



ΧΡΟΝΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ
ΕΤΟΣ ΙΔΡΥΣΗΣ 1932



MALDI-TOF

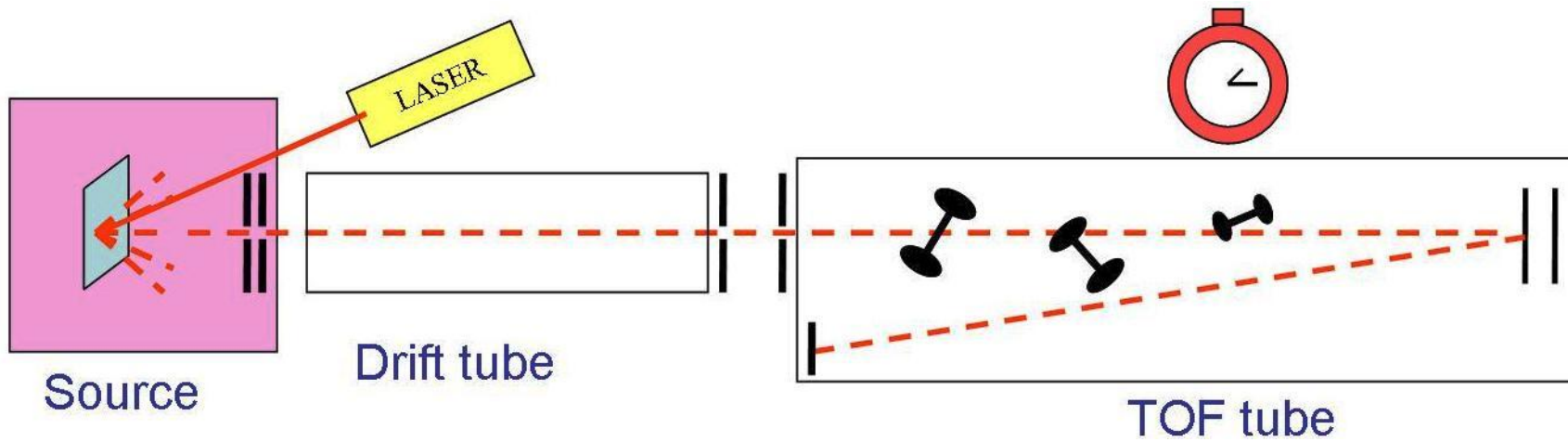
Εφαρμογες του φασματογράφου μάζας MALDI-ToF στην κλινική μικροβιολογία

Γεωργία Βρυώνη

12-13 Νοεμβρίου 2022

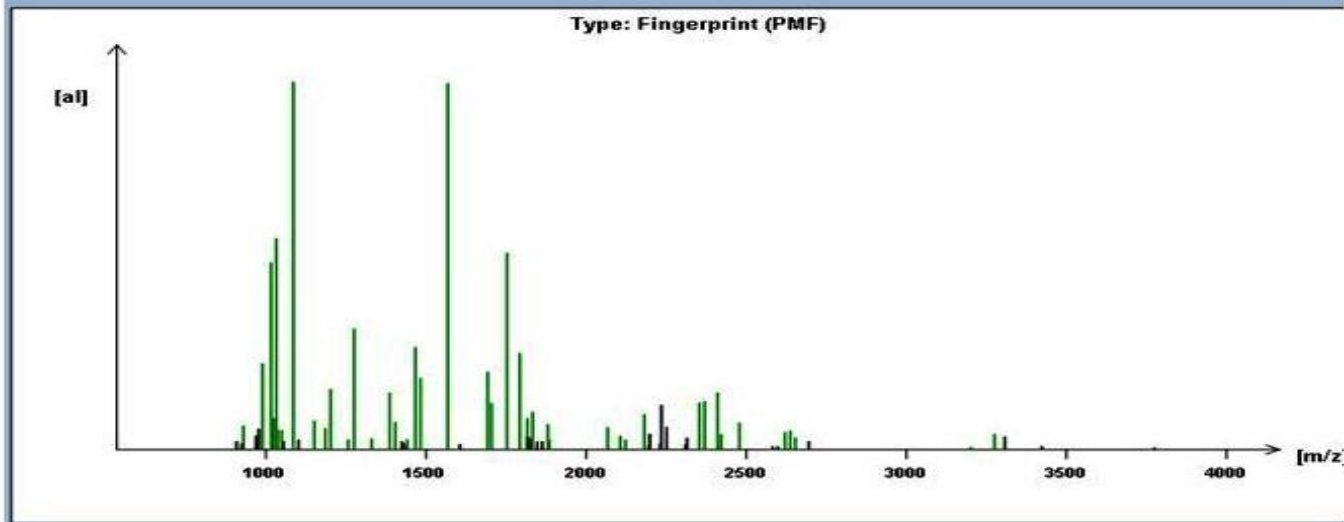
Εργαστήριο Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ





The matrix-assisted laser desorption ionization time-off -flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)

Type: fingerprint (PMF, Peptide Mass Fingerprint)



Περιεχόμενο ομιλίας

Αρχή μεθόδου

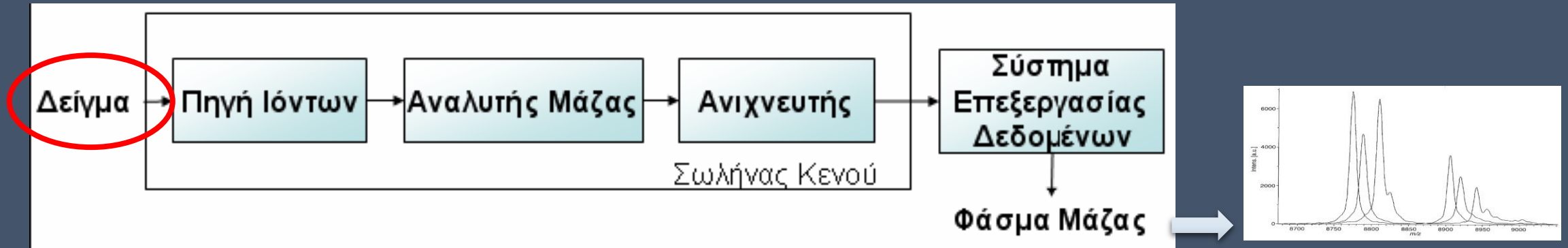
Ιστορική αναδρομή

Εφαρμογές

Δεδομένα από Εργαστήριο Μικροβιολογίας

Συμπεράσματα

MALDI TOF-MS

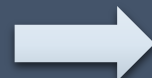


**Μέθοδος
MALDI**



Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
Ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια χημικού υποστρώματος - μήτρας

**Αναλυτής/Ανιχνευτής
TOF-MS**



Time Of Flight



Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

- Organic polymers
- Large synthetic polymers and biopolymers

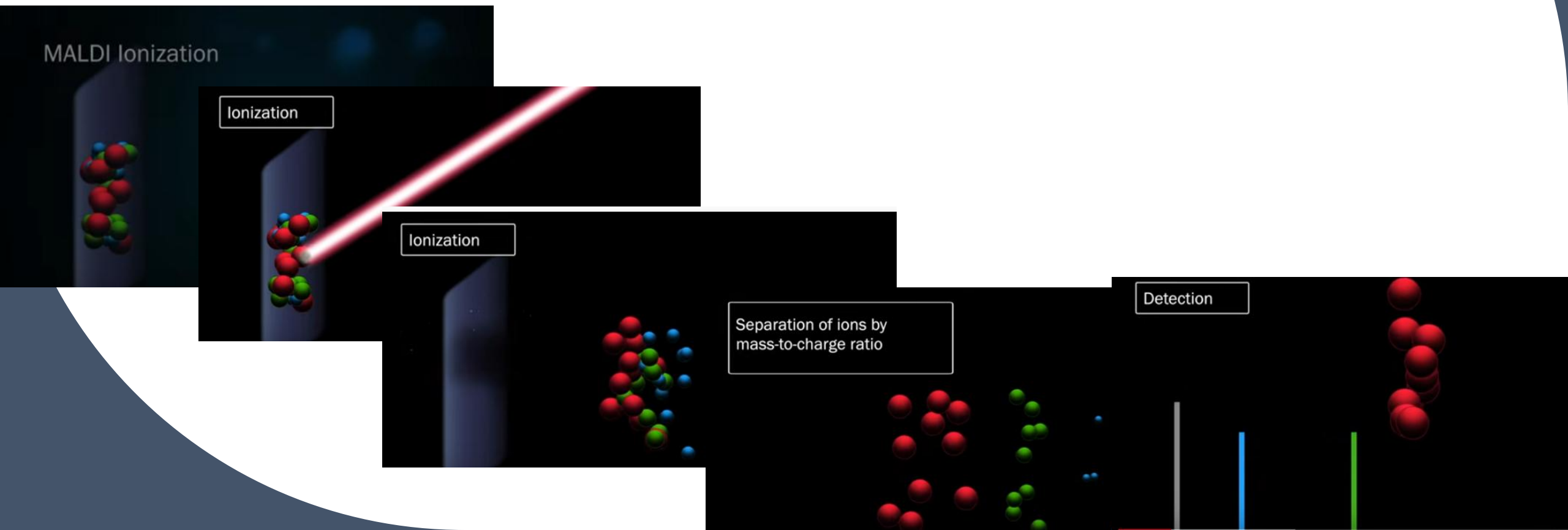
MALDI Ionization

Ionization

Ionization

Separation of ions by mass-to-charge ratio

Detection



Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

- Organic polymers
- Large synthetic polymers and biopolymers

1. Ionization
2. Sorting of ions
3. Detections of ions



Forms gaseous ions **without** fragmentation or decomposition

Biomolecules

peptides

lipids

nucleotides

saccharides

other organic

macromolecules

Impossible to ionize

and desorb into

gas phase

by other ionization

techniques

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

- Organic polymers
- Large synthetic polymers and biopolymers

1. Ionization
2. Sorting of ions
3. Detections of ions

Biomolecules
peptides
lipids
nucleotides
saccharides
other organic
macromolecules

Impossible to ionize
and desorb into
gas phase
by other ionization
techniques

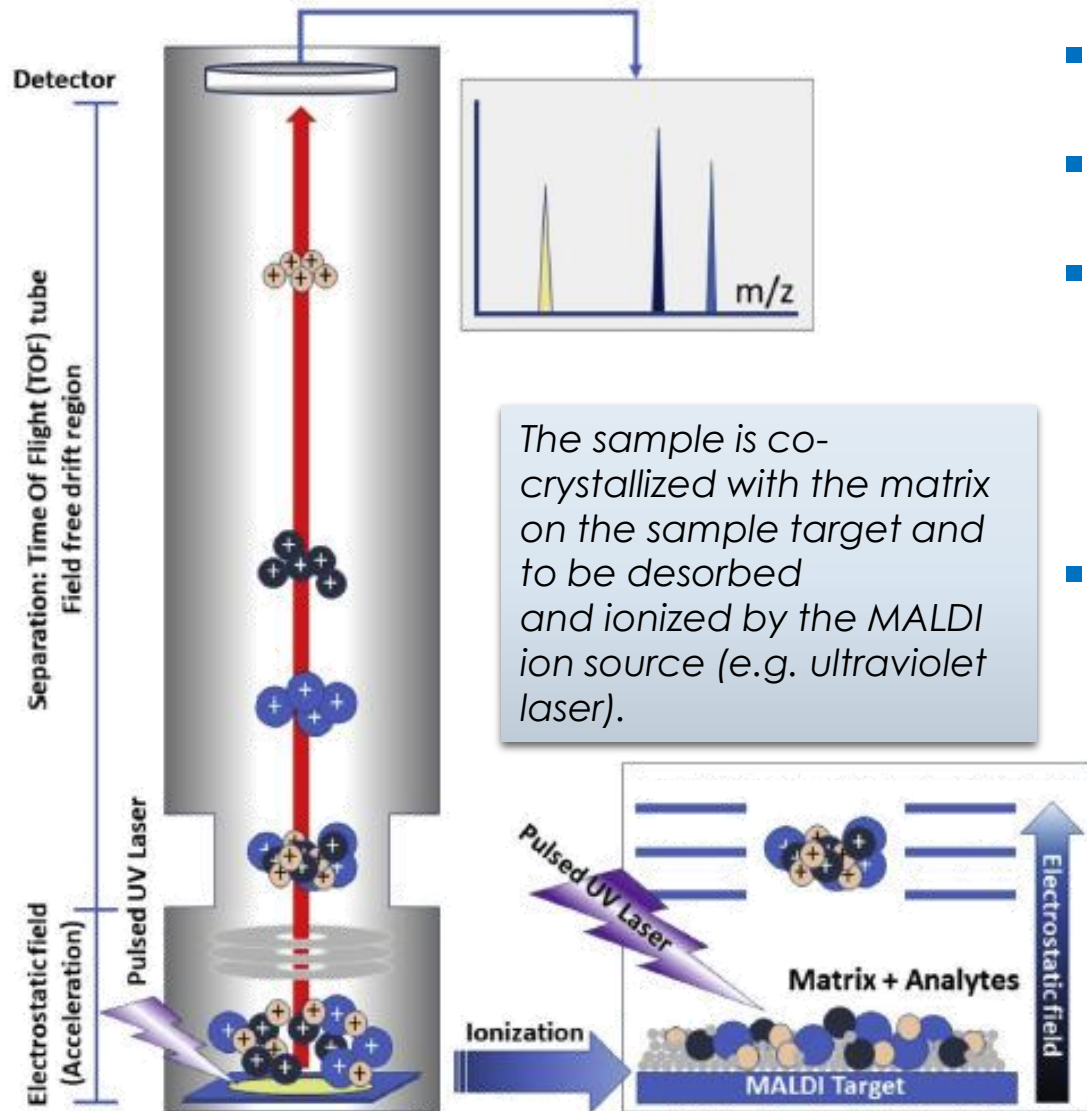


**MALDI is a “soft ionization” technique
ionizes analyte molecules whole**

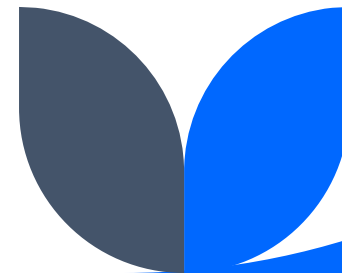
Advantages of MALDI

1. Ionization of nonvolatile molecules
2. Softer ionization
3. Mixed samples
4. Sensitive samples

1. Αρχή λειτουργίας



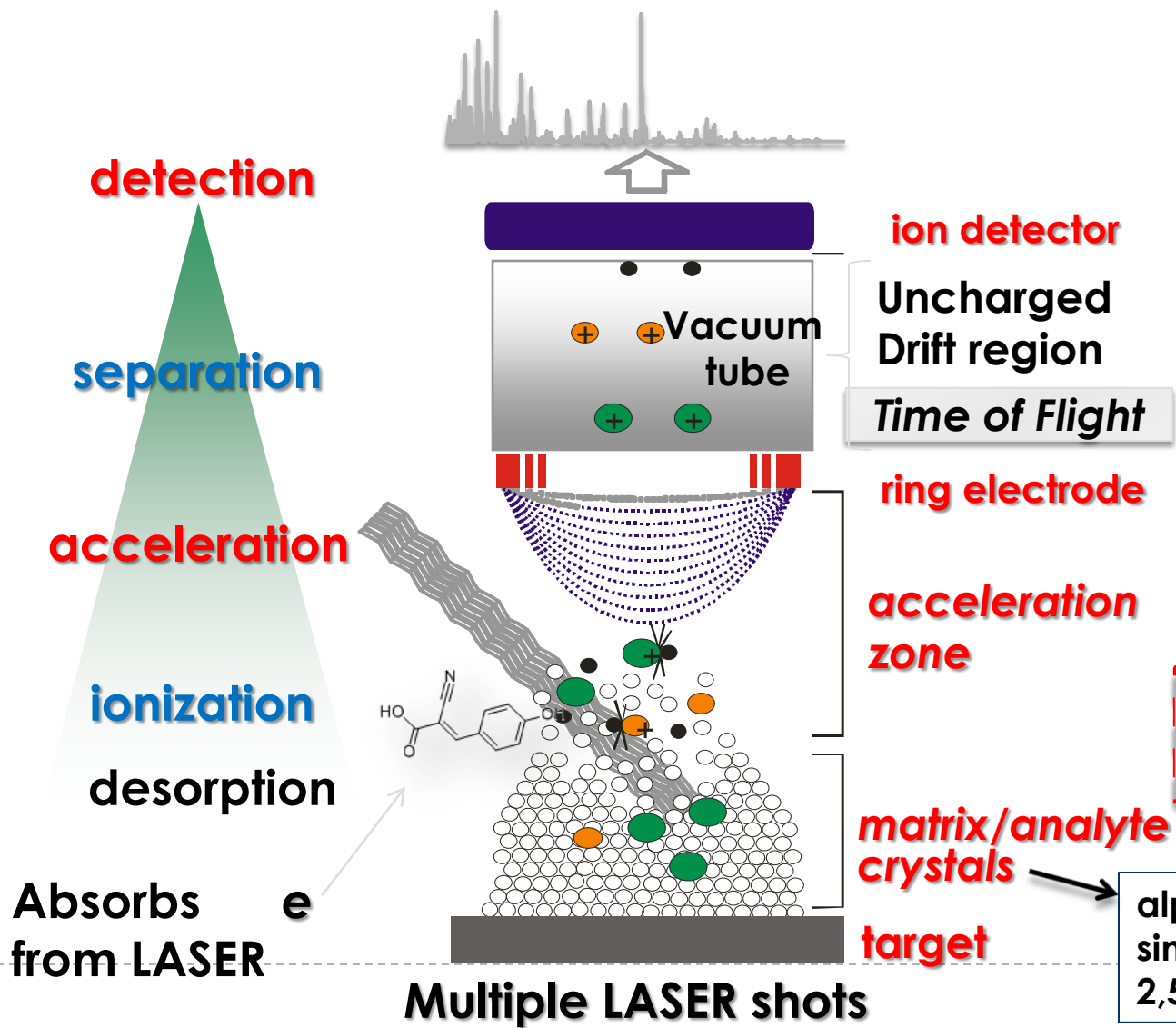
- Εύκολα και γρήγορα προετοιμαζόμενο δείγμα
- **Ιονισμός μακρομορίων, κυρίως πρωτεϊνών**
- **Επιτάχυνση** των ιόντων προς την περιοχή του ανιχνευτή κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες και σε περιβάλλον κενού
- **Ανίχνευση και ανάλυση** των προκυπτουσών φασμάτων μάζας → **ταυτοποίηση των μακρομορίων** μέσω του προσδιορισμού του **λόγου μάζας προς φορτίο m/z** (χρόνος 2 min)



MALDI-TOF MS: αρχή λειτουργίας

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2$$

m: mass
z: charge
U: acceleration voltage
L: path length
t: time
e: elementary charge

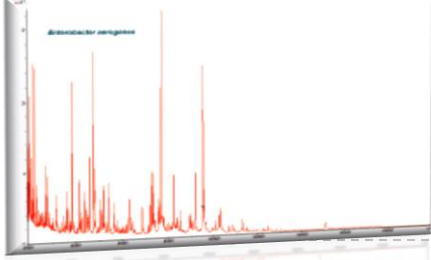


Which protein molecules?
 Those that are easily desorbed,
 Like **ribosomal proteins**

About 50% of detected proteins are ribosomal proteins

alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)
 sinapinic acid (SA)
 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB).

Absorbs **e**
 from **LASER**



Autobio 安图生物



Autof MS1000, Automated mass spectrometry microbial identification system



Shimadzu (Tokyo, Japan)



VITEK® MS



VITEK® MS PRIME



MALDI Biotyper® (MBT) Microbial identification system based on MALDI-ToF mass spectrometry,

◎ The various MALDI-TOF MS instruments, currently commercialised, have similar analytical properties as regards sample ionization, detection and recording of the signal

Ερμηνεία αποτελεσμάτων



Autobio Autof MS1000

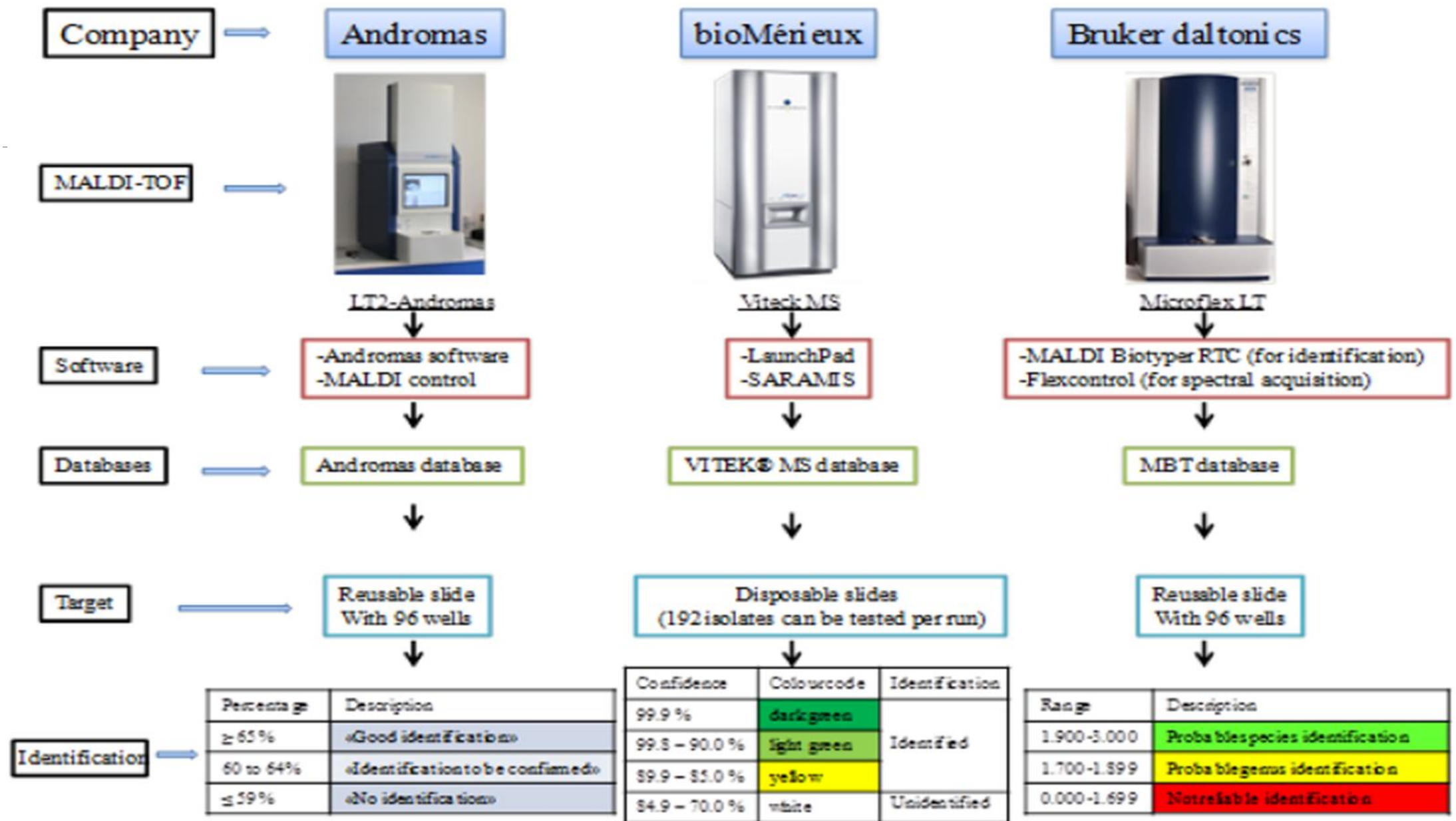
9.000-10.000	Reliable species identification
6.000-8.999	Reliable genus identification
< 6.000	No reliable identification



Bruker Biotyper

2.00-3.00	Reliable species identification
1.70-1.99	Reliable genus identification
< 1.7	No reliable identification
	No peaks found





⊙ differences are more associated with sample preparation, algorithms for spectra generation and evaluation and software databases.

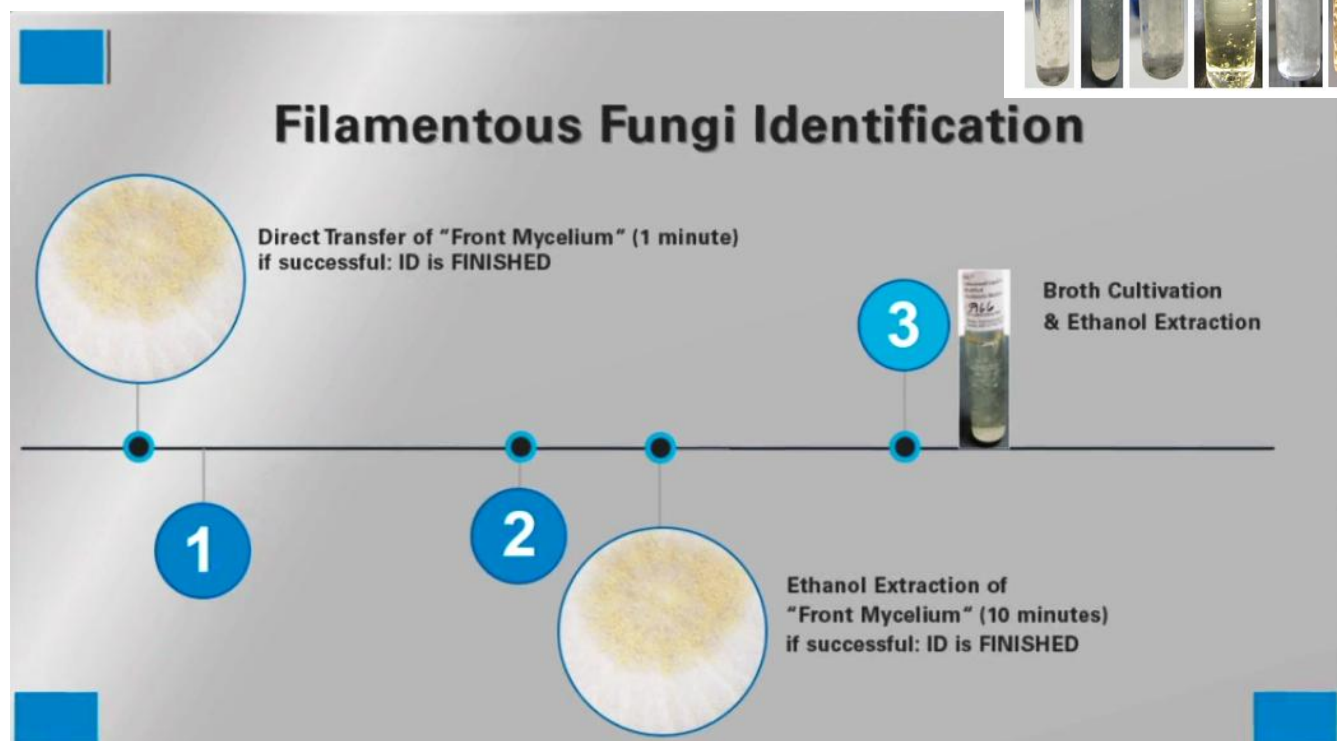
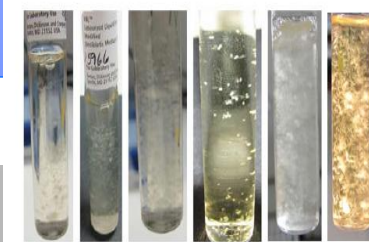


Πρωτόκολλα επεξεργασίας

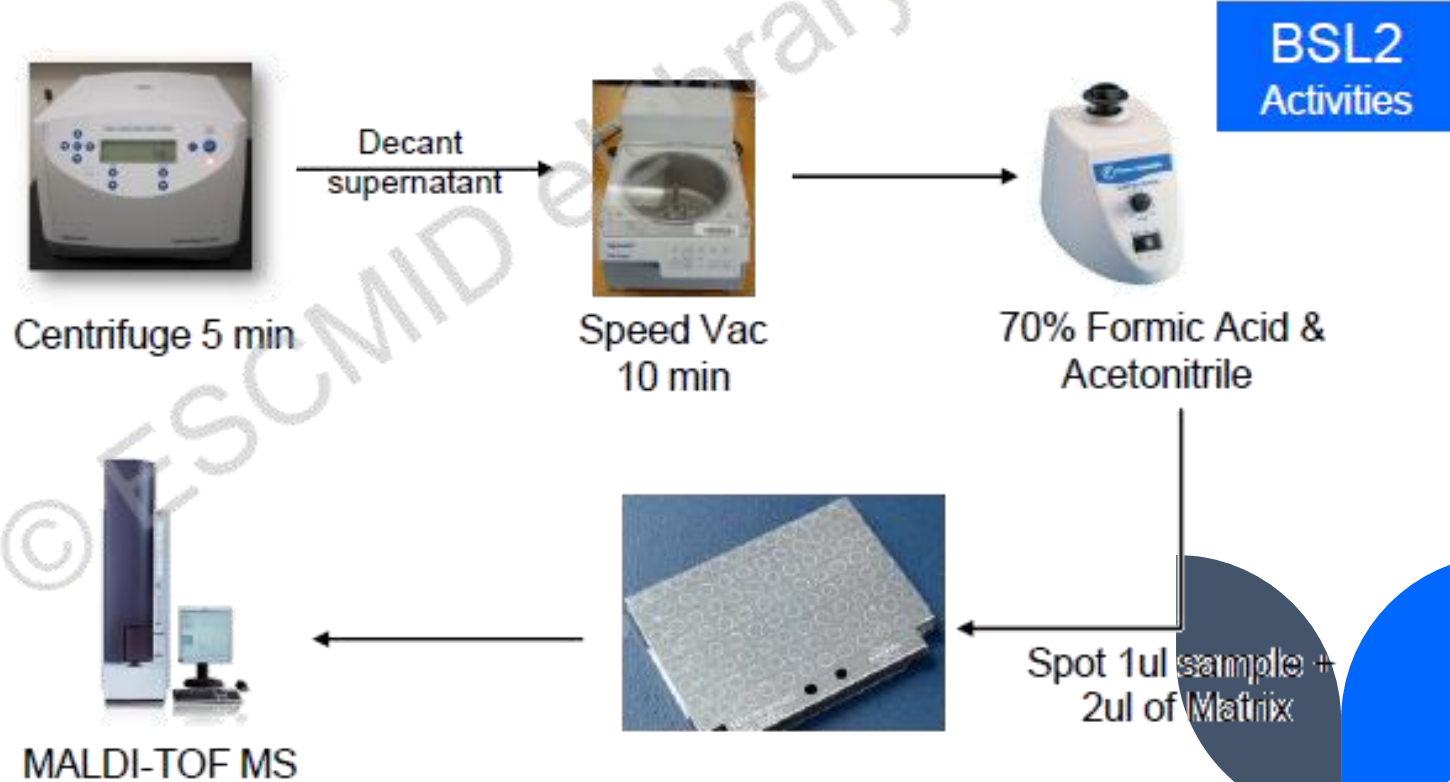
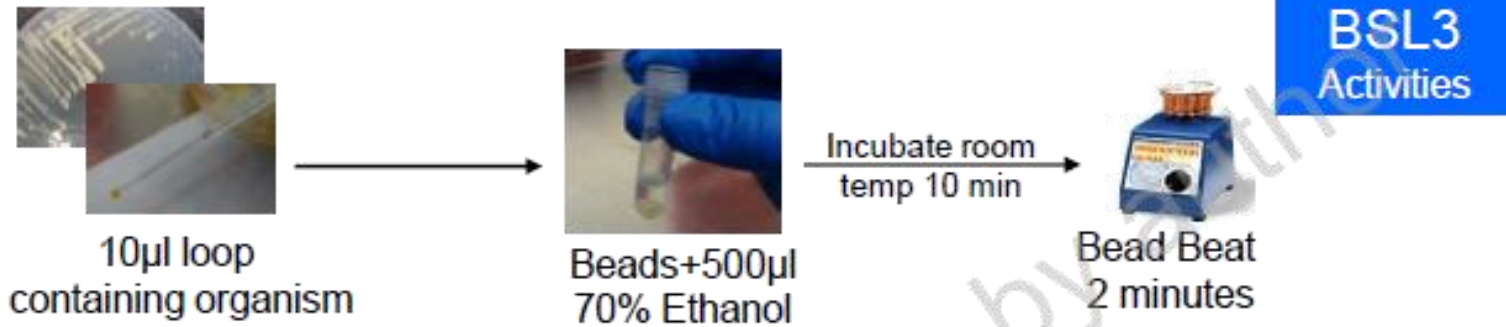
1. Άμεση τοποθέτηση στην πλάκα της αποικίας με matrix → **βακτήρια**
2. Πρωτόκολλο **ταχείας πρωτεϊνικής εξαγωγής** με 70% φορμικό οξύ → **βακτήρια, ζύμες, υφομύκητες**
3. Πρωτόκολλο **κλασσικής πρωτεϊνικής εξαγωγής** με αιθανόλη → **βακτήρια, ζύμες, υφομύκητες**
4. **Υγρή καλλιέργεια** σε Sabouraud ακολουθούμενη από κλασσική πρωτεϊνική εξαγωγή → **υφομύκητες**

© Vitek[®]-MS: Πρωτόκολλο **ταχείας** πρωτεϊνικής εξαγωγής.

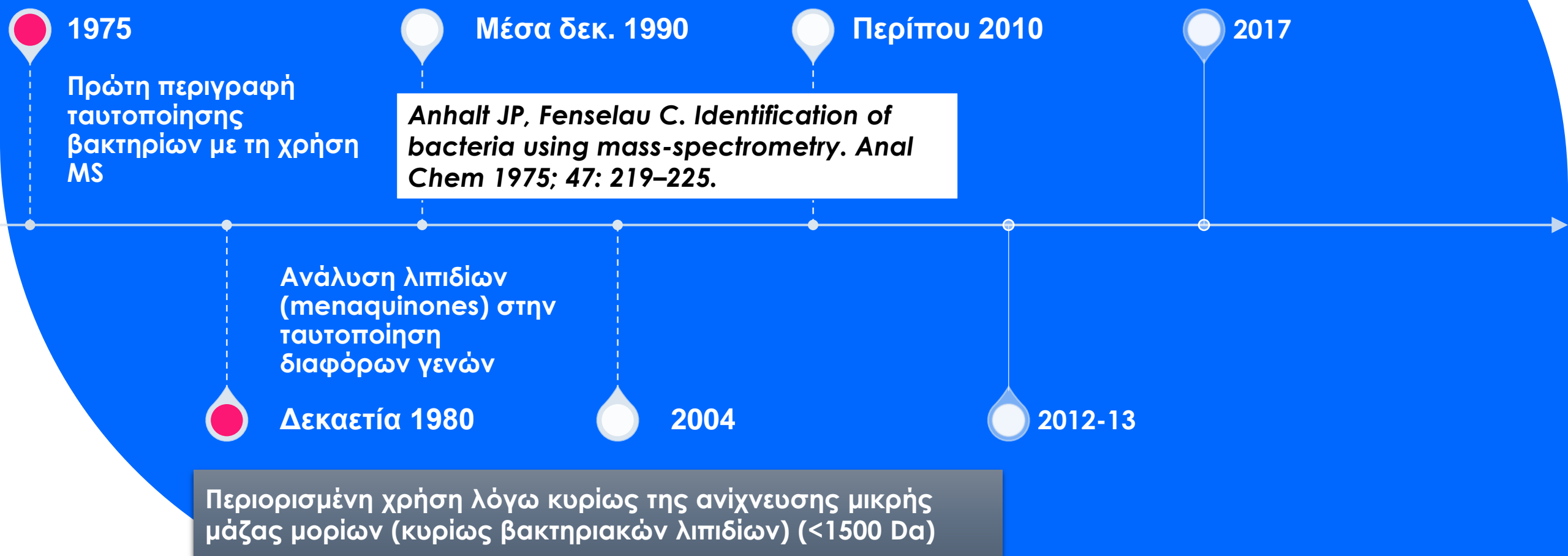
© Bruker Daltonics: Πρωτόκολλο **πλήρους πρωτεϊνικής** εξαγωγής.



Μυκοβακτηρίδια



2. MALDI-TOF MS: ιστορική αναδρομή



2. MALDI-TOF MS: ιστορική αναδρομή

Developed in 1980s by Karas and Hillenkamp

Detection of large molecules using **TOF** by Tanaka and Yoshida

Introduction of matrix compounds to analyze large molecules

Ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια χημικού υποστρώματος - μήτρας (MALDI-MS)
→ *amino acid alanine could be ionized easily if it was mixed with amino acid tryptophan & irradiated with pulsed 266nm laser*

Anal. Chem. **1988**, *60*, 2301–2303

Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons

Michael Karas*
Franz Hillenkamp

RECEIVED for review May 16, 1988. Accepted July 5, 1988.

Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry

Koichi Tanaka[†], Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida and Tamio Yoshida

Shimadzu Corporation, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604, Japan

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 2, NO. 8, 1988 151

Received 6 June 1988; accepted 6 June 1988.

- First commercial instrument developed by Shimadzu
- First commercial database developed by Anagnostec (1998)



2. MALDI-TOF MS: ιστορική αναδρομή



1975

Πρώτη περιγραφή ταυτοποίησης βακτηρίων με τη χρήση MS

Μέσα δεκ. 1990

Ανάπτυξη μηχανημάτων MALDI-TOF & EPI MS για χρήση στα μικρ. εργαστήρια

Περίπου 2010

Είσοδος τεχνολογίας στα κλινικά εργαστήρια ρουτίνας

2017

VITEK MS v. 3.0 FDA cleared for bacteria, yeasts, mold, and mycobacteria

Ανάλυση λιπιδίων (menaquinones) στην ταυτοποίηση διαφόρων γενών

Δεκαετία 1980

Αναφορά πλήρους βάσης για την ταυτοποίηση βακτηρίων

2004

2013: MALDI BioTyper (Bruker) FDA cleared for bacteria and yeast
2012: database for mold identification (RUO).

2012-13

Keys CJ, et al. Infect Genet Evol 2004; 4: 221-242.



2. MALDI-TOF MS: ιστορική αναδρομή

Developed in 1980s by Karas and Hillenkamp

Detection of large molecules using **TOF** by Tanaka and Yoshida

Introduction of matrix compounds to analyze large molecules

Ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια χημικού υποστρώματος - μήτρας (MALDI-MS)
→ *amino acid alanine could be ionized easily if it was mixed with amino acid tryptophan & irradiated with pulsed 266nm laser*

Anal. Chem. **1988**, *60*, 2301–2303

Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons

Michael Karas*
Franz Hillenkamp

RECEIVED for review May 16, 1988. Accepted July 5, 1988.

Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry

Koichi Tanaka[†], Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida and Tamio Yoshida

Shimadzu Corporation, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604, Japan

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 2, NO. 8, 1988 151

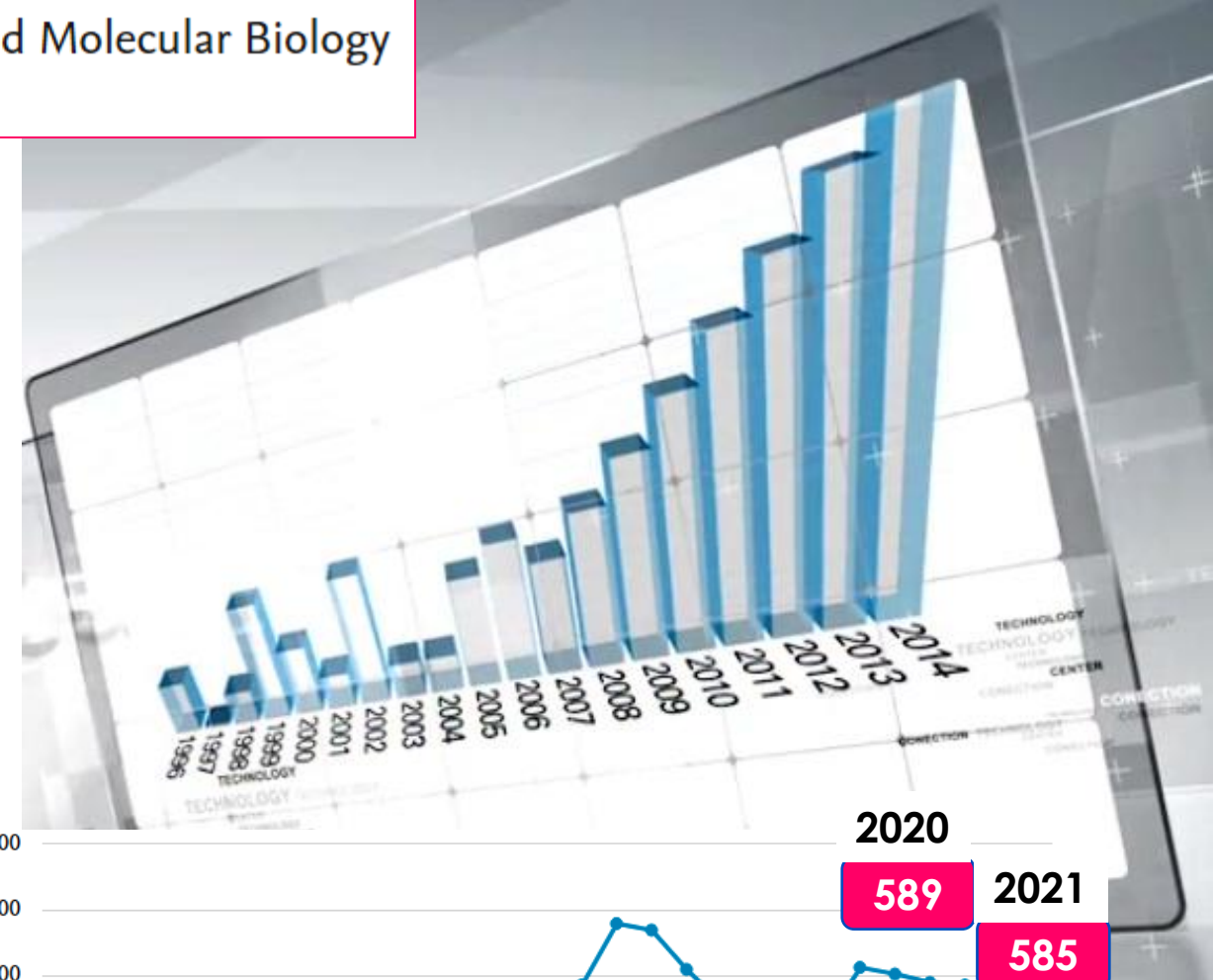
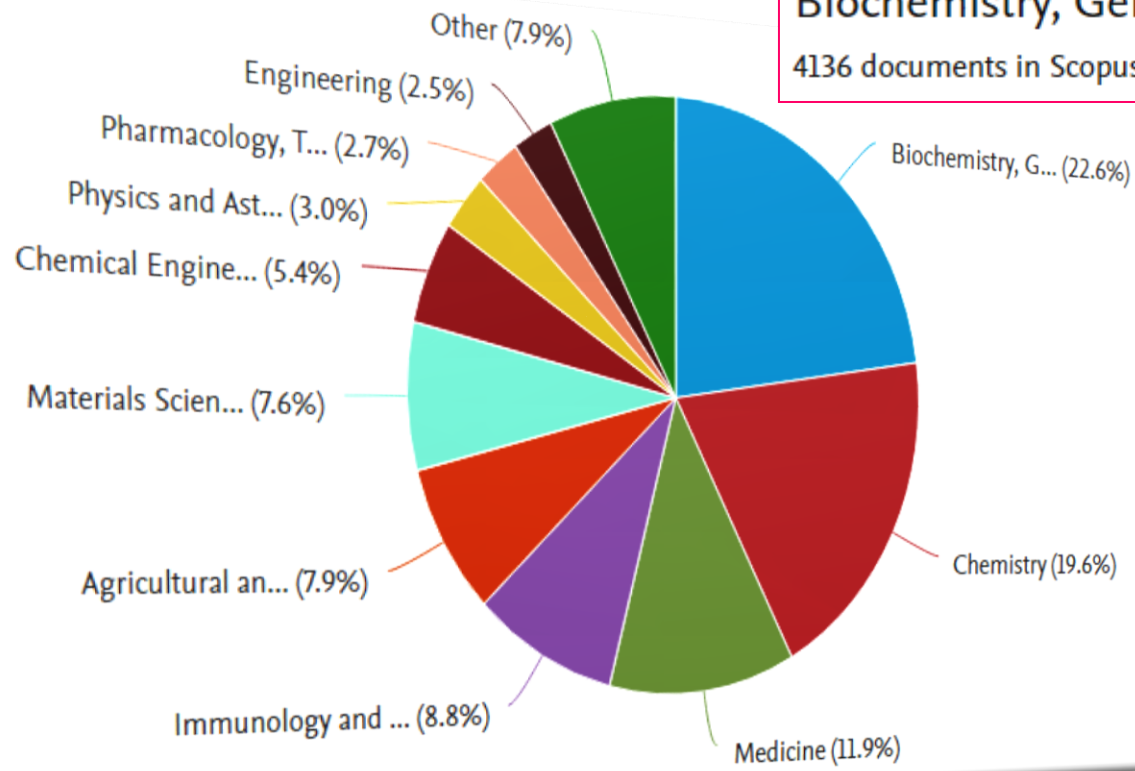
Received 6 June 1988; accepted 6 June 1988.

- Shimadzu scientist receives Nobel Prize in Chemistry → **Kiochi Tanaka (2002)**
- **Technology in use in Europe for >20 years.**
- **Acquired in thousands labs worldwide**



Biochemistry, Genetics and Molecular Biology

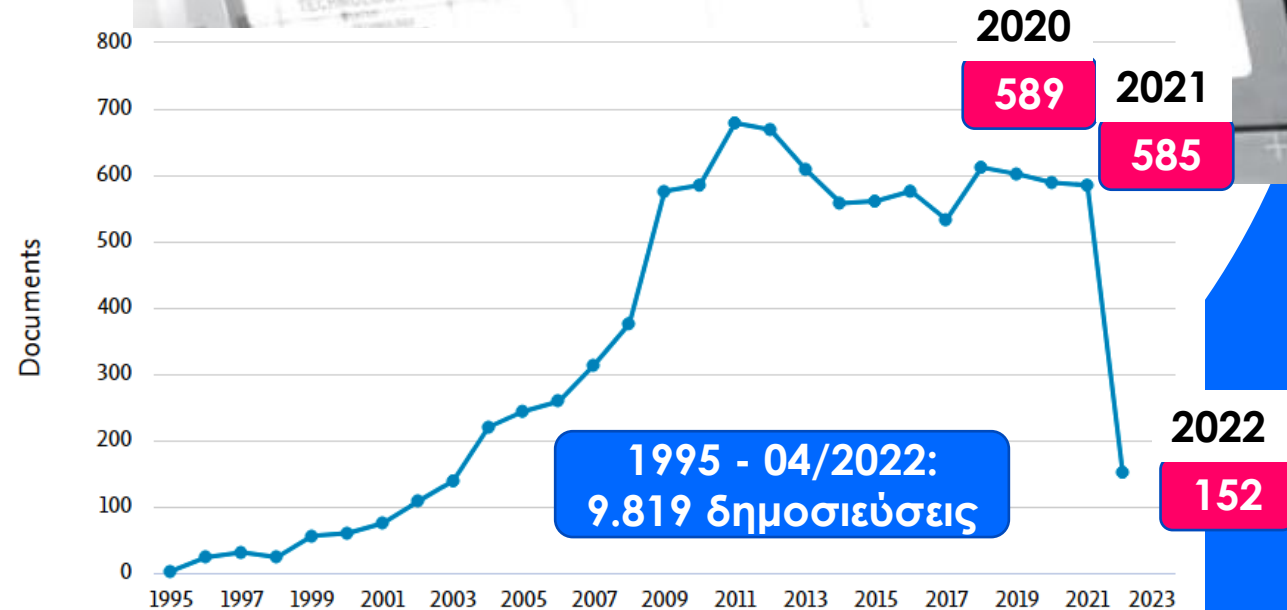
4136 documents in Scopus



Medicine

2179 documents in Scopus

Δημοσιεύσεις για MALDI-TOF (1995-2022) (πηγή: Scopus)



1995 - 04/2022:
9.819 δημοσιεύσεις

Άλλα είδη φασματογράφων (ερευνητικά εργαστήρια)

- **MALDI-resequencing (MALDI-RE)**

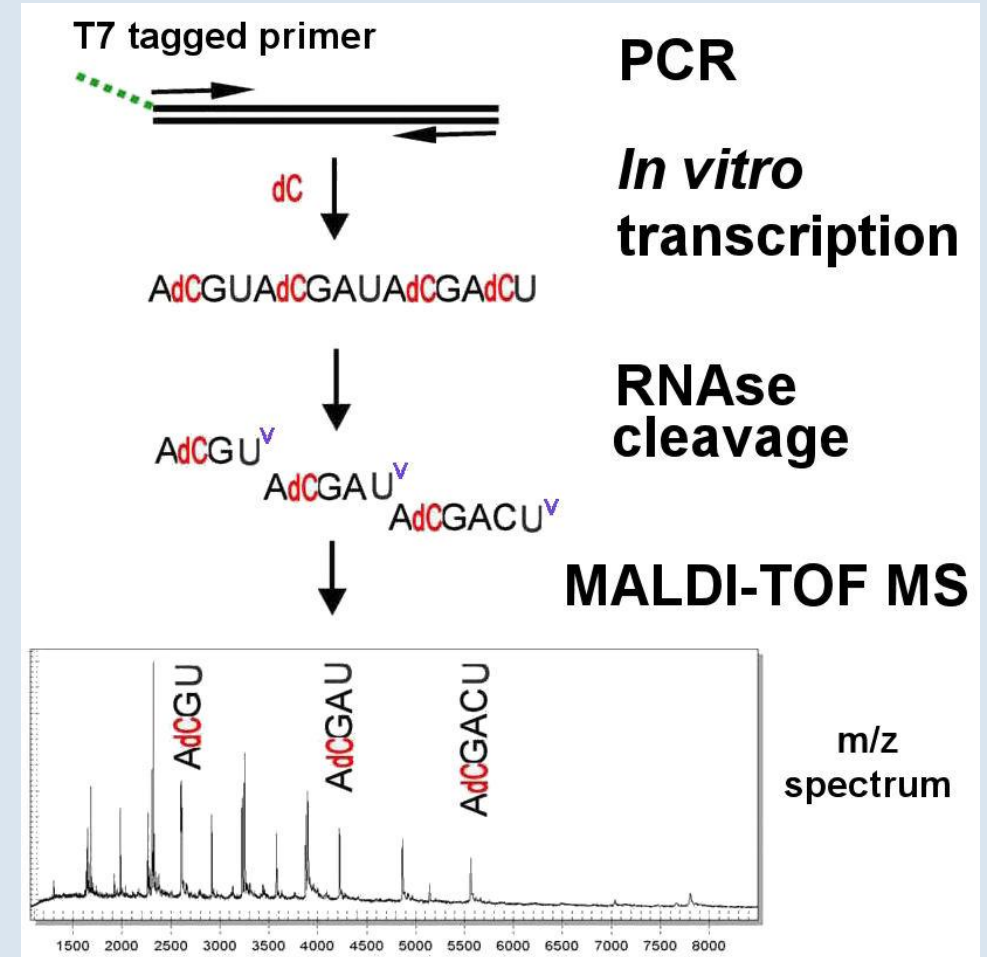
- DNA αποδιατάσσεται → ανάγκη μετατροπής σε RNA

- **PCR- electrospray ionization -MS (PCR-ESI-MS)**



- **Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων για**

- γονοτύπιση βακτηρίων
- ταυτοποίηση παθογόνων



Εφαρμογές στη μικροβιολογική διάγνωση

Ταυτοποίηση από καλλιέργειες

- ❖ Κλινική Μικροβιολογία
- ❖ Μικρ/γία τροφίμων & νερών
- ❖ Μικροβιολογία περιβάλλοντος
- ❖ Ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών εσκεμμένης διασποράς και τοξινών

Clark A E et al. Clin. Microbiol. Rev. 2013;26:547-603;
Singhal N, et al. Front. Microbiol. 2015;6:791;
Tsung-Yun Hou, et al. J Food Drug Anal. 2019; 27:404

TABLE 3 | Fungi which have been identified using MALDI-TOF MS.

Organisms	Reference
<i>Fusarium</i> spp.	Dong et al. (2009), Kempfner et al. (2009)
<i>Aspergillus</i> spp.	Li et al. (2000), Hettick et al. (2008b), Alanio et al. (2011), Pan et al. (2011)
<i>Penicillium</i> spp.	Chen and Chen (2005)
<i>Fusarium proliferatum</i>	Seyfarth et al. (2008)
<i>Lichtheimia</i> spp.	Schröd et al. (2012)
Dermatophyte species	Erhard et al. (2008), Theel et al. (2011), Nenoff et al. (2013)
<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>C. gattii</i>	Mc Taggart et al. (2011)
<i>Neoscytalidium</i> spp.	Alshawa et al. (2012)
<i>Candida</i> spp.	Spanu et al. (2012)

Yeasts



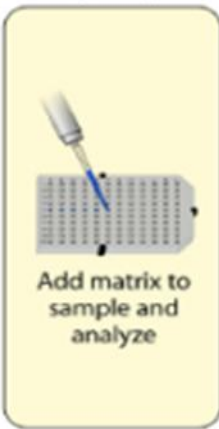
1. Culture 24 to 72 hours depending upon fungal species and media type
2. Select colony



3. Spot target organism, overlay with 1µL Formic Acid



3. Full extraction with Ethanol and Formic Acid/Acetonitrile

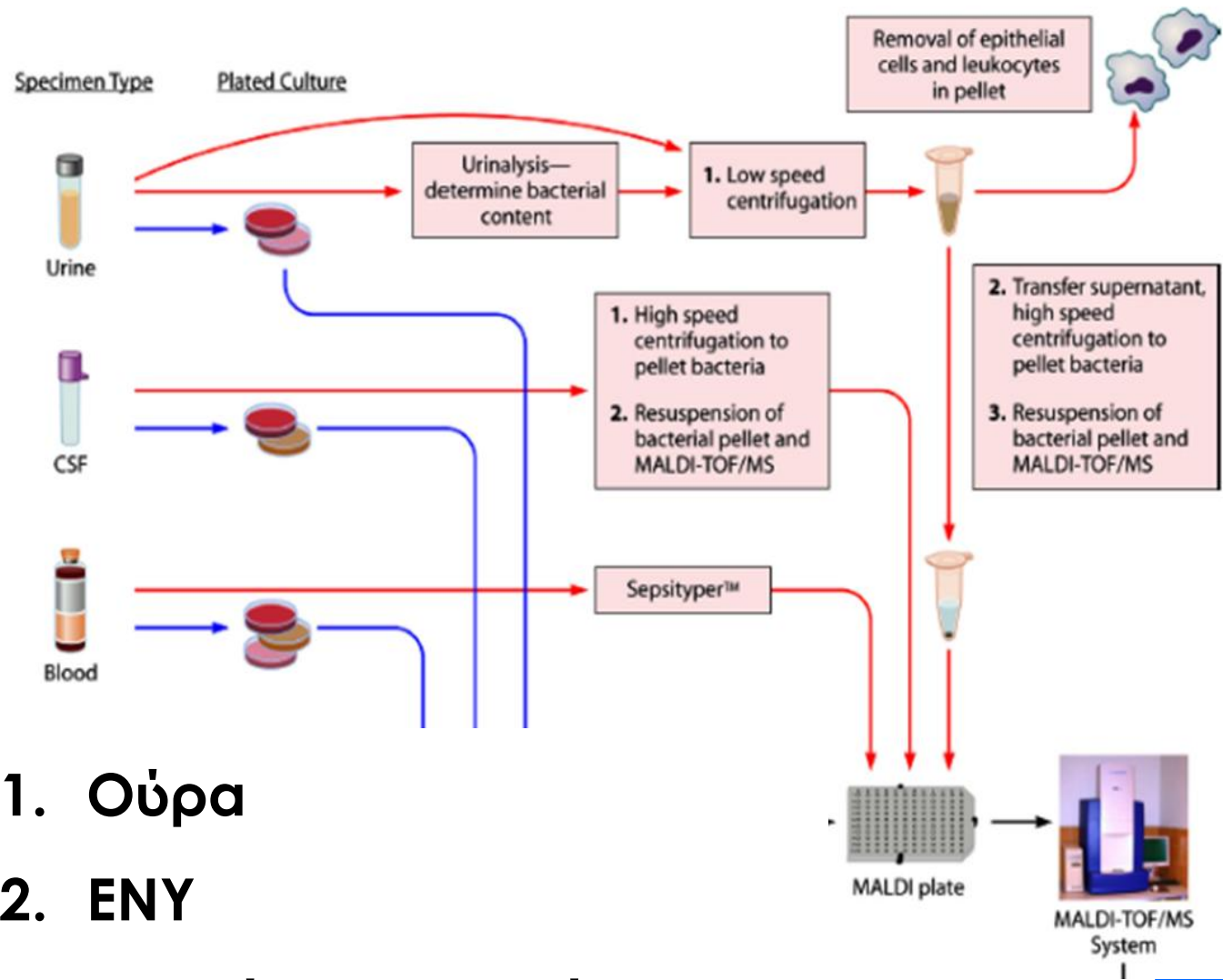


Εφαρμογές στη μικροβιολογική διάγνωση

Άμεση ανίχνευση σε κλινικά δείγματα

- ❖ Κλινική Μικροβιολογία
- ❖ Μικρ/γία τροφίμων & νερών
- ❖ Μικροβιολογία περιβάλλοντος
- ❖ Ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών εσκεμμένης διασποράς και τοξινών

Clark A E et al. Clin. Microbiol. Rev. 2013;26:547-603;
Singhal N, et al. Front. Microbiol. 2015;6:791;
Tsung-Yun Hou, et al. J Food Drug Anal. 2019; 27:404;
Tsuchida S, et al. Molecules. 2020; 25:4775



1. Ούρα

2. ΕΝΥ

3. Θετική αιμοκαλλιέργεια

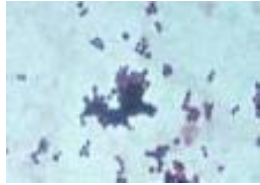


Το κύριο πλεονέκτημα → ακρίβεια και ταχύτητα

Προ MALDI-TOF εποχή



Gram + cocci σε αλυσίδες



Gram + cocci σε ομάδες



Gram - βακτηρίδια

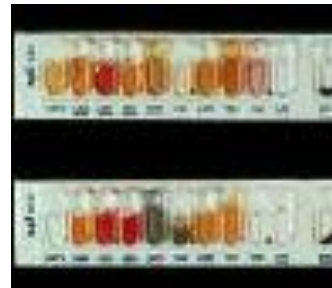
Overnight incubation



S. aureus



E. coli

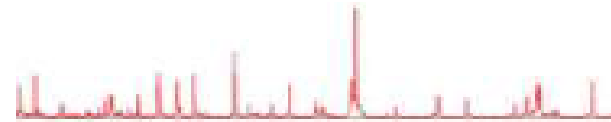


Μετά MALDI-TOF εποχή

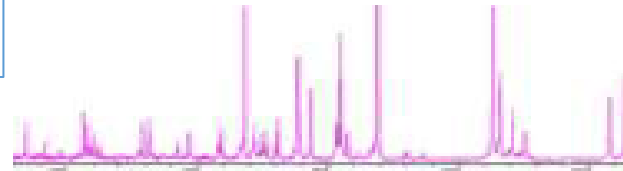


E. faecium

92.5–95.5% σε γένος
91.7–92.8% σε είδος



S. aureus



E. coli

92.5–99.8% σε γένος
91.7–98.2% σε είδος

Ημέρα 0

Ημέρα 1

- ▶ MALDI-TOF MS → ακριβή ταυτοποίηση τουλάχιστον 24 h νωρίτερα των φαινοτυπικών μεθοδολογιών, ακόμη και των αυτοματοποιημένων.

A true revolution related to the **CLINICAL IMPACT**

Table 1 – References of the evaluation of MALDI-TOF MS identification in clinical microorganism isolates.

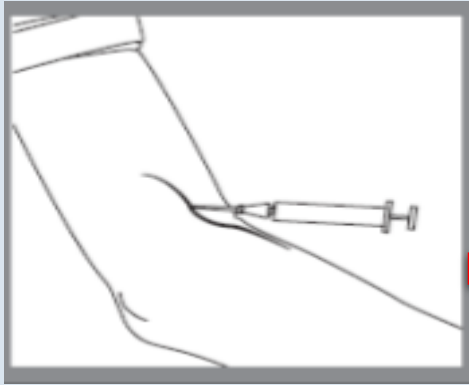
Study	Percentage (No.) organisms correctly detected by MALDI-TOF MS		Description of isolates of study
	Genus level	Species Level	
Gram negative bacteria			
Faron et al., 2015 [29]	99.8% (2258/2263)	98.2% (2222/2263)	2263 clinical isolates of aerobic Gram-negative bacteria.
Gamer et al., 2013 [30]	92.5% (357/386)	91.7% (351/386)	386 isolates of anaerobic Gram-negative bacteria.
Gram positive bacteria			
Rychert et al., 2013 [31]	95.5% (1094/1146)	92.8% (1063/1146)	1146 isolates of aerobic Gram-positive from multicenter.
Gamer et al., 2013 [30]	92.5% (245/265)	91.7% (243/265)	265 isolates of anaerobic gram Positive bacteria.
Anaerobic bacteria			
Gamer et al., 2013 [30]	92.5% (602/651)	91.2% (591/651)	651 isolates anaerobic bacteria.
Yeast and mold			
Wang et al., 2016 [46]	n.a. ^a	98.8% (2651/2683)	2683 clinical isolates of yeast.
Chao et al., 2014 [47]		92.5% (185/200)	200 clinical isolates of yeast.
Chen et al., 2013 [45]	94.9% (93/98)	74.5% (73/98)	98 Clinical isolates of yeast.
Becker et al., 2014 [49]	n.a.	95.4% (372/390)	390 clinical mold isolates.
Gautier et al., 2014 [50]	n.a.	98.8% (1094/1107)	760 customized reference spectra. 1107 clinical mold isolates (107 distinct species). 2832 customized reference spectra.
Mycobacterium			
Wilen et al., 2015 [21]	n.a.	89.2% (140/157)	157 mycobacterial isolates (including 16 isolates of <i>M. tuberculosis</i>).
Rodriguez-Sanchez et al., 2015 [44]	n.a.	88.8% (111/125)	125 non-tuberculosis mycobacterial (NTM) isolates.
Chen et al., 2013 [45]	87.3% (89/102)	62.8% (64/102)	102 mycobacterial isolates.
Blood culture positive bottles			
Chien et al., 2016 [36]			405 blood culture (BC) positive samples.
	89.6% (327/365)	72.1% (263/365)	365/405 monomicrobial growth BC samples.
	92.5% (37/40)	82.5% (33/40)	40/405 polymicrobial growth BC positive samples.
Arroyo et al., 2017 [13]	94.0% (188/200)	91.5% (181/200)	200 isolates of Gram-negative bacilli from monomicrobial growth of BC positive samples.
Chen et al., 2013 [11]	97.8% (177/181)	81.8% (148/181)	181 monomicrobial growth BC positive samples.
Kok et al., 2011 [35]	100% (358/358)	78.5% (281/358)	358 monomicrobial growth BC positive samples.
	100% (195/195)	67.7% (132/195)	195 Gram-positive isolates
	100% (163/163)	91.4% (149/163)	163 Gram-negative isolates

^a Not applicable.

MALDI-TOF-MS: εφαρμογή σε θετική αιμοκαλλιέργεια

VITEK® MS Blood Culture Kit (RUO)

MBT Sepsityper® IVD Kit



Δειγματοληψία



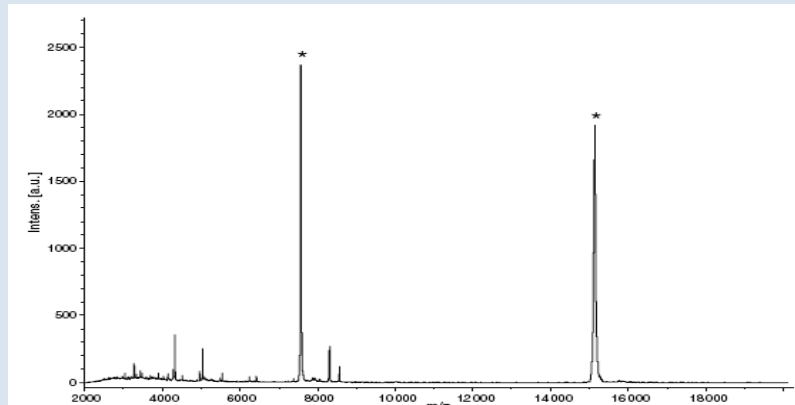
Επώαση αιμοκαλλιεργείων

αν θετική



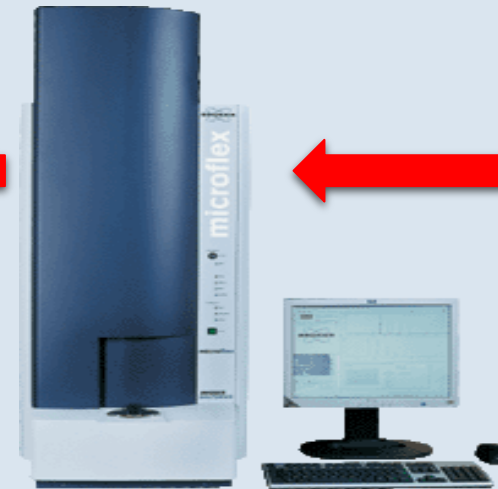
Απομάκρυνση αίματος γιατί ψευδώς θετικά σήματα λόγω αιμοσφαιρίνης

Ετοιμασία του βακτηριακού ιζήματος

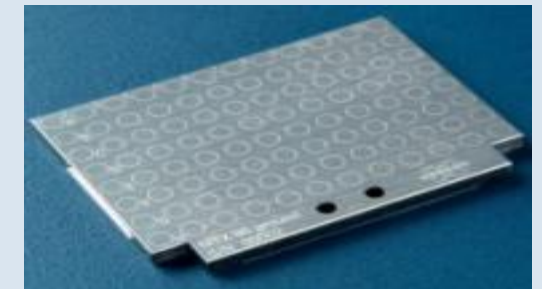


Σύγκριση με βάση δεδομένων

Αποτέλεσμα σε 15-20 min



Λήψη πρωτεϊνικού προφίλ



Τοποθέτηση του βακτηριακού ιζήματος στην MALDI μικροπλάκα

Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis: Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit

International Journal of Microbiology, 2015

Nils G. Morgenthaler^{1,2} and Markus Kostrzewa²

- **21 μελέτες**
- Σωστή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους σε **80% των 3320** θετικών αιμοκαλλιιεργειών.
 - ✓ **Gram (-) βακτήρια: 90%**
 - ✓ **Gram (+) βακτηρία: 76%**
 - ✓ **Ζυμομύκητες: 66%**
- **ΔΕΝ υπήρχε λάθος ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους (score 1.6)**



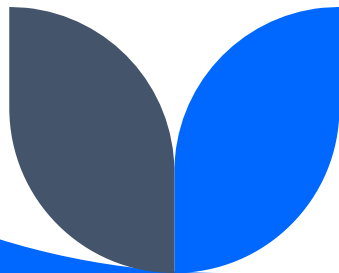
Direct bacterial identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry: A systematic review and meta-analysis

Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed). 2018

Jesús Ruiz-Aragón^a, Mónica Ballesterro-Téllez^{a,*}, Belén Gutiérrez-Gutiérrez^a, Marina de Cueto^{a,b}, Jesús Rodríguez-Baño^{a,c}, Álvaro Pascual^{a,b}

- **32 μελέτες**
- Για **Gram-θετικά βακτήρια**: σωστή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους από 0.17 έως 0.98, συνολικό ποσοστό **0.72** (95% CI: 0.64–0.80).
- Για **Gram-αρνητικά βακτήρια**, σωστή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους από 0.66 έως 1.00, συνολικό ποσοστό **0.92** (95% CI: 0.88–0.95).
- Για **Εντεροβακτηριακά**, συνολικό ποσοστό **0.96** (95% CI: 0.94–0.97).


MALDI-TOF MS έχει **υψηλότερη ακρίβεια** στην ταυτοποίηση **Gram-αρνητικών βακτηρίων**, ειδικά Εντεροβακτηριακά, άμεσα από θετική αιμοκ/α, and **μέτρια ακτίβεια** στη ταυτοποίηση **Gram-θετικών βακτηρίων** (μικρή για κάποια είδη).

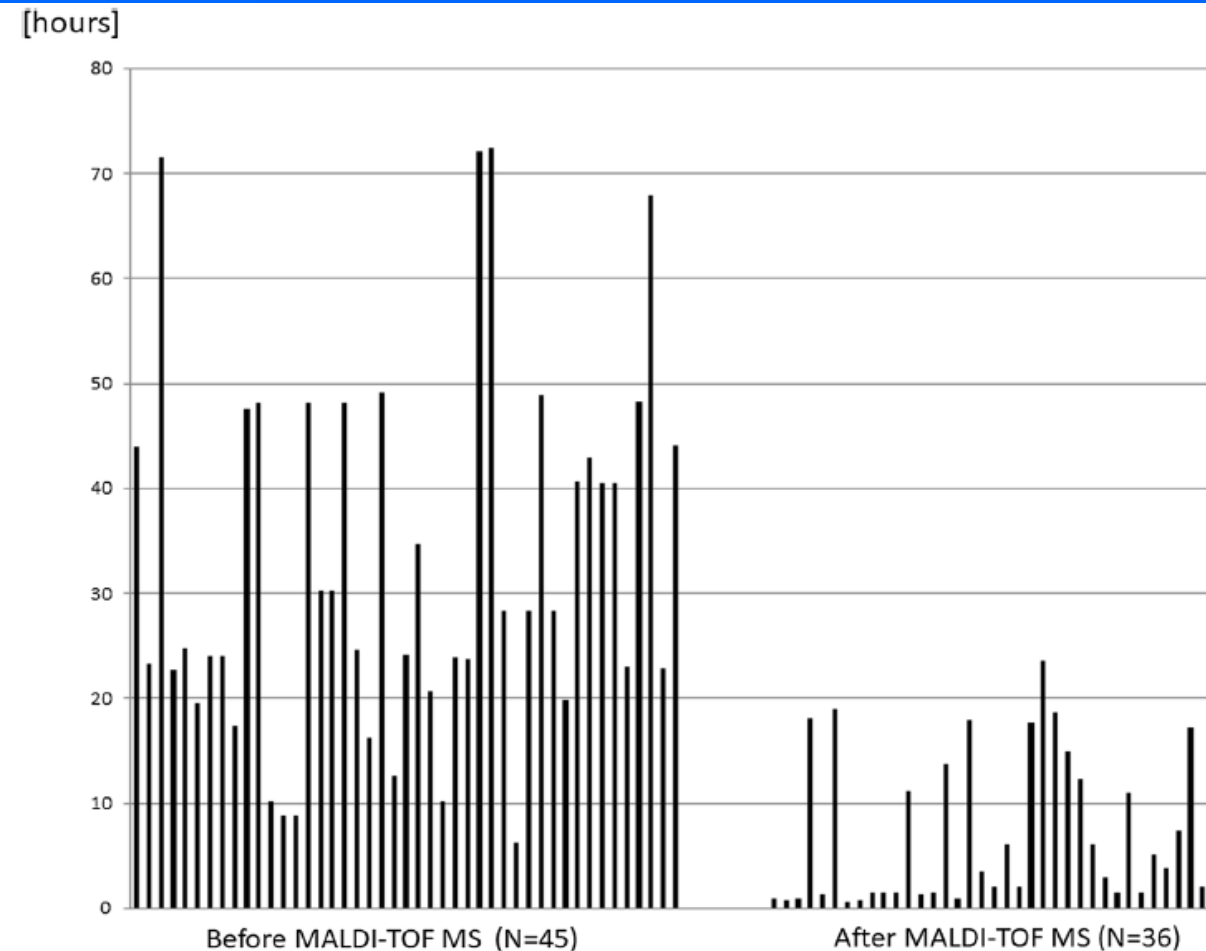


Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection



Clin Proteom 2020;17:14

Fumio Nomura^{1*} , Sachio Tsuchida¹, Syota Murata², Mamoru Satoh¹ and Kazuyuki Matsushita²



CMFT πρωτόκολλο σε 170 μονομικρ. αιμοκ/ες
καλύτερα αποτελέσματα ιδίως σε Gram (+)
MALDI-TOF MS σε πολυμικροβιακές αιμοκ/ες:
δυσκολία στην ανίχνευση → ανάγκη για ανακ/α

Μείωση του TAT μέχρι την ταυτοποίηση:

- 34.3 h αν σε όλες τις αιμοκ/ες
- 26.5 h αν σε κάποιες προηγούταν

ανακαλλιέργεια και εφαρμογή MALDI-TOF

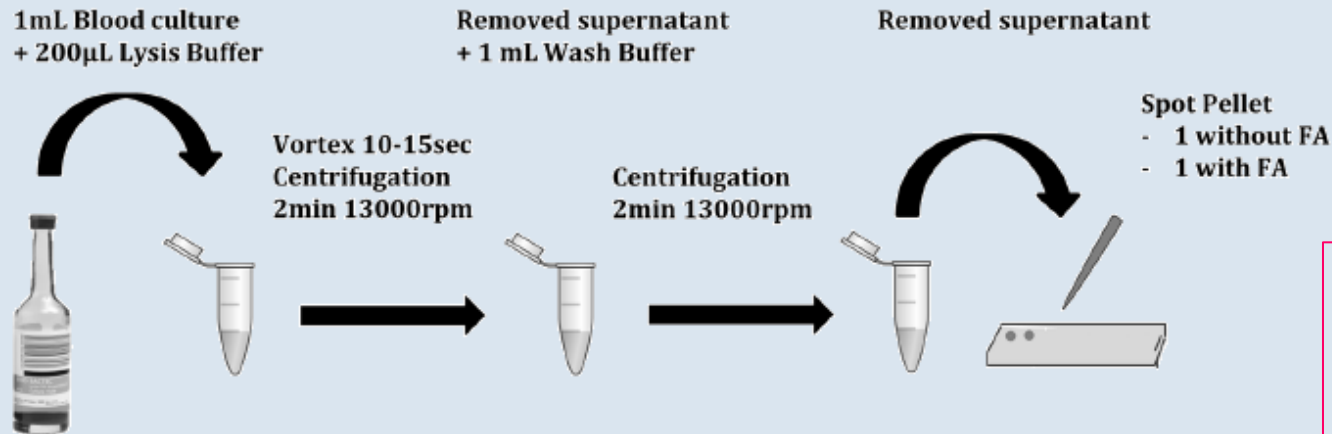
μεμβράνης (CMFT).



Evaluation of Rapid Sepsityper[®] protocol and specific MBT-Sepsityper module (Bruker Daltonics) for the rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-TOF-MS

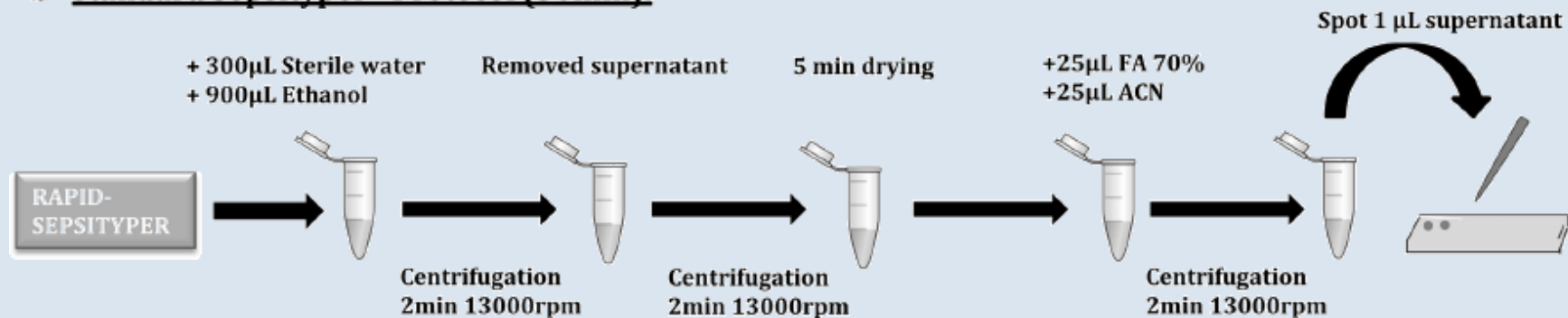
Ponderand et al.
Ann Clin Microbiol Antimicrob
2020;19:60

a Rapid Sepsityper[®] Protocol (10min):



**Rapid Sepsityper[®]
protocol ± FA:
ταυτοποίηση με ακρίβεια
2/3 των δειγμάτων**

b Standard Sepsityper[®] Protocol (30min):



MALDI-ToF MS και ιολογία

MALDI-ToF MS και βακτήρια

Ενδοκυττάρια πρωτεΐνες (κυρίως ριβοσωμικές)

Μέγεθος: 2,000 - 20,000 Th (m/z)

Μη γλυκοζυλιωμένες – τροποποίηση μετά τη μετάφραση (κυρίως φωσφορυλίωση)

Η καταλληλότερη μήτρα (matrix) για τον ιονισμό: alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (**CHCA**)

MALDI-ToF MS και ιοί

Απουσία ενδοκυττάρων “housekeeping” πρωτεϊνών

Μέγεθος ιικών πρωτεϊνών: 10,000 -

300,000 Th (m/z) – πολύ μεγαλύτερη (σε μεγάλο βαθμό γλυκοζυλιωμένες και τροποποιημένες μετά τη μετάφραση)

CHCA **όχι κατάλληλη** μήτρα ιονισμού

Κατάλληλες άλλες ουσίες όπως sinapinic acid (SA) (3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid)



MALDI-TOF MS και ιολογία

Εφαρμογές

Διάγνωση

Αναπνευστικοί ιοί
HSV (και σε αρχειακό υλικό)
Εντεροιοί
HPV (high-risk)

Ανίχνευση μεταλλάξεων και τυποποίηση γονοτύπων

HBV
HCV

Ανίχνευση αντοχής στα αντιϊικά

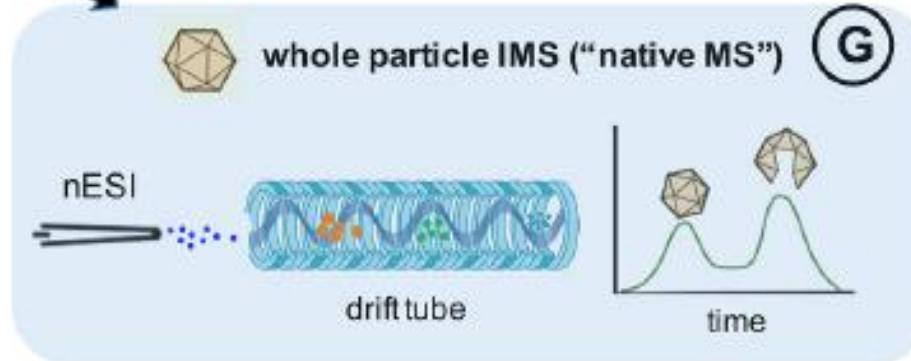
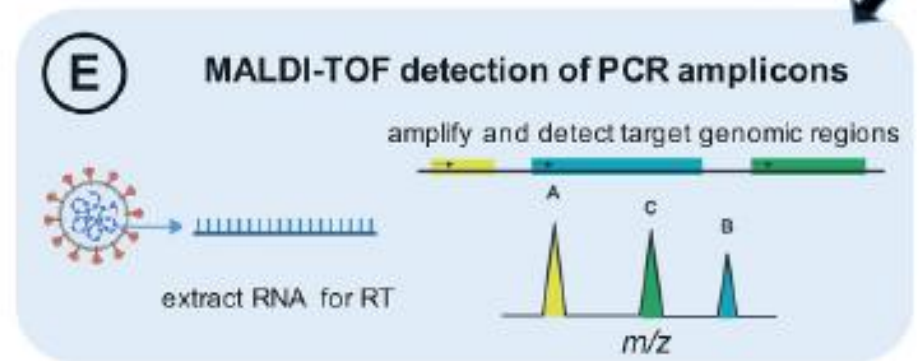
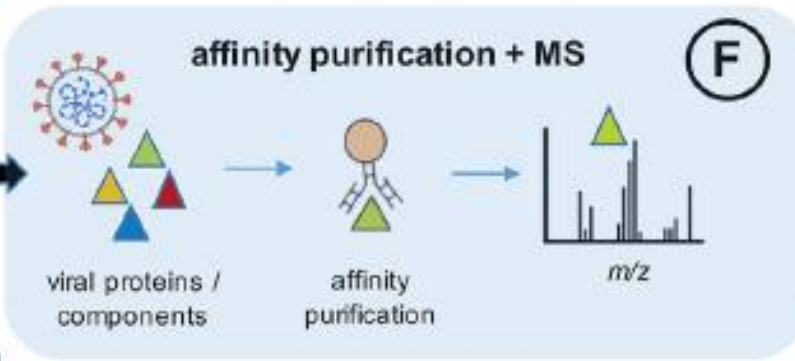
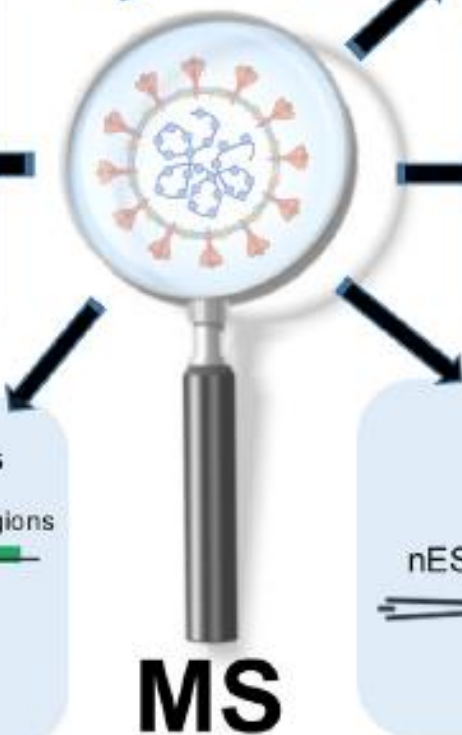
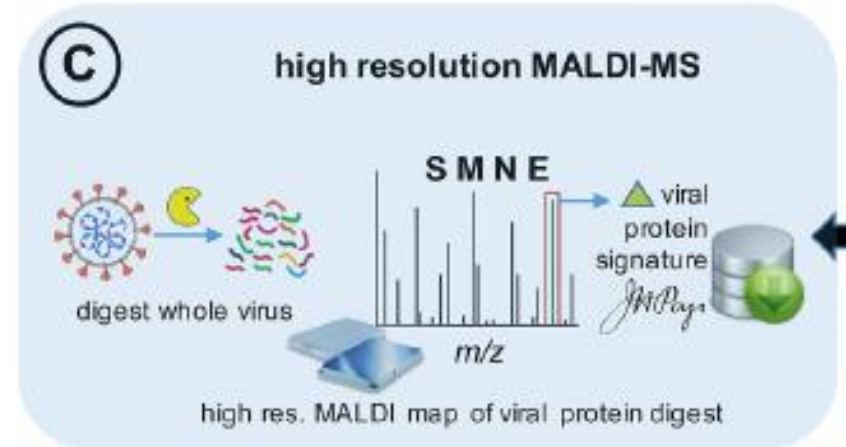
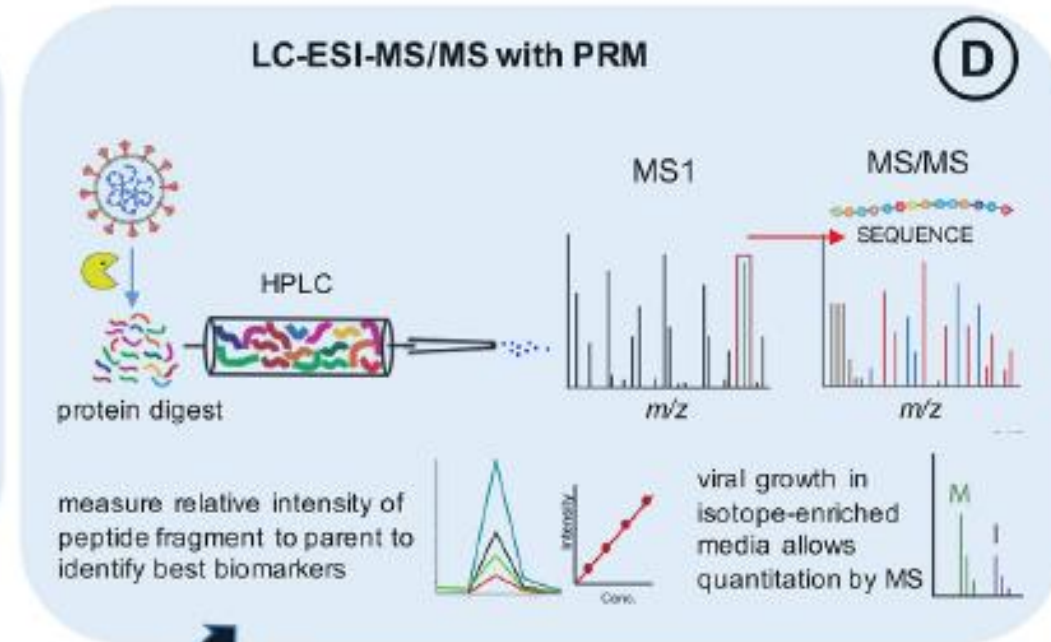
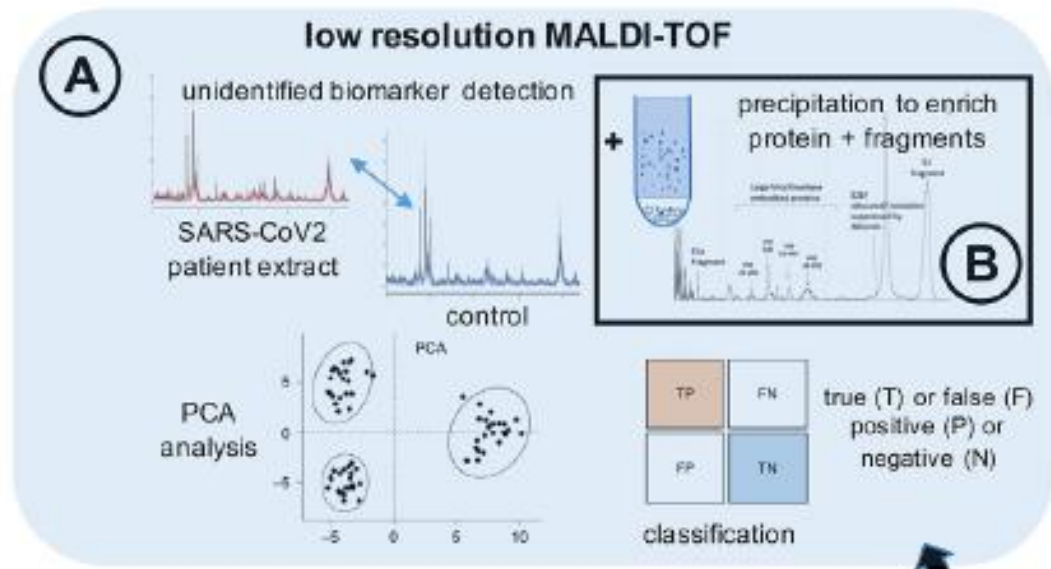
Ganciclovir

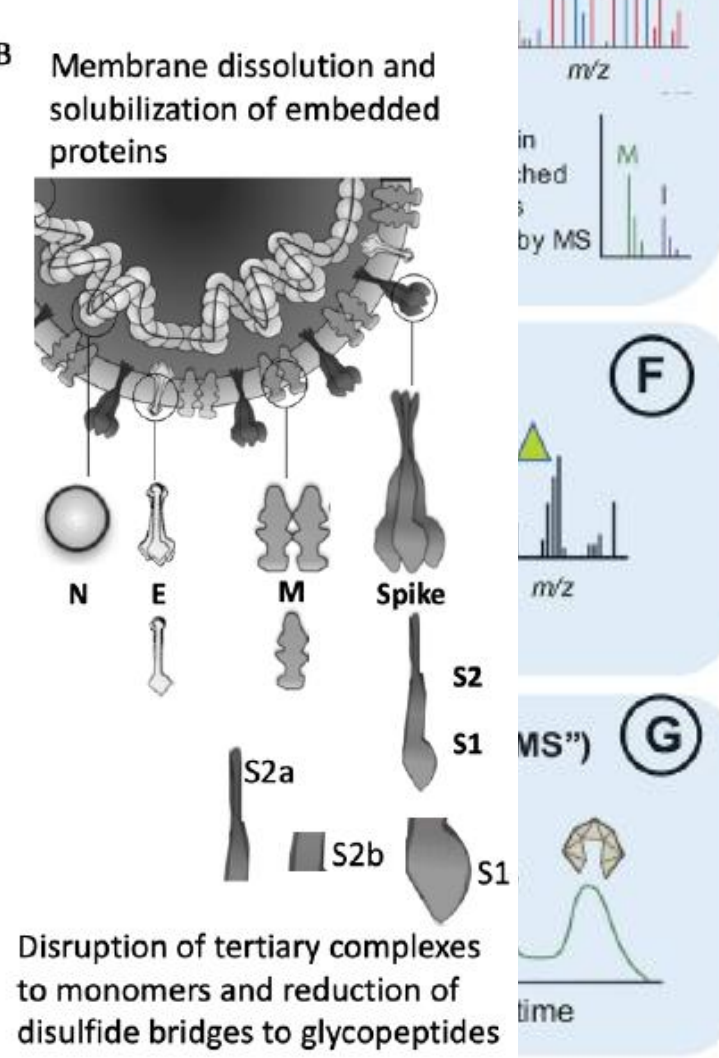
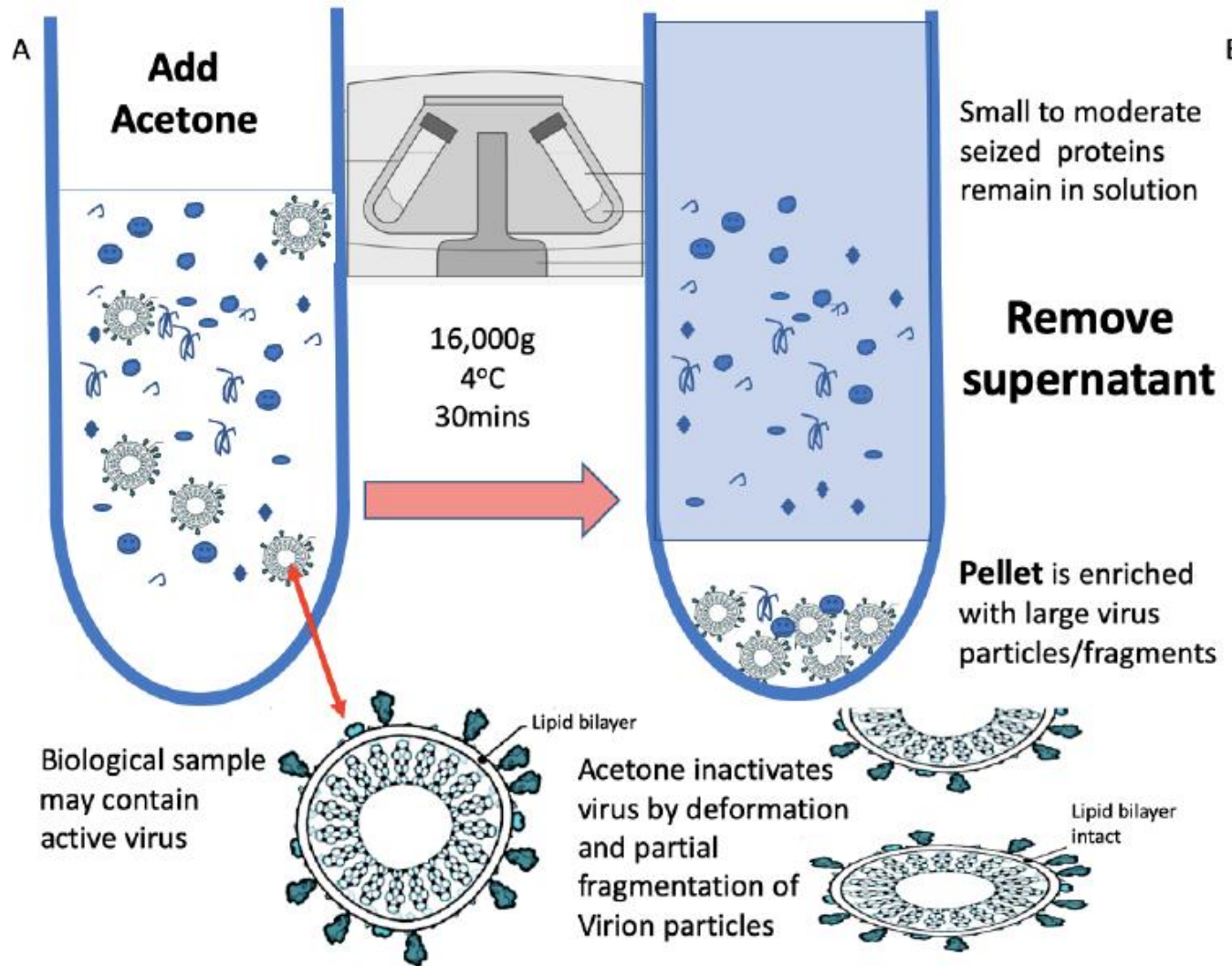
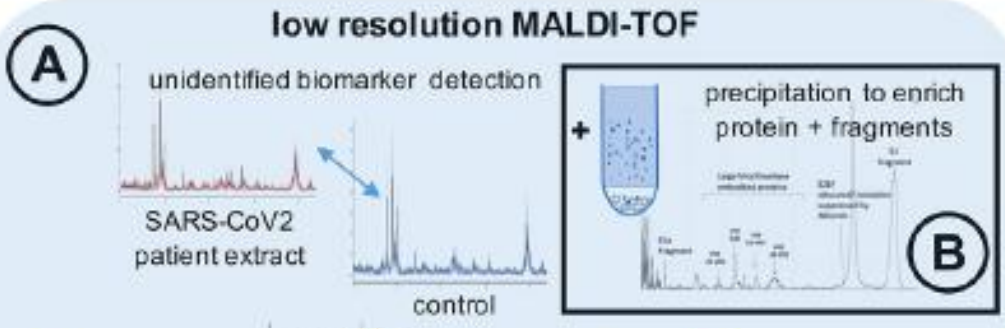
Επιδημιολογία

Table 12.1 Summary of the main applications of MALDI-TOF MS to clinical virology
Applications

Identification of viruses from clinical samples
Diagnosis of mutations for viruses
Screening of viral subtypes
Identification of antiviral resistance
Epidemiology of viral infections







MALDI-ToF MS και ιολογία

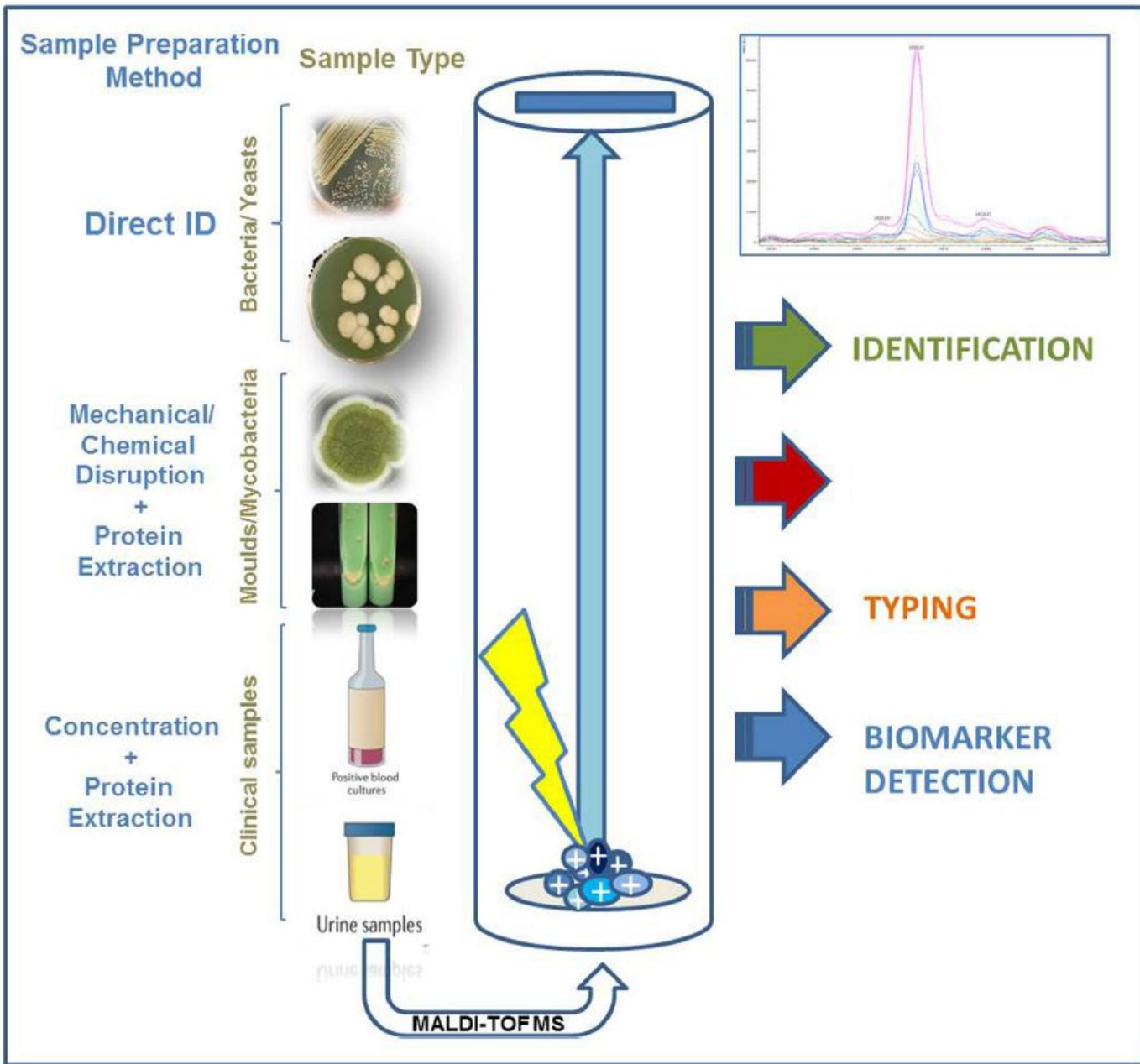
Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα

Table 1
Comparison of RT-PCR versus amplicon and viral peptide detection for SARS-CoV2 diagnosis^a.

Step/parameter	RT-PCR detection [5]	DNA amplicon detection by MS [30,31]	Viral peptide detection by MALDI-MS [16]	Viral peptide sequencing by LC-ESI-MS/MS [21]
Viral component recovery	RNA	RNA	protein	protein
Recovery time	minutes	minutes	1–2 h	1–2 h
Steps pre-analysis	reverse transcription, denaturation, annealing, amplification ^b	reverse transcription, denaturation, annealing, amplification ^b	proteolytic digestion with/without reduction/alkylation	proteolytic digestion with/without reduction/alkylation
Pre-analysis time	30 min	30 min	4–14 h ^c	4–14 h ^c
Detection time	2–4 h	few minutes	few minutes	30 min – 1 h
Detection limit (copies)	~10	>10–10 ² [30]	> 10 ^{5d}	10 ⁵ –10 ⁶
Reliability/confidence	up to 95%	high (with multiple amplicons detected)	high (with multiple peptides detected)	high (with multiple peptides sequenced)
Analysis cost/sample (USD)	\$10	\$10-50	\$100	\$250
Instrument cost (USD)	\$20 K+	\$100 K+	\$100–1000 K+	\$250–500 K+

Trends in Analytical Chemistry 142 (2021) 116328



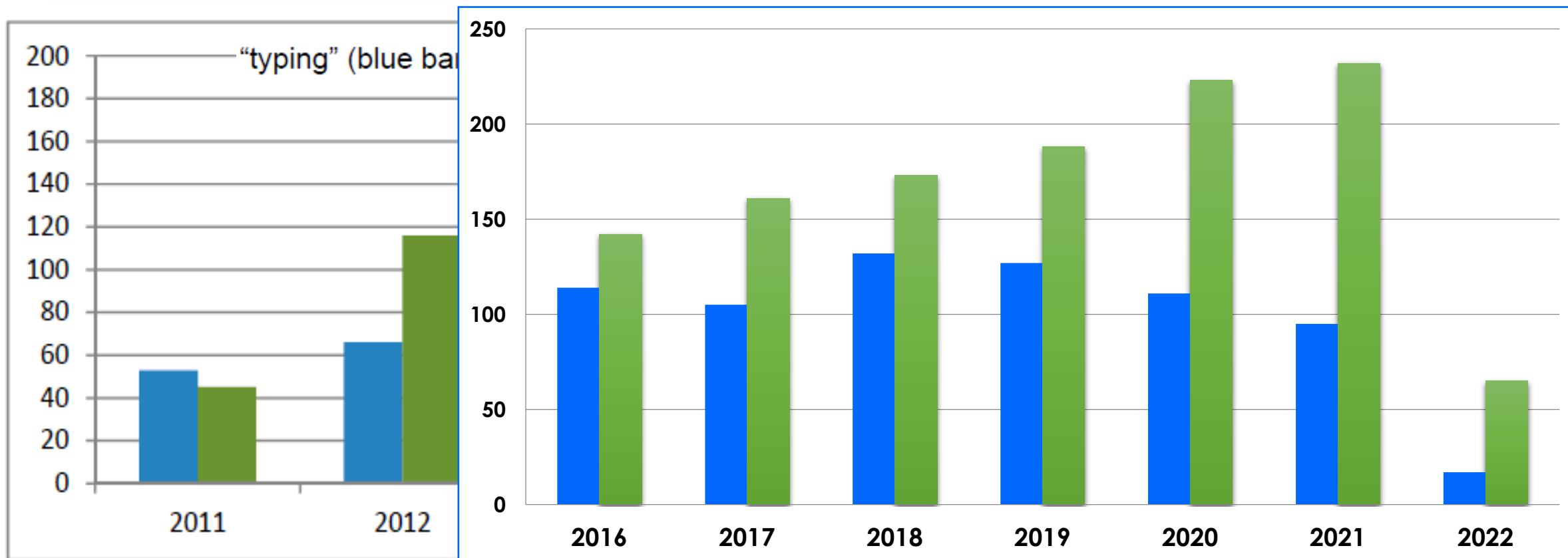


Sample types that can be analyzed by MALDI-TOF and the processing method recommended

MALDI-TOF MS: ανίχνευση μικροβιακής αντοχής

Report of the literature accessed from PubMed on Apr. 9, 2022

Why is this increased interest in the detection of resistance by MS?



Σύγκριση μεθοδολογιών ταχείας ανίχνευσης αντοχής

5 main approaches have been introduced as rapid means of detecting antimicrobial resistance

Technology	LOD (CFU/ml) ^a	Sensitivity (%) ^b	Specificity (%) ^b	TAT ^c	Price/sample (\$)
Molecular genetics	10^2 – 2×10^4	96–99	96–99	1–3 h	5–50 ^d
Biochemical methods	6×10^8	90–99	96–100	30 min–2 h	1–5 ^e
Immunoassays	10^4 – 10^6	96–100	97–100	20 min	7–15 ^f
Electrochemical assays	10^6 – 10^9	95–96	100	5–30 min	1 (plus \$100 for the homemade reader) ^g
MALDI-TOF MS	10^5 – 10^6	98–100	92–100	30 min–3 h	1–10

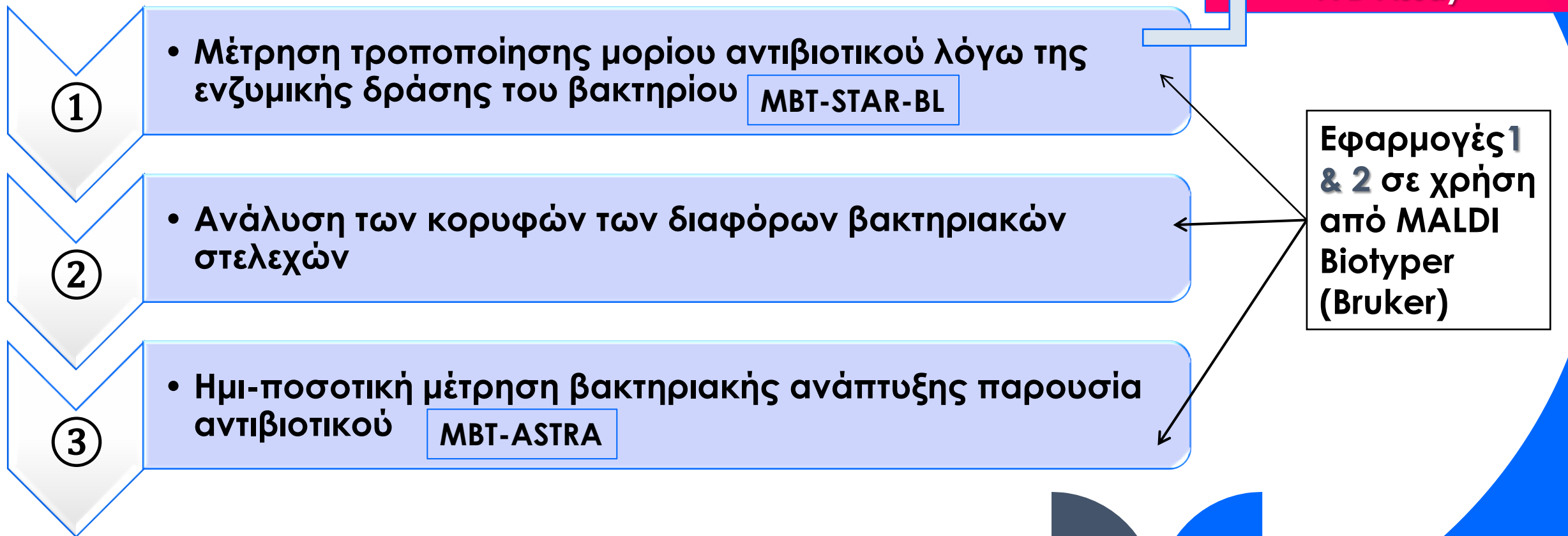
The MALDI-TOF MS method is a rapid and simple procedure that combines the universal advantages of phenotypic assays with the rapidity and accuracy of molecular assays.

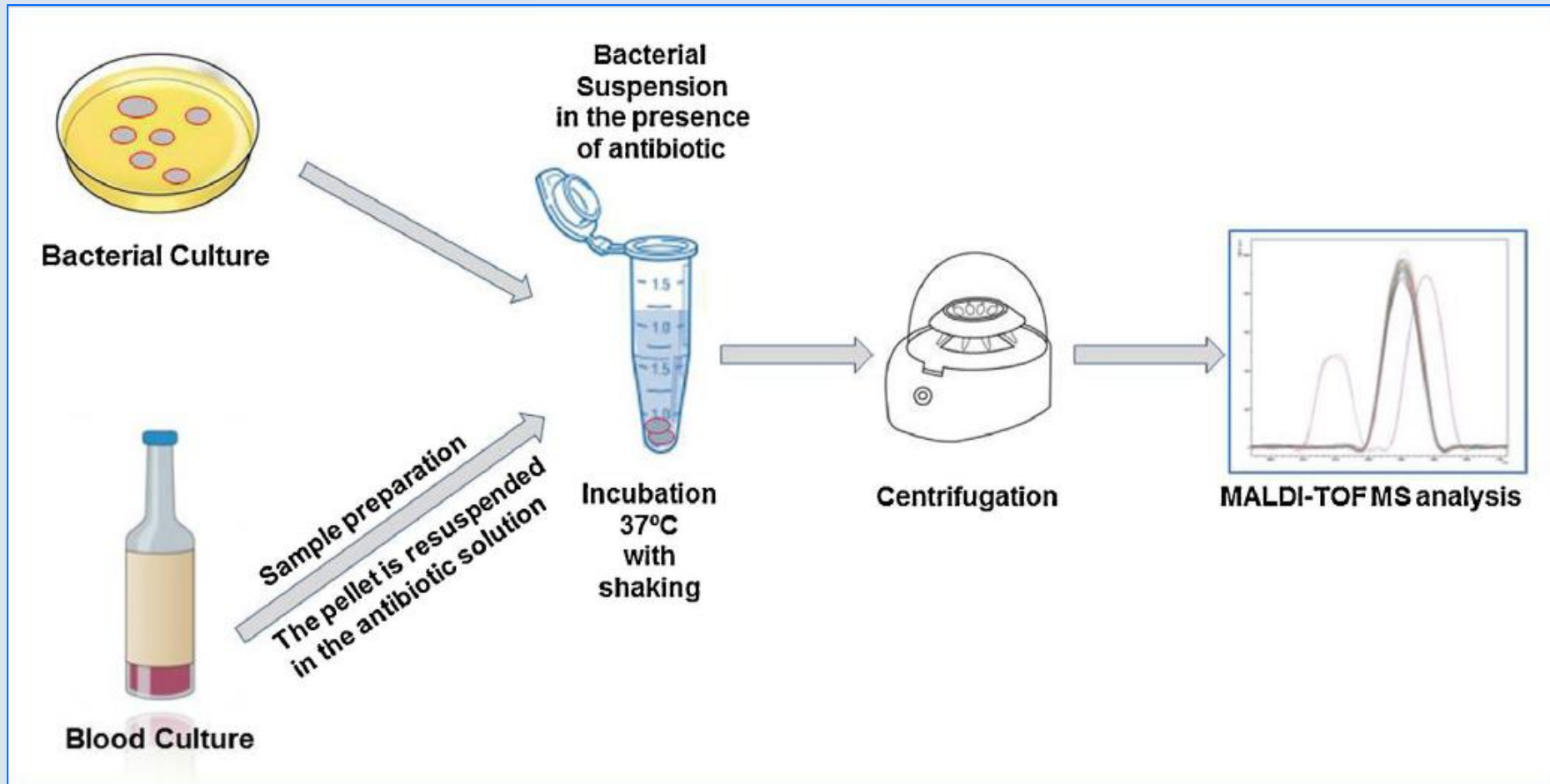
Τεχνικές ελέγχου ευαισθησίας βασισμένες στην MALDI-TOF

Όνομασία	Αρχή μεθόδου	Παθογόνα	Αντιβιοτικά - στόχοι
Βακτήρια			
Η MALDI-TOF σε αναλογία με γονοτυπικές αναλύσεις			
Ειδικό πρότυπο αντοχής	Φασματομετρική ανάλυση με MALDI-TOF δοθέντος μικροοργανισμού, με σκοπό την ανίχνευση «χαρακτηριστικού προτύπου κορυφών αντοχής»	MRSA, MSSA, VRE Porins alteration in <i>Klebsiella</i> Carbapenem resistant <i>Bacteroides fragilis</i>	Όλα τα αντιβιοτικά
Η MALDI-TOF σε αναλογία με τις κλασσικές, βιοχημικές μεθόδους ευαισθησίας			
MALDI Biotyper-Selective Testing of Antibiotic Resistance-Beta-Lactamase Assay (MBT-STAR-BL Assay)	Ανάλυση της υδρόλυσης των β-λακταμικών που προκαλείται από τα βακτήρια	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>E. cloacae</i>	β-λακτάμες
MALDI Biotyper-Resistance Test with Stable Isotopes Assay, (MBT-RESIST Assay)	Ανίχνευση σταθερών (μη-ραδιενεργών) ιχνηθετημένων με ισότοπα αμινοξέων, που παίρνουν μέρος στη δομή νέο-συντιθέμενων πρωτεϊνών	Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> (MRSA), <i>P. aeruginosa</i>	Όλα τα αντιβιοτικά αλλά κυρίως για τα αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση
MALDI Biotyper-Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay (MBT-ASTRA).	Ανάλυση της βακτηριακής ανάπτυξης κατά την παρουσία και την απουσία αντιβιοτικών με την χρήση στοιχείου εσωτερικού ελέγχου	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>S. aureus</i> <i>Mycobacteria</i> : <i>M. tuberculosis</i> , NTM Anaerobic bacteria (<i>B. fragilis</i>)	Όλα τα αντιβιοτικά <i>M. tuberculosis</i> : rifampin, isoniazid, linezolid, ethambutol. NTM: clarithromycin, RIF, CM, MER, metronidazole
Vrioni G., et al. Ann Transl Med 2018;6:240			

Τρεις κύριες μεθοδολογίες ανίχνευσης μικροβιακής αντοχής με MALDI-TOF MS

Ανίχνευση μικροβιακής αντοχής με:





Workflow for the application of MALDI-TOF to the detection of antibiotic resistance mechanisms

Έτοιμα kit για χρήση ρουτίνας

Detection of carbapenemases by **MBT STAR Carba kit**

Analysis of bacterially induced hydrolysis of β -lactam antibiotics

Samples are analyzed using **imipenem** to detect carbapenemase enzymes

Ratio between the area under the peak of the internal standard and intact imipenem

Advantages

- ✓ sensitivities ranging from 95% to 100% and specificities ranging from 98.2% to 100%,
- ✓ the turnaround time: <1 h
- ✓ automated interpretation of results
- ✓ microorganisms from plate cultures or from positive blood cultures

Disadvantages

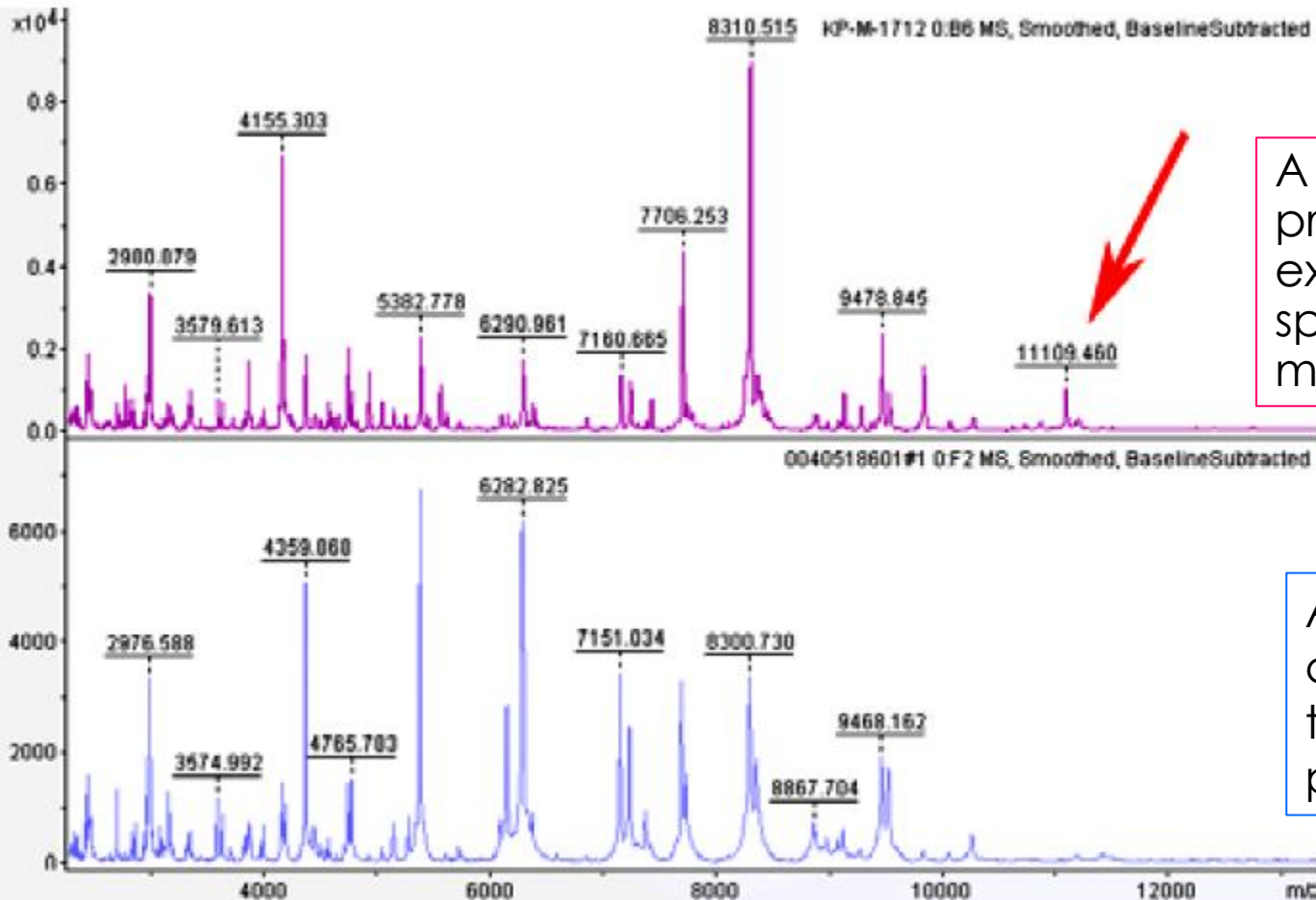
- No identification of the β -lactamase type
- Does not provide information regarding the MIC



H	hydrolyzed
NH	Non-hydrolyzed ²

Ανάλυση των κορυφών των διαφόρων βακτηριακών στελεχών

The pKpQIL plasmid-related peak in the MALDI mass spectra of *K. pneumoniae*

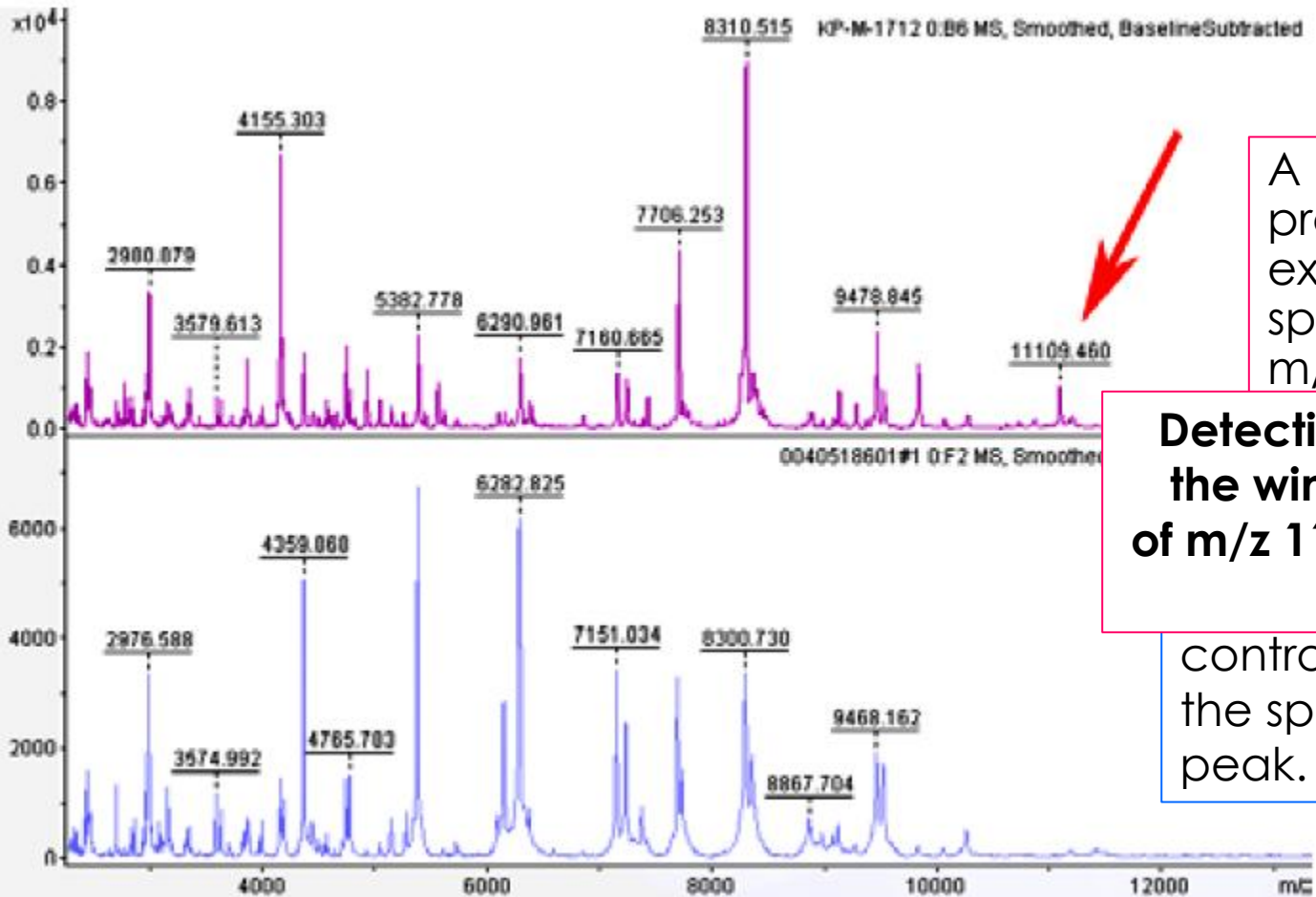


A KPC-producing strain exhibiting the specific 11,109 m/z peak.

Detection in the window of m/z 11,109 +/-5.

A negative control, without the specific peak.

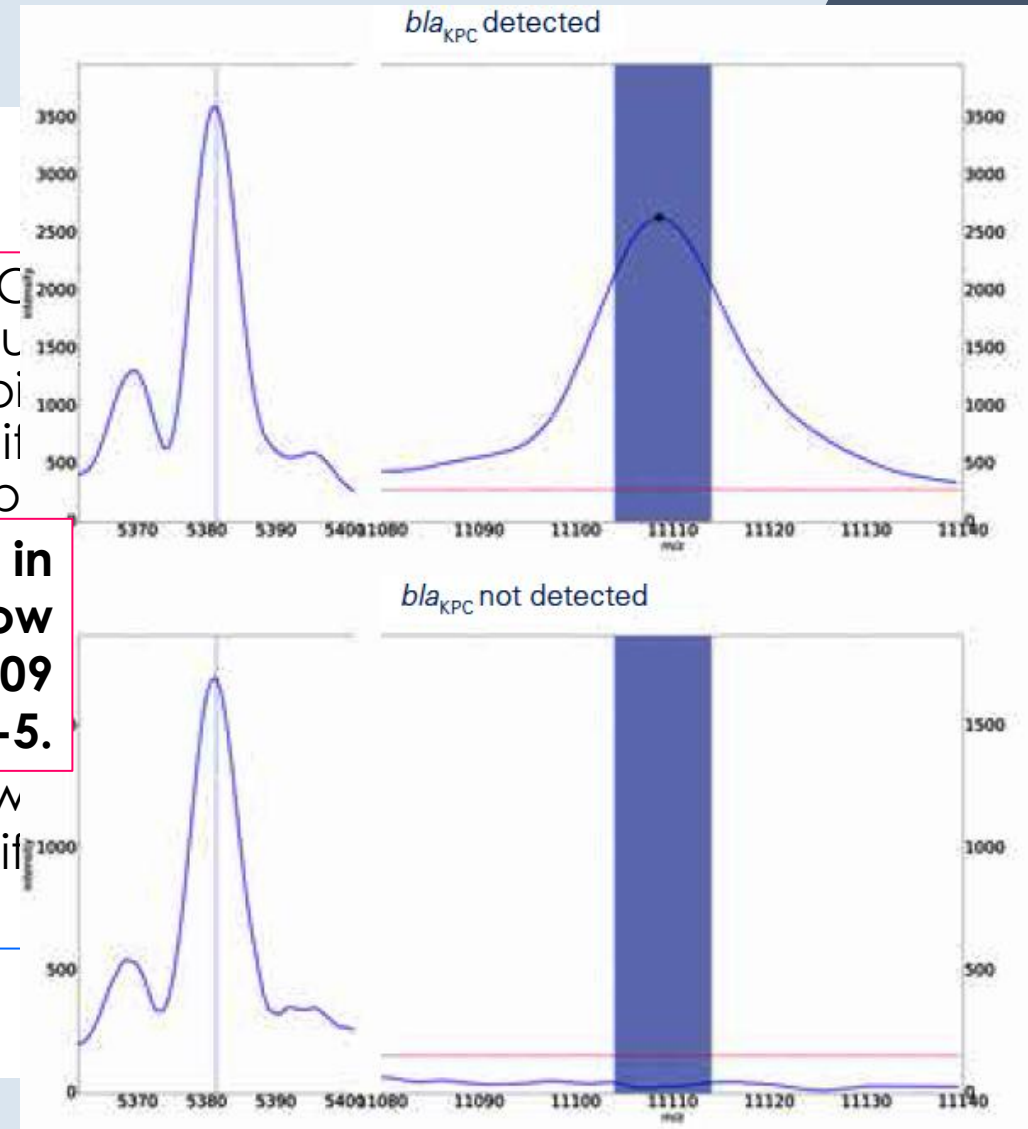
Ανάλυση των κορυφών των διαφόρων βακτηριακών στελεχών



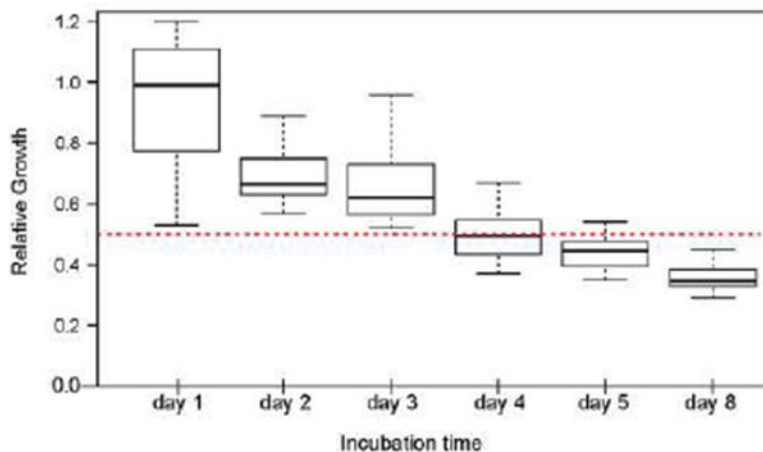
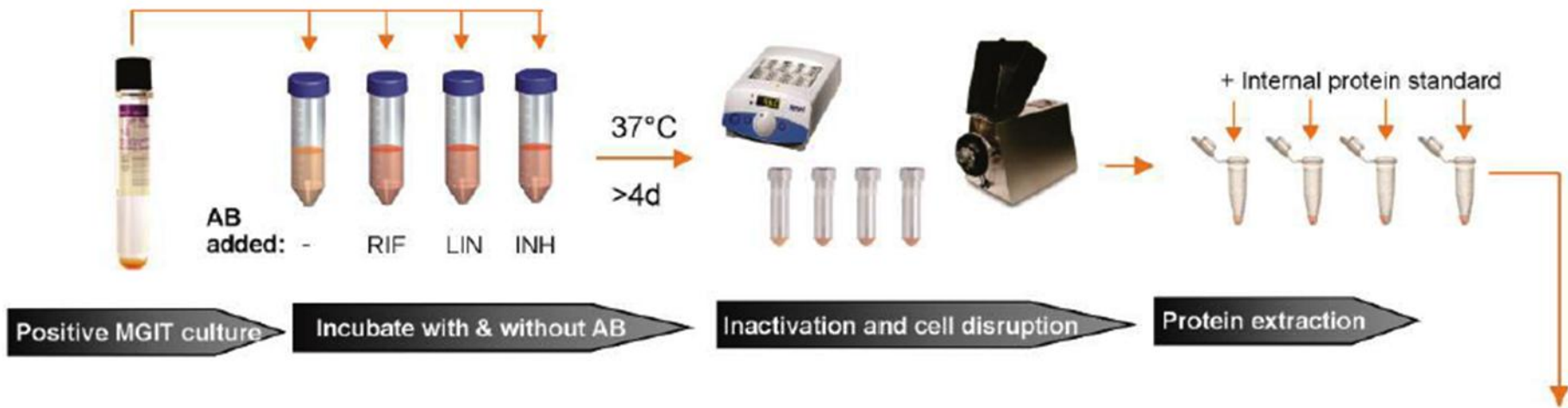
A KPC prod
exhibi
specif
m/z p

Detection in
the window
of m/z 11,109
+/-5.

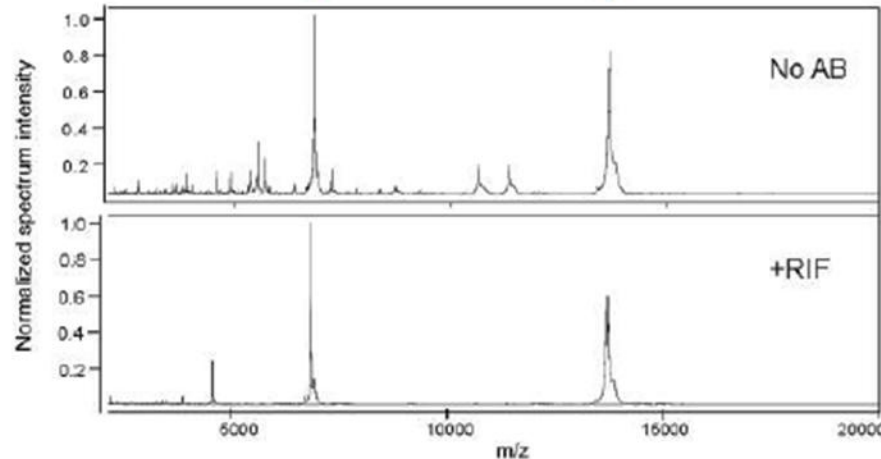
control, w
the specif
peak.



Ανάλυση της βακτηριακής ανάπτυξης κατά την παρουσία και την απουσία αντιβιοτικών (MBT-ASTRA)



MBT-ASTRA data processing



MALDI-TOF spectra acquisition

Άμεση συσχέτιση ανίχνευσης βακτηριακών πεπτιδίων με και χωρίς αντιβιοτικό

Growth values are shown for *M. tuberculosis* H37Rv, incubated for 8 days in the presence and absence of rifampicin.

Ceyssens P-J, et al. 2016; *J Clin Microbiol* 55:624 – 634

Δεδομένα από Εργαστήριο Μικροβιολογίας

MALDI Biotyper® IVD System based on microflex® LT/SH

Από 2020

> 3000 ταυτοποιήσεις: 70% Μύκητες (ζύμες & υφομύκητες)

-Βιβλιοθήκες IVD & RUO (Βακτήρια, ζύμες, υφομύκητες, μυκοβακτηρίδια, εσκεμμένης διασποράς)

-Δυνατότητα ανίχνευσης διπλών πληθυσμών

- Ανίχνευση από θετική αιμοκ/α και

- Ανίχνευση αντοχών (STAR kits)



Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier	Score Value
1 (+++)	Trichophyton tonsurans 28 VML [presumptive mixture with Trichophyton interdigitale 120227_03 ETL]	2.34	34387 101480	2.41
2 (+++)	Trichophyton tonsurans 28 VML	2.20	34387	2.17
3 (+)	Trichophyton tonsurans RV491_Sep09_C LBK	1.88	34387	1.98
4 (+)	Trichophyton tonsurans VML	1.77	34387	

Escherichia coli ATCC 25922
THL

closely related to Shigella / Escherichia fergusonii and not definitely distinguishable at the moment

Raoultella ornithinolytica
CCUG 52805 CCUG

Klebsiella oxytoca and species ornithinolytica / planticola / terrigena of the genus Raoultella have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.

Species benhamiae / equinum / interdigitale and tonsurans of the genus Trichophyton have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.

Δυνατότητα ανίχνευσης και μικτών καλλιεργειών

Δυσκολία στη διαφοροποίηση συγγενών μικροοργανισμών

Carba

Δ controls = 1.96

recalibrated with 'MBT STAR Matrix'



Sample	Species	Control ID	CARBA	Result
49	Pseudomonas putida	not performed	0.99	H
neg.control		not performed	-0.01	NH
pos.control		not performed	1.08	H

Autobio 安图生物



VS

BRUKER



Autof MS1000, Automated mass spectrometry microbial identification system

MALDI Biotyper® (MBT) Microbial identification system based on MALDI-ToF mass spectrometry,

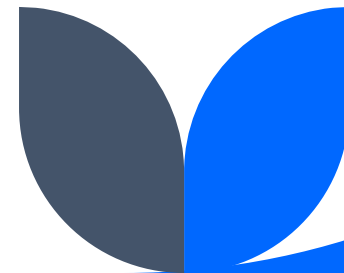


Bacteria

Group of organisms	N	Bruker Biotyper			Autof ms1000		
		Species	Genus	No reliable ID	Species	Genus	No reliable ID
Gram-positive cocci (<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Kocuria</i>)	42	38	4	0	33	6	3
Gram-positive bacteria (<i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i>)	9	4	5	0	7	2	0
Enterobacterales	21	20	1	0	19	2	0
Nonfermenters (<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>)	11	8	3	0	8	3	0
Gram-negative bacteria (<i>Achromobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Cardiobacterium</i> , <i>Elisabethkingia</i> , <i>Moraxella</i>)	11	7	4	0	10	1	0
Anaerobes	8	6	2	0	6	1	1
Total	102	83	19	0	83	15	4
		102/102			98/102		

Fungi

Group of organisms	N	Bruker Biotyper			Autof ms1000		
		Species	Genus	No reliable ID	Species	Genus	No reliable ID
Yeasts (<i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i>)	43	24	18	1	27	14	2
Hyalohyphomyce tes (<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Dermatophytes</i>)	12	3	3	6	11	1	0
Total	55	27	21	7	38	15	2
		48/55			53/55		



Application of MALDI-TOF MS for the identification of clinical yeast isolates: comparison of the Autof ms1000 and Bruker Biotyper platforms

Both systems were able to identify all 87 yeast strains at the species level and the results obtained were identical (100% concordance). The only differences observed were in the score values (**Table**).

	Autof ms1000 (%)	Bruker Biotyper (%)
Score (n=87)		
High	48/87 (55.2) at species level 37/87 (42.5) at genus level only	64/87 (73.6) at species level 23/87 (26.5) at genus level only
Non-reliable	2/87 (both <i>C. auris</i>)	0
ID compared with VITEK (n=21)	17/21 (80.9)	17/21 (80.9)



Performance of MALDI-TOF MS for routine identification of *Fusarium* clinical isolates: comparison of the Autof ms1000 and Bruker Biotyper platforms

Identification results were obtained for 36 of the 37 (97.3%) *Fusarium* strains by both systems (**Table**).

28/36 strains gave identical results by both systems, at least at the species complex (SC) level (**77.8% concordance**).

	Autof ms1000 (%)	Bruker Biotyper (%)
Score (n=36)		
High	16/36 (44.4)	25/36 (69.4)
Non-reliable	5/36 (13.9)	1/36 (2.8)
Correct ID (n=25 with molecular ID)	16/25 (64) ➤ 14 at species level ➤ 2 at SC level	20/25 (80) ➤ 17 at species level ➤ 3 at SC level



Κόστος - όφελος

Κόστος αγοράς μηχανήματος: \$160 000 - \$250 000

Service / έτος: \$10.000 - \$35 000

Αντιδραστήρια - αναλώσιμα: \$ 0.10–\$ 0.50 / δείγμα **vs**

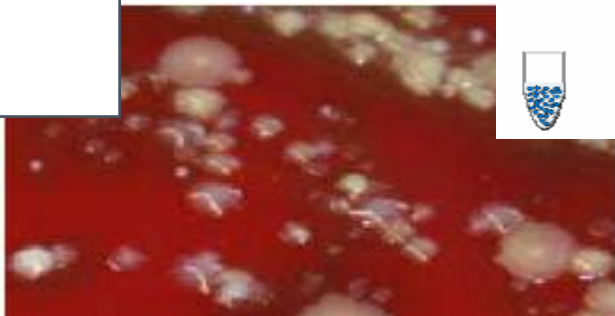
κλασική μεθοδολογία ~ \$2.50–\$5.00 / δείγμα

+ κέρδος χρόνου (~ 1 minute / ταυτοποίηση) – συνολικά 20 min



~ 1 h for 96 samples

Mass range:
2000-20000 Da

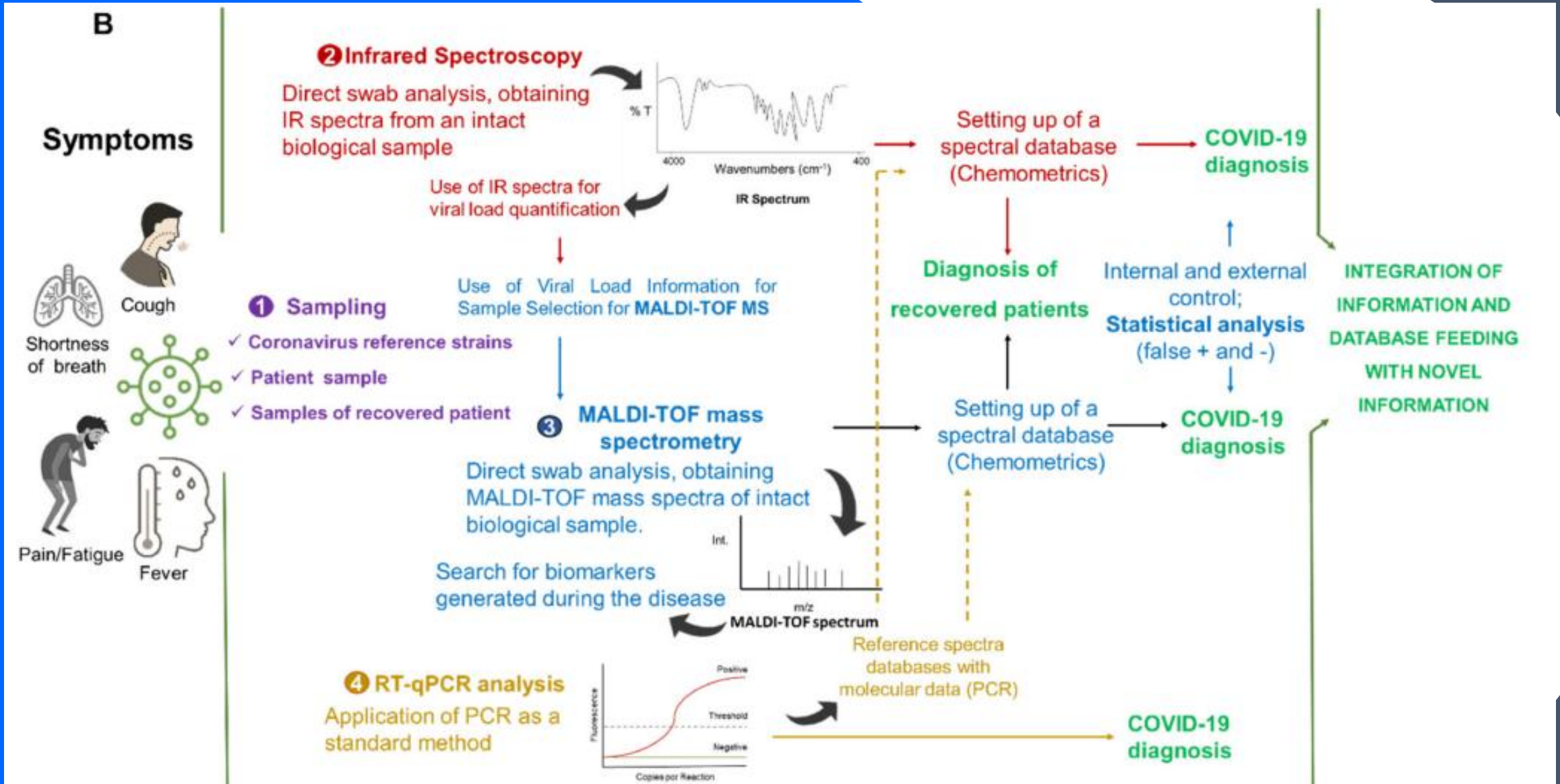


Analyze
supernatant



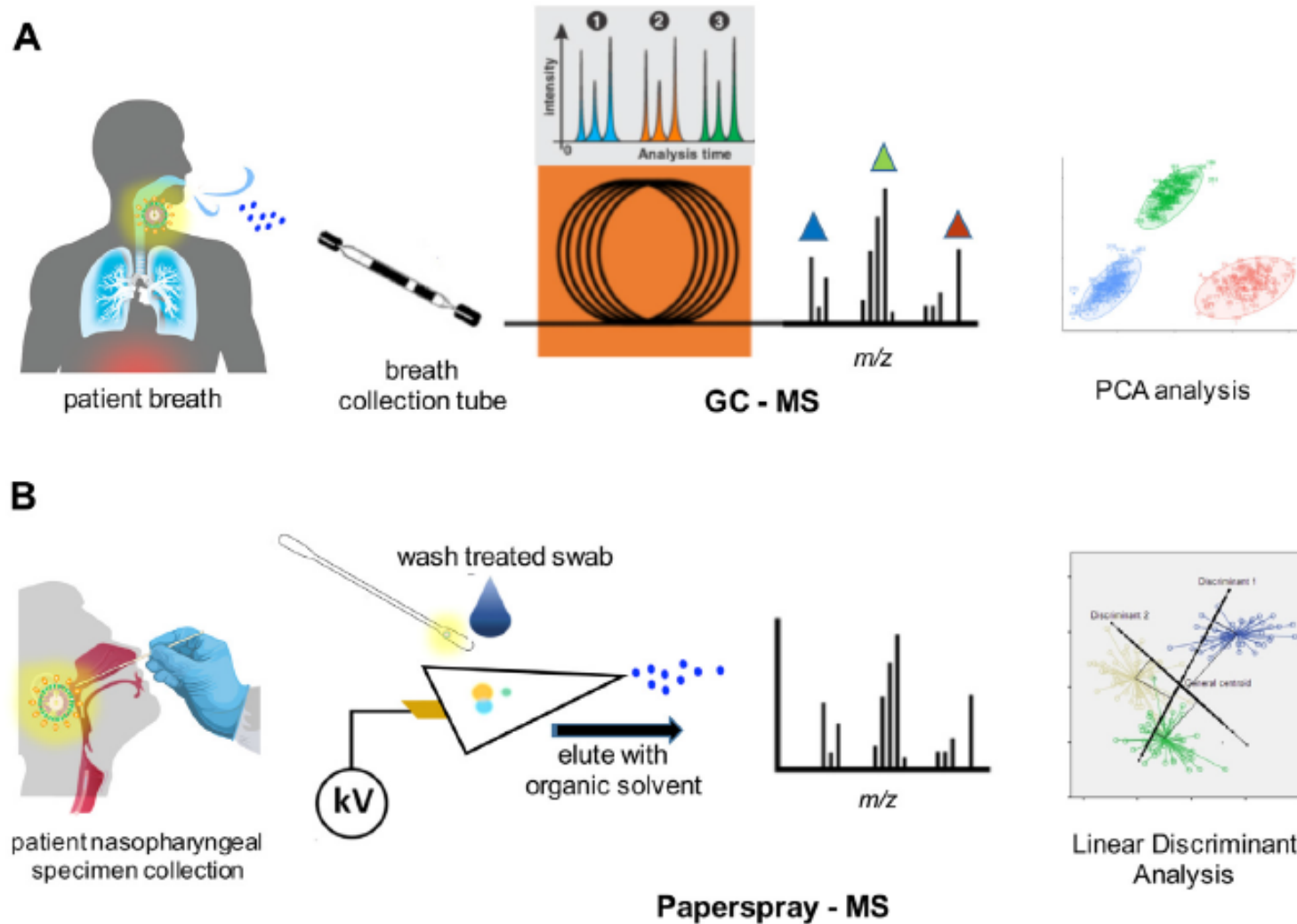
Ethanol-FA extraction Acetonitrile

Άλλες εφαρμογές ;



Costa, J.. Et al COVID-19, Chikungunya, Dengue and Zika Diseases: An Analytical Platform Based on MALDI-TOF MS, IR Spectroscopy and RT-qPCR for Accurate Diagnosis and Accelerate Epidemics Control. *Microorganisms* **2021, 9, 708**

Άλλες εφαρμογές ;



Schematics of (A) GC-MS analysis of **volatiles in breath** of infected patients and (B) nasopharyngeal swab specimens **by paperspray** mass spectrometry. Performance (sensitivities, resolution, dynamic ranges, etc.) depend on specific MS instrument configuration and operation.

5. Συμπεράσματα

Μεγάλη τεχνολογική πρόοδος (επανάσταση)

Περισσότερα δεδομένα

Ταχύτερα

Υψηλότερη ποιότητα και ακρίβεια αποτελεσμάτων

Χαμηλότερο κόστος

Αλλά χρειάζεται

Ευελιξία

Προσαρμογή στις νέες προκλήσεις

Νέες δεξιότητες



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

Σάββατο 12 Νοεμβρίου 2022

- 08.45 – 09.15 Προσέλευση
- 09.15 – 09.30 Εισαγωγή σχετικά με την οργάνωση του φροντιστηρίου
Γ. Βρυώνη
- 09.30 – 10.00 Εφαρμογές του Φασματογράφου Μάζας Maldi-ToF στην κλινική μικροβιολογία
Γ. Βρυώνη
- 10.00 – 11.30 Εφαρμογές της Φασματομετρίας Μάζας στην Κλινική Χημεία (προσδιορισμός στεροειδών ορμονών, βιταμίνης D, μετانهφρινών, φαρμάκων)
Π. Μουτσάτσου
- 11.30 – 12.10 Μελέτες φαρμακοκινητικής και βιοδιαθεσιμότητας βιοδραστικών ουσιών
Α. Τσαρμπόπουλος

- 12.10 – 12.30 Διάλειμμα - καφές
- 12.30 -14.00 Φασματομετρία Μάζας: θεωρία / οργανολογία, εφαρμογή στον έλεγχο τροφίμων
Ν. Θωμαΐδης
- 14.00 – 15.00 Διάλειμμα – ελαφρύ γεύμα
- 15.00 – 17.00 **Πρακτικό μέρος**
Ταυτοποιήσεις (α) με απευθείας τεχνική, (β) με φορμικό οξύ, (γ) με χρήση αιθανόλης:
- βακτηρίων,
- ζυμομυκήτων,
- υφομυκήτων
Γ. Βρυώνη και συνεργάτες

Κυριακή 13 Νοεμβρίου 2022

- 09.00 – 09.30 Προσέλευση
- 09.30 – 11.00 Εφαρμογές Φασματομετρίας Μάζας σε κληρονομικά, μεταβολικά νοσήματα και ανίχνευση βιοδεικτών κλινικής σημασίας. Καινοτόμες εφαρμογές (metabolomics, proteomics, lipidomics)
Γ. Μαρόπουλος
- 11.00 – 11.30 Διάλειμμα – καφές
- 11.30 – 12.00 Η χρήση της Maldi-ToF Φασματομετρίας Μάζας στη διερεύνηση μηχανισμών αντοχής μικροοργανισμών. Ανίχνευση καρβαπενεμασών
Κ. Παπαγιαννίτσας
- 12.00 – 12.40 Εφαρμογές Φασματογράφου Μάζας σε περιβαλλοντικά δείγματα και στην τυποποίηση μικροοργανισμών: το παράδειγμα των *Legionella pneumophila* και *Brucella spp.*
Μ. Κυρίτσου
- 12.40 – 13.00 Ερωτήσεις - Συζήτηση
- 13.00 – 13.30 Bruker's Maldi Biotyper: εφαρμογές στο κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο
Α. Ευσταθίου
- 13.30-14.00 Ταχεία ταυτοποίηση μικροβίων με το AutoF MS 1000 – νεότερες εξελίξεις
Π. Καρατζέτζος
- 14.00 – 15.00 Διάλειμμα – ελαφρύ γεύμα
- 15.00 – 16.00 **Πρακτικό Μέρος I**
Προετοιμασία κλινικών στελεχών *Enterobacteriales* για έλεγχο ευαισθησίας. Ερμηνεία μεθοδολογίας στο σύστημα Bruker's Maldi-ToF
Γ. Βρυώνη και συνεργάτες
- 16.00 – 17.00 **Πρακτικό Μέρος II**
Άμεση ανίχνευση παθογόνων από θετική αιμοκαλλιέργεια. Έλεγχος ευαισθησίας σε κεφαλοσπορίνες και καρβαπενέμες
Γ. Βρυώνη και συνεργάτες
- 17.00 Συζήτηση / Συμπεράσματα – Αξιολόγηση Φροντιστηρίου
Όλοι οι Συμμετέχοντες