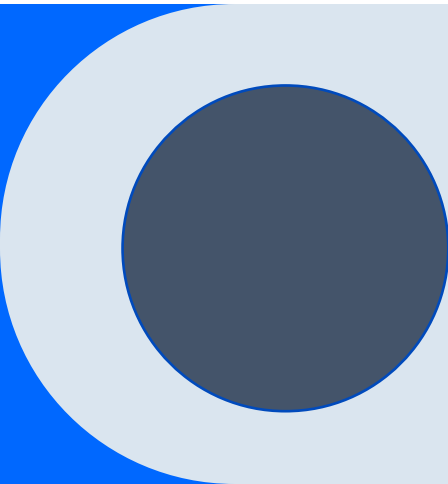



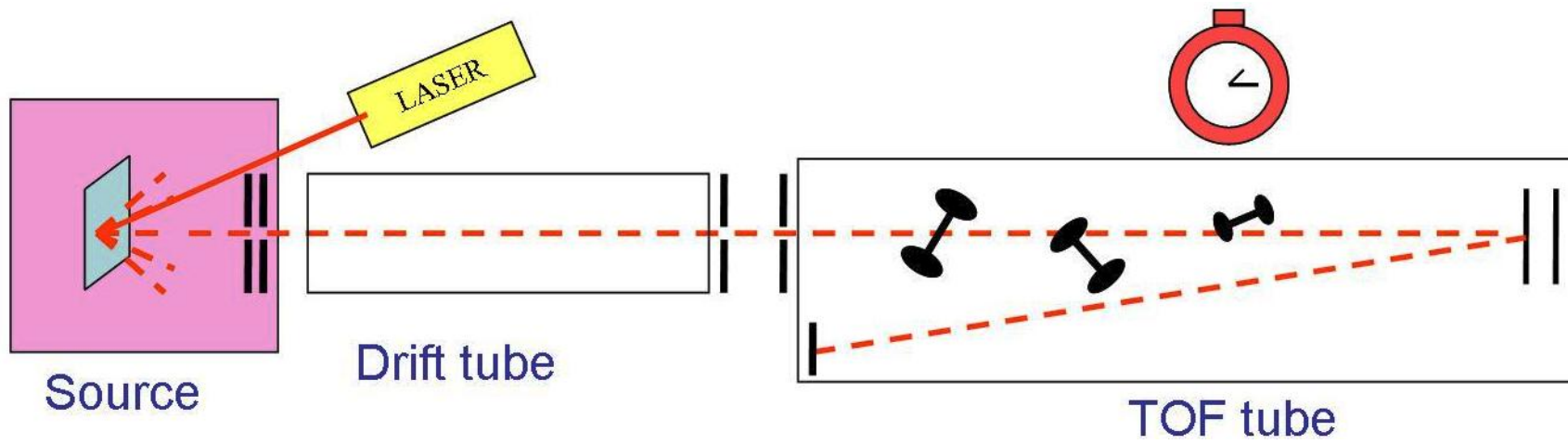


# Φασματογράφος μάζας στην ταυτοποίηση ζυμο- και υφομυκητών



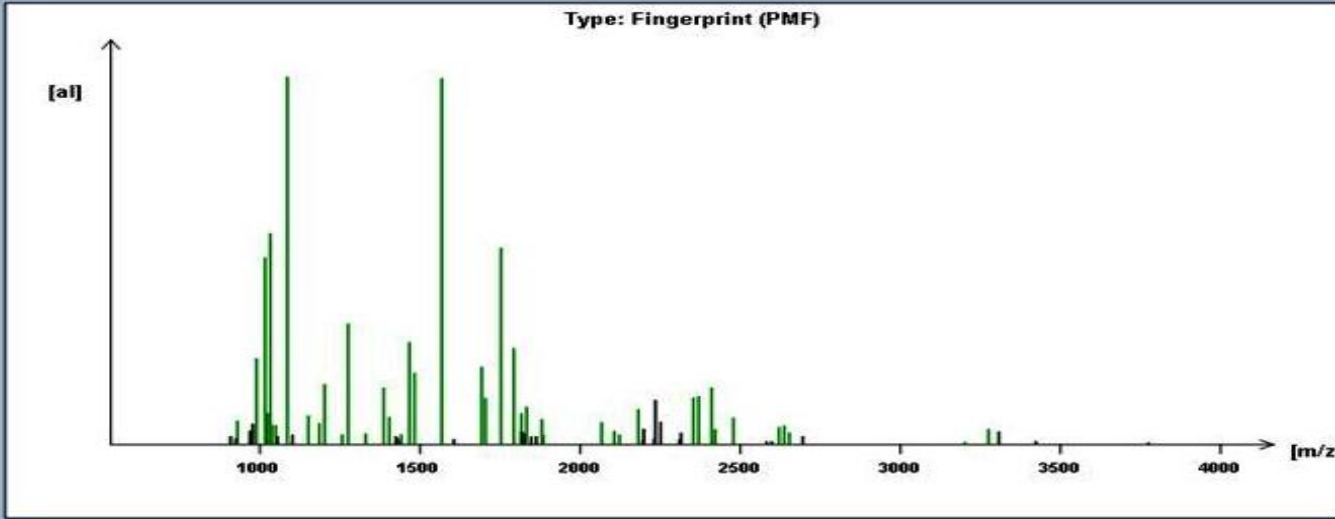
Καθ. Γεωργία Βρυώνη  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας  
Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ





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

Type: fingerprint (PMF, Peptide Mass Fingerprint)



# 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

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

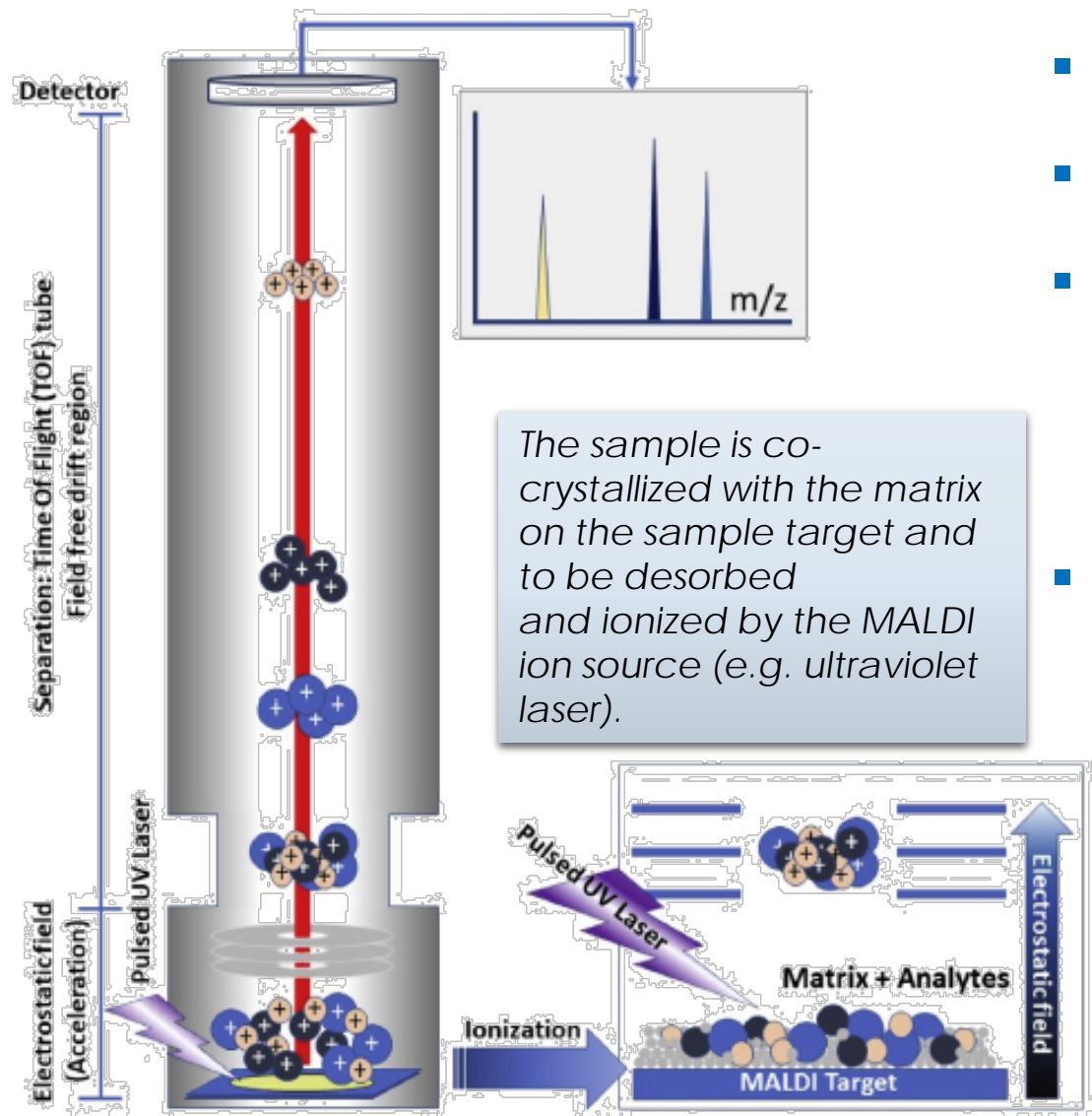


MALDI is a "soft ionization" technique  
ionizes analyte molecules whole

## Advantages of MALDI

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

# Αρχή λειτουργίας



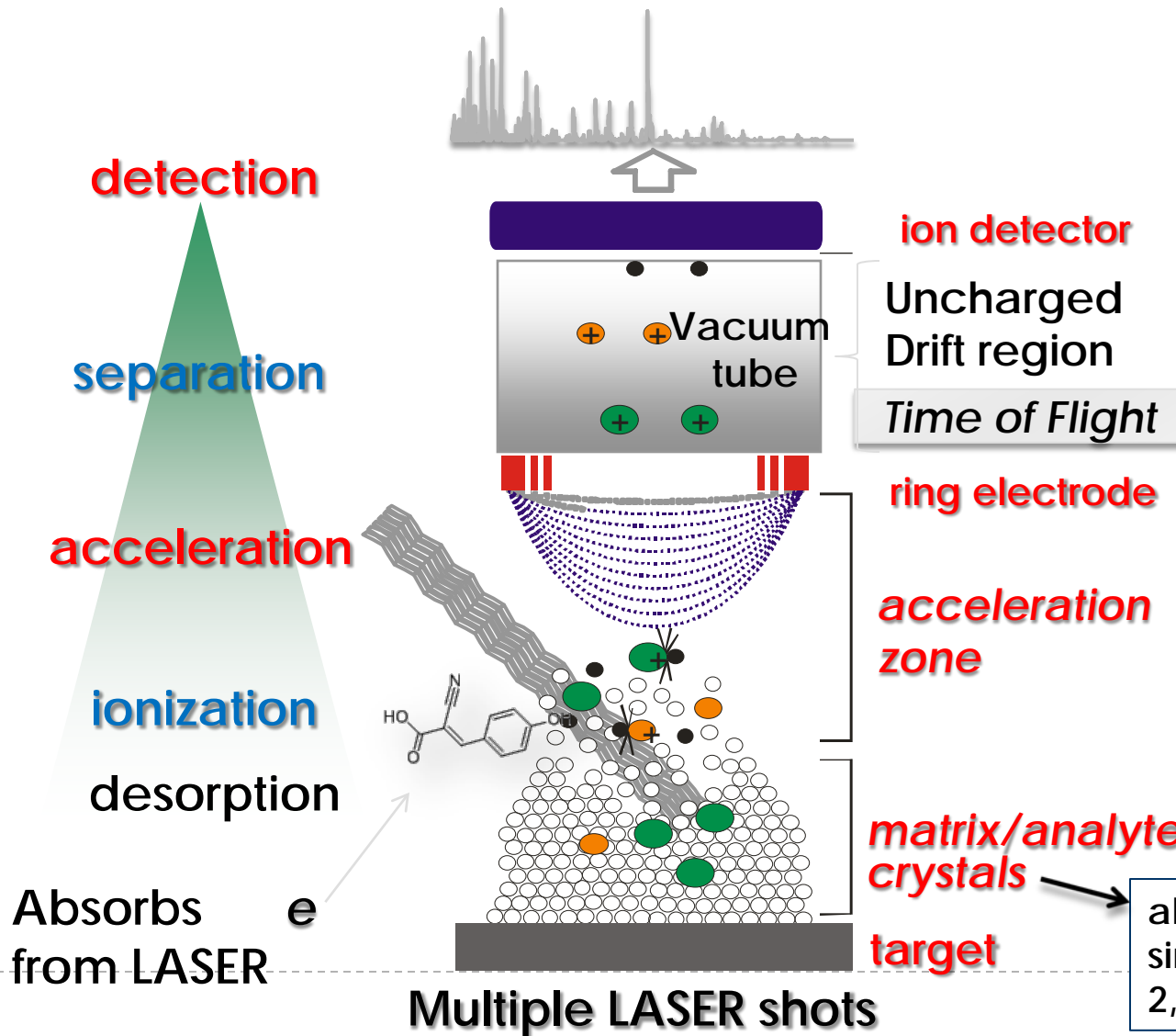
- Εύκολα και γρήγορα προετοιμαζόμενο δείγμα
- **Ιονισμός μακρομορίων, κυρίως πρωτεϊνών**
- **Επιτάχυνση** των ιόντων προς την περιοχή του ανιχνευτή κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες και σε περιβάλλον κενού
- **Ανίχνευση και ανάλυση** των προκυπτουσών φασμάτων μάζας → **ταυτοποίηση των μακρομορίων** μέσω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



# MALDI-TOF MS: αρχή λειτουργίας

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

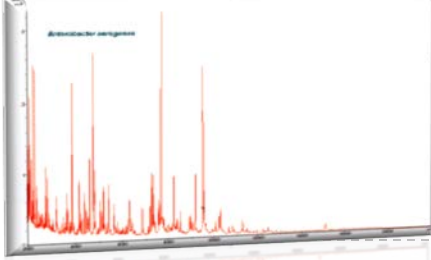
m: mass  
 z: charge  
 U: acceleration voltage  
 L: path length  
 t: time  
 e: elementary charge



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).



**Autobio** 安图生物



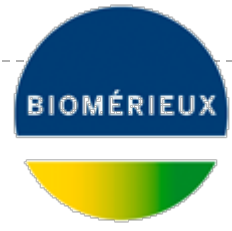
Autof MS1000, Automated mass spectrometry microbial identification system



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

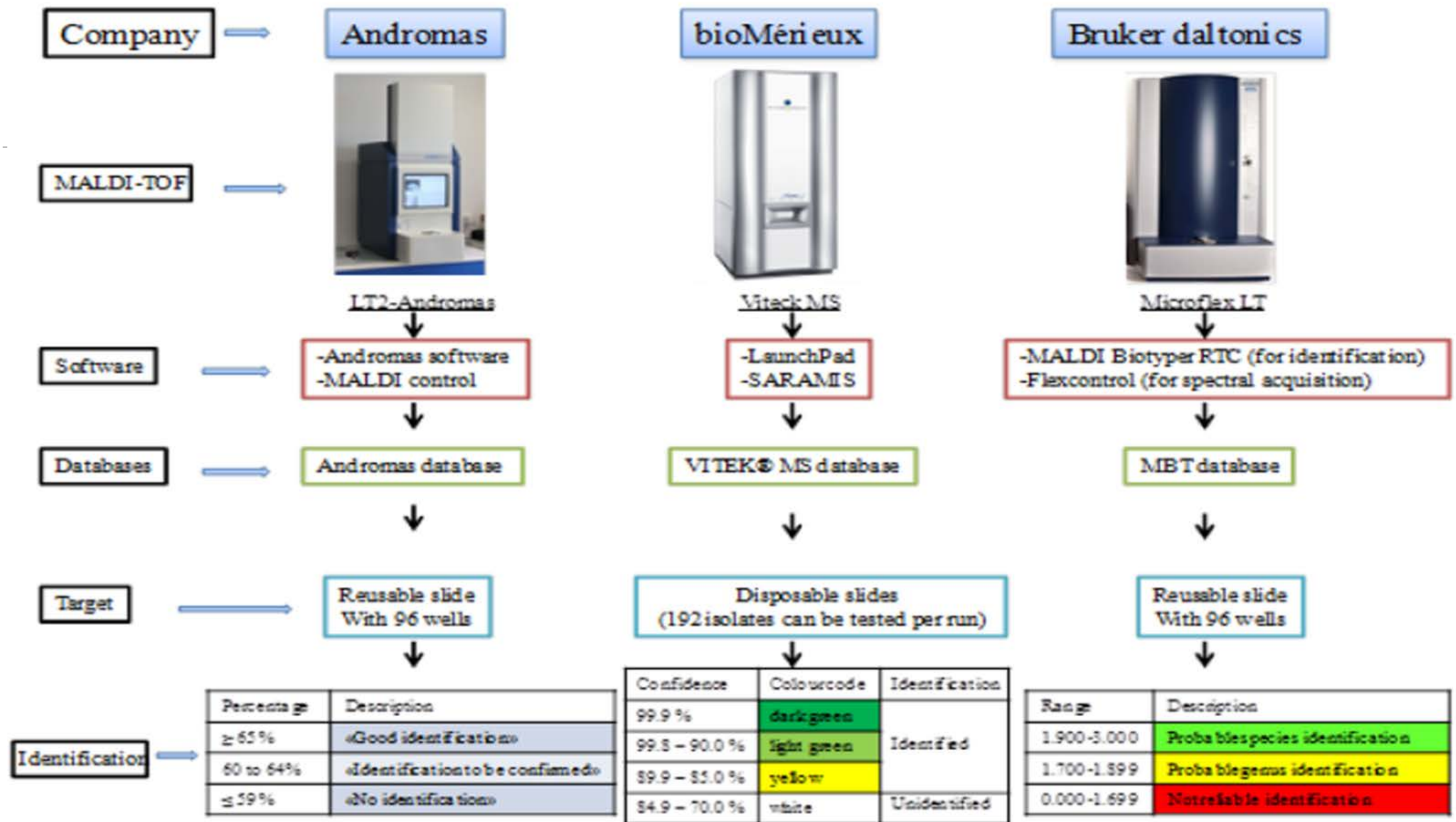


Bruker Biotyper

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.

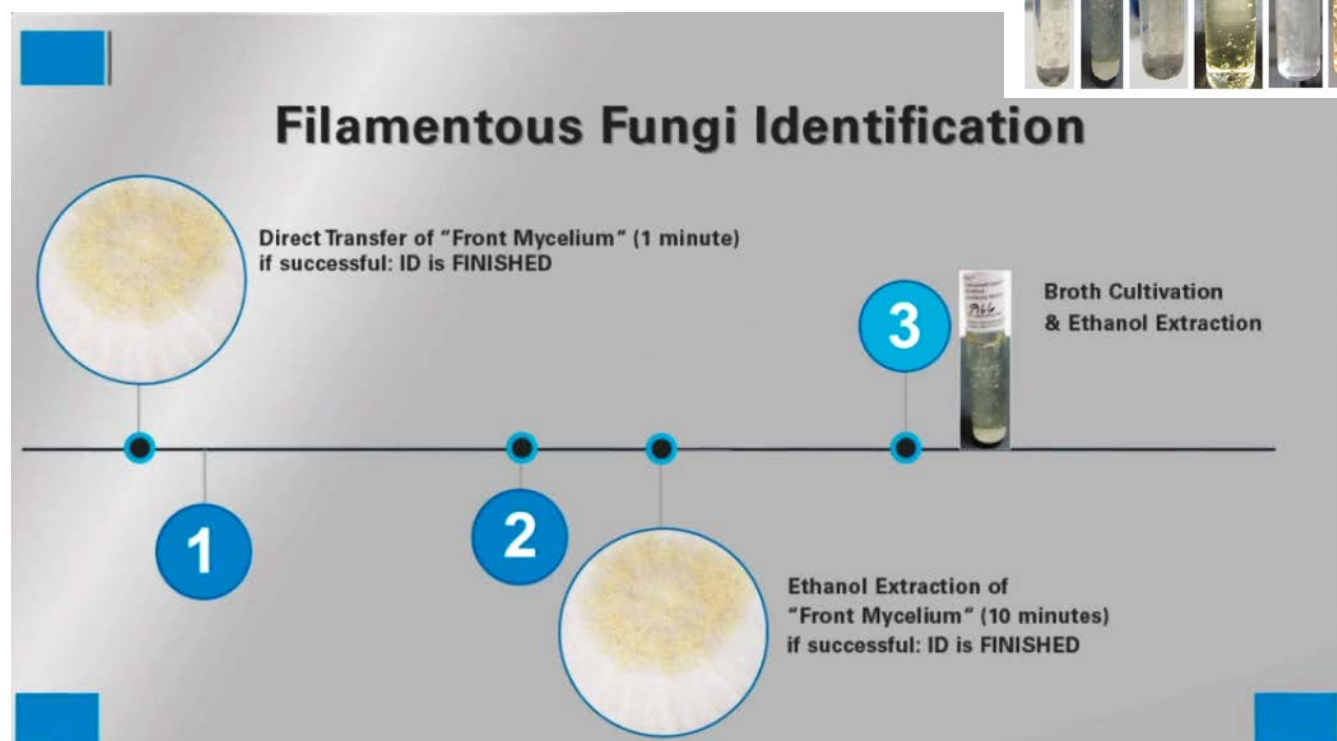
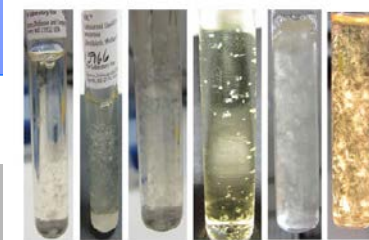


# Πρωτόκολλα επεξεργασίας

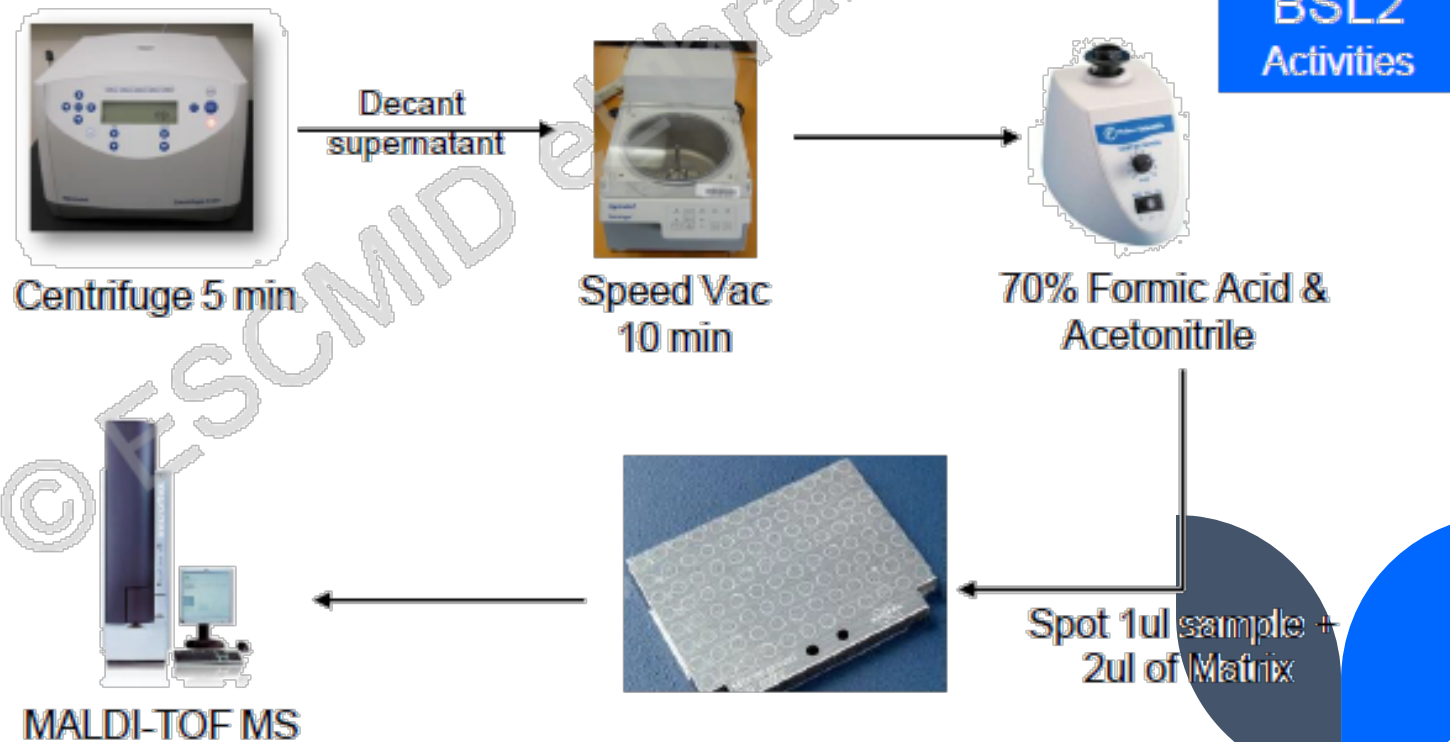
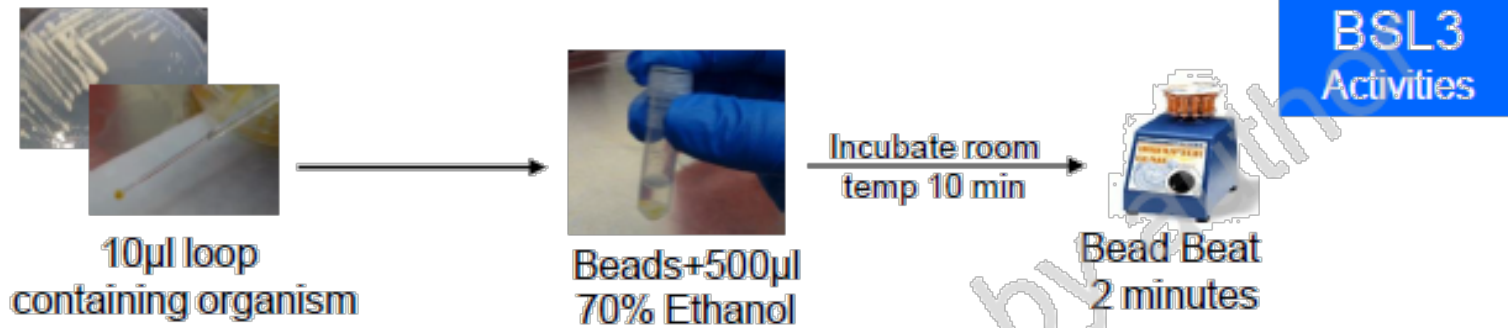
1. Άμεση τοποθέτηση στην πλάκα της αποικίας με matrix → **βακτήρια**
2. Πρωτόκολλο **ταχείας πρωτεϊνικής εξαγωγής** με 70% φορμικό οξύ → **βακτήρια, ζύμες, υφομύκητες**
3. Πρωτόκολλο **κλασσικής πρωτεϊνικής εξαγωγής** με αιθανόλη → **βακτήρια, ζύμες, υφομύκητες**
4. **Υγρή καλλιέργεια** σε Sabouraud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

© Vitek<sup>®</sup>-MS: Πρωτόκολλο **ταχείας** πρωτεϊνικής εξαγωγής.

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



# Μυκοβακτηρίδια



## 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**

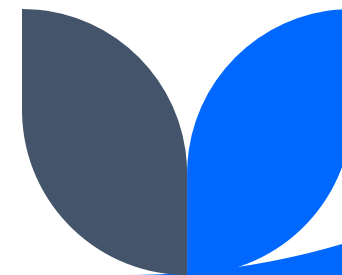
Koichi Tanaka<sup>†</sup>, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida and Tamio Yoshida

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

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

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

2012-13





# 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<sup>†</sup>, 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**



# Άλλα είδη φασματογράφων (ερευνητικά εργαστήρια)

- MALDI-resequencing (MALDI-RE)

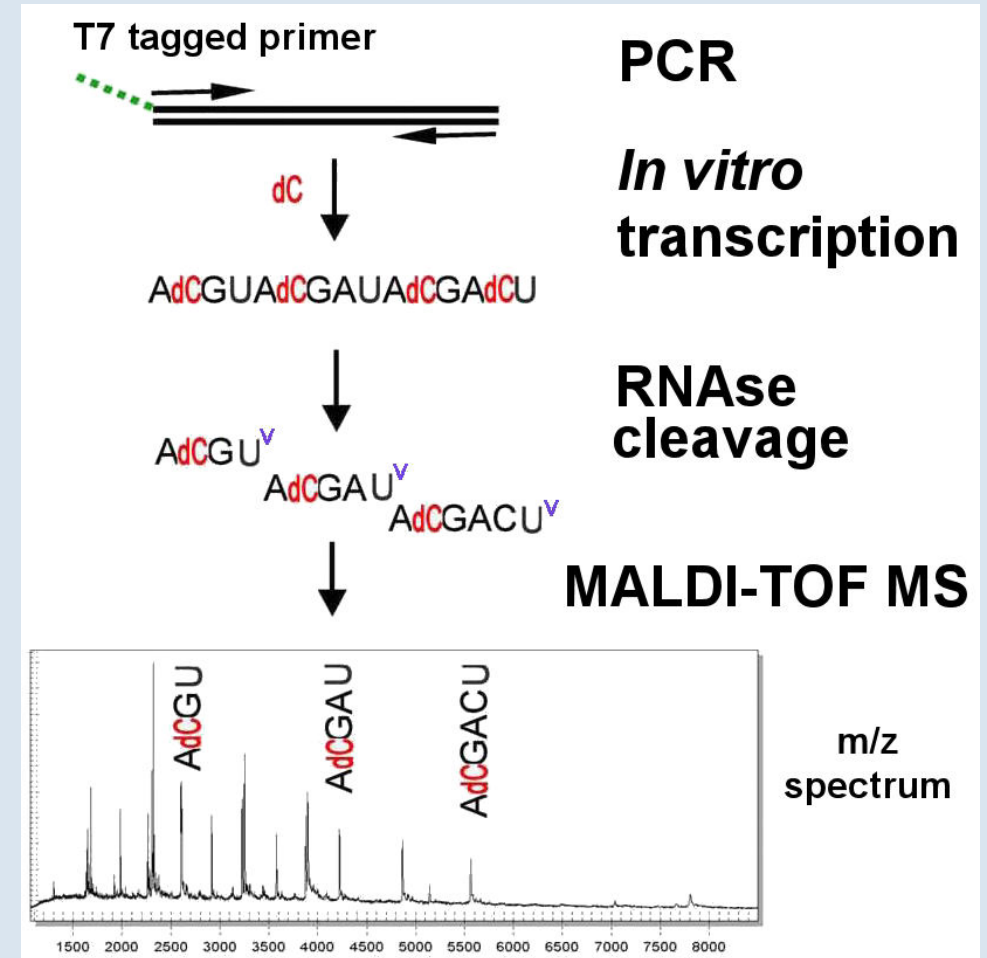
- DNA αποδιατάσσεται → ανάγκη μετατροπής σε RNA

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



- **Ανάλυση νουκλεϊκών οξέων** για

- γονοτύπιση βακτηρίων
  - ταυτοποίηση παθογόνων





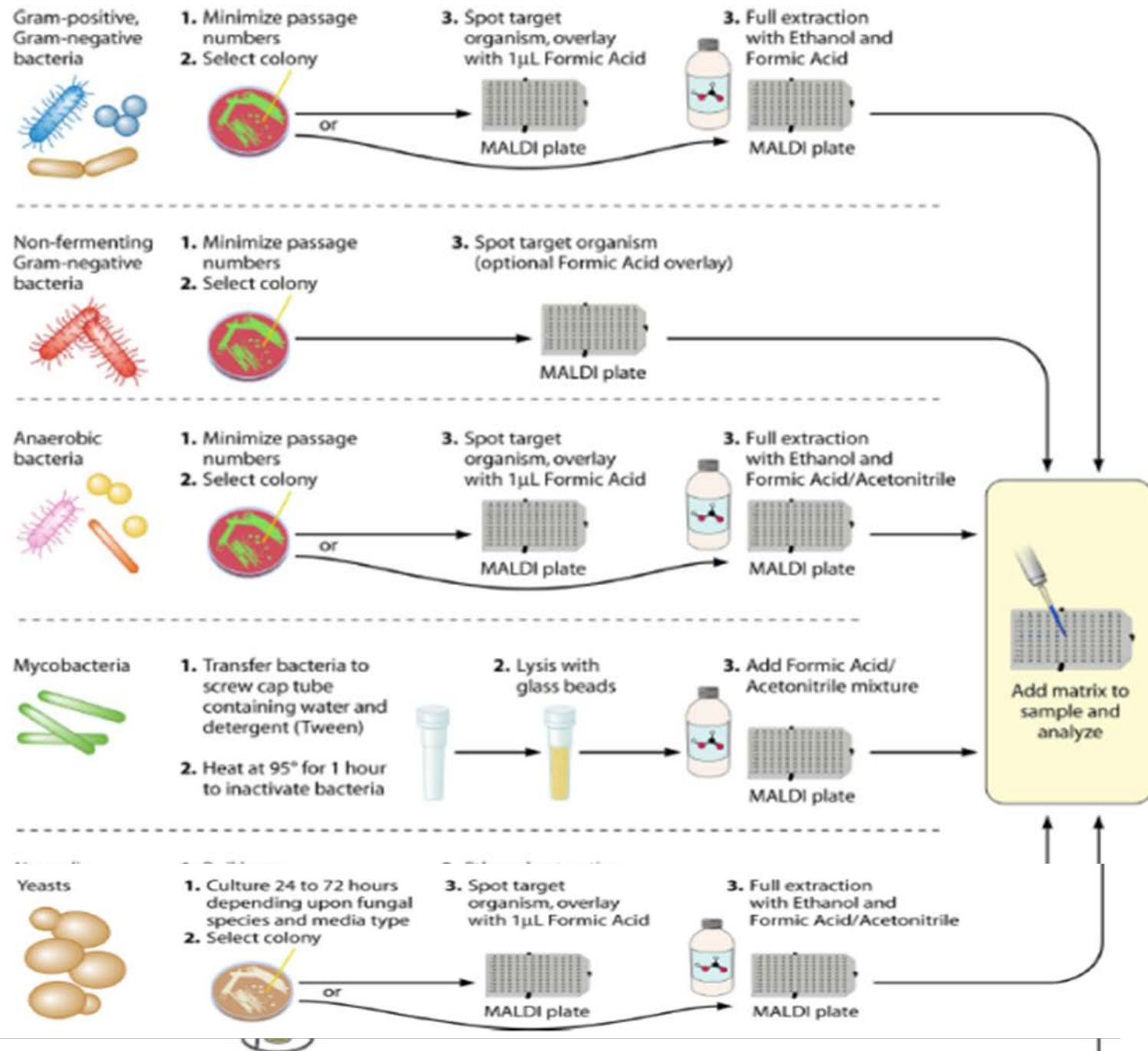
# Εφαρμογές στη μικροβιολογική διάγνωση

## Ταυτοποίηση από καλλιέργειες

Υφομύκητες

Βακτήρια

Ζύμες



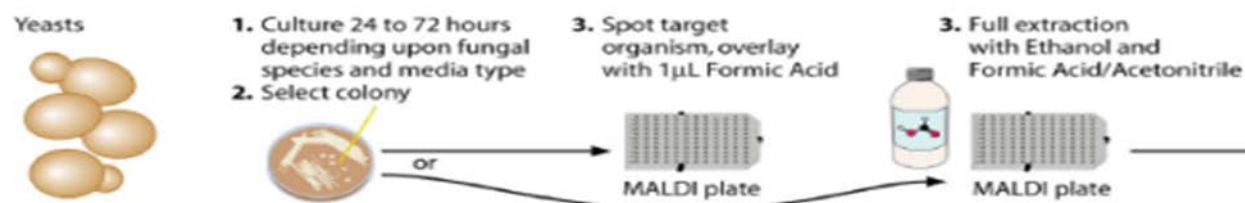
# Εφαρμογές στη μικροβιολογική διάγνωση

## Ταυτοποίηση από καλλιέργειες

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

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

Organisms	Reference
<i>Fusarium</i> spp.	Dong et al. (2009), Kemptner 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)

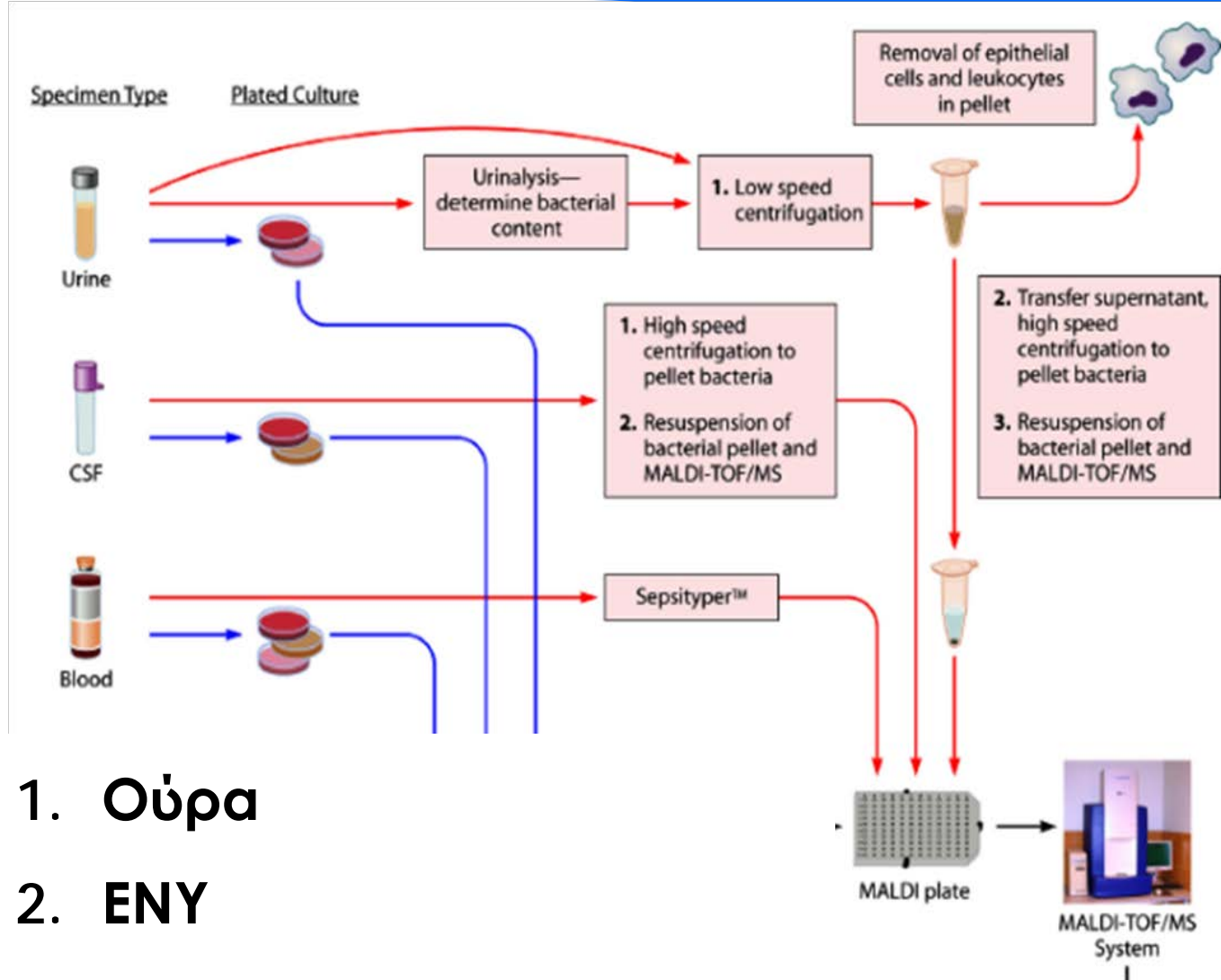


# Εφαρμογές στη μικροβιολογική διάγνωση

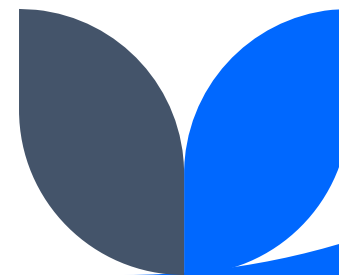
## Άμεση ανίχνευση σε κλινικά δείγματα

- ❖ 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

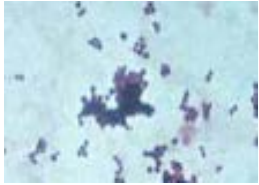


# Το κύριο πλεονέκτημα → ακρίβεια και ταχύτητα

## Προ MALDI-TOF εποχή



Gram + cocci σε αλυσίδες



Gram + cocci σε ομάδες



Gram - βακτηρίδια

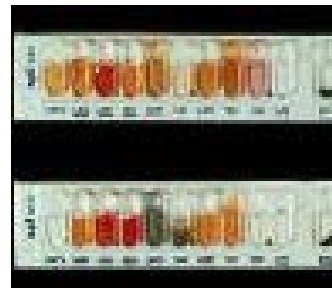
Overnight incubation



*S. aureus*



*E. coli*



## Μετά MALDI-TOF εποχή

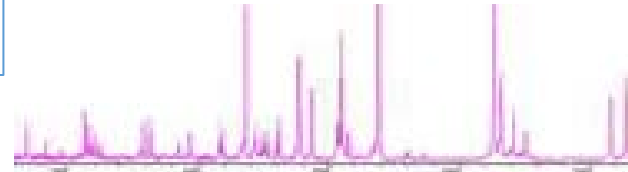


*E. feacium*

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

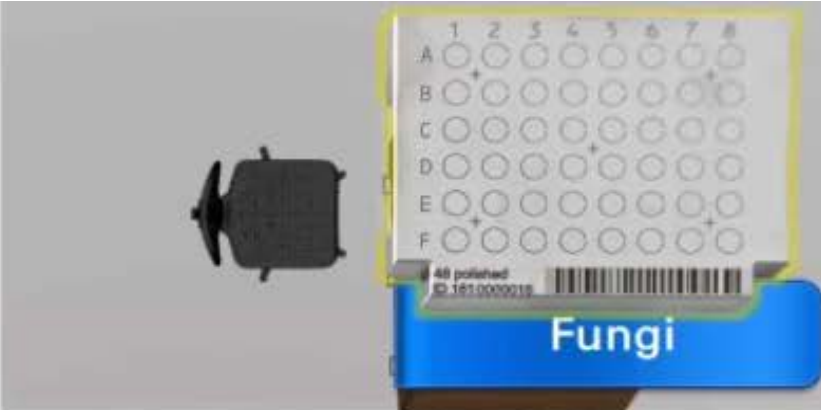
- ▶ MALDI-TOF MS → ακριβή ταυτοποίηση τουλάχιστον 24 h νωρίτερα των φαινοτυπικών μεθοδολογιών, ακόμη και των αυτοματοποιημένων.

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

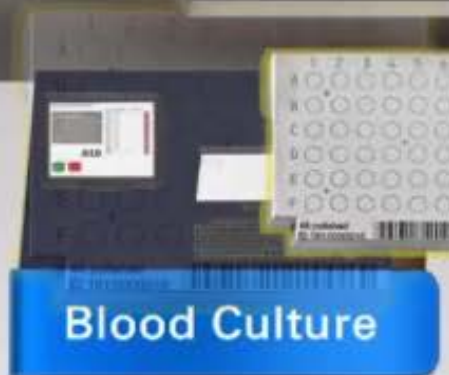




**Mycobacteria**



**Fungi**



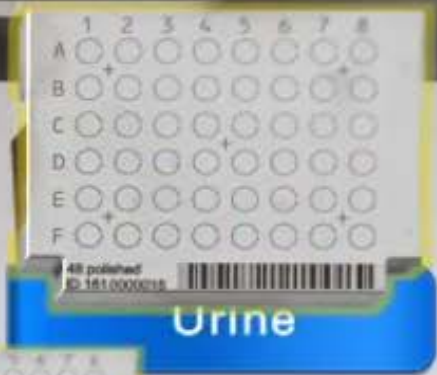
**Blood Culture**



**Non-Specialty Culture**



**Specialty**



**Urine**



**MALDI Biotyper**



**Approximately 200 identifications per hour**

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

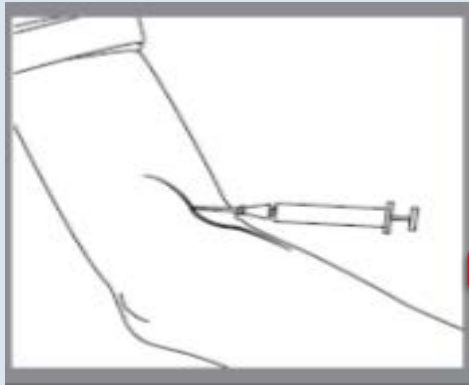
Study	Percentage (No.) organisms correctly detected by MALDI-TOF MS		Description of isolates of study
	Genus level	Species Level	
<b>Gram negative bacteria</b>			
Faron et al., 2015 [29]	99.8% (2258/2263)	98.2% (2222/2263)	2263 clinical isolates of aerobic Gram-negative bacteria.
Gamer et al., 2013 [30]	92.5% (357/386)	91.7% (351/386)	386 isolates of anaerobic Gram-negative bacteria.
<b>Gram positive bacteria</b>			
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.
<b>Anaerobic bacteria</b>			
Gamer et al., 2013 [30]	92.5% (602/651)	91.2% (591/651)	651 isolates anaerobic bacteria.
<b>Yeast and mold</b>			
Wang et al., 2016 [46]	n.a. <sup>a</sup>	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.
<b>Mycobacterium</b>			
Wilen et al., 2015 [21]	n.a.	89.2% (140/157)	157 mycobacterial isolates (including 16 isolates of <i>M. tuberculosis</i> ).
Rodrigues-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.
<b>Blood culture positive bottles</b>			
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

<sup>a</sup> Not applicable.

# MALDI-TOF-MS: εφαρμογή σε θετική αιμοκαλλιέργεια

VITEK® MS Blood Culture Kit (RUO)

MBT Sepsityper® IVD Kit

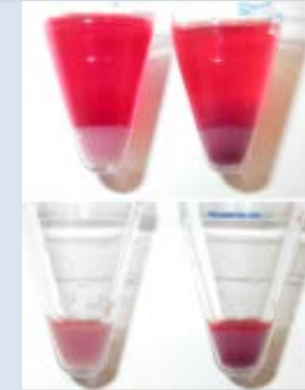


Δειγματοληψία



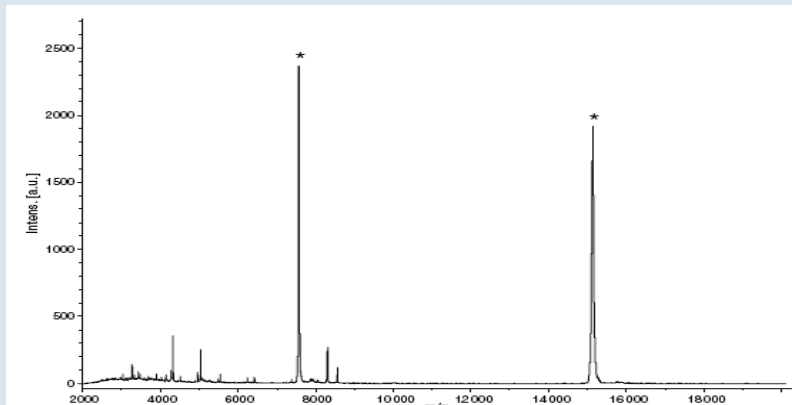
Επώαση αιμοκαλλιεργείων

αν θετική



Απομάκρυνση αίματος γιατί ψευδώς θετικά σήματα λόγω αιμοσφαιρίνης

Ετοιμασία του βακτηριακού ιζήματος

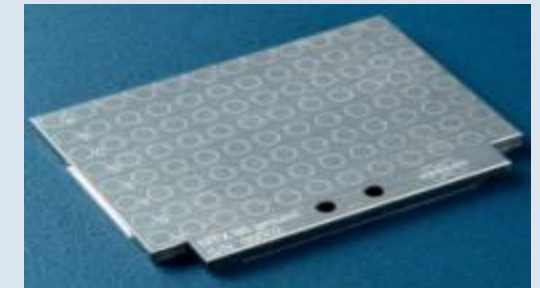


Σύγκριση με βάση δεδομένων

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<sup>1,2</sup> and Markus Kostrzewa<sup>2</sup>


- **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)**

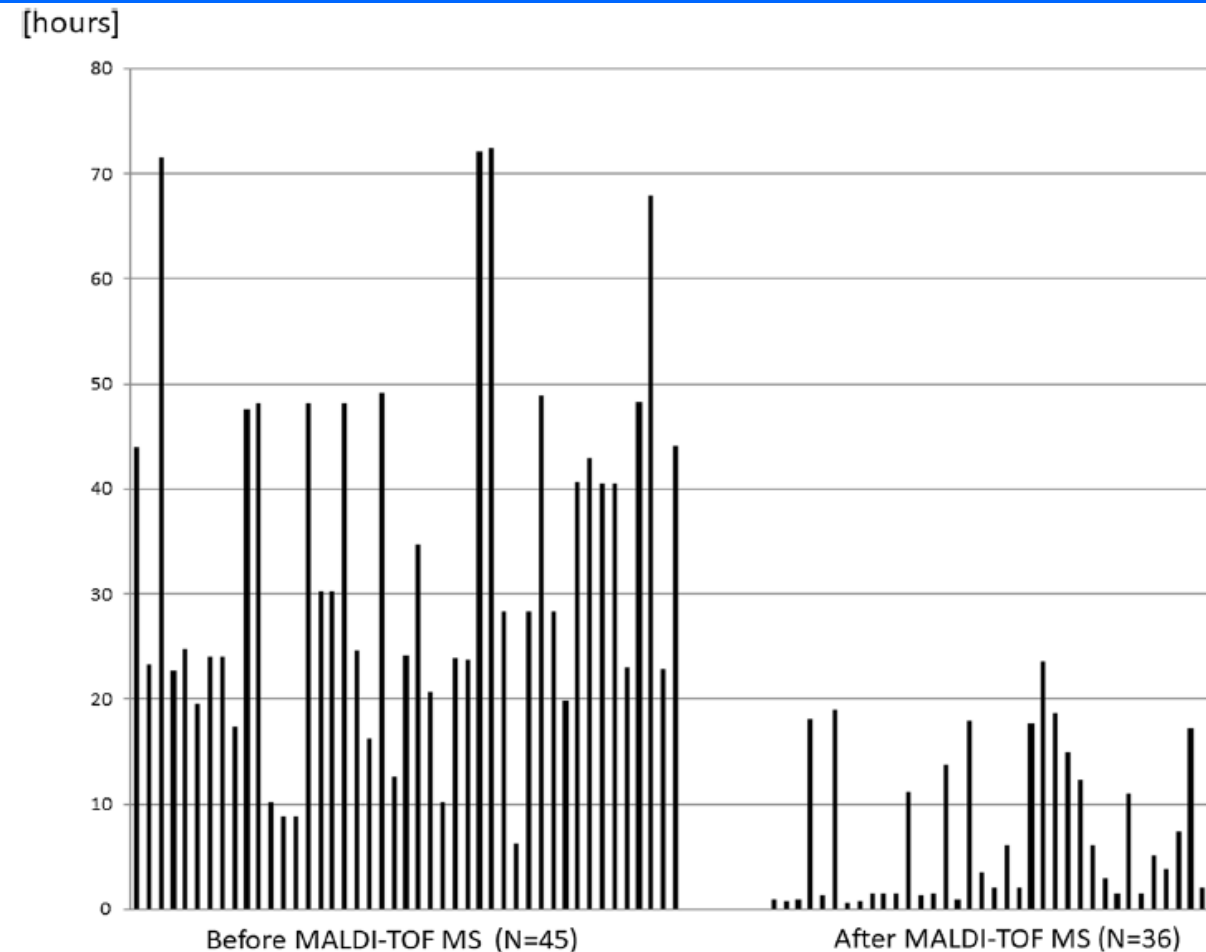


# Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection



*Clin Proteom* 2020;17:14

Fumio Nomura<sup>1\*</sup> , Sachio Tsuchida<sup>1</sup>, Syota Murata<sup>2</sup>, Mamoru Satoh<sup>1</sup> and Kazuyuki Matsushita<sup>2</sup>



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

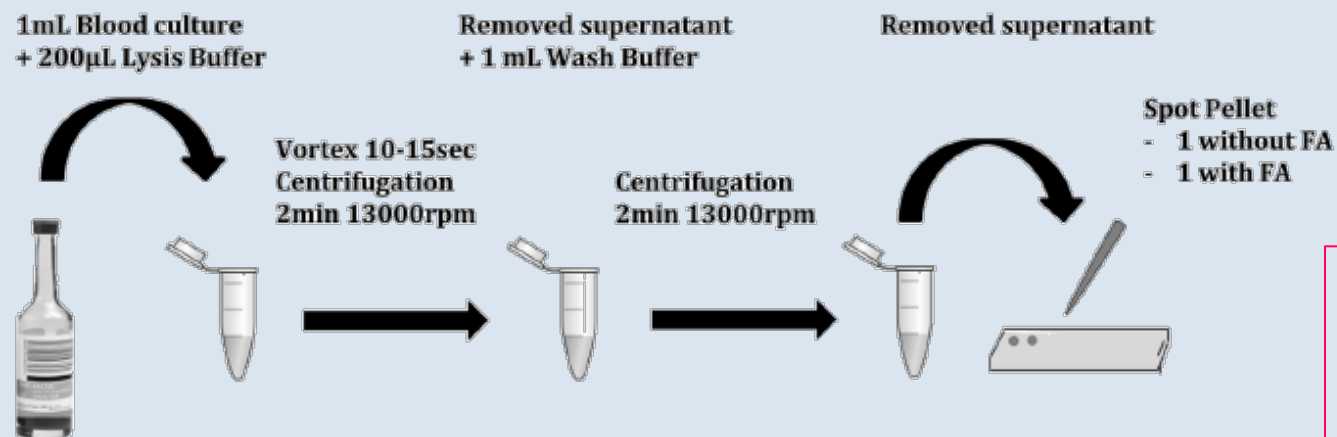
μεμβράνης (CMFT).



# Evaluation of Rapid Sepsityper<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> Protocol (10min):

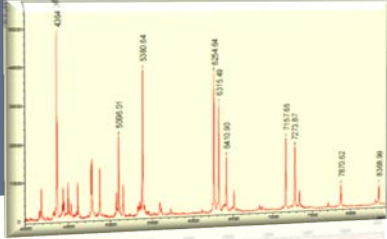


Rapid Sepsityper<sup>®</sup>  
protocol ± FA:  
ταυτοποίηση με ακρίβεια  
2/3 των δειγμάτων

## b Standard Sepsityper<sup>®</sup> Protocol (30min):



# Κόστος - όφελος



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

Service / έτος: \$10.000 - \$35 000

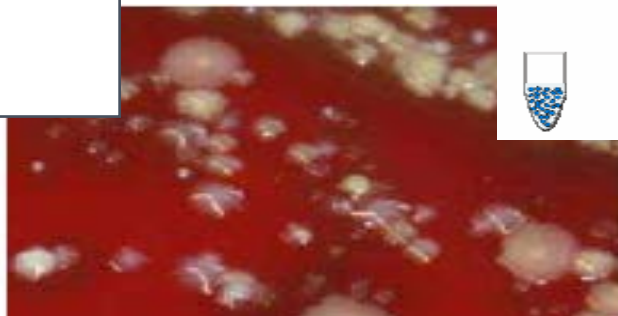
Αντιδραστήρια - αναλώσιμα: \$ 0.10-\$ 0.50 / δείγμα **vs**

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**

# Συμπεράσματα

Μεγάλη τεχνολογική πρόοδος (επανάσταση)

Περισσότερα δεδομένα

Ταχύτερα

Υψηλότερη ποιότητα και ακρίβεια αποτελεσμάτων

Χαμηλότερο κόστος

Αλλά χρειάζεται

Ευελιξία

Προσαρμογή στις νέες προκλήσεις

Νέες δεξιότητες

