LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF EN LA DETECCIÓN RÁPIDA DE BACTERIAS RESISTENTES: IMPACTO CLÍNICO

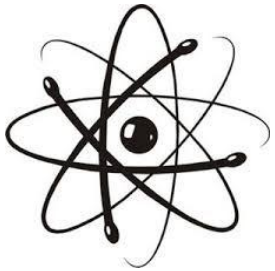
SEIMC 2016

inibic
instituto de investigación biomédica de a coruña

SERVIZO GALEGO de SAÚDE | Xerencia Xestión Integrada A Coruña

Marina Oviaño García
marina.oviano.garcia@sergas.es
Río Hortega del ISCIII
Complejo Hospitalario Universitario A Coruña-INIBIC

¿Cómo aplicar MALDI-TOF a la detección de resistencias bacterianas?



1. Detectar la resistencia a través del efecto que ejerce la bacteria sobre el antibiótico. **Seguimos los cambios de masa del antibiótico.**
   - Detección de la actividad β-lactamasa

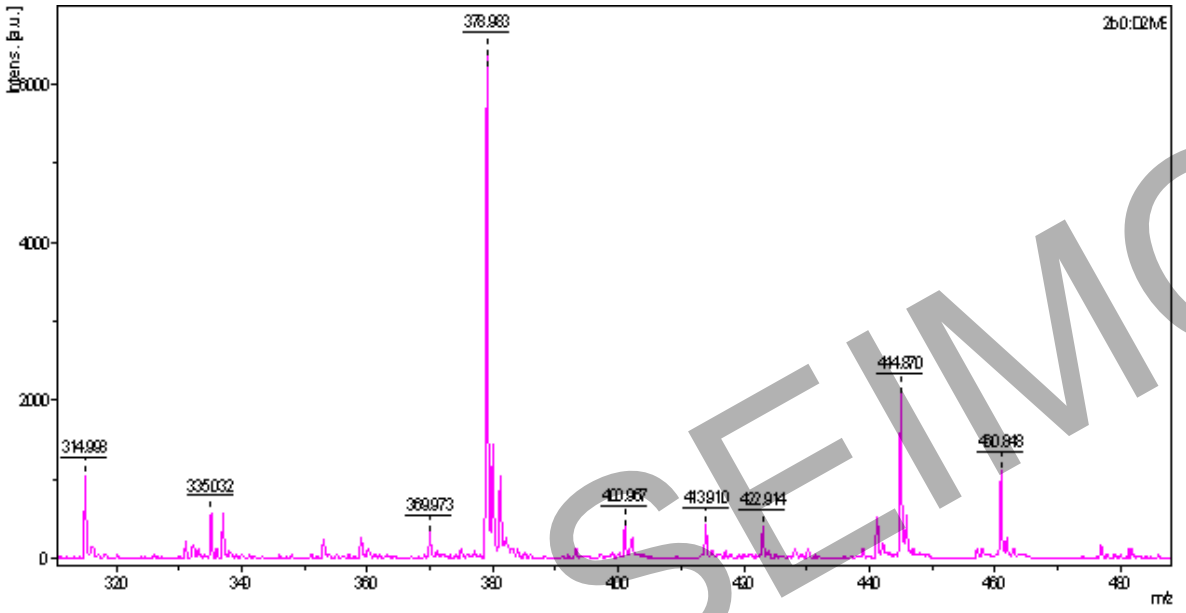
2. Detectamos la resistencia a través del efecto que ejerce el antibiótico sobre la bacteria. **Seguimos los cambios de masa de la bacteria.**
   - Perfiles de resistencia cuantitativos
   - Perfiles de resistencia en levaduras.

3. **Evaluamos la presencia en el perfil proteico de la bacteria de proteínas asociadas a resistencia.**
   - Detección de *Enterococcus sp*. resistentes a vancomicina.
   - Detección de *Bacteroides fragilis cfiA*-positivo
   - Detección de β-lactamasas
   - Detección de MRSA

SEIMC 2016

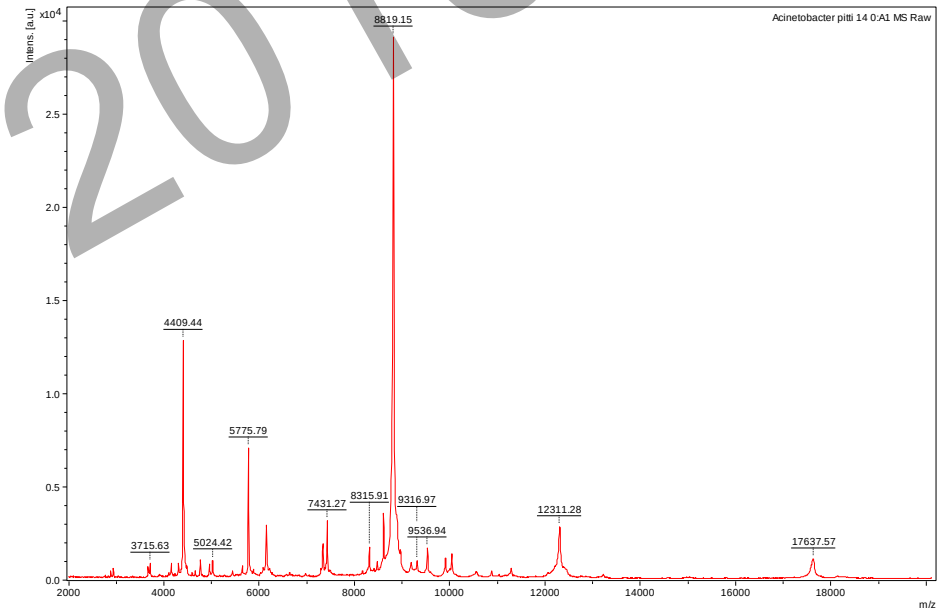
¿Cuál es el resultado?

- Si seguimos los cambios de masa del antibiótico:



- Rango de masas de 300-600 Da.
- Calibrador : Bradykinin
  α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid [HCCA]

- Si seguimos los cambios en el perfil proteico de la bacteria:



- Rangos de masas de 2.000-20.000 Da.
- Calibrador : BTS
  α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid [HCCA]

SEIMC 2016

Detección de la actividad β-lactamasa

JCM
Journals.ASM.org

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against β-Lactam Antibiotics

Katrin Sparbier,[a] Sören Schubert,[b] Ulrich Weller,[c] Christiane Boogen,[c] and Markus Kostrzewa[a]

Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany[a]; Max von Pettenkofer-Institute, Munich, Germany[b]; and Praxis für Laboratoriumsmedizin, Ärztliche Gemeinschaft für Diagnostik Köln-Bonn, Cologne, Germany[c]

- Se describen los espectros de masas de ampicilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima, ertapenem, imipenem y meropenem y sus productos de hidrólisis.
- Establece concentraciones y buffers.
- Tiempo de incubación 3 horas.
- Introduce inhibidores en la reacción.
- Hemocultivos directos.

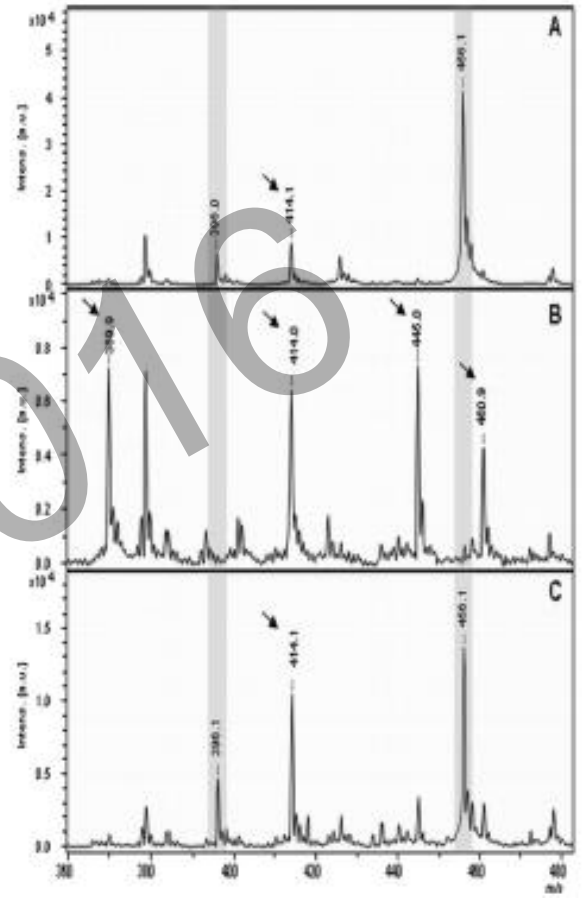


TABLE 1 Calculated masses and corresponding molecular forms defining the sensitivity and resistance patterns for different antibiotics

		Sensitivity pattern (Da)							Resistance pattern (Da)							
Antibiotic	Mol wt (g/mol)	$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + 2\,Na]^+$	$[M + Na + K]^+$	$[M + 3\,Na]^+$	$[M\text{-}X^a + H]^+$	$[M_{hydr.} + H]^+$	$[M_{hydr.} + Na]^+$	$[M_{hydr.} + 2\,Na]^+$	$[M_{hydr.} + Na + K]^+$	$[M_{hydr./decarb.} + H]^+$	$[M_{hydr.}\text{-}X + H]^+$	$[M_{hydr./decarb.}\text{-}X + H]^+$	$[M_{hydr./decarb.} + Na]^+$	$[M_{hydr./decarb.} + K]^+$
Ampicillin	349.4	350.4	372.4		394.4				368.4	390.4	412.4		324.4				
Piperacillin	517.5	518.5	540.5		562.5				536.5	558.5	580.5		(492.5)				
Cefotaxime	455.5	456.5	478.5					396.5						414.5	370.5		
Ceftazidime	546.6	547.6						468.6						486.6	442.6		
Ertapenem	475.5	476.5	498.5	514.5	520.5	536.5	542.5		494.5	516.5	538.5	554.5	450.5			472.5	488.5
Imipenem	299.4	300.4															
Meropenem	383.4	384.5	406.5		428.5												

[a] X, acetyl for cefotaxime and pyridine for ceftazidime.

SEIMC 2016

Detección de la actividad β-lactamasa

- **Metodología general:**

Cultivo en placa

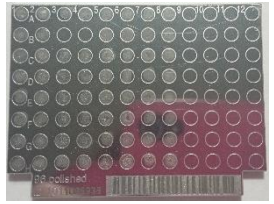
Hemocultivo

MALDI Sepsityper kit

Suspensión bacteriana con el antibiótico

Incubación a 37ª en agitación

Centrifugación



SEIMC 2016

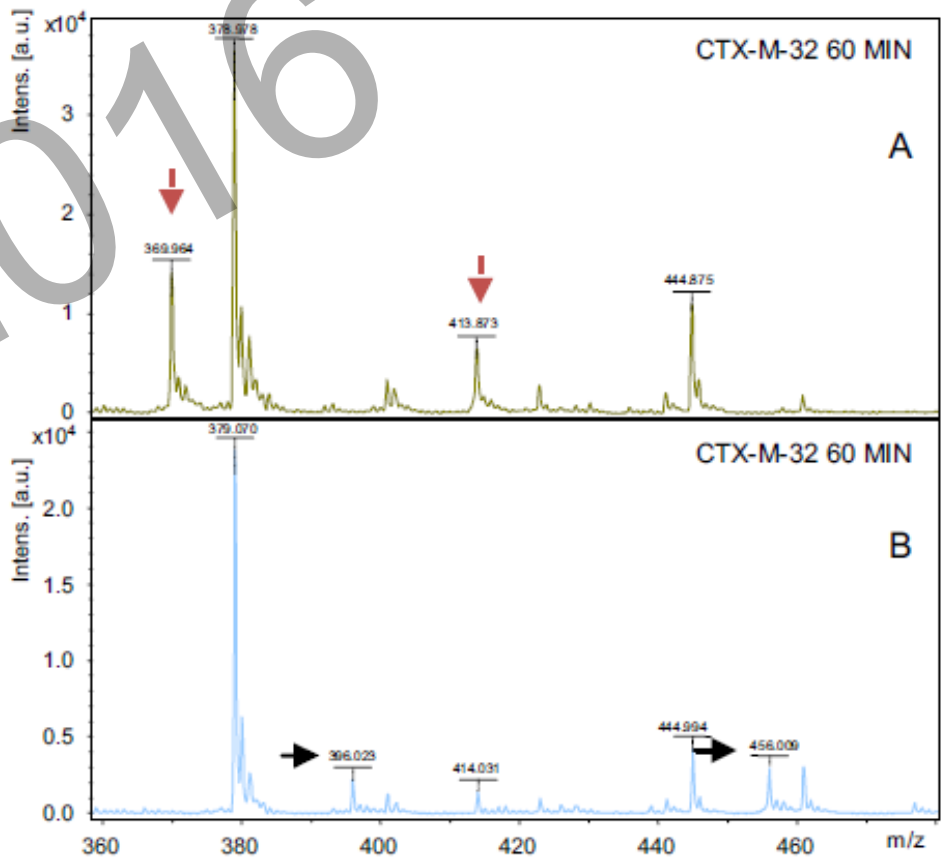
Detección de la actividad β-lactamasa

ORIGINAL ARTICLE 10.1111/1469-0691.12729

Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

M. Oviaño, B. Fernández, A. Fernández, M. J. Barba, C. Mouriño and G. Bou
Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

- Se utilizó cefotaxima y ceftazidima en *Enterobacteriaceae*
- Se empleó ácido clavulánico para identificar la presencia de BLEE.
- Se estudiaron 141 hemocultivos.
- Tiempo de incubación 90 min y sensibilidad de 99%.
- Se obtuvo una relación cualitativa entre el grado de hidrólisis y la concentración mínima inhibitoria (CMI).
- La cefotaxima da lugar a un menor tiempo de reacción y mayores valores de sensibilidad.



SEIMC 2016

Detección de la actividad β-lactamasa

Johansson *et al. BMC Microbiology* 2014, **14**:89
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/89

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE Open Access

The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight

Åsa Johansson[1], Josefine Ekelöf[2], Christian G Giske[3*] and Martin Sundqvist[1,4]

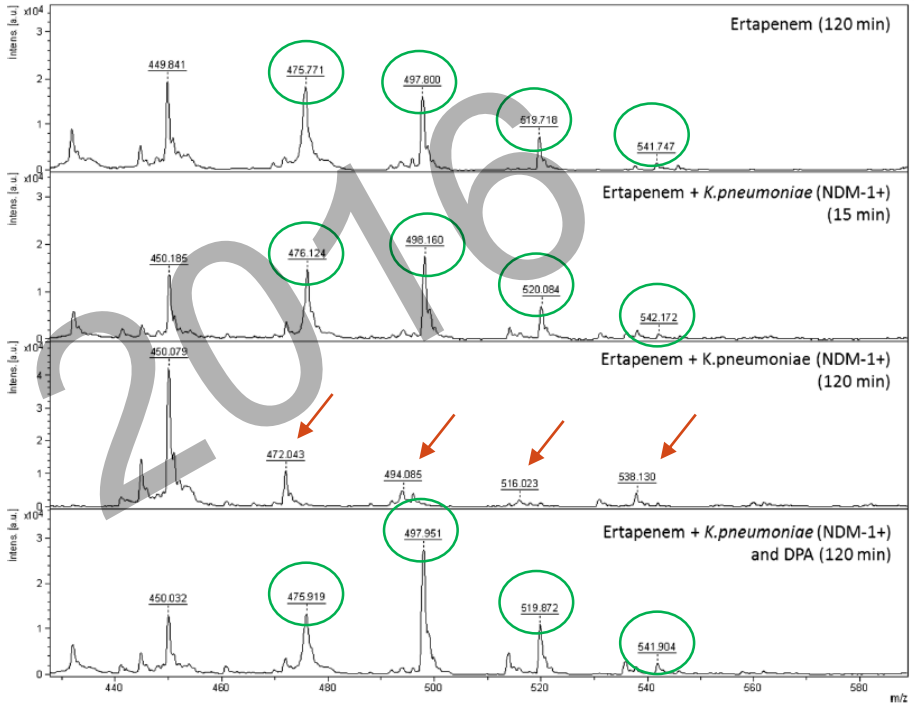


Figure 2 Mass spectrum showing the non hydrolysed pattern of ertapenem (top), The non hydrolysed pattern of ertapenem after 15 min incubation together with NDM producing *K. pneumoniae* (middle top), the full hydrolysis of ertapenem of a NDM-producing *K. pneumoniae* after 120 min (middle bottom) and the effect of the supplement of DPA inhibiting the NDM mediated hydrolysis of ertapenem (bottom).

SEIMC 2016

- El antibiótico estudiado fue ertapenem.
- Los tiempos de reacción fueron desde 15 min para aislados de tipo KPC a 120 min para las metalo-β-lactamasas.
- Los aislados de OXA-48 necesitaron una incubación de 24 h para hidrolizar el ertapenem.
- Ninguno de los *Acinetobacter baumannii* testados (OXA-23, OXA-24-like y OXA-58) hidrolizaron el antibiótico en < 24 h.

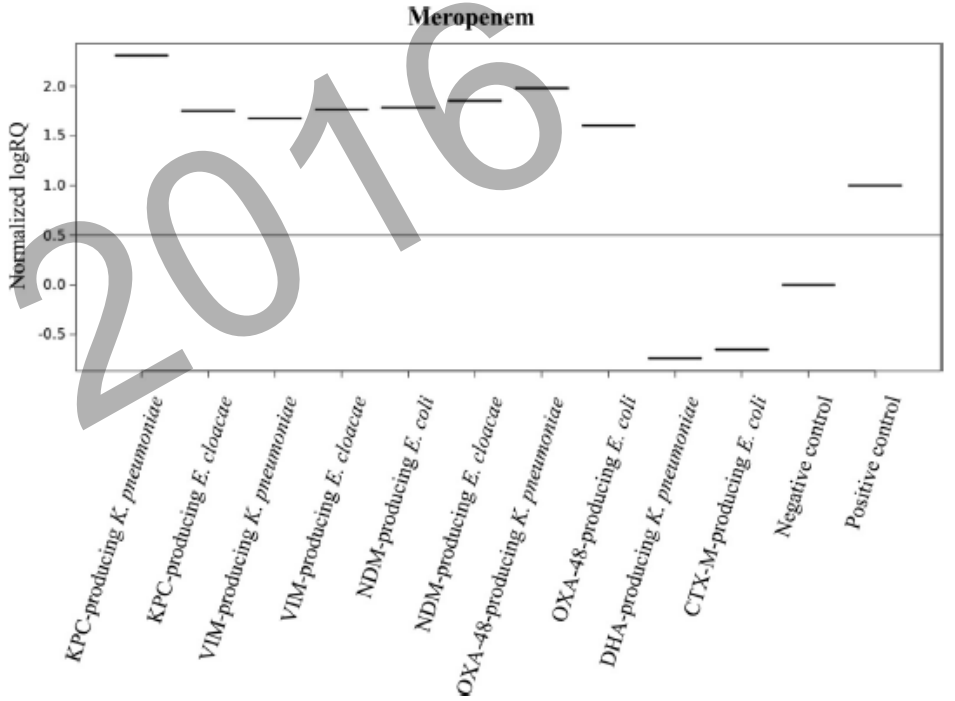
Detección de la actividad β-lactamasa

JCM
Journals.ASM.org

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Meropenem Hydrolysis Assay with NH_4HCO_3, a Reliable Tool for Direct Detection of Carbapenemase Activity

Costas C. Papagiannitsis,[a,e] Vendula Študentová,[a] Radoslaw Izdebski,[b] Olga Oikonomou,[c] Yvonne Pfeifer,[d] Efthimia Petinaki,[c] Jaroslav Hrabák[a,e]

Department of Microbiology, Faculty of Medicine and University Hospital in Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic[a]; National Medicines Institute, Warsaw, Poland[b]; Department of Microbiology, Medical School, University of Thessaly, Biopolis, Larissa, Greece[c]; Robert Koch Institute, Nosocomial Pathogens and Antibiotic Resistance, Wernigerode, Germany[d]; Biomedical Center, Faculty of Medicine and University Hospital in Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic[e]



SEIMC 2016

- Introduce en el buffer de reacción NH_4HCO_3.
- Permite detectar por primer vez portadores de **OXA-48** sin disminuir la sensibilidad en la detección del resto de enzimas.
- La sensibilidad de la detección se incrementa de un 76% a un 98%.

Detección de la actividad β-lactamasa

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Journal of Clinical Microbiology

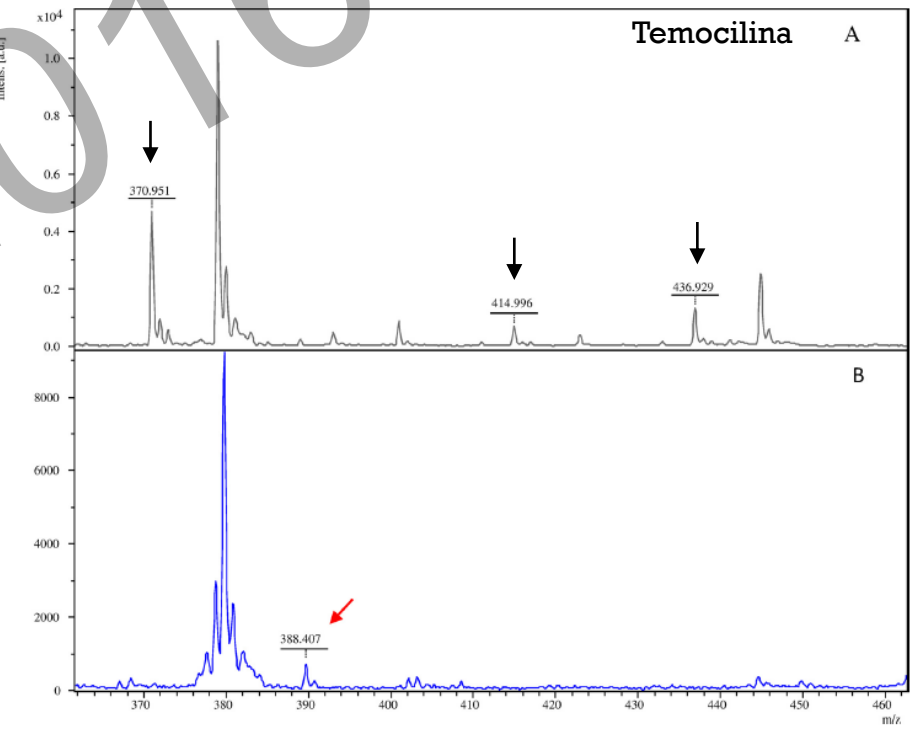
Rapid Detection of OXA-48-Producing *Enterobacteriaceae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry

Marina Oviaño,[a] María José Barba,[a] Begoña Fernández,[a] Adriana Ortega,[b,c] Belén Aracil,[b,c] Jesús Oteo,[b,c] José Campos,[b,c] Germán Bou[a,c]

Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, La Coruña, Spain[a]; Laboratorio de Antibióticos, Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain[b]; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Madrid, Spain[c]

SEIMC 2016

- Se emplearon 161 *Enterobacteriaceae*.
- Se utilizó ertapenem y como inhibidores DPA Y PBA para detectar y clasificar carbapenemasas.
- Se introdujo el análisis estructural de la temocilina como un marcador de resistencia de carbapenemasas de grupo D, por falta de inhibidor específico.
- El ensayo tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 93% en la detección de productores de OXA-48 para un test de 60 min con ertapenem y 15 min con temocilina.



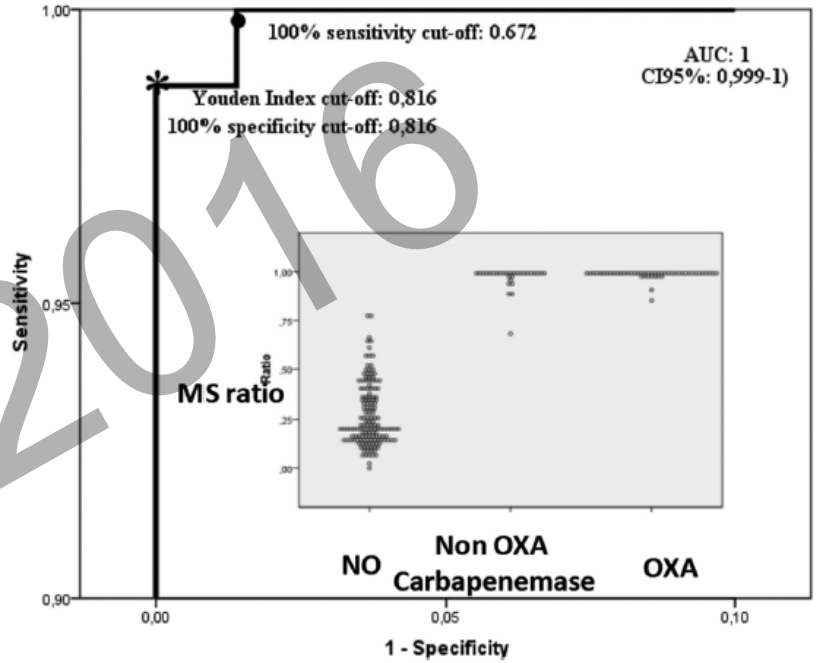
Detección de la actividad β-lactamasa

JCM
Journals.ASM.org

Efficient Detection of Carbapenemase Activity in *Enterobacteriaceae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes

Camille Lasserre,[a] Luc De Saint Martin,[b] Gaelle Cuzon,[c] Pierre Bogaerts,[d] Estelle Lamar,[a] Youri Glupczynski,[d] Thierry Naas,[c] Didier Tandé[a]

Service de Bactériologie, CHU La Cavale Blanche, Brest, France[a]; Service de Médecine Interne, CHU La Cavale Blanche, Brest, France[b]; Service de Bactériologie, APHP, LabEx LERMIT, University of Paris-Sud, Orsay, France [c]; Laboratoire de Bactériologie, CHU Dinant-Godinne UCL Namur, Yvoir, Belgium[d]



SEIMC 2016

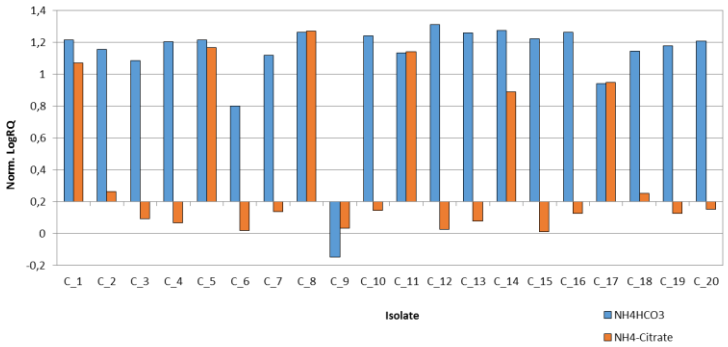
- Se estudiaron 223 *Enterobacteriaceae* (77 CPE y 146 no-CPE).
- Se utiliza el imipenem como marcador de resistencia y una incubación de 30 min.
- Se estudia el ratio de hidrólisis con un programa manual.
- Se establece un cut-off de 0.82 para separar aislados productores de carbapenemasa y no productores.
- Se obtiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 100%.

Detección de la actividad β-lactamasa

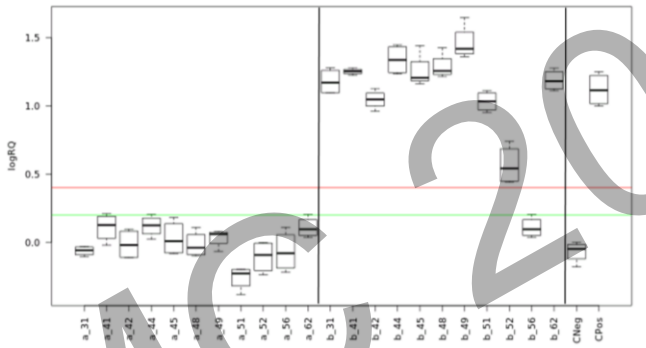
Novel automated method for the rapid detection of carbapenem resistant bacteria directly from blood cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Marina Oviaño[1], Katrin Sparbier[2], Maria José Barba[1], Markus Kostrzewa[2], and Germán Bou[1]

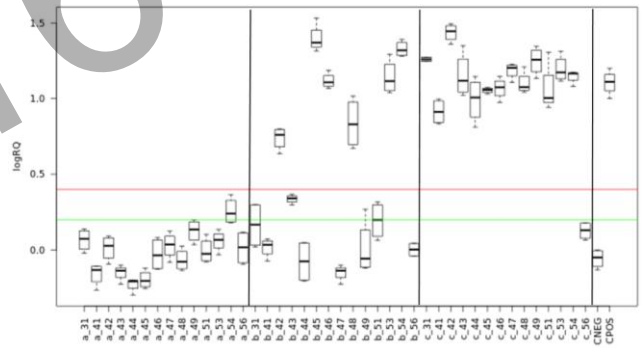
ECCMID P0954



Buffer de reacción



Influencia del SDS



Influencia del reactivo de lisis del Sepsityper Kit en la extracción del hemocultivo

SEIMC 2016

- Se estudian 119 hemocultivos, con 81 aislados productores de carbapenemasas entre *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.
- Se utiliza el imipenem como marcador de la resistencia y un tiempo de incubación de 30 min.
- Misma metodología para todos los aislados bacterianos.
- Se observa una clara influencia en la reactividad en función del buffer de reacción, de la presencia de SDS y de la cantidad de reactivo de lisis (Sepsityper Kit) utilizado en la extracción.
- Se utilizan 2 sistemas automatizados para la interpretación de espectros: Prototype Software and Compass Software (Bruker Daltonik).
- La sensibilidad del método es de un 98% con una especificidad del 100%.

Detección de la actividad β-lactamasa

Imipenem and avibactam as a combination for the rapid detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

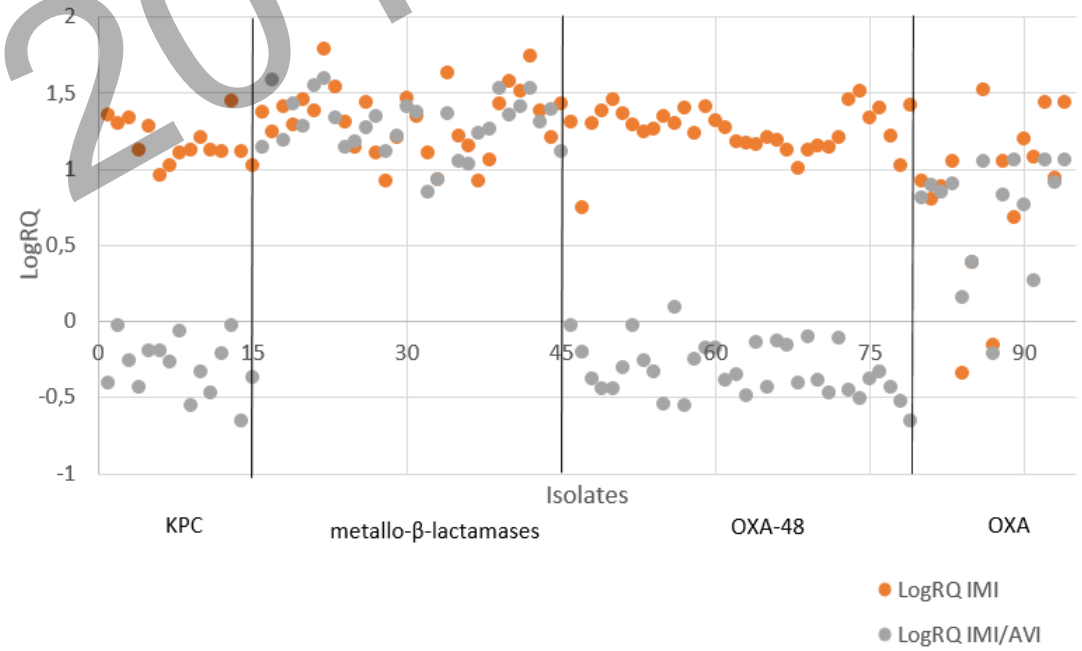
Marina Oviaño[1] and Germán Bou[1]

inibic Instituto de Investigación biomédica de A Coruña

SERVIZO GALEGO de SAÚDE | Xerencia Xestión Integrada A Coruña

SEIMC 2016

- Se estudió la actividad carbapenemasa de 115 *Enterobacteriaceae* y 16 *Acinetobacter baumannii*.
- El imipenem fue el marcador de la resistencia, obteniéndose una sensibilidad y especificidad del 98 y 100% respectivamente.
- El avibactam se utilizó para detectar enzimas de tipo KPC y OXA-48 con una sensibilidad y especificidad del 100%.
- El avibactam no muestra actividad sobre metalo-β-lactamasas ni sobre *A. baumannii.*
- Software automatizado Prototype software (Bruker Daltonik) en 30 min.



SEIMC SP-16; POSTER 557

Detección de la resistencia a través del efecto que ejerce el antibiótico en el crecimiento de la bacteria

Perfil de resistencia cuantitativo

SEIMC 2016

JCM
Journals.ASM.org

Quantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Resistance Detection

Christoph Lange,[a] Sören Schubert,[b] Jette Jung,[b] Markus Kostrzewa,[a] Katrin Sparbier[a]
Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany[a]; Max von Pettenkofer-Institut, Munich, Germany[b]

- Se compara el crecimiento relativo, a través de un estándar interno, de los aislados en ausencia y presencia de 8 µg/ml de meropenem.
- El tiempo de incubación es de 1 hora.
- La sensibilidad y la especificidad fueron de 97.3% y 93.5% respectivamente.

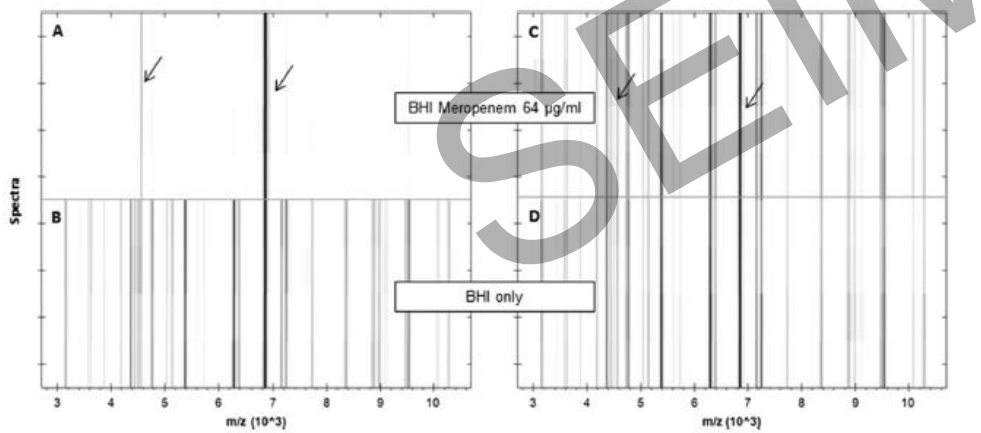


FIG 1 Pseudogel views of the mass range between 3 and 10 kDa of a susceptible (A, B) and a resistant (C, D) *K. pneumoniae* strain after incubation in the absence (lower panels) or presence (upper panels) of meropenem (64 µg/ml) for 1 h. For each incubation, four spectra acquired from two different spots are shown. Internal standard peaks are marked by arrows.

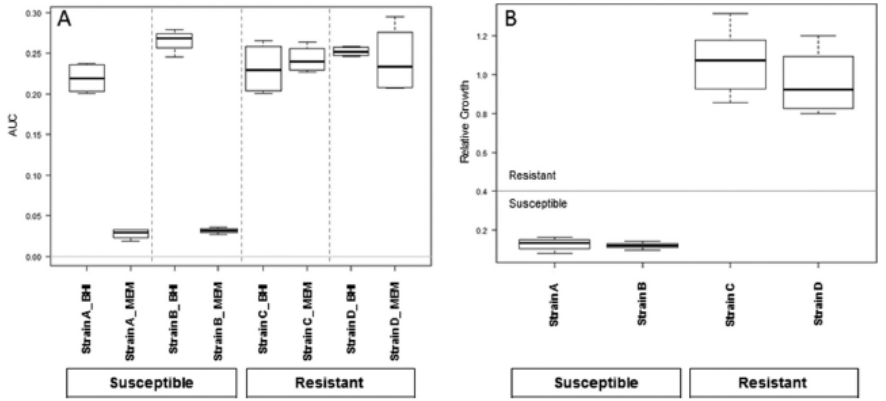


FIG 2 Box plots of the results of the automated evaluation. (A) AUC values obtained for four selected *K. pneumoniae* strains in the absence or presence of meropenem (64 µg/ml) for 1 h. Results were obtained from four spectra from two separate spots. Susceptible strains show a clear reduction of AUC 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. The horizontal line indicates the susceptibility/resistance threshold, the medians are indicated by bold lines, the minima and maxima are indicated by whiskers, and the 25th and 75th percentiles are indicated by boxes.

Detección de la resistencia a través del efecto que ejerce el antibiótico en el crecimiento de la bacteria

Perfil de resistencia en levaduras

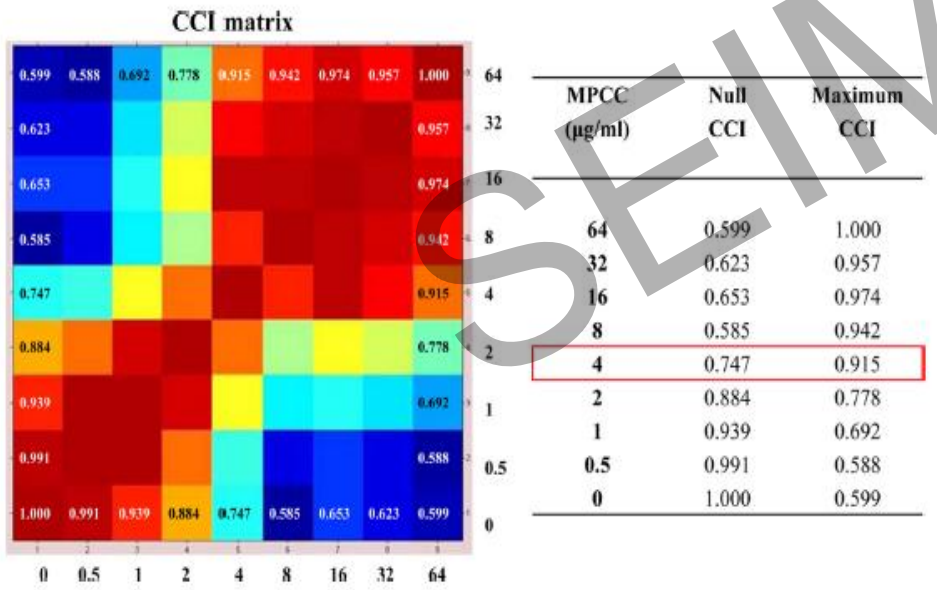
SEIMC 2016

JCM
Journals.ASM.org

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

Elena De Carolis,[a] Antonietta Vella,[a] Ada R. Florio,[a] Patrizia Posteraro,[b] David S. Perlin,[c] Maurizio Sanguinetti,[a] and Brunella Posteraro[d]

Institute of Microbiology[a] and Institute of Hygiene,[d] Universita Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy; Clinical Laboratory, Ospedale San Carlo, Rome, Italy[b]; and Public Health Research Institute, New Jersey Medical School, UMDNJ, Newark, New Jersey, USA[c]



MPCC (µg/ml)	Null CCI	Maximum CCI
64	0.599	1.000
32	0.623	0.957
16	0.653	0.974
8	0.585	0.942
4	0.747	0.915
2	0.884	0.778
1	0.939	0.692
0.5	0.991	0.588
0	1.000	0.599

- Susceptibilidad de *Candida* y *Aspergillus sp.* a caspofungina.
- El tiempo de incubación fue de 15 h.
- Analisis de resultados: Composite Correlation Index (CCI, Bruker Daltonik GmbH, Germany).
- CCI matriz: cada espectro obtenido se compara con las concentraciones máxima y mínima.
- Los valores de CCI van desde 0 indicando que los espectros son totalmente diferentes hasta 1 que indicaría la máxima similitud.
- Se determinó la MPCC (minimal profile change concentration) y se comparó con la CMI (94, 1 % de acuerdo)

Detección de la resistencia a través del perfil proteico bacterian

Detección de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina

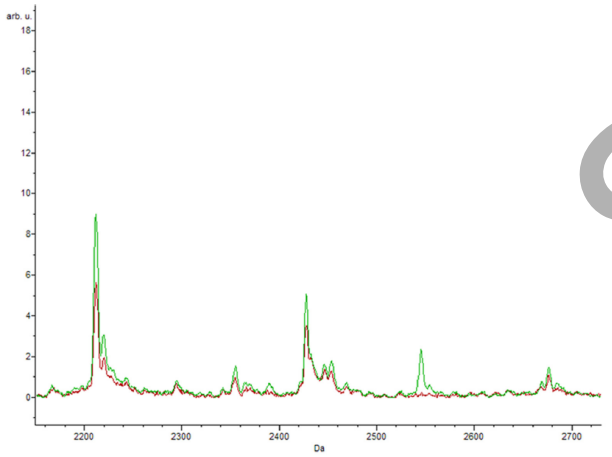
JCM
Journals.ASM.org

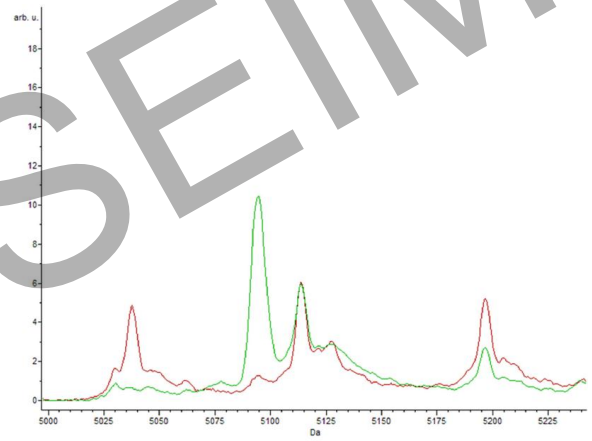
Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry To Identify Vancomycin-Resistant Enterococci and Investigate the Epidemiology of an Outbreak

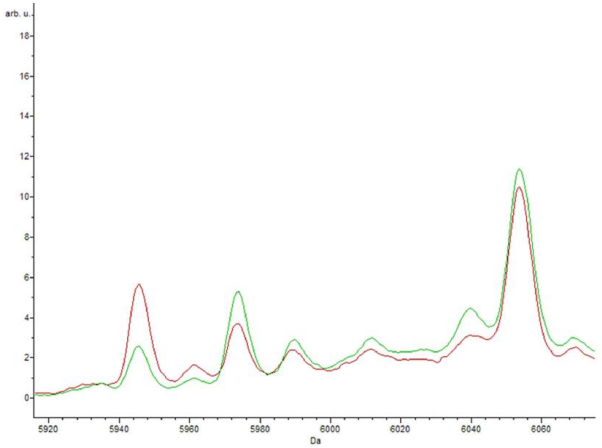
Paul M. Griffin,[a] Gareth R. Price,[b] Jacqueline M. Schooneveldt,[a] Sanmarié Schlebusch,[a] Martyn H. Tilse,[a] Tess Urbanski,[a] Brett Hamilton,[b] and Deon Venter[a,b]
Microbiology Division, Mater Pathology, Brisbane, Australia,[a] and Omics Laboratory, Mater Pathology, Brisbane, Australia[b]

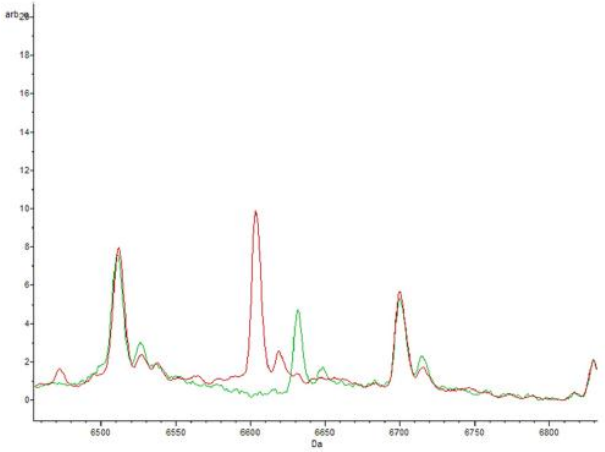
- Identifica *E. faecium* portador del gen vanB, después de una extracción.
- Los datos son analizados por ClinProTools y se generó un algoritmo de identificación.
- La sensibilidad es de 92.4% y la especificidad de 85.2%.

SEIMC 2016









Detección de la resistencia a través del perfil proteico bacterian

Detección de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Short Communication

Differentiation of *vanA*-positive *Enterococcus faecium* from *vanA*-negative *E. faecium* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry

Satoshi Nakano[a], Yasufumi Matsumura[a,*], Karin Kato[a], Tomoyuki Yunoki[a], Go Hotta[a], Taro Noguchi[a], Masaki Yamamoto[a], Miki Nagao[a], Yutaka Ito[b], Shunji Takakura[a], Satoshi Ichiyama[a]

[a] Department of Clinical Laboratory Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, 54 Shogoin-Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan
[b] Department of Respiratory Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

- Identifica *E. faecium* portador del gen vanA.
- Los datos son analizados por el software ClinProTools (Bruker Daltonik) y se generó un algoritmo de identificación, seleccionando 5 picos de masas de interés.
- La sensibilidad es >90%

SEIMC 2016

Table 2
ClinProTools peak statistics using genetic algorithm for the five peaks of interest.

Index	Mass (*m*/*z*)	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	SD1	SD2	CV1	CV2
41	3183.52	4.61	<0.000001	0	0.0000284	8.72	4.11	2.02	1.52	23.22	37.03
112	5702.18	2.4	<0.000001	0	<0.000001	3.13	0.73	1.19	0.73	37.84	99.79
153	7414.6	2.09	<0.000001	<0.000001	<0.000001	1.9	3.98	0.64	1.42	33.75	35.54
155	7444.88	1.9	<0.000001	<0.000001	0.00000911	1.12	3.03	0.56	1.06	49.49	34.9
213	12 661.72	0.68	<0.000001	<0.000001	<0.000001	0.39	1.07	0.26	0.74	65.71	69.14

Index, peak index or isolate number; mass, *m*/*z* value; DAve, difference between the maximum and minimum average peak area/intensity of all classes; PTTA, *P*-value of *t*-test; PWKW, *P*-value of Wilcoxon (preferable for non-normally distributed data); PAD, *P*-value of Anderson–Darling test, which provides information about normal distributions (range 0–1; 0, non-normally distributed; 1, normally distributed); Ave1 and Ave2, peak area/intensity average of class 1 [*vanA*-positive *Enterococcus faecium* (VPEF)] and class 2 [*vanA*-negative *E. faecium* (VNEF)], respectively; SD1 and SD2, standard deviation of the peak area/intensity average of class 1 (VPEF) and class 2 (VNEF), respectively; CV1 and CV2, coefficient of variation (in percent) of class 1 (VPEF) and class 2 (VNEF), respectively.

Detección de la resistencia a través del perfil proteico bacterian

Detección de *Bacteroides fragilis* portador del gen *cfi*A

SEIMC 2016

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2011, p. 1961–1964 Vol. 49, No. 5
0095-1137/11/$12.00 doi:10.1128/JCM.02321-10
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Differentiation of *cfiA*-Negative and *cfiA*-Positive *Bacteroides fragilis* Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry▽

Ingrid Wybo,* Annelies De Bel, Oriane Soetens, Fedoua Echahidi, Kristof Vandoorslaer, Marina Van Cauwenbergh, and Denis Piérard

Department of Microbiology and Infection Control, Universitair Ziekenhuis Brussel, Vrije Universiteit Brussel (VUB), Laarbeeklaan 101, 1090 Brussels, Belgium

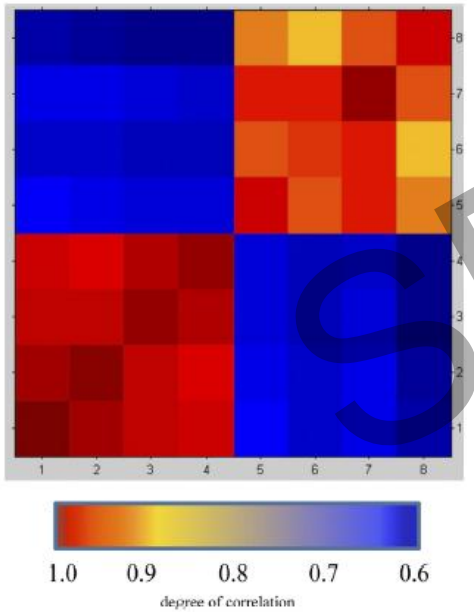


FIG. 1. The composite correlation index (CCI) values betv
A-positive (1 to 4) and *cfiA*-negative (5 to 8) isolates were hi
an CCI values if *cfiA*-positive isolates were compared with
gative isolates.

Journal of Medical Microbiology (2011), **60**, 1584–1590 DOI 10.1099/jmm.0.031336-0

Differentiation of division I (*cfiA*-negative) and division II (*cfiA*-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

Elisabeth Nagy,[1] Simone Becker,[2] József Sóki,[1] Edit Urbán[1] and Markus Kostrzewa[2]

Correspondence
Elisabeth Nagy
nagye@mlab.szote.u-szeged.hu

[1]Hungarian Anaerobe Reference Laboratory, Institute of Clinical Microbiology, University of Szeged, Hungary
[2]Bruker Daltoniks GmbH, Bremen, Germany

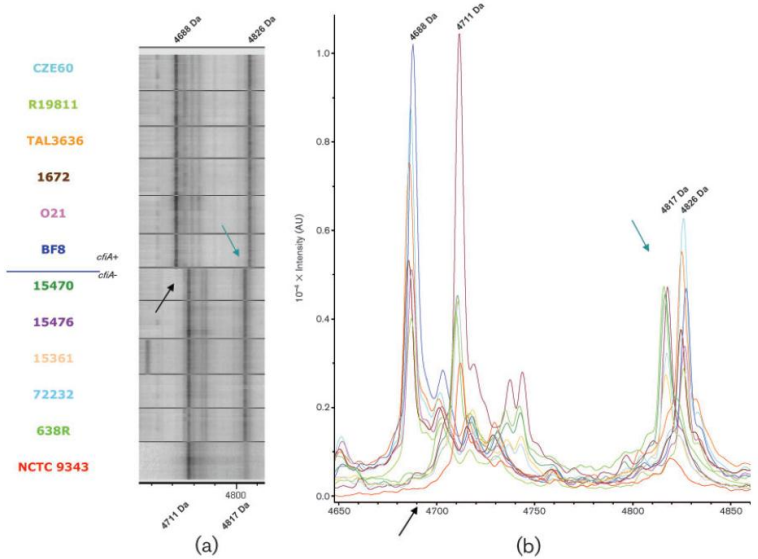


Fig. 2. Example of the clear differences in the MS peaks in the interval 4650–4850 Da between the *cfiA*-positive and -negative strains. (a) Visualized by the gel/stack view. (b) Visualized by the mass spectra. Peaks are shifted from 4711 Da and 4817 Da (*cfiA*-negative) to 4688 Da and 4826 Da (*cfiA*-positive), respectively.

Detección de la resistencia a través del perfil proteico bacterian

Detección de β-lactamasas

Anal Bioanal Chem (2007) 389:1633–1638
DOI 10.1007/s00216-007-1558-7

TECHNICAL NOTE

Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

Johanna E. Camara · Faith A. Hays

- Se identificó una proteína a 29KDa sugestiva de resistencia a ampicilina, que no presentaban los aislados sensibles.

AAC
Journals.ASM.org

Identification of CMY-2-Type Cephalosporinases in Clinical Isolates *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS

C. C. Papagiannitsis,[a] S. D. Kotsakis,[b] Z. Tuma,[c] M. Gniadkowski,[d] V. Miriagou,[b] J. Hrabak[a]

Department of Microbiology, Faculty of Medicine and University Hospital in Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic[a]; Laboratory of Bacteriology, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece[b]; Proteomic Laboratory, Charles University Medical School, Plzen, Czech Republic[c]; National Medicines Institute, Warsaw, Poland[d]

- Se identificó una proteína a 39KDa en extractos proteicos de aislados portadores de enzimas de tipo CMY-2.

© Med Sci Monit, 2012; 18(9): MT71-77
PMID: 22936198

WWW.MEDSCIMONIT.COM
Diagnostics and Medical Technology

Received: 2012.03.04
Accepted: 2012.06.21
Published: 2012.09.01

A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry

Authors' Contribution:
A Study Design
B Data Collection
C Statistical Analysis
D Data Interpretation
E Manuscript Preparation
F Literature Search
G Funds Collection

Reiner Schaumann*[1 ABDEFG], Nicolas Knoop*[1 ABDEF], Gelimer H. Genzel[1 EF], Kevin Losensky[1 B], Christiane Rosenkranz[1 B], Catalina S. Stingu[1 B], Wolfgang Schellenberger[2 CD], Arne C. Rodloff[1 AEG], Klaus Eschrich[2 BCDEFG]

* Both authors contributed equally to this work

[1] Institute for Medical Microbiology and Epidemiology of Infectious Diseases, University of Leipzig, Leipzig, Germany
[2] Institute of Biochemistry, School of Medicine, University of Leipzig, Leipzig, Germany

Source of support: Departmental sources

- No pudieron diferenciar de manera fiable aislamientos de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* productores y no productores de β-lactamasas .

¿Reproducibilidad?

SEIMC 2016

Detección de la resistencia a través del perfil proteico bacterian

Detección de *MRSA*

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijmm

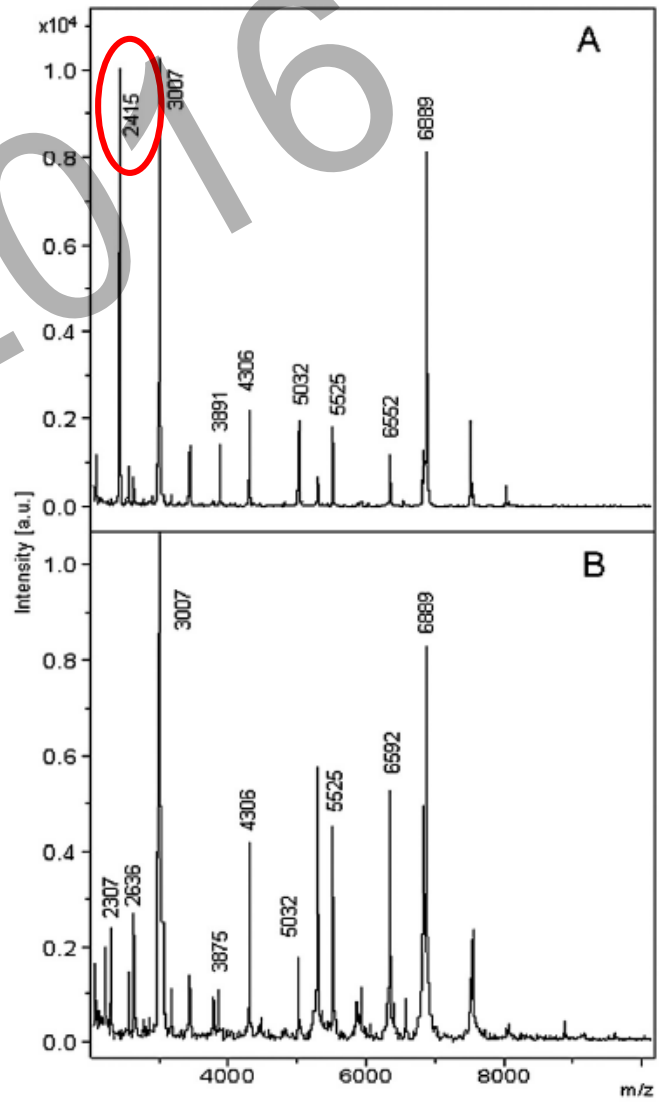
Identification of *agr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A *mec* complex by MALDI-TOF mass spectrometry

Michaele Josten, Jasmin Dischinger, Christiane Szekat, Marion Reif, Nahed Al-Sabti, Hans-Georg Sahl, Marijo Parcina, Isabelle Bekeredjian-Ding, Gabriele Bierbaum*

Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology, University Clinic of Bonn, D-53105 Bonn, Germany

SEIMC 2016

- Identificación de *agr*-positive MRSA que contienen el gen *mec A* .
- La masa de 2415 Da corresponde al péptido phenol-soluble modulin (PSM) PSM-mec que está codificado en tres cassettes SCCmec (tipos II, III and VIII).
- No debe hacerse extracción previa.
- Sensibilidad del 95% y 100% para MRSA *agr*-positive.



Detección de porinas

JCM
Journals.ASM.org

LETTER TO THE EDITOR

Detection of OmpK36 Porin Loss in *Klebsiella* spp. by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry

Jia Chang Cai
Yan Yan Hu
Rong Zhang
Hong Wei Zhou
Gong-Xiang Chen
Second Affiliated Hospital of Zhejiang University
Zhejiang University
Hangzhou, People's Republic of China

frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 04 August 2015
doi: 10.3389/fmicb.2015.00784

Rapid detection of porins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry

*Yan-Yan Hu, Jia-Chang Cai, Hong-Wei Zhou, Rong Zhang and Gong-Xiang Chen**

Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Zhejiang University, Hangzhou, China

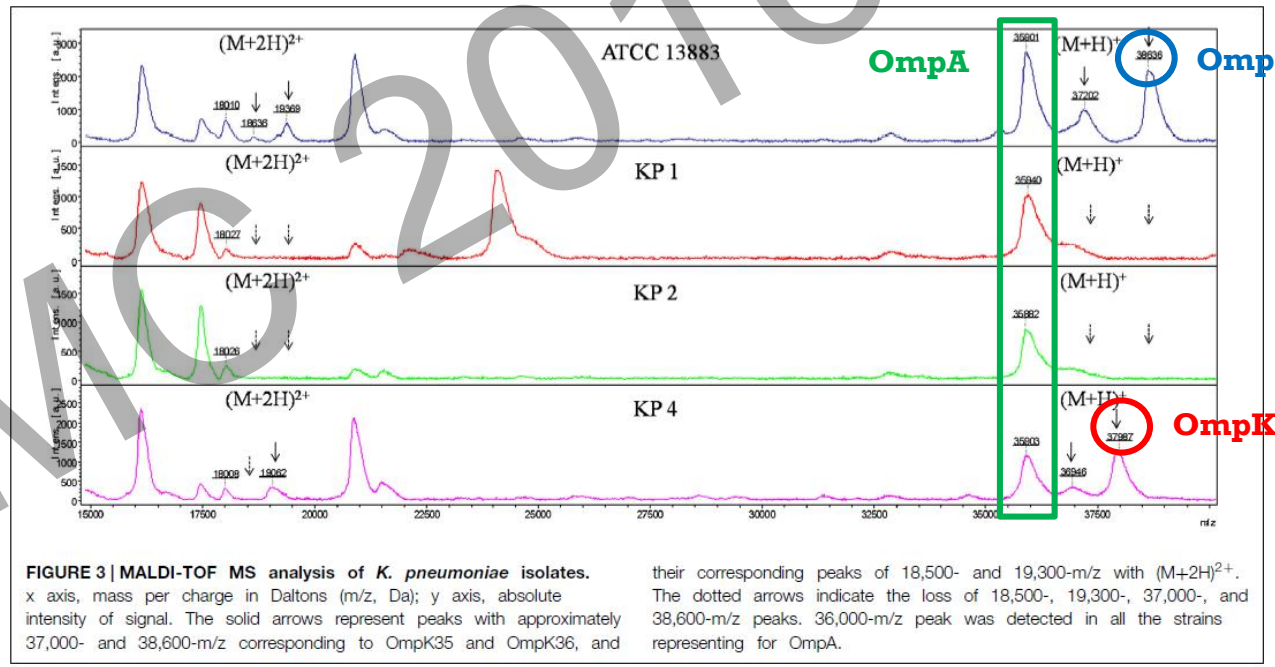


FIGURE 3 | MALDI-TOF MS analysis of *K. pneumoniae* isolates. x axis, mass per charge in Daltons (m/z, Da); y axis, absolute intensity of signal. The solid arrows represent peaks with approximately 37,000- and 38,600-m/z corresponding to OmpK35 and OmpK36, and their corresponding peaks of 18,500- and 19,300-m/z with $(M+2H)^{2+}$. The dotted arrows indicate the loss of 18,500-, 19,300-, 37,000-, and 38,600-m/z peaks. 36,000-m/z peak was detected in all the strains representing for OmpA.

SEIMC 2016

Impacto clínico y retos futuros

¿Qué ventajas ofrece el MALDI-TOF?

- Rapidez.
  - ✓ B-lactámicos: 30 min.
  - ✓ Perfiles de resistencia cuantitativos: 3 h
  - ✓ Perfiles proteicos, porinas: minutos
- Barato.
  - ✓ 0.3 € por determinación.
  - ✓ (Aunque requiere el gasto inicial en la tecnología)
- Sencillez en la metodología.
  - ✓ Mismo equipo que se utiliza para identificar.
  - ✓ Pocos paso a seguir: preparación del antibiótico, incubación, centrifugación, aplicación en la tarjeta y lectura.

SEIMC 2016

Impacto clínico y retos futuros

¿Qué ventajas ofrece el MALDI-TOF?

- Sensibilidad y especificidad: Identificación de **OXA-48**.

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Note

MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay

Patrick M. Chong [a], Stuart J. McCorrister [a], Mark S. Unger [a], David A. Boyd [b], Michael R. Mulvey [b], Garrett R. Westmacott [a,*]

[a] Mass Spectrometry and Proteomics Core, National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba R3E 3R2, Canada
[b] Antimicrobial Resistance and Nosocomial Infections, National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada, 1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba R3E 3R2, Canada

- Se comparó la actividad carbapenemasa con el Carba-NP test y el MALDI-TOF.
- El MALDI-TOF detectó el 99% de las carbapenemasas.
- El Carba-NP test el 85%, con los peores resultados para los aislados de tipo OXA y GES.

- La sensibilidad y el valor predictivo negativo del Carba NP test es de 80 y 73% respectivamente.
- Los falsos negativos se encontraton en cepas mucoides y portadoras de OXA-48.
- Para aislados portadores de OXA-48 los resultados fueron falsos negativos en un 41 % (16/39)

AAC Journals.ASM.org

Evaluation of the Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*

Nathalie Tijet,[a] David Boyd,[b] Samir N. Patel,[a] Michael R. Mulvey,[b] Roberto G. Melano[a]

Public Health Ontario Laboratories, Toronto, Ontario, Canada[a]; National Microbiology Laboratory, Winnipeg, Manitoba, Canada[b]

SEIMC 2016

Impacto clínico y retos futuros

Limitaciones

1. **Si seguimos los cambios de masa del antibiótico:**
   Método rápido < 1h
   No permite detectar resistencias que no sean enzimáticas.
2. **Si detectamos la resistencia a través del efecto que ejerce el antibiótico sobre la bacteria:**
   Permite detectar "cualquier" tipo de resistencia.
   Método lento > 3h
3. **Si evaluamos la presencia en el perfil proteico de la bacteria de proteínas asociadas a resistencia.**
   - Queda mucho por avanzar. (Positivos para la detección de *Enterococcus sp*. resistentes a vancomicina y de*Bacteroides fragilis cfiA*-positive, pero aún inconsistentes para MRSA y β-lactámicos)

SEIMC 2016

Impacto clínico y retos futuros

Retos futuros

- Determinación de múltiples mecanismos de resistencia simultáneamente.
- Construcción de librería proteómica con determinantes de resistencia.
- Aplicabilidad de los ensayos en muestras clínicas directas.
- **Implementación en la rutina de los ensayos de resistencia de antibióticos β-lactámicos.**

SEIMC 2016

AUTOMATIZACIÓN

Impacto clínico y retos futuros

Impacto clínico

- **Implementación en la rutina de los ensayos de resistencia de antibióticos β-lactámicos.**

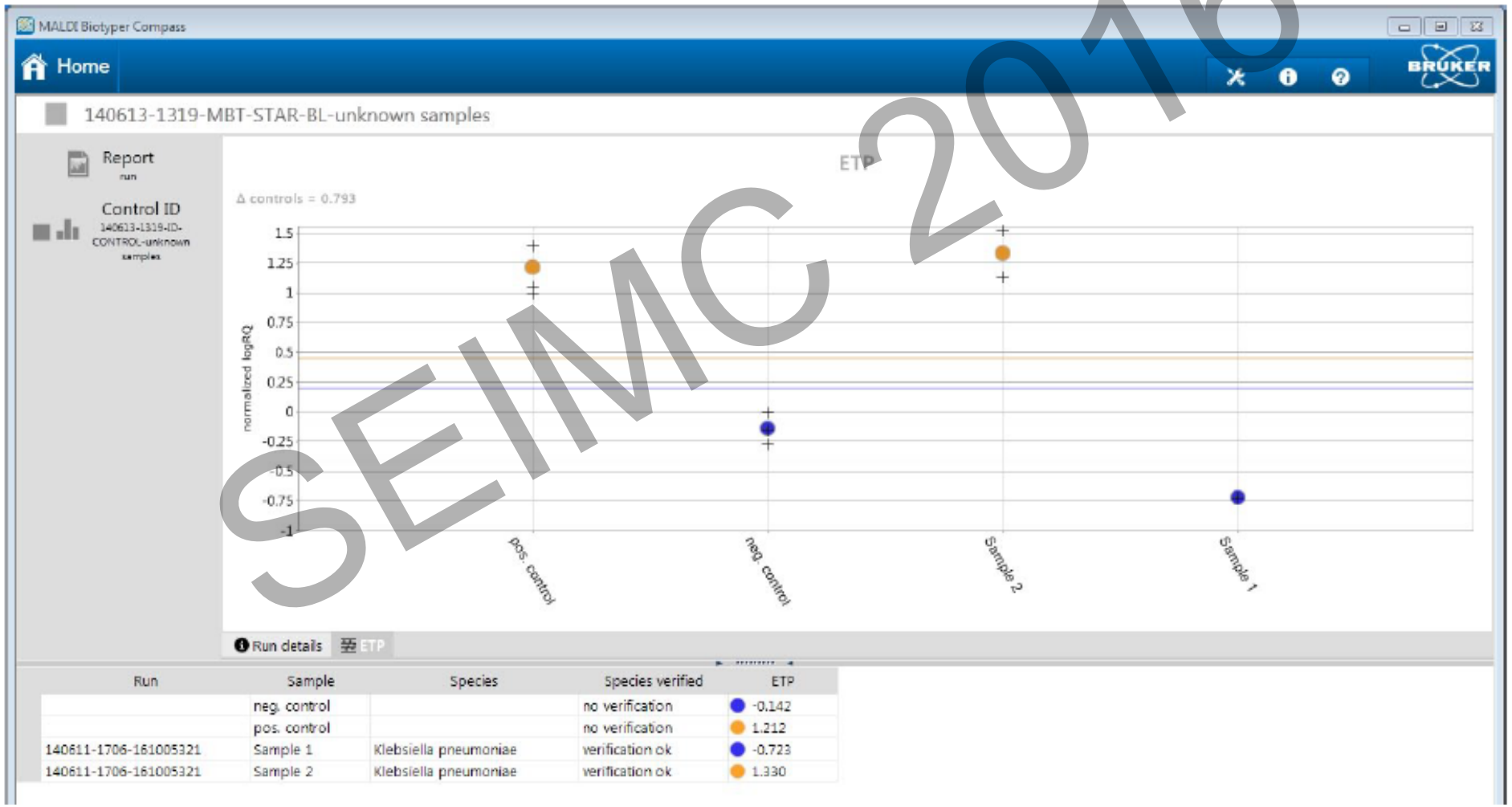
¿Por qué la automatización?

- Los espectros ya no tienen que ser interpretados, sino que un software automatizado lo hace.
- No necesitamos expertos en espectrometría de masas analizando resultados, un técnico de laboratorio puede realizar el ensayo.
- Nos proporciona el LogRQ o ratio de hidrólisis del antibiótico.
- Permite la identificación y determinación de resistencias en el mismo ensayo.
- Permite el procesamiento de múltiples muestras en <1 hora.

SEIMC 2016

Impacto clínico y retos futuros

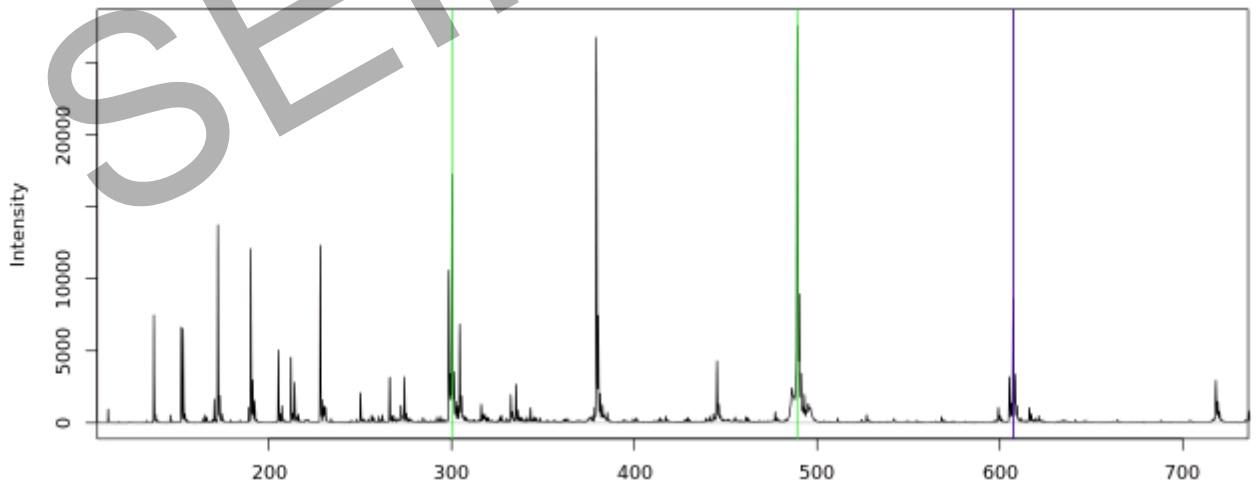
- **MBT STAR-BL Software**



SEIMC 2016

Impacto clínico y retos futuros

- **MBT STAR-BL Software**
  - La versión actual del Software sólo esta validada para su uso en investigación.
  - Permite la determinación de ampicilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, meropenem y ertapenem.
  - No permite la visualización de los espectros, ni obtención de los mismos en formato original.
  - Los controles tienen que tener un $\Lambda \geq 0.5$
  - Kit IMI: detección de carbapenemasas para uso clínico desde colonias en cultivo a hemocultivos directos. Contiene imipenem y una matriz con un estándar interno.



SEIMC 2016

¿Más información?

SEIMC 2016

CMR
Journals.ASM.org

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis

Jaroslav Hrabák, Eva Chudáčková, Radka Walková
Department of Microbiology, Faculty of Medicine and University Hospital in Plzeň, Charles University in Prague, Plzeň, Czech Republic

Proteomics Clin. Appl. 2013, *7*, 767–778 DOI 10.1002/prca.201300042 767

REVIEW

MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms

Markus Kostrzewa[1], *Katrin Sparbier*[1], *Thomas Maier*[1] *and Sören Schubert*[2]

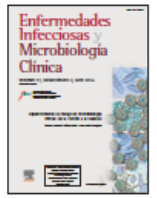
[1] Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany
[2] Max von Pettenkofer-Institute, Munich, Germany

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34(Supl 2):36-41

ELSEVIER

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Detección rápida de resistencias antimicrobianas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Marina Oviaño[a], María Dolores Rojo[b], José María Navarro Marí[b] y Germán Bou[a,*]

[a]*Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, España*
[b]*Complejo Hospitalario Universitario de Granada, Granada, España*