



# Η χρήση της MALDI-TOF φασμαφωτομετρίας μάζας στη διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής πολυανθεκτικών μικροοργανισμών

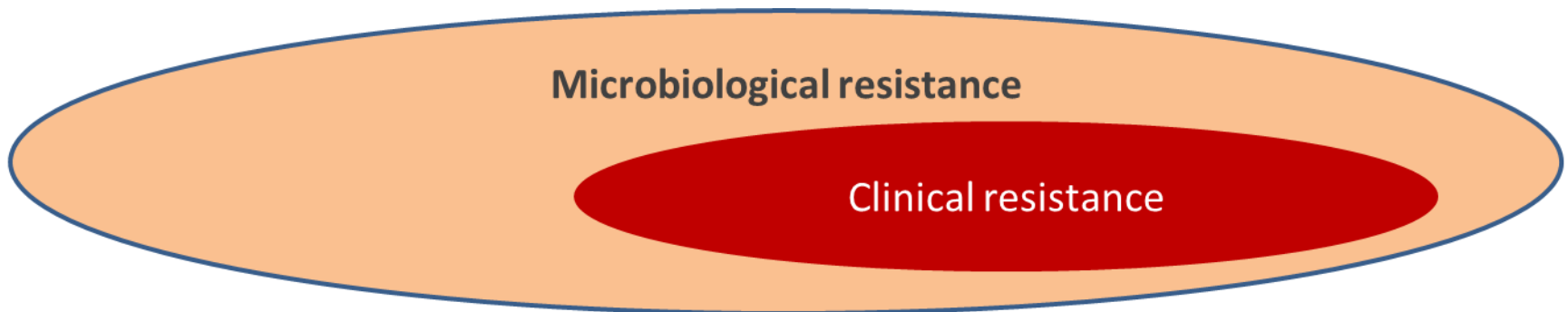
Κωνσταντίνος Χ. Παπαγιαννίσης  
Επικ. Καθ. Μικροβιολογίας

Τμήμα Μικροβιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα  
Καθ. Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Ευθυμία Πετεινάκη

# Μικροβιολογική Αντοχή



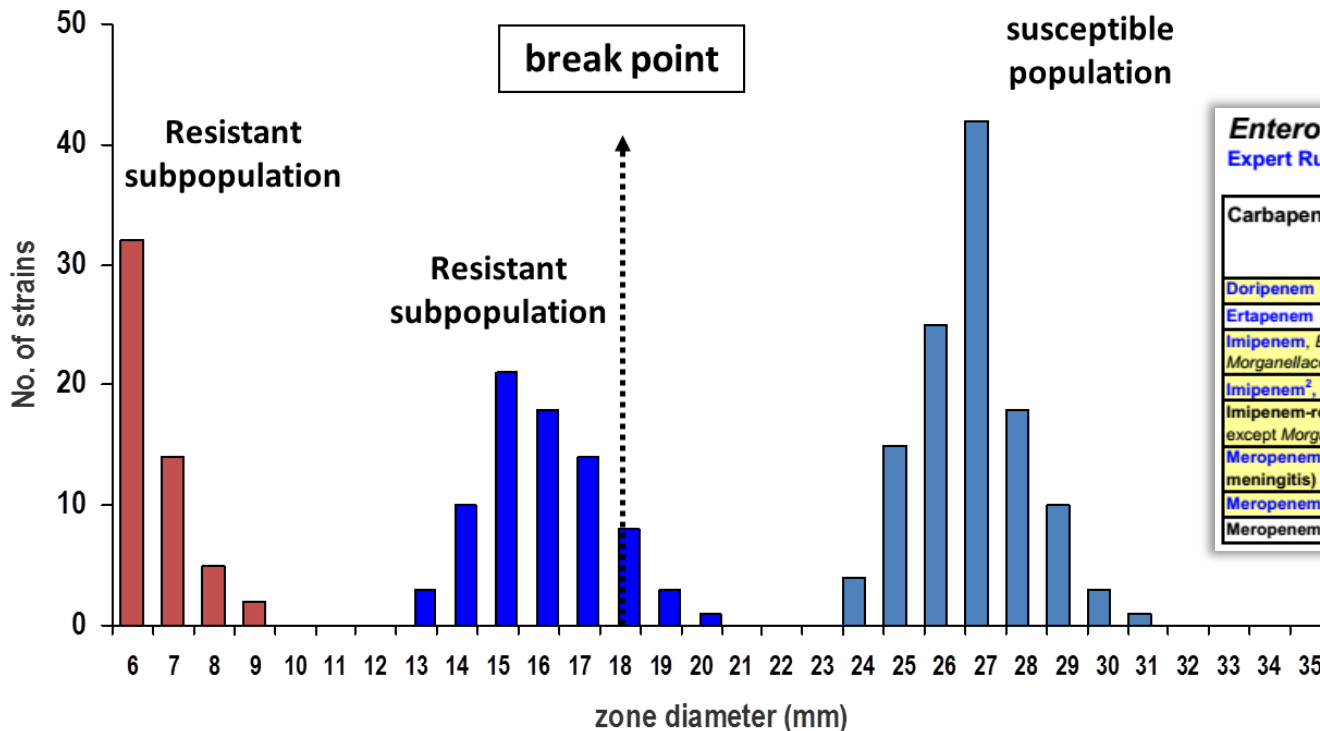
- ένας μικροοργανισμός ορίζεται ως non-wild type (**NWT**) για ένα είδος λόγω της παρουσίας ενός επίκτητου μηχανισμού αντοχής ή μεταλλάξεων που προσδίδουν αντοχή στο εν λόγω αντιβιοτικό
- ένας μικροοργανισμός κατηγοριοποιείται ως **NWT** για ένα είδος, εφαρμόζοντας την κατάλληλη **ECOFF** τιμή σε ένα καθορισμένο φαινοτυπικό σύστημα δοκιμής
- η **ECOFF** τιμή δεν θα αλλάξει από μεταβαλλόμενες συνθήκες
- οι **NWT** μικροοργανισμοί μπορεί να ανταποκρίνονται ή να μην ανταποκρίνονται κλινικά στην αντιμικροβιακή αγωγή



# Κλινική Αντοχή



- ένας μικροοργανισμός ορίζεται ως ανθεκτικός από ένα επίπεδο αντιμικροβιακής δράσης που σχετίζεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας
- ένας μικροοργανισμός κατηγοριοποιείται ως **ανθεκτικός (R)** εφαρμόζοντας το κατάλληλο **breakpoint** σε ένα καθορισμένο φαινοτυπικό σύστημα δοκιμής
- το **breakpoint** μπορεί να τροποποιηθεί από μεταβαλλόμενες συνθήκες



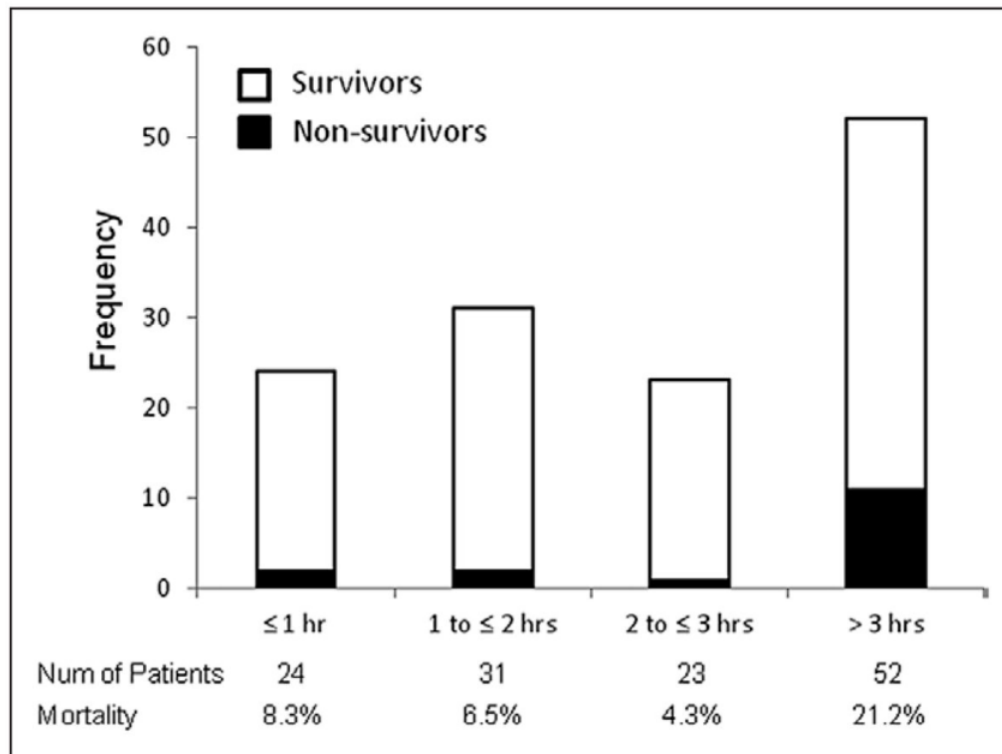
Carbapenems <sup>1</sup>	MIC breakpoints (mg/L)		
	S ≤	R >	ATU
Doripenem	1	2	
Ertapenem	0.5	0.5	
Imipenem, <i>Enterobacterales</i> except <i>Morganellaceae</i>	2	4	
Imipenem <sup>2</sup> , <i>Morganellaceae</i>	0.001	4	
Imipenem-relebactam, <i>Enterobacterales</i> except <i>Morganellaceae</i>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	
Meropenem (indications other than meningitis)	2	8	
Meropenem (meningitis)	2	2	
Meropenem-vaborbactam	8 <sup>4</sup>	8 <sup>4</sup>	

# Κλινική Αντοχή



- η καθυστερημένη ή μη κατάλληλη αντιβιοτική θεραπεία συνήθως αυξάνει τη θνησιμότητα σε σοβαρές λοιμώξεις

## Ανάγκη για γρήγορες δοκιμές ευαισθησίας



Time from sepsis recognition to initial antimicrobial administration with survival fraction.



NIH Public Access

Author Manuscript

*Crit Care Med.* Author manuscript; available in PMC 2015 November 01.

Published in final edited form as:

*Crit Care Med.* 2014 November ; 42(11): 2409–2417. doi:10.1097/CCM.0000000000000509.

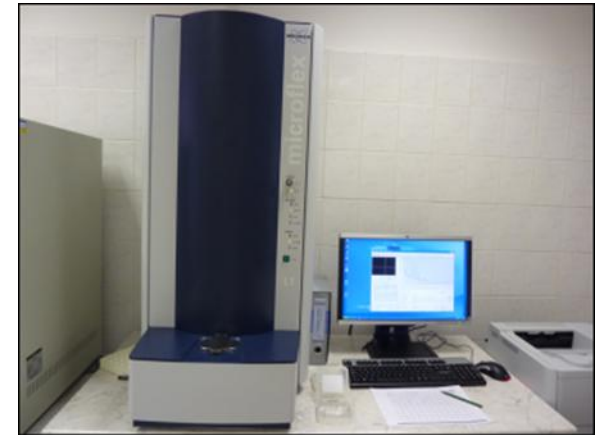
**Delayed Antimicrobial Therapy Increases Mortality and Organ Dysfunction Duration in Pediatric Sepsis**

# MALDI-TOF MS

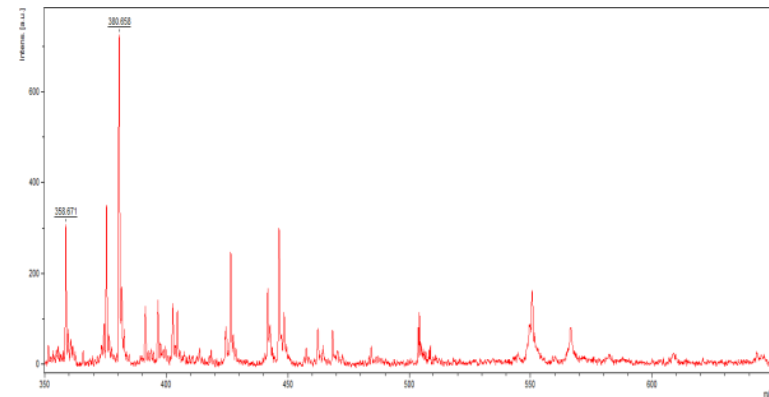


Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

Η συγκεκριμένη τεχνολογία παράγει οπτικά αποτυπώματα μάζας (**mass optical fingerprints**), τα οποία είναι μοναδικά για κάθε μικροοργανισμό.



Επομένως, είναι η ιδανική μέθοδος για την ακριβή **μικροβιακή ταυτοποίηση**, τόσο σε επίπεδο γένους όσο και σε είδους.



# MALDI-TOF MS



Το **1996**, οι Holland et al. ανέφεραν για πρώτη φορά **ότι MALDI-TOF MS spectral fingerprints** μπορούσαν να αποκτηθούν από ολόκληρα βακτηριακά κύτταρα χωρίς προεπεξεργασία πριν την MS ανάλυση.

Πλέον, η MALDI-TOF MS χρησιμοποιείται ευρέως για το χαρακτηρισμό μίας ευρείας ποικιλίας μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες και ιοί).

- Ακέραιοι μικροοργανισμοί μπορούν άμεσα να αναλυθούν με τη MALDI-TOF MS μέθοδο **χωρίς προεπεξεργασία**, επειδή τα περισσότερα βακτήρια λύνονται μετά από έκθεση σε νερό, οργανικούς διαλύτες ή ισχυρά οξέα στα MALDI-matrices.
- Για την MALDI-ανάλυση ανθεκτικών μικροοργανισμών (όπως ιοί, βακτηριακοί σπόροι, ακτινομύκητες και μύκητες) ειδική προεπεξεργασία ή διαδικασίες απομόνωσης πρωτεϊνών μπορεί να είναι χρήσιμες.

# MALDI-TOF MS

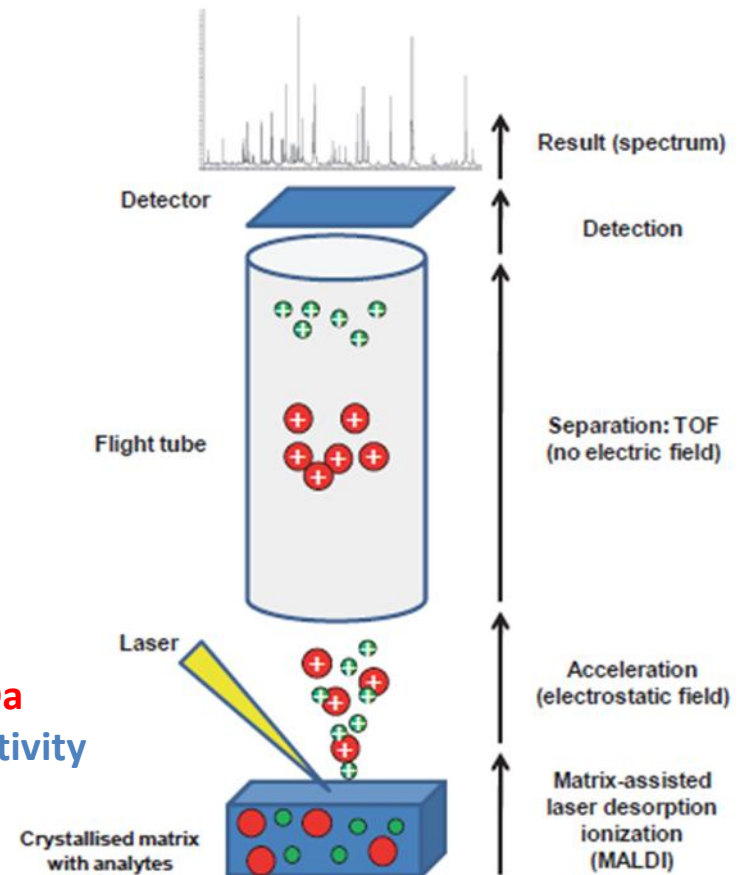


Στη MALDI ανάλυση, τα δείγματα παρασκευάζονται με ανάμιξη του δείγματος με ένα **matrix**, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη κρυσταλοποίηση του δείγματος εντός του **matrix**.

Το **matrix** αποτελείται από μικρά οξικά μόρια, τα οποία παρουσιάζουν ισχυρή οπτική απορρόφηση στο εύρος του λέιζερ-μήκους κύματος που χρησιμοποιείται.

Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα matrices είναι:

- 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)
  - α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA)
  - sinapinic acid (SA)
  - ferulic acid (FA)
  - και 2,4-hydroxy-phenyl benzoic acid. →
- up to 10 kDa
- above 15 kDa
- above 15 kDa  
higher sensitivity

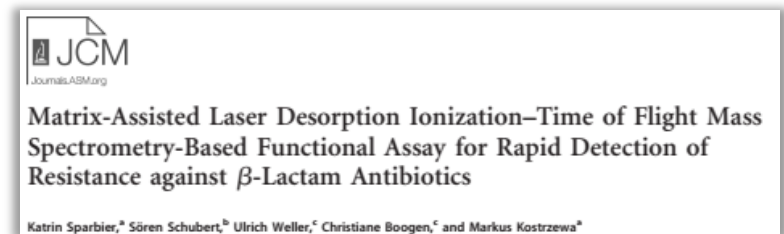
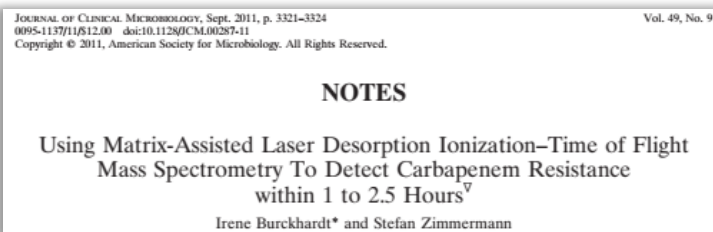
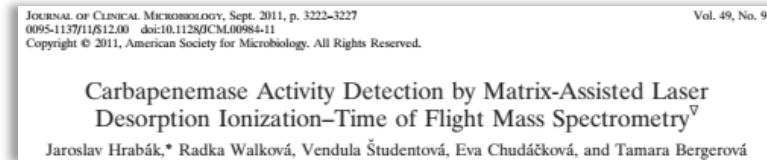
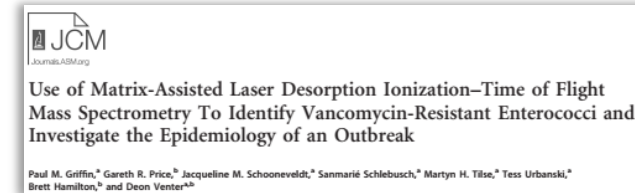
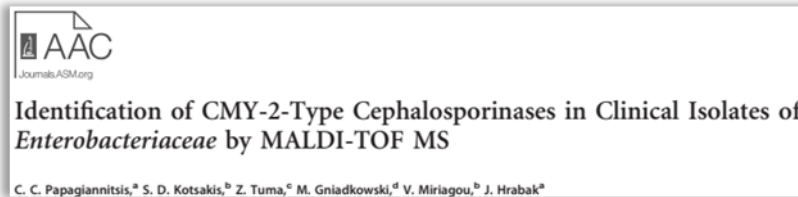
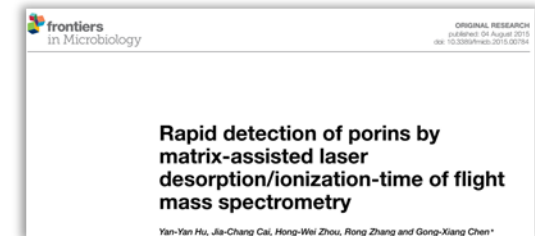


# MALDI-TOF MS



Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί ελπιδοφόρες προσεγγίσεις για την ανίχνευση της αντοχής σε διάφορα μέσω του MALDI-TOF MS

- Ανίχνευση των βανκομικίνη-ανθεκτικών *Enterococcus* spp.
- Ανίχνευση των MRSA στελεχών
- **Ανίχνευση της δραστικότητας των β-λακταμάσων**
- Ανάλυση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος
- Ανίχνευση των β-λακταμασών





# MALDI-TOF MS



## MALDI-TOF MS in susceptibility testing

- **Rapid determination of MIC equivalent for categorization of isolate (S/I/R)**
- **Detection of resistance mechanism**
- **Detection of epidemiological markers** (clones connected with antibiotic resistance)
  - Interpretative reading
  - Epidemiological purpose

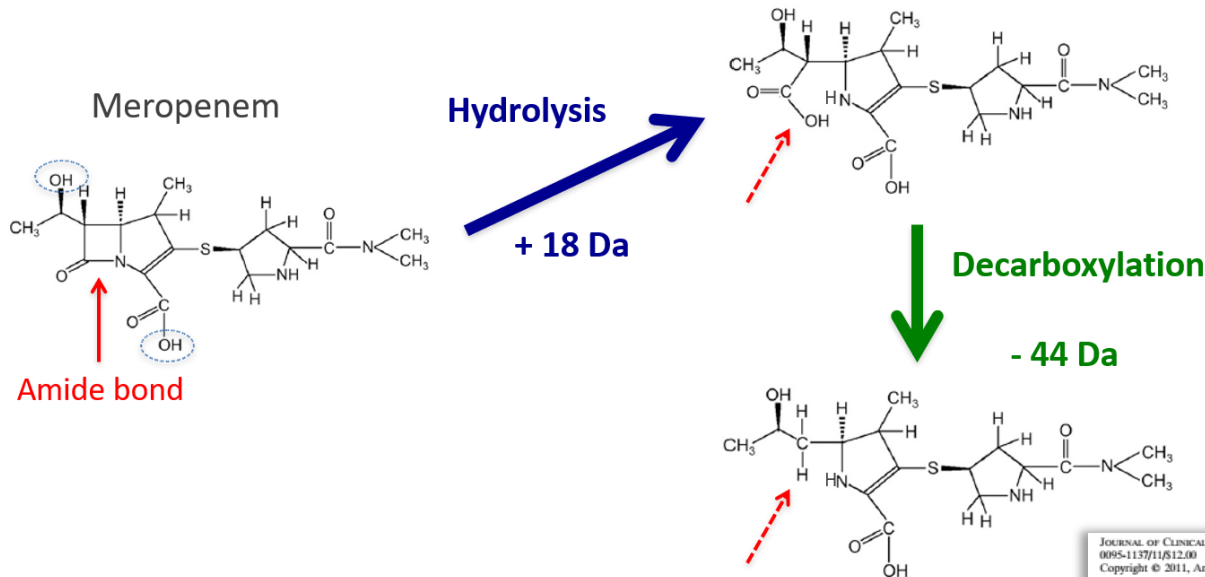
# MALDI-TOF MS



## Ανίχνευση της δραστηριότητας των β-λακταμάσων

Το **2011**, δύο ερευνητικές ομάδες απέδειξαν (Hrabák J et al. 2011; Burckhardt I et al. 2011) ότι η MALDI-TOF MS μπορεί να ανιχνεύσει τη δραστηριότητα των καρβαπενεμασών, μέσω της απεικόνισης των καρβαπενεμών και των προϊόντων διάσπασης τους.

- Χρησιμοποιείται στη ρουτίνα αρκετών μικροβιολογικών εργαστηρίων



JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2011, p. 3222–3227  
0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.00984-11  
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 49, No. 9

### Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry<sup>∇</sup>

Jaroslav Hrabák,\* Radka Walková, Vendula Študentová, Eva Chudáčková, and Tamara Bergerová

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2011, p. 3321–3324  
0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.00287-11  
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 49, No. 9

### NOTES

Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry To Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2.5 Hours<sup>∇</sup>

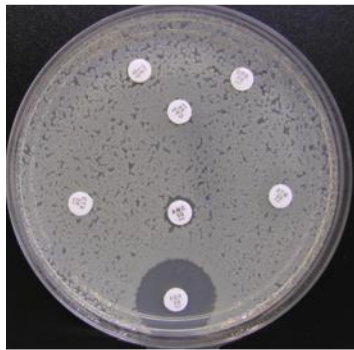
Irene Burckhardt\* and Stefan Zimmermann

# MALDI-TOF MS



## Ανίχνευση της δραστικότητας των β-λακταμάσων

Αρχή της μεθόδου meropenem-hydrolysis assay:



3 McFarland

20 mM Tris-HCl  
150 mM NaCl  
pH 7.0



Centrifugation  
of 1 ml of the  
suspension



Resuspension  
of pellet (in 50μl)

20 mM Tris-HCl  
**0.01% SDS**  
**50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>**  
0.1 mM meropenem  
pH 7.0

**Incubation at  
35° C for 2  
hours**

Centrifugation  
of the mixture

**MALDI-TOF MS**  
(matrix: DHB  
in 50% ethanol)

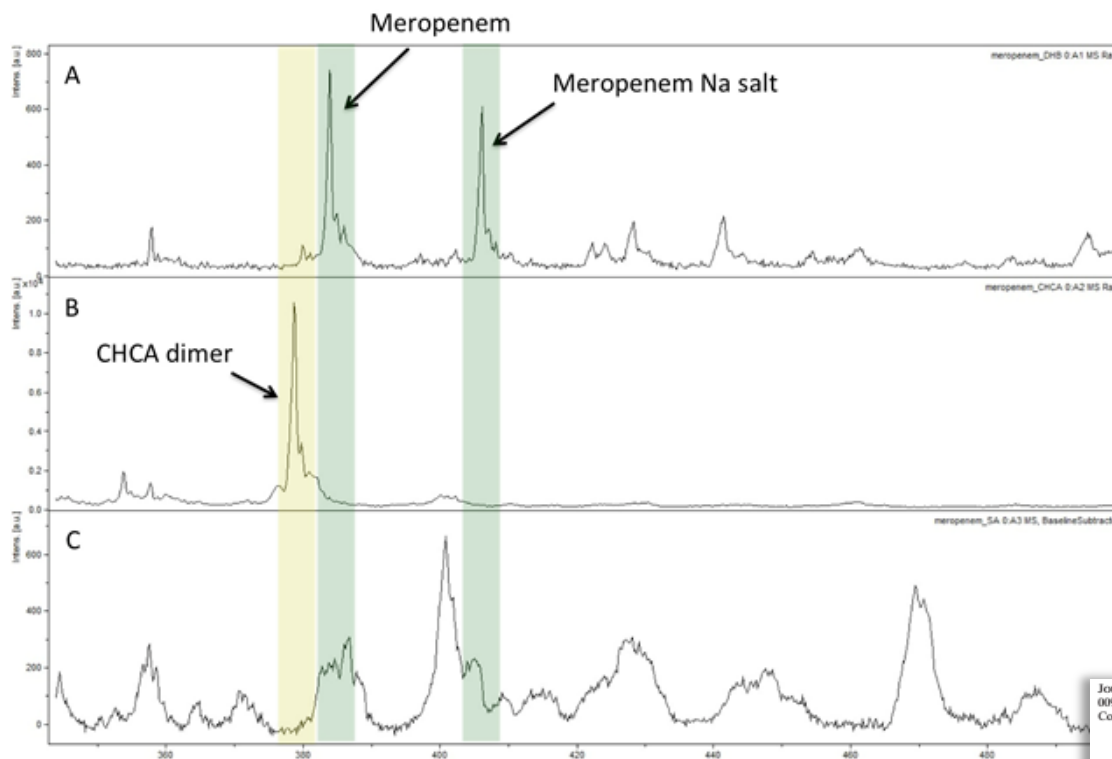
# MALDI-TOF MS



## Ανίχνευση της δραστηριότητας των β-λακταμάσων

### Matrix:

- 2,5-Dihydroxybenzoic acid (**DHB**) 10 mg/ml, in 50 % ethanol
- Το CHCA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί, αλλά το διμερές του θα καλύψει την κορυφή της μεροπενέμης (μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άλλες β-λακτάμες)



2,5-Dihydroxybenzoic acid  
(DHB)

$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid  
(CHCA)

Sinapinic acid  
(SA)

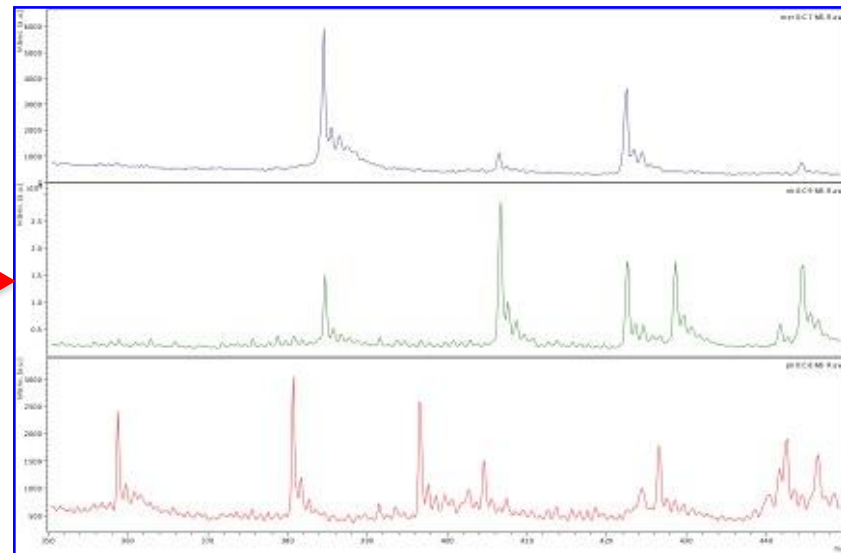
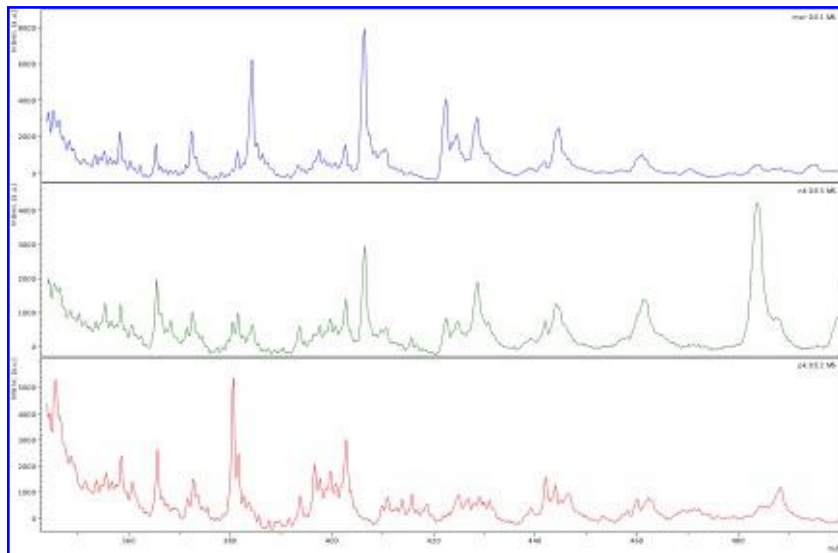
# MALDI-TOF MS



## Ανίχνευση της δραστηριότητας των β-λακταμάσων

Πώς να αποκτήσετε αναγνώσιμα φάσματα:

- Παίξτε με παραμέτρους (voltage, laser intensity, pulse time)
- Ή ρωτήστε την εταιρεία...
- Πριν μετρήσετε τα δείγματά σας, βελτιστοποιήστε τη μέτρηση σε διάλυμα αντιβιοτικού



# MALDI-TOF MS



## Ανίχνευση της δραστηριότητας των β-λακταμάσων

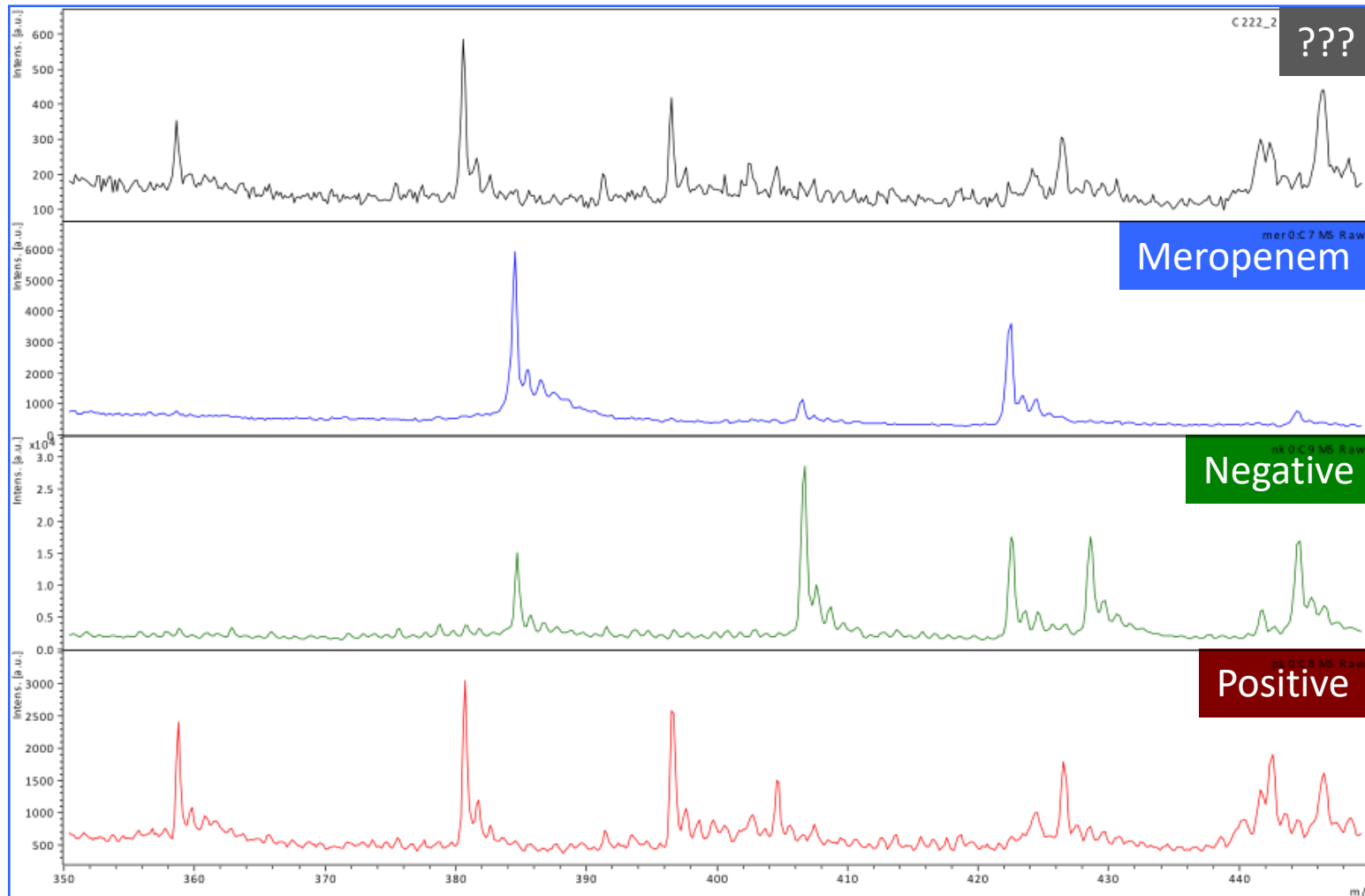
Ερμηνεία των φασμάτων:

Peak at <i>m/z</i> of:	Interpretation	
	Carbapenemase producer	Non-carbapenemase producer
358.5	Present	Absent
380.5	Present	Absent
384.5	Absent	Present
406.5	Absent	Present

- Κατά τη διάρκεια κάθε μέτρησης, πρέπει να συμπεριλαμβάνεται διάλυμα μεροπενέμης, θετικός και αρνητικός μάρτυρας
- Εάν βλέπετε και τους δύο τύπους κορυφών (που αντιπροσωπεύουν το φυσικό μόριο και το προϊόν αποδόμησης), επαναλάβετε τη μέτρηση

# MALDI-TOF MS

## Ερμηνεία των φασμάτων

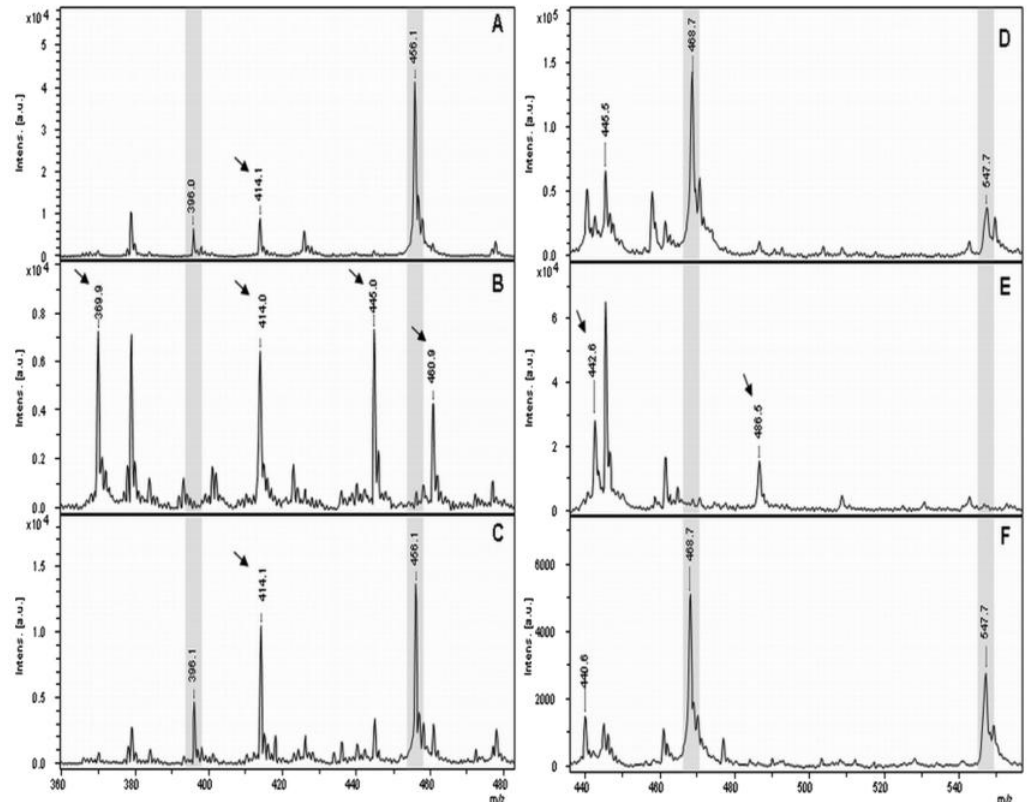


# MALDI-TOF MS



## Ανίχνευση της δραστηριότητας των β-λακταμάσων

- Το 2012, οι Sparbier *et al.*, έδειξαν την ικανότητα του MALDI-TOF MS να ανιχνεύει και άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά, όπως η αμπικιλίνη, η πιπερακιλλίνη, η κεφταξίμη και η κεφταζιδίμη.
- Επιπλέον, έδειξαν ότι μπορεί να αναγνωρίσει τους τύπους β-λακταμάσης με τη χρήση των αναστολέων κλαβουλανικού οξέος, ταζομπακτάμης και αμινο-φαινυλοβορονικού οξέος.





# MALDI-TOF MS

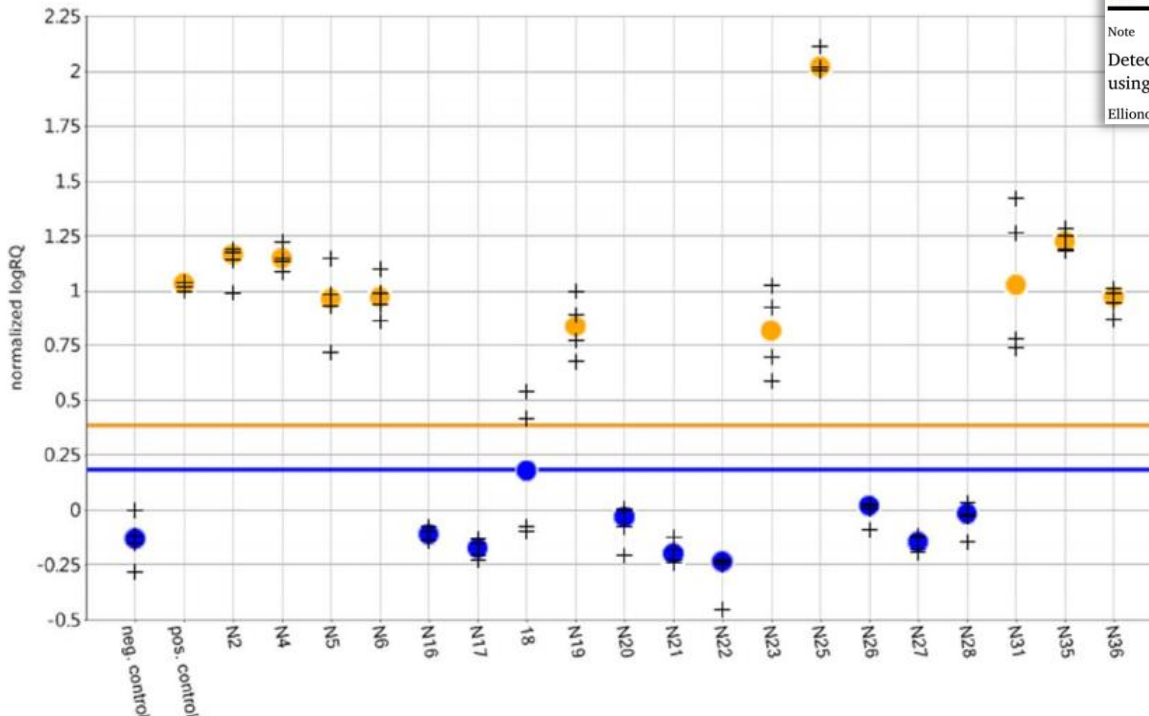


## Ανίχνευση της δραστικότητας των β-λακταμάσεων

- Η αξιολόγηση του πρώτου εμπορικού τεστ, του IVD εγκεκριμένου **MBT STARCarba kit** (Bruker Daltonics, Βρέμη, Γερμανία), για την ανίχνευση των καρβαπενεμασών με τη χρήση της MALDI-TOF MS δημοσιεύτηκε το 2018 (Rapp et al. 2018).

$\Delta$  controls = 0.89

recalibrated with 'STAR-BL Matrix'



Automatic interpretation of spectra with the MBT STAR BL software

# MALDI-TOF MS



## Ανίχνευση της δραστηριότητας των β-λακταμάσων

- Η προσθήκη  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  στο διάλυμα αντίδρασης της MALDI-TOF MS δοκιμασίας βελτίωσε δραματικά την ευαισθησία της (98%) κυρίως έναντι των στελεχών που παρήγαγαν την OXA-48-τύπου καρβαπενεμάση.

TABLE 3 Diagnostic values of the MALDI-TOF MS assays and Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing isolates<sup>a</sup>

Method	No. of results				Sensitivity	Specificity
	TP	TN	FP	FN		
MALDI-TOF assay	87 (65)	48 (41)	0 (0)	26 (18)	77% (78%)	100% (100%)
Carba NP test	86 (92)	48 (48)	0 (0)	27 (21)	76% (81%)	100% (100%)
MALDI-TOF BIC assay	111 (80)	48 (41)	0 (0)	2 (3)	98% (96%)	100% (100%)

<sup>a</sup> TP, true positive; TN, true negative; FP, false positive; FN, false negative. The numbers in parentheses refer to the diagnostic values for the automatic interpretation for each method. Automatic interpretation was not applied to the spectra of *P. aeruginosa* isolates.



Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Meropenem Hydrolysis Assay with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , a Reliable Tool for Direct Detection of Carbapenemase Activity

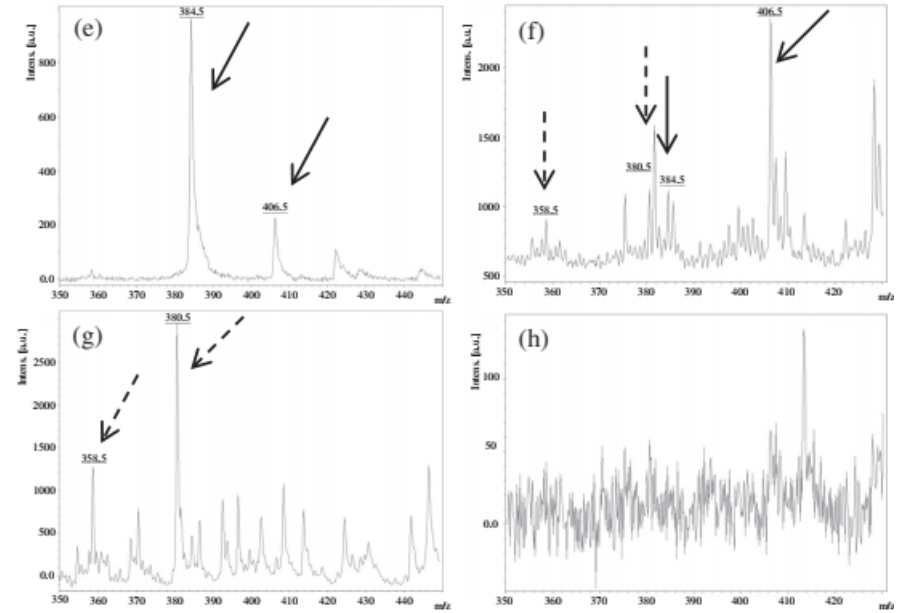
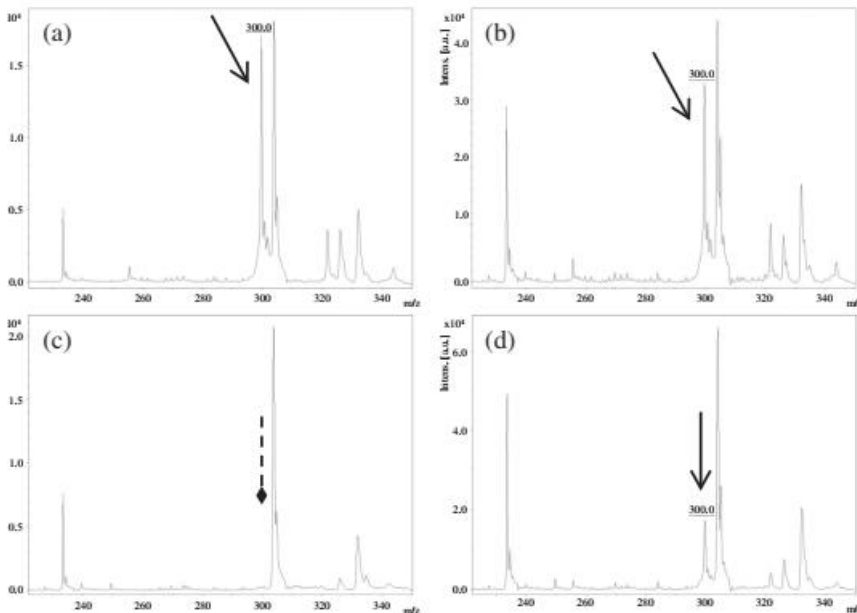
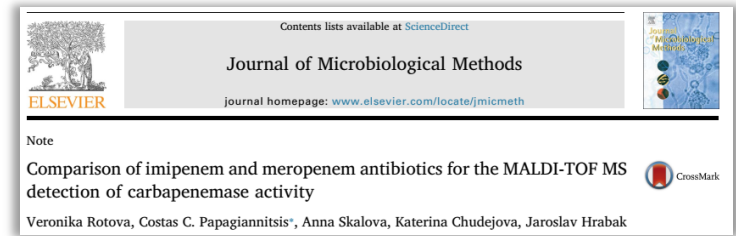
Costas C. Papagiannitsis,<sup>a,\*</sup> Vendula Studentová,<sup>a</sup> Radoslaw Izdebski,<sup>b</sup> Olga Oikonomou,<sup>c</sup> Yvonne Pfeifer,<sup>d</sup> Efthimia Petinaki,<sup>e</sup> Jaroslav Hrabák<sup>a,\*</sup>

# MALDI-TOF MS



## Ανίχνευση της δραστηριότητας των β-λακταμάσων

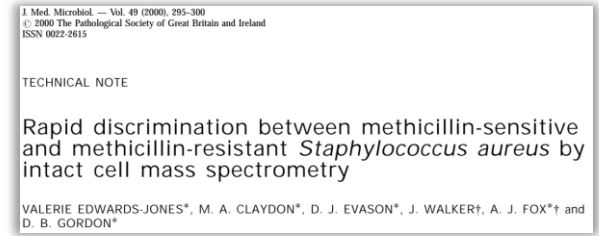
- Μια σύγκριση των μορίων καρβαπενέμης για την ανίχνευση βακτηρίων που παράγουν καρβαπενεμάσες με τη χρήση της MALDI-TOF MS έδειξε ότι η ιμιπενέμη παρουσίαζε υψηλότερη ευαισθησία (97%) και ειδικότητα (100%) για τα στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* από τη μεροπενέμη.



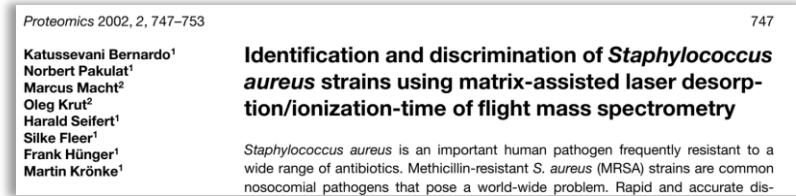
# MRSA Detection



- Το 2000, οι Edwards-Jones *et al.* ανέφεραν την ανίχνευση συνολικά
  - ❖ 14 MRSA-ειδικών κορυφών
  - ❖ και 2 MSSA-ειδικών κορυφών



- **Αντίθετα**, οι Bernardo *et al.* δεν βρήκαν συσχέτιση μεταξύ των φασματικών προφίλ και των στελεχών MRSA ή MSSA. Ωστόσο, απέδειξαν την αναπαραγωγιμότητα των λαμβανόμενων φασματικών προφίλ, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση νοσοκομειακών εξάρσεων.

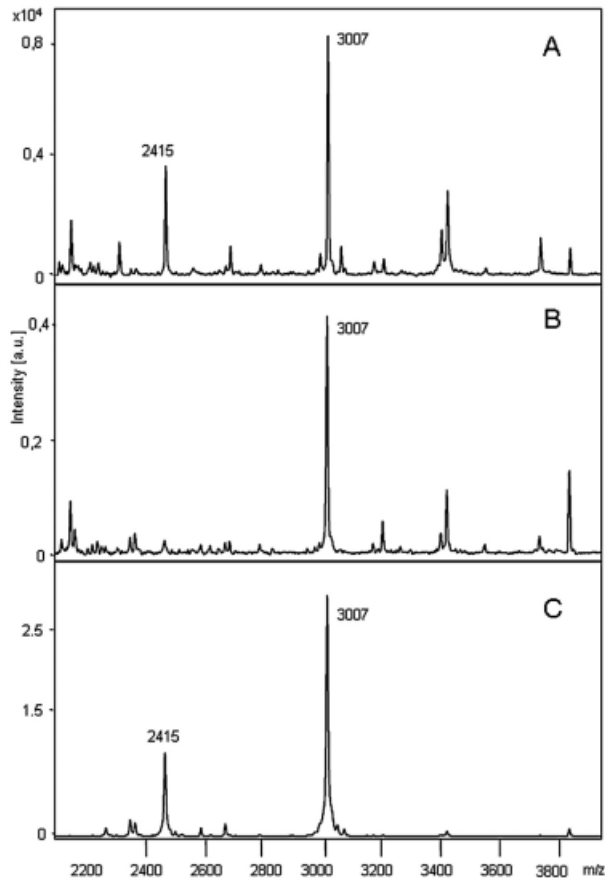


- Επομένως, οι ανιχνευθείς κορυφές είναι πιθανώς ειδικές για συγκεκριμένους κλώνους.

# MRSA Detection



- Ένα μικρό πεπτίδιο που ονομάζεται PSM-mec κωδικοποιείται στις κασέτες τύπου II, III και VIII SCC<sub>mec</sub> που υπάρχουν στα γονιδιώματα των νοσοκομειακών MRSA στελεχών.



- Η αξιολόγηση μιας συλλογής κλινικών MRSA και MSSA στελεχών έδειξε ότι, χρησιμοποιώντας ένα παράθυρο ανίχνευσης m/z 2411-2419, το PSM-mec ανιχνεύεται με φασματομετρία μάζας ολόκληρων κυττάρων με **ευαισθησία 0,95** και **ειδικότητα 1**, επιτρέποντας έτσι την ταχεία ταυτοποίηση μιας υποομάδας των MRSA στελεχών με μια μέθοδο που χρησιμοποιείται κατά τις συνήθεις διαδικασίες ταυτοποίησης.

The spectra of strain USA100 (A), strain USA100 harbouring pEPSA5-psmmec in the presence of xylose (B) and strain USA100 harbouring pEPSA5-psm-mec in the absence of xylose (C). The signal at m/z 3007 is caused by the delta-toxin, and the peak at m/z 2415, which corresponds to PSM-mec, is suppressed by the antisense RNA expressed in the presence of xylose.



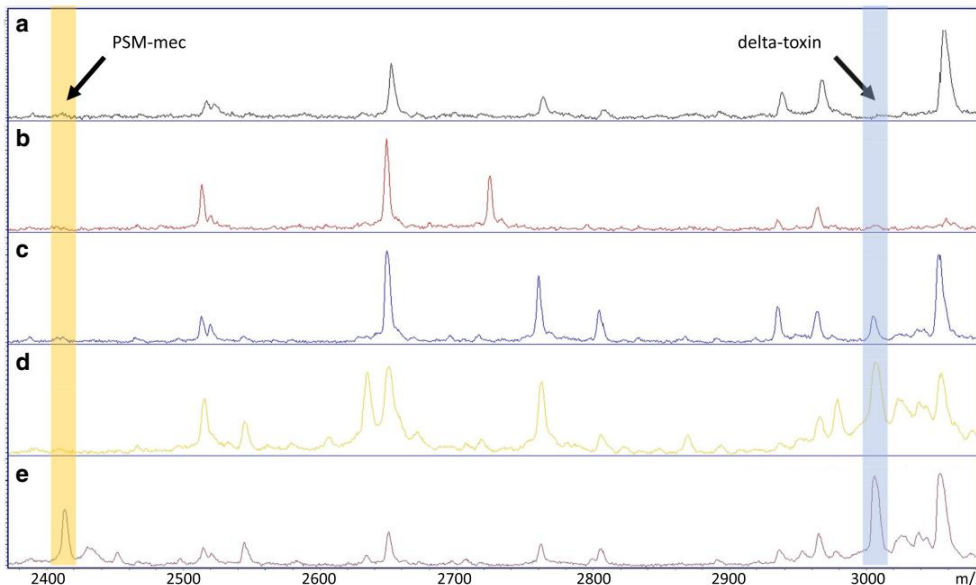
# MRSA Detection



- Οι Rotova *et al.*, έδειξαν ότι η ευαισθησία της μεθόδου κυμαινόταν μεταξύ 50% και 90% σε στελέχη που φέρουν τα  $psm_{MEC}$  και  $psm_{\delta}$  γονίδια

**Table 1** Detection of MRSA by MALDI-TOF mass spectrometry in strains possessing different SCCmec cassettes

SCCmec	No. of isolates	Identified as MRSA	Identified as MSSA	Sensitivity (%)	Specificity (%)
I	7	0	7	100	100
II	10	9	1	90	100
III	10	5	5	50	100
IV	6	0	6	100	100
V	2	0	2	100	100



Mass spectra acquired by automatic measurement. (a), (b)—strains expressing no PSM-mec neither  $\delta$ -toxin; (c), (d)—strains expressing  $\delta$ -toxin only; (e)—strain identified as MRSA showing both proteins (PSM-mec,  $\delta$ -toxin)

Folia Microbiologica  
<https://doi.org/10.1007/s12223-020-00799-0>

ORIGINAL ARTICLE

**Insufficient repeatability and reproducibility of MALDI-TOF MS-based identification of MRSA**

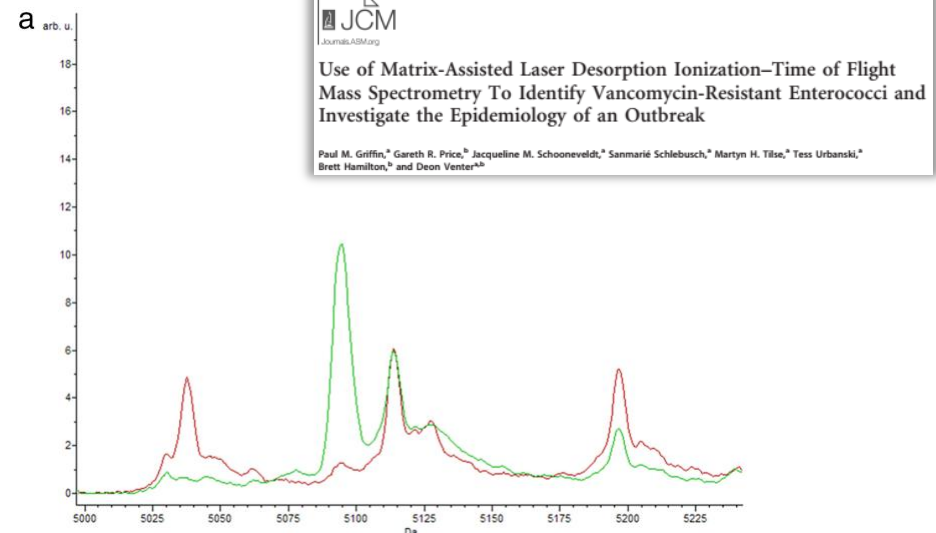
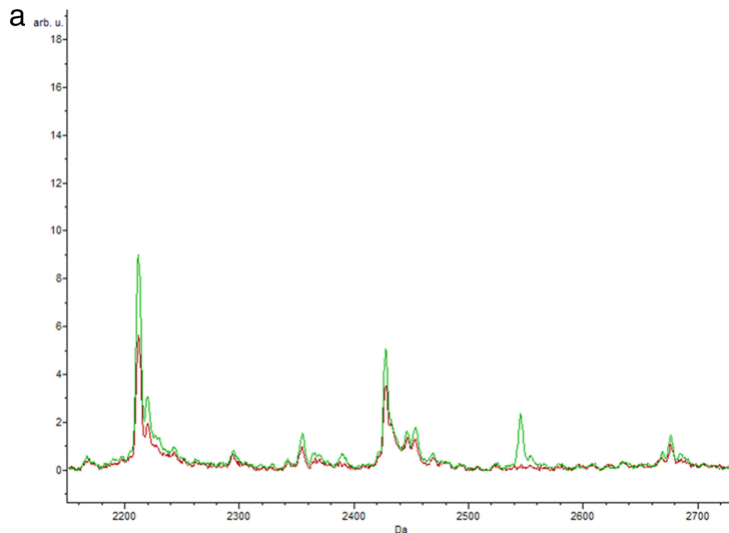
Veronika Paskova<sup>1,2</sup> • Katerina Chudejova<sup>1,2</sup> • Anna Sramkova<sup>1,2</sup> • Lucie Kraftova<sup>1,2</sup> • Vladislav Jakubu<sup>2,3,4</sup> • Eftimia A. Petinaki<sup>5</sup> • Helena Zemlickova<sup>2,3,4</sup> • Katerina Neradova<sup>4</sup> • Costas C. Papagiannitsis<sup>1,2</sup> • Jaroslav Hrabak<sup>1,2</sup>

Check for updates

# Detection of VRE



- Πρώτη «επιτυχής» ταυτοποίηση των *vanB*-θετικών *Enterococcus faecium* VRE από ευαίσθητα στελέχη, με τη χρήση MALDI-TOF MS.
- Η εσωτερική επικύρωση του βέλτιστου μοντέλου παρήγαγε ευαισθησία 92,4% και ειδικότητα 85,2%.
- Οι ανιχνευθείς κορυφές είναι πιθανώς ειδικές για τους συγκεκριμένους κλώνους, επειδή δεν χρησιμοποιήθηκαν ισογονικά στελέχη για την επικύρωση της μεθόδου.



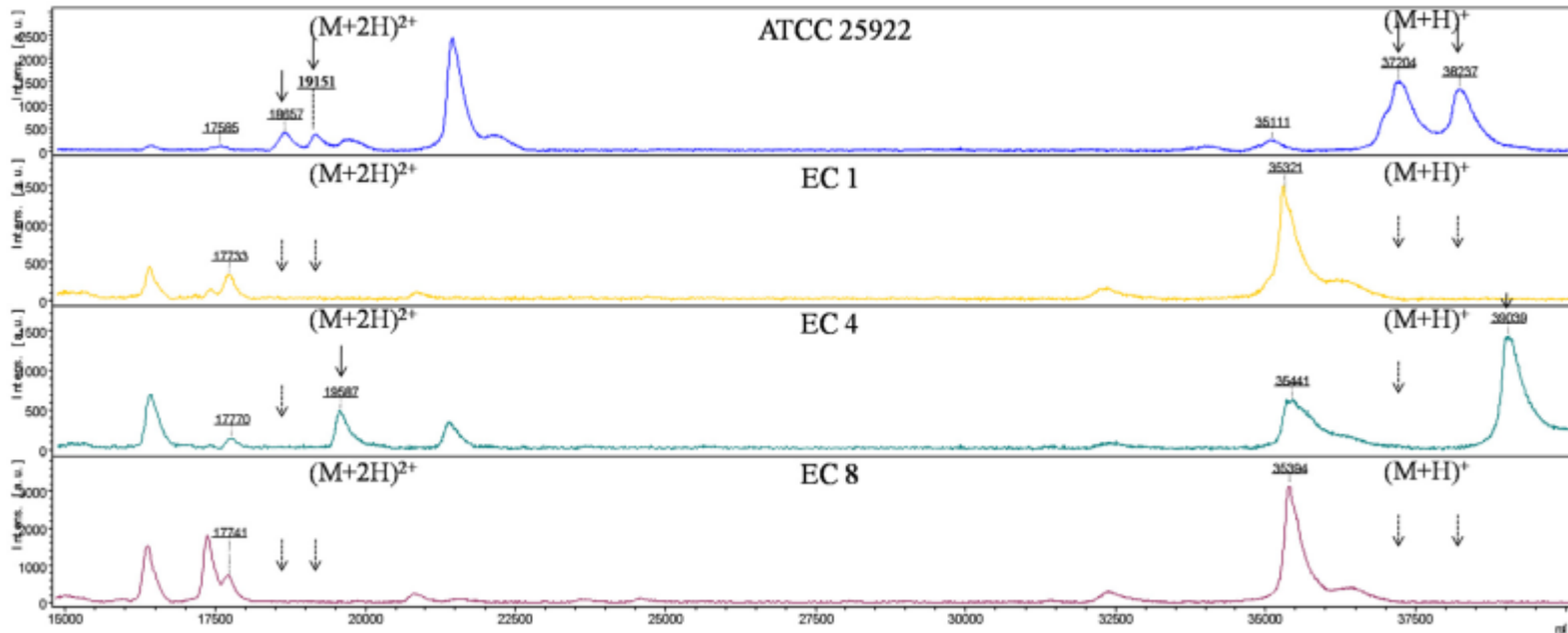
Representative comparison of the average spectra of the *vanB*-positive *E. faecium* isolates (green) and the *vanB*-negative *E. faecium* isolates (red)

# Detection of Porins



- Χρήση της sodium lauroyl sarcosinate μεθόδου για ημι-ειδική εκχύλιση συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος

Σε σύγκριση με την SDS-PAGE, η MALDI-TOF MS είναι σε θέση να αναγνωρίσει γρήγορα τα στελέχη με απώλεια-πορίνης, εντός μισής ώρας, με καλύτερη ευαισθησία, μικρότερο κόστος.



MALDI-TOF MS analysis of E. coli isolates.

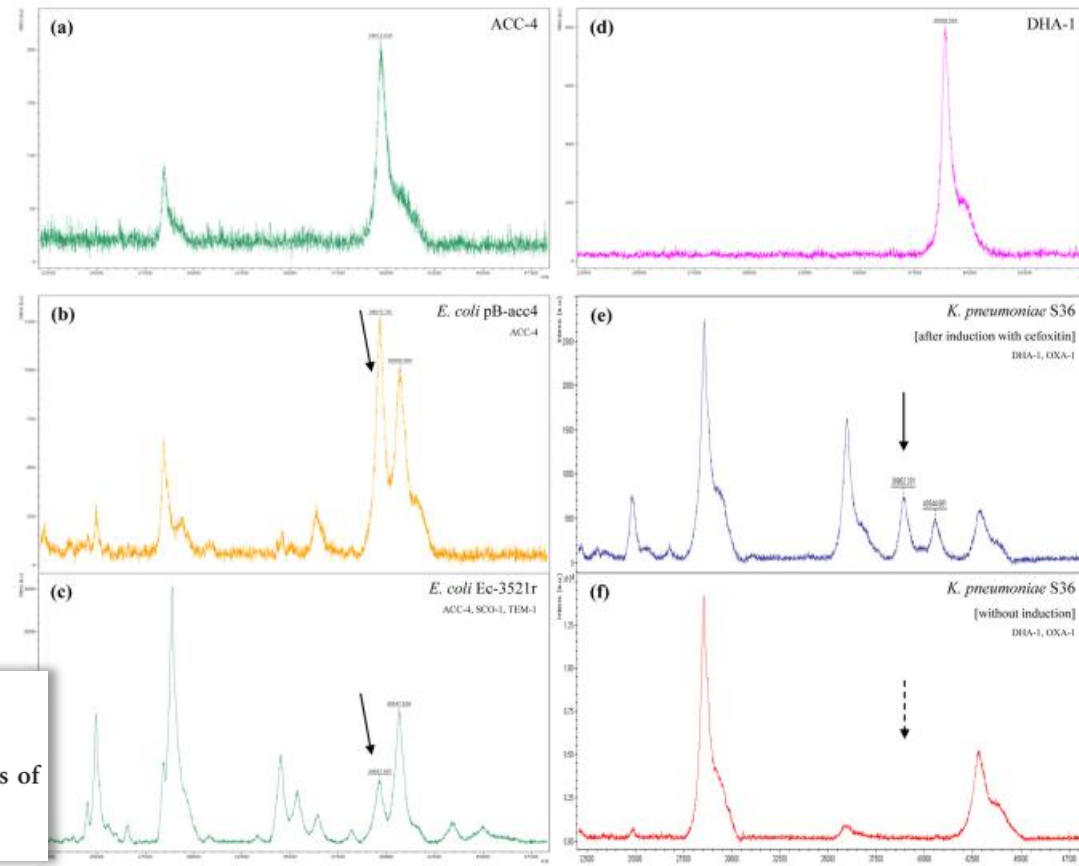


# Detection of $\beta$ -Lactamases



- Ανίχνευση της TEM-1  $\beta$ -λακαταμάσης ισογονικό στέλεχος (Camara and Hays, 2007)
- Ανίχνευση των CMY-2 και άλλων AmpC-τύπου  $\beta$ -λακταμασών σε κλινικά στελέχη (Papagiannitsis et al. 2014)

- Ειδική εκχύλιση των περιπλασμικών πρωτεϊνών
- MALDI-TOF MS ανίχνευση μοριακού βάρους
- Ικανότητα ανίχνευσης του ακυλο-ενζύμου συμπλόκου



# MALDI-TOF MS



## Limitations:

- Αυτές οι δοκιμασίες ισχύουν μόνο για την ανίχνευση αντοχής στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.
- Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν μπορούν να ερμηνευθούν με σιγουριά ότι αντιπροσωπεύουν την ευαισθησία για όλα τα βακτήρια.
- Εναλλακτικοί μηχανισμοί αντίστασης μπορεί να κρύβουν τη δραστηριότητα των β-λακταμασών.

# MALDI-TOF MS



MIC equivalent determination



# MALDI-TOF MS

Proteomics 2009, 9, 4627–4631

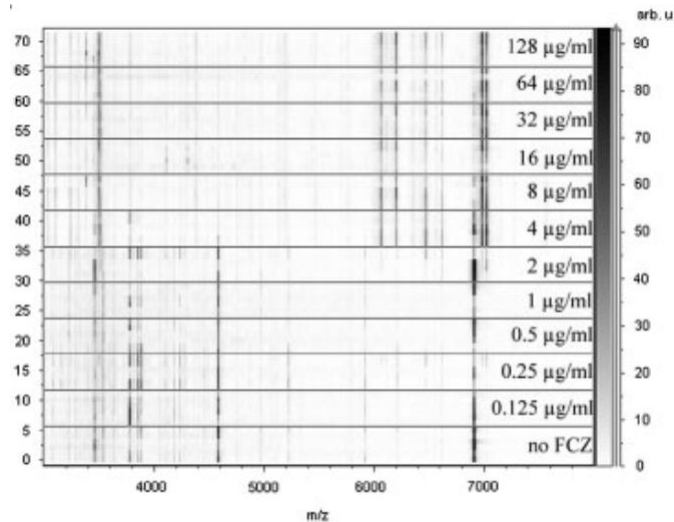
DOI 10.1002/pmic.200900152

4627

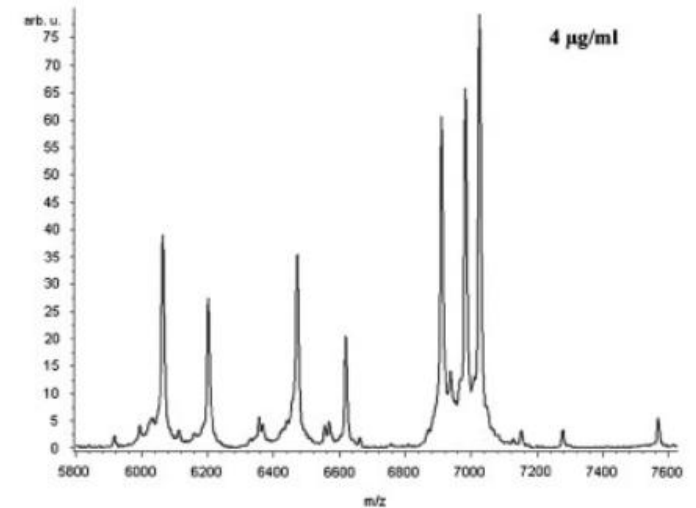
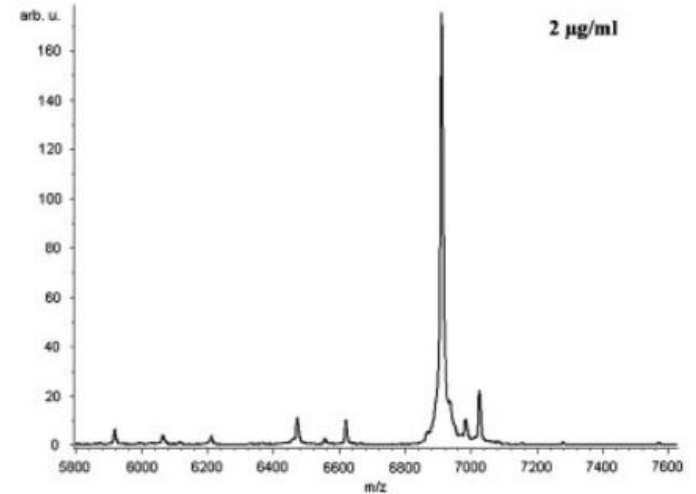
RAPID COMMUNICATION

## MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole

Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι η πρωτεϊνική σύνθεση των στελεχών *C. albicans* θα ποικίλλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του φαρμάκου στην οποία υποβάλλεται, και θα αντανακλά την επιβίωση του παθογόνου στα διάφορα επίπεδα του φαρμάκου.

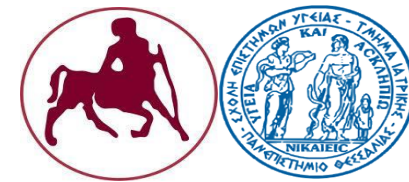


Alterations in the mass spectra of the DSY2260 *C. albicans* strain (FCZ MIC=8 mg/mL) exposed to increasing FCZ concentrations.

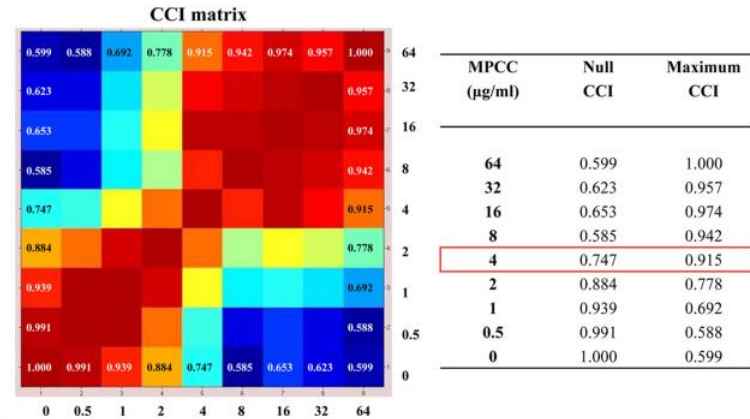


A portion of the average mass spectra (range m/z 5800–7600) of the spectra of DSY2260 *C. albicans* exposed to 2 and 4 mg/mL of FCZ.

# MALDI-TOF MS



Επικύρωση της μεθόδου του προσδιορισμού της Αλλαγής-Προφίλ για τον έλεγχο της ευαισθησίας στα αντιμυκητιασικά

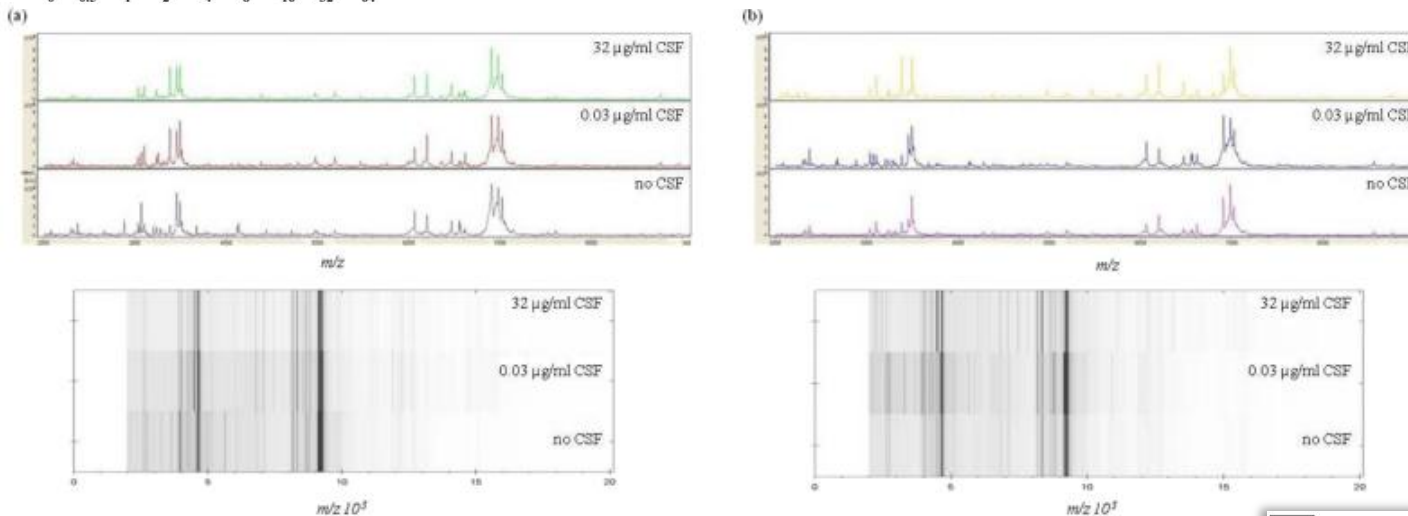


JCM  
Journal of Clinical Microbiology

Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Caspofungin Susceptibility Testing of *Candida* and *Aspergillus* Species

Elena De Carolis,<sup>a</sup> Antonietta Vella,<sup>a</sup> Ada R. Florio,<sup>a</sup> Patrizia Posteraro,<sup>a</sup> David S. Perlin,<sup>b</sup> Maurizio Sanguinetti,<sup>c</sup> and Brunella Posteraro<sup>a</sup>

Representative **composite correlation index (CCI)** matrix derived from selected mass spectra, which correspond to those for *C. glabrata* DSP155 cells (MIC of 4 µg/ml) exposed for 15 h at 37°C to serial caspofungin concentrations.



MALDI-TOF mass spectra and relative gel MALDI views of the mass profiles obtained from a WT (UCSC52-030412) *C. albicans* isolate (a) and an *fks1* mutant (UCSC78-270612) *C. albicans* isolate (b)

JCM  
Journal of Clinical Microbiology

Rapid Antifungal Susceptibility Testing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Analysis

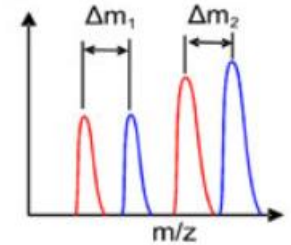
Antonietta Vella,<sup>a</sup> Elena De Carolis,<sup>a</sup> Luisa Vaccaro,<sup>a</sup> Patrizia Posteraro,<sup>b</sup> David S. Perlin,<sup>b</sup> Markus Kostrzewa,<sup>c</sup> Brunella Posteraro,<sup>a</sup> Maurizio Sanguinetti<sup>d</sup>

# MALDI-TOF MS



## Προσδιορισμός της Αλλαγής-Προφίλ στα βακτήρια

- Δεν γίνεται εύκολα όπως στους μύκητες
- Χρησιμοποιούνται **θρεπτικά υλικά που περιέχουν σταθερά ισότοπα**
- Με αποτέλεσμα τη μετατόπιση των κορυφών στα φάσματα όταν χρησιμοποιούνται θρεπτικά υλικά που περιέχουν σταθερά ισότοπα (και τη **break-point** συγκέντρωση του αντιβιοτικού)
- Υπάρχει η δυνατότητα **χρήσης ενός εσωτερικού πρότυπου** για την ποσοτική αξιολόγηση της έκφρασης των πρωτεϊνών



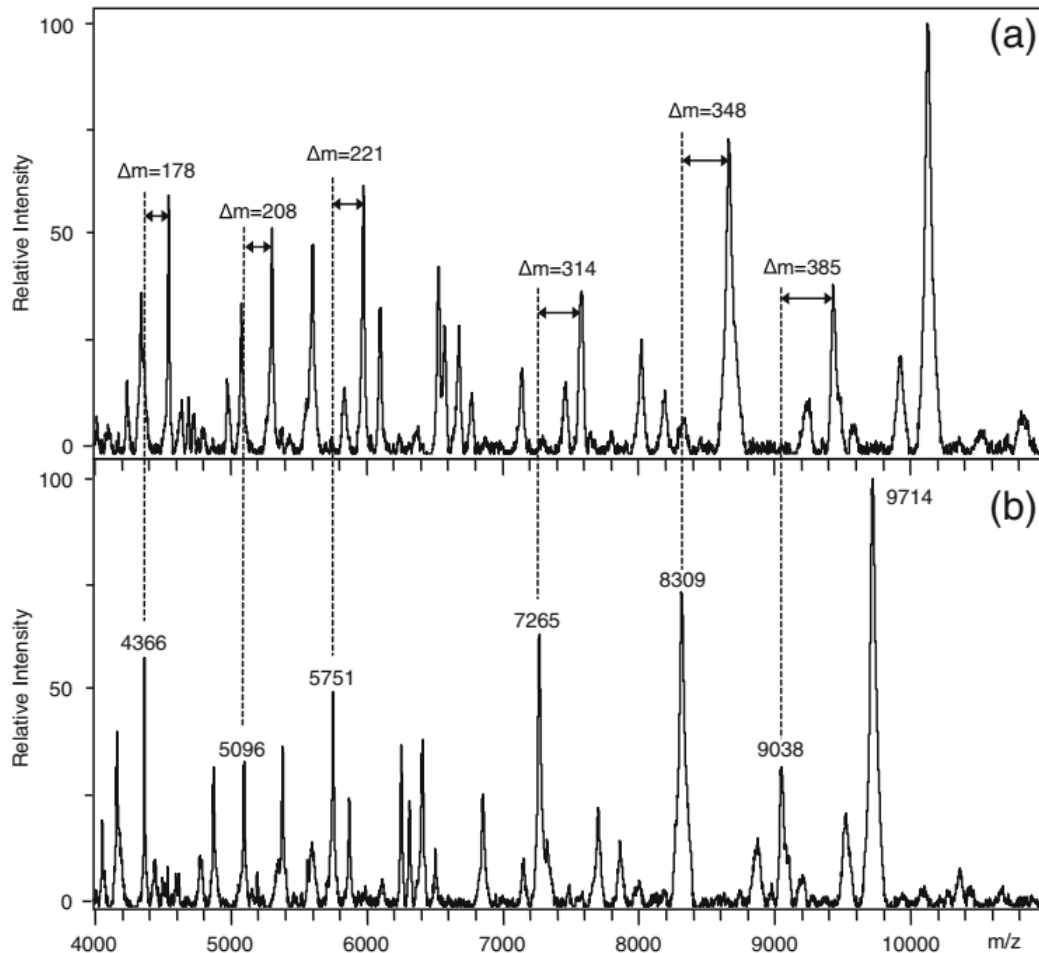
Standard media  
13C-labeled media  
with drug



# MALDI-TOF MS



## Προσδιορισμός της Αλλαγής-Προφίλ στα βακτήρια



Συγκεκριμένα, ένα φάσμα μάζας ενός μικροοργανισμού που έχει αναπτυχθεί σε ισότοπο-σημασμένα θρεπτικά υλικά που περιέχουν αντιβιοτικό συγκρίνονται με το φάσμα μάζας του μικροοργανισμού που αναπτύχθηκε σε μη-σημασμένα θρεπτικά υλικά χωρίς την παρουσία του αντιβιοτικού (Demirev *et al.*, 2013).

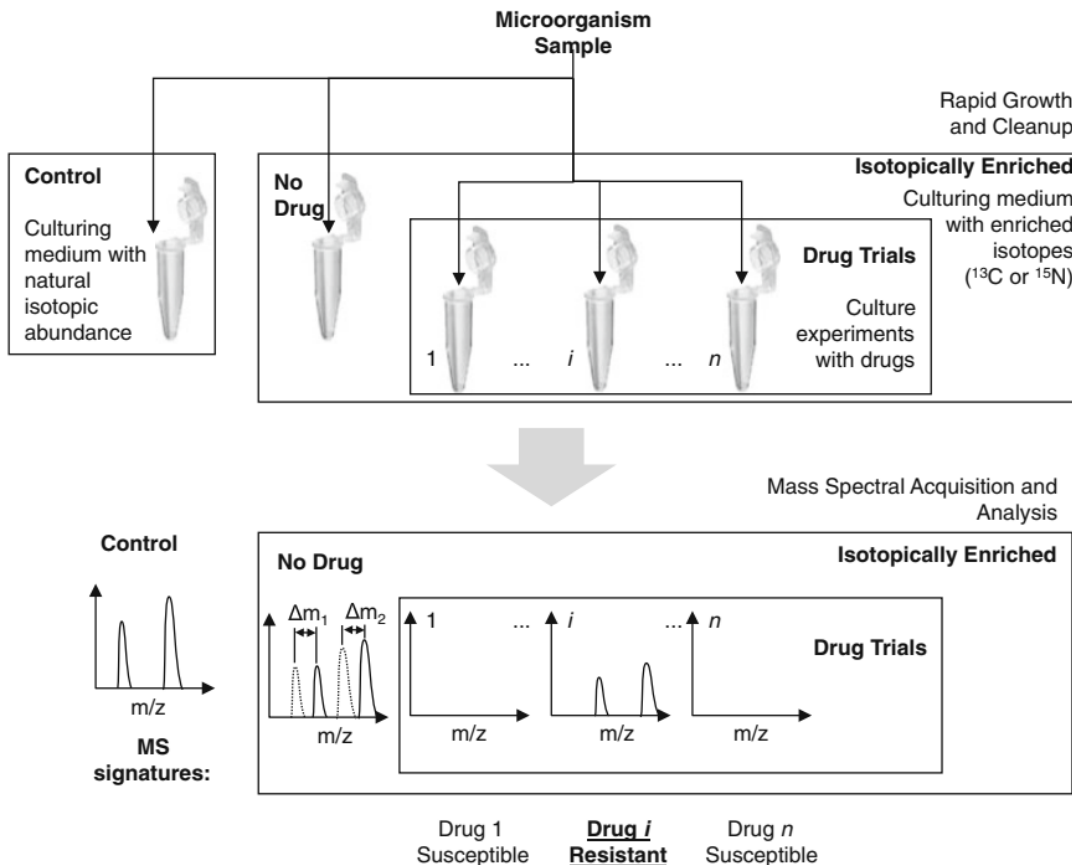
Comparison of MALDI TOF mass spectra of intact *E. coli* microorganisms grown in <sup>13</sup>C isotope enriched medium (top) and *E. coli* grown in control medium (bottom)



# MALDI-TOF MS



## Προσδιορισμός της Αλλαγής-Προφίλ στα βακτήρια



- Bacteria were inoculated into three separate flasks incubated for 6 h at 37 °C.
- Streptomycin was introduced into one of the natural isotopic abundance cultures and to the culture containing isotope-enriched media to determine organism susceptibility.
- The matrix, alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), dissolved in 1:1 acetonitrile/water (vol/vol), was used.

Assay to establish drug resistance by rapid growth and subsequent MS analysis of intact microorganisms.

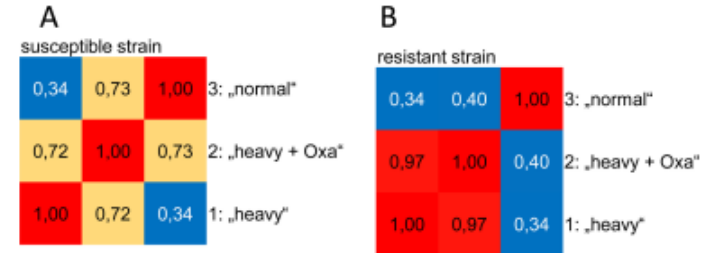
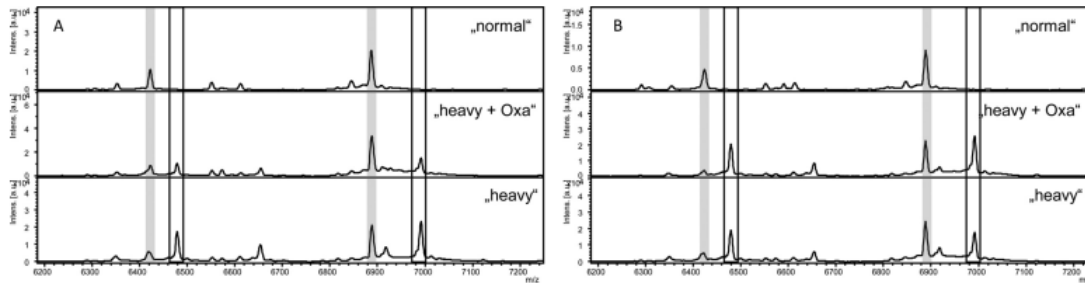


# MALDI-TOF MS

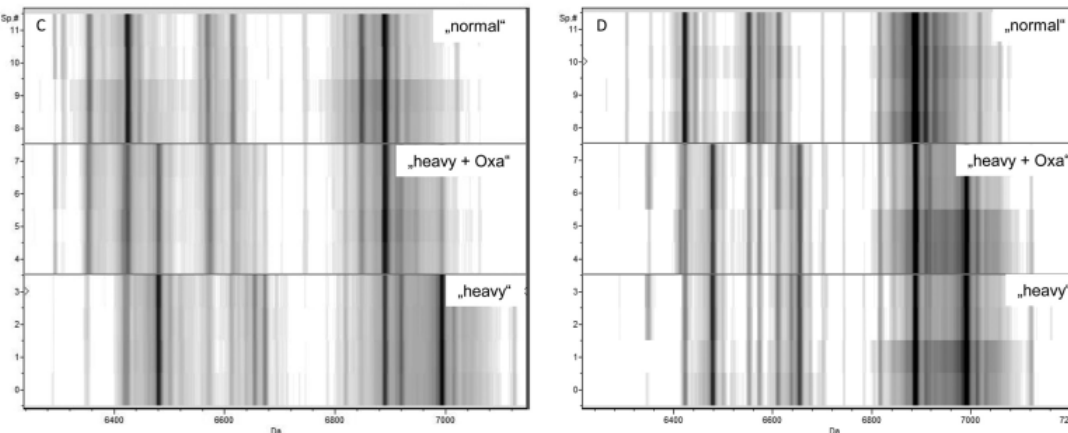


## Προσδιορισμός της Αλλαγής-Προφίλ στα βακτήρια

The **MBT-RESIST** (resistance test with stable isotope-labeled amino acids) assay employs stable (nonradioactive) isotopes that are incorporated into newly synthesized proteins (Sparbier et al., 2013).



Correlation analysis: correlation matrix of “normal” versus “heavy + Oxa” versus “heavy” data for a susceptible strain (A) and a resistant strain (B)



Zoom of MALDI-TOF MS spectra of a susceptible *Staphylococcus aureus* strain (A and C) and a resistant *Staphylococcus aureus* strain (B and D).

- The bacterial suspensions were incubated at 37°C with agitation in a thermomixer for 3 h.
- Bacteria were lysed with 10 µl of 70% formic acid and 10 µl of 100% acetonitrile
- MALDI matrix (α-HCCA [10 mg/ml α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid-50% acetonitrile–2.5% trifluoroacetic acid])

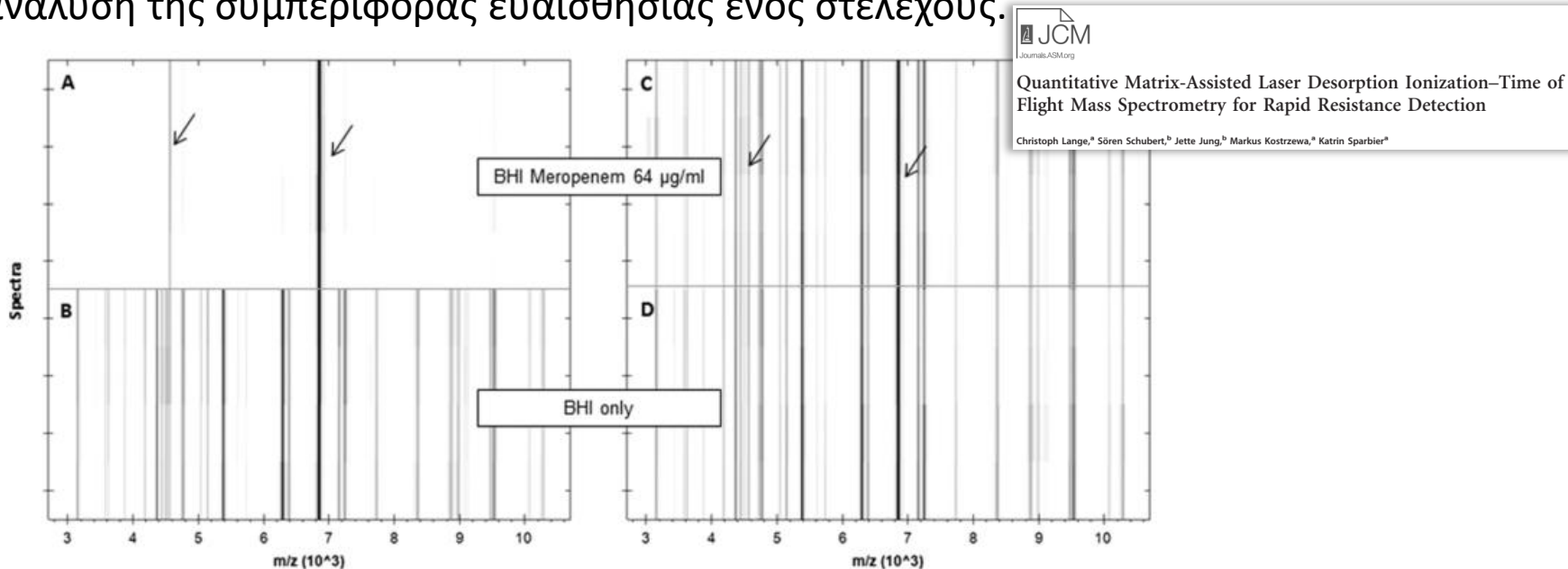
# MALDI-TOF MS



## Ποσοτική MALDI-TOF MS στο προσδιορισμό της Αύξης

Η **MBT-ASTRA** δοκιμασία είναι μια ποσοτική MALDI-TOF MS προσέγγιση (Lange *et al.*, 2014).

- Η ποσοτική MALDI-TOF MS, με τη χρήση ενός εσωτερικού πρότυπου, διευκολύνει τη μέτρηση της ποσότητας των πεπτιδίων και των μικρών πρωτεϊνών σε ένα φάσμα.
- Οι ποσότητες των πρωτεϊνών σχετίζονται με τον αριθμό των μικροοργανισμών και συνεπώς με την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού.
- Η σύγκριση της ανάπτυξης παρουσία και απουσία ενός αντιβιοτικού επιτρέπει την ανάλυση της συμπεριφοράς ευαισθησίας ενός στελέχους.



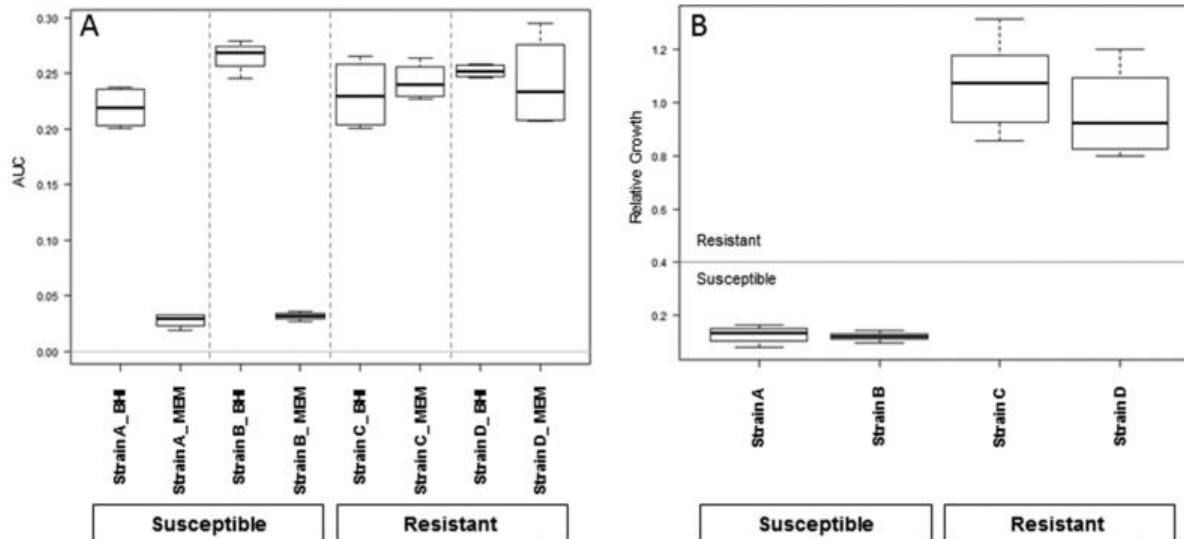
Pseudogel views of the mass range between 3 and 10 kDa of a susceptible (A, B) and a resistant (C, D) *K. pneumoniae* strain after incubation in the absence (lower panels) or presence (upper panels) of meropenem (64 g/ml) for 1 h.

# MALDI-TOF MS



## Ποσοτική MALDI-TOF MS στο προσδιορισμό της Αύξης

- Each strain was incubated for 1 h in the absence or presence of meropenem (8 µg/ml)
- Cells were centrifuged and washed once with 150 µl pure water and once with 100 µl 70% ethanol.
- Bacteria were lysed according to the MALDI Biotyper standard protocol with 10 µl 70% formic acid and 10 µl 100% acetonitrile containing RNase B ( $4 \times 10^{-3}$  g/liter) as an internal standard.
- One microliter of the cell lysates was directly spotted onto a polished steel MALDI target plate.
- Dried spots were overlaid with MALDI matrix (10 mg/ml of -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid [-HCCA] in 50% acetonitrile–2.5% trifluoroacetic acid).

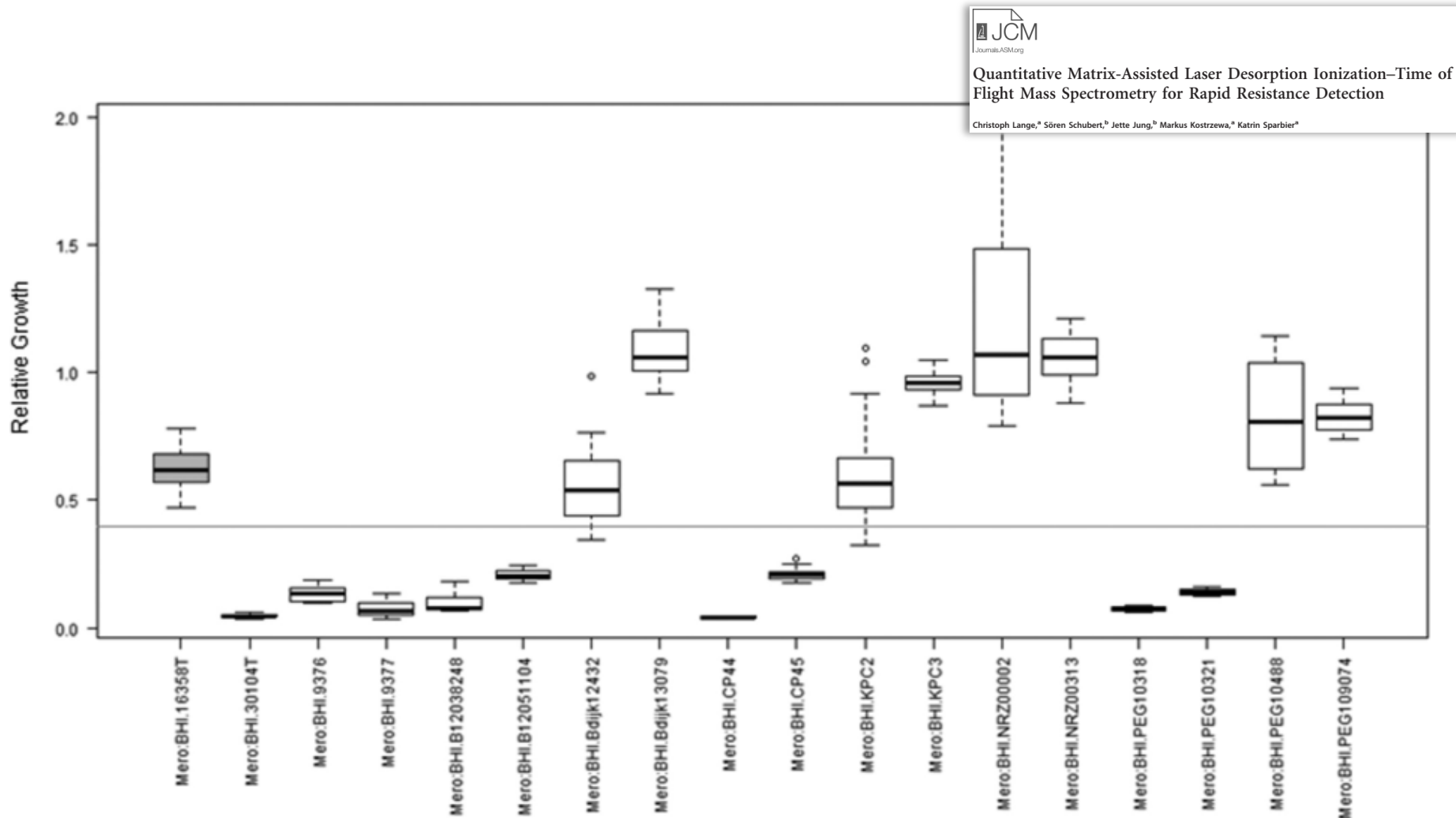


Box plots of the results of the automated evaluation. (A) AUC values obtained for four selected *K. pneumoniae* strains in the absence or presence of meropenem. Susceptible strains show a clear reduction of AUC in the presence of antibiotic.

(B) The ratio of the AUC in the presence of antibiotic to that in the absence of antibiotic provides the relative growth

# MALDI-TOF MS

## Ποσοτική MALDI-TOF MS στο προσδιορισμό της Αύξησης



Analysis of 18 positive blood cultures using the MS-based resistance test. Samples were incubated for 1 h at 37°C with 8 µg/ml meropenem.

# Categorization of clinical isolate to categories (S/I/R)



## General accepted parameters:

- MIC (Minimum Inhibitory Concentration)
- MBC (Minimum Bactericidal Concentration)
- MAC (Minimum Antibacterial Concentration)

## For MALDI-TOF MS:

- MPCC (Minimum Profile Change Concentration)
- MEC (Minimum Effective Concentration)

# MALDI-TOF MS



## Συμπεράσματα

- Η MALDI-TOF MS τεχνολογία έχει πολλές πιθανές εφαρμογές σε διαγνωστικά εργαστήρια
- Απαιτείται λιγότερος σε σύγκριση με τις κλασσικές τεχνικές καλλιέργειας
- Πιθανή ενσωμάτωση αυτών των τεχνικών σε αυτόματες γραμμές
- Απαιτείται περαιτέρω βελτιστοποίηση και επικύρωση ορισμένων μεθόδων

MALDI-TOF MS/MS χρήση της MALDI-TOF φασμαφωτομετρίας μάζας στη διερεύνηση των μηχανισμών αντοχής πολυανθεκτικών μικροοργανισμών



**ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΓΙΑ ΤΗ ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΑΣ**



c.papagiannitsis@gmail.com