MALDI-TOF MS that remains untapped. Machine learning (ML) is a group of methods for finding patterns from specific datasets. Various ML algorithms, including k-nearest neighbors (KNN), naive Bayes (NB), random forest (RF) and support vector machine (SVM), are stable and reliable [69]. The ML model can use a large number of computations to discover non-intuitive or even counterintuitive statistical information from the learning set and use the learned pattern to classify the unknown test set [70]. In a recent paper, Weis et al. analyzed 36 studies implementing machine learning algorithms. These studies investigated bacterial species identification and antimicrobial susceptibility testing using MALDI-TOF MS. It is interesting to note that the vast majority of these studies used off-the-shelf classification methods in combination with relatively small datasets, usually containing less than a thousand samples and a minimal number of species, which are often restricted to a single family or even a single genus [68]. Mortier et al. conducted a large-scale comparative study of bacterial identification using MALDI-TOF mass spectrometry and machine learning methods. They implemented several traditional machine learning methods and several novel methods such as univariate conventional neural networks, hierarchical classifiers, and an out-of-decomposition detection method to identify *Leuconostoc* and *Fructobacillus* species. The results show that acceptable identification rates were obtained, but these numbers are typically lower than reported in studies with more limited analyses. Using hierarchical classification methods, researchers also showed that taxonomic information is generally not well preserved in MALDI-TOF mass spectrometry data [71].

Hyeon Park et al. compared the identification performance of the recently developed Autof ms1000 (Autobio Diagnostics Co., Ltd., Zhengzhou, China) with that of the Bruker Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). Studies reveal that both instruments showed comparable performance in the routine identification of clinical microorganisms [72]. Buchan et al., used the Mycobacterium Library v1.0 as an addition to the Mycobacterium specific spectral library used with the standard MALDI Biotyper software to identify the mycobacterium bacteria. The percentage of isolates generating an acceptable confidence result (≥ 1.7) increased from 50.6% (Biotyper standard library) to 89.8% (79/88) using the Mycobacterium Library v1.0 [73]. Farfour et al. analyzed a large pool of Gram-positive *Mycobacteria* using the Andromas system and reported the accurate identification of GPR species using the direct transfer with the additional ethanol treatment to fix and inactivate microorganisms [74]. The Andromas identification strategy is based on a limited number of species-specific profiles for each entry [75,76]. The unique feature of the Andromas database is that it was built without any extraction step. Regoui et al., on the other hand, developed a database to identify *Francisella tularensis* and distinguished it from the closely related species *F. tularensis* subsp. *novicida* and *Francisella philomiragia* [77]. They also found that incubation on chocolate agar plates supplemented with PolyViteX® at 30 or 37 °C in an aerobic or 5% CO₂-enriched atmosphere for less than 72 h allows for the accurate identification of *F. tularensis* subsp. *holarctic*. Korean scientists developed a new MALDI-TOF MS ASTA MicroIDSys system (ASTA, Suwon, Korea). Compared to 16S rRNA sequencing and the Bruker Biotyper system, the ASTA MicroIDSys showed excellent results in identifying clinically significant anaerobic bacteria such as *Peptostreptococcus anaerobius* [78], *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Finexgoldia magna*, *Parvimonas micra* [79] and aerobic *Mycobacterium* [80]. The Autof MS 1000ASTA and MicroIDSys systems are analogous to the MALDI BioTyper, the database is based on an isolate-specific refer-

ences approach, while for bioMérieux principles (e.g., Vitek MS) are based on taxonomical group-specific principles [81,82].

Another technique used to identify microorganisms is the approach that uses signals conserved from specific proteins found in bacterial cells. Ribosomal proteins proved to be one of the best biomarkers, because they are numerous, highly conserved and encoded by chromosomal genes. Their molecular weights range from 4 to 30 kDa, observed through MALDI-TOF MS [83]. Despite being highly conserved, interspecies and interstrain differences can be used in the typing and subtyping of microorganisms. Reference databases containing predicted weights of bacterial ribosomal subunits calculated directly from genomic sequences became an alternative to the pattern-based identification of bacteria in MALDI-TOF MS. A database PAMIDTM (Mabritec AG, Riehen, Switzerland) of putative protein masses for the identification was established, which was shown to complement reference databases such as SARAMISTM (Mabritec, Riehen, Switzerland) [83]. Suarez et al., on the basis of ribosomal signals, grouped the different strains of *Neisseria meningitidis* into six subgroups corresponding to sequence types [84]. This approach in the MALDI-TOF MS analysis was successfully used to distinguish subspecies and clone complexes of bacteria such as *Streptococcus agalactiae* [85] and *E. coli* [86]. This method was also used successfully by Toh et al. for the differentiation of *Acinetobacter haemolyticus* and *Acinetobacter* genomic species, including 13BJ/14T strains [87].

3.1.2. Sample Preparation

The key element in each “omic” approaches is the sample preparation stage. The methods of sample preparation to identify microorganisms using MALDI-TOF MS on the basis of ribosomal proteins include the preparation of ethanol–formic acid protein extracts, direct transfer and direct transfer with formic acid (Figure 2). Ethanol–formic acid extraction is the gold standard used to generate a reference database [88]. Schulthess et al. compared the three methods mentioned above to identify Gram-positive rods. The mass spectra analysis was performed by scientists using a Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). Their research showed that the identification rates for the direct formic acid transfer method were comparable to those of the ethanol–formic acid extraction procedure [89]. However, the protein extraction method is time-consuming [90]. Therefore, the direct transfer method is more effective in the routine clinical analysis. For many environmental strains such as *Legionella* spp., the direct sample transfer compared to the extraction procedure has no significant differences in the identification levels [91]. Direct sample transfer gives the best identification results for rod-shaped Gram-negative bacteria [92]. Worse outcomes were obtained for anaerobic bacteria, Gram-positive bacteria and some *Mycobacteria*. Studies show that *Bacillus subtilis* was misidentified as *Bacillus mojavensis* and vice versa, which may be due to the high similarity of the mass spectra of the two bacteria, which leads to eventual misidentification [93,94]. Gram-positive bacteria with a thick cell wall have a greater range of identification results, but are not always identified to the species level. In the case of these strains, it is difficult to obtain a smear that contains an adequate number of bacterial cells and is homogeneous [93,95]. To conclude, the extraction methods, due to higher protein recovery, are more preferable for MALDI detection of Gram-positive bacteria (in particular, sporulating bacteria).

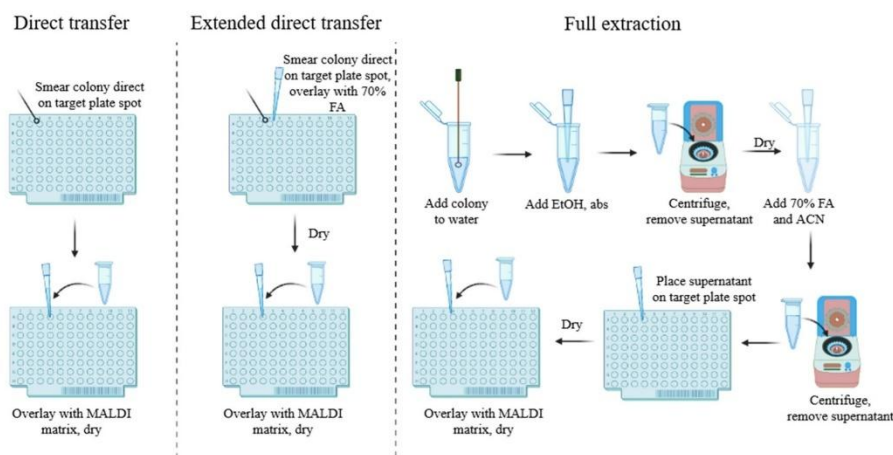


Figure 2. Sample preparation procedures by direct transfer, extended direct transfer, and full extraction using the ethanol/formic acid method.

Rotcheewaphan et al. developed a one-step method of extracting proteins from *Mycobacteria* using only a 1 µL loop of bacteria. Thus, they shortened the sample preparation time from 60 min to less than 10 min, ensuring clinically acceptable identification results (score > 1.8) [96]. The high level of identification caused that the application of bacterial colonies directly to the MALDI-TOF MS target plate became a standard protocol for the sample preparation in routine diagnostics [97].

In the case of the direct analysis of liquid clinical specimens, it is necessary to pre-clean the sample. Pathogen differentiation from positive blood cultures was described, among other things, by La Scola et al. [98]. The researchers used two protocols to prepare the samples. In the first one, a series of centrifugations were used, and then the pellet was suspended in acetonitrile (AN) and 20% trifluoroacetic acid (TFA) (1:1 v/v) and incubated for 15 min. In the second protocol, the time of each centrifugation was shortened, and formic acid and ACN (1:1 v/v) were added to the pellet. After the brief centrifugation, the supernatant was applied to the target plate. The results obtained by the researchers indicate that the first protocol allowed the identification of 94% of Gram-negative bacteria and only 37% of Gram-positive bacteria. Thanks to the use of FA instead of TFA (protocol two), the identification of Gram-positive bacteria increased to 67% and remained high for Gram-negative bacteria (88%). The latest research by Dai et al. describes a fast and simplified protocol to identify microorganisms directly from blood cultures on the basis of the addition of the Triton X-100 reagent and centrifugation [99]. The results of the research show that a high level of identification was achieved for *Enterobacterales* (96.81%), *Enterococcus* (92.31%), non-fermenting *Bacilli* (89.07%), and *Staphylococcus* (88.91%) within 20 min. Researchers confirmed that the identification factor for Gram-positive bacteria is lower than for Gram-negative bacteria.

Identifying microbes directly from biological samples is another challenge. The reason is most likely the difference in the cell wall thickness of these bacteria. Oviaño et al. directly identified bacteria from urine samples using MALDI-TOF MS [100]. They used a Sepsityper kit to prepare the sample. The reliable identification of 91% (503/553) of the samples was obtained by a direct analysis of MALDI-TOF MS urine samples. Identification at the species level was achieved in 88% (487/553) of the samples. Using a direct MALDI-TOF MS analysis, it was possible to identify the main pathogens present in each sample. The mean score for MALDI-TOF MS identification was 2.131. Mohan et al. research show that MALDI-TOF MS's direct identification can correctly differentiate bacteria in 73.83% of urine

samples [101]. Sun et al. developed a new method to diagnose pathogens through MALDI-TOF MS and UF-5000i urine flow cytometers directly from urine samples within 1 h [102]. Ying et al. investigated the possibility of using pathogen enrichment Fc-MBL@Fe₃O₄ with MALDI-TOF MS profiling to identify pathogens in samples cultured in liquid. They concluded that Fc-MBL@Fe₃O₄ could recognize and trap broad-spectrum microorganisms and could, therefore, be adapted to be combined with the MALDI-TOF MS technique [103].

The MALDI-TOF MS technique can also be successfully applied to identify sporulating bacteria and to analyze compounds that build up bacterial spores. For example, the release of proteins is a general problem in the spore analysis. In order to extract a large mass of analytically useful compounds, bacterial spores are treated with corona plasma discharges (CPD) or subjected to sonication [104]. The results of Ryzhov et al. suggest that the MALDI spectra allow the spores to be characterized as belonging to the *B. cereus* group (*B. anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*) contained peaks that became more visible when the spores were treated with CPD or sonication [105]. In contrast, Afonso et al. used bioactive slides to simplify the analysis of bacterial spores by specific surface absorption and the lysis of spores with strong acids [106]. Horneffer et al. applied wet heat treatment of portions of spore solutions of *B. subtilis*, *Bacillus cereus*, and *B. sporothermodurans* using two techniques. In the first one, deionized water was added to the spore suspension, while the samples were heated in a glycerin bath at 120 °C for 3 and 20 min, respectively, and then immediately cooled. The second technique was to heat the spore solutions in a water bath at 100 °C for 15–30 min. The research results show that both techniques of the wet heat treatment allowed for the release of characteristic proteins from bacterial spores, and thus improved the quality of the obtained protein profiles [28].

3.1.3. Identification Problems

The analysis of higher molecular weight proteins is problematic, because they do not ionize efficiently by MALDI from such a complex mixture as untreated lysate of bacterial cells. It also remains difficult to distinguish other closely related microorganisms such as the *Mycobacterium tuberculosis* complex, including *M. africanum*, *M. caprae*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. pinnipedii* and *M. canettii* [107]. Moreover, species with a low index of differences in their ribosomal protein sequences include *Shigella* spp., *E. coli*, certain *Stenotrophomonas maltophilia*, *Propionibacterium acnes* and *Streptococcus pneumoniae*. Members of the *Streptococcus oralis/mitis* group may be misidentified by MALDI-TOF MS [63]. Zloch et al. investigated the possibility of MALDI-TOF MS being applied to distinguish closely related salivary streptococci. They proved that the technique could correctly identify streptococcal bacteria by protein and lipid profiling. They also showed that comparable results could be obtained using the FTIR technique, but the interpretation of the breakouts required more time and technical experience [47]. Detecting specific coagulases allows for species differentiation from the *Staphylococcus* genus [108].

Pierce et al. decided to identify *Coxiella burnetii* as a highly infectious microorganism causing Q fever in humans, currently considered a potential bioterrorist agent in the US. Due to the high biological risk, the bacteria were exposed to gamma radiation before the MALDI-TOF MS analysis, which eliminates the viability of *C. burnetii*. The analysis method was validated by predicting unknown samples of *C. burnetii* in an independent test kit with 100% sensitivity and specificity for five of the six strain classes. The supervised pattern recognition via Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) was used to confirm the correctness of identification [109].

Jones et al. were the first to describe the use of the Fourier transform mass spectrometry (FTMS) combined with MALDI to analyze bacterial proteins directly from whole cells. It was shown that the accurate MALDI-FTMS mass can be used to characterize specific ribosomal proteins directly from *Escherichia coli* cells. Accurate mass measurements and high-resolution isotope profile data confirm the posttranslational modifications previously proposed based on low-resolution mass measurements. Seven ribosomal proteins were observed from whole *E. coli* cells with errors less than 27 ppm. This was achieved directly

from whole cells without fractionation, aggregation, or overexpression of characteristic cellular proteins [110].

3.1.4. ProteinChip Arrays

BioRad introduced ProteinChip Arrays with surfaces that selectively nurture proteins. Therefore, the company renamed MALDI-TOF MS to Surface-Enhanced Laser/Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS). The ProteinChip technique is a de novo approach to protein discovery where prior knowledge of specific proteins is not required. The essential elements of the described technology are ProteinChip arrays, ProteinChip reader and dedicated software. ProteinChip arrays are produced using different chemical properties of the surface (Figure 3), and according to Shah et al., three types of matrices, hydrophobic (H50), strong anion exchange (SAX/Q10) or weak cationic (CM10), can provide broad proteome coverage in all microorganisms [111]. Biological samples such as cell lysates, extracts or body fluids are applied to the ProteinChip Array, which allows proteins to bind to the surface based on chromatographic properties or specially designed biological affinity. Unbound molecules are flushed out, and proteins retained on the surface of the template are analyzed and detected using SELDI-TOF MS and the ProteinChip Reader. The obtained MS spectra are compared using differential protein mapping techniques, where the relative expression levels of specific molecular weights are compared using statistical and bioinformatics methods [112].

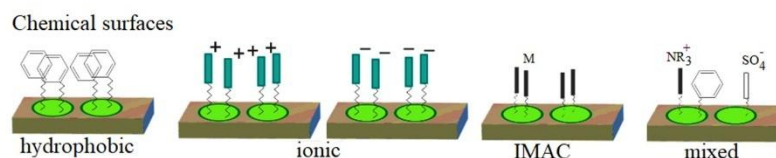


Figure 3. Examples of chemical surfaces in SELDI ProteinChip arrays.

Research by Rajakarun using the CM10 ProteinChip Array captured the most comprehensive wide range for *S. aureus* isolates [113]. This was also confirmed by the study of Shah et al., who, thanks to the SELDI-TOF MS technique and CM10, correctly differentiated *S. aureus* strains differing in resistance to methicillin [114]. Schmid et al. used a hydrophobic reversed-phase H50 surface to identify *Neisseria gonorrhoeae* causing gonorrhea. Preliminary studies of *N. gonorrhoeae* strains revealed subtle differences in mass spectral profiles, suggesting that SELDI-TOF MS is capable of detecting small differences in the protein expression between strains [115].

3.2. Lipidomic

A lipidome describes the complete lipid profile in a cell, tissue, or the entire body. Lipids are the main functional components of bacterial cells, which play a fundamental role in bacterial metabolism, energy storage and cell signaling. They constitute a barrier between cells and the external environment [116,117]. The cell membrane is the largest lipid reservoir in a bacterial cell. Lipids require modification to perform various functions in the cell and outside it, and the fatty acids themselves differ in the length of the chain and the number of double bonds [118]. The differences were also demonstrated in the lipid profiles of the cell walls of bacteria belonging to the same Gram type [119]. It is essential, apart from lipids present in all bacteria, to characterize the ones that are specific for a given species, showing a high degree of variability, thus enabling the species identification. Gram-negative bacteria are characterized by the presence of a membrane composed of lipopolysaccharide (LPS), which is an amphiphilic endotoxin. LPS is composed of lipid A, an oligosaccharide core and an O-antigen. The lipid A or O-antigen structure differs between the different species of Gram-negative bacteria [120–122]. On the other hand,

Gram-positive bacteria contain glycolipids, glucolipids and lipoteichoic acid (LTA), which is a typical component of the cell membrane.

Fischer distinguished five types of LTA (I-V) [123]. Type I is the most common characteristic of *S. aureus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. agalactiae* and *Streptococcus pyogenes* [124]. Type II and III were found in *Lactococcus garvieae* and *Clostridium inoculum*. They contained repeating units of glycosylalditol phosphate [125]. In type IV, LTA and WTA (wall teichoic acid) are substituted with choline, mainly in *S. pneumonia* [126]. Type V includes mainly macroamphiphiles, such as lipoglycans [127]. Moreover, in mycobacteria, unique long-chain fatty acids—mycolic acids—forming the outer membrane of bacteria were described [128–130]. Mycolic acids evince large structural differences, including changes in the chain length (from C₆₀ to C₉₀), the saturation level, and changes in chemical groups such as ketones and methoxy [131]. In addition, it was demonstrated, for example, that sulfolipid and polyacyltrehalose occurred exclusively in *M. tuberculosis*, while trehalose polyfate occurred in non-tuberculosis mycobacteria [132,133].

The possibility of identifying bacteria based on lipids was first introduced in the 1960s by Abel et al. using gas chromatography (GC) [134]. However, the GC analysis of fatty acids is time-consuming and the sample preparation is labor-intensive, being based on their derivatization to methyl derivatives. Therefore, lipidomics, based on mass spectrometry and combined with other analytical techniques, became a vital tool for the lipid analysis in cells, tissues and even whole organisms [135]. The increasing interest in microbial lipidomics led to the rapid development of lipid analysis techniques using MALDI-TOF MS. Research shows that the lipid analysis by MALDI TOF MS may be a promising tool for detecting antibiotic resistance, for example, in the case of rapidly spreading polymyxin resistance [136]. Commercially available databases used in the MALDI-TOF MS analysis, such as Bruker Biotyper or Vitek, were developed initially to elaborate on the protein profiles of bacteria [47,137,138]. The conducted studies show that lipidomic structures may be as strong or stronger than those based on proteomics [139–142].

The analysis of lipids or fatty acids requires the selected method of the extraction of these from the cells, such as extraction with organic solvents, division and concentration. The most commonly used methods are the Folch extraction, based on chloroform:methanol (2:1, *v/v*) solvents and Blight and Dyer approaches based on chloroform and methanol solvents (1:2, *v/v*) with the addition of aqueous salt solution to wash out the polar components [143]. Matyash et al. presented a new extraction protocol developed for profiling complex lipidomes. The method involves the extraction of lipids with methyl tert-butyl ether (MTBE)/methanol, which greatly simplifies sample handling and enables the automated processing of small quantities of biological samples. It was also found that lipid recovery from *E. coli* is the same or better than that obtained by the Folch method [144]. Leung et al., using MALDI-TOF in the negative ion mode, investigated the possibility of identifying ESKAPE pathogens (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp.) based on membrane glycolipids, especially glycolipid A. The technique is potentially an alternative to the currently used diagnostics [140]. Scientists used the hot ammonium isobutyrate microextraction protocol developed by El Hamidi et al. [145]. A new method of the rapid lipid extraction from the cell membrane using hot sodium acetate lysis Buffer was presented in the work of Liang et al. This method, combined with the database described above, enables the identification of pathogens from mono- and multi-organism samples in less than one hour [142].

After the extraction, these lipids could be analyzed by MALDI-TOF MS with an appropriate template to allow their ionization and desorption. Walczak-Skierska et al., for the analysis of lactic acid bacteria strains, used the HCCA originally developed for protein analysis [139]. Zloch et al., in addition to HCCA, used the DHB to identify the lipids of salivary streptococci [47]. Angelini et al. used 9-aminoacridine (9-AA), a matrix initially developed to rapidly analyze glycerophospholipids, for the direct lipid analysis of the highly halophilic archaea *Halobacterium salinarum* [146]. Another MALDI matrix, 1,8-bis(dimethylamino) naphthalene (DMAN), was used to identify the lipids of intact

Gram-positive *Lactobacillus anfranciscensis* and *L. plantarum* [147]. Larrouy-Maumusa et al. developed a new method that allows the direct MALDI-TOF MS analysis of lipids on intact microbes [148]. The main advantage of this approach is simple, quick sample preparation that does not require any chemical treatment or purification before the MALDI-TOF MS analysis. The heat-inactivated microorganisms are washed three times in double-distilled water and deposited on a MALDI target plate, and then on a MALDI matrix consisting of a 9:1 mixture of dihydroxybenzoic acid and 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid (super-DHB) dissolved in an a polar solvent system [148,149]. Using this approach, the microbial identification can be completed in less than 10 min for less than 1000 bacteria, making it a useful tool in the clinical laboratory [150]. This method has been hitherto used to differentiate *Mycobacteria*, filamentous fungi and the detection of lipid A in Gram-negative bacteria [151–153]. In the case of *Mycobacteria*, this approach provides accurate identification with the sensitivity and specificity of 96.7 and 91.7%, respectively. This method is also quite fast without sophisticated preparation steps. Additionally, studies have reported that using the negative ion mode favors the identification of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), while the positive ion mode is better for detecting non-tuberculosis mycobacteria (NTM) [150]. Khor et al. presented a new and simple method to detect subspecies-specific lipids used in the *Mycobacterium abscessus* complex (MABS) [154]. The researchers also used the super DHB matrix at a 10 mg/mL concentration but dissolved it in ethanol at 10, 25, 50, 70 and 100%. They also performed the raw mass spectra analysis for 5 McFarland dilutions (5, 10, 20, 30 and 50). They found that combining a matrix called super-DHB with 25% ethanol with a suspension of bacteria in McFarland 20 gave solid and reproducible data, enabling the discrimination of bacteria within strains of the MABS complex. Nevertheless, regardless of the ethanol concentration used and the McFarland dilution, the mass spectra showed two specific peaks for these bacteria.

Cox et al. developed an innovative laser metal oxide ionization (MOLI), which used cerium as a catalyst to convert bacterial lipids into taxonomically available fatty acids. Conversion occurs in situ when applying the lipid extracts to the MALDI target plate spotted with CeO₂. The CeO₂-MOLI MS method gave 100% accurate identification at the species and genus level, with only 2% of the incorrect identification at the level of the *Acinetobacter* strain [155]. Using the same technique, the strain level identification was obtained with 94% accuracy among nine different strains of the three *Staphylococcus* species using their fatty acid profiles [156]. Importantly for clinical microbiology, MOLI MS allowed for the correct identification of *Shigella* isolates, a bacterium routinely classified as *E. coli* based on the protein analysis [157]. However, overlapping bacteria and mammalian fatty acids may complicate the direct analysis of patient samples [140].

The possibility of identifying microbial lipids directly from bodily fluids such as blood, urine, and serum, thus omitting the stage of growing microorganisms on agarose plates or in a liquid medium, could constitute a breakthrough in microbiological clinical diagnostics. Leung et al. proved this by adding *S. aureus* or *K. pneumoniae* B6 to blood samples, incubating the bacteria for 6 h and recovering them by differential centrifugation. The lipids from the recovered microorganisms were then extracted and analyzed by MALDI-TOF MS in a negative ion mode. It was then possible to obtain excellent quality signals for 10⁴ CFU bacteria [140].

The challenge in the analysis of bacterial lipids by the MALDI-TOF MS technique is the selection of an appropriate extraction method along with a suitable matrix to obtain the mass spectra of the best possible quality. The MBT Lipid Xtract™ kit (Bruker, Germany) is commercially available, which facilitates efficient sample preparation for microbial lipid analysis, as well as also SimLipid® software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA, USA, SimLipid v.6.05 software), compatible with Bruker systems [158,159]. Despite a significant progress in optimizing the sample preparation, a further development of bioinformatics resources is needed to make the lipid analysis user-friendly in clinical diagnostic settings, including building robust and accurate databases. The development of representative lipid databases of comparable size and diversity to the protein mass spectral libraries currently provided

by commercial systems will improve the efficiency of microbial identification. Ryu et al. developed and tested a model spectral library for the MALDI-TOF-MS data analysis of bacterial membrane glycolipids, such as lipid A from Gram-negative bacteria and related species from Gram-positive bacteria. Their accomplishment may be important in improving the lipid analysis [141]. A significant drawback of the lipid analysis using the MALDI-TOF MS technique is primarily the background chemical noise arising from the matrix [160]. Another problem arises from the fragmentation in the source of some fragile lipid types. Some of these limitations can be addressed by using alternative matrices to minimize the fragmentation, higher pressure ion sources, and also by using MS/MS to filter out the background chemical noise [161].

3.3. Metabolomic

The metabolome is a complete set of small molecules (>1.5 kDa) involved in the metabolism present in cells [162–164]. Bacterial metabolism is a highly complex source of bioactive compounds, many of which have significant consequences for human, animal and plant health [165]. The unique bacterial metabolites are analyzed and used for microbial identification, antibiotic resistance development and also as biomarkers for disease detection [166]. The metabolites are classified into primary and secondary metabolites. Primary metabolites are directly involved in the proper development of the body. Secondary metabolites play a significant ecological role and arise during the stationary phase of bacterial growth. The entire metabolites secreted outside the microbial cell are called the exometabolome [167]. The analysis of the exometabolome provides information on the microbial activity under various culture conditions, which, combined with the intracellular metabolic profile, provides a comprehensive overview of microbial metabolism [168].

Microbial metabolomics is becoming more and more widespread in many areas of microbiology and infection research [169,170]. For example, this method proved effective in distinguishing between different strains of *Bacillus cereus* [171], characterizing and differentiating drug susceptibility phenotypes in *Leishmania donovani* [172] to identify volatile metabolites in different *P. aeruginosa* strains [173] and to describe the metabolic adaptations of *P. aeruginosa* strains colonizing various niches in the lung of cystic fibrosis [174]. Kamari et al. conducted tests to detect condensates of volatile organic compounds (VOCs) in three bacteria: *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, and *K. pneumoniae*, which may be biomarkers used to identify these bacteria. They found common and characteristic compounds for the given bacterial species [175]. The concept of using microbial VOCs as ‘signature markers’ could provide a faster and non-invasive diagnosis. Finding biomarkers is difficult due to the specificity required in complex matrices. Research by Maurer et al. shows that the VOC sets produced by *Mycobacteria* ssp. change over time and that different strains produce different VOCs [176]. Studies by Moyne et al. found differences in the virulence-related metabolome in several clinical *P. aeruginosa* strains isolated from inert infections in hospitals across Europe [177]. The best known bioactive bacterial metabolites influencing human health include short-chain fatty acids such as propionate, butyrate and acetate, which significantly impact inflammatory bowel disease and colitis [178–180].

Laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MSI) imaging is a powerful tool for visualizing bacterial metabolites in microbial colonies and biofilms and their interactions. This technique enables a direct visualization of the spatial distribution of metabolic signals by collecting spectra at specific locations in the sample. The active application of IMS with MALDI-TOF for the analysis of microbial samples grown on agar did not begin until the Dorrestein laboratory [181,182]. Advanced software allows for the processing and display of the obtained mass spectra in heat maps, which reveals the location and relative intensity of the analytes. Using MALDI-MSI, Bleich et al. identified *m/z* peaks showing spatial distributions superimposed on fluorescence and thus representing putative biofilm-stimulating molecules. This method allowed them to predict and confirm that the thiazolyl antibiotics and thiocillins were metabolites produced by *B. cereus* that stimulated the expression of biofilm genes in *B. subtilis* [183]. The use of MALDI-MSI allows carrying

out the rapid identification of metabolic differences between closely related strains. This is confirmed, among other things, by a comparative study of *Lysobacter* strains grown along with *Rhizoctonia solanii*. Comparing monocultures with fungal cultures illustrates how phylogenetically related species can overflow various metabolomic profiles. Moree et al. used MALDI-TOF and MALDI-FT-ICR imaging mass spectrometry (MALDI-MSI) in conjunction with MS/MS networks in their research. This enabled the visualization and identification of metabolites secreted by *P. aeruginosa* and *A. fumigatus* into the culture medium and they observed interactions between organisms at the molecular level [184]. Additionally, mapping the metabolic profiles of *Lysobacter* strains allowed identifying specialized metabolites, which was predicted on the basis of the genome analysis [185]. Moreover, MALDI-MSI enables the observation of complex metabolic pathogen–host interactions in vivo along with the study of other small molecules, including pharmaceutical compounds. An example would be pathogen–pharmaceutical interaction analysis using MS/MS methods to monitor the antibiotic moxifloxacin in the lungs of rabbits infected with *M. tuberculosis*. The obtained results allowed the researchers to conclude that the drug distributor was heterogeneous within the kernels, with relatively lower concentrations in the kernel centers identical to the sites of infectious outbreaks [186]. In the case of MALDI-FT-MS, Jones et al. studied *E. coli* lipids in the low-mass region (m/z 100–1000) [187]. They identified two main components, phosphatidylethanolamine and triglycerides, commonly found in prokaryotic membranes. The same group described *Saccharomyces cerevisiae* lipid analysis methods with conventional MALDI-FTMS [188].

Chase et al. developed a data acquisition and bioinformatics (IDBac) technique for metabolomic identification that uses the MALDI-TOF MS method to analyze the spectra of proteins and metabolites recorded from single bacterial colonies [189]. It attempts to combine protein testing with the metabolite analysis to distinguish easily between closely related colonies. This technique organizes bacteria into similar phylogenetic groups and allows the metabolic differences of hundreds of isolates to be compared in just a few hours. The IDBac system is free of charge and only requires access to a MALDI-TOF mass spectrometer. Scientists validated the system's performance by distinguishing the two strains of *B. subtilis* in less than 30 min based on their differing ability to produce the cyclic peptide antibiotics surfactin and plipastatin.

Nguyen et al. adapted the METASPACE cloud software to image the MS metabolite database. Scientists showed that the software used, in conjunction with the relevant specialized metabolite database, could describe specialized microbial metabolites on the basis of agar MS imaging data. This is evidenced by the description of 53 ions representing 32 specialized metabolites validated against the correct taxonomic classification in The Natural Products Atlas [190].

Extremely dangerous secondary metabolites that can lead to acute and chronic poisoning (also fatal) can also cause allergies, fungal infections, respiratory, gastrointestinal and liver diseases. Numerous diseases associated with a weakened immune system are caused by mycotoxins produced by fungi of the genera, among others, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* [191,192]. Mycotoxins are heat stable and exhibit high levels of bioaccumulation. Hleba et al. investigated the detectability of six different types of mycotoxins: aflatoxin B1, citrinin, deoxynivalenol, zearalenone, T2 toxin, and griseofulvin. The researchers learned that it is possible to detect mycotoxins using a MALDI-TOF Microflex LT mass spectrometer operating in a linear positive ion mode and using an HCCA matrix in a very short time [193]. Very similar conclusions are drawn by the researchers focusing on the identification of mycotoxins produced by *Alternaria* [194] or *Fusarium* [195] fungi.

Mass spectrometry-based metabolomics generates a wide array of data with a very large number of peaks, especially in the case of MSI, where one data set consists of thousands of pixels, each represented by an information-rich mass spectrum. Spectral information is affected by many factors, such as known adduct formation and less-characterized chemical background signals. There is a lack of easy methods to distinguish background chemical signals from actual metabolite signals. [196]. One of the main reasons for the

lack of signal identification at the molecular level is the structural diversity (isobars and isomers) and the dynamic range of metabolites. In addition, there is a lack of commercial analytical standards (only a few thousand are available) that are needed for metabolite identification [197].

3.4. Genomic

Genomics is a branch of molecular biology that deals with the analysis of the complete genetic material of organisms—the genome. The bacterial genome is a circular DNA molecule called the bacterial chromosome. Additionally, prokaryotes have circular, extra-chromosomal DNA molecules called plasmids containing virulence and antibiotic resistance genes. Whole-genome sequencing has become the gold standard in studying bacterial phylogenetic relationships. The 16S rRNA (rDNA) gene is the most commonly used for bacterial identification.

The first person to use MALDI-TOF MS to detect DNA was Hurst in 1996. He used 3-hydroxypicolinic acid as a template and detected 108- and 168-basePCR products specific to *Legionella* in the negative ion mode [198]. Two years later, the scientist used the same method to identify genes characteristic of the bacteria *Methylosinus* and *Methylomicrobium*. The measurement of DNA by MALDI-TOF MS is limited as double-stranded nucleic acid is usually not detected due to the acidic nature of the templates. The MALDI resequencing (MALDI-RE) method uses RNA molecules that are more stable during the MALDI ionization. This method is based on the PCR amplification of several ordinal or tandem repeat genes (VNTR). The resulting amplicons are transcribed in vitro; the products are cleaved with specific RNases. The mass spectra of desalinated RNA fragments are measured linearly with a mass range up to 10,000 m/z . Then, the spectra are compared with the results of the in silico analysis to identify the tested microorganisms. The agreement between the described method and multi-locus sequence typing (MLST) constitutes over 98% [199].

In the early 2000s, von Wintzingerode et al. developed a rapid 16S rRNA (16S rDNA) gene identification approach to the microbial identification, combining the uracil-DNA-glycosylase (UDG)-mediated fragmentation of PCR products with MALDI-TOF MS. The amplified 16S rRNA sequences in the presence of deoxyuridine triphosphate (dUTP) instead of thymidine triphosphate (dTTP) were immobilized on streptavidin-coated solid supports [200]. This enabled the selective production of sense and antisense matrices. The single-stranded PCR products were then treated with uracil-DNA glycosylase to generate T-specific basic sites. The amplicon fragmentation by the base treatment was also performed. MALDI-TOF MS was then used to analyze the resulting fragment patterns. The study distinguished between *Bordetella* species and closely related *Alcaligenes* and *Achromobacter*.

On the basis of the in silico pattern database of proprietary sequences and the 16S rDNA sequence database, 24 mycobacterial isolates were correctly identified. Repeated experiments showed high reproducibility. The platform is not limited to identifying 16S rDNA. Still, it can be extended to other genotypic markers, e.g., *gyrB* sequence polymorphism analysis for differentiation of the *M. tuberculosis* complex, multi-drug resistance regions or multilocus sequence typing, further broadening its application [201]. Cuénod et al. identified clinically essential and now often misdiagnosed *Klebsiella* spp. They used the whole-genome sequencing (WGS), the comparative genomic analysis and the in silico protein mass prediction of ribosomal subunits from WGS data. A diverse selection of bacterial isolates ($n = 50$) representing at least eight *K. pneumoniae* isolates sequenced throughout the genome was used to validate the detection of the predicted marker masses in the MALDI-TOF mass spectra. Based on a systematic comparison of WGS and in silico ribosomal mass prediction, researchers proposed a MALDI-TOF MS analysis to discriminate between eight *Klebsiella* species [202].

Dunne et al. developed a sequence-typing method MLST by mass spectrometry, making it possible to compare the peak patterns of the cleavage fragments of specific PCR amplicons with the reference sequence assigned to isolates sequence types. Such an analysis may increase the chance of identifying subgroup-specific biomarker peaks. MLST is used

for the global surveillance of bacterial pathogens. Through MLST and MALDI-TOF MS, the same researchers discovered seven new alleles and 30 previously unreported sequence types of *S. pneumoniae* isolates [203]. Ha et al. used The Korean TrueBac ID system to identify the bacteria on the basis of the entire genome of the bacteria. They proved that the method used could differentiate pathogens in opposition to the standard MALDI-TOF MS method and 16S rRNA sequencing [204].

Sequenom Inc. launched the MassARRAY system combining MALDI-TOF MS with endpoint PCR. Currently, it is still not used in the clinical diagnosis of microbiology. The system enables the identification of microorganisms based on the target DNA transcription and base-specific RNA cleavage. The usefulness of this technique in the differentiation of microorganisms was confirmed by many researchers [205–208].

4. Antibiotic Resistance

The effectiveness of and easy access to antibiotics has led to their overuse, which, in turn, has led to the development of drug resistance among microorganisms [209,210]. The consequences of the emergence of drug resistance were the discovery, development and implementation of new β -lactam antibiotics, which started in 1950, the period known as the “golden age of antibiotic discovered” [211,212]. Soon, the first cases of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) were discovered [212]. As a result, the effectiveness of antibiotics in treating bacterial infections has significantly diminished in the recent years. The consequence of this is the development of new antibiotics. Nevertheless, the effectiveness of antibacterial drugs in treating bacterial infections has decreased in the recent years. The continuous selection pressure of various drugs has led to the emergence of bacteria with additional resistance mechanisms, resulting in the emergence of multi-drug resistant bacteria (MDR), extensively drug-resistant bacteria (XDR), and pan-drug resistant bacteria (PDR), called superbugs [213].

Serious infections include nosocomial infections due to multidrug-resistant strains of bacteria such as *A. baumannii*, *C. difficile*, *Enterobacter* spp., vancomycin-resistant *enterococci* (VRE), *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. pneumoniae*, extensively drug-resistant *M. tuberculosis* (XDR-TB) or MRSA, considered to be the most common superbug [213–216].

Furthermore, with the advent of incurable strains of Enterobacteriaceae resistant to carbapenems, humanity was on the threshold of the post-antibiotic era [217]. Carbapenem resistance is one of the most troublesome for antibiotic resistance, as infections with carbapenem-resistant bacteria have a 48% mortality rate [218].

The “gold standard” used to assess the susceptibility of microorganisms to the antibiotics used is the disc diffusion method introduced by Bauer and Kirby in 1956, using the phenomenon of the formation of a concentration gradient in the substrate during the diffusion of the active substance from the antibiogram disc [219]. A significant achievement in the routine analysis of widespread antibiotic resistance in bacteria was the development of epsilometer testing (E-test). Plastic E-test strips are coated with predefined concentrations of antibiotics, and the appropriate minimal inhibitory concentration (MIC) ranges are marked on the surface of the strip [220]. The identification of antibiotic resistance can also be made by searching for the homology of DNA sequences against a database. For this purpose, several reference databases were designed, including the Antibiotic Resistance Gene Database (ARDB) [221], Structured Antibiotic Resistance Gene Database (SARG) [222], Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [223] and ResFinder [224].

The first successful use of MALDI-TOF MS to detect antibiotic resistance was the observation of β -lactam ring hydrolysis after antibiotic exposure to β -lactamases produced by aerobic and anaerobic bacteria. The evidence of positive results was demonstrated on mass spectra where signals characteristic of the drug used and its hydrolysis products were visible. Other LDI techniques, such as nanotechnology-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (NALDI-TOF MS) and SELDI-TOF MS, were also used to

identify antibiotic resistance. Similar to identifying microorganisms, resistance to antibiotics can occur through proteomics, lipidomics, metabolomics, and genomics.

4.1. Proteomics

In *Staphylococcus*, there are methicillin-resistant (MRSA) and methicillin-sensitive (MSSA) strains [225]. This makes it difficult to classify these strains into two different groups. Partial success was achieved by developing a method involving the production of a phenol-soluble protein toxin (PSM-mec) by a subset of MRSA strains that is detectable by MALDI-TOF MS at the peak of 2415 ± 2.00 *m/z*. The “MBT Subtype Module” software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany, flexAnalysis software version 3.4) was developed to detect PSM-mec in the mass spectrum of *S. aureus* isolates, providing the indirect evidence of methicillin resistance [226,227]. However, the use of PSM in identifying MRSA is not very reliable. This method has high specificity, but low sensitivity and is therefore no longer used as commercially available software [228,229]. In addition, there are other examples of the subtype module. One of them is the use of MALDI-TOF MS and the CarbaNP test for the rapid identification of *Bacteroides fragilis* strains with the *cfiA* gene, which is responsible for developing resistance to carbapenems [228].

Researchers recently reported a method to determine bacterial sensitivity using the direct-on-target microdroplet growth assay (DOT-MGA), which is straightforward, practical, and quick to perform. For the DOT-MGA analysis, the bacteria are incubated with and without the indicator antibiotic in the microdroplets nutrient broth directly on the MALDI-TOF MS targets. The evaporation and drying out of places is solved by storing the plate in plastic containers with water at its bottom. By assessing the growth in the presence of various antibiotics, it is possible to determine the sensitivity of the isolate and analyze the potential mechanisms of drug resistance. Nix et al. investigated the possibility of using DOT-MGA to rapidly detect MRSA in patients with positive blood culture bottles using cefotaxime. The researchers calculated that the optimal size of the microdroplets is 6 μ L [229]. The authors analyzed three sample preparation methods: continuous broth dilution, lysis/centrifugation, and differential centrifugation. The results showed that lysis/centrifugation and 4-h incubation led to the best reliability, sensitivity and specificity. In the MRSA analysis, an additional step was to destroy the cell membrane by adding formic acid before adding the matrix. This step could be omitted when performing DOG-MGA on Gram-negative bacteria. Idelevich et al. determined carbapenemase resistance in *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *P. mirabilis*, and *K. aerogenes*. Additionally, they examined the fourth pretreatment method, filtration/dilution, but observed that lysis/centrifugation and a 4 h incubation of bacteria gave the best results [230].

Another test based on MALDI-TOF MS is the resistance test that detects isotope-labeled, stable (non-radioactive) amino acids that are incorporated into newly synthesized bacterial proteins (MBT RESIST) [231]. In this approach, the deficiency of the corresponding amino acids in the culture medium is supplemented with either radio-labeled amino acids or labeled amino acids in combination with the antibiotic to be tested. The culture media labeled with specific isotopes is the main limitation of this approaches [232]. Microorganisms are grown simultaneously on two different media, one containing the ^{12}C isotope and the other with ^{13}C as the carbon component. The susceptibility/resistance of bacteria is determined by the amount of radio-labeled amino acids incorporated into the newly synthesized proteins. The growth of resistant bacteria is observed in the presence of an antibiotic containing ^{13}C in its polypeptides. This shifts the signals to higher *m/z* values in the mass spectrum. The MBT RESIST approach was used to examine antibiotic resistance in MRSA strains using oxacillin and cefoxitin and to detect ciprofloxacin, meropenem and tobramycin resistance in *P. aeruginosa* after 3 h of incubation [231]. The method's difficulty is that the masses of proteins represented by the tested signals must be previously known and conserved for all species strains [228].

Antibiotic resistance can also be determined using semi-quantitative mass spectrometry using the MBT ASTRA approach, which can be used for all antibiotics and microbial

species classes. The technique consists of calculating and comparing the areas under the curves (AUC) of the spectra of bacteria exposed or not to the antibiotic [229]. If the microbial strain is susceptible, the AUC of the bacterial suspension with the antibiotic will be lower than it would be without it. In contrast, the AUC with or without the antibiotic will be comparable for the resistant strain. Ceysens et al., using MBT ASTRA, successfully assessed the sensitivity of *M. tuberculosis* strains to rifampin, isoniazid, linezolid and ethambutol, as well as non-tuberculous mycobacteria to rifampin, isoniazid, linezolid and ethambutol [228]. The main disadvantage this approach is complicated and a multistep procedure, with has limited its common application in routine analysis [232].

4.2. Lipidomic

Changes in the lipid composition of bacteria are also associated with developing drug resistance. A common mechanism of resistance is the modification of the lipopolysaccharide (LPS), which, among others, includes the modification of the A-lipid regions. In addition, the use of antibiotics enables the release of lipopolysaccharide (LPS), which is an important cause of the development of septic shock in patients treated for severe infections caused by Gram-negative bacteria. It is generally accepted that LPS from the outer membranes of Gram-negative bacteria is responsible for many of the clinical symptoms of sepsis [233].

The resistance of ESKAPE pathogens to colistin is given by the *mcr-1* gene encoding phosphoethanolamine transferase (PE). Its expression leads to the modification of PE lipid A, reducing its total negative charge. The MALDI-TOF MS analysis of three ESKAPE clinical pathogens (*K. pneumoniae*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa*) with *mcr-1* by Liu et al. demonstrated PE to lipid A and revealed that even strains showing slight decreases in sensitivity had a modification of the PE of lipid A [234]. These results indicate that the MALDI-TOF MS technology may be a valuable tool in monitoring the spread of *mcr-1* among pathogens. Dortet et al. used the MALDx test based on the MALDI TOF-MS technique to detect *A. baumannii* resistance to colistin. The test accurately detected all colistin-resistant bacterial isolates within 15 min with limited sample preparation before the MALDI TOF-MS analysis. Standard methods require 24–48 h to obtain a result [151]. The research by Lopalco et al. in 2017 identified unique acid glycerophospholipids: cardiolipin, and monoliscardiophilin in *A. baumannii* using MALDI-TOF MS thin layer chromatography (TLC). The knowledge of these compounds allows for determining the resistance of bacteria to environmental factors and antibiotics [235]. The rapid detection of colistin resistance based on lipid A modification is also possible thanks to the new MBT LipidArt software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) using MALDI Biotyper® sirius System analysis in negative ion mode.

Bisignano et al. showed the potential correlation between *S. aureus* lipid profile, the site of infection, antibiotic resistance, and cell surface hydrophobicity [236]. Researchers showed that bacterial lipid profiles differed both qualitatively and quantitatively between different strains of *S. aureus*, and this change affected both antibiotic resistance and cell surface hydrophobicity.

4.3. Metabolomic

MBT-ASTRA is a rapid antibiotic resistance detection method based on the MALDI-TOF MS software tool AUC [237]. Another test, the MBT-STAR-BL assay, is already a widely studied functional assay analyzing the bacterially induced hydrolysis of β -lactam antibiotics [238,239]. Hydrolysis is monitored by observing specific mass shifts, which in most cases are detectable after an incubation time of 30–180 min. The suitability of the MBT STAR-Cepha and MBT STAR-Carba tests for detecting bacteria producing extended action β -lactamases (ESBL) and carbapenemases was also assessed. The authors compared the investigated techniques with covert methods such as microdilution or PCR amplification. Studies show that the MBT STAR-Cepha kit effectively distinguished between resistant strains of third-generation cephalosporin-sensitive phenotypes. In addition, the MBT STAR-Carba kit accurately detected antimicrobial resistance by carbapenemase producers.

The obtained results suggest that the target bacterial strains, antimicrobial susceptibility phenotypes and resistance genes were necessary for utilizing MBT STAR-Cepha and MBT STAR-Carba kits based on MALDI-TOF MS in routine bacterial diagnosis [240,241].

4.4. Genomic

Currently, the most common use of MALDI-TOF MS in genomic research is for genotyping and detecting single nucleotide polymorphisms responsible, among other things, for antibiotic resistance. SNPs are DNA sequence variations that occur when a single nucleotide in a genome sequence is replaced with another [242]. For discovering new SNPs and bacterial fingerprinting, re-sequencing methods may be helpful, which involve sequencing part of an individual's genome to detect sequence differences between the individual and the standard genome of the species [243,244]. One proposed MALDI-TOF MS-based approach for detecting *K. pneumoniae* resistance to carbapenems is based on identifying plasmids carrying *blaKPC* carbapenemase genes [245,246].

The MassARRAY system involves adding SNP sequence-specific extension primers to the amplified PCR product for a one-base extension at the SNP site. The prepared analytes are then co-crystallized with the chip array and analyzed by MALDI-TOF MS. SNP genotyping on the MassARRAY system combines multiplexed primer extension chemistry with highly sensitive mass spectrometry. This combination provides the precise, rapid, cost-effective analysis of hundreds of genotypes daily. MassARRAY technology allows the analysis of SNP combinations in 96- or 384-well plates. Furthermore, it is possible to analyze at least 40 SNPs per well [247,248]. Si et al. proved that the MassARRAY system based on the MALDI-TOF MS technique detected 60 copies of *Mtb* gene mutations associated with the emergence of resistance to rifampicin and isoniazid, streptomycin, quinolone or aminoglycosides [249].

Pu et al. used whole genome re-sequencing to obtain differences in genomic levels between *A. baumannii* strains. Diversity was determined by multi-locus sequence typing, and the genetic relationship between ten strains and others was examined by phylogenetic analysis. They conducted a comparative analysis focused on resistance genes related to insertions and deletions and single nucleotide polymorphisms (SNPs) to identify the primary mechanism of *A. baumannii* resistance [250]. Another example is the study by Suzuki et al., who performed genome re-sequencing analyses for each drug-resistant *E. coli* strain tested to identify fixed mutations and changes in gene expression. Moreover, they looked at how acquiring resistance to one drug alters the resistance and susceptibility to other drugs. By integrating this data and using a simple mathematical model, scientists demonstrated how to quantify drug resistance based on the expression levels of a small number of genes [251].

Ikryannikova et al. presented an approach using the MALDI-TOF MS-based micro-sequencing reaction to detect the SNPs responsible for extending the substrate specificity of β -lactamases towards oxymino-cephalosporins in *E. coli* and *K. pneumoniae*. In this work, the described approach was mapped to the analysis of polymorphisms in three codons of the *bla_{TEM}* gene. The MALDI TOF MS-based mini-sequencing assay can detect and differentiate all key mutations conferring β -lactamase activity from the wild-type sequence. Different mutations at the same site are distinguishable due to the apparent differences in mass peaks. The main advantage of the developed test is its high level of reliability: all polymorphisms identified by the mini sequencing technique were confirmed by direct DNA sequencing results [252].

5. Biofilm and Development of Antibiotic Resistance

Biofilms constitute a protective barrier for pathogens, enabling them to survive in stressful environmental conditions. Research into the development and control of biofilms using new techniques is crucial in medicine and environmental research. Biofilm plays a pivotal role in surviving external threats and toxic materials, including antimicrobial drugs [253]. Biofilm formation occurs in four basic steps: reversible adhesion, irreversible

adhesion, biofilm maturation and cell dispersion. At the stage of biofilm maturation, the bacteria begin to secrete extracellular polymeric substances (EPS), which constitute up to 90% of the mature biofilm structure [254]. EPS comprises polysaccharides, proteins, extracellular DNA (eDNA), and lipids [255].

Gram-positive and Gram-negative bacteria can form biofilm on medical devices, implants, and surgical wounds or teeth. It is estimated that *S. aureus* and *S. epidermidis* cause about 40–50% of heart valve prosthesis infections, 50–70% of catheter biofilm infections and 87% of bloodstream infections [256]. Two-thirds of infections associated with implanted devices are caused by staphylococcal species such as *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci [257,258]. *P. aeruginosa* quickly adapts to harsh conditions and antibiotics and is widely used as an in vitro model to study biofilm formation [259].

Resistance to antibiotics in the bacterial biofilm occurs as a result of the slow or incomplete penetration of the drug by the polymer matrix, the interaction of the drug with this matrix, a result of which being that the antibiotic loses its properties, the presence of enzymes such as β -lactamases, genetic changes on target cells or hiding target sites, extrusion antibiotics using efflux pumps [260], and the company of an outer membrane structure such as that of Gram-negative bacteria [261]. It was shown that mycolic acids in *Mycobacterium smegmatis* EPS may be associated with higher resistance to antibiotics [262]. Adibi et al. showed the biofilm production was higher in MDR *P. aeruginosa* strains than in strains without MDR [263]. The presence of multi-drug resistance in *A. baumannii* strains also increased the biofilm production, as confirmed by the studies by Amin et al. [264]. Manandhar et al. linked the biofilm production in *S. aureus* to methicillin resistance [265].

On the other hand, many studies fail to prove a direct relationship between the MDR phenotype and the increased bacterial biofilm production [266,267]. Caputo et al. showed that MALDI-TOF MS could be used to differentiate quickly and accurately clinical *S. epidermidis* isolates as biofilm producers. The researchers identified clinical strains derived from suture wires, and their protein profiles were compared with those obtained from two ATCC reference strains (biofilm producer and non-producer). Using the MALDI method they identified eighteen isolates as *S. epidermidis* by matching sixteen profiles to the biofilm producer and two to the non-producer, supporting the crystal violet test results [268].

The use of MALDI-TOF MS also allows for predicting the influence of substances secreted by one bacterium on the impact on the physiology of neighboring microorganisms, including the activation or inhibition of the expression of the biofilm genes. Bleich et al. used MALDI-IMS to identify thiocillins, antibiotics of the thiazolyl peptide group. These compounds produced by *B. cereus* induce the biofilm matrix produced by *B. subtilis*. Researchers found that thiocillin increased the *B. subtilis* cell population. An important observation is that the mutation eliminating the antibacterial activity of thiocillin did not affect the ability to induce the expression of the biofilm formation gene [183].

Li et al. described a one-step, spray application of a 2,5-dihydroxybenzoic acid solution for the direct imaging of desorption/laser ionization of hydrated *B. subtilis* biofilms on agar supported by a matrix. An optimized airbrush and an automatic home sprayer showed the region-specific distributions of signal metabolites and cannibalistic factors from *B. subtilis* cells grown on a biofilm-promoting medium. This approach provides a uniform, relatively dry coating on the hydrated samples, improves the point-to-point signal reproducibility compared to a screened matrix, and is easily adapted to imaging a range of agar-based biofilms [269]. Pauter et al., using the same biofilm imaging technique, showed changes in the molecular profiles of *Bacillus tequilensis* before and after the antibiotic therapy, leading to the proposed antibiotic resistance mechanisms. The researchers showed that the matrix-assisted laser desorption mass spectrometry could be used along with the UniProt database as a complementary technique to capillary electrophoresis (CE) to study differences in the molecular profile of *B. tequilensis* after the antibiotic treatment [270]. Additionally, Si et al. studied molecular heterogeneity in biofilms of *B. subtilis* colonies using MALDI-TOF MS. In this study, they combined the MALDI and fluorescence methods, which allowed detecting distinct populations of cells in a biofilm [271]. Pereira et al. evaluated the MALDI-TOF

mass spectrometry to analyze the molecular profile of *P. aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic surfaces at different stages of the biofilm development. The results of molecular studies show that MALDI-based profiling cannot distinguish between the various stages of the biofilm development, but this can be observed when biofilm cells are released in the dispersion phase that first occurred on the polypropylene surface [272].

In 2019, De Carolis et al. published a paper presenting a newly developed BIOF-HILO test based on MALDI-TOF MS in conjunction with analyzing protein profiles with a complex correlation index (CCI). Researchers proved that this enabled the rapid (i.e., 3-h) identification of *Candida parapsilosis* isolates with the high or low biofilm formation capacity [273]. However, as no reference *C. parapsilosis* mass spectral databases were used in this test, more research is required before the developed method can be used in the routine patient diagnosis.

Based on the presented research, it can be concluded that MALDI profiling may become a promising technique for a clinical diagnosis and the prediction of the development of biofilm formation.

6. Conclusions

Solving the crisis of increasing antibiotic resistance requires discovering compounds with new mechanisms of action and searching for new, more accurate and faster methods of identifying bacteria and their antibiotic resistance. In addition, the availability of updated epidemiological data on antimicrobial resistance in common bacterial pathogens will be helpful in making decisions concerning treatment strategies and developing an effective hospital antimicrobial management program. Combining the MALDI TOF-MS technique with a multiomic approach can bring excellent results in accurately and comprehensively identifying microorganisms and resistance to antibacterial drugs. Currently, the priority is to shorten the incubation time, sample preparation and analyzes, which will significantly speed up the diagnosis of clinical patients. As the MALDI-TOF technology advances and develops beyond the pattern recognition of unfractionated cell lysates and/or intact cells, it will become important and necessary to identify the specific protein ions whose amino acid sequence is unique to the microorganism under study. The identification of protein toxins, virulence factors, and antibiotic resistance mechanisms becomes particularly important. Genomics, proteomics, and metabolomics are necessary to obtain information that is not available from the sequenced genome. Additionally, MALDI-TOF MS techniques have the potential to significantly advance the identification of undigested proteins.

Author Contributions: Conceptualization, D.J. and M.S.-M.; writing—original draft preparation, D.J.; writing—review and editing, D.J., M.S.-M., P.P. and B.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: This work was supported by Nicolaus Copernicus University in Toruń, Center of Excellence “Towards Personalized Medicine” operating under Excellence Initiative-Research University.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Kaplan, W.; Laing, R. *Priority Medicines for Europe and the World*; World Health Organization Department of Essential Drugs and Medicines Policy: Geneva, Switzerland, 2004; pp. 1–134.
- Rappuoli, R.; Bloom, D.E.; Black, S. Deploy vaccines to fight superbugs. *Nature* **2017**, *552*, 165–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cassini, A.; Högberg, L.D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G.S.; Colobm-Cotin, M.; Kretzschmar, M.E.; Devleesschaower, B.; Cecchini, M.; et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 55–66. [[CrossRef](#)]
- Pauter, K.; Szultka-Młyńska, M.; Buszewski, B. Determination and identification of antibiotic drugs and bacterial strains in biological samples. *Molecules* **2020**, *25*, 2556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Park, S.H.; Aydin, M.; Khatiwara, A.; Dolan, M.C.; Gilmore, D.F.; Bouldin, J.L.; Ahn, S.; Ricke, S.C. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiol.* **2013**, *38*, 250–262. [[CrossRef](#)]
- Omiccioli, E.; Amagliani, G.; Brandi, G.; Magnani, M. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp.; *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 615–622. [[CrossRef](#)]
- Tewari, A.; Abdullah, S. *Bacillus cereus* food poisoning: International and Indian perspective. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 2500. [[CrossRef](#)]
- Zhao, X.; Lin, C.W.; Wang, J.; Oh, D.H. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *24*, 297–312. [[CrossRef](#)]
- Złoch, M.; Maślak, E.; Kupczyk, W.; Jackowski, M.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Culturomics approach to identify diabetic foot infection bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9574. [[CrossRef](#)]
- Fan, S.L.; Miller, N.S.; Lee, J.; Remick, D.G. Diagnosing sepsis—The role of laboratory medicine. *Clin. Chim. Acta* **2016**, *460*, 203–210. [[CrossRef](#)]
- Unemo, M.; Golparian, D.; Eyre, D.W. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and treatment of gonorrhea. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1997*, 37–58.
- Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2935–2939. [[CrossRef](#)]
- Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151–153. [[CrossRef](#)]
- Griffiths, J. A Brief history of mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 5678–5683. [[CrossRef](#)]
- Gao, J.; Cassady, C.J. Negative ion production from peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 4066–4072. [[CrossRef](#)]
- Boesl, U. Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *36*, 86–109. [[CrossRef](#)]
- Fenselau, C.; Demirev, F.A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20*, 157–171. [[CrossRef](#)]
- Lay, J.O. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20*, 172–194. [[CrossRef](#)]
- Fagerquist, C.K.; Garbus, B.R.; Williams, K.E.; Bares, A.H.; Harden, L.A. Covalent attachment and dissociative loss of sinapinic acid to/from cysteine-containing proteins from bacterial cell lysates analyzed by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 819–832. [[CrossRef](#)]
- Šedo, O.; Nemec, A.; Krizova, L.; Kačalová, M.; Zdráhalab, Z. Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus*—*Acinetobacter baumannii* complex. *Syst. Appl. Microbiol.* **2013**, *36*, 572–578. [[CrossRef](#)]
- Harvey, D.J. Analysis of carbohydrates and glycoconjugates by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: An update for 2003–2004. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 273–361. [[CrossRef](#)]
- Luxembourg, S.L.; McDonnell, L.A.; Duursma, M.C.; Guo, X.; Heeren, R.M.A. Effect of local matrix crystal variations in matrix-assisted ionization techniques for mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2333–2341. [[CrossRef](#)]
- Shu, X.; Liang, M.; Yang, B.; Li, Y.; Liu, C.; Wang, Y.; Shu, J. Lipid fingerprinting of *Bacillus* spp. using online MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Methods* **2012**, *4*, 3111–3117. [[CrossRef](#)]
- Xu, N.; Huang, Z.-H.; de Jonge, B.L.M.; Cage, D.A. Structural characterization of peptidoglycan muropeptides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry and postsource decay analysis. *Anal. Biochem.* **1997**, *248*, 7–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhou, P.; Altman, E.; Perry, M.B.; Li, J. Study of matrix additives for sensitive analysis of lipid a by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 3437–3443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schilling, B.; McLendon, M.K.; Phillips, N.J.; Apicella, M.A.; Gibson, B.W. Characterization of lipid A acylation patterns in *Francisella tularensis*, *Francisella novicida*, and *Francisella philomiragia* using multiple-stage mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization on an intermediate vacuum source linear ion trap. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1034–1042. [[PubMed](#)]
- Liu, H.; Du, Z.; Wang, J.; Yang, R. Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1899–1907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Horneffer, V.; Haverkamp, J.; Janssen, H.G.; Notz, R. MALDI-TOF-MS analysis of bacterial spores: Wet heat-treatment as a new releasing technique for biomarkers and the influence of different experimental parameters and microbiological handling. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1444–1454. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Elhanany, E.; Barak, R.; Fisher, M.; Kobiler, D.; Altboum, Z. Detection of specific *Bacillus anthracis* spore biomarkers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2110–2116. [\[CrossRef\]](#)
30. Amiri-Eliasi, B.; Fenselau, C. Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5228–5231. [\[CrossRef\]](#)
31. Valentine, N.B.; Wahl, J.H.; Kingsley, M.T.; Wahl, K.L. Direct surface analysis of fungal species by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1352–1357. [\[CrossRef\]](#)
32. Li, T.-Y.; Liu, B.-H.; Chen, Y.-C. Characterization of *Aspergillus* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 2393–2400. [\[CrossRef\]](#)
33. Bright, J.J.; Claydon, M.A.; Soufian, M.; Gordon, D.B. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *J. Microbiol. Methods* **2002**, *48*, 127–138. [\[CrossRef\]](#)
34. Evason, D.J.; Claydon, M.A.; Gordon, D.B. Effects of ion mode and matrix additives in the identification of bacteria by intact cell mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 669–672. [\[CrossRef\]](#)
35. Williams, T.L.; Andrzejewski, D.; Lay, J.O.; Musser, S.M. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 342–351. [\[CrossRef\]](#)
36. Large, R.; Knof, H. A comparison of negative and positive ion mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1976**, *11*, 582–598. [\[CrossRef\]](#)
37. Gandhi, K.; Kumar, A.; Sarkar, P.; Aghav, A.; Lal, D. MALDI-TOF MS: Application in dairy and related sectors. *Res. Rev. J. Dairy Sci. Technol.* **2013**, *2*, 2319–3409.
38. Jackson, S.N.; Wang, H.-Y.J.; Woods, A.S. Direct profiling of lipid distribution in brain tissue using MALDI-TOFMS. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4523–4527. [\[CrossRef\]](#)
39. Wang, J.; Sporns, P. MALDI-TOF MS analysis of food flavonol glycosides. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, *48*, 1657–1662. [\[CrossRef\]](#)
40. Dhiman, N.; Hall, L.; Wohlfiel, S.L.; Buckwalter, S.P.; Wengenack, N.L. Notes: Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 1614. [\[CrossRef\]](#)
41. Rychert, J. Benefits and limitations of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of microorganisms. *J. Infect.* **2019**, *2*, 1–5. [\[CrossRef\]](#)
42. Patel, T.S.; Kaakeh, R.; Nagel, J.L.; Newton, D.W.; Stevenson, J.G. Cost analysis of implementing matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry plus real-time antimicrobial stewardship intervention for bloodstream infections. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 60. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Scott, J.R.; Schürch, S.; Moore, S.; Wilkins, C.L. Evaluation of MALDI-FTMS for analysis of peptide mixtures generated by ladder sequencing. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1997**, *160*, 291–302. [\[CrossRef\]](#)
44. Aichler, M.; Walch, A. MALDI Imaging mass spectrometry: Current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Lab. Invest.* **2015**, *95*, 422–431. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Buck, A.; Ly, A.; Balluff, B.; Sun, N.; Gorzalka, K.; Feuchtinger, A.; Janssen, K.-P.; Kuppen, P.J.K.; van de Velde, C.J.H.; Erlmeier, F.; et al. High-resolution MALDI-FT-ICR MS imaging for the analysis of metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded clinical tissue samples. *J. Pathol.* **2015**, *237*, 123–132. [\[CrossRef\]](#)
46. Ban, N.; Beckmann, R.; Cate, J.H.D.; Dinman, J.D.; Dragon, F.; Ellis, S.R.; Lafontaine, D.L.J.; Lindahl, L.; Liljas, A.; Lipton, J.M.; et al. A new system for naming ribosomal proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *24*, 165. [\[CrossRef\]](#)
47. Zloch, M.; Rodzik, A.; Pauter, K.; Szultka-Mlynska, M.; Rogowska, A.; Kupczyk, W.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Problems with identifying and distinguishing salivary streptococci: A multi-instrumental approach. *Future Microbiol.* **2020**, *15*, 1157–1171. [\[CrossRef\]](#)
48. Singhal, N.; Kumar, M.; Kanaujia, P.K.; Viridi, J.S. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 791. [\[CrossRef\]](#)
49. Ashfaq, M.Y.; Da’na, D.A.; Al-Ghouti, M.A. Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review. *J. Environ. Manag.* **2022**, *305*, 114359. [\[CrossRef\]](#)
50. Nomura, F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteom.* **2015**, *1854*, 528–537. [\[CrossRef\]](#)
51. Gregorich, Z.R.; Ge, Y. Top-down proteomics in health and disease: Challenges and opportunities. *Proteomics* **2014**, *14*, 1195–1210. [\[CrossRef\]](#)
52. Han, X.; Aslanian, A.; Yates, J.R. Mass Spectrometry for Proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 483. [\[CrossRef\]](#)
53. Jabbour, R.E.; Wade, M.M.; Deshpande, S.V.; Stanford, M.F.; Wick, C.H.; Zulich, A.W.; Snyder, P.J. Identification of *Yersinia pestis* and *Escherichia coli* strains by whole cell and outer membrane protein extracts with mass spectrometry-based proteomics. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 3647–3655. [\[CrossRef\]](#)

54. Dickinson, D.N.; La Duc, M.T.; Haskins, W.E.; Gornushkin, I.; Winefordner, J.D.; Powell, D.H.; Venkateswaran, K. Species differentiation of a diverse suite of Bacillus spores by mass spectrometry-based protein profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 475–482. [\[CrossRef\]](#)
55. Fagerquist, C.K.; Miller, W.G.; Harden, L.A.; Bates, A.H.; Vensel, W.H.; Wang, G.; Mandrell, R.E. Genomic and proteomic identification of a DNA-binding protein used in the “fingerprinting” of Campylobacter species and strains by MALDI-TOF-MS protein biomarker analysis. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4897–4907. [\[CrossRef\]](#)
56. Schaller, A.; Troller, R.; Molina, D.; Gallati, S.; Aebi, C.; Meier, P.S. Rapid typing of Moraxella catarrhalis subpopulations based on outer membrane proteins using mass spectrometry. *Proteomics* **2006**, *6*, 172–180. [\[CrossRef\]](#)
57. Sun, L.; Teramoto, K.; Sato, H.; Torimura, M.; Tao, H.; Shintani, T. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of Lactobacillus plantarum. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3789–3798. [\[CrossRef\]](#)
58. Schmidt, F.; Fiege, T.; Hustoft, H.K.; Kneist, S.; Thiede, B. Shotgun mass mapping of Lactobacillus species and subspecies from caries related isolates by MALDI-MS. *Proteomics* **2009**, *9*, 1994–2003. [\[CrossRef\]](#)
59. Camara, J.E.; Hays, F.A. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant Escherichia coli by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1633–1638. [\[CrossRef\]](#)
60. Rozanova, S.; Barkovits, K.; Nikolov, M.; Schmidt, C.; Urlaub, H.; Marcus, K. Quantitative mass spectrometry-based proteomics: An overview. *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2228*, 85–116.
61. Bilecen, K.; Yaman, G.; Ciftci, U.; Laleli, Y.R. Performances and reliability of Bruker microflex LT and VITEK MS MALDI-TOF mass spectrometry systems for the identification of clinical microorganisms. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 516410. [\[CrossRef\]](#)
62. Clark, A.E.; Kaleta, E.J.; Arora, A.; Wolk, D.M. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 547–603. [\[CrossRef\]](#)
63. Carolis, E.; De Vella, A.; Vaccaro, L.; Torelli, R.; Spanu, T.; Fiori, B.; Posteraro, B.; Sanguinetti, M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J. Infect. Dev. Ctries* **2014**, *8*, 1081–1088. [\[CrossRef\]](#)
64. Rodríguez-Sánchez, B.; Ruiz-Serrano, M.J.; Ruiz, A.; Timke, M.; Kostrzewa, M.; Bouza, E. Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v3.0 for identification of nontuberculous mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 1144–1147. [\[CrossRef\]](#)
65. Leyer, C.; Gregorowicz, G.; Mougari, F.; Raskine, L.; Cambau, E.; De Briel, D. Comparison of Saramis 4.12 and IVD 3.0 Vitek MS matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of Mycobacteria from solid and liquid culture media. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2045–2054. [\[CrossRef\]](#)
66. Lee, H.-S.; Shin, J.H.; Choi, M.J.; Won, E.J.; Kee, S.J.; Kim, S.H.; Shin, M.G.; Suh, S.P. Comparison of the Bruker Biotyper and VITEK MS matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry systems using a formic acid extraction method to identify common and uncommon yeast isolates. *Ann. Lab. Med.* **2017**, *37*, 223. [\[CrossRef\]](#)
67. Lévesque, S.; Dufresne, P.J.; Soualhine, H.; Domingo, M.-C.; Bekal, S.; Lefebvre, B.; Tremblay, C. A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144878. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Weis, C.W.; Jutzeler, C.R.; Borgwardt, K. Machine learning for microbial identification and antimicrobial susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: A systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* **2020**, *26*, 1310–1317. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Wang, H.-Y.; Chen, C.-H.; Lee, T.-Y.; Horng, J.-T.; Liu, T.-P.; Tseng, Y.-J.; Lu, J.-J. Rapid detection of heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus based on matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight: Using a machine learning approach and unbiased validation. *Front Microbiol.* **2018**, *9*, 2393. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Goodwin, C.R.; Covington, B.C.; Derewacz, D.K.; McNeese, C.R.; Wikswo, J.P.; McLean, J.A.; Bachmann, B.O. Phenotypic mapping of metabolic profiles using self-organizing maps of high-dimensional mass spectrometry data. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6563–6571. [\[CrossRef\]](#)
71. Mortier, T.; Wieme, A.D.; Vandamme, P.; Waegeman, W. Bacterial species identification using MALDI-TOF mass spectrometry and machine learning techniques: A large-scale benchmarking study. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2021**, *19*, 6157–6168. [\[CrossRef\]](#)
72. Park, J.H.; Jang, Y.; Yoon, I.; Kim, T.S.; Park, H. Comparison of Autof ms1000 and Bruker Biotyper MALDI-TOF MS platforms for routine identification of clinical microorganisms. *Hindawi* **2021**, *2021*, 6667623.
73. Buchan, B.W.; Riebe, K.M.; Timke, M.; Kostrzewa, M.; Ledebor, N.A. Comparison of MALDI-TOF MS with HPLC and nucleic acid sequencing for the identification of Mycobacterium species in cultures using solid medium and broth. *Am. J. Clin. Pathol.* **2014**, *141*, 25. [\[CrossRef\]](#)
74. Farfour, E.; Leto, J.; Barritault, M.; Barberis, C.; Meyer, J.; Dauphin, B.; Le Guern, A.-S.; Leflèche, A.; Badell, E.; Guiso, N.; et al. Evaluation of the andromas matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing gram-positive bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2702–2707. [\[CrossRef\]](#)
75. Carbonnelle, E.; Beretti, J.-L.; Cottyn, S.; Quesne, G.; Berche, P.; Nassif, X.; Ferroni, A. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 2156–2161. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Degand, N.; Carbonnelle, E.; Dauphin, B.; Beretti, J.-L.; Le Bourgeois, M.; Sermet-Gaudelus, I.; Segonds, C.; Verche, P.; Nassif, X.; Ferroni, A. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 3361–3367. [\[CrossRef\]](#)

77. Regoui, S.; Hennebique, A.; Girard, T.; Boisset, S.; Caspar, Y.; Maurin, M. Optimized MALDI TOF mass spectrometry identification of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1143. [\[CrossRef\]](#)
78. Legaria, M.C.; Nastro, M.; Camporro, J.; Heger, F.; Barberis, C.; Stecher, D.; Rodriguez, C.H.; Vay, C.A. *Peptostreptococcus anaerobius*: Pathogenicity, identification, and antimicrobial susceptibility. Review of monobacterial infections and addition of a case of urinary tract infection directly identified from a urine sample by MALDI-TOF MS. *Anaerobe* **2021**, *72*, 102461. [\[CrossRef\]](#)
79. Kim, D.; Ji, S.; Kim, J.R.; Kim, M.; Byun, J.H.; Yum, J.H.; Yong, D.; Lee, K. Performance evaluation of a new matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, ASTA MicroIDSys system, in bacterial identification against clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe* **2020**, *61*, 102131. [\[CrossRef\]](#)
80. Yoo, I.Y.; Shim, H.J.; Yun, S.A.; Kang, O.K.; Chung, Y.N.; Kim, T.Y.; Lee, H.; Park, Y.-J.; Huh, H.J.; Lee, N.Y. Evaluation of the ASTA MicroIDSys matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of mycobacteria directly from positive MGIT liquid cultures. *Int. J. Infect. Dis.* **2021**, *102*, 172–177. [\[CrossRef\]](#)
81. Yi, Q.; Xiao, M.; Fan, X.; Zhang, G.; Yang, F.; Zhang, J.-J.; Duan, S.-M.; Cheng, J.-W.; Li, Y.; Zhou, M.-L.; et al. 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.* **2021**, *11*, 3. [\[CrossRef\]](#)
82. Lee, Y.; Sung, J.Y.; Kim, H.; Yong, D.; Lee, K. Comparison of a new matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry platform, ASTA MicroIDSys, with Bruker Biotyper for species Identification. *Ann. Lab. Med.* **2017**, *37*, 531–535. [\[CrossRef\]](#)
83. Ziegler, D.; Pothier, J.F.; Ardley, J.; Fossou, R.K.; Pflüger, V.; de Meyer, S.; Vogel, G.; Tonolla, M.; Howieson, J.; Reeve, W.; et al. Ribosomal protein biomarkers provide root nodule bacterial identification by MALDI-TOF MS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 5547–5562. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Suarez, S.; Ferroni, A.; Lotz, A.; Jolley, K.A.; Guérin, P.; Leto, J.; Dauphin, B.; Jamet, A.; Maiden, M.C.J.; Nassif, X.; et al. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J. Microbiol. Methods.* **2013**, *94*, 390–396. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Rothen, J.; Pothier, J.F.; Foucault, F.; Blom, J.; Nanayakkara, D.; Li, C.; Ip, M.; Tanner, M.; Vpigel, G.; Pflüger, V.; et al. Subspecies typing of *Streptococcus agalactiae* based on ribosomal subunit protein mass variation by MALDI-TOF MS. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 471. [\[CrossRef\]](#)
86. Matsumura, Y.; Yamamoto, M.; Nagao, M.; Tanaka, M.; Machida, K.; Ito, Y.; Takakura, S.; Ichiyama, S. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 1034–1040. [\[CrossRef\]](#)
87. Toh, B.E.W.; Zowawi, H.M.; Krizova, L.; Paterson, D.L.; Kamolvit, W.; Peleg, A.Y.; Sidjabat, H.; Nemec, A.; Pflüger, V.; Huber, C.A. Differentiation of *Acinetobacter* genomic species 13B/14TU from *Acinetobacter haemolyticus* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 3384. [\[CrossRef\]](#)
88. Drevinek, M.; Dresler, J.; Klimentova, J.; Pisa, L.; Hubalek, M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **2012**, *55*, 40–46. [\[CrossRef\]](#)
89. Schulthess, B.; Bloemberg, G.V.; Zbinden, R.; Böttger, E.C.; Hombach, M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-positive rods: Development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 1089–1097. [\[CrossRef\]](#)
90. Freiwald, A.; Sauer, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 732–742. [\[CrossRef\]](#)
91. Pascale, M.R.; Mazzotta, M.; Salaris, S.; Girolamini, L.; Grottola, A.; Simone, M.L.; Cordovana, M.; Bisognin, F.; Dal Monte, P.; Bucci Sabattini, M.A.; et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry in diagnostic and environmental surveillance of *Legionella* species: A comparison with culture and Mip-Gene Sequencing technique. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 589369. [\[CrossRef\]](#)
92. Tsuchida, S.; Umemura, H.; Nakayama, T.; Mauri, P.L.; Marchetti-Deschmann, M.; Canetti, D. Current Status of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules* **2020**, *25*, 4775. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Wang, J.; Wang, H.; Cai, K.; Yu, P.; Liu, Y.; Zhao, G.; Chen, R.; Xu, R.; Yu, M. Evaluation of three sample preparation methods for the identification of clinical strains by using two MALDI-TOF MS systems. *J. Mass Spectrom.* **2021**, *56*, e4696. [\[CrossRef\]](#)
94. Huang, C.H.; Huang, L.; Chang, M.T.; Chen, K.L. Establishment and application of an analytical in-house database (IHDB) for rapid discrimination of *Bacillus subtilis* group (BSG) using whole-cell MALDI-TOF MS technology. *Mol. Cell Probes.* **2016**, *30*, 312–319. [\[CrossRef\]](#)
95. Veloo, A.C.M.; Elgersma, P.E.; Friedrich, A.W.; Nagy, E.; van Winkelhoff, A.J. 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.* **2014**, *20*, 1091–1097. [\[CrossRef\]](#)
96. Rotcheevaphan, S.; Lemon, J.K.; Desai, U.U.; Henderson, C.M.; Zelazny, A.M. Rapid one-step protein extraction method for the identification of mycobacteria using MALDI-TOF MS. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *94*, 355–360. [\[CrossRef\]](#)
97. Bizzini, A.; Durussel, C.; Bille, J.; Greub, G.; Prod'homme, G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 1549–1554. [\[CrossRef\]](#)

98. La Scola, B.; Raoult, D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e8041. [\[CrossRef\]](#)
99. Dai, Y.; Xu, X.; Yan, X.; Li, D.; Cao, W.; Tang, L.; Hu, M.; Jiang, C. Evaluation of a rapid and simplified protocol for direct identification of microorganisms from positive blood cultures by using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 632679. [\[CrossRef\]](#)
100. Oviaño, M.; de la Luna Ramírez, C.; Barbeyto, L.P.; Bou, G. Rapid direct detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical urine samples by MALDI-TOF MS analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 1350–1354. [\[CrossRef\]](#)
101. Mohan, B.; Gautam, N.; Sethuraman, N.; Kaur, H.; Taneja, N. Evaluation of matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry in direct identification of bacteriuria from urine samples. *Indian J. Med. Microbiol.* **2020**, *38*, 293–298. [\[CrossRef\]](#)
102. Sun, C.; Zhang, X.; Wang, J.; Cheng, C.; Kang, H.; Gu, B.; Ma, P. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry combined with UF-5000i urine flow cytometry to directly identify pathogens in clinical urine specimens within 1 hour. *Ann. Transl. Med.* **2020**, *8*, 602. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
103. Ying, J.; Gao, W.; Huang, D.; Ding, C.; Ling, L.; Pan, T.; Yu, S. Application of MALDI-TOF MS Profiling Coupled With Functionalized Magnetic Enrichment for Rapid Identification of Pathogens in a Patient With Open Fracture. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 672744. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Birmingham, J.; Demirev, P.; Ho, Y.-P.; Thomas, J.; Bryden, W.; Fenselau, C. Corona Plasma Discharge for Rapid Analysis of Microorganisms by Mass Spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 604–606. [\[CrossRef\]](#)
105. Ryzhov, V.; Hathout, Y.; Fenselau, C. Rapid Characterization of Spores of Bacillus cereus Group Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3828. [\[CrossRef\]](#)
106. Afonso, C.; Fenselau, C. Use of Bioactive Glass Slides for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Analysis: Application to Microorganisms. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 694–697. [\[CrossRef\]](#)
107. Saleen, P.G.; Drake, S.K.; Murray, P.R.; Zelazny, A.M. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 1790–1794.
108. Noumi, E.; Merghni, A.; Alreshidi, M.; Del Campo, R.; Adnan, M.; Haddad, O.; De Feo, V.; Snoussi, M. Phenotypic and Genotypic Characterization with MALDI-TOF-MS Based Identification of Staphylococcus spp. Isolated from Mobile Phones with their Antibiotic Susceptibility, Biofilm Formation, and Adhesion Properties. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 3761. [\[CrossRef\]](#)
109. Pierce, C.Y.; Barr, J.R.; Woolfitt, A.R.; Moura, H.; Shaw, E.I.; Thompson, H.A.; Massung, R.F.; Fernandez, F.M. Strain and phase identification of the U.S. category B agent Coxiella burnetii by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multivariate pattern recognition. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 23–31. [\[CrossRef\]](#)
110. Jones, J.J.; Stump, M.J.; Fleming, R.C.; Lay, J.O.; Wilkins, C.L. Investigation of MALDI-TOF and FT-MS techniques for analysis of Escherichia coli whole cells. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1340–1347. [\[CrossRef\]](#)
111. Shah, H.N.; Chilton, C.; Rajakaruna, L.; Gaulton, T.; Hallas, G.; Atanassov, H.; Khoder, G.; Rakowska, P.D.; Cerasoli, E.; Gharbia, S.E. Changing Concepts in the Characterisation of Microbes and the Influence of Mass Spectrometry. In *Mass Spectrometry for Microbial Proteomics*; Shah, H.N., Gharbia, S.E., Eds.; Wiley Online Library: Hoboken, NJ, USA, 2010; pp. 1–34.
112. Reddy, G.; Dalmaso, E.A. SELDI ProteinChip® Array Technology: Protein-Based Predictive Medicine and Drug Discovery Applications. *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**, *2003*, 237. [\[CrossRef\]](#)
113. Rajakaruna, L.K. *Proteomics as a Tool for the Characterisation of Nosocomial Pathogens*; ProQuest LLC.: London, UK, 2010; pp. 1–235.
114. Shah, H.N.; Rajakaruna, L.; Ball, G.; Misra, R.; Al-Shahib, A.; Fang, M.; Gharbia, S.E. Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of Staphylococcus aureus, using SELDI-TOF Mass Spectrometry and Artificial Neural Network Analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* **2011**, *34*, 81–86. [\[CrossRef\]](#)
115. Schmid, O.; Ball, G.; Lancashire, L.; Culak, R.; Shah, H. New approaches to identification of bacterial pathogens by surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry in concert with artificial neural networks, with special reference to Neisseria gonorrhoeae. *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54*, 1205–1211. [\[CrossRef\]](#)
116. Nakamura, M.T.; Yudell, B.E.; Loor, J.J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid. Res.* **2014**, *53*, 124–144. [\[CrossRef\]](#)
117. Van Meer, G.; Voelker, D.R.; Feigenson, G.W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112–124. [\[CrossRef\]](#)
118. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H.A.; Glass, C.K.; Merrill, A.H.; Murphy, R.C.; Reatz, C.R.H.; Russel, D.W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; et al. A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 839–861. [\[CrossRef\]](#)
119. Sohlenkamp, C.; Geiger, O. Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *40*, 133–159. [\[CrossRef\]](#)
120. Liu, B.; Knirel, Y.A.; Leng, L.; Perepelov, A.V.; Senchenkova, S.N.; Reeves, P.R.; Wang, L. Structural diversity in Salmonella O antigens and its genetic basis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2014**, *38*, 56–89. [\[CrossRef\]](#)
121. Froning, M.; Helmer, P.O.; Hayen, H. Identification and structural characterization of lipid A from Escherichia coli, Pseudomonas putida and Pseudomonas taiwanensis using liquid chromatography coupled to high-resolution tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2020**, *34*, e8897. [\[CrossRef\]](#)
122. Casabuono, A.C.; van der Ploeg, C.A.; Roge, A.D.; Bruno, S.B.; Couto, A.S. Characterization of lipid A profiles from Shigella flexneri variant Xlipopolysaccharide. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 2011–2020. [\[CrossRef\]](#)

123. Fischer, W. Lipoteichoic acids and lipoglycans. In *New Comprehensive Biochemistry*; Ghuyssen, J., Hakenbeck, R., Eds.; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 1994; pp. 199–215.
124. Schneewind, O.; Missiakas, D. Lipoteichoic Acids, Phosphate-Containing Polymers in the Envelope of Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* **2014**, *196*, 1133–1142. [\[CrossRef\]](#)
125. Koch, H.U.; Fischer, W. Acyldiglucoyl-diacylglycerol-containing lipoteichoic acid with a poly(3-O-galabiosyl-2-O-galactosyl-sn-glycerol-1-phosphate) chain from *Streptococcus lactis* Kiel 42172. *Biochemistry* **1978**, *17*, 5275–5281. [\[CrossRef\]](#)
126. Fischer, W. Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. *Microb. Drug Resist.* **1997**, *3*, 309–325. [\[CrossRef\]](#)
127. Fischer, W. One-step purification of bacterial lipid macroamphiphiles by hydrophobic interaction chromatography. *Anal. Biochem.* **1991**, *194*, 353–358. [\[CrossRef\]](#)
128. Jackson, M. The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a021105. [\[CrossRef\]](#)
129. Ripoll, F.; Deshayes, C.; Pasek, S.; Laval, F.; Beretti, J.-L.; Biet, F.; Risler, J.-L.; Daffé, M.; Etienne, G.; Gillard, J.-L.; et al. Genomics of glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium abscessus* and *M. chelonae*. *BMC Genom.* **2007**, *8*, 114. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
130. Batt, S.M.; Minnikin, D.E.; Besra, G.S. The thick waxy coat of mycobacteria, a protective layer against antibiotics and the host's immune system. *Biochem. J.* **2020**, *477*, 1983–2006. [\[CrossRef\]](#)
131. Marrakchi, H.; Lanéelle, M.-A.; Daffé, M. Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 67–85. [\[CrossRef\]](#)
132. Burbaud, S.; Laval, F.; Lemassu, A.; Daffé, M.; Guilhot, C.; Chalut, C. Trehalose Polyphleates Are Produced by a Glycolipid Biosynthetic Pathway Conserved across Phylogenetically Distant Mycobacteria. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 278–289. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
133. Jarrad, A.M.; Karoli, T.; Blaskovich, M.A.T.; Lyras, D.; Cooper, M.A. Clostridium difficile drug pipeline: Challenges in discovery and development of new agents. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5164–5185. [\[CrossRef\]](#)
134. Abel, K.; Deschmerling, H.; Peterson, J.I. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. *J. Bacteriol.* **1963**, *85*, 1039–1044. [\[CrossRef\]](#)
135. Hu, T.; Zhang, J.L. Mass-spectrometry-based lipidomics. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41*, 351–372. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
136. Solntceva, V.; Kostrzewa, M.; Larrouy-Maumus, G. Detection of species-specific lipids by routine MALDI TOF Mass Spectrometry to unlock the challenges of microbial identification and antimicrobial susceptibility testing. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 621452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
137. Pomastowski, P.; Złoch, M.; Rodzik, A.; Ligor, M.; Kostrzewa, M.; Buszewski, B. Analysis of bacteria associated with honeys of different geographical and botanical origin using two different identification approaches: MALDI-TOF MS and 16S rDNA PCR technique. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217078. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
138. Ratiu, I.A.; Railean Plugaru, V.; Pomastowski, P.; Milanowski, M.; Mametov, R.; Bocos-Bintintan, V.; Buszewski, B. Temporal influence of different antibiotics onto the inhibition of *Escherichia coli* bacterium grown in different media. *Anal. Biochem.* **2019**, *585*, 113407. [\[CrossRef\]](#)
139. Walczak-Skierska, J.; Złoch, M.; Pauter, K.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Lipidomic analysis of lactic acid bacteria strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 11062–11078. [\[CrossRef\]](#)
140. Leung, L.M.; Fondrie, W.E.; Doi, Y.; Johnson, J.K.; Strickland, D.K.; Ernst, R.K.; Goodlett, D.R. Identification of the ESKAPE pathogens by mass spectrometric analysis of microbial membrane glycolipids. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6403. [\[CrossRef\]](#)
141. Ryu, S.Y.; Wendt, G.A.; Chandler, C.E.; Ernst, R.K.; Goodlett, D.R. Model-based spectral library approach for bacterial identification via membrane glycolipids. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 11482–11487. [\[CrossRef\]](#)
142. Liang, T.; Leung, L.M.; Opene, B.; Fondrie, W.E.; Lee, Y.I.; Chandler, C.E.; Yoon, S.H.; Ernst, R.K.; Goodlett, D.R. Rapid microbial identification and antibiotic resistance detection by mass spectrometric analysis of membrane lipids. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 1286–1294. [\[CrossRef\]](#)
143. Patel, A.; Mikes, F.; Matsakas, L. An overview of current pretreatment methods used to improve lipid extraction from oleaginous microorganisms. *Molecules* **2018**, *23*, 1562. [\[CrossRef\]](#)
144. Matyash, V.; Liebisch, G.; Kurzchalia, T.V.; Shevchenko, A.; Schwudke, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1137–1146. [\[CrossRef\]](#)
145. El Hamidi, A.; Tirsoaga, A.; Novikov, A.; Hussein, A.; Caroff, M. Microextraction of bacterial lipid A: Easy and rapid method for mass spectrometric characterization. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 1773–1778. [\[CrossRef\]](#)
146. Angelini, R.; Babudri, F.; Lobasso, S.; Corcelli, A. MALDI-TOF/MS analysis of archaeobacterial lipids in lyophilized membranes dry-mixed with 9-aminoacridine. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2818–2825. [\[CrossRef\]](#)
147. Calvano, C.D.; Zambonin, C.G.; Palmisano, F. Lipid fingerprinting of gram-positive lactobacilli by intact—Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using a proton sponge based matrix. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 1757–1764. [\[CrossRef\]](#)
148. Larrouy-Maumus, G.; Puzo, G. Mycobacterial envelope lipids fingerprint from direct MALDI-TOF MS analysis of intact bacilli. *Tuberculosis* **2015**, *95*, 75–85. [\[CrossRef\]](#)
149. Larrouy-Maumus, G.; Clements, A.; Filloux, A.; McCarthy, R.R.; Mostowy, S. Direct detection of lipid A on intact Gram-negative bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* **2016**, *120*, 68–71. [\[CrossRef\]](#)
150. Gonzalo, X.; Broda, A.; Drobniowski, F.; Larrouy-Maumus, G. Performance of lipid fingerprint-based MALDI-ToF for the diagnosis of mycobacterial infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 912.e1–912.e5. [\[CrossRef\]](#)

151. Dortet, L.; Potron, A.; Bonnin, R.A.; Plesiat, P.; Naas, T.; Filloux, A.; Larrouy-Maumus, G. Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16910. [\[CrossRef\]](#)
152. Furniss, C.R.D.; Kostrzewa, M.; Mavridou, D.A.I.; Larrouy-Maumus, G. The clue is in the lipid A: Rapid detection of colistin resistance. *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008331. [\[CrossRef\]](#)
153. Dortet, L.; Broda, A.; Bernabeu, S.; Glupczynski, Y.; Bogaerts, P.; Bonnin, R.; Naas, T.; Filloux, A.; Larrouy-Maumus, G. Optimization of the MALDIx test for the rapid identification of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* using MALDI-TOF MS. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 110–116. [\[CrossRef\]](#)
154. Khor, M.J.; Broda, A.; Kostrzewa, M.; Drobniewski, F.; Larrouy-Maumus, G. An improved method for rapid detection of *Mycobacterium abscessus* complex based on species-specific lipid fingerprint by routine MALDI-TOF. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 715890. [\[CrossRef\]](#)
155. Cox, G.; Wright, G.D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* **2013**, *303*, 287–292. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
156. Saichek, N.R.; Cox, C.R.; Kim, S.; Harrington, P.B.; Stambach, N.R.; Voorhees, K.J. Strain-level *Staphylococcus* differentiation by CeO₂-metal oxide laser ionization mass spectrometry fatty acid profiling. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 72. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
157. Cox, C.R.; Jensen, K.R.; Saichek, N.R.; Voorhees, K.J. Strain-level bacterial identification by CeO₂-catalyzed MALDI-TOF MS fatty acid analysis and comparison to commercial protein-based methods. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10470. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
158. Meitei, N.S.; Shulaev, V. Bioinformatics in Lipidomics: Automating Large-Scale LC-MS-Based Untargeted Lipidomics Profiling with SimLipid Software. *Plant Metab. Eng.* **2022**, *2396*, 197–214.
159. Verma, A.; Meitei, N.S.; Gajbiye, P.U.; Raftery, M.J.; Ambatipudi, K. Comparative Analysis of Milk Triglycerides Profile between Jaffarabadi Buffalo and Holstein Friesian Cow. *Metabolites* **2021**, *10*, 507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
160. Jinno, K.; Sawada, H. Recent trends in open-tubular capillary electrochromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 664–675. [\[CrossRef\]](#)
161. Jurowski, K.; Kochan, K.; Walczak, J.; Barańska, M.; Piekoszewski, W.; Buszewski, B. Analytical techniques in lipidomics: State of the art. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2017**, *47*, 418–437. [\[CrossRef\]](#)
162. Szultka-Młyńska, M.; Buszewski, B. Study of in-vitro metabolism of selected antibiotic drugs in human liver microsomes by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 8273–8287. [\[CrossRef\]](#)
163. Szultka-Młyńska, M.; Buszewski, B. Electrochemical oxidation of selected immunosuppressants and identification of their oxidation products by means of liquid chromatography and tandem mass spectrometry (EC-HPLC-MS/MS). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *176*, 112799. [\[CrossRef\]](#)
164. Szultka-Młyńska, M.; Pauter, K.; Buszewski, B. Identification of in vitro and in vivo potential metabolites of novel cardiovascular and adrenolytic drugs by liquid chromatography-mass spectrometry with the aid of experimental design. *Nov. Biotechnol. Chim.* **2019**, *18*, 179–194. [\[CrossRef\]](#)
165. Weckwerth, W. Metabolomics in systems biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, *54*, 669–689. [\[CrossRef\]](#)
166. Megha, P.; Prasad, T. Metabolomics: A Promising Tool to Study Disease Biomarkers and Host-Pathogen Interactions. *Integr. Omics Approaches Infect. Dis.* **2021**, 403–423. [\[CrossRef\]](#)
167. Mashego, M.R.; Van Gulik, W.M.; Heijnen, J.J. Metabolome dynamic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to simultaneous rapid perturbations in external electron acceptor and electron donor. *FEMS Yeast Res.* **2007**, *7*, 48–66. [\[CrossRef\]](#)
168. Pinu, F.R.; Villas-Boas, S.G. Extracellular microbial metabolomics: The state of the art. *Metabolites* **2017**, *7*, 43. [\[CrossRef\]](#)
169. Shi, Y.; Yang, H.; Chu, M.; Niu, X.; Huo, X.; Gao, Y.; Zeng, J.; Zhang, T.; Li, Y.G.; Outi, K.E.; et al. *Klebsiella*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 233–257. [\[CrossRef\]](#)
170. Grim, C.M.; Luu, G.T.; Sanchez, L.M. Staring into the void: Demystifying microbial metabolomics. *FEMS Microbiol. Lett.* **2019**, *366*, 135. [\[CrossRef\]](#)
171. Bundy, J.G.; Willey, T.L.; Castell, R.S.; Ellar, D.J.; Brindle, K.M. Discrimination of pathogenic clinical isolates and laboratory strains of *Bacillus cereus* by NMR-based metabolomic profiling. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *242*, 127–136. [\[CrossRef\]](#)
172. T'Kindt, R.; Scheltema, R.A.; Jankevics, A.; Bruner, K.; Rijal, S.; Dujardin, J.-C.; Breitling, R.; Watson, D.G.; Coombs, G.H.; Decuyper, S. Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e904. [\[CrossRef\]](#)
173. Bean, H.D.; Rees, C.A.; Hill, J.E. Comparative analysis of the volatile metabolomes of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J. Breath Res.* **2016**, *10*, 047102. [\[CrossRef\]](#)
174. Jørgensen, K.M.; Wassermann, T.; Johansen, H.K.; Christiansen, L.E.; Molin, S.; Høiby, N.; Ciofu, O. Diversity of metabolic profiles of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* during the early stages of lung infection. *Microbiology* **2015**, *161*, 1447–1462. [\[CrossRef\]](#)
175. Karami, N.; Karimi, A.; Aliahmadi, A.; Mirzajan, F.; Rezadoost, H.; Ghassempour, A.; Fallah, F. Identification of bacteria using volatile organic compounds. *Cell Mol. Biol.* **2017**, *63*, 112–121. [\[CrossRef\]](#)
176. Allegretta, G.; Maurer, C.K.; Eberhard, J.; Maura, D.; Hartmann, R.W.; Rahme, L.; Empting, M. In-depth profiling of MvfR-regulated small molecules in *Pseudomonas aeruginosa* after Quorum Sensing inhibitor treatment. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 924. [\[CrossRef\]](#)
177. Moyne, O.; Castelli, F.; Bicout, D.J.; Boccard, J.; Camara, B.; Cournoyer, B.; Faudry, E.; Terrier, S.; Hannani, D.; Huot-Marchand, S.; et al. Metabotypes of *Pseudomonas aeruginosa* correlate with antibiotic resistance, virulence and clinical outcome in cystic fibrosis chronic infections. *Metabolites* **2021**, *11*, 63. [\[CrossRef\]](#)

178. Morrison, D.J.; Preston, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **2016**, *7*, 189–200. [\[CrossRef\]](#)
179. Sharon, G.; Garg, N.; Debelius, J.; Knight, R.; Dorrestein, P.C.; Mazmanian, S.K. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 719–730. [\[CrossRef\]](#)
180. Sun, M.; Wu, W.; Liu, Z.; Cong, Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol.* **2017**, *52*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
181. Yang, Y.L.; Xu, Y.; Straight, P.; Dorrestein, P.C. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 885–887. [\[CrossRef\]](#)
182. Yang, J.Y.; Phelan, V.V.; Simkovsky, R.; Watrous, J.D.; Trial, R.M.; Fleming, T.C.; Wenter, R.; Moore, B.S.; Golden, S.S.; Pogliano, K.; et al. Primer on agar-based microbial imaging mass spectrometry. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 6023–6028. [\[CrossRef\]](#)
183. Bleich, R.; Watrous, J.D.; Dorrestein, P.C.; Bowers, A.A.; Shank, E.A. Thiopeptide antibiotics stimulate biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 3086–3091. [\[CrossRef\]](#)
184. Moree, W.J.; Phelan, V.V.; Wu, C.H.; Bandeira, N.; Cornett, D.S.; Duggan, B.M.; Dorrestein, P.C. Interkingdom metabolic transformations captured by microbial imaging mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 13811–13816. [\[CrossRef\]](#)
185. De Bruijn, I.; Cheng, X.; de Jager, V.; Expósito, R.G.; Watrous, J.; Patel, N.; Postma, J.; Dorrestein, P.C.; Kobayashi, D.; Raaijmakers, J.M. Comparative genomics and metabolic profiling of the genus *Lysobacter*. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 991. [\[CrossRef\]](#)
186. Prideaux, B.; Dartois, V.; Staab, D.; Weiner, D.M.; Goh, A.; Via, L.E.; Barry, C.E., 3rd; Stoeckli, M. High-Sensitivity MALDI-MRM-MS Imaging of Moxifloxacin Distribution in Tuberculosis-Infected Rabbit Lungs and Granulomatous Lesions. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2112. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
187. Hensel, M.; Shea, J.E.; Gleeson, C.; Jones, M.D.; Dalton, E.; Holden, D.W. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **1995**, *269*, 400–403. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
188. Jones, J.J.; Stump, M.J.; Fleming, R.C.; Lay, J.O.; Wilkins, C.L. Strategies and data analysis techniques for lipid and phospholipid chemistry elucidation by intact cell MALDI-FTMS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1665–1674. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
189. Clark, C.M.; Costa, M.S.; Sanchez, L.M.; Murphy, B.T. Coupling MALDI-TOF mass spectrometry protein and specialized metabolite analyses to rapidly discriminate bacterial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 4981–4986. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
190. Nguyen, D.D.; Saharuka, V.; Kovalev, V.; Stuart, L.; Del Prete, M.; Lubowiecka, K.; De Mot, R.; Venturi, V.; Alexandrov, T. Facilitating imaging mass spectrometry of microbial specialized metabolites with METASPACE. *Metabolites* **2021**, *11*, 477. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
191. Lewis, L.; Onsongo, M.; Njapau, H.; Schurz-Rogers, H.; Luber, G.; Kieszak, S.; Nyamongo, J.; Backer, L.; Mohamud Dahiye, A.; Misore, A.; et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 1763–1767. [\[CrossRef\]](#)
192. Richard, J.L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 3–10. [\[CrossRef\]](#)
193. Hleba, L.; Cisarová, M.; Shariati, M.A.; Tančinová, D. Detection of mycotoxins using maldi-tof mass spectrometry. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* **2017**, *7*, 181–185. [\[CrossRef\]](#)
194. Sivagnanam, K.; Komatsu, E.; Rampitsch, C.; Perreault, H.; Gräfenhan, T. Rapid screening of *Alternaria* mycotoxins using MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 357–361. [\[CrossRef\]](#)
195. Jerome Jeyakumar, J.M.; Zhang, M.; Thiruvengadam, M. Determination of mycotoxins by HPLC, LC-ESI-MS/MS, and MALDI-TOF MS in *Fusarium* species-infected sugarcane. *Microb. Pathog.* **2018**, *123*, 98–110. [\[CrossRef\]](#)
196. Cleary, J.L.; Luu, G.T.; Pierce, E.C.; Dutton, R.J.; Sanchez, L.M. BLANKA: An Algorithm for blank subtraction in mass spectrometry of complex biological samples. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *30*, 1426–1434. [\[CrossRef\]](#)
197. Sévin, D.C.; Kuehne, A.; Zamboni, N.; Sauer, U. Biological insights through nontargeted metabolomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *34*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
198. Hursf, G.B.; Doktycz, M.J.; Vass, A.A.; Buchanan, M.V. Detection of bacterial DNA polymerase chain reaction products by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *RAPID Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 377–382.
199. Honisch, C.; Chen, Y.; Mortimer, C.; Arnold, C.; Schmidt, O.; Van Den Boom, D.; Cantor, C.R.; Shah, H.N.; Sharbia, S.E. Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10649–10654. [\[CrossRef\]](#)
200. Von Wintzingerode, F.; Böcker, S.; Schlötelburg, C.; Chiu, N.H.L.; Storm, N.; Jurinke, C.; Cantor, C.R.; Göbel, U.B.; van den Boom, D. Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: A tool for rapid bacterial identification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7039–7044. [\[CrossRef\]](#)
201. Lefmann, M.; Honisch, C.; Böcker, S.; Storm, N.; Von Wintzingerode, F.; Schlötelburg, C.; Moter, A.; van den Boom, D.; Göbel, U.B. Novel mass spectrometry-based tool for genotypic identification of Mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 339–346. [\[CrossRef\]](#)
202. Cuénod, A.; Wüthrich, D.; Seth-Smith, H.M.B.; Ott, C.; Gehring, C.; Foucault, F.; Mouchet, R.; Kassim, A.; Revathi, G.; Vogt, D.R.; et al. Whole-genome sequence-informed MALDI-TOF MS diagnostics reveal importance of *Klebsiella oxytoca* group in invasive infections: A retrospective clinical study. *Genome Med.* **2021**, *13*, 150. [\[CrossRef\]](#)
203. Dunne, E.M.; Kok Ong, E.; Moser, R.J.; Siba, P.M.; Phuanukoonnon, S.; Greenhill, A.R.; Robins-Browne, R.M.; Mulholland, E.K.; Satzke, C. Multicocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* by use mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 3756–3760. [\[CrossRef\]](#)

204. Ha, S.M.; Kim, C.K.; Roh, J.; Byun, J.H.; Yang, S.J.; Choi, S.B.; Chun, J.; Yong, D. Application of the whole genome-based bacterial identification system, TRUEBAC ID, using clinical isolates that were not identified with three matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems. *Ann. Lab. Med.* **2019**, *39*, 530–536. [\[CrossRef\]](#)
205. Zhang, C.; Xiu, L.; Xiao, Y.; Xie, Z.; Ren, L.; Peng, J. Simultaneous detection of key bacterial pathogens related to pneumonia and meningitis using multiplex PCR coupled with mass spectrometry. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 107. [\[CrossRef\]](#)
206. Peng, L.; Li, K.; Zhang, C.; Jin, Q. MW polyomavirus and STL polyomavirus present in tonsillar tissues from children with chronic tonsillar disease. *Clin. Microbiol. Infect.* **2016**, *22*, 97. [\[CrossRef\]](#)
207. Nyasinga, J.; Kyany'a, C.; Okoth, R.; Oundo, C.; Matano, D.; Wacira, S.; Sang, W.; Musembi, S.; Musila, L. A six-member SNP assay on the iPlex MassARRAY platform provides a rapid and affordable alternative for typing major African *Staphylococcus aureus* types. *Access Microbiol.* **2019**, *1*, e000018. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
208. Syrmis, M.W.; Moser, R.J.; Whileu, D.M.; Vaska, V.; Coombs, G.W.; Nissen, M.D.; Sloots, T.P.; Nimmo, G.R. Comparison of a multiplexed MassARRAY system with real-time allele-specific PCR technology for genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 1804–1810. [\[CrossRef\]](#)
209. Read, A.F.; Woods, R.J. Antibiotic resistance management. *Evol. Med. Public Health* **2014**, *2014*, 147. [\[CrossRef\]](#)
210. Levy, S.B.; Bonnie, M. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **2004**, *10*, S122–S129. [\[CrossRef\]](#)
211. Spellberg, B.; Gilbert, D.N. The future of antibiotics and resistance: A tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59*, S71–S75. [\[CrossRef\]](#)
212. Sengupta, S.; Chattopadhyay, M.K.; Grossart, H.P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 47. [\[CrossRef\]](#)
213. Alekshun, M.N.; Levy, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **2007**, *128*, 1037–1050. [\[CrossRef\]](#)
214. Davies, J.; Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417–433. [\[CrossRef\]](#)
215. Żabicka, D.; Literacka, E. MDR, XDR, PDR-jednolite, międzynarodowe definicje nabytej oporności drobnoustrojów na antybiotyki. *Aktual. Nar. Programu Ochr. Antybiot.* **2012**, *3*, 1–7.
216. Sotgiu, G.; Ferrara, G.; Matteelli, A.; Richardson, M.D.; Centis, R.; Ruesch-Gerdes, S.; Tounghousova, O.; Zellweger, J.-P.; Spanevello, A.; Cirillo, D.; et al. Epidemiology and clinical management of XDR-TB: A systematic review by TBNET. *Eur. Respir. J.* **2009**, *33*, 871–881. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
217. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2013**, *62*, 165–170.
218. Patel, G.; Huprikar, S.; Factor, S.H.; Jenkins, S.G.; Calfee, D.P. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **2008**, *29*, 1099–1106. [\[CrossRef\]](#)
219. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; Truck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493–496. [\[CrossRef\]](#)
220. Picard, J. *Applied Veterinary Bacteriology and Mycology: Bacteriological Techniques*; University of Pretoria, Afrivip: Pretoria, South Africa, 1990.
221. Liu, B.; Pop, M. ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic. Acids Res.* **2009**, *37*, D443–D447. [\[CrossRef\]](#)
222. Yin, X.; Jiang, X.-T.; Chai, B.; Li, L.; Yang, Y.; Cole, J.R.; Tiedje, J.M.; Zhang, T. ARGs-OAP v2.0 with an expanded SARG database and Hidden Markov Models for enhancement characterization and quantification of antibiotic resistance genes in environmental metagenomes. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 2263–2270. [\[CrossRef\]](#)
223. McArthur, A.G.; Weglechner, N.; Nizam, F.; Yan, A.; Azad, M.A.; Baylay, A.J.; Bhullar, K.; Canova, M.J.; De Pascale, G.; Ejim, L.; et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 3348–3357. [\[CrossRef\]](#)
224. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M.; Voldby Larsen, M. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2640–2644. [\[CrossRef\]](#)
225. Wang, Y.R.; Chen, Q.; Cui, S.H.; Li, F.Q. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biomed. Environ. Sci.* **2013**, *26*, 430–436.
226. Rhoads, D.D.; Wang, H.; Karichu, J.; Richter, S.S. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *86*, 257–261. [\[CrossRef\]](#)
227. Schuster, D.; Josten, M.; Janssen, K.; Bodenstein, I.; Albert, C.; Schallenberg, A.; Gajdiss, M.; Sib, E.; Szekat, C.; Kehl, K.; et al. Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci harboring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int. J. Med. Microbiol.* **2018**, *308*, 522–526. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
228. Ho, P.-L.; Yau, C.-Y.; Ho, L.-Y.; Chen, J.H.K.; Lai, E.L.Y.; Lo, S.W.U.; Tse, C.W.S.; Chow, K.-H. Rapid detection of *cfiA* metallo- β -lactamase-producing *Bacteroides fragilis* by the combination of MALDI-TOF MS and CarbaNP. *J. Clin. Pathol.* **2017**, *70*, 868–873. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
229. Nix, I.D.; Idelevich, E.A.; Strock, L.M.; Sparbier, K.; Drews, O.; Kostrzewa, M.; Becker, K. Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* From Agar Cultures and Directly From Positive Blood Cultures Using MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
230. Idelevich, E.A.; Strock, L.M.; Sparbier, K.; Drews, O.; Kostrzewa, M.; Becker, K. Rapid Direct Susceptibility Testing from Positive Blood Cultures by the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Direct-on-Target Microdroplet Growth Assay. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*, e00913–e00918. [\[CrossRef\]](#)

231. Paskova, V.; Chudejova, K.; Sramkova, A.; Kraftova, L.; Jakubu, V.; Petinaki, E.A.; Zamlickova, H.; Neradova, K.; Papagiannitsis, C.C.; Hrabak, J. Insufficient repeatability and reproducibility of MALDI-TOF MS-based identification of MRSA. *Folia Microbiol.* **2020**, *65*, 895–900. [\[CrossRef\]](#)
232. Li, M.; Liu, M.; Song, Q.; Xiong, L.; Chen, Z.; Kang, M.; Xie, Y. Rapid antimicrobial susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry using a qualitative method in *Acinetobacter baumannii* complex. *J. Microbiol. Methods* **2018**, *153*, 60–65. [\[CrossRef\]](#)
233. Watkins, R.R.; David, M.Z.; Salata, R.A. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **2012**, *61*, 1179–1193. [\[CrossRef\]](#)
234. Liu, Y.-Y.; Chandler, C.E.; Leung, L.M.; McElheny, C.L.; Mettus, R.T.; Shanks, R.M.Q.; Liu, J.-H.; Goodlett, D.R.; Ernst, R.K.; Doi, Y. Structural modification of lipopolysaccharide conferred by mcr-1 in gram-negative ESKAPE pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00580–17. [\[CrossRef\]](#)
235. Lopalco, P.; Stahl, J.; Annese, C.; Averhoff, B.; Corcelli, A. Identification of unique cardiolipin and monolysocardiolipin species in *Acinetobacter baumannii*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2972. [\[CrossRef\]](#)
236. Bisignano, C.; Ginestra, G.; Smeriglio, A.; La Camera, E.; Crisafi, G.; Franchina, F.A.; Tranchida, P.Q.; Alibrandi, A.; Trombetta, D.; Mondello, L.; et al. Study of the lipid profile of ATCC and clinical strains of *Staphylococcus aureus* in relation to their antibiotic resistance. *Molecules* **2019**, *24*, 1276. [\[CrossRef\]](#)
237. Sparbier, K.; Schubert, S.; Kostrzewa, M. MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? *Methods* **2016**, *104*, 48–54. [\[CrossRef\]](#)
238. Hrabák, J.; Walková, R.; Študentová, V.; Chudáčková, E.; Bergerová, T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 3222–3227. [\[CrossRef\]](#)
239. Burckhardt, I.; Zimmermann, S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 3321–3324. [\[CrossRef\]](#)
240. Ota, Y.; Furuhashi, K.; Hirai, N.; Ishikawa, J.; Nagura, O.; Yamanaka, K.; Maekawa, M. Evaluation of MBT STAR-Cepha and MBT STAR-Carba kits for the detection of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemase producing microorganisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* **2021**, *183*, 106166. [\[CrossRef\]](#)
241. Anantharajah, A.; Tossens, B.; Olive, N.; Kabamba-Mukadi, B.; Rodriguez-Villalobos, H.; Verroken, A. Performance Evaluation of the MBT STAR®-Carba IVD Assay for the Detection of Carbapenemases With MALDI-TOF MS. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1413. [\[CrossRef\]](#)
242. Vogel, N.; Schiebel, K.; Humeny, A. Technologies in the Whole-Genome Age: MALDI-TOF-Based Genotyping. *Transfus. Med. Hemotherapy* **2009**, *36*, 253. [\[CrossRef\]](#)
243. Sauer, S. Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: Principles and diagnostic applications. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *363*, 95–105. [\[CrossRef\]](#)
244. Griffin, T.J.; Smith, L.M. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 77–84. [\[CrossRef\]](#)
245. Lau, A.F.; Wang, H.; Weingarten, R.A.; Drake, S.K.; Suffredini, A.F.; Garfield, M.K.; Chen, Y.; Gucek, M.; Youn, J.-H.; Stock, F.; et al. A rapid Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 2804. [\[CrossRef\]](#)
246. Cordovana, M.; Kostrzewa, M.; Glandorf, J.; Bienia, M.; Ambretti, S.; Pranada, A.B. A full MALDI-based approach to detect plasmid-encoded KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2854. [\[CrossRef\]](#)
247. Rybicka, M.; Miłosz, E.; Bielawski, K.P. Superiority of MALDI-TOF Mass Spectrometry over Real-Time PCR for SARS-CoV-2 RNA Detection. *Viruses* **2021**, *13*, 730. [\[CrossRef\]](#)
248. Ellis, J.A.; Ong, B. The MassARRAY® system for targeted SNP genotyping. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1492*, 77–94.
249. Shi, J.; He, G.; Ning, H.; Wu, L.; Wu, Z.; Ye, X.; Qiu, C.; Jiang, X. Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in re-treated patients. *Tuberculosis* **2022**, *135*, 102209. [\[CrossRef\]](#)
250. Pu, L.; Jian, Z.; Pan, F.; Geng, Y.; He, M.; Liao, P. Comparative genomic analysis and multi-drug resistance differences of *Acinetobacter baumannii* in Chongqing, China. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 2827. [\[CrossRef\]](#)
251. Suzuki, S.; Horinouchi, T.; Furusawa, C. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5792. [\[CrossRef\]](#)
252. Ikryannikova, L.N.; Shitikov, E.A.; Zhivankova, D.G.; Il'ina, E.N.; Edelstein, M.V.; Govorun, V.M. A MALDI TOF MS-based minisequencing method for rapid detection of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of Enterobacteriaceae. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *75*, 385–391. [\[CrossRef\]](#)
253. Stewart, P.S. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiol. Spectr.* **2015**, *3*, 1–30.
254. Vu, B.; Chen, M.; Crawford, R.J.; Ivanova, E.P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* **2009**, *14*, 2535. [\[CrossRef\]](#)
255. Houari, A.; Picard, J.; Habarou, H.; Galas, L.; Vaudry, H.; Heim, V.; Di Martino, P. Rheology of biofilms formed at the surface of NF membranes in a drinking water production unit. *Biofouling* **2008**, *24*, 235–240. [\[CrossRef\]](#)
256. Chen, M.; Yu, Q.; Sun, H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 18488–18501. [\[CrossRef\]](#)

257. Darouiche, R.O. Treatment of infections associated with surgical implants. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *350*, 1422–1429. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
258. Ribeiro, M.; Monteiro, F.J.; Ferraz, M.P. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter* **2012**, *2*, 176–194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
259. Kaya, E.; Grassi, L.; Benedetti, A.; Maisetta, G.; Pileggi, C.; Di Luca, M.; Batoni, G.; Esin, S. In vitro interaction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with human peripheral blood mononuclear cells. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
260. Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 322–332. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
261. Singh, S.; Singh, S.K.; Chowdhury, I.; Singh, R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol. J.* **2017**, *11*, 53. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
262. Zambrano, M.M.; Kolter, R. Mycobacterial biofilms: A greasy way to hold it together. *Cell* **2005**, *123*, 762–764. [\[CrossRef\]](#)
263. Abidi, S.H.; Sherwani, S.K.; Siddiqui, T.R.; Bashir, A.; Kazmi, S.U. Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. *BMC Ophthalmol.* **2013**, *13*, 57. [\[CrossRef\]](#)
264. Amin, M.; Pai, V.; Qayoom, S.; Arshi, S.; Khurshid, S. Biofilm formation and multidrug resistance in nosocomial isolates of *Acinetobacter*. *Indian J. Microbiol. Res.* **2018**, *5*, 425.
265. Manandhar, S.; Singh, A.; Varma, A.; Pandey, S.; Shrivastava, N. Biofilm producing clinical *Staphylococcus aureus* isolates augmented prevalence of antibiotic resistant cases in tertiary care hospitals of Nepal. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2749. [\[CrossRef\]](#)
266. Cepas, V.; López, Y.; Muñoz, E.; Rolo, D.; Ardanuy, C.; Martí, S.; Xervavins, M.; Horcajada, J.P.; Bosch, J.; Soto, S.M. Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Microb. Drug Resist.* **2019**, *25*, 72–79. [\[CrossRef\]](#)
267. Avila-Novoa, M.G.; Solís-Velázquez, O.A.; Rangel-López, D.E.; González-Gómez, J.P.; Guerrero-Medina, P.J.; Gutiérrez-Lomeli, M. Biofilm formation and detection of fluoroquinolone-and carbapenem-resistant genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2019**, *2019*, 3454907. [\[CrossRef\]](#)
268. Caputo, P.; Di Martino, M.C.; Perfetto, B.; Iovino, F.; Donnarumma, G. Use of MALDI-TOF MS to discriminate between biofilm-producer and non-producer strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 1695. [\[CrossRef\]](#)
269. Li, B.; Comi, T.J.; Si, T.; Dunham, S.J.B.; Sweedler, J.V. A one-step matrix application method for MALDI mass spectrometry imaging of bacterial colony biofilms. *J. Mass Spectrom.* **2016**, *51*, 1030–1035. [\[CrossRef\]](#)
270. Pauter, K.; Railean-Plugaru, V.; Zloch, M.; Pomastowski, P.; Szultka-Młyńska, M.; Buszewski, B. Identification, structure and characterization of *Bacillus tequilensis* biofilm with the use of electrophoresis and complementary approaches. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 722. [\[CrossRef\]](#)
271. Si, T.; Li, B.; Zhang, K.; Xu, Y.; Zhao, H.; Sweedler, J.V. Characterization of *Bacillus subtilis* colony biofilms via mass spectrometry and fluorescence imaging. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 1955–1962. [\[CrossRef\]](#)
272. Pereira, F.D.E.S.; Bonatto, C.C.; Lopes, C.A.P.; Pereira, A.L.; Silva, L.P. Use of MALDI-TOF mass spectrometry to analyze the molecular profile of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on glass and plastic surfaces. *Microb. Pathog.* **2015**, *86*, 32–37. [\[CrossRef\]](#)
273. De Carolis, E.; Soldini, S.; La Rosa, M.; Nucci, F.; Posteraro, B.; Sanguinetti, M. BIOF-HILO assay: A new MALDI-TOF mass spectrometry based method for discriminating between high- and low-biofilm-producing *Candida parapsilosis* isolates. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2046. [\[CrossRef\]](#)

PUBLIKACJA [P2]

Identification of bacteria associated with post-operative wounds of patients with use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry approach

M. Szultka-Młyńska, **D. Janiszewska**, P. Pomastowski, M. Złoch,

W. Kupczyk, B. Buszewski

Molecules (2021) 26: 1-24. IF₂₀₂₁ = 4,927 PM = 140

doi: 10.3390/molecules26165007

Article

Identification of Bacteria Associated with Post-Operative Wounds of Patients with the Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Approach

Małgorzata Szultka-Młyńska ^{1,*}, Daria Janiszewska ¹, Paweł Pomastowski ², Michał Złoch ²,
Wojciech Kupczyk ³ and Bogusław Buszewski ^{1,2}

¹ Department of Environmental Chemistry and Bioanalytics, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University, Gagarin 7, 87-100 Toruń, Poland; janiszewska_daria@doktorant.umk.pl (D.J.); bbusz@umk.pl (B.B.)

² Centre for Modern Interdisciplinary Technologies, Nicolaus Copernicus University, Wilenska 4, 87-100 Toruń, Poland; pawel_pomastowski@wp.pl (P.P.); michalzloch87@gmail.com (M.Z.)

³ Department of General, Gastroenterological and Oncological Surgery, Collegium Medicum, Nicolaus Copernicus University, 87-100 Toruń, Poland; kupczykwojciech@tlen.pl

* Correspondence: mszultka@umk.pl



Citation: Szultka-Młyńska, M.; Janiszewska, D.; Pomastowski, P.; Złoch, M.; Kupczyk, W.; Buszewski, B. Identification of Bacteria Associated with Post-Operative Wounds of Patients with the Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Approach. *Molecules* **2021**, *26*, 5007. <https://doi.org/10.3390/molecules26165007>

Academic Editors: José Rubén Tormo, Claire Turner and Evangelos Gikas

Received: 1 July 2021

Accepted: 16 August 2021

Published: 18 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The bacterial infection of post-operative wounds is a common health problem. Therefore, it is important to investigate fast and accurate methods of identifying bacteria in clinical samples. The aim of the study was to analyse the use of the MALDI-TOF MS technique to identify microorganism wounds that are difficult to heal. The most common bacteria are *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., and *Enterococcus* spp. We also demonstrate the effect of culture conditions, such as the used growth medium (solid: Brain Heart Infusion Agar, Mueller Hilton Agar, Glucose Bromocresol Purple Agar, and Vancomycin Resistance Enterococci Agar Base and liquid: Tryptic Soy Broth and BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F), the incubation time (4, 6, and 24h), and the method of the preparation of bacterial protein extracts (the standard method based on the Bruker guideline, the Sepsityper method) to identify factors and the quality of the obtained mass spectra. By comparing the protein profiles of bacteria from patients not treated with antibiotics to those treated with antibiotics based on the presence/absence of specific signals and using the UniProt platform, it was possible to predict the probable mechanism of the action of the antibiotic used and the mechanism of drug resistance.

Keywords: antibiotic influence; bacterial strain; MALDI-TOF MS; post-operative wound

1. Introduction

Quick and reliable methods are needed to identify bacteria from post-operative wounds. The rapid identification of the pathogen causing the infection will enable to implement of an appropriate therapy [1]. Currently, the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry technique (MALDI-TOF MS) is used with great success [2]. The MALDI-TOF MS technique allows for quick and accurate identification of clinically relevant microorganisms [3,4].

Post-operative wound infection, also known as surgical site infections (SSIs), is a common healthcare problem. It is estimated that 2–7% of all operations develop SSIs, and 11% of all deaths in intensive care patients are related to post-operative wound infections [5]. Research confirms the incidence of SSIs (2.1%) and shows that infections occur even when surgeons take aseptic precautions during surgery and patients are treated before and after surgery [6]. Infections are associated with the bacterial contamination of the wound during surgery or later due to the deterioration of skin barriers during wound care [7].

The most common pathogens of hard to heal post-operative wound infections are *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus* spp. Other frequently identified microorganisms in infected post-operative wounds include *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp. and coagulase-negative staphylococci [8,9]. Their role as infectious agents is due to the increasing number of highly virulent organisms that can survive in hospital conditions.

The widespread use of broad-spectrum antibiotics has likely led to the development of antibiotic-resistant and multi-drug-resistant strains, such as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and *P. aeruginosa* [10–12]. Antibiotic prophylaxis significantly reduces the risk of post-operative infections; however, there is still disagreement about the duration of the antibiotic therapy and the choice of antibiotics [13,14]. β -lactam antibiotics, quinolones, and lincosamide antibiotics are used in order to treat bacterial infections of post-operative wounds [15].

The MALDI-TOF MS is the simplest form of mass spectrometry, successfully applied to effectively detect bacteria in clinical samples [2]. The identification based on the MALDI-TOF MS consists of generating mass spectra from the analysis of whole cells or bacterial extracts representing mainly ribosomal proteins and other abundant bacterial proteins [16,17]. The obtained spectra are then matched with the references in the database. The identification accuracy depends on the appropriate quality of the spectrum and a close reference match in the database.

Some of the commercially available databases used to identify microorganisms are MALDI Biotyper (BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany) and VITEK[®]MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) [18]. The quality of the protein profiles of the identified bacteria may be influenced by the types of matrix, the composition of the culture medium, and the temperature, pH, and incubation time of the bacterial cells with the method of sample preparation [19].

These changes are visible in the form of differences in the intensity and separation of individual signals and the loss or shift of signals, which may be caused by different expressions of the analysed proteins. In addition, an important factor is a procedure of sample application to the MALDI target plate and the selection of an appropriate matrix affecting the range of ionized molecules [20]. The MALDI-TOF MS can also be applied as an efficient tool to study the drug-resistance mechanism and the antibiotic drug metabolite identification [21,22].

The most frequently studied resistance is the one directed against β -lactam antibiotic drugs (cefotaxime, meropenem, piperacillin, tazobactam, penicillin, and amoxicillin), which inhibit the bacterial cell wall biosynthesis by affecting penicillin-binding proteins (PBPs) [23]. β -lactam resistance is a growing and disturbing phenomenon, and it mainly affects *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*.

Bacterial resistance to β -lactams is determined by three main mechanisms: (I) the production of PBP proteins with low affinity for β -lactams while performing a catalytic function, (II) the regulation of β -lactam entry and efflux, and (III) the production of β -lactamases—enzymes hydrolysing β -lactam molecules [24]. Quinolone antibiotics, including ciprofloxacin, are the agents that inhibit DNA replication. The bactericidal activity is based on the inhibition of topoisomerase IV (Gram-positive bacteria) and topoisomerase II—DNA grainy (Gram-negative ones), enzymes indispensable for the course of replication and the provocative DNA twist [25]. Resistance to quinolone antibiotics has been a problem for over 40 years and maybe related to two mechanisms.

The first is related to chromosomal mutations in genes encoding the protein targets, or mutations causing reduced drug accumulation, either by a decreased uptake or by an increased efflux—they mainly concern *Enterobacteriaceae* bacteria, *P. aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*. Acquired plasmid resistance genes that produce protective target proteins, drug modifying enzymes or drug efflux pumps represent the second mechanism of quinolone resistance (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *E. coli*) [26]. Lincosamide antibiotics, such as clindamycin inhibit bacterial protein synthesis by specific

actions on the 50S subunit of the bacterial ribosome, possibly by influencing the initiation of the peptide chain. The mechanisms of resistance are similar to those of quinolone resistance and are characteristic of, among others, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., and *Staphylococcus* spp. [27].

The aim of the research was a new approach to development a spectrometric method to identify bacterial strains isolated from post-operative wounds of patients undergoing antibiotic therapy using the MALDI-TOF MS technique and the influence of culture conditions on the level of the identification and quality of mass spectra. Moreover, generated proteins profiles of strains derived from control patients (no antibiotic treatment) and those subjected to antibiotic therapy were compared based on the presence/absence of specific signals of bacterial molecular profile.

Then, the signals were analysed following their name and function by using the UniProt database as a pilot study. Utilization of the UniProt database was performed as an attempts to indicate the protein complexes responsible for molecular changes in bacterial profiles—untargeted analysis. Due to the use of MALDI-TOF MS technique and the UniProt database, we compared the obtained signals and, on this basis, it was possible to investigate whether there are factors contributing to the development of antibiotic resistance in isolates from patients undergoing antibiotic therapy.

2. Results and Discussion

2.1. Bacterial Identification

The sample preparation procedure and the MALDI-TOF MS analysis allowed us to obtain MS spectra and identify bacterial strains on post-operative wounds of patients. Bacterial strains were analysed in single-spectrum and MSP (Main spectra profiles) modes using the MALDI Biotyper 3.0 platform. Identification results and score values for both RAW and MSP spectra for each medium are summarized in Table 1.

The use of four culture media allowed for greater microbiological diversity. Due to this, it was possible to analyse the number of not only the species but also the strains colonizing difficult post-operative wounds.

Identifying the most significant number of bacterial species was possible through the use of non-selective media: BHI and MH, which allow the isolation of a wide variety of microorganisms. These media have been successfully used to isolate bacteria from clinical specimens [28,29]. Compared to other culture media, BHI was the only one that enabled the isolation of *Lactobacillus pentosus* and *Providencia stuartii*. Fewer bacterial species were identified on the selective BCP medium to isolate *Enterobacteriaceae* bacteria [30]. The BCP medium was the only one that allowed *Enterobacter kobei* to be detected. The smallest number of bacterial species involved in post-operative wound infections was isolated on the VRE medium, a selective medium for the culture of vancomycin-resistant enterococci, such as *E. faecalis* and *E. faecium* [31].

In summary, we obtained 75 different bacterial isolates, among which 71 were identified. Bacteria from 50 samples were identified with species confidence and 21 with genus confidence. The use of four different microbiological media allowed us to identify 34 strains belonging to 15 species and nine types of bacteria (Table 2). The highest percentage concerned bacteria of the genus *Enterococcus* (26.5%) and *Staphylococcus* (23.5%). *E. coli* accounted for 11% of all the identified bacteria. Each of the other types of bacteria accounted for <10% of all identified microorganisms.

Table 1. MALDI-TOF MS identification results from raw samples (primary identification, RAW) and main spectra library (second identification, MSP) with the level of the identification of bacteria strains isolated from solid medium (non-selective: BHI, MH and selective: BCP, VRE) using the Biotyper 3.0 platform.

Non-Selective Growth Media									
BHI					MH				
Sample Name	RAW		MSP		Sample Name	RAW		MSP	
	Best Match	Score Value	Best Match	Score Value		Best Match	Score Value	Best Match	Score Value
B1a	<i>Providencia stuartii</i> DSM 4539T HAM	2.10	<i>Providencia stuartii</i> DSM 4539T HAM	1.99	B1a	<i>Morganella morganii</i> ssp <i>morganii</i> 15284_1 CHB	2.04	<i>Morganella morganii</i> ssp <i>morganii</i> 15284_1 CHB	2.05
B1b	<i>Enterobacter cloacae</i> MB_5277_05 THL	1.91	<i>Enterobacter cloacae</i> MB_5277_05 THL	1.78	B1b	<i>Morganella morganii</i> 9544_1 CHB	1.93	<i>Morganella morganii</i> 9544_1 CHB	1.93
B3a	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 THL	2.35	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL	2.26	B3aD	<i>Enterobacter cloacae</i> MB_5277_05 THL	2.03	<i>Enterobacter cloacae</i> MB11506_1 CHB	1.99
B3b	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 THL	2.19	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 THL	1.99	B3aM	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL	2.15	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 THL	2.12
B4a	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10547 CHB	2.28	-	1.69	B3b	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL	2.23	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 THL	2.19
B4b	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990T THL	1.90	-	1.53	B4a	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10547 CHB	1.99	-	1.51
B7a	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	2.14	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	2.15	B4bD	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> DSM 30104T HAM	2.13	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	1.90
B7b	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.09	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.09	B4bM	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 0547 CHB	1.98	<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 4851 DSM	1.74
B8a	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	2.19	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	2.14	B7a	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.25	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.25
B8b	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 2570 DSM	2.18	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20409 DSM	1.91	B7b	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.35	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.29

Table 1. Cont.

Non-Selective Growth Media									
BHI					MH				
Sample Name	RAW		MSP		Sample Name	RAW		MSP	
	Best Match	Score Value	Best Match	Score Value		Best Match	Score Value	Best Match	Score Value
B9a	-	1.45	-	1.39	B8a	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20409 DSM	2.10	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20409 DSM	2.03
B11a	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>ozaenae</i> DSM 16358T HAM	2.15	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>rhinoscleromatis</i> DSM 16231T HAM	2.06	B8b	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	2.12	<i>Enterococcus faecalis</i> 20247_4 CHB	1.91
B11b	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> DSM 30104T HAM	2.07	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	2.04	B11b	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	2.32	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	2.32
B15a	-	1.39	-	1.33	B15a	<i>Bacillus pumilus</i> IAM 12469 PAH	1.74	-	1.64
B15b	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	2.30	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20409 DSM	2.26	B15b	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	2.43	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20409 DSM	2.35
B17a	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 THL	2.25	<i>Escherichia coli</i> DH5alpha BRL	2.18	B17a	<i>Escherichia coli</i> MB11464_1 CHB	1.99	<i>Escherichia coli</i> MB11464_1 CHB	1.88
B18a	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 10024 CHB	2.23	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 10024 CHB	1.97	B17b	<i>Escherichia coli</i> RV412_A1_2010_06a LBK	1.95	<i>Escherichia coli</i> RV412_A1_2010_06a LBK	1.95
B18b	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCM 4505 CCM	2.10	-	1.68	B18a	<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 1798 DSM	1.85	<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 1798 DSM	1.89
B21a	<i>Bacillus pumilus</i> IAM 12469 PAH	1.77	-	1.68	B18b	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> Mb18803_2 CHB	2.01	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> Mb18803_2 CHB	1.93
B21a (white)	<i>Lactobacillus pentosus</i> DSM 20199 DSM	1.82	-	1.21	B21a	-	1.68	-	1.59

Table 1. Cont.

Selective Growth Media									
Sample Name	BCP				Sample name	VRE			
	RAW		MSP			RAW		MSP	
	Best Match	Score Value	Best Match	Score Value		Best Match	Score Value	Best Match	Score Value
B1a	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 THL	2.22	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 THL	2.09	B1a	<i>Morganella morganii</i> 9544_1 CHB	1.96	<i>Morganella morganii</i> 9544_1 CHB	1.80
B1b	<i>Escherichia coli</i> MB11464_1 CHB	2.15	<i>Escherichia coli</i> MB11464_1 CHB	2.10	B1b	<i>Morganella morganii</i> (E) 21086317 MLD	1.99	<i>Morganella morganii</i> (E) 21086317 MLD	1.89
B3aD	<i>Enterobacter kobei</i> DSM 13645T DSM	2.20	<i>Enterobacter cloacae</i> 13159_1 CHB	2.08	B3a	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 THL	2.47	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 THL	2.21
B3aM	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL	2.03	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL	1.88	B3b	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 THL	2.47	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL	2.25
B3b	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL	1.95	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 THL	1.84	B4a	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	2.34	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20409 DSM	2.33
B4a	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990T THL	2.04	<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 1798 DSM	1.84	B4b	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	2.06	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	1.83
B4b	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990T THL	2.14	<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 1798 DSM	1.84	B7a	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	1.97	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	1.95
B7a	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.19	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	2.15	B7b	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	1.95	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	1.95
B7b	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.05	<i>Enterococcus faecium</i> 20218_1 CHB	2.09	B8b	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	2.20	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 7080 THL	2.15
B8a	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20371 DSM	1.98	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20371 DSM	1.90	B15a	<i>Bacillus pumilus</i> DSM 13835 DSM	2.09	<i>Bacillus pumilus</i> DSM 13835 DSM	2.09
B8b	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.32	<i>Enterococcus faecium</i> 11037 CHB	2.38	B15b	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 CHB	2.20	<i>Enterococcus faecalis</i> 20247_4 CHB	2.11

Table 1. Cont.

Selective Growth Media									
BCP					VRE				
Sample Name	RAW		MSP		Sample name	RAW		MSP	
	Best Match	Score Value	Best Match	Score Value		Best Match	Score Value	Best Match	Score Value
B11a	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	2.22	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	2.17	B17a	<i>Enterococcus avium</i> 96 PIM	1.87	<i>Enterococcus avium</i> 96 PIM	1.87
B11b	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	2.10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	2.10	B18a	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10547 CHB	2.16	<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 3269 DSM	1.92
B15a	-	1.61	-	1.61	B18b	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10547 CHB	1.92	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 4b_r ESL	1.87
B15b	<i>Enterococcus faecalis</i> 20247_4 CHB	2.29	<i>Enterococcus faecalis</i> 20247_4 CHB	2.18	B21a	<i>Bacillus altitudinis</i> CS 809_1 BRB	1.72	-	1.57
B17a	<i>Escherichia coli</i> DH5alphaBRL	2.19	<i>Escherichia coli</i> DH5alpha BRL	2.01					
B17b	<i>Escherichia coli</i> DH5alpha BRL	2.08	<i>Escherichia coli</i> MB11464_1 CHB	1.84					
B18a	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 10547 CHB	2.08	<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 1798 DSM	1.94					
B18b	<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 1798 DSM	2.00	<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSM 1798 DSM	2.13					
B21a	<i>Bacillus pumilus</i> IAM 12469 PAH	1.73	-	1.68					

The probability of correct identification in the MALDI Biotyper 3.0 system was expressed in the form of a point index and a graphical index: 2.300–3.000: reliable identification of the microorganism up to species level; 2.000–2.299: reliable identification of the microorganism to genus level and the probable result of identification to species level; 1.700–1.999: indicates the probable result of identification to the level of the genus; <1.699: not reliable identification result; BH1–Brain Heart Infusion Agar, MH–Mueller Hinton Agar, BCP–Glucose Bromocresol Purple Agar, VRE–Vancomycin Resistance Enterococci Agar Base; a–swab stick from a tube with Amies solid transport medium (BorPol, Gliwice, Poland); b–dry swab stick placed in Amies liquid transport medium (DeltaSwab Amies, Barcelona, Spain); D–large colony; and M–small colony.

Table 2. Bacterial strains isolated from swabs from post-operative wounds and identified in biological material.

Bacteria from Biological Material	Reference Bacteria Strain
<i>Bacillus</i>	
<i>B. altitudinis</i> VRE.B21a	<i>B. altitudinis</i> CS 809_1 BRB
<i>B. pumilus</i> BCP.B21a	<i>B. pumilus</i> IAM 12469 PAH
<i>B. pumilus</i> VRE.B15a	<i>B. pumilus</i> DSM 13835 DSM
<i>Enterobacter</i>	
<i>E. cloacae</i> BHI.B1b	<i>E. cloacae</i> MB_5277_05 THL
<i>E. kobei</i> BCP.B3aD	<i>E. kobei</i> DSM 13645T DSM
<i>Enterococcus</i>	
<i>E. avium</i> VRE.B17a	<i>E. avium</i> 96 PIM
<i>E. faecalis</i> BCP.B8a	<i>E. faecalis</i> DSM 20371 DSM
<i>E. faecalis</i> BCP.B15b	<i>E. faecalis</i> 20247_4 CHB
<i>E. faecalis</i> BHI.B15b	<i>E. faecalis</i> ATCC 7080 THL
<i>E. faecalis</i> BHI.B8b	<i>E. faecalis</i> DSM 2570 DSM
<i>E. faecalis</i> VRE.B15b	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 CHB
<i>E. faecalis</i> MHA.B8a	<i>E. faecalis</i> DSM 20409 DSM
<i>E. faecium</i> BHI.B7b	<i>E. faecium</i> 11037 CHB
<i>E. faecium</i> BHI.B7a	<i>E. faecium</i> 20218_1 CHB
<i>Escherichia</i>	
<i>E. coli</i> BHI.B17a	<i>E. coli</i> ATCC 25922 THL
<i>E. coli</i> BCP.B1b	<i>E. coli</i> MB11464_1 CHB
<i>E. coli</i> BCP.B17a	<i>E. coli</i> DH5alpha BRL
<i>E. coli</i> MHA.B17a	<i>E. coli</i> RV412_A1_2010_06a LBK
<i>Klebsiella</i>	
<i>K. pneumoniae</i> BCP.B11a	<i>K. pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB
<i>K. pneumoniae</i> BHI.B11a	<i>K. pneumoniae</i> ssp <i>ozaenae</i> DSM 16358T HAM
<i>K.pneumoniae</i> BHI.B11b	<i>K.pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> DSM 30104T HAM
<i>Lactobacillus</i>	
<i>L. pentosus</i> BHI.B21a(white)	<i>L. pentosus</i> DSM 20199 DSM
<i>Morganella</i>	
<i>M. morgani</i> MHA.B1b	<i>M. morgani</i> 9544_1 CHB
<i>M. morgani</i> VRE.B1b	<i>M. morgani</i> (E) 21086317 MLD
<i>M. morgani</i> MHA.B1a	<i>M. morgani</i> ssp <i>morgani</i> 15284_1 CHB
<i>Providencia</i>	
<i>P. stuartii</i> BHI.B1a	<i>P. stuartii</i> DSM 4539T HAM
<i>Staphylococcus</i>	
<i>S. aureus</i> BCP.B3aM	<i>S. aureus</i> ATCC_33591_THL
<i>S. aureus</i> BHI.B3b	<i>S. aureus</i> ATCC_25923_THL
<i>S. epidermidis</i> BCP.B4a	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990T THL
<i>S. epidermidis</i> BHI.B4a	<i>S. epidermidis</i> 10547 CHB
<i>S. epidermidis</i> BCP.B18b	<i>S. epidermidis</i> DSM 1798 DSM
<i>S. epidermidis</i> BHI. B18b	<i>S. epidermidis</i> CCM 4505 CCM
<i>S. haemolyticus</i> BHI.B18a	<i>S. haemolyticus</i> 10024 CHB
<i>S. haemolyticus</i> MHA.B18b	<i>S. haemolyticus</i> Mb18803_2 CHB

The research by Gangania et al. and Akinkunmi et al., confirmed the high share of *E. coli* and *S. aureus* in post-operative wound infections; they also indicate *Staphylococcus*, *Enterococcus*, and *Streptococcus* bacteria. The research shows that *P. aeruginosa* also plays a role in surgical site infections [32,33]. The MALDI-TOF MS analysis did not allow the identification of three bacterial isolates (score < 1.7). This indicates the need to extend the currently available databases, also indicated by the literature data [34]. The insufficient number of mass spectra in the base of testers may also cause incorrect identification, which was proven by Body et al. [35].

As for bacterial species commonly found in clinical samples, the available databases are robust and sufficient to conclude that they are enough for the routine identification in clinical microbiology [36]. On the other hand, known human pathogens represent only 1% of the population of all microbial species in the world; therefore, the databases will not be fully complete [37]. Extending the databases will enable more accurate identification of microorganisms. For example, a group previously thought to be a single *Candida haemulonii* is now identified as a complex of species, three of which are regularly detected in clinical trials [38]. A similar situation applies to bacteria of the *Klebsiella* genus [39]. The newly discovered species belonging to these types of microorganisms appear to be of clinical importance. Updating the databases can solve the problem of misidentification or non-identification [40].

From the swabs taken from a patient treated with three antibiotics (B21) and two antibiotics, ciprofloxacin combined with metronidazole (B12), it was impossible to isolate the bacteria from any of the solid media used, which may indicate that the antibiotic therapy worked effectively. The presence of *Bacillus* spp. in the patient sample B21 may have been caused by the contamination of the sample.

The type of swabs used was also taken into account. It can be concluded that the analysis performed for liquid and solid swabs gave a similar number of identified bacteria at the species level.

2.2. Mass Spectra Analysis

The analysis of mass spectra obtained for *S. aureus* bacteria isolated from each of the four culture media (Figure 1), for which score >2 showed that a different quality of the spectrum was obtained depending on the medium used. The highest identification score value was obtained for the bacteria isolated from the VRE medium (2.47) and BHI (2.35). The medium from which the bacteria giving the lowest identification scores were isolated was the selective BCP medium (2.03).

A salt blend added to the VRE medium and pigments in the BCP medium can reduce the yield or inhibit the analyte is ionized by blocking/suppressing the ionization process [41,42]. On the other hand, Zloch et al. investigated the effect of various solid culture media on the identification of *S. aureus* [43]. Their results showed that each medium allowed for the correct identification of microorganisms, and the differences between the score values were minimal.

Phyloproteomic relationships between isolates are presented in MSP dendrograms (Figure 2). All the phyloproteomic trees proved the relationship between the bacterial strains isolated from the biological material and the reference strains present in the database. Proteomic trees were made in order to confirm the correct identification of the isolated bacterial strain. Their analysis showed that five groups of bacteria were identified on the BHI medium, four groups on the BCP, five groups on the VRE, and eight groups on the MH. On each of the dendrograms of bacteria evolved from the BHI, BCP, and MH media, bacteria of the genus *Escherichia*, *Klebsiella*, and *Enterobacter* were grouped into one cluster may prove their close relationship.

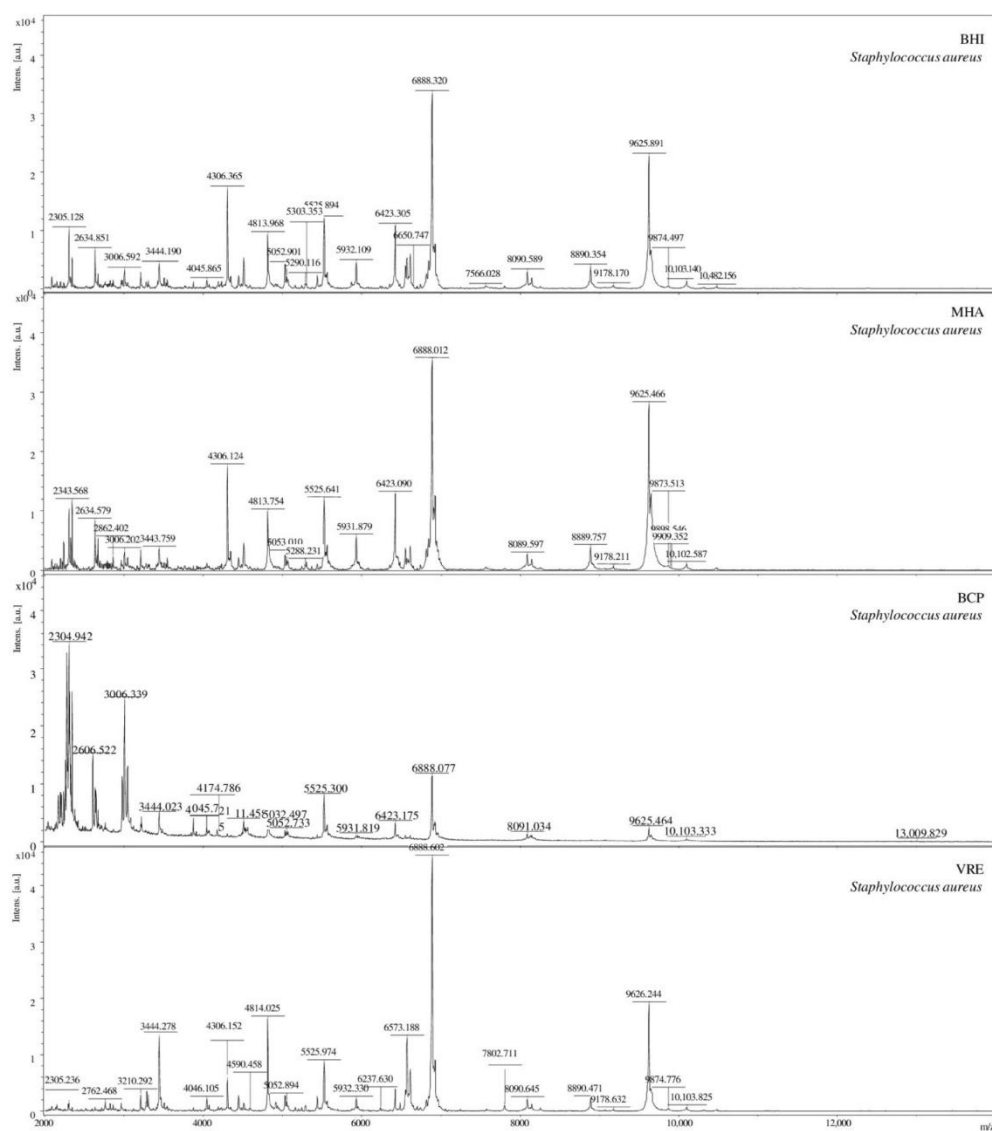


Figure 1. Comparison of the MS spectra for *S. aureus* bacteria isolated on four different culture media (BHI, BCP, MHA, and VRE), [a.u.] = arbitrary units.

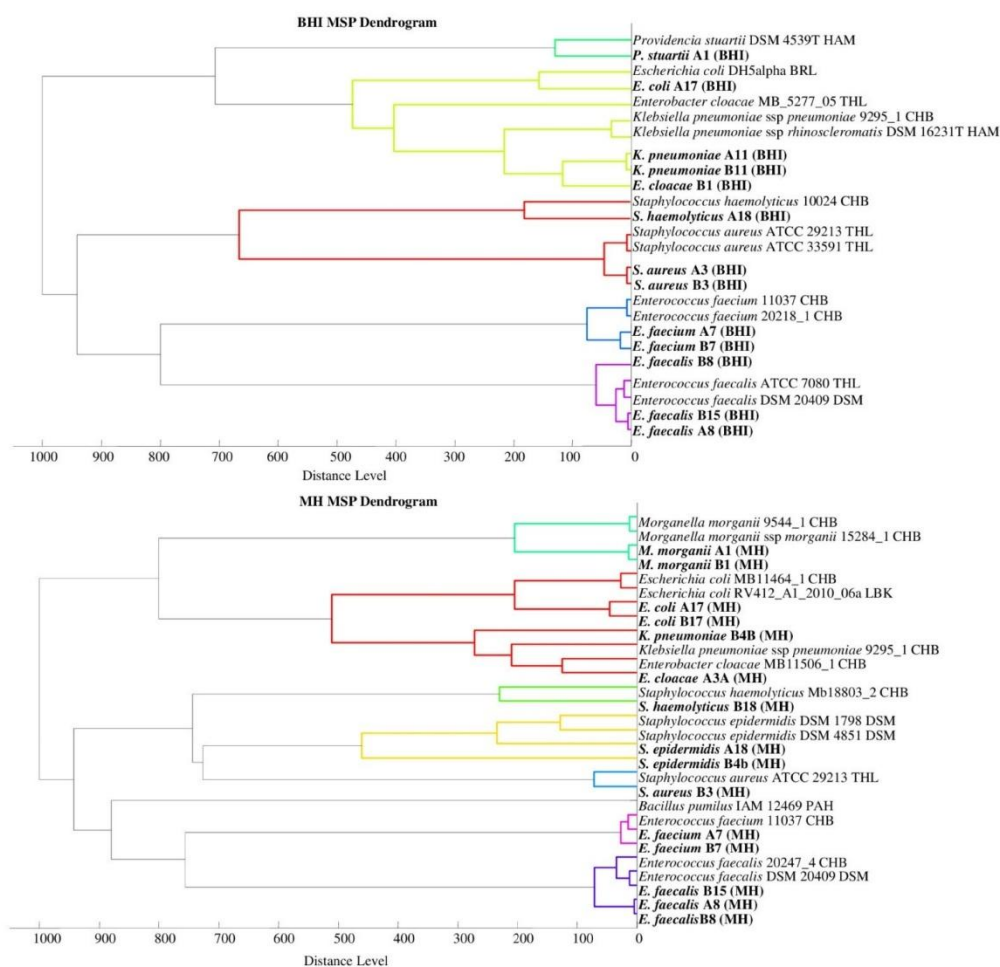


Figure 2. Cont.

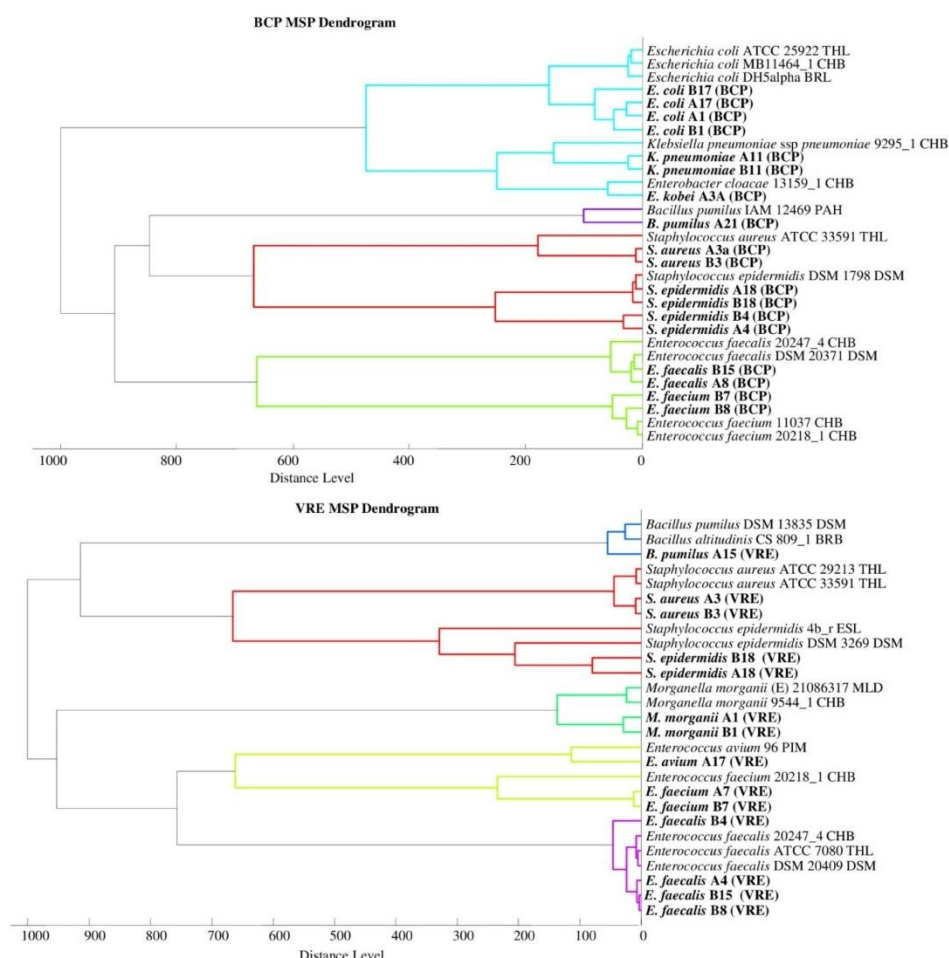


Figure 2. Phyloproteomic trees of the identified bacterial strains on all media and reference strains based on MSP identification via the MALDI Biotyper platform, MSP = main spectra.

The listed species of bacteria belong to the large *Enterobacteriaceae* family, and the results from the phyloproteomic tree correlate with their genetic background. This is confirmed, among other things, by the studies by Paradis et al. [44]. No close relationship was found for the bacteria of the genus *Staphylococcus* triggered on the MH medium as they were divided into three groups based on species (*S. haemolyticus*, *S. aureus*, and *S. epidermidis*). The analysis of phyloproteomic trees made for bacteria evolved from the remaining growth media (BHL, BCP, and VRE) allows us to conclude that there is a close relationship between these strains.

The analysis of the phylogenetic trees by Ziłoch et al. confirmed the relative origin of the *Staphylococcus* species [2]. The analysis of the VRE dendrogram shows that *Enterococcus* bacteria were divided into two groups (*E. faecalis* and *E. faecium*), and the genetic relationships presented by analogous phylogenetic trees were confirmed by the data obtained from the analysis of phyloproteomic trees [45].

2.3. Identification of Proteins with Specific Peak to the Predicted Antibiotic Mechanism of Action and Bacterial Drug-Resistance

Table 3 includes the specific peaks identified by the MALDI-TOF MS and their characteristics from the UniProt database. Moreover, the table does not include signals from uncharacterized proteins or proteins that are not associated with the action of antibiotics or antibiotic resistance. The values of m/z from the control sample and the test sample were compared. The samples tested were protein profiles obtained for *S. aureus* (patient treated with clindamycin), *E. cloacae* (patient treated with clindamycin) and *E. faecalis* (piperacillin combined with tazobactam).

Table 3. Summary of signals observed on MALDI-TOF MS spectra with characterized m/z values, according to the database of Universal Protein (UniProt).

<i>S. aureus</i> /ATCC 29213 THL/(Antibiotic: Clindamycin)					
m/z	Control Sample	Test Sample	Protein	Putative Function	Ref.
2656.8	-	+	Phenol-soluble modulins PSM- α -3	virulence factor	[46,47]
3006.2	-	+	TraR/DksA family transcriptional regulator	virulence, antibiotic resistance, pathogenesis	[48]
4290.7	+	-	50S ribosomal protein L36	builds ribosome, translation	[49]
4365.1	+	-	ABC transporter ATP-binding protein		[50,51]
4379.9	+	-	Teichoic acid ABC transporter permease		[50,51]
4386.1	+	-	Single-stranded DNA-binding protein	DNA replication	[52]
4822.6	+	-	Oligopeptide ABC superfamily ATP binding cassette transporter, binding protein (Protein CysJ)		[50,51]
5437.4	+	-	50S ribosomal protein L33	builds ribosome, translation	[49]
5872.7	+	-	50S ribosomal protein L33	builds ribosome, translation	[49]
6355.1	-	+	Antibiotic transport-associated protein		[53]
6589.8	-	+	Antibiotic resistance protein		[53]
6743.1	-	+	Exported protein		[53]
7022.9	+	-	ABC transporter ATP-binding protein		[50,51]
8111.7	-	+	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT)	kanamycin and gentamycin resistance	[54]
8908.0	+	-	Compound ABC uptake transporter ATP-binding protein		[50,51]
9898.5	-	+	Immunoglobulin G binding protein A	binding protein A	[55]
9909.4	-	+	Protein A	pathogenic factor	[55]
<i>E. faecalis</i> /ATCC 7080 THL/(antibiotics: piperacillin and tazobactam)					
m/z	Control sample	Test sample	Protein	Putative Function	
2443.3	-	+	Attenuator leader peptide	response to antibiotic	[56]
6341.0	+	-	50S ribosomal protein L30	builds ribosome, translation	[57]
<i>E. cloacae</i> /MB_5277_05 THL/(antibiotic: clindamycin)					
m/z	Control sample	Test sample	Protein	Putative Function	
3710.7	-	+	Agmatinase	catalysis of the reaction: agmatine + H_2O = putrescine + urea	[58]
5571.8	+	-	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+))	cofactor binding sites Mg^{2+} , Mn^{2+}	[59]
5598.8	-	+	Agmatinase	catalysis of the reaction: agmatine + H_2O = putrescine + urea	[58]
6417.9	-	+	Murein transglycosylase	break the glycosidic bond	[60]
7620.8	-	+	Cellulose biosynthesis protein BcsF	necessary for biofilm formation	[61]
9410.2	-	+	DNA polymerase V	part of the SOS response to DNA damage	[62]
10,315.8	+	-	ParB partition protein	regulation of transcription	[63]
10,883.9	-	+	Ribosome hibernation promoting factor HPF	primary metabolic process, regulation of translation	[64]

The control and test sample columns are highlighted as green and orange, respectively, to differentiate between them.

Eighteen specific signals related to virulence, drug resistance, or the administered antibiotic's mechanisms were identified for *S. aureus* / ATCC 29213 THL/. Among the signals appearing in the test sample, phenol-soluble modulins PSM- α -3 ($m/z = 2656.8$) can be distinguished. The studies of Queck et al. and Chatterjee et al. demonstrated that this protein is a rare example of combined antibiotic resistance and virulence factors in MRSA [46,47]. The increased PSM expression was shown to cause the increased virulence of the MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*) and MDR (multidrug-resistant) *S. aureus* strains and contribute to the infection's severity [65,66].

In addition, it was shown that PSM proteins are involved in the structuring of the bacterial biofilm of *S. aureus*, which entails the spread of infection and increases the resistance to antibiotics [67]. Generally, PSM toxin is a major virulence factor of *S. aureus* and primarily causes cytolysis in red and white blood cells. Among α -type phenol soluble modulins, the PSM- α 3 plays the most prominent role in *S. aureus* virulence and, moreover, is the most cytotoxic member of the family [67].

The presence of the TraR/DksA family transcriptional regulation ($m/z = 3006.2$) on bacterial conjugation plasmids suggests their role in pathogenicity, virulence, and antibiotic resistance [48]. In the case of bacteria isolated from control group patients, the presence of antibiotic transport proteins (characteristic for the signal $m/z = 6355.1$), uncharacterized in the database protein synthesized in response to antibiotic use ($m/z = 6589.8$) and exported protein ($m/z = 6743.1$) was also demonstrated. These proteins can contribute to the development of antibiotic resistance [53].

Characteristic signals for immunoglobulin G building protein A ($m/z = 9898.5$) and protein A ($m/z = 9909.4$) being a virulence factor, especially in MRSA strains [55], have been reported. In addition, a signal characteristic of GCN5-related *N*-acetyltransferase (GNAT) was also identified, the presence of which was first confirmed in kanamycin and gentamycin resistant bacteria [54]. This result may indicate resistance to more than one antibacterial agent in the analysed *S. aureus* strain.

Compared with the control group, the test sample is mainly the signals characterized as 50S ribosomal protein L36 ($m/z = 4290.7$) and L33 ($m/z = 5437.4$ and 5872.7). The inhibition of the production of ribosomal proteins, thus, prevents the translation and biosynthesis of bacterial proteins [49]. Signals from various ABC transport proteins were also identified ($m/z = 4365.1$, 4379.9 , 4822.6 , 7022.9 , and 8908.0). These proteins may affect the virulence of pathogenic strains and may be the target of antibiotics [50].

The lack of proteins from the ABC family will likely impair the import of many substances important for the life of bacterial cells and, thus, negatively affect their functioning [51]. Single-stranded DNA binding proteins ($m/z = 4386.1$) (ssDNA) (SSB), the signal of which does not appear only in the control sample, are necessary for the DNA replication and the protection of the delayed strand against the nuclease attack [52].

The patient who was identified with the presence of *E. cloacae* / MB_5277_05 THL/ was treated with clindamycin. After using the antibiotic, a signal appeared corresponding to the Agmatinase protein ($m/z = 3710.7$; 5598.8), catalysing the reaction of agmatine hydrolysis to putrescine and urea. McCurtain et al. proved that the accumulation of agmatinase could result in the increased antibiotic tolerance by bacteria [58].

We found that the MS spectrum of bacteria after the administration of the antibiotic showed a signal from murein transglycosylase ($m/z = 6417.9$), responsible for breaking the glycosidic bond and for the catalysis of intramolecular and glycosylation [60]. These reactions can disintegrate the bacterial cell wall. On the other hand, the appearance of the BcsF cellulose biosynthesis protein was discovered ($m/z = 7620.8$), which is involved in the formation of a bacterial biofilm and, thus, increased the resistance to antibiotics [61].

Additionally, it can be assumed that the use of clindamycin may affect damage to the genetic material, because the mass spectrum showed a signal from the DNA polymerase V ($m/z = 9410.181$), which is part of the SOS response to the DNA damage [62]. The antibiotic administration likely caused dysregulation of the DNA transcription, which pretended the ParB partition protein signal ($m/z = 10,315.8$) and translation—the appearance of a

factor favouring the hibernation of ribosomes HPF ($m/z = 10,883.9$) [63,64,68]. After the antibiotic treatment, the signal disappearance at $m/z = 5571.8$ for dehydrogenase (NADP (+)) was visible.

This protein is responsible, inter alia, for the binding of Mg^{2+} and Mn^{2+} ions; it has the activity of isocitrate dehydrogenase (NADP (+)) and takes part in the citric acid cycle [59]. On this basis, we concluded that this protein plays several important physiological roles, inter alia, in the reductive fatty acid biosynthesis, proper oxidation–reduction balance as well as in oxidative damage. Moreover, the lack of it in a bacterial cell may result in a disturbance of the cell metabolism and may have a negative impact on the integrity of cell membranes [59].

Patients with identified *E. faecalis*/ATCC 7080 THL/were treated with piperacillin combined with tazobactam. Both of the used drugs belong to the group of β -lactam antibiotics that inhibit the biosynthesis of the bacterial cell wall. A significant change in the mass spectrum of bacteria from the control sample, compared to the test group, is the appearance of the attenuator leader peptide ($m/z = 2443.3$) in the latter, which is a response to the action of the applied antibiotics [56]. The disappearance of the signal characteristic of the 50S ribosomal protein L30 ($m/z = 6341.0$) was demonstrated. This can result in disturbances in translation and protein synthesis [57].

The conducted pilot research indicates the possibility of using the UniProt database to the preliminary match of the proteins contained therein with the spectra generated by the MS, including predicting the mechanisms of the action of antibiotics and the mechanisms of the antibiotic resistance of bacteria. Notably, the products of antibiotic metabolism can also be biologically active substances [69]. To confirm the obtained results, it is necessary to perform additional analysis by the utilisation of, e.g., shotgun techniques, such as liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) or combined sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and MALDI-TOF/TOF MS methods [70,71].

2.4. Selection of Sample Preparation Conditions to Determine Microorganisms Using the MALDI-TOF MS Technique

Table 4 compares the obtained identification indicators of the tested bacterial species in terms of the liquid medium used, the method of sample preparation, and the incubation time. Empty spaces in the table mean that it was not possible to obtain mass spectra from these samples.

Table 4. Comparison of the obtained identification indices of the tested bacterial species in terms of the applied liquid culture media, methods of sample preparation, and incubation time.

Bacteria Species	Time	Standard Method		Sepsityper Method	
		Vials	TSB	Vials	TSB
<i>S. aureus</i>	4 h	1.85–1.97		1.79–1.88	2.05–2.16
	6 h	2.38–2.42	2.31–2.39	2.36–2.39	2.25–2.30
	24 h	2.25–2.34	2.24–2.33	2.30–2.34	2.31–2.42
<i>E. coli</i>	4 h	-	2.35–2.37	-	2.31–2.38
	6 h	-	2.31–2.33	-	2.20–2.28
	24 h	-	2.27–2.32	-	2.10–2.17
<i>E. faecalis</i>	4 h	2.33–2.35	2.26–2.36	2.28–2.32	2.06–2.18
	6 h	2.00–2.02	1.76–1.88	2.02–2.06	
	24 h	2.39–2.42	2.45–2.47	2.19–2.24	

2.300–3.000: reliable identification of the microorganism up to species level (green); 2.000–2.299: reliable identification of the microorganism to genus level and probable result of identification to species level (green); 1.700–1.999: indicates probable result of identification to the level of the genus (yellow); ≤ 1.699 : not reliable identification result (red). TSB–Tryptic Soy Broth; and Vials–BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F.

Both methods used allowed for the correct species identification at a similar level. The analysis of the obtained results showed that it was possible to correctly identify *E. faecalis* after 4 h of incubation using both media and both methods of sample preparation. The use of the same conditions and a 6-h incubation allowed for the identification at the species level of *S. aureus*. Identification of *E. coli* was possible only after the application of liquid TSB medium.

The standard method turned out to be a better method of preparing bacterial extracts for MALDI-TOF MS analysis compared with the Sepsityper method. This conclusion confirms Drevinek et al.'s research, which proved that the technique of using ethanol for pre-treatment and formic acid in combination with acetonitrile for the preparation of bacterial extracts showed the highest extraction efficiency and spectral quality. Researchers found this method universal for samples suspected of having Gram (+) or Gram (−) bacteria [72]. The research by Burckhardt et al. proved that 20 h of incubation was sufficient to detect multidrug-resistant bacteria and MRSA strains [73].

Pomastowski et al. showed that shortening the incubation time to 12 h enabled the generation of good-quality spectra and the correct identification of microorganisms. Their research showed that different incubation time intervals affected the quality of the recorded spectra; yet, they did not detect any significant qualitative changes in the peak patterns—they only observed an increase in the intensity (100% with 24-h incubation) [17]. The research results by van den Bijllaardt et al. suggested that 10 h of incubation of bacterial cells during tests related to reading sensitivity to antibiotics was sufficient [74]. Altun et al., on the other hand, obtained results that showed that a 5.5-h incubation of bacteria from blood cultures enabled the satisfactory identification of bacteria using MALDI-TOF MS and the Vitek 2 database [75].

Oviaño et al., in their research, proved that using the MALDI-TOF MS technique and the sonication-based extraction method enabled the precise identification of bacteria in the liquid bacterial culture in 15 min [76]. Haiko et al. used the method of the urine short incubation MALDI-TOF for the rapid identification of urinary pathogens [77]. They correctly identified 86% of G (−) bacteria; however, this method did not identify G (+) bacteria. Due to this approach, it was possible to shorten the analysis time to 4–6 h compared to the 24 h required by conventional methods.

Shortening the analysis time will significantly speed up microbiological diagnostics, which will additionally enable a faster application of the appropriate therapy for saving the patient's health and life. Additionally, Gajdács et al. proved that the MALDI-TOF MS technique compared to conventional biochemical methods showed higher efficiency in identifying anaerobic bacteria, such as *Cutibacterium* spp., *Bacteroides/Parabacteroides* spp., and *Clostridium* spp. in blood samples [78].

The obtained mass spectra were also analysed for every tested bacteria. Below is a comparison of spectra under specific conditions for exemplary bacterial species. The spectra obtained for bacteria isolated from two different media slightly differ from each other. Some of the signals for the TSB medium vary in intensity (Figure 3(A.1,A.2)). Additionally, due to using the BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F Vial Culture Media, a more significant number of signals were obtained (Figure 3B).

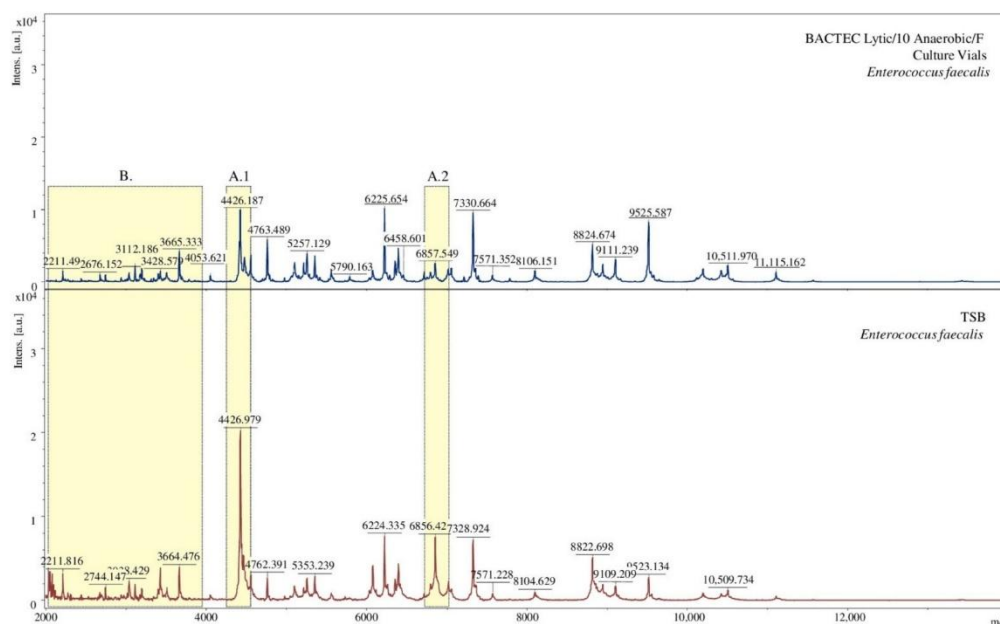


Figure 3. Comparison of MALDI-TOF MS mass spectra in terms of the medium used, [a.u.] = arbitrary units. (A.1), (A.2) show signals of different intensity; (B) denotes spectral fragments differing in the number of signals.

Using two methods of preparing bacterial extracts, spectra of different quality were obtained. The signals received for samples prepared with the Sepsityper method had a higher intensity than those equipped with the standard method. On the other hand, the second method allowed obtaining more separated signals (Figure 4A) and more of them (Figure 4B). The differences may result from the different buffer composition of the analysed sample.

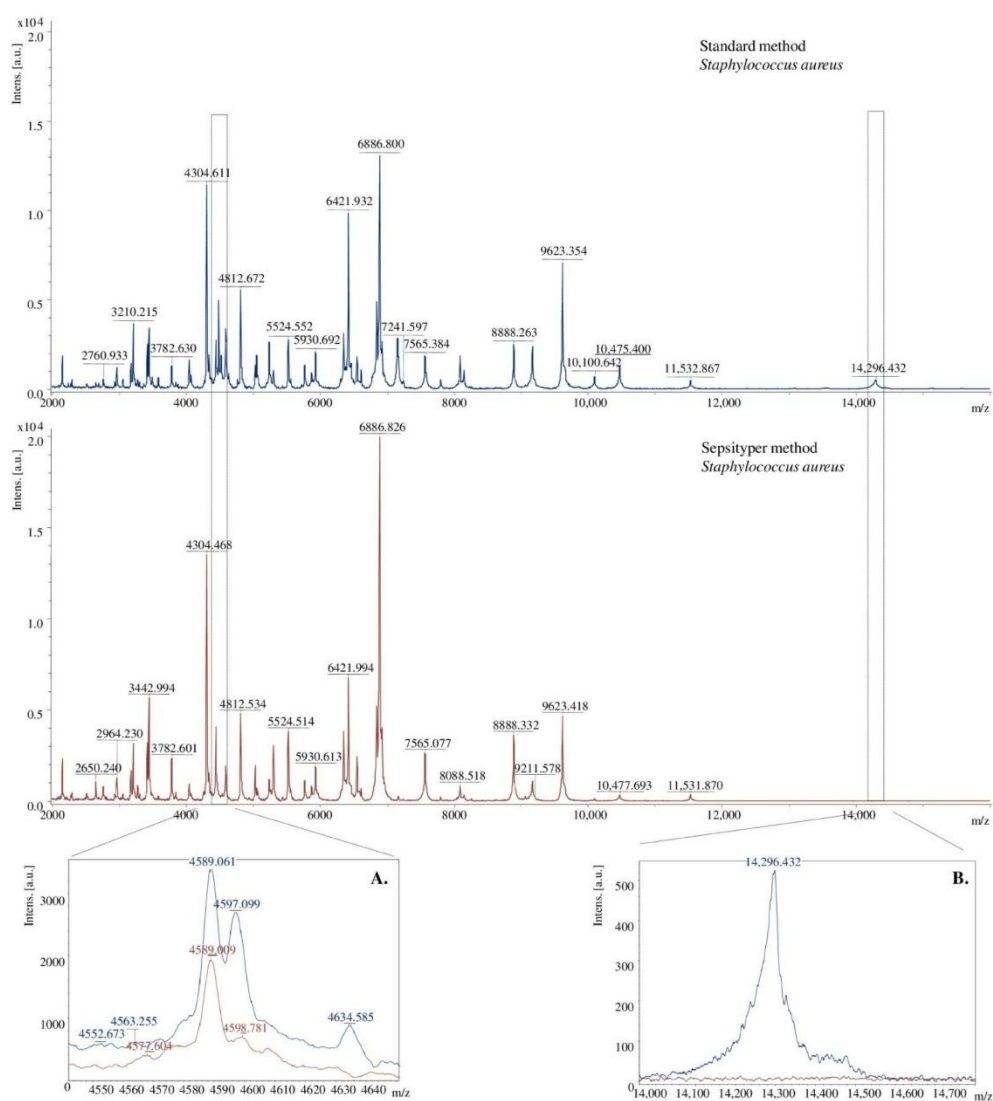


Figure 4. Comparison of the MALDI TOF MS mass spectra in terms of the method of the preparation of bacterial extracts, [a.u.] = arbitrary units. **(A)**—more split signals were obtained for the standard method, **(B)**—more signals were obtained for the standard method.

3. Experimental

3.1. Chemicals and Reagents

The reagents of high purity were used. Brain Heart Infusion Agar (BHI), Mueller Hilton Agar (MH), Glucose Bromocresol Purple Agar (BCP), Vancomycin Resistance Enterococci Agar Base (VRE), Tryptic Soy Broth (TSB) (all from Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), and BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F Vial Culture Media (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) were used to isolate bacteria and to culture peptone water.

To obtain the bacterial protein extract, HPLC-grade water, formic acid (FA), acetonitrile (ACN), ethanol, trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were applied. In order to prepare samples, in addition to the reagents mentioned before, a MBT Sepsityper IVD Kit was used (BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany). The kit contained Lysis Buffer and Washing Buffer. For the MALDI-TOF MS analysis, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) (Sigma-Aldrich, Schaffhausen, Switzerland) and Bacterial Test Standard (BTS) (BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany) were used.

3.2. Patient and Sample Characterization

Biological material was the superficial swab from post-operative wounds from fifteen patients with SSIs following abdominal surgery of the Provincial Polyclinic Hospital in Toruń. Thirteen patients were treated with antibiotics administered through an intravenous infusion. Six patients received one antibiotic: cefotaxime (B1), clindamycin (two patient—B2, B17), meropenem (B4), ciprofloxacin (B11), and metronidazole (16), while the remaining patients received a combination of the antibiotic treatment with piperacillin and tazobactam (three patients—B7, B15, and B18), ciprofloxacin and metronidazole (two patients—B8 and B12), penicillin and clindamycin (B9) and clindamycin, metronidazole, and amoxicillin (B21). The other two patients were not treated with an antibiotic (control samples).

Before smearing, the post-operative wounds were washed with a sterile physiological saline solution. Two swabs were then collected from each patient. The first was performed with a dry swab stick, which was then placed in Amies liquid transport medium (DeltaSwab Amies, Barcelona, Spain) (swab sample “b”). The second swab was taken with a swab stick from a tube with Amies solid transport medium (BorPol, Gliwice, Poland) (swab sample “a”).

The research was approved by the Bioethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Toruń (decision no. 585/2017). All the study participants were informed orally and in writing about the purpose of the study, completed the questionnaire and a declaration of their voluntary consent to participate in the study.

3.3. Isolation of Post-Operative Wound Bacteria

Swab stick “a” was placed in 1 mL of the transport medium, and 1 mL of the transport medium was added to the swab sample “b”. 100 μ L of the obtained suspension was transferred onto the four growth media: two non-selective (BHI, MH) and two selective (VRE, BCP) and incubated for 24 h at 37 °C. After the incubation, to receive pure bacterial colonies, streaking was made and followed by incubation again under the same conditions as previously [79]. Protein extracts were made from pure bacterial colonies according to standard acetonitrile-formic acid extraction protocol [2].

3.4. MALDI-TOF MS Analysis

For the MALDI-TOF MS analysis, bacterial protein extracts from the obtained pure bacterial cultures were prepared based on the Bruker guideline with slight modifications (standard method). Approximately 10 mg of bacterial colonies were added to 150 μ L of ultrapure water and mixed thoroughly. Subsequently, 300 μ L of absolute EtOH was added to the resulting suspension, and then thoroughly vortexed and centrifuged (15871 RCF, 5 min).

After that, the supernatant was discarded, and the pellet was dried in a vacuum concentrator at 37 °C for 7–10 min. We added 1–12 μ L FA to the dried pellet in proportion

to the amount of biological material and carefully mixed by pipetting. Next, the same volume of ACN was added, mixed and centrifuged (15871 RCF, 5 min). Afterwards, 1 µL of each sample was transferred onto MALDI MTP 384 polished steel target sample spot (BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany) in duplicate.

After air-drying, the sample spots were overlaid with HCCA matrix dissolved in standard solvent (50% water, 47.5% ACN, and 2.5% TFA) at the final concentration of 10 mg/mL. The MALDI target plate with samples was analysed using the ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with smart beam-II laser-positive mode according to the procedure described by Pomastowski et al. [80].

The calibration analysis was originally performed with a Bruker Bacterial Test Standard (BTS). The spectra were collected manually using the flexControl software with parameters m/z range: 2000–20,000, acceleration voltage at 25 kV, global attenuator offset at 20%, attenuator offset at 34%, range at 34%, laser power at 40%, and 500 shots in-one-single spectra to frequency 2500. The obtained spectra were smoothed and brought to the baseline.

Validated mass spectra were processed with the use of the software provided by the manufacturer—flexControl and flexAnalysis and, subsequently, used for the bacterial identification via the MALDI Biotyper Compass platform (BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany) based on both raw spectra (RAW) and Main Spectra (MSP) according to the manufacturer's protocol. Based on the MSPs, phyloproteomic dendrograms were generated to verify the correct identification of the isolated microorganisms by their relationship with the reference strains and the relationship between the isolated strains. The UniProt platform was used to predict the mechanism of the action of the antibiotic administered to the patient on the bacterial cell based on the obtained m/z values.

3.5. Selection of Sample Preparation Conditions to Determine Microorganisms with MALDI-TOF MS

Two Gram-positive strains (*S. aureus*BHL.B3a, *E. faecalis* VRE.B3a) and one Gram-negative (*E. coli* BHL.B4a) bacterial strain were selected for further analysis. From one-day cultures, one inoculation loop was transferred to a glass tube with 2 mL peptone water to obtain a bacterial suspension with a density equal to 0.5 McFarland. This process was performed in duplicate. Then, 100 µL of suspension was transferred to 9.9 mL liquid growth media TSB, vortexed and diluted 1:1 (v/v) in TSB. From the second tubes, 100 µL inoculum was transferred to 900 µL peptone water and mixed thoroughly.

Next, 200 µL of suspension was added to the vial with BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F culture media using a syringe with a needle and mixed. Both of the bacterial cultures were incubated for 4, 6, and 24 h at 37 °C. After each incubation time, the bacterial extracts were prepared according to the previously described standard method and using the MBT Sepsityper IVD Kit according to the protocol provided by the manufacturer. We added 200 µL of Lysis Buffer to a 1 mL of sample and vortexed. The sample was centrifuged (18407 RCF, 2 min), the supernatant was discarded, and 1 mL of Washing Buffer was added, mixed thoroughly and centrifuged again (18407 RCF, 1 min).

The supernatant was discarded, and the pellet was dried at 37 °C using a vacuum concentrator (LABCONCO CentriVap DNA® Concentrator, Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA). After that, FA and ACN were added proportionally to the amount of the dried pellet. The MALDI-TOF MS analysis was performed as previously described. For each bacterial species, 12 samples were prepared, including two liquid media, three different incubation times, and two sample preparation methods (six samples for TSB medium for bacteria incubated consecutively 4, 6, and 24 h, and extracts prepared by the standard and the Sepsityper method). In total, 36 samples were analysed.

4. Conclusions

Using the MALDI-TOF MS approach, we confirmed the high involvement of *Staphylococcus*, *Enterococcus*, and *Escherichia* bacteria in the process of inducing post-operative wound infections. The conducted research proved that the selection of the culture medium and the preparation of bacterial extracts significantly affected the identification factor and the quality of the mass spectra obtained. The best quality of the spectra was obtained using non-selective media and the standard method of sample preparation, which is also confirmed by the literature data.

The use of non-selective media, such as the BHI or MH, also leads to obtaining more types of bacteria. The incubation time strongly influenced the bacterial identification; therefore, we concluded that the optimal time can significantly accelerate the microbiological diagnosis of post-operative wound infections and implement the individual therapy faster. The use of the UniProt database made it possible to indicate proteins influencing the emergence of drug resistance and predict the antibiotics' actions.

The obtained results of the studies showed that MALDI-TOF MS with the use of additional databases, such as UniProt, can be a relevant tool for the detection of antibiotic resistance. Microbiological proteomics is a powerful tool for basic microbiological research not only in determining microbial mechanisms and physiology but also as a clinical diagnosis and antimicrobial therapy guideline. The obtained results may enable us to verify the medical diagnosis; they bring hope for the development of methods enabling a faster diagnosis due to the detection of disease changes at the cellular level prior to the occurrence of clinical changes, the monitoring of the course of the disease treatment, and the development of drugs for individual patients.

Author Contributions: Conceptualization, M.S.-M., P.P. and D.J.; methodology, M.S.-M. and D.J.; software, D.J. and W.K.; validation, M.S.-M. and D.J.; formal analysis, M.S.-M. and D.J.; investigation, M.S.-M. and D.J.; resources, M.S.-M. and D.J.; data curation, M.S.-M., P.P., M.Z. and D.J.; writing—original draft preparation, M.S.-M. and D.J.; writing—review and editing, M.S.-M., B.B., M.Z., P.P. and D.J.; visualization, M.S.-M. and D.J.; supervision, M.S.-M., P.P. and B.B.; project administration, M.S.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Toruń (decision no. 585/2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds (antibiotics) and tissue samples are available from the authors.

References

1. Jackowski, M.; Szeliga, J.; Kłodzińska, E.; Buszewski, B. Application of capillary zone electrophoresis (CZE) to the determination of pathogenic bacteria for medical diagnosis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2153–2160. [\[CrossRef\]](#)
2. Złoch, M.; Rodzik, A.; Pauter, K.; Szultka-Młynska, M.; Rogowska, A.; Kupczyk, W.; Buszewski, B. Problems with identifying and distinguishing salivary streptococci: A multi-instrumental approach. *Future Microbiol.* **2020**, *15*, 1157–1171. [\[CrossRef\]](#)
3. Saffert, R.T.; Cunningham, S.A.; Ihde, S.M.; Jobe, K.E.; Mandrekar, J.; Patel, R. Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 887–892. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Richter, S.S.; Sercia, L.; Branda, J.A.; Burnham, C.A.; Bythow, M.; Ferraro, M.J.; Garner, O.B.; Ginocchio, C.C.; Jennemann, R.; Lewinski, M.A.; et al. Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *32*, 1571–1578. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Kłodzińska, E.; Kupczyk, W.; Jackowski, M.; Buszewski, B. Capillary electrophoresis in the diagnosis of surgical site infections. *Electrophoresis* **2013**, *34*, 3206–3213. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

6. Jain, R.K.; Shukla, R.; Singh, P.; Kumar, R. Epidemiology and risk factors for surgical site infections in patients requiring orthopedic surgery. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* **2015**, *25*, 251–254. [\[CrossRef\]](#)
7. Pryor, K.O.; Fahey, T.J.; Lien, C.A.; Goldstein, P.A. Surgical Site Infection and the Routine Use of Perioperative Hyperoxia in a General Surgical Population: A Randomized Controlled Trial. *J. Am. Med. Assoc.* **2004**, *291*, 79–87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Gelaw, A.; Gebre-Selassie, S.; Tiruneh, M.; Mathios, E.; Yifru, S. Isolation of bacterial pathogens from patients with post-operative surgical site infections and possible sources of infections at the University of Gondar Hospital, Northwest Ethiopia. *J. Environ. Occup. Sci.* **2014**, *3*, 103–108. [\[CrossRef\]](#)
9. Anguzu, J.R.; Olila, D. Drug sensitivity patterns of bacterial isolates from septic post-operative wounds in a regional referral hospital in Uganda. *Afr. Health Sci.* **2007**, *7*, 148–154. [\[CrossRef\]](#)
10. Kramer, A.; Schwebke, I.; Kampf, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect. Dis.* **2006**, *6*, 130. [\[CrossRef\]](#)
11. Tahaesi, S.A.S.; Stájer, A.; Barrak, I.; Ostorházi, E.; Szabó, D.; Gajdács, M. Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in *Staphylococcus aureus* isolates: A laboratory-based study in Hungary and a review of the literature. *Infect. Drug Resist.* **2021**, *14*, 1155–1168. [\[CrossRef\]](#)
12. Behzadi, P.; Baráth, Z.; Gajdács, M. It's not easy being green: A narrative review on the microbiology virulence and therapeutic prospect of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics* **2021**, *10*, 42. [\[CrossRef\]](#)
13. Leoncini, E.; Ricciardi, W.; Cadoni, G.; Arzani, D.; Petrelli, L.; Paludetti, G. Adult height and head and neck cancer: A pooled analysis within the INHANCE Consortium. *Eur. J. Epidemiol.* **2014**, *36*, 1391. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Gajdács, M.; Urbán, E.; Stájer, A.; Baráth, Z. Antimicrobial resistance in the context of the sustainable development goals: A brief review. *Eur. J. Investig. Health Psychol. Educ.* **2021**, *11*, 71–82. [\[CrossRef\]](#)
15. Goswami, N.N.; Trivedi, H.R.; Goswami, A.P.P.; Patel, T.K.; Tripathi, C.B. Antibiotic sensitivity profile of bacterial pathogens in post-operative wound infections at a tertiary care hospital in Gujarat, India. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2011**, *2*, 158–164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Sauer, S.; Kliem, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 74–82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Pomastowski, P.; Szultka, M.; Kupczyk, W.; Jackowski, M.; Buszewski, B. Evaluation of Intact Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of-Flight Mass Spectrometry for Capillary Electrophoresis Detection of Controlled Bacterial Clumping. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **2015**, *6*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
18. Mather, C.A.; Rivera, S.F.; Butler-Wu, S.M. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 130–138. [\[CrossRef\]](#)
19. Williams, T.L.; Andrzejewski, D.; Lay, J.O.; Musser, S.M. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 342–351. [\[CrossRef\]](#)
20. Vargha, M.; Takáts, Z.; Konopka, A.; Nakatsu, C.H. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *J. Microbiol. Methods* **2006**, *66*, 399–409. [\[CrossRef\]](#)
21. Becker, K.; Schubert, S. Editorial: MALDI-TOF MS Application for Susceptibility Testing of Microorganisms. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 568891. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Szultka-Młyńska, M.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Application of solid phase microextraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry in the determination of antibiotic drugs and their metabolites in human whole blood and tissue samples. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, *1086*, 153–165. [\[CrossRef\]](#)
23. Sharifzadeh, S.; Brown, N.W.; Shirley, J.D.; Bruce, K.E.; Winkler, M.E.; Carlson, E.E. *Chemical Tools for Selective Activity Profiling of Bacterial Penicillin-Binding Proteins*, 1st ed.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2020; Volume 638. [\[CrossRef\]](#)
24. King, D.M.; Sobhanifar, S.; Strynadka, N.C.J. The mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. In *Handbook of Antimicrobial Resistance*; Gotte, M., Berghuis, A., Matlashewski, G., Sheppard, D., Wainberg, A., Eds.; Springer Science: New York, NY, USA, 2017; pp. 177–2017. [\[CrossRef\]](#)
25. Champoux, J.J. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 369–413. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Jacoby, G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* **2005**, *41*, S120–S126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Spížek, J.; Řezanka, T. Lincomycin, clindamycin and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 455–464. [\[CrossRef\]](#)
28. Abebe, M.; Tadesse, S.; Meseret, G.; Derbie, A. Type of bacterial isolates and antimicrobial resistance profile from different clinical samples at a Referral Hospital, Northwest Ethiopia: Five years data analysis. *BMC Res. Notes* **2019**, *12*, 568. [\[CrossRef\]](#)
29. Saini, S.; Gupta, N.; Aparna, L.; Griwan, M.S. Surgical infections: A microbiological study. *Braz. J. Infect. Dis.* **2004**, *8*, 118–125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Shi, Y.; Yang, H.; Chu, M.; Niu, X.; Huo, X.; Gao, Y. Klebsiella. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 233–257. [\[CrossRef\]](#)
31. Cuzon, G.; Naas, T.; Fortineau, N.; Nordmann, P. Novel chromogenic medium for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 2442–2444. [\[CrossRef\]](#)
32. Gangania, P.S.; Singh, V.A.; Ghimire, S.S. Bacterial Isolation and Their Antibiotic Susceptibility Pattern from Post-Operative Wound Infected Patients. *Indian J. Microbiol. Res.* **2015**, *2*, 231–235. [\[CrossRef\]](#)

33. Akinkunmi, E.O.; Adesunkanmi, A.-R.; Lamikanra, A. Pattern of pathogens from surgical wound infections in a Nigerian hospital and their antimicrobial susceptibility profiles. *Afr. Health Sci.* **2014**, *14*, 802–809. [\[CrossRef\]](#)
34. Wu, J.; Zhou, Y.; Liu, X.; Cao, Y.; Hu, C.; Chen, Y. Extension and application of a database for the rapid identification of *Vibrio* using MALDI-TOF MS. *Acta Oceanol. Sin.* **2020**, *39*, 140–146. [\[CrossRef\]](#)
35. Body, B.A.; Beard, M.A.; Slechts, E.S.; Hanson, K.E.; Barker, A.P.; Babady, N.E. Evaluation of the Vitek MS v3.0 matrix-Assisted laser desorption ionization–Time of flight mass spectrometry system for identification of mycobacterium and nocardia species. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*, e00237–18. [\[CrossRef\]](#)
36. Van Belkum, A.; Welker, M.; Pincus, D.; Charrier, J.P.; Girard, V. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiology: What are the current issues? *Ann. Lab. Med.* **2017**, *37*, 475–483. [\[CrossRef\]](#)
37. Microbiology by numbers. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 628. [\[CrossRef\]](#)
38. Grenfell, R.C.; da Silva Junior, A.R.; Del Negro, G.; Munhoz, R.B.; Gimenes, V.M.; Assis, D.M.; Rockstroh, A.C.; Motta, A.L.; Rossi, F.; Juliano, L.; et al. Identification of *Candida haemulonii* complex species: Use of ClinProTools™ to Overcome Limitations of the Bruker Biotyper™, VITEK MSTM IVD, and VITEK MSTM RUO databases. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 940. [\[CrossRef\]](#)
39. Fonseca, E.L.; Ramos, N.V.; Andrade, B.G.N.; Morais, L.L.C.S.; Marin, M.F.A.; Vicente, A.C.P. A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, *87*, 315–317. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Garner, O.; Mochon, A.; Branda, J.; Burnham, C.A.; Bythrow, M.; Ferraro, M. Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK® MS system. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 335–339. [\[CrossRef\]](#)
41. Anderson, N.W.; Buchan, B.W.; Riebe, K.M.; Parsons, L.N.; Gnacinski, S.; Ledebore, N.A. 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.* **2012**, *50*, 1008–1013. [\[CrossRef\]](#)
42. Buskirk, A.D.; Hettick, J.M.; Chipinda, I.; Law, B.F.; Siegel, P.D.; Slaven, J.E. Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi. *Anal. Biochem.* **2011**, *411*, 122–128. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Zloch, M.; Pomastowski, P.; Maślak, E.; Monedeiro, F.; Buszewski, B. Study on Molecular Profiles of *Staphylococcus aureus* Strains: Spectrometric Approach. *Molecules* **2020**, *25*, 4894. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Paradis, S.; Boissinot, M.; Paquette, N.; Bélanger, S.D.; Martel, E.A.; Boudreau, D.K. Phylogeny of the Enterobacteriaceae based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase β -subunit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 2013–2025. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Palmer, K.L.; Godfrey, P.; Griggs, A.; Kos, V.N.; Zucker, J.; Desjardins, C. Comparative genomics of enterococci: Variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. *MBio* **2012**, *3*, e00318–11. [\[CrossRef\]](#)
46. Queck, S.Y.; Khan, B.A.; Wang, R.; Bach, T.H.L.; Kretschmer, D.; Chen, L. Mobile genetic element-encoded cytotoxin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000533. [\[CrossRef\]](#)
47. Chatterjee, S.S.; Chen, L.; Joo, H.S.; Cheung, G.Y.C.; Kreiswirth, B.N.; Otto, M. Distribution and regulation of the mobile genetic element-encoded phenol-soluble modulins PSM-mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28781. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Blankschien, M.D.; Potrykus, K.; Grace, E.; Choudhary, A.; Vinella, D.; Cashel, M. TraR, a homolog of a RNAP secondary channel interactor, modulates transcription. *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000345. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.; Nagi, Y.; et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **2001**, *357*, 1225–1240. [\[CrossRef\]](#)
50. Hensel, M.; Shea, J.E.; Gleeson, C.; Jones, M.D.; Dalton, E.; Holden, D.W. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **1995**, *269*, 400–403. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Davidson, A.L.; Dassa, E.; Orelle, C.; Chen, J. Structure, function and evolution of bacterial ATP-binding cassette system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 317–364. [\[CrossRef\]](#)
52. Huang, Y.H.; Guan, H.H.; Chen, C.J.; Huang, C.Y. *Staphylococcus aureus* single-stranded DNA-binding protein SsbA can bind but cannot stimulate PriA helicase. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182060. [\[CrossRef\]](#)
53. Hassan, K.A.; Skurray, R.A.; Brown, M.H. Active export proteins mediating drug resistance in staphylococci. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *12*, 180–196. [\[CrossRef\]](#)
54. Vetting, M.W.; Luiz, L.P.; Yu, M.; Hegde, S.S.; Magnet, S.; Roderick, S.L. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *433*, 212–226. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Palmqvist, N.; Foster, T.; Tarkowski, A.; Josefsson, E. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microb. Pathog.* **2002**, *33*, 239–249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Paulsen, I.T.; Banerjee, L.; Myers, G.S.A.; Nelson, K.E.; Seshadri, R.; Read, T.D.; Fouts, D.E.; Eisen, J.A.; Gill, S.R.; Heidelberg, J.F.; et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **2003**, *299*, 2071–2074. [\[CrossRef\]](#)
57. Tsakou, F.; Jersie-Christensen, R.; Jenssen, H.; Mojsoska, B. The role of proteomics in bacterial response to antibiotics. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 214. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. McCurtain, J.L.; Gilbertsen, A.J.; Evert, C.; Williams, B.J.; Hunter, R.C. Agmatine accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates confers antibiotic tolerance and dampens host inflammation. *J. Med. Microbiol.* **2019**, *68*, 446–455. [\[CrossRef\]](#)

59. Venkateswara Prasad, U.; Vasu, D.; Nada Kumar, Y.; Santhosh Kumar, P.; Yeswanth, S.; Swarupa, V.; Phaneendra, B.V.; Chaudhary, A.; Sarma, P.V.G.K. Cloning, expression and characterization of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from *Staphylococcus aureus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *169*, 862–869. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Ostash, B.; Walker, S. Bacterial transglycosylase inhibitors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 459–466. [\[CrossRef\]](#)
61. Thongsomboon, W.; Serra, D.O.; Possling, A.; Hadjineophytou, C.; Hengge, R.; Cegelski, L. Phosphoetanalamine cellulose: A naturally produced chemically modified cellulose. *Science* **2018**, *338*, 334–338. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Goodman, M.F.; Woodgate, R. Translesion DNA polymerases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *4*, a010363. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Funnell, B.E. ParB partition proteins: Complex formation and spreading at bacterial and plasmid centromeres. *Front. Mol. Biosci.* **2016**, *3*, 44. [\[CrossRef\]](#)
64. Ueta, M.; Ohniwa, R.L.; Yoshida, H.; Maki, Y.; Wada, C.; Wada, A. Role of HPF (hibernation promoting factor) in translational activity in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **2008**, *143*, 425–433. [\[CrossRef\]](#)
65. Li, M.; Diep, B.A.; Villaruz, A.E.; Braughton, K.R.; Jiang, X.; DeLeo, F.R. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 5883–5888. [\[CrossRef\]](#)
66. Talha, M.H.; Khazaal, S.S.; Al Hadraawy, M.K.; Mostafavi, S.K.S. Screening of antibiotic resistance genes and virulence determinants of *Staphylococcus aureus* from skin infections. *Meta Gene* **2020**, *24*, 100682. [\[CrossRef\]](#)
67. Periasamy, S.; Joo, H.S.; Duong, A.C.; Bach, T.H.L.; Tan, V.Y.; Chatterjee, S.S. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 1281–1286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Dersch, P.; Khan, M.A.; Mühlen, S.; Görke, B. Roles of regulatory RNAs for antibiotic resistance in bacteria and their potential value as novel drug targets. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 803. [\[CrossRef\]](#)
69. Pauter, K.; Szultka-Młyńska, M.; Buszewski, B. Determination and Identification of Antibiotic Drugs and Bacterial Strains in Biological Samples. *Molecules* **2020**, *25*, 2556. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Hu, Y.Y.; Cai, J.C.; Zhou, H.W.; Zhang, R.; Chen, G.-X. Rapid detection of porins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 784. [\[CrossRef\]](#)
71. Sun, X.; Jia, H.L.; Xiao, C.L.; Yin, X.F.; Yang, X.Y.; Lu, J. Bacterial proteome of *Streptococcus pneumoniae* through multidimensional separations coupled with LC-MS/MS. *Omi. A J. Integr. Biol.* **2011**, *15*, 477–482. [\[CrossRef\]](#)
72. Drevinek, M.; Dresler, J.; Klimentova, J.; Pisa, L.; Hubalek, M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **2012**, *55*, 40–46. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Burckhardt, I.; Last, K.; Zimmermann, S. Shorter incubation times for detecting multi-drug resistant bacteria in patient samples: Defining early imaging time points using growth kinetics and total laboratory automation. *Ann. Lab. Med.* **2018**, *39*, 43–49. [\[CrossRef\]](#)
74. Van den Bijllaardt, W.; Buitingm, A.G.; Mouton, J.W.; Muller, A.E. Shortening the incubation time for antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion for Enterobacteriaceae: How short can it be and are the results accurate? *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *49*, 631–637. [\[CrossRef\]](#)
75. Altun, O.; Botero-Kleiven, S.; Carlsson, S.; Ullberg, M.; Özenci, V. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media. *J. Med. Microbiol.* **2015**, *64*, 1346–1352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Oviaño, M.; Rodríguez-Sánchez, B.; Gómara, M.; Alcalá, L.; Zvezdanova, E.; Ruíz, A. Direct identification of clinical pathogens from liquid culture media by MALDI-TOF MS analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 624–629. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Haiko, J.; Savolainen, L.E.; Hilla, R.; Pätäri-Sampo, A. Identification of urinary tract pathogens after 3-hours urine culture by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* **2016**, *129*, 81–84. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Gajdacs, M.; Ábrók, M.; Lázár, A.; Terhes, G.; Urbán, E. Anaerobic blood culture positivity at a University Hospital in Hungary: A 5-year comparative retrospective study. *Anaerobe* **2020**, *63*, 102200. [\[CrossRef\]](#)
79. Sanders, E.R. Aseptic laboratory techniques: Plating methods. *JoVE* **2012**, *63*, e3064. [\[CrossRef\]](#)
80. Pomastowski, P.; Złoch, M.; Rodzik, A.; Ligor, M.; Kostrzewa, M.; Buszewski, B. Analysis of bacteria associated with honeys of different geographical and botanical origin using two different identification approaches: MALDI-TOF MS and 16S rDNA PCR technique. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0217078. [\[CrossRef\]](#)

PUBLIKACJA [P3]

**Implications of sample preparation methods on the MALDI-TOF MS
identification of spore-forming *Bacillus* species from food samples: a
closer look at *Bacillus licheniformis*, *Peribacillus simplex*, *Lysinibacillus
fusiformis*, *Bacillus flexus*, and *Bacillus marisflavi***

D. Janiszewska, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Szultka-Młyńska

ACS Omega (2023) 8: 34196-35441. IF = 4,1 PM = 70

doi: 10.1021/acsomega.3c04354

Implications of Sample Preparation Methods on the MALDI-TOF MS Identification of Spore-Forming *Bacillus* Species from Food Samples: A Closer Look at *Bacillus licheniformis*, *Peribacillus simplex*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus flexus*, and *Bacillus marisflavi*

Daria Janiszewska,* Michał Złoch, Paweł Pomastowski, and Małgorzata Szultka-Młyńska



Cite This: *ACS Omega* 2023, 8, 34982–34994



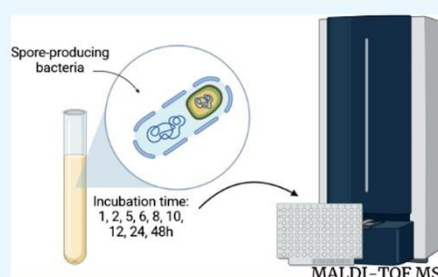
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: This research underscores the criticality of tailored culture conditions and incubation periods for effective and accurate identification of spore-forming bacteria: *Bacillus licheniformis*, *Peribacillus simplex*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus flexus*, and *Bacillus marisflavi*, isolated from food samples, utilizing the MALDI-TOF MS technique. All isolated strains were confirmed as Gram-positive bacteria from diverse genera through 16S rDNA gene sequencing. To enhance the accuracy of the identification process, the study employed an optimization strategy involving a varied incubation time (ranging from 1 to 48 h) and two distinct sample preparation approaches—direct transfer facilitated by formic acid and protein extraction via ethanol. It was observed that matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) could successfully identify



approximately 47% of the samples following a 24 h incubation period. The study emphasizes the critical role of sample preparation methods in enabling precise bacterial identification. Our findings reveal the necessity of tailoring the incubation time for each sample, as the optimum period for accurate identification fluctuated between 1 and 12 h. Further demonstrating the interplay between incubation time and spore quantity, our study used the Schaeffer–Fulton staining method to show that the lowest spore counts were detected between 5 and 8 h of incubation. This provides evidence that spore formation impacts bacterial identification. Our research thus deepens the understanding of spore-forming bacteria identification using MALDI-TOF MS and illuminates the various factors affecting the dependability and accuracy of this technique. Future research may explore additional variables, such as the effect of varying culture media, to further augment identification accuracy and gain a holistic understanding of spore-forming bacterial behavior in food samples. By enhancing our knowledge, these findings can substantially contribute to improving food safety and quality assurance strategies by enabling the more accurate and efficient identification of spore-forming bacteria in the food industry, thereby elevating the standards of food safety.

1. INTRODUCTION

Spore formation by bacteria results from the influence of adverse external factors and drastic environmental changes. Spores are one of the survival strategies of bacterial cells. Thanks to the metabolic activity of their vegetative forms, spore-forming bacteria can be used as a biological weapon or cause opportunistic infections. Spore-forming bacteria constitute a major problem for the food industry, especially for dairy products.¹ *Bacillus* spoilage bacteria are of particular concern, as their spores are extremely resistant to most environmental stresses, including pasteurization and other heat treatments commonly used in food processing.^{2,3} Besides the dairy industry, *Bacillus* spores were isolated from various types of food, such as rice, eggs, pasta, and honey.^{4–7} The presence of *Bacillus* spores in many food industries is a consequence of

several factors. For example, spores in dairy products result from the initial contamination of raw milk and subsequent temperature abuse during transport and distribution.⁸ The widespread disclosure of *Bacillus cereus* spores in cooked rice and meat may result from slow cooling and prolonged storage at room temperature, which facilitates the formation of spores.^{9,10} It was also proven that including cracked and contaminated eggs and limited disinfection can lead to the

Received: June 22, 2023

Accepted: August 30, 2023

Published: September 13, 2023



ACS Publications

© 2023 The Authors. Published by
American Chemical Society

34982

<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04354>
ACS Omega 2023, 8, 34982–34994

occurrence of *B. cereus*.¹¹ Moreover, species such as *B. cereus*, *B. thuracicus*, and, to a lesser extent *Bacillus subtilis*, are pathogenic in humans and other mammals. Literature data also indicate that some strains of different species, including *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus pumilus*, can cause foodborne illness (e.g., gastrointestinal symptoms that are self-limiting) typical of either *B. cereus* or *B. subtilis*.¹² The steps involved in the spore formation include DNA segregation, septum formation, engulfment, spore formation, formation of spore protein layers, cortex, membranes, and spore coat, and the maturation of the spore before mother cell lysis and release. After the endospore formation, it can remain dormant and survive in adverse environmental conditions without moisture and nutrients due to the protective structure and properties of the endospore.¹³ Moreover, endospores have different protein expressions than vegetative cells.¹⁴

Mesophilic spore-forming bacteria belong to two taxonomic groups: the order *Bacillales* (aerobic) and the genus *Clostridium* (anaerobic). They can both spoil organisms and pathogenic bacteria.^{15,16} The family *Bacillaceae* covers 19 genera, including *Bacillus*, *Lysinibacillus*, and *Peribacillus*.^{17,18}

The MALDI-TOF MS technique is routinely used for rapid identification of microorganisms. Currently, one of the prevailing trends is to reduce the incubation time of bacteria and thus speed up analyses. Longer incubation times for *Bacillaceae* family bacteria lead to nutrient depletion in the culture medium, promoting endospores' growth. The thick peptidoglycan walls of endospores can make identifying spore-forming microorganisms much more difficult. However, literature data indicate that this technique can locate spore-forming bacteria of the *Bacillus* genera.^{19,20}

The research aimed to optimize the culture conditions for spore-forming bacteria isolated from food samples: sauerkraut, pickled cucumbers, and cow's milk. In the present study, the effect of incubation time on the development of spores along the level of identification using the MALDI-TOF MS technique was investigated. In addition, two sample preparation methods were compared—the extraction of bacterial proteins by the ethanol/formic acid method and extended direct transfer involving the analysis of whole bacterial cells treated with formic acid.

2. RESULTS

2.1. 16S rDNA Bacteria Identification. Based on 16S rDNA gene sequencing, it was possible to identify all isolated strains classified as Gram-positive bacteria (Table 1). The isolates were represented by bacteria of the genera *Bacillus* (7NN), *Peribacillus* (8NN), *Lysinibacillus* (11NN), *Priestia* (12NN) and *Rosellomorea* (13NN). Members of *Peribacillus*, *Priestia*, and *Rosellomorea* are species until recently included in the *Bacillus* genus, which was restricted to species closely related to *B. subtilis* and *B. cereus*.¹⁷ All of the identified bacteria are characterized by their ability to produce endospores. For the sample 7NN, sequencing showed two *Bacillus* species (*B. licheniformis*, *Bacillus haynesii*) with the same percent of identity (Per. Ident). The sample 8NN was identified as *Brevibacterium-fragilitolerans* and *Peribacillus simplex*. Due to slight differences in 16S rDNA sequences ($\geq 0.5\%$), the species differentiation of *Lysinibacillus* was impossible.

2.2. MALDI-TOF MS Bacteria Identification. Bacteria identification from food samples was performed after applying 3 sample preparation approaches: direct transfer, on-target extraction, and in-tube extraction. Using these three methods,

Table 1. Result of Bacteria Identification Based on 16S rDNA Gene Sequencing

strain	related species from NCBI [accession number]	identity [%]	given accession number
7NN	<i>Bacillus licheniformis</i> strain DSM 13 [NR_118996.1]	99.64	OM371088
	<i>Bacillus licheniformis</i> strain BCRC 11702 [NR_116023.1]	99.64	
	<i>Bacillus haynesii</i> strain NRRL B-41327 [NR_157609.1]	99.64	
8NN	<i>[Brevibacterium] fragilitolerans</i> DSM 8801 [117474.1]	99.72	OM371091
	<i>Peribacillus simplex</i> NBRC 1570 = DSM 1321 [NR_112726.1]	99.58	
	<i>Peribacillus simplex</i> LMG 11160 [NR_114919.1]	99.58	
11NN	<i>Lysinibacillus pakistanensis</i> strain NCCP-54 [NR_113166.1]	98.46	OM372597
	<i>Lysinibacillus macroides</i> strain LMG 18474 [NR_114920.1]	98.25	
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain DSM 2898 [NR_042072.1]	98.25	
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain NBRC 15717 [NR_112628.1]	98.25	
12NN	<i>Priestia flexa</i> strain NBRC 15715 [NR_113800.1]	99.65	OM372596
	<i>Priestia flexa</i> strain IFO15715 [NR_024691.1]	99.65	
13NN	<i>Rosellomorea marisflavi</i> strain TF-11 [NR_119437.1]	99.86	OM372574

identification was obtained after 24 h of bacterial incubation for 46.67% (7/15) of samples (Table 2). The identification at the genus level (score 1700–1999) using a direct transfer and on-target extraction was obtained for only two samples, 8NN and 13NN. For the sample 12NN, the identification was obtained only for on-target extraction. Performing protein extracts allowed the identification of microorganisms at the genus level in the samples 11NN and 12NN.

On-target and in-tube extraction were selected for further analysis as sample preparation methods for the MALDI-TOF MS analysis. No reliable identification (score <1700) was obtained for the remaining samples, as shown in gray in the table.

2.3. Selection of the Incubation Time. Regarding the selection of the incubation time of spore-producing bacteria, the results are summarized in Table 3. Additionally, the dependence of bacterial identification score values on incubation time was plotted.

The best results were achieved for the sample 12NN, where *Priestia flexa* (*B. flexus*) was identified at the species level as early as 1 h of incubation, and satisfactory identification results were achieved up to 24 h of incubation. One-hour incubation also allowed the identification at the bacterial genus level in the samples 7NN, 8NN, and 13NN, where additionally, the sample preparation by extraction allowed the identification at the species level. Isolate 7NN was identified in 73.68% (14/19) of the cases, of which 35.71% (5/14) identifications were at the species level. *P. simplex* (8NN) was identified between 1–6 h of incubation, with the extract allowing the identification at 5 h, where the score ≥ 2 . In this case, 52.63% (10/19) of the analysis gave reliable identification results, of which 10% (1/10) were conducted at the species level.

The identification of sample 11NN at the genus level was possible after 5 h of incubation and protein extract preparation.

Table 2. Results Obtained for Microflex LRF MALDI-TOF MS Analysis^a

MALDI identification results	sample name	microflex LT MALDI-TOF MS					
		direct transfer	score	on-target extraction	score	in-tube extract	score
pickled cucumbers	7NN						
sauerkraut	8NN	<i>Peribacillus simplex</i>	1.96	<i>Peribacillus simplex</i>	1.80		
cow milk	11NN					<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1.96
cow milk	12NN			<i>Bacillus flexus</i> ¹	2.13	<i>Bacillus flexus</i> ¹	1.86
sauerkraut	13NN	<i>Bacillus marisflavi</i> ²	1.94	<i>Bacillus marisflavi</i> ²	2.04		

^aThe probability of correct identification in the MALDI Biotyper 3.0 system was expressed in the form of a point index and a graphical index: 2.300–3.000: reliable identification of the microorganism up to species level; 2.000–2.299: reliable identification of the microorganism to the genus level and the probable result of identification to species level; 1.700–1.999: probable result of identification to the level of the genus; ≤1.699: not reliable identification result. New nomenclature: ¹*Priestia flexa*, ²*Rosellomorea marisflavi*.

Table 3. Results of Bacterial Identification Using MALDI-TOF MS Including Incubation Time and Sample Preparation Method

Time	7NN <i>Bacillus licheniformis</i>		8NN <i>Peribacillus simplex</i>		11NN <i>Lysinibacillus fusiformis</i>		12NN <i>Bacillus flexus</i> ¹		13NN <i>Bacillus marisflavi</i> ²	
	Extraction	Whole-cell	Extraction	Whole-cell	Extraction	Whole-cell	Extraction	Whole-cell	Extraction	Whole-cell
1h	1.80 ± 0.17	1.74 ± 0.06	1.90 ± 0.11	1.73 ± 0.11	1.44 ± 0.08	1.38 ± 0.14	2.16 ± 0.06	2.09 ± 0.13	2.02 ± 0.12	1.71 ± 0.14
2h	2.14 ± 0.22	1.86 ± 0.11	1.92 ± 0.02	1.71 ± 0.08	1.36 ± 0.06	1.3 ± 0.16	2.29 ± 0.12	2.09 ± 0.22	2.01 ± 0.09	1.83 ± 0.04
5h	2.14 ± 0.20	1.61 ± 0.05	1.94 ± 0.18	1.87 ± 0.14	1.65 ± 0.11	1.61 ± 0.03	2.25 ± 0.03	1.89 ± 0.19	1.72 ± 0.11	1.84 ± 0.02
6h	1.92 ± 0.13	1.73 ± 0.05	1.70 ± 0.02	1.70 ± 0.08	1.54 ± 0.13	0	2.06 ± 0.12	2.22 ± 0.03	1.54 ± 0.17	1.83 ± 0.10
8h	1.76 ± 0.09	1.84 ± 0.12	1.43 ± 0.05	1.39 ± 0.23	1.55 ± 0.13	1.51 ± 0.10	2.24 ± 0.05	2.22 ± 0.11	1.94 ± 0.06	1.68 ± 0.03
10h	0	2.12 ± 0.11	1.31 ± 0.04	1.59 ± 0.13	1.70 ± 0.05	0	2.16 ± 0.14	0	1.80 ± 0.09	1.70 ± 0.07
12h	1.71 ± 0.08	2.03 ± 0.15	0	1.36 ± 0.07	1.84 ± 0.12	1.67 ± 0.05	2.22 ± 0.20	2.10 ± 0.20	1.83 ± 0.13	1.32 ± 0.05
24h	1.92 ± 0.06	1.49 ± 0.19	1.90 ± 0.07	1.50 ± 0.03	1.87 ± 0.03 ^a	1.66 ± 0.05	1.96 ± 0.17	1.87 ± 0.08	1.73 ± 0.14	1.57 ± 0.20
48h	1.89 ± 0.03	1.53 ± 0.09	1.59 ± 0.11	1.47 ± 0.24	1.91 ± 0.10 ^b	1.26 ± 0.06	1.28 ± 0.08	1.40 ± 0.16	1.49 ± 0.09	1.39 ± 0.06

Blue colour – mass spectra cannot be collected
 Orange colour – no species identification possible (*Lysinibacillus* sp):
^a*L. fusiformis*; *L. pakistanensis*; *L. xylanilyticus*
^b*L. fusiformis*; *L. xylanilyticus*
 New nomenclature:
¹*Priestia flexa* ²*Rosellomorea marisflavi*

^aBlue color—mass spectra cannot be collected. Orange color—no species identification possible (*Lysinibacillus* sp): ^a*L. fusiformis*; *L. pakistanensis*; *L. xylanilyticus*. ^b*L. fusiformis*; *L. xylanilyticus*. New nomenclature: ¹*Priestia flexa* ²*Rosellomorea marisflavi*.

Between 10 and 24 h, bacteria were identified at the genus level. However, species identification was impossible because successive replicates resulted in different species of bacteria belonging to the genus *Lysinibacillus*: *L. xylanilyticus*, *L. fusiformis*, and *L. pakistanensis*. At the species level, *Lysinibacillus* was identified after 48 h of incubation, but again two species were obtained from several replicates: *L. xylanilyticus* and *L. fusiformis* (orange color in Table 3). *Rosellomorea marisflavi* (*B. marisflavi*) in the sample 13NN was identified after 1–6 h of incubation. However, the best results were obtained for the extraction method after 1 and 8 h of incubation.

Based on the graph (Figure 1), it can be concluded that for sample 7NN, the best identification results were obtained after 2 h of incubation for the extract and 12 h for whole cells. For the 8NN, the best results were obtained after 5 h of incubation for both sample preparation methods. For the sample 11NN, it was complicated to determine the optimal incubation time due to the unclear species identification of microorganisms. For 12NN up to 1–12 h of incubation, scores ≥2.00 were obtained for bacterial extracts. Analyzing the results obtained for whole cells, the optimal incubation time is 8 h, although the species-

level identification was obtained after only 1 h of incubation. For the 13NN samples, the best identification results were obtained after 1 h of incubation, both for extracts and whole cells.

Microscopic images taken after staining over time using the Schaeffer–Fulton method show that the incubation time of the bacteria influences the number of spores in the sample. Figure 2 shows changes in the number of spores for *P. simplex* (sample 8NN).

On average, the ratio of spore to vegetative cell counts during successive incubation hours exhibited diverse values, specifically 4.5/1.8, 13.0/4.7, 1.7/10.5, 7.5/8.0, 3.3/8.5, 5.0/4.5, 13.5/3.8, 17.8/1.3, and 15.0/1.5, in that order. These observations suggest a notable fluctuation in the spore-vegetative cell relationship across the incubation period. Interestingly, the number of spores was observed to be more pronounced during the initial and concluding stages of the incubation period compared to the midpoint. This trend suggests an intriguing dynamic between spore formation and the progression of the incubation period, which merits further examination. Upon assessing the rates of spore production, expressed as the ratio of spores to vegetative cells (as depicted

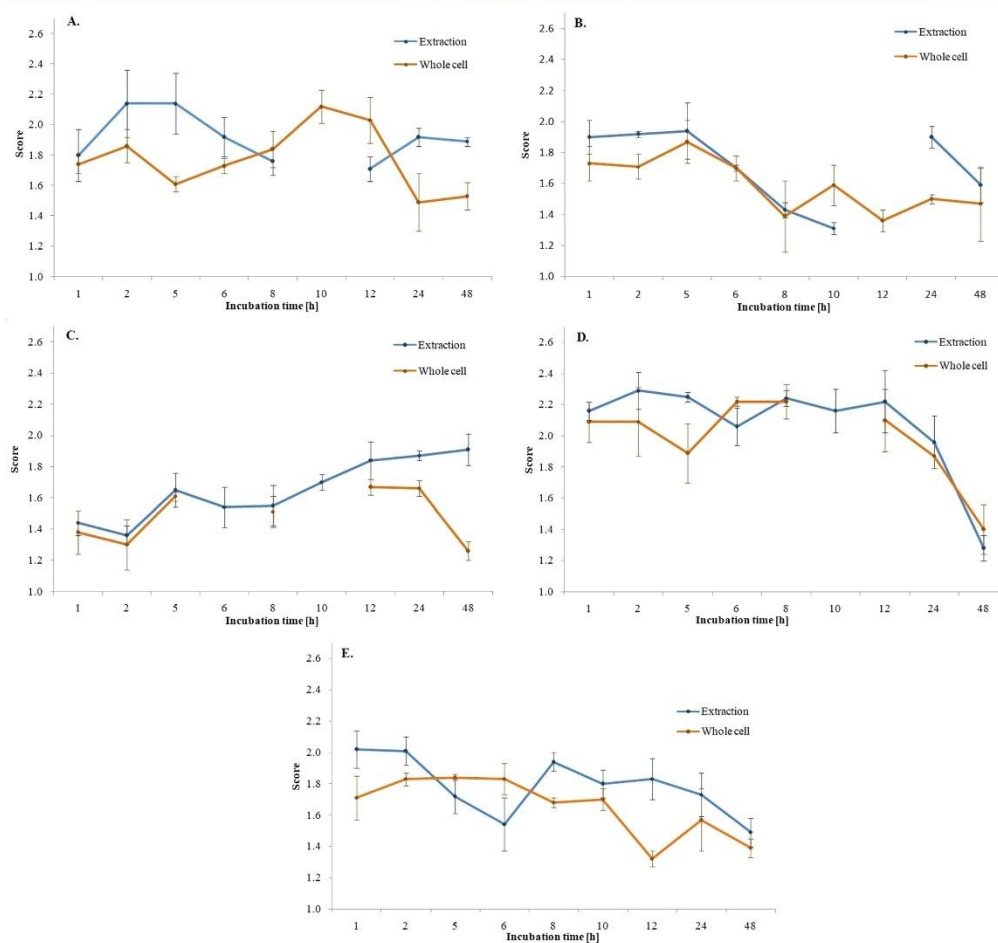


Figure 1. Graphs showing the dependence of average score values on the incubation time of bacteria (A—*B. licheniformis*, B—*P. simplex*, C—*Lysinibacillus sp.*, D—*B. flexus*, E—*B. marisflavi*).

in Figure 3), we discovered that the minimum quantity of spores was recorded within the 5 to 8 h interval of the incubation period. This particular time frame is significant and can be considered the optimal incubation duration for our study. This is because we noticed a gradual upswing in the number of spores beginning from the 10 h mark of the incubation period. This gradual increase indicates the start of a prolific spore-forming phase, thus making the 5 to 8 h interval critical in terms of managing spore production for accurate identification of the bacteria. This understanding could potentially influence and improve the methodologies adopted for the identification of spore-forming bacteria.

2.4. MS Spectra Analysis. To explain the differences in identification in relation to the incubation time, the mass spectra analysis was carried out for four selected times: 1, 5, 10, and 24 h. Figure 4 shows sample spectra obtained for the 8NN sample. Comparing the obtained spectra, it can be observed

that in 1 h of incubation, the characteristic signals are 4305 (Figure 4A) and 7576 m/z (Figure 4B). After 5 h, it can be seen that the intensity of the 4305 m/z signal has decreased, while the 7845 m/z (Figure 4C) signal has appeared. According to the UniProt database, the 4305 m/z signal is due to the 50S ribosomal protein L36 or the sporulation protein YjcZ. The decrease in the intensity of the described signal after 5 h of incubation suggests that it is the protein responsible for sporulation. The signal 7576 m/z corresponds to the protein that builds bacterial spores. The signal that appeared after 5 h of incubation (7845 m/z) corresponded to the protein responsible for the germination of bacterial spores. This confirms the assumption that spore germination and an increase in the number of vegetative cells occur after this time. The signal 7576 m/z corresponds to the protein that builds bacterial spores.

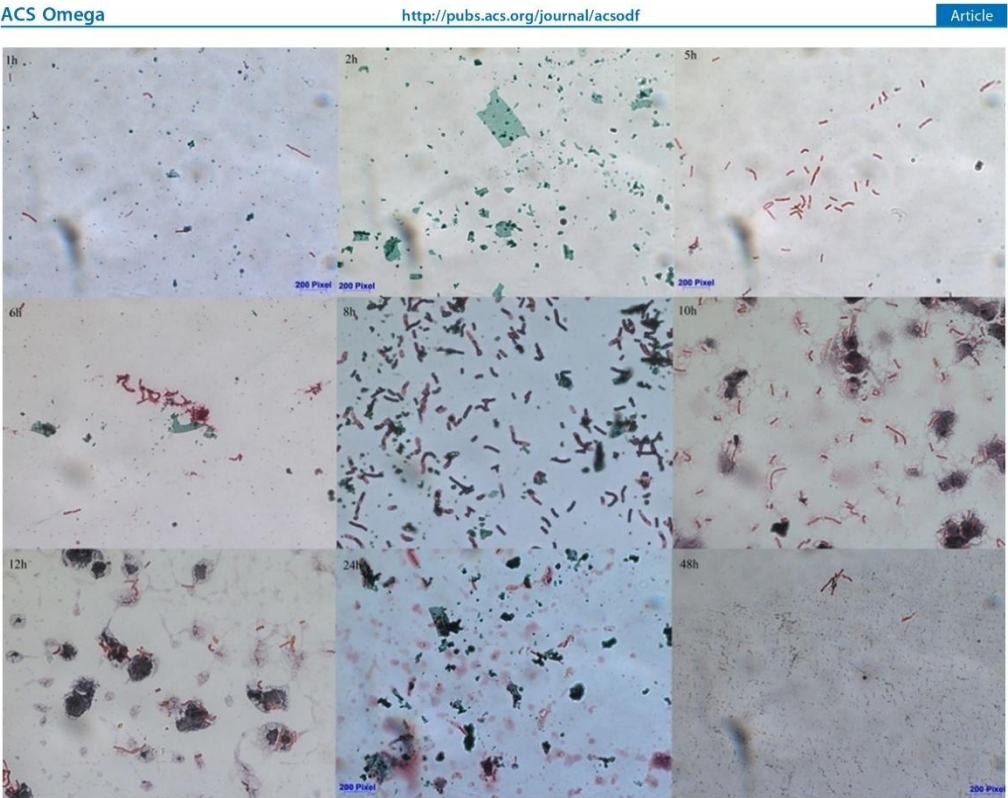


Figure 2. Microscopic photos of bacterial preparations after staining with the Schaeffer–Fulton method, showing endospores for the 8NN sample (green—spores, pink—vegetative cells).

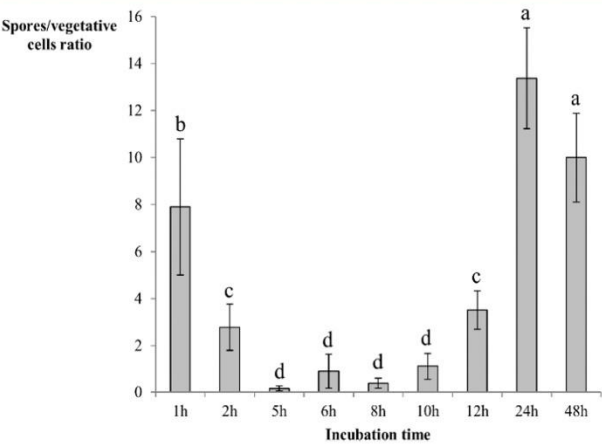


Figure 3. Spore production dynamics during incubation expressed as the ratio of spores to the number of vegetative cells calculated using optical microscopy as well as Gram and Schaeffer–Fulton staining techniques. Subsequent letters of the alphabet denote statistical differences between the results calculated using analysis of variance (ANOVA) and Fisher's least significant differences (LSD) post hoc test in descending order.

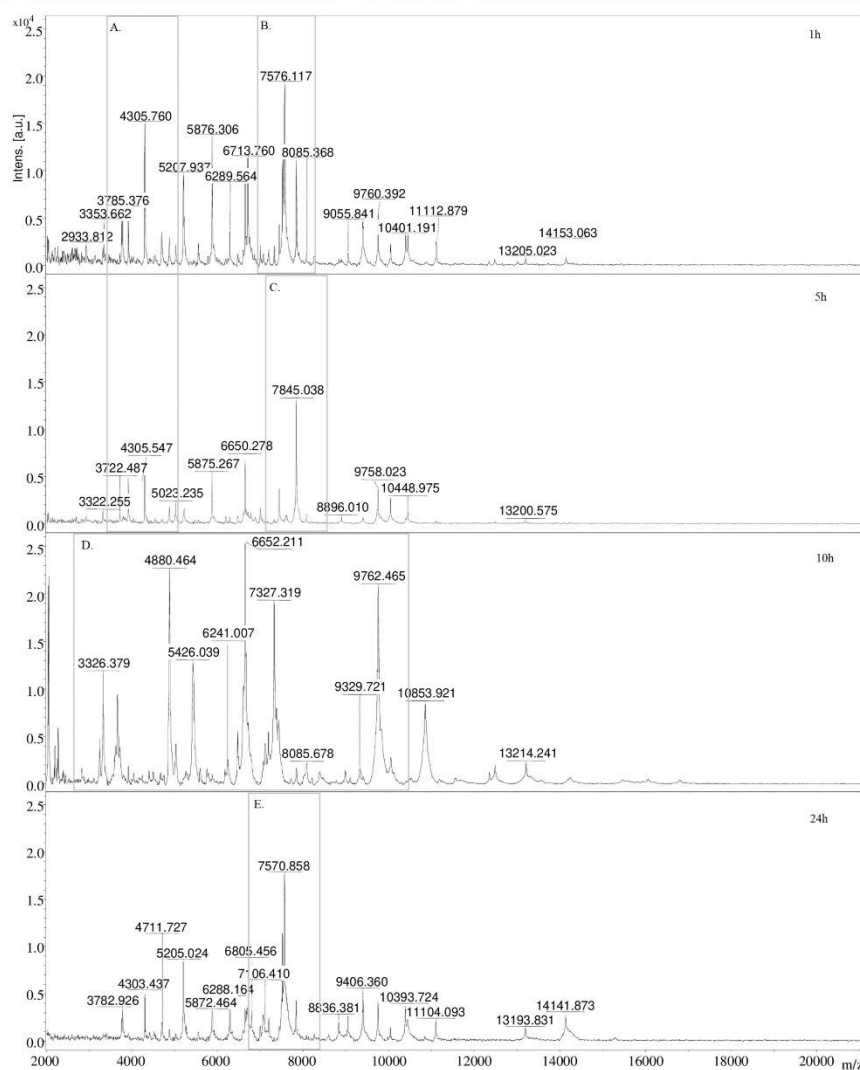


Figure 4. Comparison of MALDI-TOF MS mass spectra after 1, 5, 10, and 24 h incubation for 8NN sample.

After a 10 h incubation, the MS spectrum shows signals 3326, 4880, 6652, and 9762 m/z (Figure 4D), which, according to the UniProt database, are responsible for bacterial sporulation, which explains the decrease in the level of identification of microorganisms. A high signal intensity of 7570 m/z (Figure 4E), corresponding to the germination protein, is observed after 24 h of bacterial incubation.

The reference spectra of *P. simplex* (8NN) were compared with the obtained spectra for 5 and 10 h (Figure 5). Green means species match (score ≥ 2), yellow—generic match (score 1.99–1.70), and red—no match (score < 1.7). The spectrum obtained after 10 h of the incubation of bacteria

shows the disappearance of signals from ribosomal proteins (on which the identification is based) in comparison with the spectrum obtained after 5 h of incubation. These results show a smaller number of ribosomal protein signals. The appearance of signals from proteins promoting sporulation negatively affects the identification of bacteria using the MALDI-TOF MS technique.

2.5. Statistical Analysis. The results of statistical analyses performed with Statistica version no. 12 using ANOVA with Fisher's least significant differences (LSD) post hoc test and Pearson's linear correlation analysis are shown in Figure 6. When analyzing the data presented in Figure 6(1.) it was

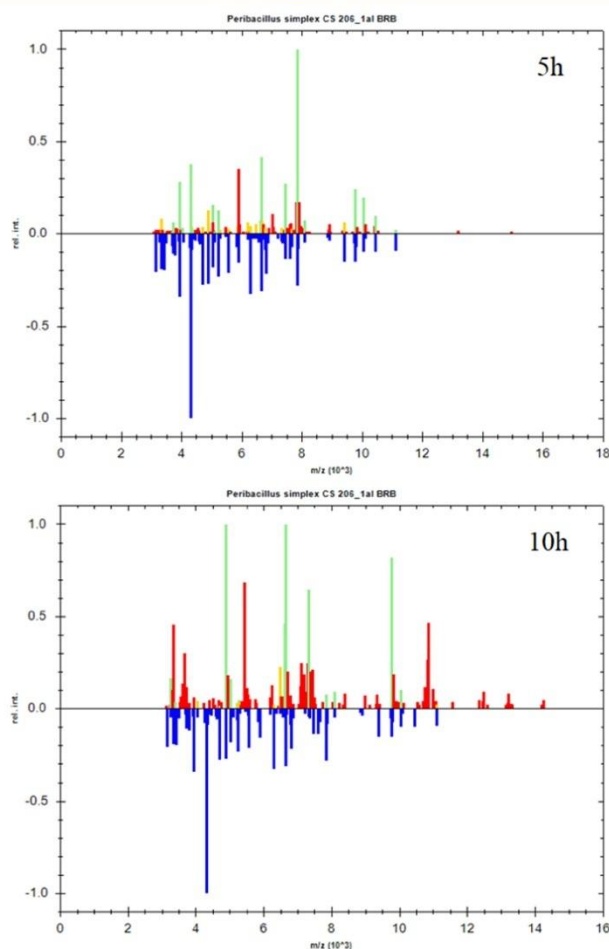


Figure 5. Comparison of the reference spectra with those obtained during the MALDI-TOF MS analysis of the 8NN sample after 5 and 10 h of incubation.

observed that the number of $S/N \geq 4$ signals in the tested samples increased during the incubation up to 5 h and significantly decreased during 10 h of incubation, regardless of the mode—FA (whole cell + FA) or E (extraction)—3 times compared to 5 h of incubation. Although during the further incubation—12–48 h—a gradual increase in the number of acquired signals in the MS spectra was observed. Only in the case of the E mode, their value approach those recorded until 5 h of incubation.

Taking into account the statistical significance of differences in the number of signals, in most cases they concerned the 5 and 10 h incubation variants, where a significant increase and decrease in the number of signals was observed, respectively. Generally speaking, the most optimal incubation time in terms of the quality of the MS spectra and the identification of bacterial species was 5 h, while the time of 10 h turned out

be the critical point characterized by the poorest quality of the spectra and the level of identification.

The data presented in Figure 6(2.) allow us to conclude that the highest score value was recorded after 5 h of incubation, which then decreased to the lowest value after 10 h of incubation, although most of the differences were not statistically significant except for the score for the FA mode and 10 h of incubation. After the incubation longer than 10 h, the score value increases, but it reaches lower values than in the case of shorter incubation times—up to 8 h. For both modes, a high correlation ($0.5 < r \leq 0.7$) of the $S/N \geq 4$ number with the score value was noted.

3. DISCUSSION

Spore-producing bacteria pose a significant risk to food safety and public health, as they are responsible for contamination

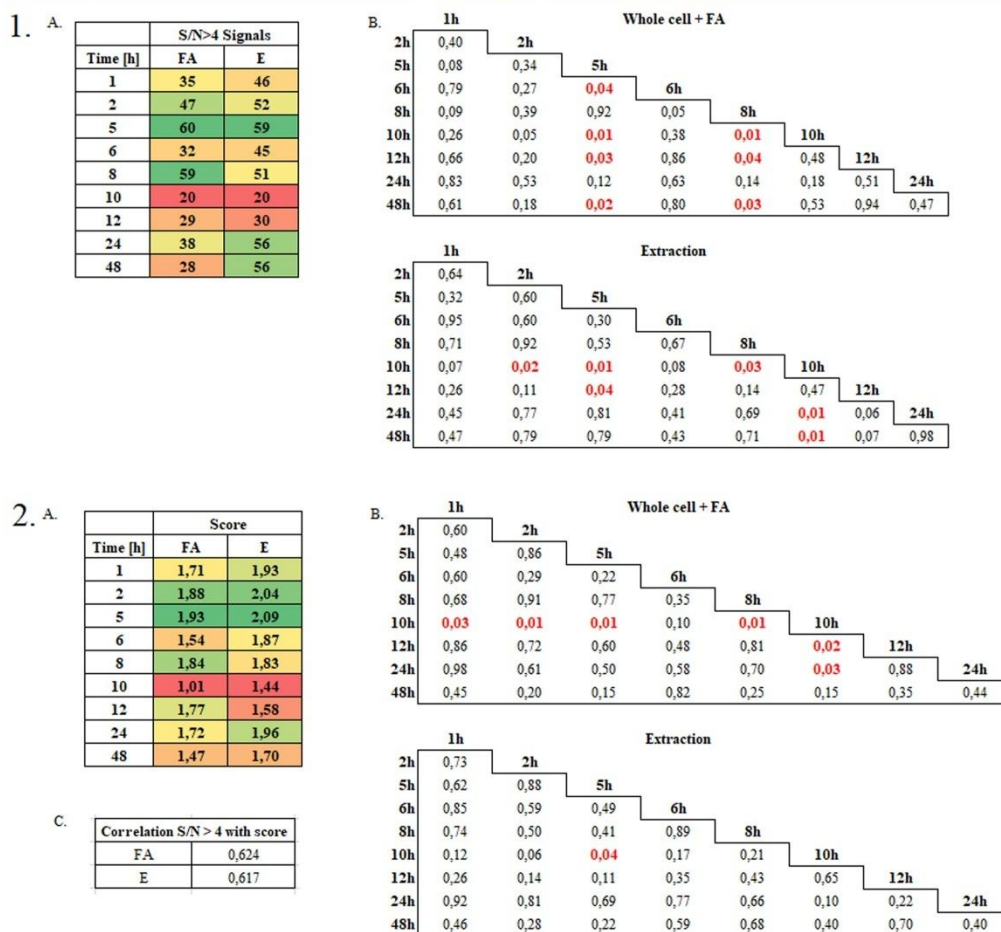


Figure 6. Significance tests of differences and existing correlations based on the number of signals (1) and the score value (2).

and disease transmission in plants, animals, and humans. These bacteria form spores, highly resistant to chemicals, disinfectants, and various physical treatments, challenging their eradication. Consequently, rapid and accurate detection of spore-forming bacteria is a crucial objective in microbiology. The MALDI-TOF MS emerged as a vital technology in clinical microbiology laboratories due to its ability to rapidly identify microorganisms accurately. Despite its many advantages, the method faces challenges when detecting spore-forming bacteria. The presence of spores complicates the identification process, as the formation of a thick cell wall and the difficulties associated with protein extraction hinder the accurate analysis.

The thick cell wall of spores provides remarkable resilience, allowing them to survive extreme conditions such as high temperatures, radiation, and desiccation. This durability poses a problem for traditional bacterial identification methods, as the cell wall obstructs the release of intracellular proteins required for the analysis. Consequently, researchers must

develop innovative strategies to overcome these challenges and improve detecting and identifying spore-forming bacteria using MALDI-TOF MS.

Potential avenues for enhancing the MALDI-TOF MS performance in spore-forming bacteria detection include optimizing sample preparation techniques, such as employing specialized extraction protocols or modifying incubation conditions. Researchers could also explore using alternative matrices and developing novel bioinformatics tools to interpret the mass spectra of spore-forming bacteria better.

Micro-biologists can significantly enhance food safety and quality control measures by addressing these challenges and refining the MALDI-TOF MS method for spore-forming bacteria detection. Ultimately, such advancements will contribute to the protection of public health by facilitating the rapid identification and mitigation of potentially harmful spore-forming bacterial contaminants in food and other environments.

Bacillus is ubiquitous and is one of the most widespread species with high phenotypic and genotypic diversity. *Bacillus* bacteria can be lethal pathogens used as biological weapons, cause opportunistic infections, contaminate food, and be used as probiotics.^{21,22} In addition, *Bacillus* species can produce a variety of extracellular enzymes such as amylase, protease, lipase, and lecithinase, so they can potentially grow and spoil a variety of food matrices.^{23,24} Reference spectra of many *Bacillus* species are available in commercially available databases such as Biotyper 3.0; however, due to the presence of endospores that mix with vegetative cells, the classification and identification of spore-forming bacterial strains using MALDI-TOF MS is complicated. It was demonstrated that the variable vegetative-endospore composition of bacterial cells has a direct impact on the identification of bacteria and that the proportion of SASP ranging from 8 to 20% is inconsistent, making accurate identification of bacteria of the *Bacillus* species even more difficult.^{25–29}

Optimizing culture conditions is a straightforward and effective strategy for managing spore formation, which is vital for obtaining reliable results in bacterial identification studies. In our research, we employed two distinct preparation methodologies for MALDI-TOF MS analysis. The first method entailed a direct transfer process complemented by a formic acid coating, and the second approach utilized a process of extraction with ethanol and formic acid. In our comparison of these two techniques, we found that the overall impact on the identification outcomes of spore-forming bacteria was statistically insignificant. In other words, both methods yielded comparable results in terms of bacterial identification, which suggests that researchers can select either method based on other considerations such as resource availability, time efficiency, or convenience. Importantly, our findings align with existing literature on this subject. Previous research has indicated that the direct transfer method with a formic acid coating is highly effective for the identification of Gram-positive bacteria at a species level. The validation of this method in our own study further strengthens the argument for its use in bacterial identification processes, particularly those involving spore-forming bacteria. These insights contribute to a growing body of knowledge on culture optimization and sample preparation methods, informing future research and best practices in the field of microbial identification. The more we understand these processes and their impact on identification outcomes, the better we can refine our methodologies and improve the accuracy and efficiency of bacterial identification. The growth rate directly affects the transformation of vegetative cells into endospores. For example, the research conducted by Shu and Yang proves the possibility of shortening the standard 24 h *Bacillus* incubation time to 12 h (solid medium).³⁰ Our research shows that even a very short incubation (up to 1 h) in the liquid medium of the bacteria allowed the identification of *P. flexa* at the species level, and satisfactory identification results were obtained up to 24 h of incubation. The worst identification results were obtained for sample 11NN, which consisted of the bacteria of the genus *Lysinibacillus* (Table 3). Species identity could not be established as successive replicates gave a different species identification result. This may be due to the close relationship between *L. fusiformis*, *L. xylanilyticus*, and *L. pakistanensis*. Nevertheless, each of the analyzed samples showed the same relationship of decreasing score values with the length of the incubation time.

Microscopic images (Figure 2) and statistical analysis (Figure 3) confirm the higher presence of spores in the first and last hours of incubation of the microorganisms. A similar phenomenon was reported by Chambers et al.³¹ and Shu et al.³⁰ who demonstrated that endospores directly reduced the identification scores assessed by MALDI-TOF MS and disturbed the identification of *Bacillus* species. Statistical analyses (Figure 6) show that 10 h of incubation is the least favorable in terms of the identification quality while 5 h is the best. It is reported that the sporulation time for *B. subtilis* is 8–10 h, which confirms the weakest identification results after 10 h of incubation.^{32,33} Literature data indicate that spore germination and integumentary overgrowth in *Bacillus* bacteria typically occurred within 1–2 and 3–7 h, respectively.³⁴ This is a supporting argument for why our results indicate that 5 h of incubation time gives the best identification results. Regarding the missing spectral data for *Lysinibacillus* at 6, 8, and 10 h of incubation, we would like to provide further clarification. While Figure 3 does indeed show that the population of bacteria is primarily formed by vegetative cells with a minimal number of spores during these time points, the sporulation process itself can pose challenges in obtaining clear spectral data. Obtaining spectra from spores is more challenging than from vegetative cells. However, it is worth noting that the sporulation process in bacteria involves a series of complex morphological and biochemical changes. During this transition phase, even if the majority of the cells are vegetative, the onset of sporulation can lead to alterations in the protein content and profile of the bacterial population. This can result in a heterogeneous mixture of proteins, which can complicate the extraction and ionization processes.

Furthermore, sporulating cells can produce a variety of proteins and other molecules that can interfere with the MALDI-TOF MS process. These molecules can either suppress the ionization of other proteins or produce additional peaks that can overshadow the signals from the main proteins of interest. As a result, even if the number of spores is low, the presence of these sporulation-related molecules can lead to a spectrum that is poor in signals, making it challenging to obtain clear and reliable data.

In our study, we observed that during the 6, 8, and 10 h incubation periods, the sporulation process, even though not dominant, had a significant impact on the quality of the spectra obtained. This led to the lack of data for these time points, as the spectra were not of sufficient quality for reliable identification using the Biotyper platform.

It is worth noting that the reproducibility and reliability of MALDI-TOF MS can be influenced by various factors, including protein extraction procedures and the system's status in different centers, as highlighted by Rodríguez-Temporal et al. in their multicentre study on nontuberculous mycobacteria identification.³⁵

Although the microorganisms described in the above study are mainly responsible for food spoilage, they may be related to the occurrence of infections in humans. For example, due to the co-infection of *B. subtilis* and *B. licheniformis*, La Jeon et al. found an atypical pattern of bacteraemia and mediastinitis in immune-compromised patients.³⁶ *B. licheniformis* can also cause foodborne illness, the symptoms of which are nausea, vomiting, diarrhea, and stomach cramps occurring 5–12 h after eating contaminated foods.³⁷ Raviane discovered the presence of *Bacillus* on thermoplastic immobilization masks used during radiation therapy treatment. Moreover, the

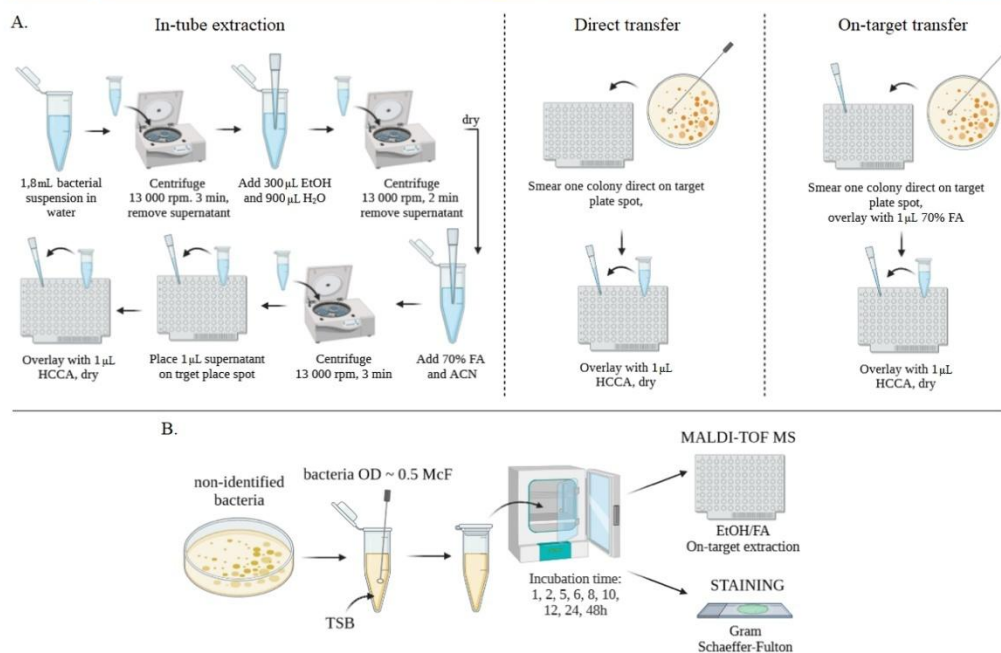


Figure 7. Procedure of sample preparation (A) and selection of incubation parameters for the spore-forming bacteria (B).

recovery of bacteria from stored masks after 4 weeks indicates the continued presence of dormant spores. This also means that they can be transferred to a patient wearing a contaminated mask during a treatment session.³⁸ As the results obtained in the above study indicate, an approximately 5 h incubation of bacteria is the right time for spore germination and the development of vegetative cells. Spores are very resistant to any changes in the environment, which cannot be said about vegetative cells, which is why it is easier to fight them. The results obtained give hope for the possibility that the rapid identification of spore-producing microorganisms contamination control can help solve the problem of food contamination. Quick analysis, when vegetative cells prevail in the sample, can be used to opt for the drastic antibacterial therapy (pasteurization, detergents, UV, or appropriate antibiotics).

Nevertheless, additional steps must be taken to obtain a comprehensive dataset that enables the precise and rapid identification of spore-forming bacteria. In the future, efforts will be made to identify these microorganisms using lipidomics and metabolomics approaches combined with the MALDI-TOF MS technology. The aforementioned studies are considered pilot and preliminary investigations. Advancements in these areas could potentially facilitate the identification of clinically relevant spore-forming bacteria in the near future.

4. CONCLUSIONS

This comprehensive research significantly advanced our understanding of spore-forming bacteria identification using MALDI-TOF MS and the crucial factors that impact the accuracy and efficiency of this method. The study has

thoroughly investigated the optimal incubation time, and sample preparation methods, and explored the potential integration of lipidomics and metabolomics approaches to improve bacterial identification.

The implications of the findings are vast and far-reaching, encompassing a range of applications such as food safety, clinical diagnostics, and environmental monitoring, where swift and precise identification of spore-forming bacteria is of paramount importance. By enhancing the capabilities of MALDI-TOF MS in clinical microbiology laboratories, the research contributes to the development of more effective strategies for detecting and managing bacterial contamination.

Moreover, this study emphasizes the need for ongoing research and innovation in the field of microbiology, particularly concerning spore-forming bacteria detection and identification. These advancements will ultimately lead to more robust tools and methodologies, ensuring public health and the safety of our food supply. Additionally, the research findings have the potential to influence policy-making, regulatory frameworks, and industry practices, driving a more proactive and science-based approach to managing the risks posed by spore-forming bacteria.

5. EXPERIMENTAL SECTION

5.1. Instrumentation. The identification of isolated microorganisms was performed using an MSP 96 target polished steel BC plate, microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). For amplification by the polymerase chain reaction (PCR), a Master cycler pro-S thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) was used, gel electrophoresis was performed using

a PowerPac power supply (Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA), and a NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) was used to measure the concentration of the DNA. For the microscopic analysis, an Axio Observer D1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) was used.

5.2. Chemical and Reagents. Tryptic Soy Agar (TSA) and Tryptic Soy Broth (TSB) (both from Sigma-Aldrich, Germany) were used for the bacteria cultivation. To obtain the bacterial protein extract, HPLC-grade water, formic acid (FA), acetonitrile (ACN), ethanol, and trifluoroacetic acid (TFA) (all from Sigma-Aldrich, Germany) were applied. For the MALDI-TOF MS analysis, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) (Sigma-Aldrich, Switzerland) and Bacterial Test Standard (BTS) (Bruker, Germany) were used. For the DNA isolation, the QIAamp DNA Microbiome Kit reagents (Qiagen, Germany) were used, while RNase-Free Water (Qiagen), agarose (Merc, Germany), 50×TAE buffer, and ethidium bromide (both from AppliChem, Germany) were used for electrophoresis. Microbiological preparations were stained with crystal violet, Lugol's reagent, safranin (all from aqua-med ZPAM-KOLASA, Poland), and malachite green (Sigma-Aldrich, Germany).

5.3. Bacteria Isolation from a Food Sample. The bacteria were isolated from cow's milk, sauerkraut, and pickled cucumber samples using the serial dilution method, culturing on TSA plates. Bacteria were incubated in aerobic conditions at 37 °C for 24 h.

5.4. Sample Preparation of Bacteria. Three sample preparation methods were used: in-tube extraction, on-target extraction, and direct colony transfer²⁸ (Figure 7A). In the first method, 1.8 mL of the bacterial suspension was centrifuged at 13,000 rpm for 5 min, and then 300 μ L of distilled water and 900 μ L of ethanol were added to the pellet. The samples were centrifuged at 13,000 rpm for 2 min, and the pellet was dried. An appropriate amount of formic acid and acetonitrile was then added, and the resulting suspension was centrifuged at 13,000 rpm for 2 min. 1 μ L of the resulting supernatant was applied to an MSP 96 Polished Steel BC target plate, dried at room temperature, and covered with 1 μ L of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix solution (10 mg HCCA/1 mL solvent solution: 50% ACN, 47.5 H₂O and 2.5% TFA). In the on-target extraction method, a single bacterial colony was smeared directly onto the target plate, overlaid with 1 μ L of 70% formic acid, and allowed to dry at room temperature. Then, 1 μ L of HCCA matrix solution was applied. The last method, direct colony transfer, is a method analogous to on-target extraction, except that the smeared bacterial colonies were covered directly with the HCCA matrix solution.

5.5. Bacteria Identification Based on the MALDI-TOF MS Approach. The spectral data collection process involved the use of a microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer, while processing of the collected spectra was facilitated via the MALDI-Biotyper 3.0 platform (Bruker Daltonics, Inc.). Each of the biological samples ($n = 3$, derived from a single culture) was subjected to triplicate analysis to ascertain consistency and accuracy of the findings. Furthermore, for each technical replicate, a series of three separate spectra were manually collected ($m = 3$), with each spectrum being composed of three times 1500 single-shot spectra collected in triplicate. The analysis encompassed the use of linear mode and positive ion mode, with ion source 1 set at 20 kV, focusing voltage at 7 kV, and detector voltage at 2.65 kV. The delayed extraction time

was fixed at 230 ns, with a detection quality range between 2000 and 20,000 Da. Spectra calibration was accomplished via a quadratic calibration algorithm, as provided by BTS. The recorded spectra were managed through FlexControl (Bruker Daltonics, Inc.), and the ensuing data were analyzed via FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Inc.). Prior to the analysis, each spectrum was subjected to a smoothing procedure through the Savitsky-Golay method (width 2 m/z , cycles 10), followed by baseline corrections via the TopHat algorithm (signal-to-noise threshold 2; peak detection algorithm—centroid), as recommended by the software supplier (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). BTS (Bruker Bacterial Test Standard, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) was used for spectra calibration, adhering strictly to the manufacturer's instructions. Post the abbreviated incubation times of 7 and 9 h, we used both standard and mixed-detection modes for the bacterial identification phase. The MALDI Biotyper 3.0 system calculates the likelihood of accurate identification by comparing the entire protein profile obtained with the reference database. This is illustrated in a point index and graphical index, with respective values indicating the reliability of microorganism identification, either at the species or genus level.

5.6. Bacteria Identification Based on Sequencing of the 16S rDNA Gene. The genomic DNA according to the protocol was provided by the manufacturer. Then, a PCR reaction was performed to amplify the 16S rDNA region using universal primers complementary to the bacterial 16S rDNA (27F: 5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3 and 1492R: 5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3). The amplification was carried out under the conditions described by Pomastowski et al.⁷ A Mastercycler pro-S thermocycler was used for all PCR reactions. The concentration and purity of the obtained amplicons were quantified by spectrophotometry. Additionally, the quality of the obtained DNA was analyzed using agarose gel electrophoresis, staining the genetic material with ethidium bromide. The PCR products were sent to Genomed (Warsaw, Poland) and were sequenced via the Sanger dideoxy method using the same primers. Finally, contigs were assembled via BioEdit Sequence Alignment Editor ver. 7.2.5³⁹ and then consensus sequences were compared to known 16S rDNA reference sequences in the National Center for Biotechnology Information database RNA reference sequences (RefSeq RNA) using the Basic Local Alignment Search Algorithm tool.

5.7. Selection of Incubation Parameters for the Spore-Forming Bacteria. Selected bacteria that could not be identified after 24 h incubation in the TSA medium were incubated for 1, 2, 5, 6, 8, 10, 12, 24, and 48 h in the TSB liquid medium. Each sample was analyzed for extracts and whole bacterial cells treated with formic acid (Figure 7B). One sample was analyzed in triplicate, the average was taken, and the standard deviation was calculated. Additionally, Gram staining and Schaeffer–Fulton staining to detect the presence of spores were performed. Pictures of microscopic preparations were taken using an Axio Observer D1 fluorescence microscope with a camera and Axiovs40 V 4.8.2.0 software.

5.8. Statistical Analysis. Tests of significance of differences and existing correlations were carried out using Statistica version no.12 (StatSoft, Inc.) using ANOVA with Fisher's last significant differences (LSD) post hoc test and Pearson's linear correlation analysis.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Daria Janiszewska – Department of Environmental Chemistry and Bioanalytics, 87-100 Toruń, Poland; orcid.org/0000-0002-5252-6886; Email: janiszewska.daria@doktorant.umk.pl

Authors

Michał Złoch – Centre for Modern Interdisciplinary Technologies, Nicolaus Copernicus University, 87-100 Toruń, Poland; orcid.org/0000-0001-6169-3099

Paweł Pomastowski – Centre for Modern Interdisciplinary Technologies, Nicolaus Copernicus University, 87-100 Toruń, Poland; orcid.org/0000-0002-1594-0623

Małgorzata Szultka-Młyńska – Department of Environmental Chemistry and Bioanalytics, 87-100 Toruń, Poland

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.3c04354>

Author Contributions

Conceptualization: M.S.-M., P.P., and D.J.; methodology: M.S.-M. and D.J.; software: D.J.; validation: M.S.-M. and D.J.; formal analysis: D.J.; investigation: D.J.; resources: M.S.-M. and D.J.; data curation: M.S.-M., P.P., M.Z., and D.J.; writing—original draft preparation: M.S.-M. and D.J.; writing—review and editing: M.S.-M., M.Z., P.P., and D.J.; visualization: M.S.-M. and D.J.; supervision: M.S.-M. and P.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Tango V project no. TANGO-V-A/0014/2021-00 financed by National Centre for Research and Development. The authors extend their profound gratitude to the Toruń Center of Excellence “Towards Personalized Medicine”, operating under the Excellence Initiative-Research University. All authors are proud members of this esteemed center, and its resourceful and stimulating environment has been integral to their research. The authors’ collective membership has fostered a richly collaborative and deeply knowledgeable atmosphere, enriching the depth and quality of their study. This acknowledgment reflects the authors’ deep appreciation for the center and its continued commitment to promoting excellence in scientific exploration.

■ REFERENCES

- (1) Fromm, H. I.; Boor, K. J. Characterization of Pasteurized Fluid Milk Shelf-life Attributes. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, M207–M214.
- (2) Andersson, A.; Rönner, U.; Granum, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int. J. Food Microbiol.* **1995**, *28*, 145–155.
- (3) Margosch, D.; Gänzle, M. G.; Ehrmann, M. A.; Vogel, R. F. Pressure Inactivation of *Bacillus Endospores*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 7321.
- (4) Rodrigo, D.; Rosell, C. M.; Martinez, A. Risk of *Bacillus cereus* in Relation to Rice and Derivatives. *Foods* **2021**, *10*, 302.
- (5) Desai, S. V.; Varadaraj, M. C. Behavioural pattern of vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* as affected by time-temperature combinations used in processing of Indian traditional foods. *J. Food Sci. Technol.* **2010**, *47*, 549–556.

- (6) Cruz-Facundo, I. M.; Adame-Gómez, R.; Vences-Velázquez, A.; Rodríguez-Bataz, E.; Muñoz-Barrios, S.; Pérez-Oláis, J. H.; Ramírez-Peralta, A. *Bacillus cereus* in eggshell: enterotoxigenic profiles and biofilm production. *Braz. J. Poult. Sci.* **2022**, *24*, No. eRBCA-2021.
- (7) Pomastowski, P.; Złoch, M.; Rodzik, A.; Ligor, M.; Kostrzewa, M.; Buszewski, B. Analysis of bacteria associated with honeys of different geographical and botanical origin using two different identification approaches: MALDI-TOF MS and 16S rDNA PCR technique. *PLoS One* **2019**, *14*, No. e0217078.
- (8) Burgess, S. A.; Lindsay, D.; Flint, S. H. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *144*, 215–225.
- (9) Borch, E.; Arinder, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Sci.* **2002**, *62*, 381–390.
- (10) Ankoekar, C.; Rahmati, T.; Labbé, R. G. Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *128*, 460–466.
- (11) Wood, S. L.; Waites, W. M. Factors affecting the occurrence of *Bacillus cereus* in liquid whole egg. *Food Microbiol.* **1988**, *5*, 103–107.
- (12) de Blackburn, C. W.; McClure, P. J. Pathogenic *Bacillus* species. In *Foodborne Pathogens*; Elsevier, 2009; pp 844–888.
- (13) Setlow, P. Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6*, 550–556.
- (14) Setlow, P. Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environ. Mol. Mutagen.* **2001**, *38*, 97–104.
- (15) Remize, F. Spore-Forming Bacteria. In *The Microbiological Quality of Food*; Elsevier, 2017; pp 99–120.
- (16) Doyle, C. J.; Gleeson, D.; Jordan, K.; Beresford, T. P.; Ross, R. P.; Fitzgerald, G. F.; Cotter, P. D. Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *197*, 77–87.
- (17) Patel, S.; Gupta, R. S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *peribacillus* gen. nov., *cytobacillus* gen. nov., *mesobacillus* gen. nov., *neobacillus* gen. nov., *metabacillus* gen. nov. and *alkalihalobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 406–438.
- (18) Ahmed, I.; Yokota, A.; Yamazoe, A.; Fujiwara, T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57*, 1117–1125.
- (19) Takahashi, N.; Nagai, S.; Fujita, A.; Ido, Y.; Kato, K.; Saito, A.; et al. Discrimination of psychrotolerant *Bacillus cereus* group based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal subunit proteins. *Food Microbiol.* **2020**, *91*, No. 103542.
- (20) da Costa, L. V.; da Silva Lage de Miranda, R. V.; dos Reis, C. M. F.; de Andrade, J. M.; Cruz, F. V.; et al. MALDI-TOF MS database expansion for identification of *Bacillus* and related genera isolated from a pharmaceutical facility. *J. Microbiol. Methods* **2022**, *203*, No. 106625.
- (21) Heyndrickx, M. The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. *Appl. Environ. Soil Sci.* **2011**, *2011*, 1–11.
- (22) Özdemir, F.; Arslan, S. Molecular Characterization and Toxin Profiles of *Bacillus* spp. Isolated from Retail Fish and Ground Beef. *J. Food Sci.* **2019**, *84*, 548–556.
- (23) Hwang, J.-Y.; Park, J.-H. Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 1652–1660.
- (24) De Jonghe, V.; Coorevits, A.; De Block, J.; Van Coillie, E.; Grijspeerdt, K.; Herman, L.; et al. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *136*, 318–325.
- (25) Lasch, P.; Beyer, W.; Nattermann, H.; Stämmeler, M.; Siegbrecht, E.; Grunow, R.; Naumann, D. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of

flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7229–7242.

(26) Setlow, P. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 29–54.

(27) Schulthess, B.; Brodner, K.; Bloemberg, G. V.; Zbinden, R.; Böttger, E. C.; Hombach, M. Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: Comparison of Different Preparation Methods and Implementation of a Practical Algorithm for Routine Diagnostics. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 1834–1840.

(28) Schulthess, B.; Bloemberg, G. V.; Zbinden, R.; Böttger, E. C.; Hombach, M. Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for identification of Gram-Positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 1089–1097.

(29) Dai, Y.; Xu, X.; Yan, X.; Li, D.; Cao, W.; Tang, L.; et al. Evaluation of a Rapid and Simplified Protocol for Direct Identification of Microorganisms From Positive Blood Cultures by Using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, No. 632679.

(30) Shu, L.-J.; Yang, Y.-L. *Bacillus* Classification Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry—Effects of Culture Conditions. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, No. 15546.

(31) Chambers, T.; Culak, R.; Gharbia, S. E.; Shah, H. N. Minor differences in the proteome of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mojavensis* based upon high abundance/conserved protein mass spectra; implications for rapid, improved identification of two pathogen genetically closely related. *J. Proteomics Enzymol.* **2015**, Vol. 4 1 DOI: 10.4172/2470-1289.1000119.

(32) Piggot, P. J.; Hilbert, D. W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 579–586.

(33) Sonenshein, A. L. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **2000**, *3*, 561–566.

(34) Setlow, P. Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know. *J. Bacteriol.* **2014**, *196*, 1297.

(35) Rodriguez-Temporal, D.; Alcaide, F.; Mareković, L.; O'Connor, J. A.; Gorton, R.; van Ingen, J.; et al. Multicentre study on the reproducibility of MALDI-TOF MS for nontuberculous mycobacteria identification. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, No. 1237.

(36) La Jeon, Y.; Yang, J. J.; Kim, M. J.; Lim, G.; Cho, S. Y.; Park, T. S.; et al. Combined *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* infection in a patient with oesophageal perforation. *J. Med. Microbiol.* **2012**, *61*, 1766–1769.

(37) Salkinoja-Salonen, M. S.; Vuorio, R.; Andersson, M. A.; Kämpfer, P.; Andersson, M. C.; Honkanen-Buzalski, T.; Scoging, A. C. Toxicogenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4637–4645.

(38) Ravine, T. J. Two *Bacillus* isolates recovered from a radiation therapy facility differ greatly in their ability to attach to four immobilization masks. *J. Med. Imaging Radiat. Sci.* **2020**, *51*, 590–598.

(39) Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symposium Series*; Oxford University Press, 1999; Vol. 41, pp 95–98.

PUBLIKACJA [P4]

**Analityka antybiotyków β -laktamowych w układzie *in silico*, *in vitro*
oraz *in vivo***

D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski

Wiadomości Chemiczne (2022) 76: 3-4. PM = 20

doi: 10.53584/wiadchem.2022.3.1

**ANALITYKA ANTYBIOTYKÓW
β-LAKTAMOWYCH
W UKŁADZIE *IN SILICO*, *IN VITRO* ORAZ *IN VIVO***

**ANALYTICS OF BETA-LACTAM ANTIBIOTICS
IN SILICO, *IN VITRO* AND *IN VIVO***

**Daria Janiszewska¹, Małgorzata Szultka-Młyńska^{1*},
Bogusław Buszewski^{1,2}**

¹*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika,
ul. Jurija Gagarina 7, 87-100 Toruń*

²*Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Wileńska 4, 87-100 Toruń
e-mail: mszultka@chem.umk.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Budowa chemiczna, właściwości fizykochemiczne i mechanizm działania antybiotyków β-laktamowych
2. Podejście *in silico* w badaniu metabolizmu antybiotyków β-laktamowych
3. Podejście *in vitro* w badaniach metabolizmu antybiotyków β-laktamowych
4. Inkubacja antybiotyków β-laktamowych z enzymami wątrobowymi frakcji mikrosomalnej
5. Zastosowanie reaktora elektrochemicznego i spektrometrii mas
6. Metody analityczne w oznaczaniu i identyfikacji antybiotyków β-laktamowych w próbkach biologicznych

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Daria Janiszewska w 2019 roku ukończyła studia drugiego stopnia na kierunku Biotechnologia na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, a w 2020 na kierunku Chemia Kryminalistyczna na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie jest doktorantką Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych na tym samym wydziale, wiążąc pracę naukową z Katedrą Chemii Środowiska i Bioanalitik. Głównie zainteresowania badawcze skupiają się wokół identyfikacji mikrobiologicznej z zastosowaniem technik „-omicznych” oraz poznaniem i interpretacją mechanizmów związanych z działaniem i metabolizmem antybiotyków.



<https://orcid.org/0000-0002-5252-6886>

Dr hab. Małgorzata Szultka-Młyńska, prof. UMK jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu uzyskując kolejno tytuł zawodowy magistra w 2010 roku oraz doktora nauk chemicznych w 2014, a doktora habilitowanego w 2019 roku. Jej zainteresowania badawcze koncentrują się wokół metod przygotowania próbek, technik chromatograficznych, spektrometrii mas, jak również oznaczania i identyfikacji związków biologicznie aktywnych w materiale biologicznym. Jest współautorką ok. 75 publikacji naukowych, 1 patentu i 3 zgłoszeń patentowych oraz wielu prezentacji konferencyjnych. Kierowała projektami naukowymi finansowanymi przez MNiSW oraz NCN. Za działalność naukową była kilkakrotnie wyróżniana nagrodami, m.in. KChA PAN, FNP, MNiSW, JM Rektora UMK.



<https://orcid.org/0000-0002-4499-0128>

Prof. dr hab. Bogusław Buszewski absolwent Chemii UMCS w Lublinie. W 1986 doktorat Słowacki Uniwersytet Techniczny w Bratysławie. W 1992 habilitacja, a w 1999 tytuł profesora chemii. Stypendysta Fundacji AvH. Autorem 15 książek, 68 patentów i ponad 660 artykułów naukowych. Prezes CEGSS, przewodniczącym KChA PAN, członek PAN i EASA. Laureat licznych nagród i wyróżnień w kraju i zagranicą, promotor 48 doktorantów, z których 24 uzyskało stopień doktora habilitowanego. Od 2013 r. pełnomocnik Marszałka Woj. Kujawsko-Pomorskiego ds. rozwoju nauki, badań i wdrożeń oraz innowacyjności. Głównie zainteresowania naukowe: bioanalitika, -omika (metabolomika, proteomika, lipidomika itp.), techniki separacyjne (chromatografia i techniki pokrewne, adsorpcja, przygotowanie próbek), spektroskopia i spektrometria, chemometria.



<https://orcid.org/0000-0002-5482-7500>

ABSTRACT

Drug analysis necessitates introducing selective methods of detection and enriching the substances present in biomaterial at low concentration levels (trace analysis). Moreover, there is a continuous demand for increase in the quality of drugs that are being developed, which in turn enforces the development of analytical techniques of increasing sensitivity and accuracy with the application of combined separation techniques. Thus the premise of this review is to compare the *in vitro* metabolic pathways of antibiotic drugs in model conditions such as in the presence of different microsomal fraction enzymes and with the application of electrochemical stimulation of metabolic transformations, as well as to the collected data with the results of *in vivo* experiments.

Keywords: biologically active compounds, chromatographic techniques, electrochemistry, *in vitro*, *in vivo*, mass spectrometry, metabolism, therapeutic drug monitoring

Słowa kluczowe: związki biologicznie aktywne, techniki chromatograficzne, elektrochemia, *in vitro*, *in vivo*, spektrometria mas, metabolizm, terapeutyczne monitorowanie leków

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

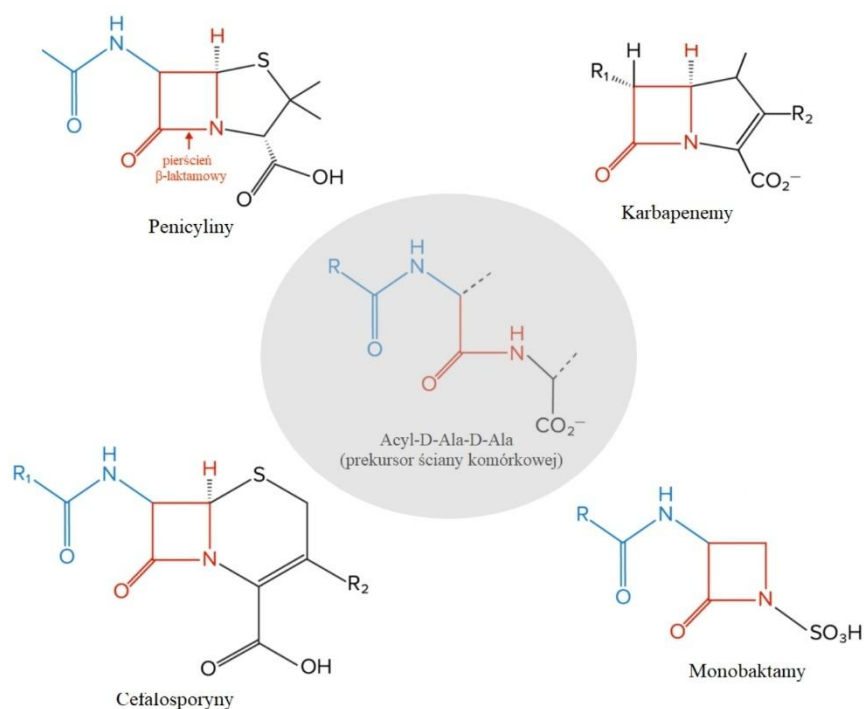
CYP	- Cytochrom P450
EC-MS	- Elektrochemia-spektrometria mas (ang. <i>Electrochemistry-Mass Spectrometry</i>)
EST	- Sulfotransferaza estrogenu
FTIR	- Spektroskopia w podczerwieni transformacją Fouriera (<i>transform infrared spectroscopy</i>)
CE	- Elektroforeza kapilarna (ang. <i>Capillary electrophoresis</i>)
GC-MS	- Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (<i>chromatography – mass spectrometry</i>)
GST	- S-transferaza glutationu
LC-MS	- Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>Liquid chromatography – mass spectrometry</i>)
NMR	- Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (<i>magnetic resonance</i>)
PBP	- Białka wiążące penicylinę (ang. <i>Penicillin-binding proteins</i>)
PGN	- Peptydoglikan
PST	- Sulfotranferaza fenolowa
QSAR	- Ilościowa zależność struktura- aktywność (ang. <i>Quantitative structure-activityrelationship</i>)
UDP	- Urydyno-5'difosforan
UGT	- Glukuronozylotransferaza

WPROWADZENIE

Podstawowym krokiem do oceny losów antybiotyków β -laktamowych w organizmie jest charakterystyka budowy chemicznej metabolitów powstających zarówno w I, jak i II fazie biotransformacji. Podstawowe pytanie dotyczące badań nad przemianami metabolicznymi związków biologicznie aktywnych w ludzkim organizmie to takie w jaki sposób skorelować ze sobą wyniki z eksperymentów *in vitro* z badaniami *in vivo* w praktyce klinicznej. W metabolizmie leków zastosowanie znajdują liczne modele *in vitro*, jak hepatocyty, enzymy wątrobowe frakcji mikrosomalnej, pojedyncze frakcje cytoplazmatyczne czy rekombinowane systemy enzymatyczne. Ponieważ komórki wątrobowe wykazują wysoki poziom aktywności cytochromu P450 i często są głównym miejscem przemian metabolicznych, powszechnie stosowanym narzędziem *in vitro* stały się mikrosomy ludzkiej wątroby. Ponadto, metabolizm związków biologicznie aktywnych może być badany za pomocą podejścia *in silico*, czyli programów komputerowych umożliwiających przewidywanie potencjalnych miejsc metabolizmu antybiotyków β -laktamowych wobec różnych izoenzymów cytochromu P450. Ponadto jedno z najbardziej postępowych narzędzi analitycznych do badania metabolizmu antybiotyków β -laktamowych stanowi obecnie połączenie elektrochemii ze spektrometrią mas, pozwalające wyeliminować wiele żmudnych etapów izolacji metabolitów powstających *in vivo* lub *in vitro*. Mając na uwadze, iż około 90% związków biologicznie aktywnych ulega reakcjom utleniania-redukcji, możemy zauważyć iż procesy katalizowane przez izoenzymy cytochromu P450 znajdują swoje odzwierciedlenie wśród reakcji przeprowadzanych za pomocą celi elektrochemicznej.

1. BUDOWA CHEMICZNA, WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE I MECHANIZM DZIAŁANIA ANTYBIOTYKÓW BETA- LAKTAMOWYCH

Antybiotyki β -laktamowe są najczęściej stosowanymi środkami przeciwbakteryjnymi na świecie. Strukturalnie β -laktamy zawierają 4-członowy pierścień β -laktamowy zawierający węgiel α i β , azot oraz grupę karbonylową. Obejmują pochodne penicyliny (penamy), cefalosporyny i cefamycyny (cefemy), karbapenemy i monobaktamy. W pierwszych czterech grupach antybiotyków pierścienie β -laktamowy skondensowany jest z 5-członowym pierścieniem tiazolidynowym i unikalnym łańcuchem bocznym [1] (Rys. 1.).



Rysunek 1. Ogólna struktura podstawowych grup antybiotyków β -laktamowych
 Figure 1. General structure of the main groups of β -lactam antibiotics

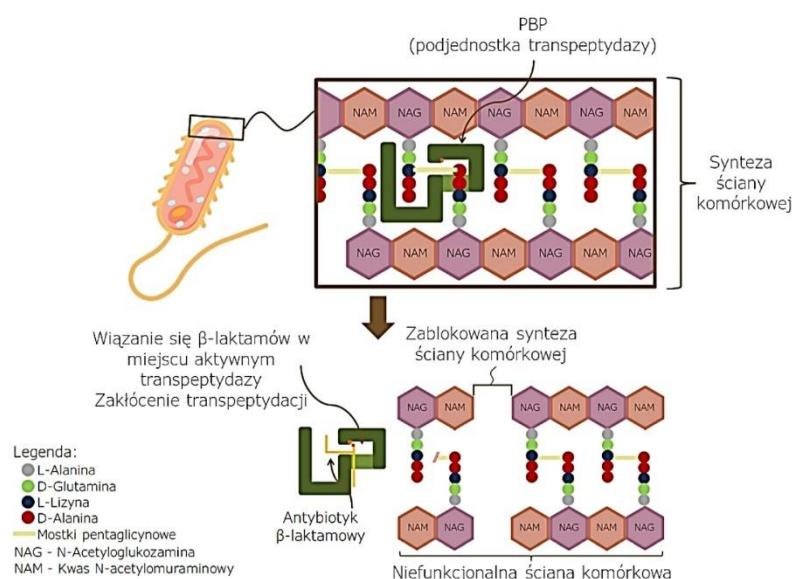
Penicyliny posiadają podstawową bicykliczną strukturę, kwas 6-aminopenicylinowy (6-APA). Struktura składa się z zamkniętego dipeptydu powstałego w wyniku kondensacji L-cysteiny i D-waliny, w wyniku czego powstaje pierścień β -laktamowy i tiazolidynowy. Reaktywny charakter układu pierścieni sprawia, że penicyliny są podatne na procesy degeneracyjne. W środowisku kwaśnym i temperaturze pokojowej pierścień β -laktamowy ulega rekonfiguracji. Proces ten ma znaczenie kliniczne, ze względu na kwasowe środowisko żołądka [2].

Cefalosporyny są grupą półsyntetycznych antybiotyków β -laktamowych, będącymi pochodnymi kwasu 7-aminocefalosporynowego (7-ACA). Zawierają w swojej cząsteczce dwupierścieniową strukturę cefamu, a od cefamycyn odróżnia je obecność grupy 7-metoksylowej. Obecnie istnieje 5 generacji antybiotyków cefalosporynowych różniących się spektrum przeciwbakteryjnym, farmakokinetyką oraz odpornością na β -laktamazy [3]. Kolejną grupą antybiotyków β -laktamowych są strukturalnie spokrewnione z penicylinami i cefalosporynami karbapenemy. Leki te są pochodnymi tienamycyny, antybiotyku wytwarzanego przez drobnoustroje głębowe. Karbapenemy posiadają maksymalne spektrum działania przeciwbakteryj-

nego, co związane jest z ich wewnętrzną opornością na prawie wszystkie β -laktamazy. Stabilność wobec β -laktamaz wynika z obecności podstawnika trans- α -1-hydroksyetylowego [4].

Wyjątkiem od podstawowej struktury chemicznej omawianych antybiotyków są monobaktamy, których postawę stanowi monocykliczny pierścień β -laktamowy, łańcuch boczny -R oraz grupa A-SO₃H [5] (Rys. 1.).

Wszystkie antybiotyki β -laktamowe mają wspólny mechanizm działania polegający na hamowaniu biosyntezy ściany komórkowej bakterii (Rys. 2.).



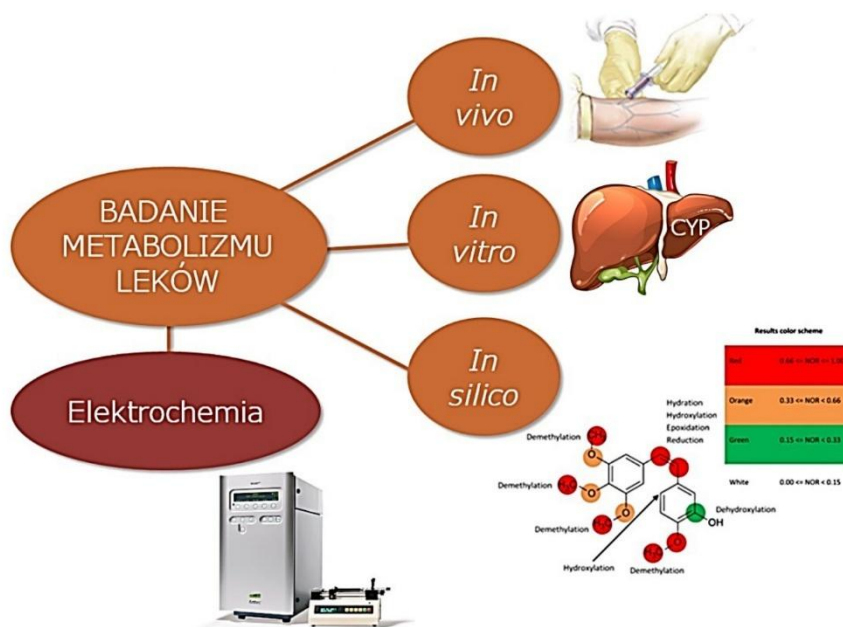
Rysunek 2. Mechanizm działania antybiotyków β -laktamowych

Figure 2. Mechanism of action of β -lactam antibiotics

Ściany komórkowe bakterii są strukturami zbudowanymi z kwasu diaminopimelinowego, muraminowego, teichojowego, aminokwasów, węglowodanów oraz lipidów. Całość tworzy złożoną makrocząsteczkę zwaną peptydoglikanem (PGN), mukopeptydem lub mureiną. Końcowe fragmenty łańcucha peptydowego PGN, które stanowi D-alanylo-D-alanina, tworzą połączenie pod wpływem transpeptydazy z wydzielaniem jednej cząsteczki D-alaniny. β -laktamy zaburzają rozwój ścian komórkowych bakterii przez integrację w enzymy trans peptydazy odpowiedzialne za tworzenie wiązań krzyżowych między niemi peptydoglikany. Enzymy te związane są z białkami wiążącymi penicylinę (PBP). Związki β -laktamowe stanowią analogi D-alanylo-D-alaniny, co ułatwia wiązanie z miejscem aktywnym PBP. Nieodwracalne hamowanie PBP

zapobiega ostatecznemu sieciowaniu (transpeptydacji) powstającej warstwy peptydoglikanu, zakłócając syntezę ściany komórkowej, powoduje utratę żywotności i lizę komórki bakteryjnej [6].

Każdy lek po wprowadzeniu do organizmu musi przejść kilka etapów aby uzyskać odpowiedni efekt farmakologiczny. Antybiotyki ulegają biotransformacji w wątrobie, nerkach, krwi oraz ścianach jelita cienkiego. Powstałe metabolity dzieli się na aktywne, nieaktywne, toksyczne lub te, które pod wpływem odpowiednich czynników fizycznych przekształcają się w związek pierwotny. W zależności od rodzaju wytwarzanego metabolitu, aktywność przeciwdrobnoustrojowa i toksyczność związku pierwotnego może wzrosnąć, co może skutkować pewnymi ograniczeniami w stosowaniu antybiotyków [7]. Analiza biotransformacji potencjalnych leków jest obowiązkowym etapem badań przedklinicznych. W tym celu możliwe jest zastosowanie kilku podejść, takich jak *in silico*, *in vitro*, *in vivo* oraz badań elektrochemicznych (Rys. 3.).



Rysunek 3. Wybrane metody badania metabolizmu antybiotyków β -laktamowych
Figure 3. Selected methods of β -lactam antibiotics metabolism research

2. PODEJŚCIE *IN SILICO* W BADANIU METABOLIZMU ANTYBIOTYKÓW BETA-LAKTAMOWYCH

Los podawanych antybiotyków β -laktamowych, a także wszystkich innych leków determinowany jest przez ich metabolizm w organizmie. Zależą one od trzech głównych faz metabolizmu. Pierwsza faza polega na wprowadzeniu grupy reaktywnej poprzez utlenianie, redukcję lub hydrolizę faza druga na koniugacji z różnymi ugrupowaniami natomiast faza trzecia na usuwaniu metabolitów z komórek wątroby i jelit. Najważniejsze izoenzymy fazy pierwszej należą do cytochromu P450 (CYP), ponieważ wytwarzają najwięcej metabolitów pierwszej generacji i mają wysoki udział metabolitów toksycznych i/lub reaktywnych[8]. Na etapie projektowania lub modyfikowania nowych antybiotyków β -laktamowych istotne jest posiadanie wiedzy o ewentualnych miejscach szczególnie podatnych na działanie enzymów metabolizujących.

Nowoczesne podejścia eksperymentalne pozwalają na szczegółowe wyjaśnienie absorpcji, dystrybucji, mechanizmu, wydalania i toksyczności, ale są kosztowne i czasochłonne, dlatego pożądane jest opracowanie skutecznych i niezawodnych metod *in silico* [9]. Na początku lat 60. opracowana została koncepcja ilościowej zależności struktura-aktywność (ang. *Quantitative structure-activity relationship*, QSAR), później szeroko stosowana w odkrywaniu leków. Koncepcja zakłada, że cząsteczki o podobnej strukturze potencjalnie wykazują podobną aktywność chemiczną i biologiczną. Podejście QSAR wykorzystuje eksperymentalne zbiory danych obejmujące aktywność biologiczną związków chemicznych; ich cechy chemiczne i fizyczne, jak również statystyczne metody korelacji tych cech z aktywnością biologiczną [10]. Modele QSAR, które przewidują przemianę metaboliczną związków endogennych lub egzogennych, są skonstruowane dla enzymów wątrobowych z rodziny CYP450 jako związków dostarczających cennych informacji do wirtualnego badania skuteczności leków na dużą skalę [11].

Obecnie stosuje się zaawansowane metody oparte na uczeniu maszynowym definiowanego jako metoda obliczeniowa ucząca się na podstawie zestawu danych testowych celem zbudowania modelu klasyfikowania nieznanymi danych. Szybki postęp w opracowywaniu nowych metod uczenia maszynowego pozwoliło na rozwój tysięcy modeli QSAR do dokładniejszego przewidywania metabolizmu leków [12]. Uczenie maszynowe lepiej nadaje się do wyodrębniania nieparametrycznych i nieliniowych relacji ze zbiorów danych, co umożliwia tworzenie modeli *in silico* o lepszej wydajności predykcyjnej [13]. Zastosowanie podejść do uczenia maszynowego we współczesnym odkrywaniu leków przyspieszyło proces skanowania i filtrowania nieskutecznych związków, osiągając

znaczną redukcję czasu i kosztów w porównaniu z eksperymentalnymi metodami przesiewowymi [14].

W dziedzinie komputerowego wspomaganie odkrywania leków uczenie maszynowe od niedawna stosuje się w celu przewidywania interakcji między ligandem a białkiem docelowym [15]. W ostatnich latach zwrócono uwagę na przewidywanie toksyczności leków z wykorzystaniem sieci neuronowych, które są jednymi z metod uczenia maszynowego [16]. Poznanie właściwości strukturalnych białka umożliwia zaprojektowanie skutecznych ligandów, a tym samym stwierdzenie czy dany lek będzie aktywny terapeutycznie, nieaktywny czy toksyczny. Najnowocześniejsze oparte na identyfikacji miejsca metabolizmu obejmują dokowanie obliczeniowe oraz dynamikę molekularną. Metody dokowania zostały skrupulatnie zastosowane do przewidywania *in silico* toksyczności antybiotyków β -laktamowych, co pozwala na identyfikację wiązania związku wiodącego z niekorzystnymi białkami oraz przewidywanie niepożądanych skutków ubocznych [17].

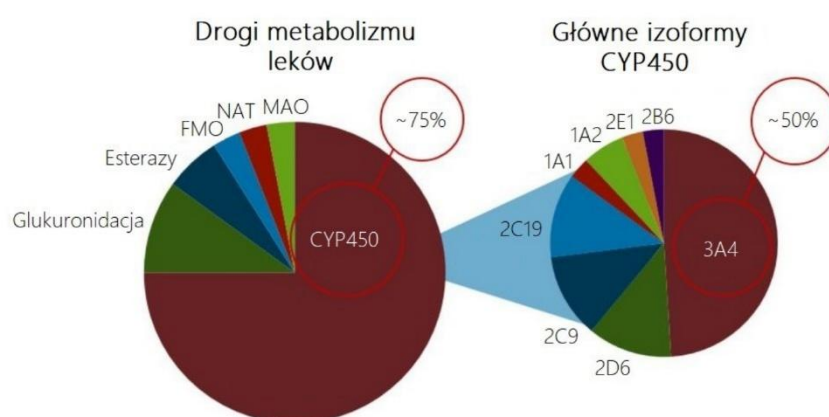
W oparciu o powstałe algorytmy zaprojektowano wiele programów komputerowych umożliwiających przewidywanie metabolizmu nowych cząsteczek o aktywności biologicznej. Jednym z takich programów jest stworzony przez firmę Molecular Discovery Ltd., MetaSite, bazujący na strukturze 2D substratu i 3D enzymu. Program obejmuje obliczenie dwóch zestawów deskryptorów, jednego dla enzymu CYP i jednego dla potencjalnego substratu, reprezentujących odpowiednio chemiczny odcisk palca enzymu i substratu [18]. Innym programem jest Meteor (Lhasa Ltd.), stanowiący bazę danych dotyczącą zależności pomiędzy strukturą danej cząsteczki, a kierunkiem jej biotransformacji (reakcje I i II fazy). Dzięki temu możliwe jest przewidzenie nie tylko powstających metabolitów, ale również określenia prawdopodobieństwa ich wystąpienia *in vivo* [19].

Poważnym problemem jest jednak niespójność dostępnych danych eksperymentalnych wykorzystywanych do budowy modeli *in silico*. Wynika to ze zmienności biologicznej i błędów technicznych, które mogą prowadzić do błędnych danych [20]. Metody *in silico* stanowią ogromną innowację w wysiłkach zmierzających do przewidywania losu leków, jednak konstrukcja wiarygodnych modeli predykcyjnych ciągle pozostaje wyzwaniem [21-22].

3. PODEJŚCIA *IN VITRO* W BADANIACH METABOLIZMU ANTYBIOTYKÓW BETA-LAKTAMOWYCH

Dla większości antybiotyków β -laktamowych główną drogą eliminacji jest biotransformacja przy udziale izoenzymów cytochromu P450. Ich działanie ma na celu przekształcenie docelowych związków w bardziej polarne. Tak zmodyfikowane leki mogą być również wykorzystane jako substraty w reakcjach

fazy II. Główne izoformy ludzkiego CYP biorące udział w metabolizmie leków to CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oraz CYP3A4, z których ta ostatnia jest odpowiedzialna za przemianę prawie 50% znanych związków biologicznie aktywnych. Do kluczowych enzymów fazy II zaliczyć można zależną od UDP (urydyno-5'-difosforan) glukuronozylotransferazę (UGT), sulfotransferazę fenolową (PST), sulfotransferazę estrogenów (EST) i S-transferazę glutationu (GST). Podobnie jak CYP, enzymy II fazy również istnieją w postaci wielu izoform (Rys. 4). Przebieg biotransformacji jest kluczowym wyznacznikiem ważnych właściwości leku, w tym stabilności metabolicznej, interakcji lek-lek oraz jego toksyczności [23-25].



Rysunek 4. Izoenzymy cytochromu P450 biorące udział w metabolizmie antybiotyków β -laktamowych
Figure 4. Cytochrome P450 isoenzymes involved in β -lactam antibiotics metabolism

Największym wyzwaniem w badaniach nad metabolizmem antybiotyków β -laktamowych u ludzi jest to, aby dokonać wiarygodnych ekstrapolacji z modelu *in vitro* lub *in vivo* w praktyce klinicznej. Dlatego też celem jest stworzenie warunków eksperymentalnych zapewniających uzyskanie produktów analogicznych do tych, które powstają naturalnie w ludzkim organizmie. W związku z tym opracowano kilka modeli *in vitro* m.in. supersomy ludzkiego CYP i UGT, mikrosomy ludzkiej wątroby, frakcję cytozolową i S9 ludzkiej wątroby, linie komórkowe wątroby, transgeniczne linie komórkowe, hepatocyty, skrawki wątroby oraz izolowaną perfundowaną wątrobę. Dominującym czynnikiem wpływającym na wyniki badań *in vitro* jest jakość pobranego materiału. Optymalny system modelowy zależy od wielu czynników. Zalicza się do nich m.in. podobieństwo *in vivo*, koszt, dostępność oraz względy etyczne [23-25].

4. INKUBACJA ANTYBIOTYKÓW BETA-LAKTAMOWYCH Z ENZYMAMI WĄTROBOWYMI FRAKCJI MIKROSOMALNEJ

Ponad 90% reakcji oksydacyjnych fazy I metabolizmu jest katalizowanych przez monooksygenazy obecne w wątrobie z tego też względu w badaniach metabolicznych jako narzędzie *in vitro* powszechnie stosowane są mikrosomy ludzkiej bądź zwierzęcej wątroby. Takie podejście sprawia, że enzymy działają w swoim naturalnym środowisku, umożliwiając tym samym powstawanie pełnego zakresu produktów metabolicznych. Roztwór enzymów frakcji mikrosomalnej otrzymuje się poprzez homogenizację wątroby, a następnie wirowanie homogenatu przy $9.000-10.000 \times g$ w celu uzyskania frakcji supernatantu (znanej jako S9 lub S10). Dalsze wirowanie uzyskanej frakcji przy $100.000 \times g$ prowadzi do powstania osadu mikrosomalnego zawierającego enzymy odpowiedzialne za reakcje fazy I, w tym monooksygenazy cytochromu P450 [23-25].

Największymi zaletami mikrosomów są przede wszystkim niskie koszty, prostota użycia oraz fakt, że jest to najlepiej scharakteryzowany system *in vitro* wykorzystywany do badań biotransformacji antybiotyków β -laktamowych. Poza nimi istnieją jednak pewne wady. Po pierwsze, wyników uzyskanych dla mikrosomów ludzkiej wątroby nie można wykorzystać do ilościowej oceny metabolizmu człowieka *in vivo*, ponieważ CYP i UGT nie konkurują z innymi enzymami, co ma miejsce w naturalnych warunkach. Skutkuje to szybszą biotransformacją leku w porównaniu nie tylko z sytuacją *in vivo* u ludzi, ale także z hepatocytami i skrawkami wątroby. Ponadto brak innych enzymów (np. NAT, GST, ST) i ko czynników cytozolowych może doprowadzić do pominięcia metabolitów powstałych w nienaruszonych komórkach wątroby [23-25].

Do oznaczania i identyfikacji substratów powstających w wyniku reakcji enzymatycznych powszechnie stosowana jest chromatografia cieczowa połączeniu z różnymi systemami detekcji.

5. ZASTOSOWANIE REAKTORA ELEKTROCHEMICZNEGO I SPEKTROMETRII MAS

W celu zbadania metabolizmu antybiotyków β -laktamowych przed zastosowaniem ich u ludzi istnieje szereg możliwości, od badań *in vitro* po ocenę *in vivo* na zwierzętach doświadczalnych. Modele zwierzęce dostarczają informacji o metabolitach, które mogą się tworzyć w wyniku biotransformacji związków w organizmie ludzkim. Z drugiej strony próbki biologiczne stanowią na tyle złożoną matrycę, że chcąc wykorzystać wcześniej wspomniane metody *in vitro*, pojawiają się pewne ograniczenia w izolowaniu powstałych produktów metabolizmu. Jedno z najbardziej postępowych narzędzi analitycznych do badania

metabolizmu antybiotyków β -laktamowych stanowi obecnie połączenie elektrochemii oraz spektrometrii mas (EC-MS). Jest to czysto instrumentalna metoda symulacji metabolizmu oksydacyjnego. Początkowo metoda ta wykorzystywana była do badania reakcji redoks różnych biocząsteczek. Rozszerzenie systemu EC-MS o możliwość rozdzielania przy zastosowaniu chromatografii cieczowej sprawiło, że został on z powodzeniem zastosowany do symulacji metabolizmu wielu związków biologicznie aktywnych, w tym antybiotyków β -laktamowych [24,25]. Podczas metabolizmu *in vivo* bezpośrednio po reakcjach fazy I następuje tworzenie koniugatów w fazie II. Możliwe jest elektrochemiczne naśladowanie obu etapów w pojedynczym eksperymencie, co zostało już zbadane na przykładzie sprzęgania leków kardiologicznych i immunosupresyjnych [26-28].

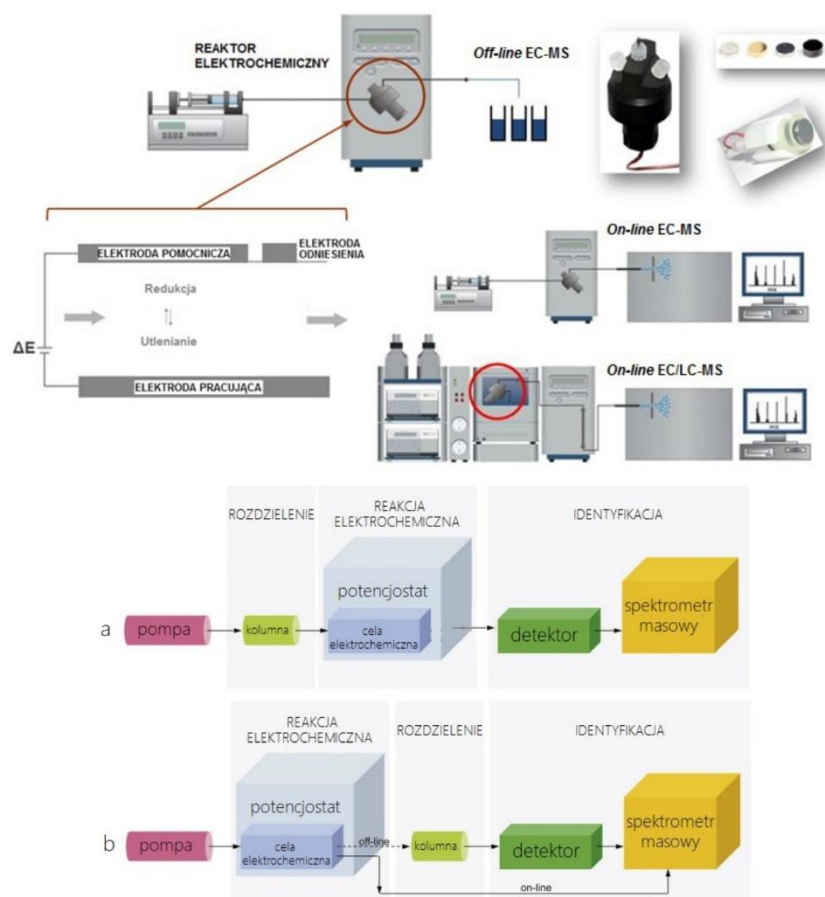
Sprzężenie EC-MS z chromatografią cieczową może odbywać się na dwa sposoby. Pierwszy z nich zakłada, że badanie elektrochemicznej konwersji dowolnej pojedynczej substancji ze złożonej mieszaniny wymaga jej rozdzielania. W tym celu wykorzystuje się procedurę obejmującą rozdzielanie poszczególnych składników metodą chromatografii cieczowej jako etap początkowy, a następnie elektrochemiczną obróbkę oraz wykrywanie za pomocą spektrometrii mas (Rys. 2.a). W ten sposób jednorazowo wykrywane są tylko produkty reakcji jednego związku. W drugim natomiast czysty materiał wyjściowy jest najpierw utleniany elektrochemicznie. Aby rozróżnić różne formy izomeryczne metabolitów oraz ocenić ich polarność, produkty rozdzielane są metodą chromatografii cieczowej, a następnie wykrywane spektrometrią mas (Rys. 2.b).

Utlennianie związków przeprowadza się w cienkowarstwowej celi elektrochemicznej wyposażonej w trzy elektrody: pracującą (WE), pomocniczą (AUX) oraz odniesienia (REF). Potencjał elektrochemiczny wytwarzany jest za pomocą potencjostatu. Aby dokonać obserwacji otrzymanych produktów utlenienia celę elektrochemiczną łączy się bezpośrednio ze źródłem jonów spektrometru mas. W wyniku liniowego zwiększania potencjału elektrody pracującej otrzymuje się woltamperogramy masowe przedstawiające zmieniającą się intensywność sygnałów leku i jego produktów elektrochemicznych w zależności od przyłożonego napięcia.

Obserwowane procesy obejmują to m.in. reakcje N-dealkilacji, S- i P-utleniania, utleniania alkoholu i dehydrogenacji. Reakcje zapoczątkowane poprzez przeniesienie atomu wodoru nie mogą być imitowane przez bezpośrednie utlenianie elektrochemiczne, np. O-dealkilacja czy alifatyczna hydroksylacja niepodstawionych pierścieni aromatycznych, co wynika ze zbyt wysokiego potencjału utleniającego niezbędnego do inicjacji procesu. Ponadto należy zauważyć, że reakcje katalizowane enzymatycznie są regioselektywne, podczas gdy

utlenianie elektrochemiczne jest chemoselektywne i daje produkty powstające z miejsc najbardziej labilnych [26-28].

Naśladowanie mechanizmu działania CYP450 za pomocą EC-MS pozwala na szybszą i znacznie łatwiejszą analizę metabolitów, a co za tym idzie, może być prowadzona na szerszą skalę. Powstające produkty charakteryzują się wysoką czystością i jest ich na tyle dużo, że mogą zostać wykorzystane jako wzorce w kolejnych badaniach. Liczne prace pozwoliły na porównanie reakcji elektrochemicznych szeregu związków biologicznie aktywnych (z różnymi grupami funkcyjnymi) z reakcjami obserwowanymi w mikrosomach wątroby. Metabolity powstające dzięki EC-MS pokazują, że istnieje duże podobieństwo pomiędzy reakcjami przeprowadzanymi przez CYP450 a reakcjami elektrochemicznymi zachodzącymi w odpowiednich warunkach eksperymentalnych.



Rysunek 5. Schemat konfiguracji LC/EC/MS (a) oraz EC/LC/MS (b)

Figure 5. Scheme of LC/EC/MS (a) and EC/LC/MS (b) setup

6. METODY ANALITYCZNE W OZNACZENIU I IDENTYFIKACJI ANTYBIOTYKÓW BETA-LAKTAMOWYCH W PRÓBKACH BIOLOGICZNYCH

Techniki analityczne stosowane do wielowymiarowej analizy metabolitów antybiotyków β -laktamowych, w układach biologicznych muszą cechować się wysoką dokładnością, specyficznością i selektywnością w celu monitorowania wielu znanych i nieznanymi cząsteczek o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych i masach cząsteczkowych. Jak dotąd, nie wybrano jednej dokładnej metody analitycznej, która pozwoliłaby na identyfikację wszystkich obecnych metabolitów. Spośród metod analitycznych wykorzystywanych w metabolomice powszechnie stosuje się technikę magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *Nuclear magnetic resonance*), spektroskopii Ramana oraz spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR, ang. *Fourier transform infrared spectroscopy*) w połączeniu z technikami chromatograficznymi i elektromigracyjnymi. Spektrometria mas jest obecnie najważniejszą metodą identyfikacji substancji wykorzystywaną w metabolomice. Zalety tej techniki to przede wszystkim bardzo wysoka czułość oraz niewielka ilość próbki (μ l) potrzebna do analizy. Należy jednak pamiętać, że wybór źródła jonów, analizatora mas, trybu akwizycji i parametrów instrumentalnych dla danej analizy zależą od właściwości fizykochemicznych badanych analitów oraz celów eksperymentalnych (jakościowych lub ilościowych). Najczęściej stosowanym połączeniem jest sprzężenie spektrometrii mas i technik chromatograficznych (chromatografia ciekłowa, gazowa), o czym świadczą liczne publikacje naukowe. Techniki te charakteryzuje wysoka czułość i selektywność względem badanych analitów [29,30]. Obie te techniki są urozmaicone poprzez zastosowanie różnych źródeł jonów, analizatorów mas, trybu akwizycji i parametrów instrumentalnych.

Metoda LC-MS zajmuje się oznaczaniem polarnych i niepolarnych związków. Istnieje wiele technik chromatografii ciekłowej, lecz obecnie w połączeniach ze spektrometrami mas zastosowanie znajdują dwie techniki chromatograficzne: wysokosprawna (HPLC) i ultrawysokosprawna (UHPLC) chromatografia ciekłowa. UHPLC to lepsza i bardziej zaawansowana technika chromatografii ciekłowej niż HPLC. Poprzez zastosowanie bardzo małych rozmiarów ziaren w kolumnie ($1,7 \mu$ m) oraz wysokiego ciśnienia (60 MPa) można uzyskać większą sprawność kolumny, większą czułość, skrócenie czasu analizy oraz mniejsze zużycie odczynników. Mimo różnic obie te techniki są szeroko wykorzystywane w badaniu metabolitów antybiotyków β -laktamowych. Najczęściej stosowaną fazą stacjonarną do tego typu badań jest kolumna z fazą odwróconą (RP, ang. *Reverse phase*), w której do żelu krzemionkowego przyłączone są łańcuchy alkilowe C8 lub C18. Przy rozdzielaniu bardzo polarnych związków stosuje się kolumny z wypełnieniem

hydrofilowym (HILIC, ang. *Hydrophilic interaction chromatography*) oraz kolumny chromatograficzne wypełnione niemodyfikowanym żelem krzemionkowym (NP, ang. *Normal phase*) [31,32]. Faza ruchoma powinna zawierać lotne rozpuszczalniki, które nie będą się osadzać we wnętrzu spektrometru mas. W tym celu stosuje się lotne dodatki, takie jak kwas mrówkowy lub octowy (0,1%), albo ich sole – octan amonu/mrówczan amonu (2–10 mmol/l). Do najpopularniejszych technik stosowanych do wykrywania i identyfikacji metabolitów antybiotyków β -laktamowych należą: jonizacja typu elektrorozpylanie (ESI, ang. *Electrospray ionization*), jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI, ang. *Atmospheric pressure chemical ionization*) i jonizacja laserowa wspomagana matrycą pod ciśnieniem atmosferycznym (API-MALDI, ang. *Atmospheric pressure ionization-matrix assisted laser desorption/ionization*). W technice tej można wykorzystywać różne analizatory mas, takie jak analizator czasu przelotu (TOF), wysokorozdzielczy analizator mas typu Orbitrap oraz pułapkę jonów (IT, ang. *Ion trap*), lecz coraz częściej zastosowanie znajdują układy analizatorów w tandemowych spektrometrach mas (MS/MS), gdzie występują dwa analizatory i komora zderzeń. Do najpopularniejszych układów MS/MS należą: potrójny kwadrupol (QQQ) i analizator czasu przelotu w połączeniu z kwadrupolem (Q-TOF) (Tab. 1).

Techniką ściśle związaną z chromatografią jest również elektroforeza kapilarna (CE, ang. *Capillary electrophoresis*). To stosunkowo nowa technika stosowana do oznaczania i identyfikacji różnych leków, w tym antybiotyków β -laktamowych. W zależności od mechanizmu separacji wyróżnić można elektroforezę stref kapilarnych (CZE, ang. *Capillary zone electrophoresis*), micelną elektrokinetyczną chromatografię kapilarną (MEKC, ang. *Micellar electrokinetic chromatography*), elektroforezę kapilarną w układzie niewodnym (NACE, ang. *Non-aqueous capillary electrophoresis*) oraz izotachoforezę kapilarną (CITP, ang. *Capillary isotachopheresis*). Istotną zaletą CE jest jej dostępność i prostota wyposażenia, a także zastosowanie niewielkich stężeń rozpuszczalników organicznych w buforze oraz przede wszystkim krótki czas trwania analizy i wysoka skuteczność separacji analitów, w tym antybiotyków β -laktamowych.

Większość proponowanych metod elektroforetycznego rozdzielania antybiotyków β -laktamowych w różnych matrycach opiera się na wykorzystaniu różnych sposobów detekcji, w tym spektrofotometrii (UV) w połączeniu z matrycą diodową (DAD, ang. *Diode array detection*), fluorescencji (FD, ang. *Fluorescence detection*), detekcji elektrochemicznej (ECD, ang. *Electrochemical detection*) oraz fluorescencji wzbudzonej laserem (LIF, ang. *Laser induced fluorescence*). Ponadto ostatnio stosowane są również inne, bardziej nowatorskie metody detekcji, takie jak bezkontaktowe wykrywanie przewodności (C^4D , ang. *Capacitively coupled*

contactless conductivity detection) czy wykrywanie potencjalnego gradientu (PGD, ang. *Procedure design gradient*).

Tabela 1. Porównanie parametrów różnych analizatorów mas stosowanych w identyfikacji antybiotyków β -laktamowych

Table 1. Comparison of parameters of various mass analyzers applied for identification of β -lactam antibiotics

Parametr	Kwadrupol (Q)	Pułapka jonowa (IT)	Analizator czasu przelotu (TOF)	Orbitrap
Szybkość zbierania danych [Hz]	2–10	2–10	10–100	1–18
Dokładność pomiaru masy [ppm]	Niska	Niska	1–10	1–5
Zakres pomiaru masy, m/z	< 3000	< 6000	< 100 000 bez ograniczeń	< 6000
Rozdzielczość	Jednostka	Jednostka	< 50 000	< 500 000
Zalety	Łatwa aplikacja różnych źródeł jonizacji Szeroki zakres dynamiczny	Łatwa aplikacja różnych źródeł jonizacji Szeroki zakres dynamiczny MS ^a	Duża szybkość skanowania Szeroki zakres mas Duża dokładność pomiaru masy	Duża dokładność pomiaru masy Możliwość analizy w dwóch polaryzacjach jednocześnie
Wady	Niska rozdzielczość Mała dokładność pomiaru masy Wąski zakres mas Mała szybkość skanowania MS/MS wymaga kilku analizatorów	Niska rozdzielczość Mała dokładność pomiaru masy Wąski zakres mas Mała szybkość skanowania	Węższy zakres dynamiczny w porównaniu z Q	Mniejsza szybkość skanowania w porównaniu z Q-TOF Węższy zakres dynamiczny w porównaniu z Q

MS – spektrometria mas, m/z – stosunek masy do ładunku elektrycznego,^a – wielokrotna fragmentacja

UWAGI KOŃCOWE

Związki biologicznie aktywne, w tym antybiotyki β -laktamowe, występują w próbkach biologicznych na stosunkowo niskich poziomach stężeń. Istotnym etapem w analizie leków dla potrzeb metabolomicznych jest wybór metody przygotowania próbki. Badania te wymagają również aplikacji odpowiedniej techniki analitycznej dla oznaczenia endogennych metabolitów obecnych w matrycy biologicznej. Poszukiwanie alternatywnych metod badania biotransformacji antybiotyków β -laktamowych jest bardzo pożądane, ze względu na możliwość zmniejszenia liczby zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych w badanych biomedycznych.

PODZIĘKOWANIE

Praca została sfinansowana z GRANTU MŁODYCH dla uczestników studiów doktoranckich z zakresu chemii oraz szkoły doktorskiej nauk ścisłych i przyrodniczych (PDB/granty wydziałowe, 2021, D. Janiszewska).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K.B. Holten, E.M. Onusko, *Am FamPhysican*, 2000, **62**, 611.
- [2] J.F. Martín, R.V. Ullán, *MicrobBiotechnol*, 2010, **3**, 285.
- [3] K.M. Percival, *J InfusNurs*, 2017, **40**, 55.
- [4] G.G. Zhanel, R. Wiebe, L. Dilay, K. Thomson, E. Rubinstein, D.J. Hoban, A.M. Noreddin, J.A. Karlowsky, *Drugs*, 2007, **67**, 1027.
- [5] S.B. Singh, K. Young, L.L. Silver, *BiochemPharmacol*, 2017, **133**, 63.
- [6] P.B. Eckburg, T. Lister, S. Walpole, T. Keutzer, L. Utley, J. Tomayko, E. Kopp, N. Farinola, S. Coleman, *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, **3**, e00892.
- [7] K. Pauter, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, *Molecules*, 2020, **25**, 2556.
- [8] B. Testa, A. Pedretti, G. Vistoli, *Drug Discov Today*, 2012, **17**, 549.
- [9] J. Kirchmair, A.H. Göller, D. Lang, J. Kunze, B. Testa, I.D. Wilson, R.C. Glen, G. Schneider, *Nat Rev Drug Discov*, 2015, **14**, 387.
- [10] K. Roy, S. Kar, R.N. Das, *Chemical Information and Descriptors, Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment*, Academic Press, Boston, 2015.
- [11] M.P. Gleeson, A.M. Davis, K.K. Chohan, S.W. Paine, S. Boyer, C.L. Gavaghan, C.H. Arby, C. Kankkonen, N. Albertson, *J Comput Aided Mol Des*, 2007, **21**, 559.
- [12] M.I. Jordan, T.M. Mitchell, *Science*, 2015, **349**, 255.
- [13] J.B.O. Mitchell, *Wiley Interdiscip Rev Comput. Mol. Sci*, 2014, **4**, 468.
- [14] N. Fleming, *Nature*, 2018, **557**, 55.
- [15] Y.-C. Lo, S.E. Rensi, W. Torng, R.B. Altman, *Drug Discov Today*, 2018, **23**, 1538.
- [16] S. Ekins, *Pharm Res*, 2016, **33**, 2594.
- [17] Z. Yao, Z. Lin, T. Wang, D. Tian, X. Zou, Y. Gao, D. Yin, *Chemosphere*, 2013, **92**, 1169.
- [18] G. Cruciani, E. Carosati, B. De Boeck, K. Ethirajulu, C. Mackie, T. Howe, R. Vianello, *J Med Chem*, 2005, **48**, 6970.
- [19] C.A. Marchant, K.A. Briggs, A. Long, *ToxicolMech Methods*, 2008, **18**, 177.
- [20] A.B. Raies, V.B. Bajic, *Wiley Interdiscip Rev ComputMolSci*, 2016, **6**, 147.
- [21] M.T.D. Cronin, J.C. Madden, *In Silico Toxicology Principles and Applications*, RSC Publishing, Liverpool, 2010.
- [22] S.R. Kazmi, R. Jun, M.-S. Yu, Ch.Jung, D. Na, *ComputBiol Med*, 2019, **106**, 54.
- [23] F.A. Esther, C. D. Raap, I. Meijerman, J. H. Beijnen, J. H.M. Schellens, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003, **189**, 233.
- [24] M. Szultka, R. Krzeminski, M. Jackowski, B. Buszewski, *Chromatogr.*, 2014, **77**, 1027.
- [25] M. Szultka-Mlynska, B. Buszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2019, **176**, 112799.
- [26] U. Karst, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 2476.
- [27] M. Szultka-Mlynska, B. Buszewski, *Talanta*, 2016, **160**, 694.
- [28] M. Szultka-Mlynska, D. Janiszewska, B. Buszewski, *Materials*, 2021, **14**, 1.
- [29] W.M. Mullet, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2007, **70**, 263.
- [30] M. Szultka-Mlynska, P. Pomastowski, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B*, 2018, **1086**, 153.
- [31] S. Noga, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2021, **402**, 231.

- [32] B. Buszewski, M. Szultka-Mlynska, Crit. Rev. Anal. Chem., 2012, **42**, 198.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 listopada 2021 r.

PUBLIKACJA [P5]

**Molecularly imprinted polymers as solid phase microextraction fibers
for the isolation of selected antibiotics from human plasma**

M. Szultka-Młyńska, **D. Janiszewska**, B. Buszewski

Materials (2021) 14: 1-24. IF₂₀₂₁ = 3.748 PM = 140

doi: 10.3390/ma14174886

Article

Molecularly Imprinted Polymers as Solid-Phase Microextraction Fibers for the Isolation of Selected Antibiotics from Human Plasma

Małgorzata Szultka-Młyńska ^{1,*} , Daria Janiszewska ¹ and Bogusław Buszewski ^{1,2}

¹ Department of Environmental Chemistry and Bioanalytics, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University, Gagarin 7, 87-100 Toruń, Poland; janiszewska_daria@doktorant.umk.pl (D.J.); bbusz@umk.pl (B.B.)

² Centre for Modern Interdisciplinary Technologies, Nicolaus Copernicus University, Wilenska 4, 87-100 Toruń, Poland

* Correspondence: mszultka@umk.pl



Citation: Szultka-Młyńska, M.; Janiszewska, D.; Buszewski, B. Molecularly Imprinted Polymers as Solid-Phase Microextraction Fibers for the Isolation of Selected Antibiotics from Human Plasma. *Materials* **2021**, *14*, 4886. <https://doi.org/10.3390/ma14174886>

Academic Editor:
Władysław W. Kubiak

Received: 16 July 2021
Accepted: 23 August 2021
Published: 27 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The aim of this study was to examine the synthesis of novel molecularly imprinted polymer (MIP)-coated polythiophene and poly(3-methylthiophene) solid-phase microextraction fibers using the direct electropolymerization method. Synthesized SPME fibers were characterized with the use of various physicochemical instrumental techniques. MIP-SPME coatings were successfully applied to carry out the selective extraction of selected antibiotic drugs (amoxicillin, cefotaxime, metronidazole) and their metabolites (amoxycilloic acid, amoxicillin diketopiperazine, desacetyl cefotaxime, 3-desacetyl cefotaxime lactone, hydroxymetronidazole). Solid-phase microextraction parameters for the simultaneous determination and identification of target compounds were optimized using the central composite design (CCD), and they accounted for 5–15 min for desorption time, 3–10 for the pH of the desorption solvent, and 30–100 µL for the volume of the desorption solvent. High-performance liquid chromatography and mass spectrometry (MS) detectors such as quadrupole time-of-flight (Q-TOF MS) and triple quadrupole (QQ MS) were applied to determine and to identify selected antibiotic drugs and their metabolites. The MIP-coated SPME are suitable for the selective extraction of target compounds in biological samples from patients in intensive care units.

Keywords: antibiotics; electropolymerization; human plasma; mass spectrometry; polythiophene; poly (3-methylthiophene); solid-phase microextraction

1. Introduction

The miniaturization of analytical techniques observed in recent years is the result of the use of the most advanced technologies. It is connected with the necessity to develop more and more sensitive and precise analytical methods [1,2]. Modern medicine has a large variety of drugs used to combat various diseases caused by bacteria. Moreover, the rapidly growing number of microbial strains resistant to particular chemotherapeutic agents forces us to conduct further research [3]. The huge diversity of samples due to the composition and aggregate state of the matrix requires the use of many techniques of the sample preparation to extract the tested compounds and to purify them prior to the determination and identification step. An important stage in the preparation of the sample for the final analysis is its isolation and/or enrichment, which consists in transferring the analytes from the primary matrix to the secondary matrix with the simultaneous removal of interfering substances (isolation) and increasing the concentration of the analytes to a level above the quantification limit of the analytical methodology (enrichment) [1,4,5]. The application of extraction techniques such as the liquid–liquid extraction (LLE), the solid-phase extraction (SPE), and the super fluid extraction (SFE) allows us to separate the analyte from the matrix, to eliminate or reduce interferences from other components,

and to enrich the analyte to a level that allows for the appropriate determination. It is advantageous for the process to take place in one step. In the era of “green chemistry”, it is more and more difficult to justify the use of analytical methods with the use of large amounts of toxic solvents at any stage of the sample preparation. Hence, solvent-free methods are preferred [1–5].

One of the newest techniques applied to isolate organic compounds is the solid-phase microextraction (SPME) due to the short extraction time, the fact that no solvents are needed, and the simplicity of the analysis [6]. The SPME technique is based on the adsorption of compounds on the absorbent layer covering the fiber and introducing them directly into the sample. The SPME is applied in case of various biological matrices, such as whole blood, plasma, urine, breath gas, food, and natural products [6–8]. The technique represents an analytical tool for the development of simple and selective medical diagnostics from samples *in vitro*, *ex vivo* or *in vivo* [9–11]. Most applied SPME coatings are commercially available. However, in the recent years, studies have been focused on the development of fibers with coatings on metal support [12–14]. Among these, electroconductive polymers including polypyrrole, polythiophene and poly(3-methylthiophene) are identified as promising candidates for the selective extraction of drugs in bioanalytical applications [15–20]. However, depending on the chemical nature of the isolated compounds, fibers with different sorption properties are used. The type of microextractive fiber coating and its thickness are selected on the basis of the polarity of the extracted analytes and the size of their particles. The type of stationary phase that the SPME fiber is covered with determines the sensitivity and selectivity of the method. Imprinted polymers, mostly molecularly imprinted polymers, are increasingly used as selective sorbents [21–23].

The purpose of this study was to prepare new MIP-coated SPME fibers by the electrochemical polymerization approach with relevant compounds as templates. For this reason, we performed deeper physico-chemical characteristics of the obtained materials with the use of different instrumental techniques. It should be mentioned that there are no available papers to study the recognition mechanisms of amoxicillin, cefotaxime and metronidazole as templates for extraction with the use of MIP-coated SPME fibers from real samples from patients. Moreover, in this contribution, we described with the use of the SPME-LC-MS/MS approach the determination and identification of the three antibiotic drugs in the human plasma samples from patients in the intensive care unit.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

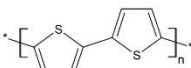
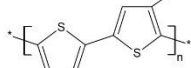
All reagents and organic solvents were of analytical grade. Thiophene (99%) and 3-methylthiophene (98%) were purchased from Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany). Amoxicillin (AMOX), cefotaxime (CEF), and metronidazole (MET), as well as their metabolites amoxycilloic acid (AMA), amoxicillin diketopiperazine (AMD), desacetyl cefotaxime (CEF-dAce), 3-desacetyl cefotaxime lactone (CEF-dAceLac), and hydroxymetronidazole (MET-OH), were supplied by Novartis Pharma GmbH (Nuremberg, Germany). Water was purified with a Milli-Q Purification System (Millipore, Bedford, MA, USA). Real samples from patients (human plasma) were kindly provided by Nicolaus Copernicus University, Collegium Medicum (Torun, Poland), with the Bioethical Commission's permission (no. 585/2017).

2.2. MIP-SPME Coating Preparation

MIP-SPME fibers were synthesized with the use of the electrochemical polymerization (Table 1). The preparation procedure was based on the home-made set-up system coupled with the potentiostat-galvanostat. In polymerization, 0.4 M thiophene (with CEF or MET), or 0.1 M 3-methylthiophene (with AMOX) solutions in 0.1 M tetrabutylammonium tetrafluoroborate ($C_4H_9)_4N(BF_4)$ in ACN were used, respectively. Dynamic voltamperometry in the meaning of the Linear Sweep Voltammetry (LSV), with threshold potentials from -0.2 to $+2.5$ V for PTh and from -0.2 to $+3.0$ V for PMeTh, was applied. The electropolymerization was performed with a scan rate on 50 mV/s and 7 scans. Stainless steel (SS),

Ni-Cr, used as a working electrode was conditioned with a mixture of acetonitrile and water (80:20, *v/v*) to remove the contamination and then dried at ambient temperature before each research investigation. Additionally, SS wires were cyclic-potential-scanned within the potential range -0.2 – $+1$ V in 0.1 M $(C_4H_9)_4N(BF_4)$ solution regarding the redox peak obtained. Afterwards, the imprinted polymers were conditioned with respect to removing the template in 0.2 M Na_2HPO_4 (in EtOH) in case of AMOX, or in 0.05 M NaOH (in MeOH) in case of CEF and MET applying potential cycling in a range from 0 to $+1.2$ V. Control SPME coatings were synthesized under the same electropolymerization conditions but without adding the antibiotic drugs to the reagent solution.

Table 1. Parameters of the electrochemical synthesis of polythiophene and poly(3-methylthiophene) coatings.

Parameter	Monomer	
	Thiophene	3-methylthiophene
Potential range [V vs. Ag/Ag^+]	$-0.2 \div 2.5$	$-0.2 \div 3.0$
Polymerization rate [mV/s]	50	50
System balancing time [s]	0	0
Number of repetitions (scans)	7	3
Monomer concentration [mol/dm ³]	0.40	0.10
Base electrolyte concentration [mol/L]	0.1	0.1
The length of the fiber coverage [mm]	15.0	15.0
Thickness of the fiber coverage [μ m]	285–295	110–160
Organic carbon content [%]	45.9	57.2
Concentration of the functional monomer [mol/L]	2.5/PThCEF/ 3.0/PThMET/	1.5/PMeThAMOX/
Template concentration [μ g/mL]	0.4/CEF/ 0.35/MET/	0.1/AMOX/
Medium used for electrodesorption	0.05 M NaOH/MeOH /PThCEF, PThCEF/	0.2 M Na_2HPO_4 /EtOH/PMeThAMOX/
Potential range, MIP [V vs. Ag/Ag^+]	0–1.2	0–1.2
Polymer (product)		

2.3. Apparatus and HPLC-MS Analysis Conditions

The determination and identification of selected antibiotics and their metabolites were carried out using an HPLC Agilent 1290 Series system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an ESI interface, a 6540 UHD accurate mass Q-TOF detector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) and Mass Hunter software (B.04.01, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) for instrumental control and data collection. The chromatographic XDB-C18 1.8μ m 4.6×50 mm column (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was maintained at 30 ± 0.5 °C. The mobile phase was composed of 0.1% HCOOH with acetonitrile (25:75, *v/v*) dosed at a flow rate of 0.4 mL/min, while the injected sample volume was 1 μ L. Moreover, quadrupole time-of-flight mass spectrometric measurements (LC-MS/MS Shimadzu (Kyoto, Japan)) were performed using electrospray ion source operating in positive ion mode (ESI(+)), with the following set of operation parameters: capillary voltage (CV), 3.5 kV; octopole voltage (OV), 800 V; skimmer voltage (SV), 50 V; drying gas temperature (DGT), 295 °C; shielding gas temperature (SGT), 315 °C; fragmentor voltage (FV), 195 V.

The liquid chromatograph was equipped with two LC-30AD pumps, the SIL-30AC autosampler and the CTO-20AC thermostat (Kyoto, Japan). The electrospray ionization (ESI) was applied in the positive ion mode, due to the positive charge located in the chemical structure of target compounds. Full-scan mass spectra (MS) were recorded within the mass range of m/z 150–500 followed by precursor ions (MS/MS) for m/z 100–450 (Table 2). The following operation parameters of MS/MS were applied: the gas flow rate was 6 L/min; the nebulizer gas pressure was 40 psi; the capillary voltage was 3500 V; the fragmentor voltage was 135 V; the drying gas temperature was set at 290 °C.

Table 2. Mass spectrometry parameters applied for the determination and identification of relevant antibiotics and their metabolites in human plasma.

Compound	Molecular ion, m/z	$Q1$, m/z	$Q3$, m/z	CE (eV); for $Q1$, $Q3$	DGT (°C)	F	CV (V)
AMOX β -lactams	366	114	349	22, 36	320	150	3500
AMA metabolite	384	189	323	27, 24	320	150	4000
AMD metabolite	366	134	337	29, 35	320	150	4000
CEF β -lactams	456	396	342	29, 30	290	110	4500
CEF-DAC LAC metabolite	396	336	282	31, 28	290	110	4500
MET nitroimidazoles	172	128	-	25	320	150	3500
MET-OH metabolite	188	126	144	29, 31	320	150	3500

$Q1$ —Quantifier ion; $Q3$ —Qualifier ion; CE—Collision energy; DGT—Drying gas temperature; F—Fragmentor; CV—Capillary voltage.

The obtained results were collected with the use of the following programs: Agilent Mass Hunter software version B.04.01 and LabSolution version 5.8. Moreover, they were further processed using Microsoft Excel. The instrument operated in the extracted ion chromatogram (EIC) and product ion modes, respectively.

2.4. SPME—Optimization of Extraction Parameters

The optimization of the extraction with the use of the MIP-SPME of target compounds was performed with the use of the central composite design (CCD). Three independent variables of extraction on three levels were optimized using the response surface methodology (RSM). The optimized parameters were the desorption time (5–15 min), the pH of the desorption solvent (3–10), and the volume of the desorption solvent (30–100 μ L). An optimization study for the three parameters was performed with the use of Statistica 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). The whole CCD design consists of 15 factorial points.

2.5. Characterization of MIP-SPME Coatings

2.5.1. Cyclic Voltammetry (CV)

During the electropolymerization, a home-made set-up system combined with a high-performance potentiostat/galvanostat Autolab PGSTAT128N model (Utrecht, The Netherlands) equipped with Gpes software for voltammetric measurements were applied for the synthesis.

2.5.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

A micrograph of the SPME coating regarding the morphological evaluation was obtained through scanning with the electron microscope (SEM), LEO 1430VP (LEO Electron

Microscopy, London, England) from Carl Zeiss SMT (Oberkochen, Germany). It was used for SEM imaging of SPME sorption polymer fibers deposited on a solid Ni-Cr support. Moreover, the mechanical and chemical stability was set up with the Optical Stereomicroscope model SZX16 (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a CCD camera (Olympus, Tokyo, Japan) and the CELL software (V1.1.6, Olympus, Tokyo, Japan).

2.5.3. Infrared Spectroscopy (FTIR)

The Spectrum 2000 spectrometer from Perkin Elmer (Waltham, Winter St, MA, USA) was used for the analyses. The spectra were made having pressed the sample with potassium bromide (KBr pelleting technique).

2.5.4. Small Angle X-ray Scattering (SAXS)

An SAXS low-angle powder diffractometer (Nanostar, Bruker AXS, Karlsruhe, Germany) with a copper lamp was used for the analyses. The camera was equipped with a HiSTAR proportional multi-wire detector with a resolution of 1024×1024 . The optics of the device (focusing and monochromatization) was in the form of crossed Goebel mirrors. The room temperature was measured. The measurement time was 10,000 s, while the distance sample–detector was 650 mm.

2.5.5. Transmission Electron Microscopy (TEM)

A transmission electron microscope manufactured by FEI Europe (Hillsboro, OR, USA), the Tecnai F20 X-Twin model, was used for the analysis.

2.5.6. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

As for the polymer samples, it was necessary to dissolve them with a deuterated solvent. Each sample was suspended in 1 mL of CDCl_3 and placed in an ultrasonic bath. The polymer fibers were shredded under the influence of ultrasound (30 min). The samples were then re-centrifuged for 10 min at 4°C at 12,000 rpm, and 550 μL was transferred to a 5 mm NMR cuvette. NMR measurements were made using the AVANCE II spectrometer by BrukerDaltonik GmbH (Bremen, Germany), with the operating frequency of 600.58 MHz. A 90-degree pulse was used for the measurements.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis of MIP-SPME Coatings

The exemplary voltamperogram obtained during the electropolymerization of monomer (thiophene) is shown in Figure 1. It turns out that the intensity of reaction peaks appearing in voltamperograms during the monomer oxidation is significantly influenced by the reaction of the environment. Due to the fact that the polymerization was carried out at a pH close to neutral, these signals were not very intense. The applied potential of the electropolymerization process changes slightly during the entire synthesis. The change in the potential over the time of a unit repetition (scan) is similar in each reversion cycle. This may indicate that the course of the electrodeposition process is stable throughout the entire duration of the process and is not disturbed by the process of forming a polymer coating on the surface. Moreover, in this case, a one-stage polymerization of the monomer with a high concentration was also used at the beginning of the reaction. It is interesting that during the polymerization of the thiophene, signals from the processes taking place on the electrodes were visible. A different situation was observed in the case of 3-methylthiophene. On the voltamperogram obtained during the electropolymerization process, the current intensity at the minimum potential decreases along with the increasing number of repetitions (scans). Moreover, the current value increases at the maximum voltage value. An interesting fact is that the alkyl derivative of thiophene is much easier to oxidize compared to the pure monomer without substituents.

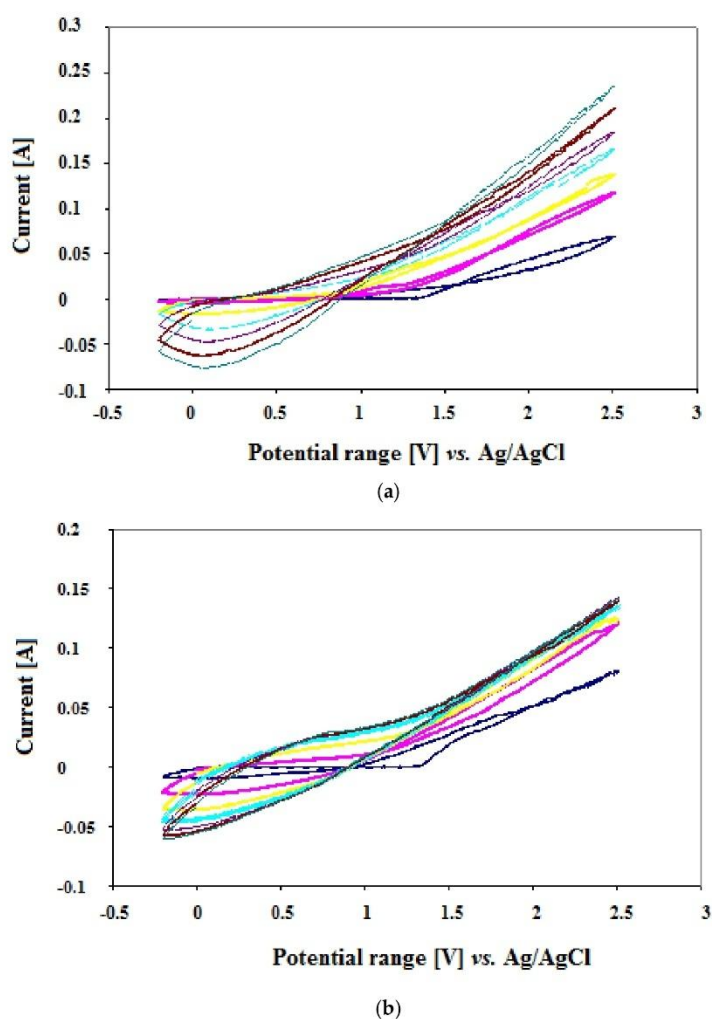


Figure 1. Voltamperograms obtained during the electropolymerization process of thiophene, with (a) and without (b) imprinted drug molecule (CEF). (a) demonstrates cyclic scans of electropolymerization of thiophene in the presence of CEF and (b) without CEF. Colors mean seven-cycle scans during polymerization.

Additionally, multi-cyclic potentiodynamic curves for a model compounds template (AMOX, CEF, MET) were obtained under the printing conditions, in the absence and presence of functional monomers (PTh, PMeTh). When recording the potential cycles for a drug molecule in 0.1 M $(C_4H_9)_4N(BF_4)$ acetonitrile solution, no anode peak was observed corresponding to electro-oxidation. Its absence indicates that, during the electropolymerization process, the target drug template was imprinted in the MIP layer in its unchanged form. Similar profiles were obtained for all studied drugs. Moreover, this may indicate the presence of strong interactions caused by the presence of the sulfur atom and a free electron pair in the structure of the polythiophene in case of CEF and MET. Moreover, a

slight reduction in the hydrophobicity of polythiophene by introducing a methyl group in the 3-position of the thiophene ring resulted in a favorable change manifested by an increase in the extraction efficiency for AMOX. In the synthesized MIP layer, there are molecular voids filled with the imprinted template (relevant drug). Having been removed, the polymer leaves an imprint in the form of a molecular gap with binding sites. In addition, during the electropolymerization, the oxidation of the analytes (molecules to be imprinted) is disadvantageous, since this can lead to the imprinting of the oxidation products (interfering substances) instead of the desired compound. Then, they can form binding sites that are unable to interact effectively with the appropriate analyte. In turn, the interaction of interfering substances with MIP molecular cavities varies according to their structural similarity to the printed template. If the conditions for the impression step of the template molecule (drug) are properly selected, then the molecular voids of the MIP layer should be complementary in shape and size to the template molecules, not to the interfering substance molecules. The obtained results show that polymer sorption fibers with an imprinted drug (AMOX, CEF and MET) obtained during the experimental work were characterized by different selectivity. Hence, PMeTh allows for obtaining the highest extraction recovery and selectivity toward AMOX. On the other hand, PTh allows for obtaining the highest extraction recovery and selectivity toward CEF and MET.

3.2. Physico-Chemical Characterization of Synthesized MIP-SPME Coatings

Scanning electron microscope images made it possible to measure the thickness of the fibers synthesized by electropolymerization. Moreover, they provided information on the structure of the fibers and the individual grains of the material. Table 1 presents the values corresponding to the given types of polymer fibers. The coatings obtained under the conditions described above are characterized by dark grey, graphite color. Their surface is matte and rough. The surface morphology of the obtained materials shows the presence of deposited polymer layers. The layers obtained at the stage of impressing the molecule of a given biologically active compound (antibiotic drug) are characterized by a matt, velvety, light-gray surface, do not detach from the substrate and do not crack. Their surface is homogeneous and presumably much less developed compared to that of a “pure” polymer fiber.

On the basis of the obtained photos presented in Figure 2, a homogeneous surface of the fibers can be seen. As a result of mixing the solution during the electropolymerization process, a clearly visible boundary between the electrode surface and the obtained sorption fiber can be observed. Moreover, mixing at the speed of 300 revolutions per minute made it possible to obtain homogeneous surfaces due to the equal concentration of monomers after the oxidation of oligomers and polymers in the entire volume of the solution (Figure 2). Moreover, in the case of conducting the electropolymerization process in a small volume of the reaction solution, it is very important that the polymer precipitation process on the electrode is not disturbed by mixing the solution. As a result of the conducted mechanical tests, it was found that the coatings adhered well to the substrate and showed no cracks or internal stresses.

The attached photos confirm the effectiveness of the electrodesorption process. In the case of the photos of the fiber before this process, clearly brighter areas are visible. This is due to the use of a secondary electron detector that provides information only on the sample surface topography. The use of a backscattered electron detector allows for an initial analysis of the composition of the sample by detecting the contrast between places on the surface of the sample that differ in their chemical composition.

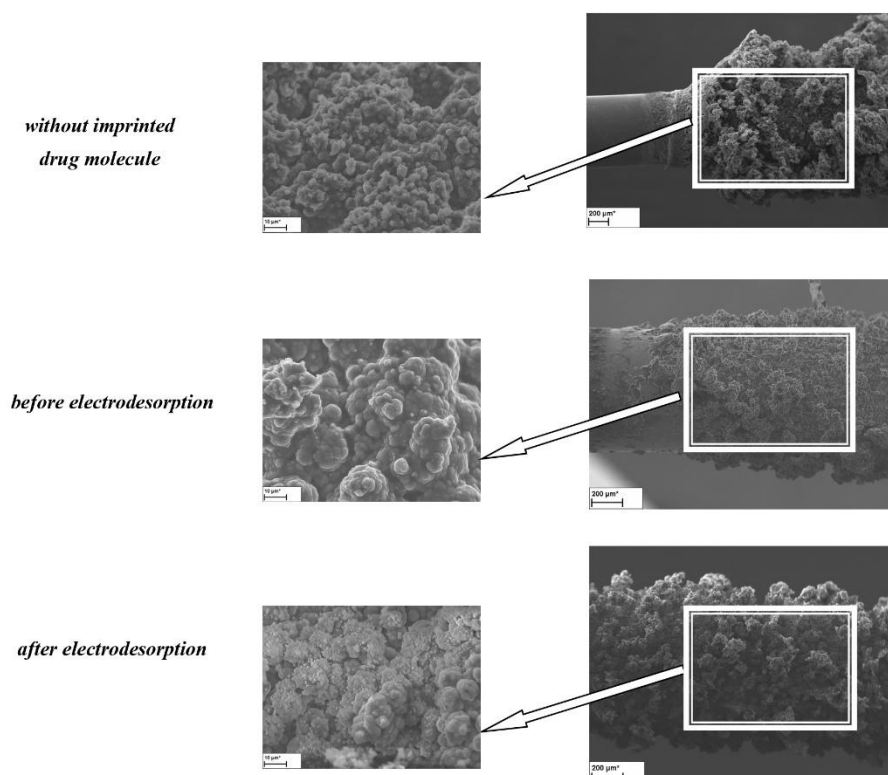
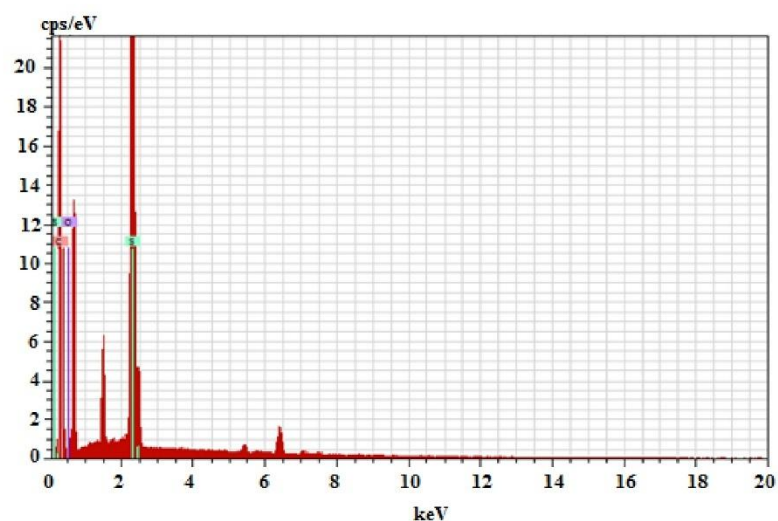
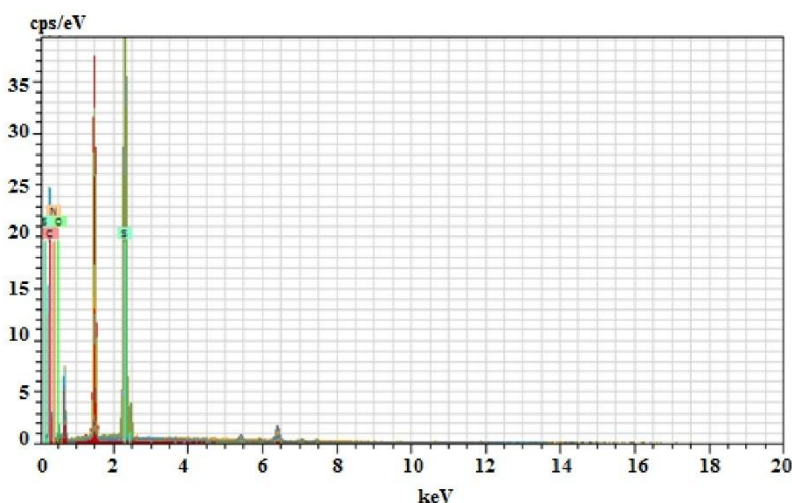


Figure 2. Microscopic photos of fibers with polythiophene coating during various stages of electropolymerization (for MET).

The EDX spectrum shows that the signals from the individual elements on the surface of the SPME coating with the drug molecule imprinted on it are higher than the signals from the layer without the analyte molecule imprinted. The experiments were performed after removing the sorption material (PTh, PMeTh) from the working electrode (SS, Ni-Cr). Elements with higher atomic masses are definitely brighter in the SEM photo, as was noticed originally. Hence, a chemical analysis of the components of the obtained polymers was also performed. On the basis of the obtained results, the presence of such elements as C, N, O, S was found (Figure 3).



(a)



(b)

Figure 3. EDX chemical analysis of the poly (3-methylthiophene) surface without (a) and with imprinted drug molecule (for AMOX) (b).

Infrared (IR) spectra were recorded with an attenuated total reflection (ATR) mode in the $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ region. In the case of the FTIR analysis, the infrared spectrum consists mainly of two areas (Figure 4). The wide band, appearing at the value of the wave number $\bar{\nu}$ of approx. 3450 cm^{-1} , corresponds to the stretching vibrations of the O–H group. The multiplet at $\bar{\nu} = 2964\text{--}2876\text{ cm}^{-1}$ corresponds to the stretching vibration of the C–H bonds. The intense signal at $\bar{\nu} = 1648\text{ cm}^{-1}$ is related to the vibration of C=C in the thiophene ring. Another relatively intense signal, occurring in the range $\bar{\nu} = 1384\text{--}1319\text{ cm}^{-1}$, is related to the vibrations originating from the tetrafluoroborate anion used in the polymer

doping process to generate the appropriate charge. Another signal confirming the presence of this ion is the multiplet in the range of $\bar{\nu} = 1084\text{--}1034\text{ cm}^{-1}$. The sharp signal for the wavenumber $\bar{\nu} = 785\text{ cm}^{-1}$ corresponds to intra-plane deformation vibrations in the thiophene ring, and the multiplet in the range $\bar{\nu} = 674\text{--}623\text{ cm}^{-1}$, with much lower intensity, is related to out-of-plane C–H stretching vibrations. In the case of recording the spectra for poly (3-methylthiophene), the use of different electrodesorption solutions was compared. Bands characteristic of the case poly (3-methylthiophene) correspond to the bands described above (slight shift of the wavenumber values, $\bar{\nu}$). All samples were prepared as KBr pellets. Well-dried KBr does not show its own absorption in the range of $\bar{\nu} = 5000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, so all signals in the spectrum come only from the sample. By analyzing the obtained spectra, it can be concluded that the characteristic bandwidth broadening at the wavenumber value $\bar{\nu}$ of about 3450 cm^{-1} is associated with the formation of intermolecular hydrogen bonds between hydrogen and nitrogen (or sulfur) atoms present in the structure of polymers, and the functional groups of the analyzed drugs. The obtained IR spectra of synthesized polymer sorption fibers and the model molecule (template) fully confirmed the presence of functional groups that are characteristic of these coatings, polythiophene and poly (3-methylthiophene), respectively, and the appropriate drug template. In the analysis of each spectrum, apart from the characteristic vibration peaks from the monomers used and the stock solution, vibrations were also found from groups confirming the presence of the template molecule. The consequence of the presence of a given drug in the polymer matrix was the widening of the absorption band in the range of $\bar{\nu} = 3700\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$. It was also observed that the intensity of the multiplet in the range of $\bar{\nu} = 1300\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, characteristic of anions coming from the doping medium, also changed significantly. It can be concluded that the described characteristic vibration bands are responsible for the formation of interactions of the appropriate polymer sorption material with the pattern particles, and thus for the subsequent formation of imprints in the polymer matrix. The interpretation of the obtained infrared spectroscopy allowed for the recognition of structural bonds, including functional groups of samples of the tested sorption materials (Figure 4).

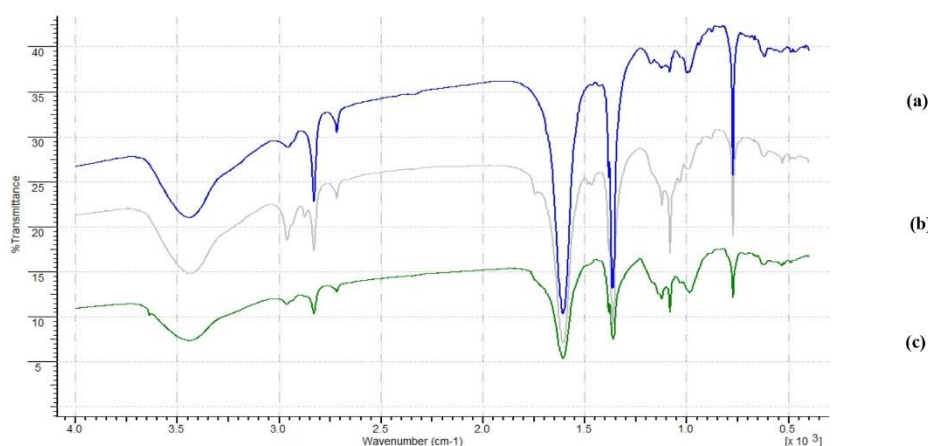


Figure 4. FTIR spectrum of the polythiophene SPME fiber before electrodesorption (a), after electrodesorption (b) and without imprinted drug molecule (c) (for CEF) (KBr pelleting technique).

Additionally, in order to accurately determine the shape and morphology of the obtained polymer fibers, imaging using transmission electron microscopy (TEM) was performed. The conducted research revealed a granular, multi-phase structure of the tested materials. The grain size (d_p), depending on the type of the polymer fiber, is $0.5\text{--}5.0\text{ }\mu\text{m}$ (Figure 5).

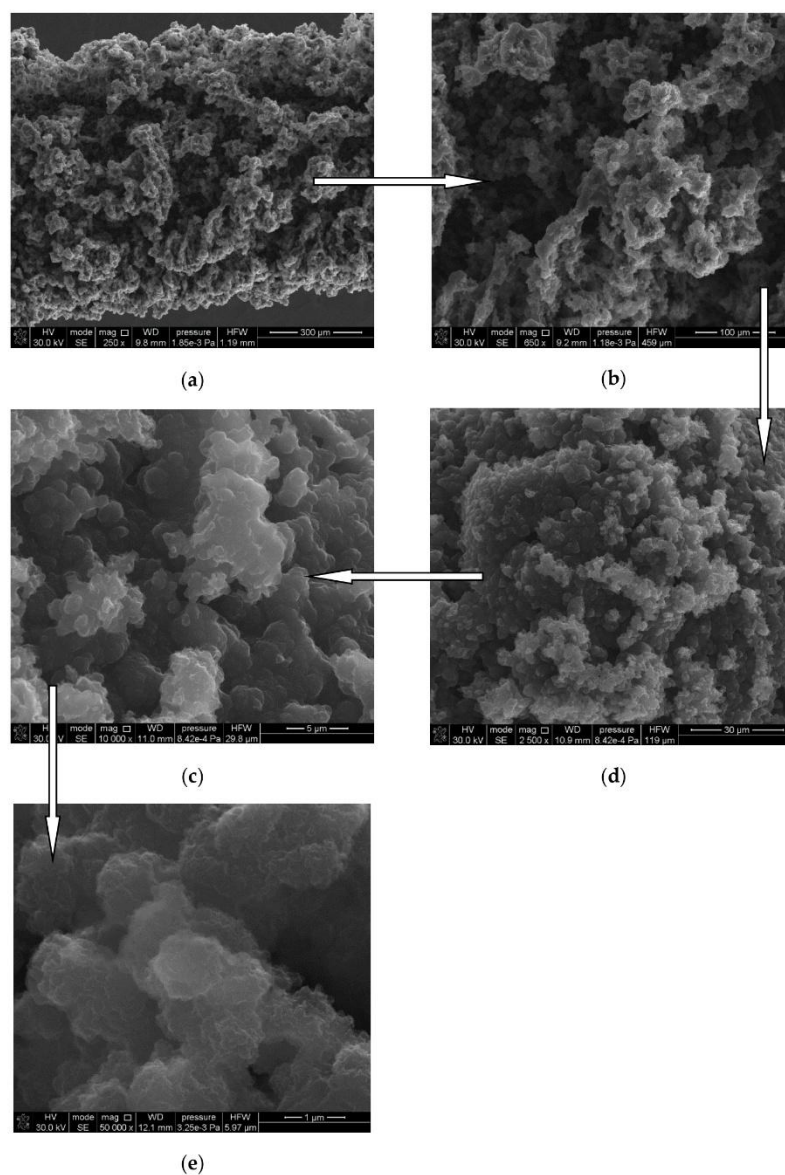


Figure 5. Structure and morphology of the surface of the sorption polythiophene MIP-SPME fiber under a transmission electron microscope (for MET).

Due to the negligible solubility of polythiophene in the NMR solvents used, the research was carried out only for poly (3-methylthiophene). ^1H NMR spectra made for this material are presented in Figure 6.

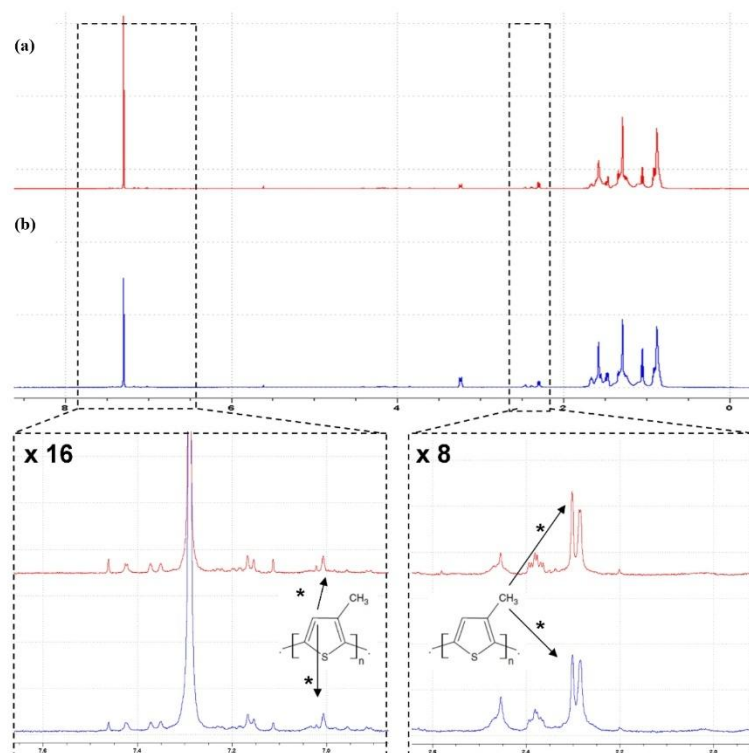


Figure 6. ^1H NMR spectra for poly(3-methylthiophene) fibers, with (a) and without (b) imprinted drug molecule (for AMOX).

The pure 3-methylthiophene spectrum was used as a reference to identify PMeTh signals (data not shown). Due to the bonds between successive meras, multiplet signals in a chemical shift (δ) equal to about 7 ppm are replaced in PMeTh with a single singlet, while the resonance signal from the methyl group is observed in a similar chemical shift as in the case of pure 3-methylthiophene, i.e., about $\delta = 2.3$ ppm. Two resonance signals potentially corresponding to the methyl group in the PMeTh polymer were observed in this region. In addition, a singlet potentially corresponding to the CH proton was observed in the chemical shift $\delta = 7.01$ ppm. When integrated, the ratio of the above signals was in the range of 3:1–4:1, which may correspond to the ratio of protons of $-\text{CH}_3$ to $-\text{CH}$ groups.

In case of the SAXS measurements, the tests were performed after removing the sorption material from the working electrode [24]. As a result of using the low-angle X-ray scattering method, the porosity was determined for the tested SPME polymer sorption fibers without and with an imprinted particle. Figure 7 shows an example of a graph characterizing the size of the pores for poly(3-methylthiophene) fibers.

The pore size distribution was in the range between 40 and 120 nm (maximum value: SPME MIP-PTh—85 nm, SPME MIP-MePTh—90 nm). The maximum values in these areas were comparable with the results obtained for both PTh and PMeTh SPME fibers. The pore size distribution for the fibers with and without the imprinted drug molecule differed slightly. Hence, the differences in the efficiency of extraction are probably not the result of the morphology of the synthesized materials, but of the imprint effect.

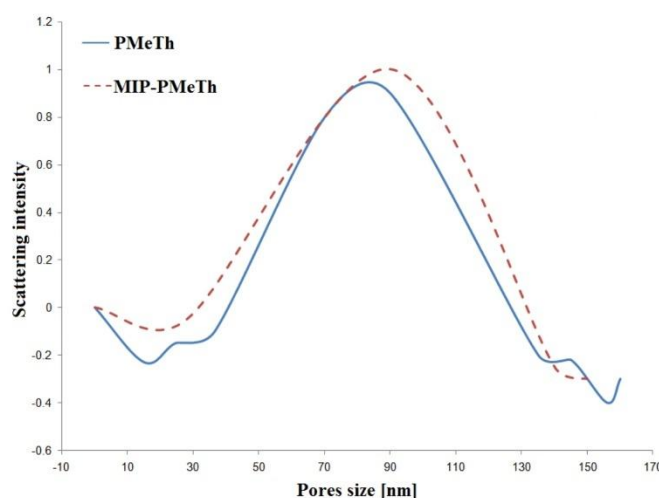


Figure 7. SPME-PMeTh fiber porosity measurement with SAXS (for AMOX).

Additionally, the chemical and mechanical stability of the synthesized SPME fibers was tested. For this purpose, various media were used: water, MeOH, THF, ACN, MeOH/H₂O mixture (50:50, *v/v*), 2-propanol, MeOH/6.5 mM CH₃COOH (75:25, *v/v*) and MeOH/25% NH₃ (80:20, *v/v*) mixture to evaluate these properties. There were no meaningful differences in the structure of a given SPME sorption fiber before and after the exposure to a given medium.

3.3. Optimization of MIP-SPME Extraction through Experimental Design (DOE)

A design of the experiment (DOE) method was applied to optimize the electrochemical polymerization parameters. In this study, the CCD was successfully applied to evaluate the relevance of the three controlled parameters for the MIP-SPME extraction and to identify possible interactions between them. It is described by the following model (Equation (1)):

$$Y = b_0 + b_{1X_1} + b_{2X_2} + b_{3X_3} + (b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3) + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 \quad (1)$$

Optimized input variables (X_1 , X_2 and X_3 in the equation) were adsorption time, desorption time and the volume of the desorption medium. For optimizations, the response (Y) was the antibiotic drug peak area at the extracted ion chromatogram (EIC) for the precursor ion. Moreover, b_i coefficients in the equation represent the linear terms, b_{ij} the interactions and b_{ii} the coefficients of quadratic terms.

The methodology with the desorption time (5–15 min), the pH of the desorption solvent (3–10) and the volume of the desorption solvent (30–100 μ L) as the three variables requires a significantly smaller number of experiments than the traditional “one variable at a time” methodology. The CCD was executed requiring 15 experiments. The surface mapping was an effective way to graphically localize the optimal conditions, allowing for the highest EIC peak area for each target compound. 3D contour plots were prepared for this purpose (Figure 8).

Owing to the graphs, which show interactions and dependencies between two variables and extraction efficiency, it was possible to indicate the best fit of conditions depending on the values of X_1 – X_3 . The greater the desorption time value (X_1), the better the system fit and the larger the surface area. The X_2 and X_3 values, the pH of the desorption solvent and the volume of the desorption solvent do not significantly affect the fit. The fit depends mainly on the value of X_1 . Initially, the larger the value of X_1 , the better the fit;

however, once the optimal value for the best fit is reached, a further increase in X_1 results in a deterioration of the result. The conclusion is that, with the same parameters, similar selectivity can be obtained. It has to be pointed out that for all the target compounds, the results were very similar, indicating the same behavior during the MIP-SPME extraction.

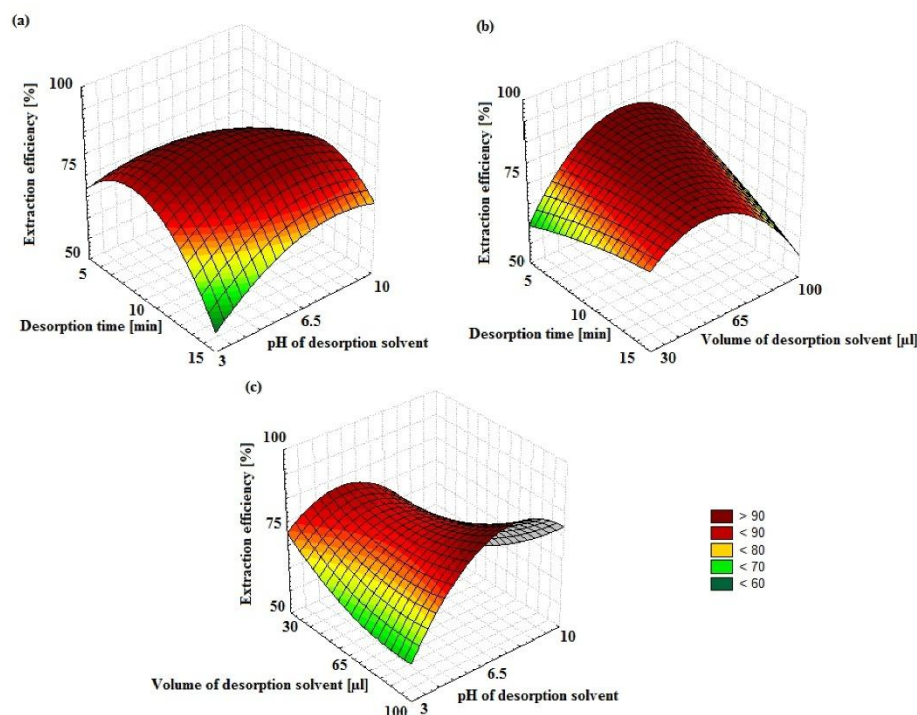


Figure 8. Response surface methodology for the extraction recovery of AMOX in case of optimized parameters such as the desorption time (X_1), the pH of the desorption solvent (X_2) and the volume of the desorption solvent (X_3). (a) X_1 vs. X_2 , (b) X_1 vs. X_3 , (c) X_3 vs. X_2 .

Finally, MIP-SPME coatings were preconditioned in the mixture of MeOH and water (80:20, *v/v*) for 15 min, followed by water with 0.1% formic acid (for 10 min). The adsorption step of the target compounds was carried out in the direct immersion mode in 50 μ L of human plasma during 10 min without agitation (at $37^\circ\text{C} \pm 0.2$). The desorption step was performed with the use of 65 μ L ammonium acetate in 70:30 MeOH:H₂O (for 10 min). The evaporated samples were dissolved in the 180 μ L of mobile phase and analyzed with the use of liquid chromatography and mass spectrometry.

3.4. Proposed Mechanism of Drug Sorption on MIP-SPME Fibers

The Figure 9a–c below presents the proposed mechanism of interaction between a given drug and the SPME polymer sorption fiber. Figure 9a shows possible interactions between the cefotaxime molecule and the polythiophene film. This type of fiber has a sulfur atom in its structure, which is an element with high electronegativity, along with free electron pairs, just like the oxygen atom from the O=C-carbonyl group derived from the drug molecule. In this case, there is no effect. Presumably, the only interactions that occur here are the donor–acceptor interaction between the hydrogen atom of the H–N-group and the H₂C-moiety of the drug molecule and the sulfur atom of the thiophene ring (in

the case of polythiophene). Additionally, very weak hydrogen bonds (due to the spherical interactions in the thiophene ring) presumably can be formed between the hydrogen atoms of the polymer chain and the oxygen atom of the O=C-carbonyl group of the drug molecule. In the case of metronidazole (Figure 9b) one can expect the donor–acceptor interaction between the oxygen atom from the hydroxyl group of the HO–drug molecule and the sulfur atom from the thiophene ring (in the case of polythiophene). Moreover, this also applies to the interaction between the nitrogen atom of the nitro group and the hydrocarbon drug molecule, along with the sulfur atom from the thiophene ring (in the case of polythiophene). In the case of a surface covered with poly (3-methylthiophene) and amoxicillin (Figure 9c), the formation of hydrogen bonds between the hydrogen atom of the H-C-polymer group and the oxygen atom of the O=C-carbonyl group of the drug molecule and the amino group HN-entails a possible drug molecule and the sulfur atom of the methylthiophene ring (in the case of poly (3-methylthiophene)).

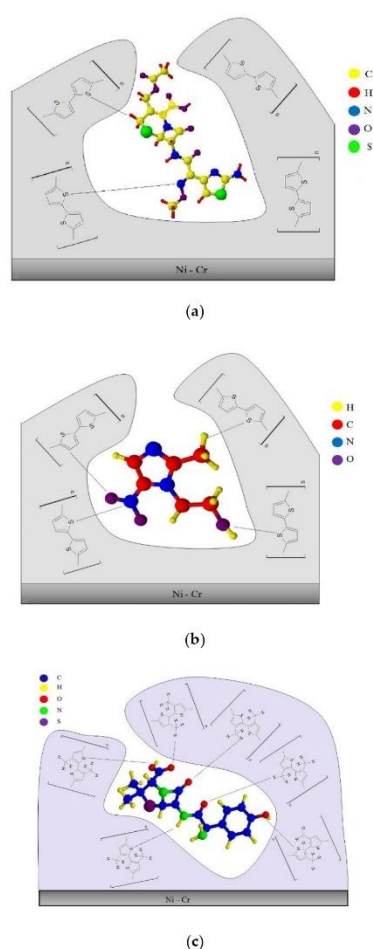


Figure 9. Proposed mechanism of the sorption of cefotaxime (a), metronidazole (b) and amoxicillin (c) molecules on the surface of PTH-SPME fiber and PMeTh-SPME fiber.

On the basis of the obtained results, it was observed that depending on the type of the polymer (PTh, PMeTh), the sorption properties of the SPME coatings are different. Moreover, the thickness of the MIP-SPME layer is very important for the printed patterns (in case of drugs) and for the isolation and labeling of the analytes. It is likely that the thicker this layer is, the greater the number of molecular cavities imprinted in it. Thus, the ability of the polymer to interact with the analyte is greater. However, the problem of removing all the printed templates remains, because their being washed out incompletely would reduce the sorption efficiency during the determination of the analytes.

3.5. Application of SPME HPLC-MS/MS to Human Plasma Samples

The MS spectra for the human plasma samples are shown in Figure 10. Moreover, we studied the fragmentation of the $[M + H]^+$ ions of the target compounds and their metabolites with the use of ESI-MS/MS measurements. Based on the obtained results, we can notice that the MS spectra are clear, which demonstrates that the MIP-SPME approach was efficient and selective.

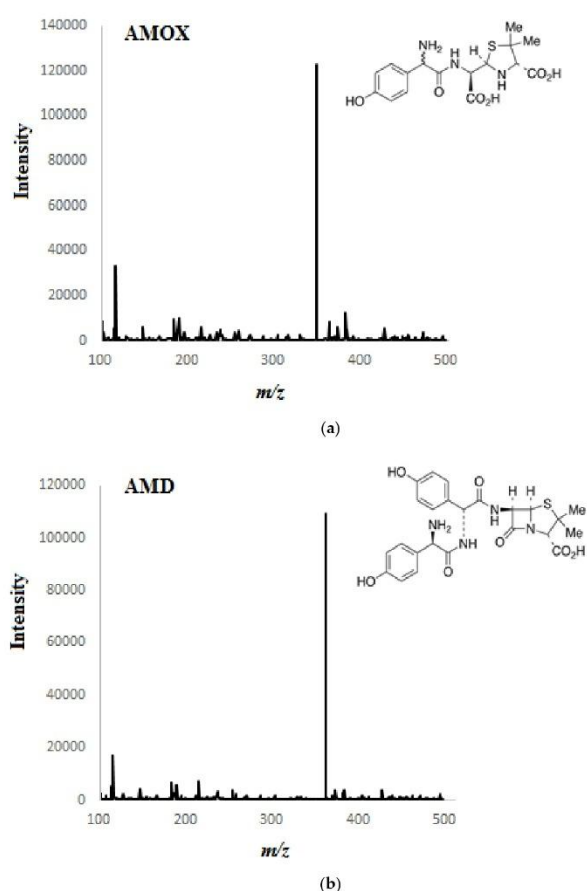


Figure 10. Cont.

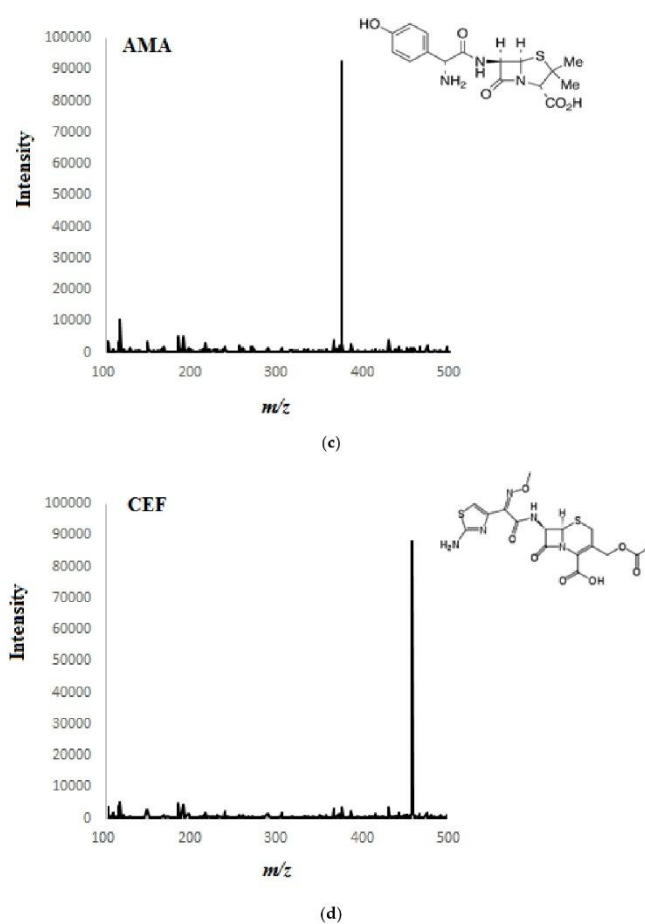


Figure 10. Cont.

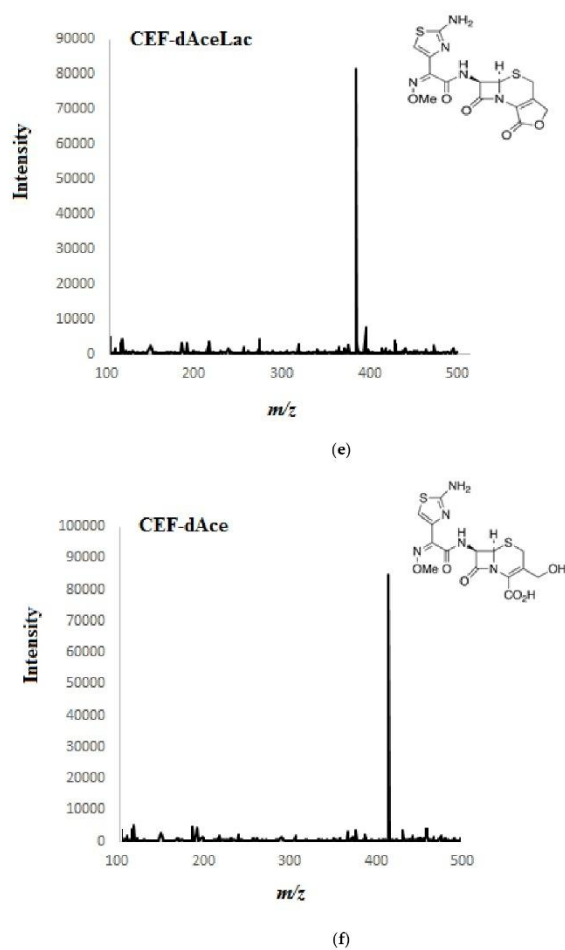
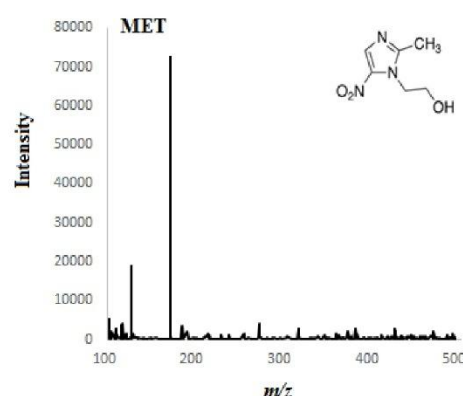
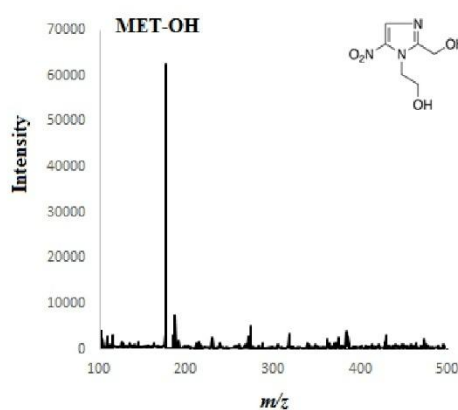


Figure 10. Cont.



(g)



(h)

Figure 10. MS spectra for the human plasma samples analyzed after the oral administration of AMOX (a), CEF (d) and MET (g), showing drugs and their metabolites (AMD (b), AMA (c), CEF-dAceLac (e), CEF-dAce (f), MET-OH (h)).

In the real samples from patients treated with metronidazole, the presence of one metabolite of the parent drug—hydroxymetronidazole, $m/z = 188$ (for MET-OH)—was observed. For amoxicillin and cefotaxime, four metabolites were identified at $m/z = 366$ and 384 (for AMD and AMA, respectively) and at $m/z = 396$ (for CEF-dAce and CEF-dAceLac). The acquired MS/MS spectra proved that the precursor ion for MET at $m/z = 172$ was mainly fragmented to $m/z = 128$ ($-C_2H_4O$) and for MET-OH at $m/z = 188$ to $m/z = 144$ ($-C_2H_2NO$) and $m/z = 126$ ($-C_2H_4O$). For CEF and CEF-DAC-LAC, the precursor ion was at $m/z = 456$ and $m/z = 396$, respectively. The CEF fragmentation (MS/MS) created mainly two product ions identified at $m/z = 342$ and $m/z = 396$ (major product) and CEF-DAC-LAC fragmented to $m/z = 282$ and $m/z = 336$.

The influence of different parameters, which were important from the point of view of the physiology of the human body, on the sorption efficiency of the selected antibiotic was investigated. As we know, the most important organic blood components are albu-

min (the protein fraction representing about 60%). Thus, it was necessary to study their interaction on the extraction efficiency of the analyzed drugs. A slight influence of albumin ($c_{\text{physiological}} = 30\text{--}50 \text{ mg/mL}$) on the sorption process in the case of the tested antibiotics was noticeable. On the basis of the obtained results, it was also possible to eliminate the influence of cations and anions on the sorption properties of polymer fibers. The need to investigate their interaction was due to the fact that, in plasma, which accounted for 55% *vol.* in the whole blood, apart from morphotic elements (erythrocytes, leukocytes, platelets), inorganic components were suspended, mainly sodium and chloride ions. Depending on the use of an appropriate dilution of sodium chloride solution (in the concentration range of 0.225–0.9%) or a magnesium-calcium buffer, the sorption efficiency was maintained at the same level.

The total amount of extracted drug (M_{cat}) per MIP-SPME fiber was calculated from the equation: $M_{\text{cat}} = c_{\text{des}} \cdot V_{\text{des}}$, where c_{des} is the drug concentration in the desorbed solution [$\mu\text{g/mL}$] and V_{des} is the volume of the desorbed solution [mL]. By comparing the amounts of the adsorbed drug at a concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$, in the human plasma samples, these values are: MIP-PMeTh (AMOX)—1.26 μg , MIP-PTh (CEF)—1.24 μg , MIP-PTh (MET)—1.19 μg .

Moreover, the reproducibility of the MIP-SPME coatings was investigated with the use of the same concentration of the drug solution (for AMOX, CEF and MET, 1 $\mu\text{g/mL}$) and six fibers synthesized under the same conditions. The extraction efficiency revealed the relative standard deviation (RSD) values, app. 3.5%, confirming that the data are highly reproducible. Based on Table 3, it can be noticed that RDS is in the range of 0.12–3.46%. By analyzing the amounts of adsorbed AMOX on individual MIP-SPME fibers and comparing the linear correlation coefficients, it can be concluded that the most effective extraction is obtained for a fiber with a PMeTh coating, and the least effective is for a PTh fiber. The reverse situation is in the case of CEF and MET. The reason for this is the interaction between the drug and a given SPME fiber coverage. It can be concluded that MIP-SPME fibers with porous material have the ability to retain characteristic molecules in their pores more strongly. This means that only selected substances from the tested medium can bind to the carrier, while analytes with a different structure are not captured. Thus, the effect of matching the particle size and pores of the sorbent will play a key role.

Table 3. Extraction efficiency for AMOX, CEF and MET in case of PTh and PMeTh SPME Coatings ($n = 6$).

Compound	MIP-SPME Coating	Slope	Intercept	R ²	RSD [%]
AMOX	PTh	0.0219	0.2884	0.9193	0.12–2.46
	PMeTh	0.0704	0.1783	0.9994	0.26–1.49
CEF	PTh	0.0814	0.1934	0.9991	0.37–1.76
	PMeTh	0.0352	0.2918	0.8465	0.86–3.46
MET	PTh	0.0946	0.8375	0.9997	0.17–2.09
	PMeTh	0.0517	0.3946	0.8493	0.65–3.05

4. Conclusions

The presented research results seem to confirm the sorption properties of electroconductive polymeric materials with an imprinted particle (MIP-SPME). This creates new possibilities in the field of the selective extraction of drugs and their potential metabolites. In addition, the use of polymer sorption fibers significantly improves the isolation of biologically active compounds remaining in low concentrations in the initial matrices. The high selectivity of SPME sorbents with an imprinted particle makes it possible to use them for the isolation from real biological samples (plasma/whole blood). This approach shortens the sample preparation time and minimizes the amount (volume) of the biological material necessary for analytical purposes.

Moreover, recent trends set by the so-called “green chemistry principles” in extraction methods focus primarily on finding solutions that reduce solvent consumption and improve

the efficiency and selectivity of the whole process. One such solution is to apply the described analytical procedure with the use of solid-phase microextraction. Both processes were optimized to define the impact of the extraction parameters of the SPME approach and conditions of the electropolymerization step on the extraction efficiency of target compounds. Then, the chemical profiles of the analyzed human plasma samples from the patients were determined with the use of LC-MS/MS.

Author Contributions: Conceptualization, M.S.-M.; methodology, M.S.-M., D.J., B.B.; software, M.S.-M., D.J.; validation, M.S.-M., D.J.; formal analysis, M.S.-M., D.J.; investigation, M.S.-M., D.J.; resources, M.S.-M., B.B.; data curation, M.S.-M., D.J.; writing—original draft preparation, M.S.-M., D.J.; writing—review and editing, M.S.-M., D.J., B.B.; visualization, M.S.-M., D.J.; supervision, M.S.-M.; project administration, M.S.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Bioethics Committee of Nicolaus Copernicus University in Toruń (decision no. 585/2017).

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: This work was financially supported by Toruń Center of Excellence “Towards Personalized Medicine” operating under Excellence Initiative-Research University (B. Buszewski, M. Szultka-Młyńska).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kataoka, H. New Trends in Sample Preparation for Clinical and Pharmaceutical Analysis. *Trends. Anal. Chem.* **2003**, *22*, 232–244. [\[CrossRef\]](#)
2. Mullett, W.M. Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2007**, *70*, 263–273. [\[CrossRef\]](#)
3. Sime, F.B.; Roberts, M.S.; Roberts, J.A.; Robertson, T.A. Simultaneous determination of seven β -lactam antibiotics in human plasma for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B.* **2014**, *1*, 134–144. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Buszewski, B.; Szultka, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2012**, *42*, 198–213. [\[CrossRef\]](#)
5. Sagandykova, G.; Szumski, M.; Buszewski, B. How much separation sciences fit in the green chemistry canoe? *Curr. Opin. Green. Sustain. Chem.* **2021**, *30*, 100495. [\[CrossRef\]](#)
6. Pawliszyn, J. Theory of Solid-Phase Microextraction. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; pp. 13–59.
7. Reyes-Garcés, N.; Gionfriddo, E.; Gomez-Rios, G. Advances in solid phase microextraction and perspective on future directions. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 302–360. [\[CrossRef\]](#)
8. Omena, E.; Oenning, A.L.; Merib, J.; Richter, P.; Rosero-Moreano, M.; Carasek, E. A green and simple sample preparation method to determine pesticides in rice using a combination of SPME and rotating disk sorption devices. *Anal. Chim. Acta.* **2019**, *1069*, 57–65. [\[CrossRef\]](#)
9. Souza, I.D.; Oliveira, I.G.C.; Queiroz, M.E.C. Innovative extraction materials for fiber-in-tube solid phase microextraction: A review. *Anal. Chim. Acta.* **2021**, *1165*, 238110. [\[CrossRef\]](#)
10. Napylov, A.; Reyes-Garcés, N.; Gomez-Rios, G. In vivo solid phase microextraction for sampling of oxylipins in brain of awake, moving rats. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2020**, *59*, 2392–2398. [\[CrossRef\]](#)
11. Szultka-Młyńska, M.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Application of solid phase microextraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry in the determination of antibiotic drugs and their metabolites in human whole blood and tissue samples. *J. Chromatogr. B.* **2018**, *1086*, 153–165. [\[CrossRef\]](#)
12. Bouchta, D.; Izaoumen, N.; Zejli, H.; El Kaoutit, M.; Temsamani, K.R. A novel electrochemical synthesis of poly-3-methylthiophene-gamma-cyclodextrin film Application for the analysis of chlorpromazine and some neurotransmitters. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2228–2235. [\[CrossRef\]](#)
13. Rico-Yuste, A.; Carrasco, S. Molecularly Imprinted Polymer-Based Hybrid Materials for the Development of Optical Sensors. *Polymers* **2019**, *11*, 1173. [\[CrossRef\]](#)
14. Masoumi, V.; Mohammadi, A.; Amini, M.; Khoshayand, M.R.; Dinarvand, R. Electrochemical synthesis and characterization of solid-phase microextraction fibers using conductive polymers: Application in extraction of benzaldehyde from aqueous solution. *J. Solid. State. Electrochem.* **2014**, *18*, 1763–1771. [\[CrossRef\]](#)

15. Szultka-Młyńska, M.; Olszowy, P.; Buszewski, B. Nanoporous conducting polymer-based coatings in microextraction techniques for environmental and biomedical applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *46*, 236–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Namsheer, K.; Rout, C.S. Conducting polymers: A comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 5659–5697.
17. Turiel, E.; Martin-Esteban, A. Molecularly imprinted polymers-based microextraction techniques. *TrAC Trends. Anal. Chem.* **2019**, *118*, 574–586. [[CrossRef](#)]
18. Szultka, M.; Pomastowski, P.; Railean-Plugaru, V.; Buszewski, B. Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 3094–3105. [[CrossRef](#)]
19. Kumar, R.; Singh, S.; Yadav, B.C. Conducting Polymers: Synthesis, Properties and Applications. *J. Sci.* **2015**, *2*, 595–604.
20. Bagheri, H.; Ayazi, Z.; Naderi, M. Conductive polymer-based microextraction methods: A review. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *767*, 1–13. [[CrossRef](#)]
21. Chen, L.; Wang, X.; Lu, W.; Wu, X.; Li, J. Molecular imprinting: Perspectives and applications. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2137–2211. [[CrossRef](#)]
22. Pathiranage, T.M.S.K.; Dissanayake, D.S.; Niermann, C.N.; Ren, Y.; Biewer, M.C.; Stefan, M.C. Role of polythiophenes as electroactive materials. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2017**, *55*, 3327–3346. [[CrossRef](#)]
23. Mametov, R.; Sagandykova, G.; Mondeneiro, F.; Buszewski, B. Development of controlled film of polypyrrole for solid-phase microextraction fiber by electropolymerization. *Talanta* **2021**, *232*, 122394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Buszewski, B.; Olszowy, P.; Pikus, S.; Kozak, M. Electropolymerized nanoporous polymeric SPME coatings: Preparation and characterization by small angle X-ray scattering and scanning elektron microscopy. *Monatsh. Chem.* **2014**, *145*, 527–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

PUBLIKACJA [P6]

**Zastosowanie techniki MIP-SPME do terapeutycznego monitorowania
leków w próbkach biologicznych**

D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski

Analityka: nauka i praktyka (2022) 23: 11-19, PM = 20



DARIA JANISZEWSKA

MAŁGORZATA SZULKA-
MŁYŃSKA

BOGUSŁAW BUSZEWSKI

Terapeutyczne monitorowanie leków oraz ich aktywnie farmakologicznych metabolitów umożliwia ocenę ich farmakokinetyki i metabolizmu, jak również ustalenia odpowiedniego dawkowania pod kątem terapii pacjenta. Technika MIP-SPME stwarza nowe możliwości w zakresie selektywnej ekstrakcji leków i ich potencjalnych metabolitów.

NAUKA

Zastosowanie techniki MIP-SPME do terapeutycznego monitorowania leków w próbkach biologicznych

Zastosowanie technik analitycznych w terapeutycznym monitorowaniu leków ma na celu ocenę ich farmakokinetyki i metabolizmu, porównanie profili farmakokinetycznych nowo opracowanych preparatów leków generycznych, jak również prowadzenie rutynowego monitorowania leków w kierunku odpowiedniego dawkowania, tak aby zminimalizować ich skutki uboczne.

Jedną z badanych grup leków są antybiotyki, które są prawdopodobnie najskuteczniejszymi dotychczas zidentyfikowanymi lekami poprawiającymi zdrowie zarówno roślin, jak i zwierząt. Leki te stosowane są w leczeniu infekcji bakteryjnych i z chemicznego punktu widzenia tworzą wiele klas związków. Są to związki małowcząsteczkowe, różniące się budową chemiczną, składem oraz właściwościami fizykochemicznymi. Wśród antybiotyków wyróżnia się β -laktamy, makrolity, aminoglikozydy, sulfonamidy i tetracykliny, glikopeptydy oraz chinolony. Antybiotyki, aby uzyskać odpowiedni efekt farmakologiczny, muszą ulec biochemicznej modyfikacji, czyli biotransformacji. Metabolizm leków przeciwbakteryjnych podzielony jest głównie na reakcje fazy I i fazy II. Reakcje fazy I prowadzą do powstania półproduktów w procesach utleniania, redukcji czy deaminacji. Reakcje fazy II natomiast polegają na sprzęganiu produktów końcowych z kwasem glukuronowym, kwasem siarkowym, glutationem i glicyną i mogą prowadzić do metylacji lub acetylacji. Powstałe metabolity różnią się właściwościami i dzielą się na

aktywne, nieaktywne, toksyczne oraz takie, które pod wpływem odpowiednich czynników fizycznych ulegają przekształceniu w związki pierwotny. W większości przypadków w wyniku biotransformacji powstają metabolity nieaktywne, które w krótkim czasie są usuwane z organizmu. Aktywne metabolity mogą powstawać zarówno z aktywnych, jak i nieaktywnych związków pierwotnych. Produkty takich przemian charakteryzować się będą niższą toksycznością lub inną aktywnością farmakologiczną niż lek pierwotny. Procesy metaboliczne mogą także skutkować powstaniem substancji toksycznych zwiększających szkodliwość stosowanego leku. Dodatkowo substancje zalegające w tkankach oraz te, które są uwalniane do środowiska, mogą prowadzić do indukcji antybiotykooporności. Przyczyną tego problemu jest nadmierne stosowanie lub niewłaściwe stosowanie leków przeciwbakteryjnych nie tylko w leczeniu infekcji u ludzi, ale także w przemyśle spożywczym, weterynarii czy rolnictwie. Dlatego też, oprócz usprawnienia antybiotykoterapii, należy zwrócić uwagę na aktywne farmakologicznie metabolity, które w organizmie mogą mieć istotny wpływ na zaostrzenie istniejącego już problemu infekcji (sepsa). Co więcej, w czasach pandemii koronawirusa SARS-CoV-2 wywołującego COVID-19 wzrosła potrzeba monitorowania leków przeciwwirusowych. Aktualnie nadal trwają poszukiwania najskuteczniejszych i najbezpieczniejszych metod farmakoterapii u pacjentów, u których wystąpiło zakażenie koronawirusem.

Obecnie badanie metabolicznej biotransformacji substancji biologicznie aktywnych, a w szczególności związków przeciwbakteryjnych, zmierzają do poznania chemicznych oraz biochemicznych szlaków ich przemian oraz do określenia chemicznych struktur powstających metabolitów, które mogą powstawać w organizmie pacjenta. Jednak realizacja takiego celu w skomplikowanym układzie biologicznym wymaga wstępnych badań modelowych. Stąd, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, badania nad przemianami metabolicznymi leków prowadzi się w kilku etapach, począwszy od prostych układów modelowych do skomplikowanych układów w organizmie człowieka. Przemiany metaboliczne bada się:

- w obecności wyizolowanych specyficznych enzymów,
- w obecności różnych czynników chemicznych,
- z zastosowaniem wyizolowanych frakcji enzymów komórek wątroby,
- w komórkach hodowanych *in vitro*, na przykład hepatocytach, komórkach nowotworowych czy liniach ludzkich komórek nabłonkowych jelit,
- w organizmie zwierząt i człowieka.

Oznaczanie i monitorowanie leków terapeutycznych w złożonych matrycach, takich jak krew, osocze, moczu czy tkanka, jest ogromnym wyzwaniem we współczesnej chemii analitycznej i wymaga odpowiednich metod izolacji i wzbogacenia. Standardowa analiza składa się z trzech podstawowych etapów: pobierania próbek, analizy chromatograficznej i przetwarzania danych bioinformatycznych.

Przygotowanie próbek do analizy

Analiza związków biologicznie aktywnych na poziomie śladowym i ultraśladowym wymaga zastosowania odpowiednich procedur analitycznych. Przygotowanie próbek jest jednym z najważniejszych etapów każdej analizy. Jego poprawne przeprowadzenie ma kluczowe znaczenia dla jednoznacznej identyfikacji i ilościowego oznaczenia analitów zwłaszcza w próbkach o skomplikowanych matrycach. Na ostateczny wynik analizy wpływ mają właściwości fizykochemiczne badanych analitów, jak rozpuszczalność, lotność czy polarność oraz złożoność matrycy biologicznej. Pomimo ogromnego rozwoju aparatury analitycznej

Tabela 1. Porównanie zalet i wad trzech technik przygotowania próbek do analizy – LLE, SPE, SPME

Zalety	Wady
LLE	
<ul style="list-style-type: none"> ■ uniwersalność ■ prostota wykorzystanej aparatury ■ łatwość wykonania ■ przydatność w analizie próbek silnie zanieczyszczonych ■ możliwość wykorzystania zarówno do usuwania matrycy, jak i wzbogacania mikrośladów ■ zastosowanie do wzbogacenia selektywnego i grupowego 	<ul style="list-style-type: none"> ■ konieczność stosowania dużych ilości często toksycznych rozpuszczalników, ekotoksycznych, łatwopalnych i drogich ■ czasochłonność i pracochłonność ■ duże straty pozyskiwanego materiału ■ konieczność wzbogacania i oczyszczania uzyskanego materiału ■ stosunkowo mały współczynnik wzbogacenia ■ tworzenie się emulsji
SPE	
<ul style="list-style-type: none"> ■ możliwość izolacji i wzbogacenia związków lotnych i nielotnych z próbek ciekłych i gazowych ■ selektywność wzbogacenia i możliwość oczyszczenia substancji ■ zapobieganie procesom biodegradacji w czasie przechowywania próbek, zwłaszcza wodnych ■ znaczne zredukowanie rozpuszczalników w porównaniu z technikami LLE ■ eliminacja problemów z tworzeniem się emulsji ■ szeroki wybór stałych sorbentów ■ łatwość automatyzacji ■ możliwość zastosowania w terenie 	<ul style="list-style-type: none"> ■ straty analitu wynikające z niecałkowitej desorpcji ■ konieczność wzbogacenia eluatu po desorpcji rozpuszczalnikiem ■ czasami niska powtarzalność i czasochłonność
SPME	
<ul style="list-style-type: none"> ■ krótki czas ekstrakcji analitów ■ brak zużycia rozpuszczalników ■ możliwość optymalizacji wielu parametrów analizy ■ możliwość automatyzacji ■ wysoka czułość ■ niewielkie rozmiary włókien SPME ■ możliwość pobierania próbek środowiskowych w terenie ■ możliwość analizy próbek o bardzo złożonej matrycy ■ sorpcja analitów lotnych i średniolotnych ■ dostępność włókien o różnej polarności ■ możliwość zastosowania SPME wraz z innymi technikami analitycznymi 	<ul style="list-style-type: none"> ■ stosunkowo duży koszt włókien ■ ograniczony czas użytkowania włókna ■ możliwość degradacji składników próbki pod wpływem temperatury ■ możliwość sorpcji zanieczyszczeń na włóknie (przed analizą)

w ostatnich latach przygotowanie próbek nadal uważane jest za impas wszystkich procedur analitycznych, zwłaszcza w analizie związków biologicznie aktywnych (leków). Ze względu na niskie stężenie leków w ludzkiej krwi surowej czy osoczu oraz różnorodność metabolitów wybrana technika ekstrakcji powinna być niemal idealna.

Głównymi celami przygotowania próbki są przede wszystkim: usunięcie potencjalnych substancji przeszkadzających (interferentów), wstępne wzbogacenie analitów, przekształcenie analitu w formę bardziej odpowiednią do wykrywania lub rozdzielania, a także zapewnienie powtarzalnej metody niezależnej od zmian w matrycy próbki. Wraz z ogromnym rozwojem „zielonej chemii” wyznaczono nowe cele, takie jak możliwość zastosowania mniejszych objętości próbki, poprawa selektywności ekstrakcji, ułatwienie automatyzacji oraz zminimalizowanie ilości stosowanego szkła i szkodliwych dla środowiska rozpuszczalników organicznych.

Konwencjonalne metody przygotowania próbki obejmują ekstrakcję ciecz–ciecz LLE (ang. *Liquid-liquid extraction*) oraz ekstrakcję do fazy stałej SPE (ang. *Solid-phase extraction*), które pozwalają na oddzielenie analitu od matrycy i jego wzbogacenie do poziomu pozwalającego na odpowiednie oznaczenie. Pomimo wielu zalet omówione metody ekstrakcji są czasochłonne, pracochłonne i wymagają dużych ilości często toksycznych rozpuszczalników organicznych, co przyczynia się do powstania znacznej ilości chemicznych odpadów. W dobie „zielonej chemii”, aby rozwiązać problemy związane z konwencjonalnymi metodami, w ciągu ostatnich dwóch i pół dekad wprowadzono wiele nowych technik ekstrakcji opartych na miniaturyzacji procesu.

Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej SPME (ang. *Solid-phase microextraction*), której podstawy teoretyczne opisał w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku prof. Janusz Pawliszyn z Uniwersytetu w Waterloo, jest jedną z technik ekstrakcji, pozwalającą na ograniczenie bądź całkowitą rezygnację z rozpuszczalników organicznych, jak również zmniejszenie ilości analitu/próbki (tab. 1). Wśród innych zalet opisywanej techniki można wyróżnić stosunkowo niskie koszty aparatury, mały rozmiar urządzeń, możliwość pobierania próbek w układach *in situ* i *in vivo* oraz możliwość automatyzacji procedury analitycznej. Ponadto dane ilościowe lub półilościowe są dostarczane nawet w przypadku niskiego stężenia oznaczanych analitów oraz strat analitów, które mogą wystąpić na etapie przygotowania próbki wykonywanego przy zastosowaniu tradycyjnych procedur pobierania próbek. Zastosowanie SPME pozwala, w większości przypadków, uniknąć etapów ekstrakcji, wzbogacenia i oczyszczania. Dodatkowo technika SPME może być stosowana do wielu rodzajów próbek w stanie gazowym, ciekłym, jak i stałym. Powszechnie SPME stosowane jest w połączeniu

z chromatografią gazową GC (ang. *Gas Chromatography*) i cieczową LC (ang. *Liquid Chromatography*), jak również z kapilarną elektroforezą strefową CZE (ang. *Capillary Zone Electrophoresis*). SPME znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, takich jak: ochrona środowiska, farmacja, biologia, kryminalistyka, ochrona żywności oraz w analizach produktów naturalnych.

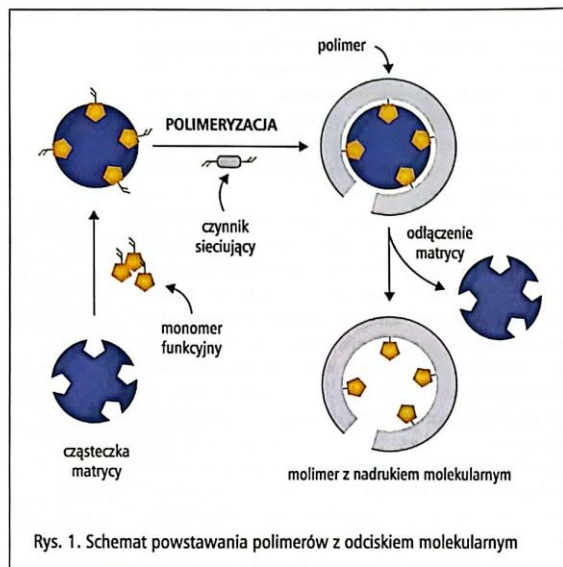
SPME polega na ekstrakcji docelowych analitów z badanej próbki poprzez adsorpcję na fazie stacjonarnej pokrywającej włókno wykonane z materiału sorpcyjnego. Wybór materiału sorbentu do powlekania SPME jest podyktowany charakterem analitów docelowych. Istnieją cztery główne kryteria, które są powszechnie stosowane przy wyborze właściwej powłoki z włókna. Są to:

- masa cząsteczkowa/rozmiar analitu,
- polarność,
- poziom stężenia analitu oraz
- złożoność matrycy próbki.

Dodatkowo rodzaj fazy stacjonarnej pokrywającej włókno determinuje selektywność i czułość metody. Szereg sorbentów SPME dostępnych w handlu i syntezowanych w laboratorium okazało się przydatnych do wielu zastosowań w technikach SPME. W ostatnich latach badano różne sorbenty oparte na polimerach z nadrukiem molekularnym MIP (ang. *Molecular Imprinted Polymers*), umożliwiając w większości przypadków nie tylko wstępne wzbogacenie i oczyszczanie próbki, ale również selektywną ekstrakcję analitu, co jest ważne, szczególnie gdy próbka jest złożona i zauważalny jest wpływ ze strony substancji przeszkadzających.

Polimery z nadrukiem molekularnym – MIP

Technika nadruku molekularnego jest uważana za jedną z najbardziej użytecznych metod wykorzystywanych w celu uzyskania wysoce selektywnych materiałów polimerowych. Od pionierskiej pracy Polyakova w latach trzydziestych XX wieku przy użyciu matryc krzemionkowych ciągle rozwija się projektowanie, wytwarzanie, charakteryzowanie i stosowanie polimerów z nadrukiem molekularnym w ostatnich latach odzwierciedla stopniowy rozwój technologii nadruku molekularnego. Pierwsze doniesienia dotyczące MIP opublikowali Mosbach i Sellergren w 1984 roku. Natomiast koncepcja materiałów określanych jako sorbenty MIP została opracowana i szczegółowo scharakteryzowana już w 1994 roku. MIP można opisać jako syntetyczne analogi naturalnych, biologicznych układów przeciwciało–antygen zdolne do selektywnego rozpoznawania i wiązania docelowego związku, zamiast innych blisko spokrewnionych cząsteczek. Modyfikowane polimery zapewniają specyficzność i selektywność receptorów biologicznych przy jednoczesnej trwałości i niskich kosztach produkcji. W przeciwieństwie do naturalnych receptorów, których warunki przechowywania są bardzo restrykcyjne, MIP są stabilne w szerokim zakresie pH,



Rys. 1. Schemat powstawania polimerów z odciskiem molekularnym

rozpuszczalników i temperatury. Ze względu na swoje właściwości MIP stały się atrakcyjne w wielu dziedzinach, takich jak oczyszczanie i separacja, chemo/bio-sensory czy sztuczne przeciwciała. W ostatnich kilku latach jednym z najbardziej obiecujących zastosowań technicznych została produkcja włókien MIP-SPME, rozwiązujących problem selektywności powłok.

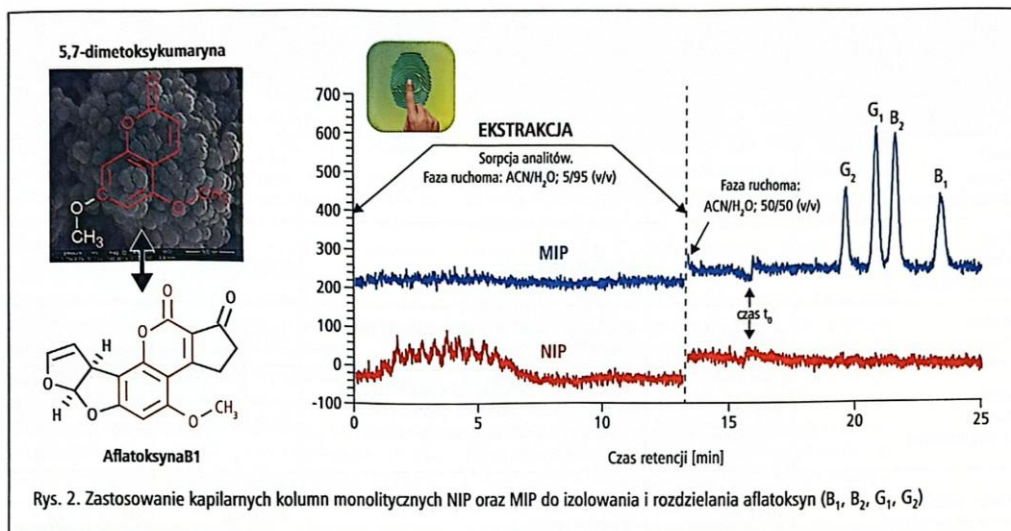
Synteza MIP

Polimery z nadrukiem molekularnym uzyskuje się przez kopolimeryzację monomeru funkcyjnego z czynnikiem sieciującym w obecności wybranej człeczki matrycy (rys. 1). W pierwszym etapie syntezy MIP tworzy się kompleks prepolimeryzacyjny pomiędzy człeczką matrycy (związkiem nadrukowywanym) a wybranym monomerem funkcyjnym za pomocą oddziaływań kowalencyjnych, niekowalencyjnych bądź półkowalencyjnych. Następnie, podczas polimeryzacji, kompleks ten jest sieciowany kompatybilnym czynnikiem sieciującym. W ostatnim etapie szablon jest usuwany z matrycy polimerowej z pozostawieniem dobrze zdefiniowanych, trójwymiarowych wgłębnień. Po polimeryzacji matryca jest usuwana z sieci polimerowej, pozostawiając miejsca wiązania, które są komplementarne pod względem wielkości, kształtu i funkcjonalności chemicznej do człeczki matrycy, tworząc w ten sposób polimer zdolny do selektywnego zatrzymywania analitów docelowych (rys. 2).

Człeczka matrycy pełni ważną funkcję podczas wszystkich procesów nadruku molekularnego. Jej zadaniem jest przyłączanie grup funkcyjnych do monomerów. Dlatego też późniejsze właściwości miejsc wiążących są zależne od struktury i funkcjonalności matrycy. Zazwyczaj rolę matrycy pełnią

małe człeczki organiczne, takie jak pestycydy, farmaceutyki, cukry, aminokwasy i peptydy. Monomery funkcyjne składają się z dwóch jednostek: rozpoznającej, która oddziałuje z matrycą, oraz zdolnej do polimeryzacji ze środkiem sieciującym. Miejsce rozpoznawania wybranego monomeru funkcyjnego powinno wykazywać silne interakcje z grupami funkcyjnymi człeczek matrycy, tworząc opisany wcześniej kompleks przed zajściem polimeryzacji. Obecnie istnieje wiele dostępnych komercyjnie monomerów funkcyjnych i do najczęściej stosowanych należą kwas metakrylowy (MAA), metakrylan metylu, 4-winylopirydyna (4-VP), kwas 2-hydroksyetylu (TFMAA) i 3-aminopropylotrietoksylan (APTES). Czynnikiem sieciującym z kolei stabilizuje miejsca rozpoznawania molekularnego, zapewnia stabilność mechaniczną i umożliwia kontrolę porowatości powstającego polimeru. Selektowność i zdolność wiązania syntetyzowanego MIP zależą od ilości zastosowanego środka sieciującego. Niewystarczająca jego ilość skutkuje powstaniem niestabilnych mechanicznie i słabo usieciowanych polimerów. Najczęściej stosowanymi w syntezie MIP czynnikami sieciującymi są dimetakrylan glikolu etylenowego (EGDMA) oraz trimetakrylan trimetylopropanu (TRIM). Dodatkowo istotnym elementem podczas syntezy MIP jest także rozpuszczalnik porogenny (toluen, acetonitryl, chloroform), który wpływa na oddziaływania między matrycą a monomerem, na tworzenie się porów podczas reakcji polimeryzacji, a także służy jako ośrodek dyspersyjny.

Opisano trzy główne podejścia syntezy MIP: kowalencyjne, niekowalencyjne oraz półkowalencyjne. Wykorzystanie pierwszego podejścia pozwala na wytworzenie odwracalnych wiązań kowalencyjnych pomiędzy człeczką matrycy oraz monomeru przed polimeryzacją. Usuwanie matrycy jest zwykle prowadzone przez traktowanie otrzymanych MIP rozpuszczalnikami organicznymi lub przez ekstrakcję Soxhleta. Zastosowanie takiego podejścia prowadzi do powstania polimeru z jednorodnym rozkładem miejsc wiążących, minimalizując tym samym ilość miejsc niespecyficznych. Wadą jest jednak trudność zaprojektowania odpowiedniego kompleksu matryca-monomer, w którym tworzenie i rozerwanie wiązań kowalencyjnych będzie łatwo odwracalne w łagodnych warunkach. Podejście półkowalencyjne również umożliwia wiązanie matrycy za pomocą wiązań kowalencyjnych. Różnica polega na tym, że ponowne wiązanie oparte jest już na oddziaływaniach niekowalencyjnych. Podejście niekowalencyjne wprowadzone przez Arshady'ego i Mosbacha opiera się na tworzeniu się *in situ* kompleksu matryca-monomer w wyniku słabych oddziaływań niekowalencyjnych (tj. wiązań wodorowych, oddziaływań jonowych, oddziaływań van der Waalsa). Matryca usuwana jest poprzez przemycie otrzymanych MIP rozpuszczalnikami organicznymi lub mieszaniną



rozpuszczalników. Podejście to jest najszerzej stosowane do wytwarzania MIP ze względu na eksperymentalną prostotę oraz komercyjną dostępność wielu monomerów zdolnych do interakcji z prawie każdym rodzajem matrycy. W podejściu tym, celem utworzenia kompleksu matryca-monomer, stosuje się nadmiar monomeru. W konsekwencji wolne monomery są losowo usuwane z matrycy polimerowej, co prowadzi do powstania nieselektywnych miejsc wiązania.

Połączenie MIP z mikroekstrakcją do fazy stacjonarnej

Połączenie nadruku molekularnego ze SPME po raz pierwszy zostało opisane na początku XXI wieku. Użytkowano wówczas włókno krzemionkowe SPME pokryte MIP do oznaczenia brombuterolu z ludzkiego moczu. Włókna SMPE powlekane MIP można wytwarzać poprzez syntezę MIP na powierzchni włókna ze stali nierdzewnej lub włókna krzemionkowego. Włókna SMPE pokryte MIP mogą być przygotowane przez syntezę MIP na powierzchni stali nierdzewnej lub włókna krzemionkowego. Powlekane włókno może być wkładane bezpośrednio do roztworu próbki. Po ekstrakcji próbka jest wstrzykiwana bezpośrednio do urządzenia analitycznego, a analit jest desorbowany albo za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego w przypadku zastosowania HPLC, albo termicznie w przypadku zastosowania GC. Pojawienie się MIP jako włókien SPME rozwiązało wiele problemów, takich jak koszt włókien komercyjnych, niestabilność chemiczna lub termiczna oraz wyzwania związane z syntezą włókien. Włókna MIP są zwykle łatwe do przygotowania przy niskich kosztach, przy jednoczesnej wytrzymałości i selektywnemu działaniu w stosunku do określonego analitu.

Pierwsze próby wytworzenia włókien MIP-SPME polegały głównie na modyfikacji krzemionki lub monolitów polimerowych. Powstałe w ten sposób materiały były jednak kruche, nieporowate, posiadały słabą stabilność i niską nośność. Zastosowanie stosunkowo taniej i prostej techniki, jaką jest elektropolimeryzacja, pozwoliło na stosunkowo tanie i proste uzyskanie włókien o wysokiej stabilności chemicznej i termicznej. Dodatkowo metody elektropolimeryzacji pozwalają na prostą i szybką technikę kontrolowania grubości polimeru przewodzącego.

Polimery przewodzące mają ogromny potencjał zastosowań w separacji ze względu na ich właściwości, takie jak hydrofobowość, wiązania wodorowe czy możliwość wymiany jonowej i elektroaktywność. Jednymi z najlepiej przebadanych materiałów są polipirrol (PPy) i politiofen, które mają dobrą stabilność środowiskową, mogą być stosowane w neutralnym pH, a ich powłokę można łatwo osadzać zarówno chemicznie, jak i elektrochemicznie na podłożach wykonanych z różnych materiałów. Ciągłe jednak prowadzone są badania nad wykorzystaniem innych polimerów przewodzących. Wykazano, że włókna MIP-SPME mogą być używane nawet 100 razy bez utraty wydajności, wykazując doskonałą zdolność adsorpcji i wysoką selektywność w porównaniu z włóknami komercyjnymi.

Woltamperometria cykliczna to technika elektroanalityczna polegająca na cyklicznej polaryzacji elektrody pracującej WE (ang. *Working Electrode*) liniowo narastającej, a następnie opadającej w czasie z taką samą prędkością, lecz przeciwnym znakiem potencjału, oraz na rejestracji odpowiedzi prądowej tej elektrody. W trakcie pomiaru CV rejestrowany prąd może mieć charakter faradajowski, pojemnościowy bądź stanowić ich superpozycję. Do przeprowadzenia pomiarów CV stosowane jest zwykle trójelektrodowe naczynko

Tabela 2. Przykłady zastosowania techniki MIP-SPME do analizy różnych grup leków terapeutycznych

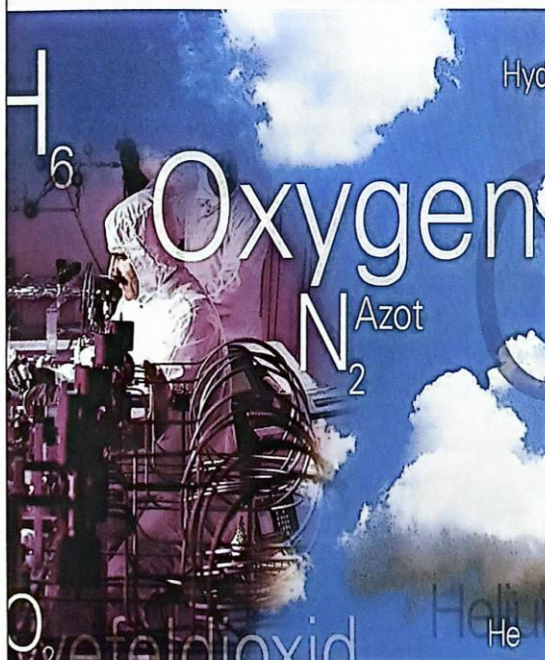
Monomer	Metoda analizy	Badane związki	Rodzaj próbki	LOD [ng/mL]
Antybiotyki				
Pirol Tiofen 3-metylotiofen	LC-MS	linezolid, daptomycyna, amoksycylina	sztuczny płyn ustrojowy i osocze	29
Pirol Tiofen 3-metylotiofen	LC-MS	amoksycylina	osocze	31
Tiofen 3-metylotiofen	HPLC-MS	amoksycylina, cefotaksym, metronidazol i ich metabolity	osocze	–
Pirol Tiofen 3-metylotiofen	HPLC-UV LC-MS/MS	amoksycylina, cefotaksym, ciprofloksacyna, daptomycyna, flukonazol, gentamycyna, klindamycyna, linezolid, metronidazole, moksyflokscyna	krew surowa	24–58 126–198
Kwas metakrylowy 4-winylopirydyna	HPLC-UV	ciprofloksacyna, ofloksacyna, norfloksacyna, lewofloksacyna	osocze, surowica, tabletki	0,023–0,033
Kwas metakrylowy	LC-MS/MS	danofloksacyna, norfloksacyna, enrofloksacyna, ciprofloksacyna	mocz	2,0–10,0
Kwas metakrylowy	–	tertacyklina, oksytetracyklina, chlorotetracyklina, doksyacyklina	mleko krowie	–
Leki przeciwwirusowe				
Kwas akrylowy	LC-DAD-ESI/MS	abakawir	mocz	0,0101–0,0136
Leki przeciwzapalne i przeciwbólowe				
Pirol	IMS	naproksen, ibuprofen, kwas mefenamowy	surowica	0,07–0,37
4-winylopirydyna	LC-MS	ketoprofen, fenbufen, ibuprofen	osocze	2,01–7,1
Leki β -adrenolityczne				
Kwas metakrylowy	HPLC-UV	propranolol, pindolol	osocze i mocz	320
Kwas metakrylowy	LC-MS/MS	oksoprenolol, atenolol, propranolol, nadolol, pindolol, labetalol, metoprolol	mocz	1,0
Leki przeciwdepresyjne				
Kwas metakrylowy	CE-UV	dopamina, epinefryna, norepinefryna	osocze i mocz	0,879–1,252
Inne związki				
Kwas metakrylowy	CE	efedryna, pseudoefedryna	mocz i surowica	0,96–1,1
3-aminopropylotrietoksylan	–	fenobarbital	mocz	9,88
Kwas winylosulfonowy	GC-FID	kwas walproinowy	surowica, syrop, tabletki	10
Kwas metakrylowy	GC-FID	metamfetaminy	ślina	14
Kwas metakrylowy	GC-MS	androsteron, stanolon, androstenedion, metylotestosteron	mocz	0,008–0,20
Kwas metakrylowy	LC-MS	brombuterol	mocz	10
Kwas metakrylowy	GC-MS	diacetylmorfina, analogi	próbki wodne	1–300

elektrochemiczne, w którym zaszczełniona jest elektroda pracująca, elektroda odniesienia RE (ang. *Reference Electrode*) oraz elektroda pomocnicza CE (ang. *Counter Electrode*). Na granicy faz elektrody pracującej i roztworu wytwarza się podwójna warstwa elektryczna przypominająca kondensator płasko-równoległy. Zachowanie warstwy podwójnej podobne jest do zachowania kondensatora elektrostatycznego, którego ładunek jest określony przez niedobór bądź nadmiar elektronów w materiale elektrody oraz (dla zachowania elektroobojętności) przez nadmiarowe kationy lub aniony w roztworze elektrolitu podstawowego.

Ocenę morfologii oraz właściwości fizykochemicznych nowo otrzymanych włókien MIP-SPME prowadzi się z wykorzystaniem między innymi metody skaningowej (SEM) i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), voltamperometrii cyklicznej, spektroskopii w podczerwieni (np. FTIR), metod dyfrakcyjnych (np. SAXS, WAXS) oraz magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Skaningowy mikroskop elektronowy jest urządzeniem, w którym strumień ukierunkowanych elektronów bombarduje badaną próbkę, skanując jej powierzchnię linią po linii. Pod wpływem wiązki elektronów próbka emituje różne sygnały, takie jak: elektrony wtórne, elektrony wstecznie rozproszone oraz charakterystyczne promieniowanie rentgenowskie, które są rejestrowane za pomocą odpowied-

nich detektorów, a następnie przetwarzane na obraz próbki lub widmo promieniowania rentgenowskiego. W zależności od zastosowanego detektora możliwe jest obserwowanie różnic w składzie pierwiastkowym próbki – detektor elektronów wstecznie rozproszonych BSE (ang. *Backscattered Electron*), topografii powierzchni próbki – detektor elektronów wtórnych SE (ang. *Secondary Electron*) czy występujących pierwiastków – spektrometr rentgenowski EDX (ang. *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*). Spektroskopia w podczerwieni jest metodą umożliwiającą badanie drgań cząsteczek związków chemicznych. Dostarcza informacji o budowie chemicznej związków poprzez identyfikację grup funkcyjnych. Próbkę naświetlana jest promieniowaniem z zakresu podczerwieni (1000 nm – 20 000 nm). W praktyce największe zastosowanie ma spektroskopia w środkowej podczerwieni od 2,5 μm do 25 μm , czyli od $\bar{\nu} = 4000 \text{ cm}^{-1}$ do $\bar{\nu} = 400 \text{ cm}^{-1}$. Niskokątowe rozpraszanie promieniowania X umożliwia badanie struktur o bardzo dużej periodyczności. Analiza rozpraszania niskokątowego dostarcza informacji o wymiarach i geometrii materiałów nanocząsteczkowych. Technika ta jest głównie wykorzystywana w badaniu polimerów. Umożliwia określenie struktur złożonych z nanoobjektów, w tym obserwacji dynamiki tworzenia się takich struktur na powierzchni.

Gazy i technika dla laboratorium

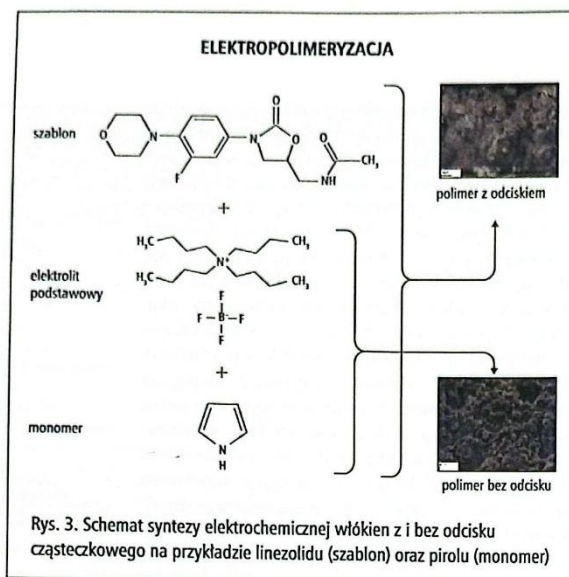
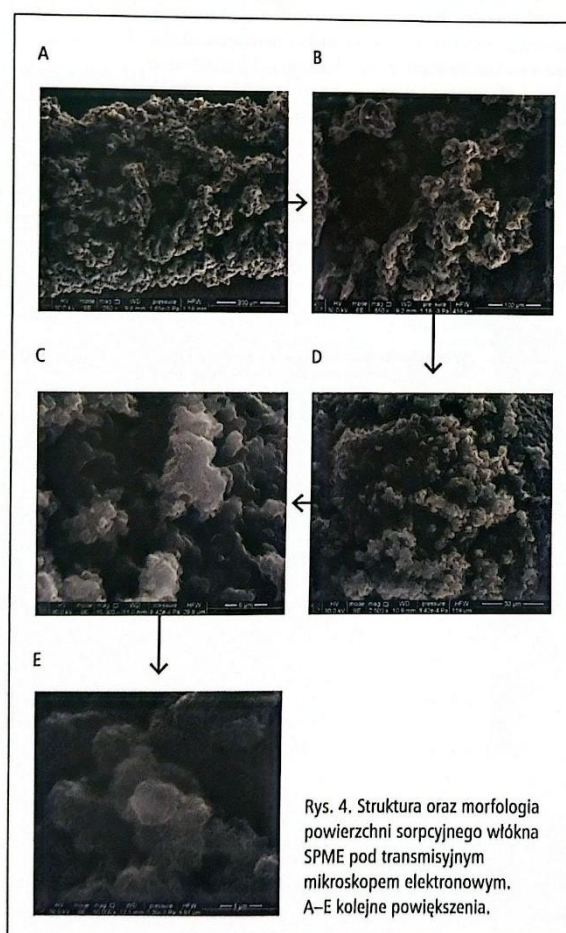


Spółka Messer jest producentem i dystrybutorem gazów czystych, specjalnych oraz mieszanin gazowych. Oferuje swoim Klientom:

- gazy wysokiej czystości do zastosowań analitycznych (do 99,99999% obj.)
- mieszaniny wzorcowe i kalibracyjne wykonane zgodnie z normą ISO 17025
- gazy laboratoryjne
- armaturę do poboru i rozpraszania gazów specjalnych (reduktory, stacje rozprężania, laboratoryjne punkty poboru gazów)
- kompleksową realizację systemów magazynowania i instalacji rozpraszania gazów
- ciśnieniowe i beciśnieniowe zbiorniki kriogeniczne
- dostawy ciekłego azotu do małych zbiorników kriogenicznych
- doradztwo techniczne i technologiczne w zakresie zastosowań gazów specjalnych.

MESSER 
Gases for Life

Messer Polska Sp. z o.o.
ul. Maciejkowska 30
41-503 Chorzów
tel. +48 32 77 26 000
fax +48 32 77 26 115
kontakt.pl@messergroup.com
www.messer.pl



Zastosowanie MIP jako selektywnych materiałów sorpcyjnych pozwala na opracowanie selektywnej procedury przygotowania próbek przed ostateczną analizą. MIP zostały z powodzeniem wykorzystane do oznaczania związków w szerokim zakresie mas cząsteczkowych, od związków lotnych do peptydów i białek, a nawet wirusów i komórek. Włókna pokryte MIP są obecnie uważane za jedne z najbardziej wytrzymałych, powtarzalnych (efekt matrycy), niedrogich, łatwych do przygotowania oraz wysoce selektywnych. W ostatnim czasie odnotowano kilka zastosowań farmaceutycznych SPME z nadrukiem molekularnym i zastosowanie różnych konfiguracji aparatury analitycznej (tab. 2). MIP-SPME zostało użyte do ekstrakcji często stosowanych leków przeciwbakteryjnych, między innymi amoksycyliny, cefotaksymu, metronidazolu oraz ich metabolitów z próbek biologicznych, takich jak mocz, osocze i pełna krew ludzka. Zastosowanie MIP-SPME skraca czas oraz zużycie toksycznych rozpuszczalników. Proces przygotowania próbki może być dodatkowo w pełni zautomatyzowany i sprzężony *on-line* z GC-MS lub LC-MS.

Podczas badań wykorzystano włókna sorpcyjne ze stali medycznej (Ni-Cr) z naniesioną w wyniku polimerizacji elektrochemicznej warstwą polipirolu (PPy), politiofenu (PTh) oraz poli(3-metylotiofenu) (PMeTh). Proces polimerizacji prowadzono przy zastosowaniu metody potencjodynamicznej, opartej na cyklicznych zmianach potencjału w przedziale czasowym (voltamperometria cykliczna), w układzie trójelektrodowym o budowie:

- elektroda srebrowa (Ag/AgCl) – elektroda referencyjna,
- blaszka platynowa (Pt) – przeciwelektroda,
- drukik ze stali medycznej (Ni-Cr) – elektroda robocza (pracująca).

Metodę elektrochemicznej polimerizacji zastosowano w celu otrzymania włókien bez odcisku oraz z odciskiem cząsteczkowym (NIP/MIP-SPME). Stąd, do elektrolitu podstawowego, obok odpowiedniego monomeru, dodawano określone stężenie molekuly szablonu (odpowiedniego leku) (rys. 3).

Kontrolny polimer bez odcisku cząsteczkowego (NIP) przygotowano za pomocą podobnej procedury do tej, którą zastosowano do otrzymania warstwy MIP, ale w nieobecności szablonu. Każdorazowo podczas procesu elektropolimerizacji używano tetrafluoroboranu tetrabutylamonowego w acetonitrylu jako elektrolitu podstawowego ($c = 0,1 \text{ M}$). Podczas prowadzenia etapu syntezy stosowano podwyższony górny potencjał, co pozwoliło na wyeliminowanie procesu aktywacji.

W celu dokładnego określenia kształtu oraz morfologii uzyskanych włókien polimerowych przeprowadzono obrazowanie z wykorzystaniem TEM. Wykonane badania ujawniły ziarnistą, wielofazową strukturę badanych materiałów. Wielkość globul (dp) w zależności od rodzaju włókna polimerowego wynosi $0,5 \mu\text{m} \pm 5,0 \mu\text{m}$ (rys. 4).

Zaprezentowane wyniki zdają się potwierdzić właściwości sorpcyjne polimerowych materiałów elektroprzewo-

dzących z odcisniętą cząsteczką (MIP-SPME). Stwarza to nowe możliwości na polu selektywnej ekstrakcji leków i ich potencjalnych metabolitów. Ponadto, wykorzystanie polimerowych włókien sorpcyjnych w znaczący sposób usprawnia izolowanie związków biologicznie aktywnych, pozostających w niskich stężeniach w matrycach wyjściowych. Wysoka selektywność sorbentów SPME z odcisniętą cząsteczką stwarza możliwość ich zastosowania do izolowania z rzeczywistych próbek biologicznych (krew/tkanka). Takie podejście skraca czas przygotowania próbek i minimalizuje ilość (objętość) materiału biologicznego dla celów analitycznych.

Podsumowanie

Terapeutyczne monitorowanie leków oraz ich aktywnie farmakologicznych metabolitów umożliwia ocenę ich farmakokinetyki i metabolizmu, jak również ustalenia odpowiedniego dawkowania pod kątem terapii pacjenta. Technika MIP-SPME stwarza nowe możliwości w zakresie selektywnej ekstrakcji leków i ich potencjalnych metabolitów. Dodatkowo zastosowanie polimerowych włókien sorpcyjnych znacząco poprawia izolację związków biologicznie aktywnych na niskich poziomach stężeń w wyjściowych matrycach. Wysoka selektywność sorbentów SPME z nadrukiem molekularnym umożliwia ich wykorzystanie do izolacji związków z rzeczywistych próbek

biologicznych. Podejście to skraca czas przygotowania próbek i minimalizuje ilość (objętość) potrzebnego materiału biologicznego do celów analitycznych. Analiza leków wymaga konieczności wprowadzenia selektywnych metod izolowania oraz wzbogacania tych związków z materiału biologicznego na poziomie niskich stężeń. Jako selektywne adsorbenty dla przyszłej aplikacji w diagnostyce medycznej coraz częściej stosuje się polimery przewodzące na nośnikach metalicznych w doświadczeniach *in vitro*, jak również *in vivo* w badaniach nad zwierzętami. Otrzymuje się je w reakcji polimeryzacji elektrochemicznej odpowiednich substratów. Ważnym celem jest opracowanie nowych, skutecznych procedur analitycznych pozwalających na oznaczanie leków przeciwbakteryjnych i ich metabolitów, które będą stanowiły narzędzie do monitorowania terapii infekcji bakteryjnych oraz wskazania odpowiedniego dawkowania danego leku, tak zwane okno terapeutyczne, indywidualnie dla każdego pacjenta.

Daria Janiszewska*, Małgorzata Szultka-Młyńska*, Bogusław Buszewski*,**

*Katedra Chemii Środowiska i Bioanalizy,

Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

**Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii,

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

NOWA GENERACJA SPEKTROFOTOMETRÓW LABORATORYJNYCH VIS I UV-VIS





a xylem brand

- photoLab® 7100 VIS (320-1100 nm)
- photoLab® 7600 UV-VIS (190-1100 nm)
- **Bezodczynnikowe oznaczenia ChZT, NO₃ i NO₂**
- Intuicyjna obsługa
- Najwyższa precyzja
- Złożone procedury AQA



Rutyna laboratoryjna staje się czystą zabawą ...
... podczas gdy resztą zajmuje się Twój fotometr



Złożone procedury stają się banalnie proste ...
... dzięki predefiniowanym oraz programowalnym metodom



Rejestracja i analiza widm dla każdej aplikacji ...
... od kontroli jakości po prace naukowo-badawcze



Szybszy od każdej dygestacji ...
... photoLab® 7600 UV-VIS oferuje innowacyjne metody oznaczeń bezodczynnikowych OptRF

WTW Pomiarowy i Analityczny Sprzęt Techniczny Sp. z o. o.
 ul. Rogowska 5, 54-440 Wrocław

tel.: 71/ 353 92 13 • faks: 71/ 353 92 15
 info@wtw.pl • www.wtw.pl

Podsumowanie i wnioski

Praca [P1] stanowi przegląd literatury podkreślający znaczenie nowoczesnych technologii, takich jak MALDI-TOF MS, w identyfikacji mikroorganizmów i analizie antybiotykooporności. W pracy [P2] opracowano metodę szybkiej identyfikacji bakterii z próbek klinicznych, co umożliwiło efektywne określanie wrażliwości na antybiotyki. Praca [P3] skupiła się na przyspieszeniu diagnostyki mikroorganizmów przetrwalnikujących poprzez skrócenie czasu inkubacji. Badania [B1] dotyczyły identyfikacji bakterii z próbek od pacjentów z infekcjami dróg oddechowych, a [B2] oceny antybiotykooporności za pomocą testów MBT-STAR-BL i MBT-ASTRA, obejmując nowe zastosowania dla lewofloksacyny i azytromycyny. Prace [P4 - P6] koncentrowały się na rozwoju techniki izolacji i analizy antybiotyków oraz ich metabolitów z próbek biologicznych.

Przedstawione w rozprawie doktorskiej badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. **Wykorzystanie techniki MALDI-TOF MS w identyfikacji mikroorganizmów:** Technika MALDI-TOF MS została skutecznie zaadaptowana do identyfikacji mikroorganizmów izolowanych z trudno gojących się ran pooperacyjnych oraz próbek z górnych dróg oddechowych pacjentów cierpiących na infekcje. Zastosowanie tej technologii przyczyniło się do skrócenia czasu diagnostyki oraz zwiększenia jej precyzji w porównaniu do tradycyjnych metod. Wyniki te stanowią potwierdzenie walidacji metody w diagnostyce klinicznej, co pozwala na szybsze wdrożenie terapii antybiotykowej, szczególnie w przypadkach zakażeń trudnych do leczenia, zgodnie z celem [P2, B1].
2. **Skrócenie czasu inkubacji bakterii przetrwalnikujących i adaptacja MALDI-TOF MS:** Badania nad skróceniem czasu inkubacji mikroorganizmów przetrwalnikujących, takich jak *Bacillus*, oraz adaptacja systemu MALDI-TOF MS do ich identyfikacji pokazały, że innowacyjne podejścia mogą przyspieszyć proces diagnostyczny. Walidacja tych metod pozwala na szybsze wykrycie zagrożeń zarówno w kontekście infekcji klinicznych, jak i w przemyśle spożywczym. Dostosowanie systemu do identyfikacji tych mikroorganizmów wspiera szybszą diagnostykę, zmniejsza ryzyko rozprzestrzeniania się drobnoustrojów opornych i podnosi efektywność procesów przemysłowych, co wpisuje się w cel [P3].
3. **Wykorzystanie MALDI-TOF MS w analizie mechanizmów oporności na antybiotyki:** Zastosowanie MALDI-TOF MS w połączeniu z analizą widma białkowego oraz bazami danych, takimi jak UniProt, pozwoliło na precyzyjną

identyfikację białek związanych z mechanizmami oporności na antybiotyki. Walidacja tej metody wykazała jej skuteczność w skracaniu czasu analizy w porównaniu do tradycyjnych metod genotypowych, oferując wysoką specyficzność i umożliwiając identyfikację szerokiego zakresu patogenów. Integracja wyników masowych z bazami danych białkowymi stanowi nowoczesne narzędzie diagnostyczne, które wspiera szybkie określenie mechanizmów oporności i ułatwia dobór odpowiedniej terapii celowanej, zgodnie z celem [P2, B2].

4. **Zastosowanie testu MBT-ASTRA w analizie oporności na antybiotyki:** Po raz pierwszy zastosowano test MBT-ASTRA do analizy oporności *Staphylococcus aureus* na azytromycynę i lewofloksacynę, co stanowi istotny wkład w rozwój metod szybkiej diagnostyki, szczególnie w kontekście szczepów MRSA. Walidacja tej metody wykazała również różnice w skuteczności i precyzji narzędzi diagnostycznych, takich jak Zybio EX2600 i Bruker Microflex LT/SH. Badania te podkreślają znaczenie walidacji nowoczesnych narzędzi diagnostycznych i ich potencjał w precyzyjnym dostosowaniu terapii antybiotykowej, co wpisuje się w cel [B2].
5. **Opracowanie selektywnej metody izolacji antybiotyków:** Opracowana innowacyjna metoda selektywnej izolacji antybiotyków z osocza ludzkiego przy użyciu włókien SPME pokrytych polimerami z odciskiem molekularnym wykazała znaczną poprawę w selektywności i efektywności izolacji. Walidacja tej metody pozwala na precyzyjne monitorowanie stężenia leków, co jest kluczowe w kontekście personalizacji leczenia. Wyniki te otwierają nowe możliwości diagnostyczne i wspierają dostosowanie terapii, szczególnie w przypadkach wymagających dokładnego doboru dawki leku, zgodnie z celami [P5, P6].
6. **Zastosowanie SPME-LC-MS/MS do oznaczania antybiotyków w próbkach osocza:** Po raz pierwszy zastosowano technikę SPME-LC-MS/MS do oznaczania antybiotyków w próbkach osocza pobranych od pacjentów intensywnej terapii. Walidacja tej metody umożliwiła precyzyjne monitorowanie stężeń leków i ich metabolitów, co ma kluczowe znaczenie w personalizacji terapii antybiotykowej w krytycznych przypadkach. Wyniki tych badań wskazują na dużą skuteczność i bezpieczeństwo tej metody, a także jej potencjał w ograniczaniu ryzyka związanego z antybiotykoopornościami, zgodnie z celami [P5, P6].

Wnioski z przeprowadzonych badań podkreślają istotną rolę nowoczesnych technik spektrometrycznych, takich jak MALDI-TOF MS, w diagnostyce mikroorganizmów i analizie mechanizmów antybiotykooporności. Zastosowanie tej technologii umożliwiło szybką i

precyzyjną identyfikację patogenów, w tym bakterii przetrwalnikujących, oraz znacząco skróciło czas inkubacji, co ma kluczowe znaczenie zarówno w diagnostyce klinicznej, jak i w przemyśle spożywczym. Po raz pierwszy wykorzystano test MBT-ASTRA do analizy oporności szczepów MRSA na lewofloksacynę i azytromycynę, co otwiera nowe możliwości diagnostyczne w leczeniu zakażeń wywołanych przez szczepy wielolekooporne. Porównanie wyników uzyskanych z wykorzystaniem spektrometrów Zybio EX2600 i BrukerMicroflex LT/SH dostarczyło cennych danych na temat skuteczności tych narzędzi w analizie oporności na imipenem.

Innowacyjnym osiągnięciem było opracowanie włókien SPME pokrytych polimerami z odciskiem molekularnym (MIP), które po raz pierwszy zastosowano w analizie antybiotyków w osoczu ludzkim z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS. Metoda ta pozwala na precyzyjne monitorowanie stężeń leków i ich metabolitów, wspierając personalizację terapii oraz zwiększając jej skuteczność i bezpieczeństwo, szczególnie w warunkach intensywnej terapii.

Badania te potwierdzają ogromny potencjał technik spektrometrycznych w diagnostyce mikrobiologicznej i terapii antybiotykowej, wskazując na możliwość dalszego rozwijania i wdrażania tych narzędzi w praktyce klinicznej. Optymalizacja tych metod i ich integracja z bazami danych białkowych, takimi jak UniProt, umożliwia lepsze zrozumienie mechanizmów antybiotykooporności oraz opracowanie celowanych strategii terapeutycznych w odpowiedzi na globalne wyzwania zdrowotne.

Dorobek naukowy

Edukacja

- 10.2020 – obecnie Szkoła Doktora Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki
Studia doktoranckie w dziedzinie nauk chemicznych
- 10.2018 – 06.2020 Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki
Magister chemii (specjalność chemia kryminalistyczna)
- 10.2017 – 06.2019 Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
Magister biotechnologii
- 10.2014 – 06.2017 Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
Licencjat biotechnologii

Staże

- 04 – 08.12.2023 Polmlek (Grudziądz, Polska)
Staż dotyczył analizy antybiotyków oraz mikroorganizmów stanowiących kontaminację w produktach mleczarskich

Szkolenia

- 05.2023 „qPCR Gene Expression”
Szkolenie prowadzone przez ThermoFisher Scientific (Polska)

Publikacje naukowe

Wchodzące w skład dysertacji

IF – impact factor, PM –punktacja ministerialna

- [P1] M. Szultka-Młyńska, **D. Janiszewska**, B. Buszewski, *Molecularly imprinted polymers as solid phase microextraction fibers for the isolation of selected antibiotics from human plasma*, Materials (2021) 14: 1-24.
IF₂₀₂₁ = 3,748 PM = 140 doi: 10.3390/ma14174886
- [P2] M. Szultka-Młyńska, **D. Janiszewska**, P. Pomastowski, M. Złoch, W. Kupczyk, B. Buszewski, *Identification of bacteria associated with post-operative wounds of patients with use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry approach*, Molecules (2021) 26: 1-24.
IF₂₀₂₁ = 4,927 PM = 140 doi: 10.3390/molecules26165007
- [P3] **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, *Analityka antybiotyków beta-laktamowych w układzie in vitro vs. in vivo*, Wiadomości Chemiczne (2022) 76: 109-127.
PM = 20 doi: 10.53584/wiadchem.2022.3.1
- [P4] **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, *Zastosowanie techniki MIP-SPME do terapeutycznego monitorowania leków w próbkach biologicznych*, Analityka: nauka i praktyka (2022) 23: 11-19,
PM = 20

- [P5]**D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, P. Pomastowski, B. Buszewski, „Omic” approaches to bacteria and antibiotic resistance identification, *International Journal of Molecular Sciences* (2022) 23: 1-33
IF₂₀₂₂ = 5,600 PM = 140 doi:10.3390/ijms23179601
- [P6] **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Szultka-Młyńska, Implications of sample preparation methods on the MALDI-TOF MS identification of spore-forming *Bacillus* species from food samples: a closer look at *Bacillus licheniformis*, *Peribacillus simplex*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus flexus*, and *Bacillus marisflavi*, *ACS Omega* (2023) 8: 34196-35441
IF₂₀₂₃ = 3,700 PM = 70 doi:10.1021/acsomega.3c04354

Publikacje niewchodzące w skład dysertacji

1. M. Szultka-Młyńska, **D. Janiszewska**, K. Pauter, B. Buszewski, *Bioanalitika mikroorganizmów z różnych matryc biologicznych*, *Analityka: nauka i praktyka* (2020) 21: 4-6, 8-11.
PM = 20
2. **D. Janiszewska**, P. Pomastowski, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, *Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne w analizie białek mleka*, *Wiadomości Chemiczne* (2021) 75: 943-957.
PM = 20
3. K. Wróblewski, I. Dybała, A. Petruczynik, M. Szultka-Młyńska, **D. Janiszewska**, J. Róg, H. Karakuła-Juchnowicz, D. Juchnowicz, B. Buszewski, *Optimization of chromatographic system for detection and determination of carbamazepine in pharmaceutical formulation, serum, and saliva by HPLC-DAD*, *Acta Poloniae Pharmaceutica* (2022) 79: 809-826.
IF₂₀₂₂ = 0,4 PM = 100 doi:10.32383/appdr/161081
4. K. Wróblewski, M. Szultka-Młyńska, **D. Janiszewska**, A. Petruczynik, B. Buszewski, *Development of the validated stability-indicating method for the determination of vortioxetine in bulk and pharmaceutical formulation by HPLC-DAD, stress degradation kinetics studies and detection of degradation products by LC-ESI-QTOF-MS*, *Molecules* (2022) 27: 1-21;
IF₂₀₂₂ = 4,600 PM = 140; doi:10.3390/molecules27061883
5. T. Tuzimski, A. Petruczynik, B. Kaproń, T. Plech, A. Makuch-Kocka, **D. Janiszewska**, M. Sugajski, B. Buszewski, M. Szultka-Młyńska, *In vitro and in silico of cholinesterases inhibition and in vitro and in vivo anti-meloma activity investigations of extracts obtained from selected Berberis species*, *Molecules* (2024) 29: 1-37
IF₂₀₂₃ = 4,200 PM = 140 doi: 10.3390/molecules29051048
6. G. Gużewska, **D. Janiszewska**, A.B. Florkiewicz, G. Czeszewska-Rosiak, P. Pomastowski, M. Szultka-Młyńska, A. Tretyn, *Lokalna i ekologiczna żywność: aspekty mikrobiologiczne w mleczarstwie*, *Przegląd Mleczarski: miesięcznik przeznaczony dla pracowników przemysłu mleczarskiego* (2024) 1: 34-44
PM = 5
7. T. Tuzimski, S. Szubartowski, J. Stążka, K. Baczewski, **D. Janiszewska**, V. Railean, B. Buszewski, M. Szultka-Młyńska, *Potential clinical application of analysis of bisphenols in pericardial fluid from patients with coronary artery disease with the use of liquid chromatography combined with fluorescence detection and triple quadrupole mass spectrometry*, *Molecules* (2025) 30: 1-27
IF₂₀₂₄ = 4,600 PM = 140 doi:10.3390/molecules30010140
8. T. Tuzimski, A. Petruczynik, T. Plech, M. Sugajski, A. Frydrysiak-Brzozowska, M. Szultka-Młyńska, **D. Janiszewska**, B. Wasilewska, B. Buszewski, *Determination of selected isoquinoline alkaloids from Corydalis species extracts by liquid chromatography and their in*

vitro and in silico cholinesterases inhibition and in vitro and in vivo cytotoxic activity against human melanoma cells, Fitoterapia (2025) 185: 1-14.

IF₂₀₂₃ = 2,600 PM = 100 doi: 10.1016/j.fitote.2025.106750

9. T. Tuzimski, K. Baczewski, V. Railean, **D. Tarkowska**, M. Szultka-Młyńska, *Potential clinical application of determination of bisphenols in pericardial fluids from patients with coronary artery disease*, Molecules (2026) 31: 1442

IF₂₀₂₄ = 4,600 PM = 140 doi: 10.3390/molecules31091442

Inne

1. **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, M. Złoch, P. Pomastowski, B. Buszewski, *Identification of the mechanisms of antibiotic resistance on the basis of specific m/z values*, w: 17th ISC Modern Analytical Chemistry, Praga (Czechy), 2021, s. 13–18;
2. **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, P. Pomastowski, W. Kupczyk, B. Buszewski, *Identification of bacteria associated with post-operative wounds with the use of MALDI-TOF MS approach*, w: A. K. Surowiak, K. Baberowska, Z. Bacińska i in. (red.), ChemBiotIC Chemistry & Biotechnology International Conference – book of abstracts, Wrocław University of Science and Technology, Wrocław, 2023, s. 96;
3. **D. Janiszewska**, P. Pomastowski, M. Kociołek, M. Szultka-Młyńska, *Analiza klinicznych izolatów bakteryjnych z zastosowaniem technik „-omicznych” w połączeniu z MALDI-TOF MS*, w: 65. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego – book of abstracts, Warszawa, 2023, Polskie Towarzystwo Chemiczne, s. 736, ISBN 978-83-60988-39-8;
4. **D. Janiszewska**, P. Pomastowski, M. Kociołek, M. Szultka-Młyńska, *Analiza klinicznych izolatów bakteryjnych z zastosowaniem technik „-omicznych” w połączeniu z MALDI-TOF MS*, w: 65. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Toruń, 18-22.09.2023 r. Książka abstraktów, 2023, Warszawa, Polskie Towarzystwo Chemiczne, 736 s., ISBN 978-83-60988-39-8;
5. **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Kociołek, M. Szultka-Młyńska, *Assessment of antibiotic resistance using MBT-STAR-BL and MBT-ASTRA tests via MALDI-TOF MS analysis*, w: Advances in Pharmaceutical Analysis (APA2024) & Metabolomics Circle 2024 – book of abstracts, Łódź, 2024, Politechnika Łódzka, s. 67;
6. **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Kociołek, M. Szultka-Młyńska, *Application of MBT-STAR-BL and MBT-ASTRA test for antibiotic resistance analysis based on MALDI-TOF MS technique*, w: 28th International Symposium on Separation Sciences (ISSS2024) – book of abstracts, Messina (Włochy), 2024, s. 236;
7. **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Kociołek, M. Szultka-Młyńska, *Advancing rapid diagnostics: detection of antibiotic resistance using MALDI-TOF MS*, w: FEMS MICRO 2025 Congress – abstract book, Milan (Włochy), 2025, Federation of European Microbiological Societies (FEMS), s. 1962.

Σ IF = 34,375 Σ PM = 1235

Konferencje naukowe

Łączna liczba wystąpień = 15, w tym na konferencjach międzynarodowych = 13

Komunikaty ustne = 8, prezentacje posterowe = 7

Współautorstwo = 1

Komunikaty ustne

1. **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, M. Złoch, P. Pomastowski, B. Buszewski, *Influence of culture conditions and methods of sample preparation on the level of bacterial identification*

- using MALDI-TOF MS technique, 15th International Scientific Conference “The Vital Nature Sign”, Kaunas (Litwa) 20-21.05.2021
2. **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, M. Złoch, P. Pomastowski, B. Buszewski, *Identification of the mechanisms of antibiotic resistance on the basis of specific m/z values*, 17th ISC “Modern Analytical Chemistry”, Praga (Czechy) 16-17.09.2021
 3. **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, P. Pomastowski, M. Złoch, W. Kupczyk, B. Buszewski, *Determination and identification of antibiotic drugs and bacteria strains in post-operative wounds*, 1st International Meeting for Young Analytical Chemists, Kraków (Polska) 27-28.09.2021
 4. **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, *New approach for determination and identification of selected antibiotics and microorganisms for biomedical purpose*, 4th international Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry, Antalya (Turcja) 23-27.03.2022
 5. **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, P. Pomastowski, M. Złoch, B. Buszewski, *Application of „-omic” techniques in bacteria identification*, 26th International Symposium in Separation Science, Ljubljana (Słowenia) 28.06-1.07.2022
 6. **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Szultka Młyńska, *Dobór warunków hodowli bakterii przetrwalnikujących i ich analiza za pomocą techniki MALDI-TOF MS*, XVI Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń (Polska) 29-30.06.2023
 7. **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Szultka-Młyńska, *Detection of antibiotic resistance in clinical bacteria using MALDI-TOF MS and real-time PCR technique*, 27th International Symposium on Separation Science, Kluż-Napoka (Rumunia) 24-27.09.2023
 8. **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Kociołek, M. Szultka-Młyńska, *Application of MBT-STAR-BL and MBT-ASTRA tests for antibiotic resistance analysis based on MALDI-TOF MS technique*, 28th International Symposium on Separation Science, Messyna (Włochy) 22-25.09.2024

Prezentacje posterowe

1. **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, K. Pauter, M. Złoch, P. Pomastowski, B. Buszewski, *Application of hyphenated techniques for the determination and identification of antibiotics and microorganisms from clinical samples*, Metabolomic Circle 2020, Białystok (Polska) 4-6.11.2020
2. **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, *Application of MIP-SPME-LC/MS for the therapeutic drug monitoring in biological samples from patients in the intensive care unit*, 1st International Meeting for Young Analytical Chemists, Kraków (Polska) 27-28.09.2021
3. **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Szultka-Młyńska, *Study on spore-producing bacteria using MALDI-TOF MS technique*, Copenhagen Separation Science Symposium, Kopenhaga (Dania) 25-26.05.2023
4. **D. Janiszewska**, M. Szultka-Młyńska, P. Pomastowski, W. Kupczyk, B. Buszewski, *Identification on bacteria associated with post-operative wound patients with the use of MALDI-TOF MS approach*, Chemistry & Biotechnology International Conference ChemBiotIC, Wrocław (Polska) 22-23.06.2023
5. **D. Janiszewska**, P. Pomastowski, M. Kociołek, M. Szultka-Młyńska, *Analiza klinicznych izolatów bakteryjnych z zastosowaniem technik „-omicznych” w połączeniu z MALDI-TOF MS*, 65. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego PTChem, Toruń (Polska) 18-22.09.2023
6. **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Kociołek, M. Szultka-Młyńska, *Assessment of antibiotic resistance using MBT-STAR-BL and MBT-ASTRA test via MALDI-TOF MS analysis*, Advance in Pharmaceutical Analysis – MetabolomicsCircle, Łódź (Polska) 14-16.11.2024

7. **D. Janiszewska**, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Kociołek, M. Szultka-Młyńska, *Advancing rapid diagnostics: detection of antibiotic resistance using MALDI-TOF MS*, FEMS MICRO MILAN 2025, Mediolan (Włochy) 14-17.07.2025

Współautorstwo

1. **M. Szultka-Młyńska**, **D. Janiszewska**, B. Buszewski, *Application of electrochemistry/mass spectrometry for the metabolic study of drugs from different therapeutic groups in case of biomedical diagnostic*, 6th International Workshop on Electrochemistry/Mass Spectrometry ElCheMS, Münster (Niemcy) 27-28.05.2021

Projekty badawcze/granty

1. Grant dla Doktorantów oraz Młodych Naukowców: *Identyfikacja produktów metabolizmu antybiotyków beta-laktamowych w warunkach modelowych wobec enzymów mikrosomalnych wyizolowanych w komórek wątroby ludzkiej* (nr PDB/granty wydziałowe)
2. **NCN PRELUDIUM** – kierownik projektu: *Spektrometria mas w detekcji modyfikacji lipidu A jako markera oporności na polimiksyne w zakażeniach szpitalnych*, nr 2025/57/N/ST4/03664, 2026-2028, **kwota: 139 934 PLN**, projekt w trakcie realizacji

Finansowanie wyjazdów zagranicznych

3. Dofinansowanie w ramach Minigrantów Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych AST UMK na realizację wyjazdu: *17th International Students Conference 'Modern Analytical Chemistry*, Praga (Czechy) 16-17.09.2021
4. Dofinansowania w ramach programu PROM 2021 na realizację wyjazdu: *26th International Symposium in Separation Science*, Ljubljana, (Słowenia) 28.06-1.07.2022
5. Dofinansowania w ramach Minigrantów Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych AST UMK na realizację wyjazdu: *Copenhagen symposium on separation science CSSS 2023*, Kopenhaga (Dania) 25-26.05.2023
6. Dofinansowanie w ramach Minigrantów Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych AST UMK na realizację wyjazdu: *27th International Symposium on Separation Science*, Kluż-Napoka (Rumunia) 24-27.09.2023
7. Dofinansowanie w ramach Minigrantów Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych AST UMK na realizację wyjazdu: *28th International Symposium on Separation Science*, Messyna (Włochy) 22-25.09.2024

Nagrody

1. Nagroda zespołowa JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia w dziedzinie organizacyjnej w 2023 roku;
2. Nagroda zespołowa JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia w dziedzinie nauki i badań w 2021 roku;
3. Wyróżnienie w konkursie „Najlepszy flash-talk” podczas 27th International Symposium on Separation Science, Kluż-Napoka (Rumunia) 24-27.09.2023.

Udział w innych projektach

1. Członkostwo w Uczelni Badawczej, Inicjatywy Doskonałości – Uczelnia Badawcza Centrum Doskonałości ToPerMed „W kierunku medycyny spersonalizowanej” – 2021 – obecnie

2. Współorganizacja warsztatów „Technika MALDI w rutynowej diagnostyce klinicznej – warsztaty z identyfikacji patogenów klinicznych i detekcji antybiotykooporności” 03.2024
3. Współorganizacja konferencji naukowej „65. Zjazd Naukowego Polskiego Towarzystwa Chemicznego” 18-22.09.2023, Toruń

Oświadczenia współautorów

Toruń, dnia 04.05.2026 r.

Mgr Daria Tarkowska
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydział Chemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

**Rada Dyscypliny Nauki Chemiczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [M. Szultka-Młyńska, D. Janiszewska, B. Buszewski, 2021, Molecularly imprinted polymers as solid phase microextraction fibers for the isolation of selected antibiotics from human plasma, Materials, 14, 1-24] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptów oraz metodologii, zbieraniu i interpretacji danych, dyskusji wyników.

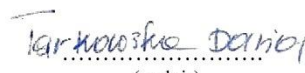
Niniejszym oświadczam, że w pracy [M. Szultka-Młyńska, D. Janiszewska, P. Pomastowski, M. Złoch, W. Kupczyk, B. Buszewski, 2021, Identification of bacteria associated with post-operative wounds of patients with use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry approach, Molecules, 26, 1-24] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptów, przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników, przygotowanie wstępnej wersji i korekcie manuskryptu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, 2022, Analityka antybiotyków β -laktamowych w układzie in vitro vs. in vivo, Wiadomości Chemiczne, 76, 3-4] mój udział polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, przeglądzie literatury, przygotowaniu wstępnej wersji i korekcie manuskryptu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, 2022, Zastosowanie techniki MIP-SPME do terapeutycznego monitorowania leków w próbkach biologicznych, Analityka: nauka i praktyka, 23, 11-19] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptu, przeglądzie literatury, przygotowaniu wstępnej wersji i korekcie manuskryptu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, P. Pomastowski, B. Buszewski, 2022, „Omic” approaches to bacteria and antibiotic resistance identification, International Journal of Molecular Sciences, 23, 1-33] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu manuskryptu, przeglądzie literaturowym, przygotowaniu wstępnej wersji i korekcie manuskryptu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, M. Złoch, P. Pomastowski, M. Szultka-Młyńska, 2023, Implications of sample preparation methods on the MALDI-TOF MS identification of spore-forming Bacillus species from food samples: a closer look at Bacillus licheniformis, Peribacillus simplex, Lysinibacillus fusiformis, Bacillus flexus, and Bacillus marisflavi, ACS Omega, 8, 34196-35441] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptów, przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników, przygotowanie wstępnej wersji i korekcie manuskryptu.


.....
(podpis)

Toruń, dnia 02.08.2024 r.

Dr hab. Małgorzata Szultka-Młyńska, prof. UMK
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki, Wydział Chemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

**Rada Dyscypliny Nauki Chemiczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [M. Szultka-Młyńska, D. Janiszewska, B. Buszewski, 2021, Molecularly imprinted polymers as solid phase microextraction fibers for the isolation of selected antibiotics from human plasma, Materials, 14, 1-24] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptu oraz metodologii, zbieraniu i interpretacji danych, dyskusji wyników, przygotowaniu wstępnej wersji i korekcie manuskryptu i pełnieniu nadzoru merytorycznego.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [M. Szultka-Młyńska, D. Janiszewska, P. Pomastowski, M. Złoch, W. Kupczyk, B. Buszewski, 2021, Identification of bacteria associated with post-operative wounds of patients with use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry approach, Molecules, 26, 1-24] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptu, korekcie manuskryptu i pełnieniu nadzoru merytorycznego.

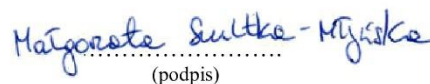
Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, 2022, Analityka antybiotyków β -laktamowych w układzie in vitro vs. in vivo, Wiadomości Chemiczne, 76, 3-4] mój udział polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji manuskryptu, korekcie manuskryptu i pełnieniu nadzoru merytorycznego.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, B. Buszewski, 2022, Zastosowanie techniki MIP-SPME do terapeutycznego monitorowania leków w próbkach biologicznych, Analityka: nauka i praktyka, 23, 11-19] mój udział polegał na współudziale przy

opracowaniu koncepcji manuskryptu, korekcie manuskryptu i pełnieniu nadzoru merytorycznego.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, **M. Szultka-Młyńska**, P. Pomastowski, B. Buszewski, 2022, „Omic” approaches to bacteria and antibiotic resistance identification, International Journal of Molecular Sciences, 23, 1-33] mój udział polegał na mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptu, korekcie manuskryptu i pełnieniu nadzoru merytorycznego.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, M. Złoch, P. Pomastowski, **M. Szultka-Młyńska**, 2023, Implications of sample preparation methods on the MALDI-TOF MS identification of spore-forming Bacillus species from food samples: a closer look at Bacillus licheniformis, Peribacillus simplex, Lysinibacillus fusiformis, Bacillus flexus, and Bacillus marisflavi, ACS Omega, 8, 34196-35441] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptu, korekcie manuskryptu oraz pełnieniu nadzoru merytorycznego.


(podpis)

Toruń, dnia 28.08.2024 r.

Dr hab. Paweł Pomastowski, prof. UMK
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Ul. Wileńska 4, 87-100 Toruń

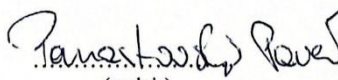
**Rada Dyscypliny Nauki Chemiczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [M. Szultka-Młyńska, D. Janiszewska, **P. Pomastowski**, M. Złoch, W. Kupczyk, B. Buszewski, 2021, Identification of bacteria associated with post-operative wounds of patients with the use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry approach. *Molecules*, 26, 1-24] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptu oraz korekcie manuskryptu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, **P. Pomastowski**, B. Buszewski, 2022, „Omic” approaches to bacteria and antibiotic resistance identification, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1-33] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptu oraz korekcie manuskryptu.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, M. Złoch, **P. Pomastowski**, M. Szultka-Młyńska. 2023, Implications of sample preparation methods on the MALDI-TOF MS identification of spore-forming *Bacillus* species from food samples: a closer look at *Bacillus licheniformis*, *Peribacillus simplex*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus flexus*, and *Bacillus marisflavi*, *ACS Omega*, 8, 34196-35441] mój udział polegał na współudziale przy opracowaniu koncepcji manuskryptu oraz korekcie manuskryptu.


(podpis)

Toruń, dnia 28.08.2024 r.

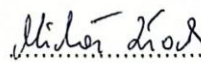
Dr Michał Złoch
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
ul. Wileńska 4, 87-100 Toruń

**Rada Dyscypliny Nauki Chemiczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [M. Szultka-Młyńska, D. Janiszewska, P. Pomastowski, **M. Złoch**, W. Kupczyk, B. Buszewski, 2021, Identification of bacteria associated with post-operative wounds of patients with the use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry approach. *Molecules*, 26, 1-24] mój udział polegał na współudziale przy planowaniu eksperymentu oraz interpretacji danych mikrobiologicznych.

Niniejszym oświadczam, że w pracy [D. Janiszewska, **M. Złoch**, P. Pomastowski, M. Szultka-Młyńska. 2023, Implications of sample preparation methods on the MALDI-TOF MS identification of spore-forming *Bacillus* species from food samples: a closer look at *Bacillus licheniformis*, *Peribacillus simplex*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus flexus*, and *Bacillus marisflavi*, *ACS Omega*, 8, 34196-35441] mój udział polegał na współudziale przy planowaniu eksperymentu oraz interpretacji danych mikrobiologicznych.


(podpis)



KUJAWSKO-POMORSKIE
CENTRUM NAUKOWO-TECHNOLOGICZNE
im. prof. Jana Czocharalskiego sp. z o.o.
ul. Krasińskiego 4; 87 100 TORUŃ
www.centrumczocharalskiego.pl

Prezes: prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski, dr h.c. mult. czł. rzecz. PAN & EASA.

Oświadczenie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. M. Szultka-Młyńska, D. Janiszewska, **B. Buszewski**, 2021, *Molecularly imprinted polymers as solid-phase microextraction fibers for the isolation of selected antibiotics from human plasma*, Materials, 14, 1-24, mój udział autorski polegał na uczestniczeniu w pracach koncepcyjnych nad manuskrytem, dyskusji wyników, korekcie manuskryptu i pełnieniu nadzoru merytorycznego.
2. M. Szultka-Młyńska, D. Janiszewska, P. Pomastowski, M. Złoch, W. Kupczyk, **B. Buszewski**, 2021, *Identification of bacteria associated with post-operative wounds of patients with the use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry approach*. Molecules, 26, 1-24 mój udział polegał na uczestniczeniu w pracach związanych z przygotowaniem koncepcji manuskryptu, dyskusji uzyskanych wyników, korekcie manuskryptu i pełnieniu nadzoru merytorycznego.
3. D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, **B. Buszewski**, 2022, *Analityka antybiotyków β -laktamowych w układzie in silico, in vitro oraz in vivo*, Wiadomości Chemiczne, 76, 3-4, 109-127, mój udział polegał na uczestniczeniu w pracach związanych z przygotowaniem koncepcji manuskryptu, dyskusji uzyskanych wyników, korekcie manuskryptu i pełnieniu nadzoru merytorycznego.
4. D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, **B. Buszewski**, 2022, *Zastosowanie techniki MIP-SPME do terapeutycznego monitorowania leków w próbkach biologicznych*, Analityka: nauka i praktyka, 23, 11-19, mój udział polegał na uczestniczeniu w pracach związanych z przygotowaniem koncepcji manuskryptu, dyskusji uzyskanych wyników, korekcie manuskryptu i pełnieniu nadzoru merytorycznego.
5. D. Janiszewska, M. Szultka-Młyńska, P. Pomastowski, **B. Buszewski**, 2022, *„Omic” approaches to bacteria and antibiotic resistance identification*, International Journal of Molecular Sciences, 23, 1-33, mój udział polegał na uczestniczeniu w pracach związanych z przygotowaniem koncepcji manuskryptu, dyskusji uzyskanych wyników, korekcie manuskryptu i pełnieniu nadzoru merytorycznego.

Toruń dnia 11 wrzesień 2024 r.



prof. dr hab. Bogusław Buszewski

Toruń, dnia 02 09 2023

Dr n med. Wojciech Kupeczyk
Katedra Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Onkologicznej
Wojewódzki Szpital Zespolony im. L. Rydygiera w Toruniu
ul. Św. Józefa 53-59, 87-100

Rada Dyscypliny Nauki Chemiczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy [M. Szultka-Młyńska, D. Janiszewska, P. Pomastowski, M. Złoch, **W. Kupeczyk**, B. Buszewski, 2021, Identification of bacteria associated with post-operative wounds of patients with the use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry approach, *Molecules*, 26, 1-24] mój udział polegał na pozyskaniu materiału biologicznego od pacjentów oraz na interpretacji medycznej uzyskanych wyników.


.....
(podpis)

Streszczenie

Przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej jest zastosowanie zaawansowanych technik analitycznych, takich jak spektrometria MALDI-TOF MS w badaniu mechanizmów antybiotykooporności, identyfikacji drobnoustrojów klinicznych oraz monitorowaniu terapii antybiotykowej. W pracy połączono podejścia „-omiczne”, w tym proteomikę i metabolomikę, z nowoczesnymi narzędziami diagnostycznymi, co stanowi znaczący wkład w rozwój medycyny spersonalizowanej i diagnostyki mikrobiologicznej.

Badania obejmowały zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do szybkiej i precyzyjnej identyfikacji bakterii izolowanych z próbek klinicznych, takich jak trudno gojące się rany czy infekcje układu oddechowego. Wykorzystano techniki MBT-STAR-BL i MBT-ASTRA do analizy oporności na różne klasy antybiotyków, w tym beta-laktamy, makrolidy i chinolony. Szczególną uwagę poświęcono integracji techniki MALDI-TOF MS z innymi metodami analitycznymi, co umożliwia kompleksową ocenę patogenów, ich mechanizmów adaptacyjnych i właściwości biologicznych.

Istotną częścią pracy było opracowanie nowatorskich włókien mikroekstrakcyjnych pokrytych polimerami z odciskiem molekularnym (MIP) do izolacji antybiotyków, takich jak amoksylicyna, cefotaksym i metronidazol, z próbek osocza pacjentów intensywnej terapii. Zastosowanie tej technologii w połączeniu z chromatografią cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (SPME-LC-MS/MS) umożliwiło precyzyjną analizę stężeń leków i ich metabolitów w próbkach biologicznych. Po raz pierwszy zastosowano tę metodę w diagnostyce klinicznej, co stanowi znaczący postęp w personalizacji terapii farmakologicznej.

Wyniki badań wykazały, że opracowane metody pozwalają na znaczące skrócenie czasu diagnostyki i zwiększenie precyzji w identyfikacji patogenów oraz ocenie ich oporności. Zaprezentowano również innowacyjne podejście do przygotowania próbek, wykorzystując nanocząstki srebra jako alternatywną matrycę w technikach laserowej desorpcji/ionizacji, co umożliwia bardziej efektywną analizę związków o niskiej masie cząsteczkowej.

Opracowane narzędzia diagnostyczne mają potencjał zastosowania w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej oraz monitorowaniu terapii antybiotykowej. Dzięki interdyscyplinarnemu podejściu, łączącemu spektrometrię mas, metody „-omiczne” i nowoczesne techniki przygotowania próbek, badania te wspierają walkę z problemem antybiotykooporności. Stanowią również cenny wkład w rozwój nowoczesnej diagnostyki i terapii, przyczyniając się do poprawy jakości opieki zdrowotnej oraz skuteczności leczenia infekcji bakteryjnych.

Abstract

This doctoral dissertation investigates the application of advanced analytical techniques, particularly MALDI-TOF MS spectrometry, to study antimicrobial resistance mechanisms, identify clinical microorganisms, and monitor antibiotic therapy. The study integrates “-omics” approaches, including proteomics and metabolomics, with modern diagnostic tools, thereby significantly advancing personalized medicine and microbiological diagnostics.

MALDI-TOF MS was employed for the rapid and accurate identification of bacteria isolated from clinical samples, including hard-to-heal wounds and respiratory tract infections. The MBT-STAR-BL and MBT-ASTRA assays were used to assess resistance to various classes of antibiotics, such as beta-lactams, macrolides, and quinolones. Particular emphasis was placed on combining MALDI-TOF MS with complementary analytical methods, enabling a comprehensive evaluation of pathogens, their adaptive mechanisms, and their biological properties.

A key component of the dissertation was the development of innovative microextraction fibers coated with molecularly imprinted polymers (MIPs) for the isolation of antibiotics, including amoxicillin, cefotaxime, and metronidazole, from plasma samples collected from intensive care unit patients. When combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPME-LC-MS/MS), this approach enabled precise quantification of drug concentrations and their metabolites in biological samples. This represents the first application of this methodology in clinical diagnostics and constitutes a significant advancement in the personalization of pharmacological therapy.

The results demonstrated that the developed methods significantly reduce diagnostic time while improving the accuracy of pathogen identification and antimicrobial resistance assessment. The dissertation also presents innovative sample preparation strategies, including the use of silver nanoparticles as an alternative matrix for laser desorption/ionization, which enhances the analysis of low-molecular-weight compounds.

The diagnostic tools developed in this research show strong potential for routine application in microbiological diagnostics and antibiotic therapy monitoring. By integrating mass spectrometry, “-omics” methodologies, and advanced sample preparation techniques, this interdisciplinary study contributes to efforts to combat antimicrobial resistance and supports the development of modern diagnostic and therapeutic strategies, ultimately improving healthcare quality and the effectiveness of bacterial infection treatment.