

# Påvisning av resistensmekanismer ved hjelp av MALDI-TOF massespektrometri

André Ingebretsen

Avd. for smittevern og Avd. for mikrobiologi

Oslo Universitetssykehus

# MALDI-TOF MS



# Etablering av MALDI-TOF MS metodikk ved Oslo universitetssykehus

- 2008
  - Pilotstudie på FUGE plattform for MS (Ultraflex I)
- 2009
  - Uplassering, validering og kjøp av system nr.1 på bakteriologisk lab (Maldi Biotyper)
- 2010
  - Akkreditering av metoden for bruk i klinisk mikrobiologi
  - Systemet inn som OUS-RH primære ID metode
  - Medlem internasjonalt *Mycobacterium* consortium.
  - Samarbeid med FHI på høypatogene agens.
- 2011
  - Opplæring i databasebygging ved Bruker Daltonik i Bremen, Tyskland
  - Utplassering, validering og kjøp av system nr.2 (Maldi Biotyper)
  - Databaseoppbygging /deling

# Studier og prosjekter ved Oslo universitetssykehus RH

## Avsluttede 2009

- Anaerob ID sammenligningsstudie (ECCMID 2010)
- Positive BK direkte på MALDI TOF MS (Ikke publisert; studentoppgave)

## 2010

- Positive SPV direkte på MALDI TOF MS (ECCMID 2011)
- Direkte E-test og MALDI TOF MS identifikasjon (ECCMID 2011)

## 2011

- Etablering av ekstraksjonsprotokoll for mykobakterier (FEMS 2011)
- Utbygging av database for mykobakterier (ECCMID 2012)

## Pågående

Påvisning av resistensmekanismer hos bakterier og sopp

Rask algoritme for identifikasjon av *Mycobacterium* sp.

Subtyping av *Legionella pneumophila*.

Påvisning av mykotoksiner

Parasitt-prosjekt

# Massespektrometri

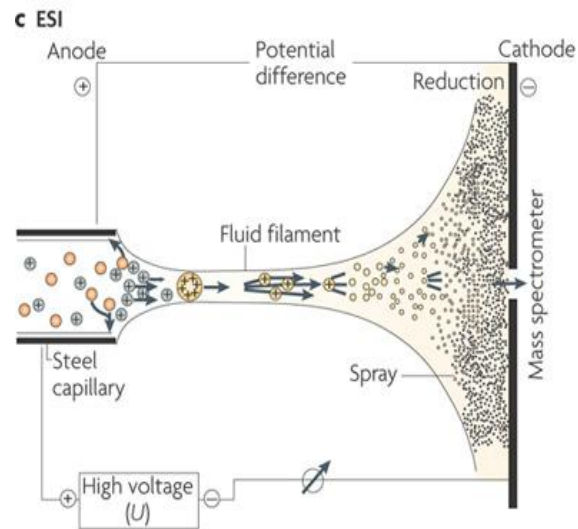
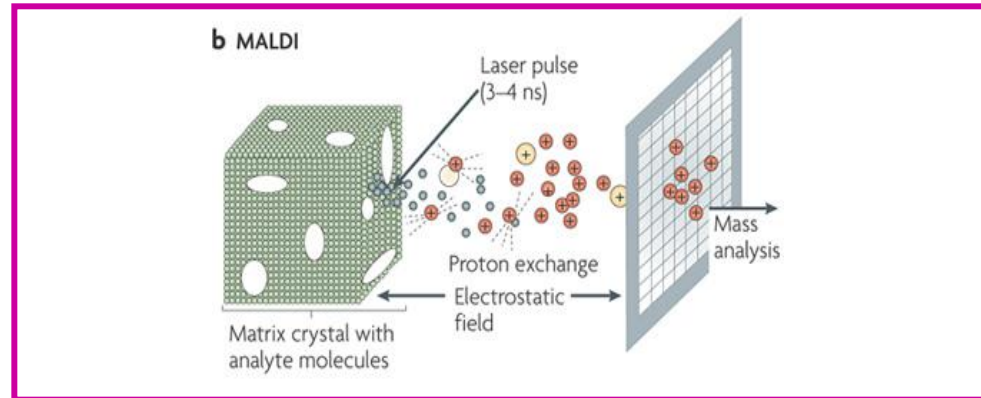
Massespektroni er en analyseteknikk der man kan, v.h.a. et massespektrometer, bestemme molekylmassen av frie ioner i et vakuum.



Electron impact (EI)  
Chemical ionization (CI)  
Fast atom bombardment (FAB)  
Electrospray ionization (ESI)  
Matrix assisted laser  
desorption/ionization (MALDI)

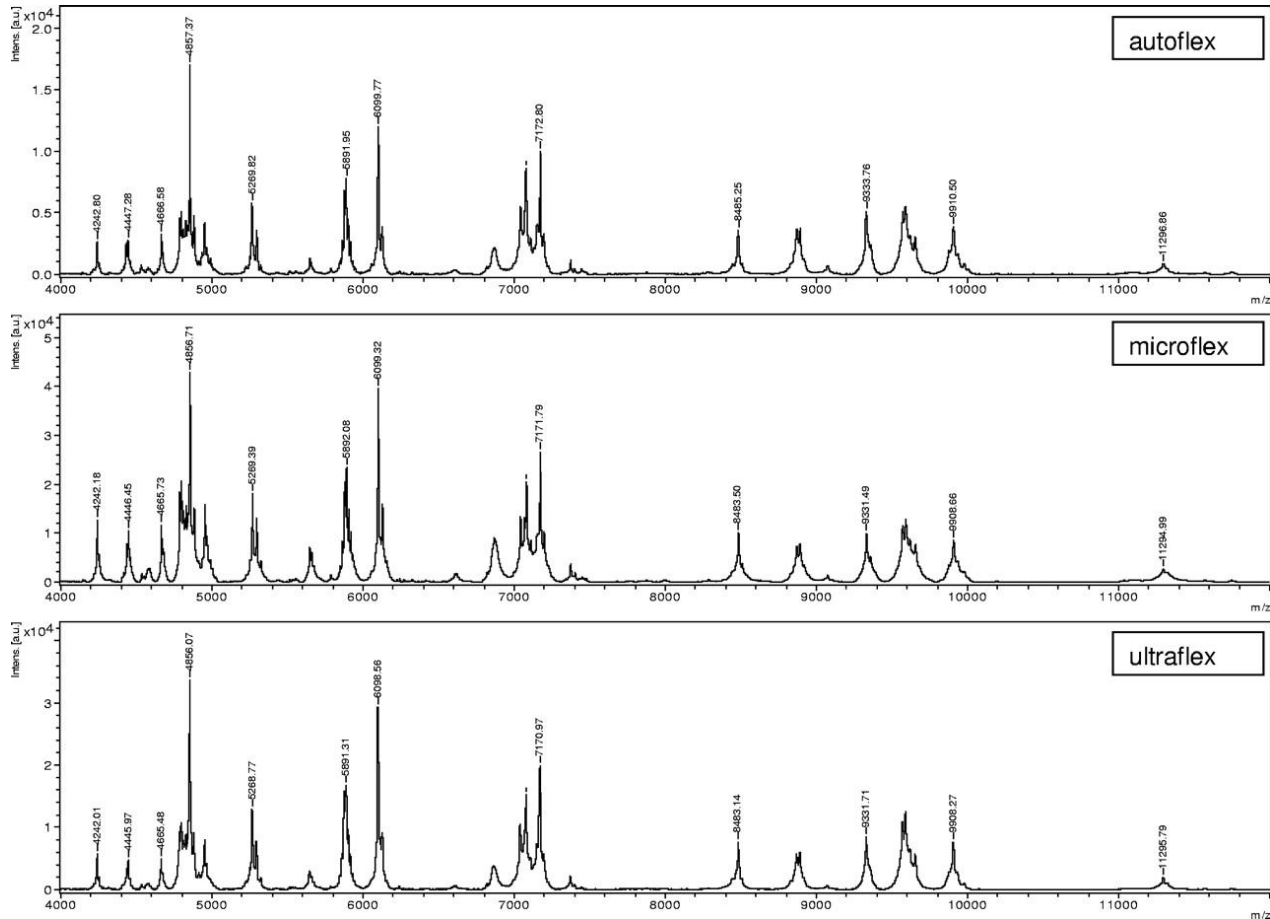
Quadrupol  
Magnetic sector  
Electric sector  
Ion trap  
ion cyclotron  
Time-of-flight

Faraday cup  
Secondary electron  
multiplier (SEM)  
Scintillator  
Micro channel plate  
(MCP)



Nature Reviews | Microbiology

# MALDI TOF MS

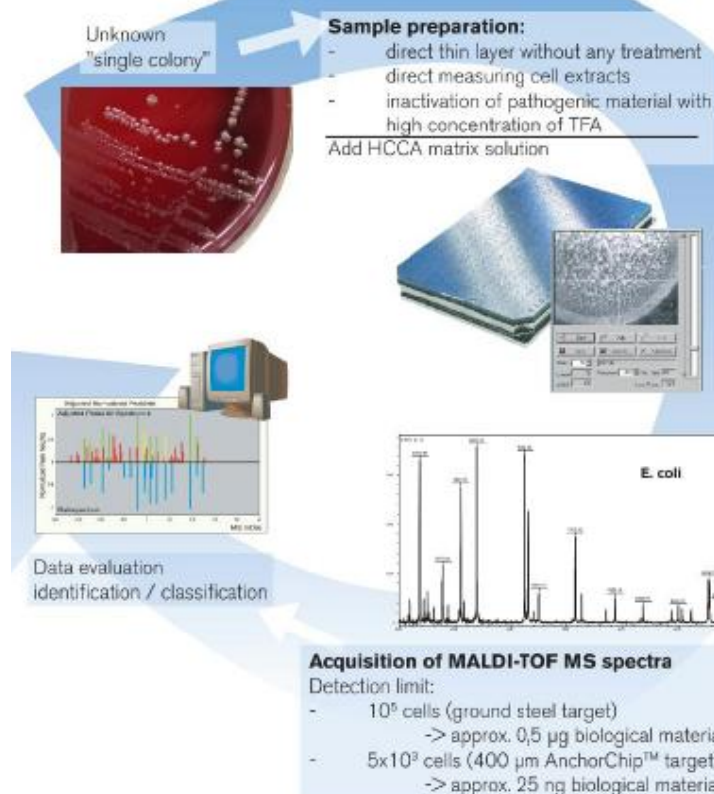


Mellmann, A. et al. 2008. *J. Clin. Microbiol.* 46(6):1946-1954

# MALDI TOF MS workflow

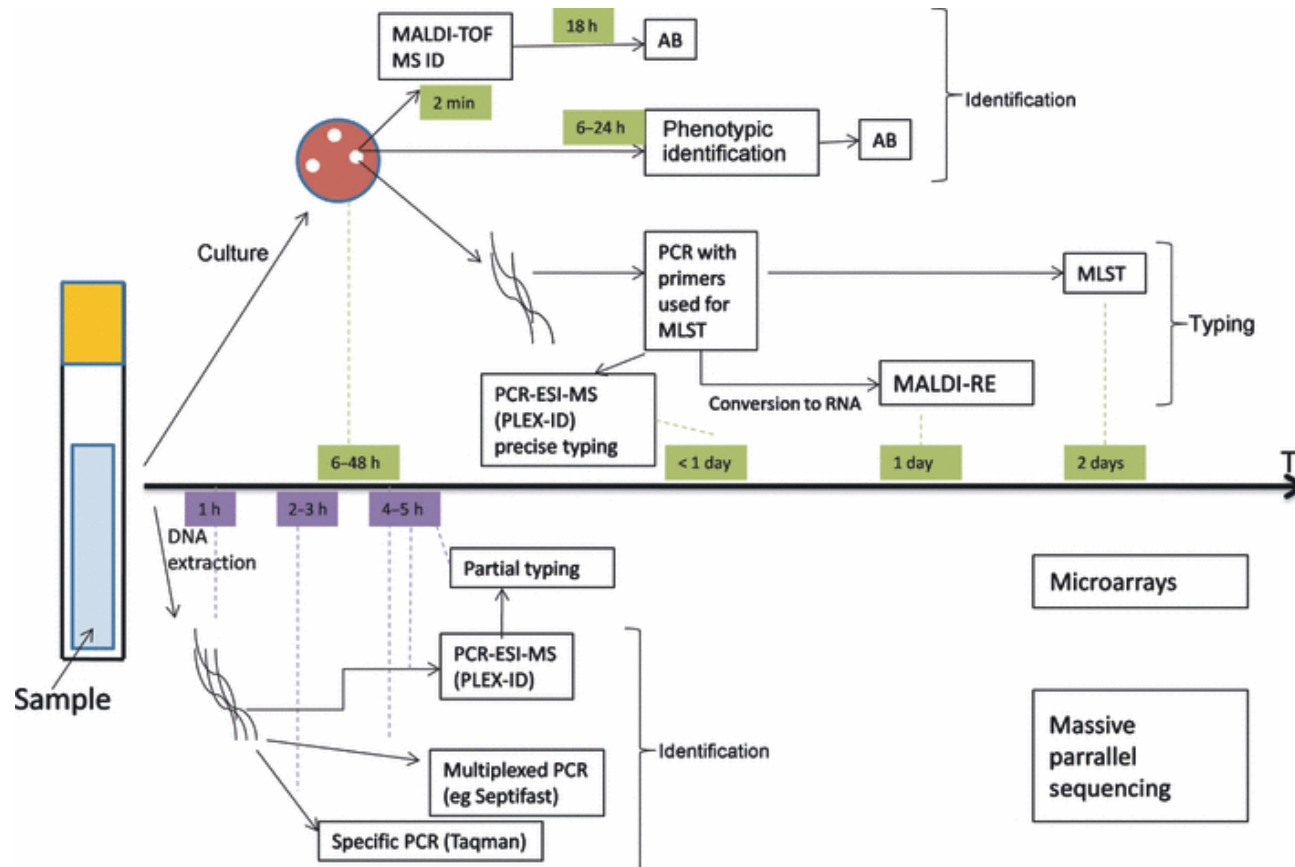
## MALDI Biotyper result report

| Analyte Name       | Organism (best match)     | Score Value | Organism (second best match) | Score Value |
|--------------------|---------------------------|-------------|------------------------------|-------------|
| <u>31</u><br>(+++) | Alcaligenes faecalis      | 2.855       | Alcaligenes faecalis         | 2.855       |
| <u>32</u><br>(+++) | Brevundimonas aurantiaca  | 1.69        | Brevundimonas vesicularis    | 1.74        |
| <u>33</u><br>(+++) | Brevundimonas diminuta    | 2.855       | Brevundimonas diminuta       | 2.855       |
| <u>34</u><br>(+++) | Brevundimonas intermedia  | 2.855       | Brevundimonas nasdae         | 1.85        |
| <u>35</u><br>(++)  | Brevundimonas vesicularis | 2.855       | Brevundimonas intermedia     | 1.805       |
| <u>36</u><br>(+++) | Burkholderia andropogonis | 2.855       | no reliable identification   | 1.381       |
| <u>37</u><br>(++)  | Burkholderia caribensis   | 2.855       | Burkholderia cepacia         | 1.74        |
| <u>38</u><br>(+++) | Comamonas nitrivorans     | 2.855       | no reliable identification   | 1.529       |
| <u>39</u><br>(+++) | Comamonas testosteroni    | 2.855       | Comamonas testosteroni       | 2.855       |
| <u>40</u><br>(+++) | Flavobacterium johnsoniae | 2.855       | Flavobacterium pectinovorum  | 1.764       |
| <u>41</u><br>(+++) | Sphingobacterium mizutaii | 2.855       | no reliable identification   | 1.381       |
| <u>42</u><br>(+++) | Inquilinus limosus        | 2.855       | no reliable identification   | 1.329       |
| <u>43</u><br>(+++) | Pseudomonas aeruginosa    | 2.855       | Pseudomonas aeruginosa       | 2.855       |
| <u>44</u><br>(+++) | Pseudomonas beteli        | 2.855       | Stenotrophomonas maltophilia | 2.775       |
| <u>45</u><br>(+++) | Pseudomonas boreopolis    | 2.855       | no reliable identification   | 1.581       |





# Massespektrometri i klinisk mikrobiologi



Emonet et al. *CMI* 2010.16;1604-13

# Deteksjon av resistens på MALDI-TOF MS

| Mikroorganisme                    | Antall prøver | AB-Resistens            | Påvisningsmetode | Instrument                              | Publiseringsår | Referanse                                           |
|-----------------------------------|---------------|-------------------------|------------------|-----------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Fungi</b>                      |               |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <i>Candida albicans</i>           | 17            | Flukonazol              | Fingerprinting   | Autoflex I (Bruker)                     | 2009           | Marinach C., et al. Proteomics 9: 4627 - 4631       |
| <i>Candida sp.</i>                | 34            | Caspofungin             | Fingerprinting   | Microflex LT (Bruker)                   | 2012           | de Carolis E., et al. JCM. doi:10.1128/JCM.00224-12 |
| <i>Aspergillus sp.</i>            | 10            |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <b>Bacteria</b>                   |               |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <i>Bacteroides fragilis</i>       | 145 + 38      | Imipenem                | Fingerprinting   | Microflex LT (Bruker)                   | 2011           | Nagy E., et al. JMM 60: 1584–1590                   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | 76            | Meticillin              | Fingerprinting   | N/A                                     | 2002           | Du, Z. et al. Anal Chem 74: 5487 - 5491             |
| <i>Enterobacteraceae</i>          | 77            | Ertapenem               | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2011           | Burckhardt I., S. Zimmermann. JCM 49: 3321 – 3324   |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     |               |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <i>Enterobacteraceae</i>          | 124           | Meropenem               | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2011           | Hrabák J., et al. JCM 49: 3222 – 3227.              |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     |               |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>    | 106           | Imipenem                | Hydrolysering    | Ultraflex I (Bruker)                    | 2012           | Kempf M., et al. PLoS One 7: e31676.                |
| <i>Enterobacteraceae</i>          | 145           | Meropenem               | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2012           | Hrabak J., et al. JCM doi:10.1128/JCM.01002-12      |
| <i>Escherichia coli</i>           | 3             | β-laktam                | Hydrolysering    | Ultraflex 3 (Bruker)<br>MALDI QqQ (ABI) | 2011           | Hooff G.P., et al. J Proteome Res. 11;79 - 84       |
| <i>Escherichia coli</i>           | 8             | β-laktam                | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2012           | Sparbier K., et al. JCM 50: 927 – 937               |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>      |               |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>   | 38            | Fluoroquin.             | Minisekvensering | N/A                                     | 2007           | Malakhova, M.V. et al. Antibiot Khimioter 52; 10-17 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 100           | Rifampicin<br>Isoniazid | Minisekvensering | Reflex IV (Bruker)                      | 2007           | Ikryannikova L.N., et al. JMM 70:395 - 405.         |

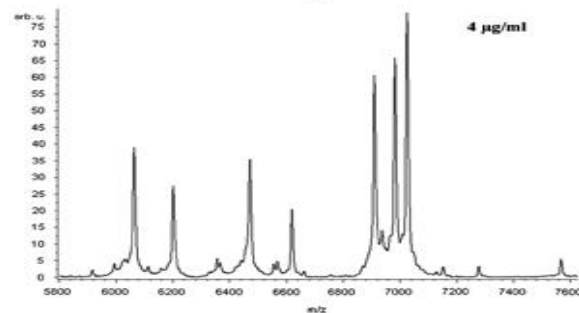
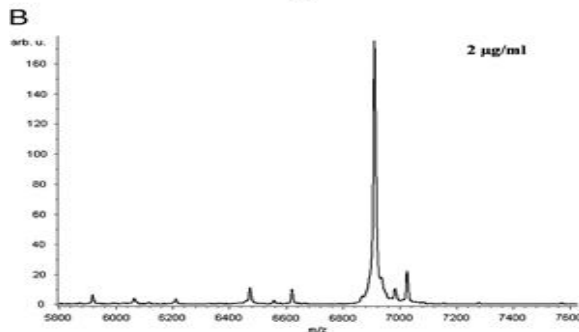
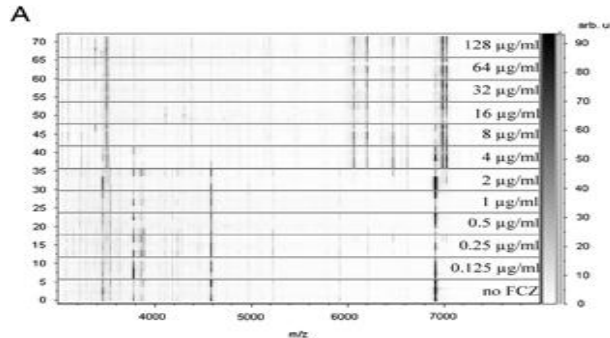
# Metode: "Fingerprinting"

- Resistente mikrober har et annet proteinuttrykk enn følsomme mikrober
- Sammenligner spektra R/S
- Leter etter markør-topper
- Stemmer overens med referansemetoder?

# Deteksjon av resistens på MALDI-TOF MS

| Mikroorganisme                                            | Antall prøver | AB-Resistens            | Påvisningsmetode | Instrument                              | Publiseringsår | Referanse                                           |
|-----------------------------------------------------------|---------------|-------------------------|------------------|-----------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Fungi</b>                                              |               |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <i>Candida albicans</i>                                   | 17            | Flukonazol              | Fingerprinting   | Autoflex I (Bruker)                     | 2009           | Marinach C., et al. Proteomics 9: 4627 - 4631       |
| <i>Candida sp.</i>                                        | 34            | Caspofungin             | Fingerprinting   | Microflex LT (Bruker)                   | 2012           | de Carolis E., et al. JCM. doi:10.1128/JCM.00224-12 |
| <i>Aspergillus sp.</i>                                    | 10            |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <b>Bacteria</b>                                           |               |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <i>Bacteroides fragilis</i>                               | 145 + 38      | Imipenem                | Fingerprinting   | Microflex LT (Bruker)                   | 2011           | Nagy E., et al. JMM 60: 1584–1590                   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                              | 76            | Meticillin              | Fingerprinting   | N/A                                     | 2002           | Du, Z. et al. Anal Chem 74: 5487 - 5491             |
| <i>Enterobacteraceae</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 77            | Ertapenem               | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2011           | Burckhardt I., S. Zimmermann. JCM 49: 3321 – 3324   |
| <i>Enterobacteraceae</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 124           | Meropenem               | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2011           | Hrabák J., et al. JCM 49: 3222 – 3227.              |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                            | 106           | Imipenem                | Hydrolysering    | Ultraflex I (Bruker)                    | 2012           | Kempf M., et al. PLoS One 7: e31676.                |
| <i>Enterobacteraceae</i>                                  | 145           | Meropenem               | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2012           | Hrabak J., et al. JCM doi:10.1128/JCM.01002-12      |
| <i>Escherichia coli</i>                                   | 3             | β-laktam                | Hydrolysering    | Ultraflex 3 (Bruker)<br>MALDI QqQ (ABI) | 2011           | Hooff G.P., et al. J Proteome Res. 11;79 - 84       |
| <i>Escherichia coli</i><br><i>Klebsiella pneumoniae</i>   | 8             | β-laktam                | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2012           | Sparbier K., et al. JCM 50: 927 – 937               |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>                           | 38            | Fluoroquin.             | Minisekvensering | N/A                                     | 2007           | Malakhova, M.V. et al. Antibiot Khimioter 52; 10-17 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                         | 100           | Rifampicin<br>Isoniazid | Minisekvensering | Reflex IV (Bruker)                      | 2007           | Ikryannikova L.N., et al. JMM 70:395 - 405.         |

# Påvisning av fluconazol resistens



- Standardiserte fingerprints
- MPCC = minimal profile change concentration
- Statistisk analyse

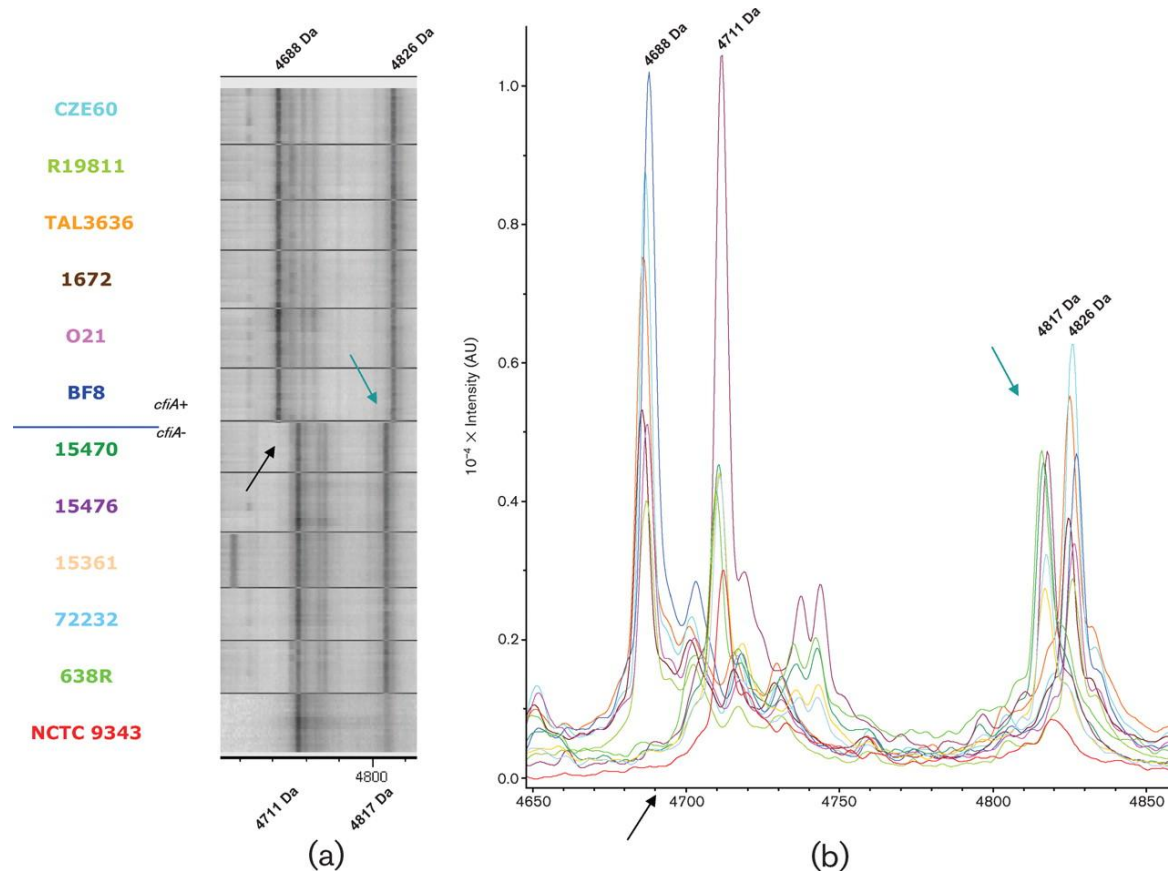
Marinach, C. et al. *Proteomics* 2009. 9; 4627 - 4631

# Påvisning av fluconazol resistens

| <i>C. Albicans</i> strains                                                                | Name       | Group | FCZ MICs<br>(µg/mL) | FCZ<br>MPCCs<br>(µg/mL) | CDR1/<br>CDR2 | MDR1 | MTL     | TAC1                | ERG11<br>mutations                        | Clade |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------|---------------------|-------------------------|---------------|------|---------|---------------------|-------------------------------------------|-------|
| <b>Reference strain</b>                                                                   | ATCC 90028 |       | 0.25                | 0.25                    |               |      | na      |                     |                                           | na    |
| <b>Clinical isolates</b><br>(grouped by sequential<br>isolates from selected<br>patients) | DSY281     | A     | 1                   | 0.5                     |               |      | a/α     |                     | S450F <sup>a)</sup>                       | 1     |
|                                                                                           | DSY284     |       | 32                  | 8                       | X             |      | a/α     | G980E <sup>a)</sup> | S450F                                     | 1     |
|                                                                                           | DSY 294    | B     | 0.25                | 0.25                    |               |      | a/α     |                     | G129A                                     | na    |
|                                                                                           | DSY296     |       | 128                 | 128                     | X             |      | α/α     | N977D               | G464S, G129A                              | na    |
|                                                                                           | DSY544     | C     | 0.5                 | 0.25                    |               |      | a/α     |                     | D116E <sup>a)</sup> , K128T <sup>a)</sup> | 1     |
|                                                                                           | DSY775     |       | 128                 | 64                      | X             |      | a/a     | G980W               | G464S                                     | 1     |
|                                                                                           | DSY2260    | D     | 8                   | 4                       | X             |      | a/α     |                     | E266D, G464S                              | na    |
|                                                                                           | DSY2262    |       | 64                  | 32                      | X             |      | a/α     |                     | E266D, L376V, G464S                       | na    |
|                                                                                           | DSY2321    | E     | 0.25                | 0.5                     |               |      | a/α     |                     | S405F <sup>a)</sup>                       | na    |
|                                                                                           | DSY2322    |       | 16                  | 16                      | X             |      | α/α     | G980E               | S405F                                     | na    |
|                                                                                           | DSY347     | F     | 0.25                | 0.125                   |               |      | a/α     |                     |                                           | na    |
|                                                                                           | DSY289     |       | 128                 | 128                     | X             |      | a/α     | A736V               | S405F, Y132H                              | na    |
|                                                                                           | DSY290     | G     | 0.5                 | 0.25                    |               |      | a/α     |                     |                                           | S     |
|                                                                                           | DSY292     |       | 128                 | 128                     |               | X    | a/α     |                     | G464S, R467K, Y132H <sup>a)</sup>         | S     |
|                                                                                           | DSY2284    | H     | 0.25                | 0.5                     |               |      | a/α     |                     |                                           | 11    |
|                                                                                           | DSY2285    |       | 16                  | 16                      |               | X    | a/a/a/α |                     |                                           | 11    |

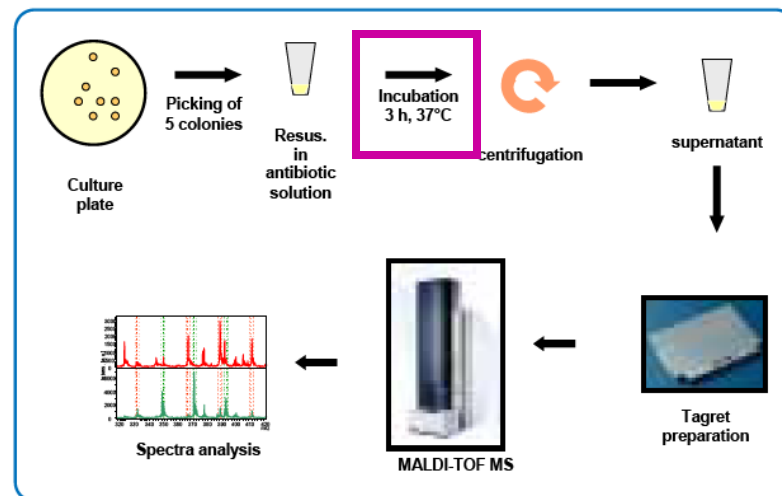
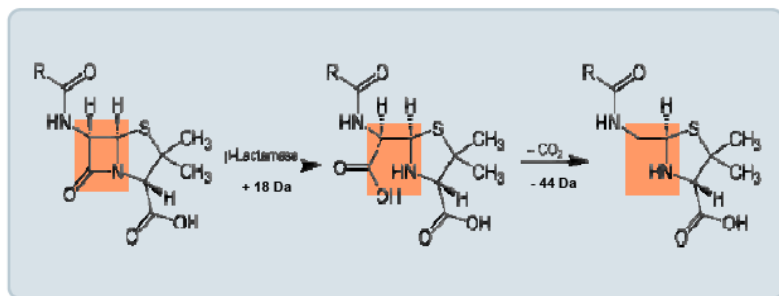
Marinach, C. et al. *Proteomics* 2009. 9; 4627 - 4631

# Påvisning av *cfiA* hos *B.fragilis*



Nagy, E. et al. J Med Microbiol. 2011. 60;1584-1590

# Hydrolysering av $\beta$ -laktam antibiotika

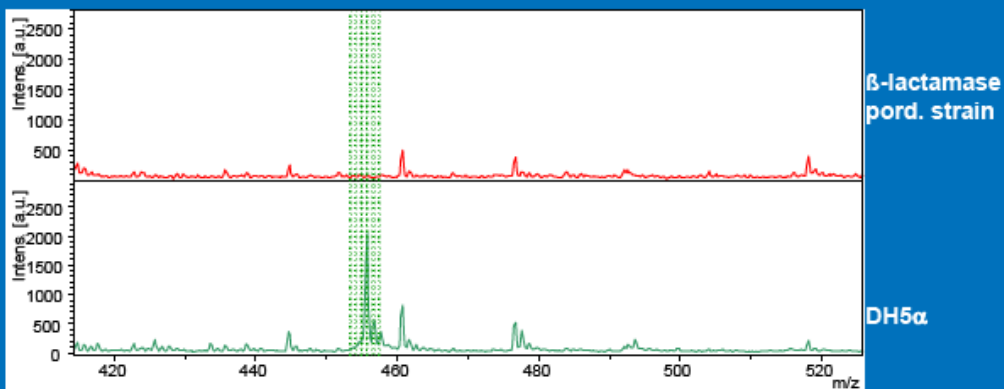


Sparbier et al: Poster 619 på ASM 2011



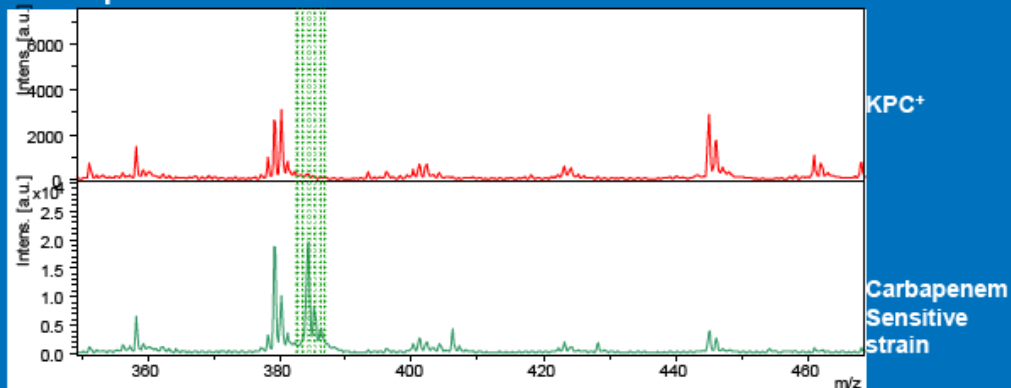
# Hydrolysering av $\beta$ -laktam antibiotika

## Cefotaxime



- Cefotaxime MW = 455,5 g/mol

## Meropenem



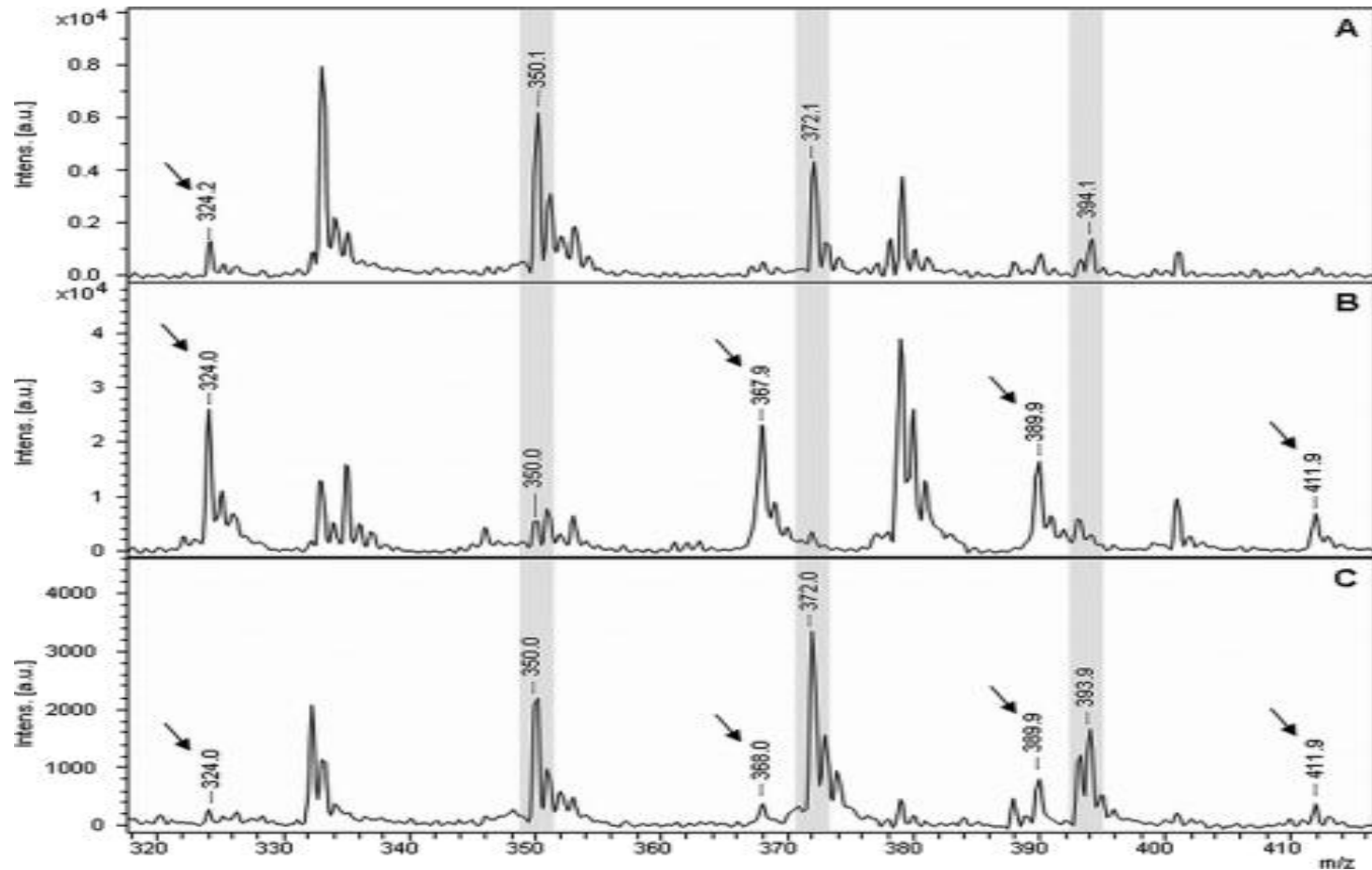
- Meropenem MW = 383,4 g/mol

Sparbier et al: Poster 619 på ASM 2011

# Deteksjon av resistens på MALDI-TOF MS

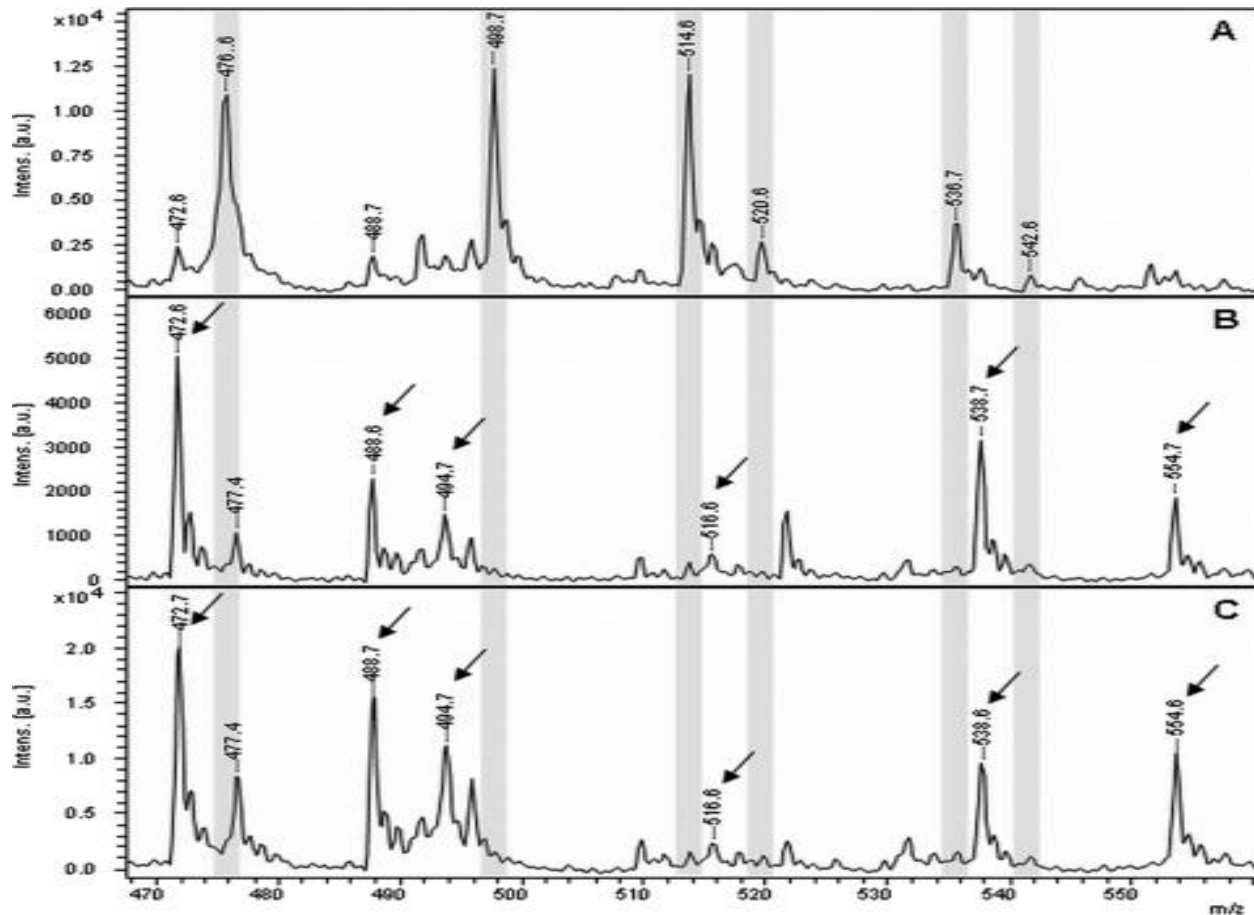
| Mikroorganisme                                            | Antall prøver | AB-Resistens            | Påvisningsmetode | Instrument                              | Publiseringsår | Referanse                                           |
|-----------------------------------------------------------|---------------|-------------------------|------------------|-----------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Fungi</b>                                              |               |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <i>Candida albicans</i>                                   | 17            | Flukonazol              | Fingerprinting   | Autoflex I (Bruker)                     | 2009           | Marinach C., et al. Proteomics 9: 4627 - 4631       |
| <i>Candida sp.</i>                                        | 34            | Caspofungin             | Fingerprinting   | Microflex LT (Bruker)                   | 2012           | de Carolis E., et al. JCM. doi:10.1128/JCM.00224-12 |
| <i>Aspergillus sp.</i>                                    | 10            |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <b>Bacteria</b>                                           |               |                         |                  |                                         |                |                                                     |
| <i>Bacteroides fragilis</i>                               | 145 + 38      | Imipenem                | Fingerprinting   | Microflex LT (Bruker)                   | 2011           | Nagy E., et al. JMM 60: 1584–1590                   |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                              | 76            | Meticillin              | Fingerprinting   | N/A                                     | 2002           | Du, Z. et al. Anal Chem 74: 5487 - 5491             |
| <i>Enterobacteraceae</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 77            | Ertapenem               | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2011           | Burckhardt I., S. Zimmermann. JCM 49: 3321 – 3324   |
| <i>Enterobacteraceae</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 124           | Meropenem               | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2011           | Hrabák J., et al. JCM 49: 3222 – 3227.              |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                            | 106           | Imipenem                | Hydrolysering    | Ultraflex I (Bruker)                    | 2012           | Kempf M., et al. PLoS One 7: e31676.                |
| <i>Enterobacteraceae</i>                                  | 145           | Meropenem               | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2012           | Hrabak J., et al. JCM doi:10.1128/JCM.01002-12      |
| <i>Escherichia coli</i>                                   | 3             | β-laktam                | Hydrolysering    | Ultraflex 3 (Bruker)<br>MALDI QqQ (ABI) | 2011           | Hooff G.P., et al. J Proteome Res. 11;79 - 84       |
| <i>Escherichia coli</i><br><i>Klebsiella pneumoniae</i>   | 8             | β-laktam                | Hydrolysering    | Microflex LT (Bruker)                   | 2012           | Sparbier K., et al. JCM 50: 927 – 937               |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>                           | 38            | Fluoroquin.             | Minisekvensering | N/A                                     | 2007           | Malakhova, M.V. et al. Antibiot Khimioter 52; 10-17 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                         | 100           | Rifampicin<br>Isoniazid | Minisekvensering | Reflex IV (Bruker)                      | 2007           | Ikryannikova L.N., et al. JMM 70:395 - 405.         |

# Hydrolysering av ampicillin



Sparbier, K. et al. JCM 2012. 50; 927 – 937

# Hydrolysering av ertapenem



Sparbier, K. et al. JCM 2012. 50; 927 – 937

# Resistensbestemmelse på MALDI-TOF MS?

- Rask deteksjon av resistens
- Kan oppdage nye  $\beta$ -laktamaser
- Stemmer godt overens med referansemetoder
- Bør kunne være metode for å detektere alle enzymatiske resistens mekanismer

# Resistensbestemmelse på MALDI-TOF MS?

- Ikke efflux mekanismer eller porin forandringer
- For få studier
- Fingerprint: for artsspesifikk?
- Autohydrolysering?
- Automatiserings-algoritmer
- Nye assay krever ekspertise i MS