

Patogeninių bakterijų ir mielių identifikavimas FTIR ATR spektriniu metodu

Discrimination of pathogenic bacteria and yeast by means of FTIR ATR spectroscopy

Gerda Anužienė¹, Irmantas Arūnas Čiužas², Eglė Lastauskienė², Justinas Čeponkus¹

¹Vilniaus universitetas, Fizikos fakultetas, Cheminės fizikos institutas, Saulėtekio al. 3, LT-10257 Vilnius

²Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas, Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius

gerda.anuziene@ff.vu.lt

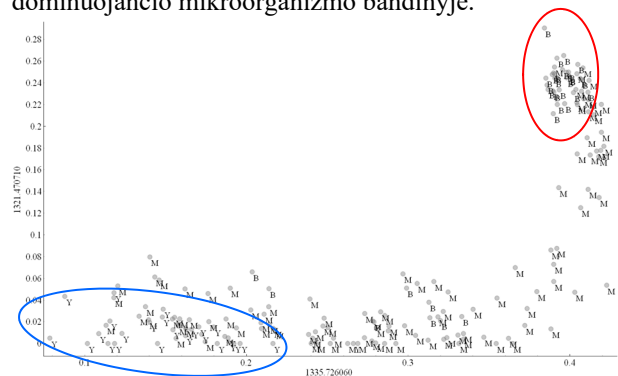
Mišrios infekcijos ant žmogaus odos yra dažniausiai susijusios su oportunistinių mikroorganizmų proliferacija, todėl bakterijų ir mielių sukeliančių infekcinių ligų atskyrimas yra labai svarbus medicinoje [1]. Bakterijų sukeliams infekcijoms gydyti yra skiriami antibiotikai, o mielių sukeliams infekcijoms gydyti – priešgrybeliniai vaistai. Mišrių infekcijų atveju paskirti medikamentai gali paveikti tik vieną patogeninių mikroorganizmų rūšį (eukariotus ar prokariotus), taip leidžiant plisti likusiai mikroorganizmų rūšiai, todėl ankstyvoje susirgimo stadijoje yra svarbu tiksliai identifikuoti mikroorganizmo rūšį ir paskirti tikslią gydymą. Taikant FTIR ATR spektrinį metodą nėra reikalingas specialus bandinių paruošimas, ATR IR sugerties spektro registravimas trunka kelias minutes todėl identifikavimas gali būti atliekamas greičiau.

Tyrimo metu buvo registruojami dviejų rūšių mielių (*Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*) ir trijų rūšių bakterijų (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*) bei jų mišinių ATR IR sugerties spektrai. Iš viso užregistruoti ir analizei naudoti 177 ATR IR sugerties spektrai.

Pagrindiniai skirtumai tarp bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektrų yra stebimi 1360 cm⁻¹ – 1280 cm⁻¹ ir 1183 cm⁻¹ – 930 cm⁻¹ spektriniuose intervaluose. Juostos stebimos minėtuose intervaluose yra daugiausia susijusios su ląstelės sienelėse esančiais angliavandeniais. Bakterijų ląstelės sienelė daugiausia yra sudaryta iš peptidoglikano susieto trumpais kryžminiais peptido tilteliais, o mielių ląstelė sudaryta iš chitino, gliukanų, chitozano ir glikozilintų baltymų.

Siekiant nustatyti kaip tiksliai gali būti identifikuojami mielių ir bakterijų ATR IR sugerties spektrai atlikta k-means statistinė analizė. Nustatyta, kad mielių ir bakterijų ATR IR sugerties spektrai gali būti identifikuojami 100 % tikslumu. Skirtingų mielių rūšių (*C. guilliermondii* ir *C. parapsilosis*) ATR IR sugerties spektrai taip pat gali būti identifikuojami 100 % tikslumu. Atlikus skirtingų bakterijų rūšių (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*) k-means statistinę analizę nustatyta, kad metodas yra tinkamas siekiant atkirti gram-neigiamų ir gram-teigiamų bakterijų ATR IR sugerties spektrus, tačiau sunku išskirti skirtingų gram-teigiamų bakterijų rūšių ATR IR sugerties spektrus, kadangi *S. aureus* ir *S. pyogenes* bakterijų ATR IR sugerties spektrai yra panašūs ir turi vienodas spektrines juostas. Šių bakterijų ląstelės sienelės struktūra, ląstelės forma ir dydis yra panašūs. Abiejų bakterijų ląstelės sienelė sudaryta iš storo peptidoglikano sluoksnio kuris sudaro kryžminius ryšius su baltymais.

Tyrimo metu registruoti bakterijų-mielių mišinių ATR IR sugerties spektrai siekiant nustatyti ar metodas yra tinkamas, patogeninių mikroorganizmų rūšių, iš kurių sudaryti mišiniai, identifikavimui. Registruoti *C. guilliermondii*-*S. aureus*, *C. parapsilosis*-*E. coli* ir *C. parapsilosis*-*S. pyogenes* mišinių ATR IR sugerties spektrai, kurie sumaišyti santykiais 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1, 2:3, 3:2. Pagrindiniai skirtumai stebimi 1360 cm⁻¹ – 1280 cm⁻¹ ir 1183 cm⁻¹ – 930 cm⁻¹ spektriniuose intervaluose. Bakterijų ir mielių ATR IR sugerties spektruose intervale nuo 1360 cm⁻¹ iki 1280 cm⁻¹ yra stebimos dvi spektrinės juostos. Polisacharidų δ(CH) spektrinė juosta stebima 1343 cm⁻¹ – 1336 cm⁻¹ spektrinėje srityje ir Amidas III spektrinė juosta, kuri stebima 1318 cm⁻¹ – 1306 cm⁻¹. Kintant mišinio santykiui kinta ir minėtų spektrinių juostų padėtis, todėl pagal polisacharidams ir Amidas III priskiriamų spektrinių juostų poslinkį galima identifikuoti bandinio tipą. Siekiant įvertinti FTIR ATR spektrinio metodo pritaikymą klinikinėje diagnostikoje grynų bakterijų ir mielių bei jų mišinių ATR IR sugerties spektrams atlikta k-means statistinė analizė (1 pav.). Galima pastebėti, kad didelė dalis grynų bakterijų spektrų yra išsidėstę diagramos dalyje, kuri pažymėta raudona elipse, o didelė dalis grynų mielių spektrų išsidėstę diagramos dalyje, kuri pažymėta mėlyna elipse. Tarp minėtų diagramos dalių išsidėstę mišinių spektrai priklausomai nuo dominuojančio mikroorganizmo bandinyje.



1 pav. Bakterijų, mielių ir jų mišinių ATR IR sugerties spektrų k-means diagrama

Reikšminiai žodžiai: FTIR ATR, patogeniniai mikroorganizmai, k-means

Literatūra

[1] A.Y. Peleg, D.A. Hogan, E. Mylonakis, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 340–349 (2010)