

MALDI-TOF MS et détection de la résistance aux antibiotiques

DORTET Laurent

MALDI-TOF MS : C'est quoi ?

Comment ça marche ?

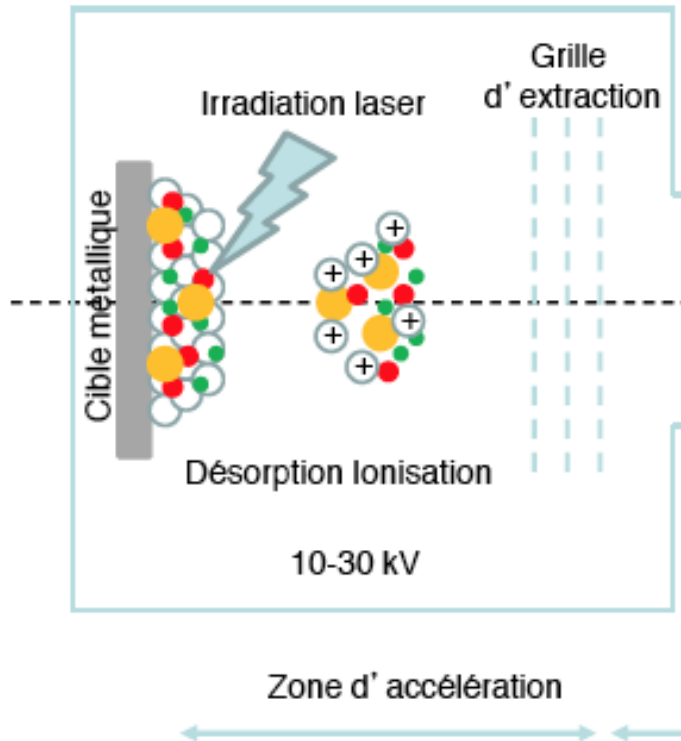
**MALDI-TOF MS= Matrix Assisted Laser Desorption
Time of Flight Mass Spectrometry**

Principe : Transformer des molécules présentes dans l'échantillon de leur état naturel en ions gazeux et obtenir leur mass moléculaire en analysant le rapport masse/charge (m/z)

Principe de ionisation

- ❑ Impact électronique ou électro-ionisation (EI)
- ❑ Ionisation chimique (CI)
- ❑ Photo-ionisation (PI)
- ❑ Electro Spray Ionisation
- ❑ **Ionisation-Desorption**
 - Emission ionique secondaire (SISMS : Secondary Ion MS)
 - Bombardement par des atomes rapides (FAB : Fast Atom Bombardment)
 - Désorption plasma (PDMS : Plasma desorption MS)
 - Désorption Laser : (LDMS : Laser Desorption MS)
(**MALDI : Matric Assisted Laser Desorption Ionization**)

Source MALDI



TOF : Time Of Flight

Phase MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption

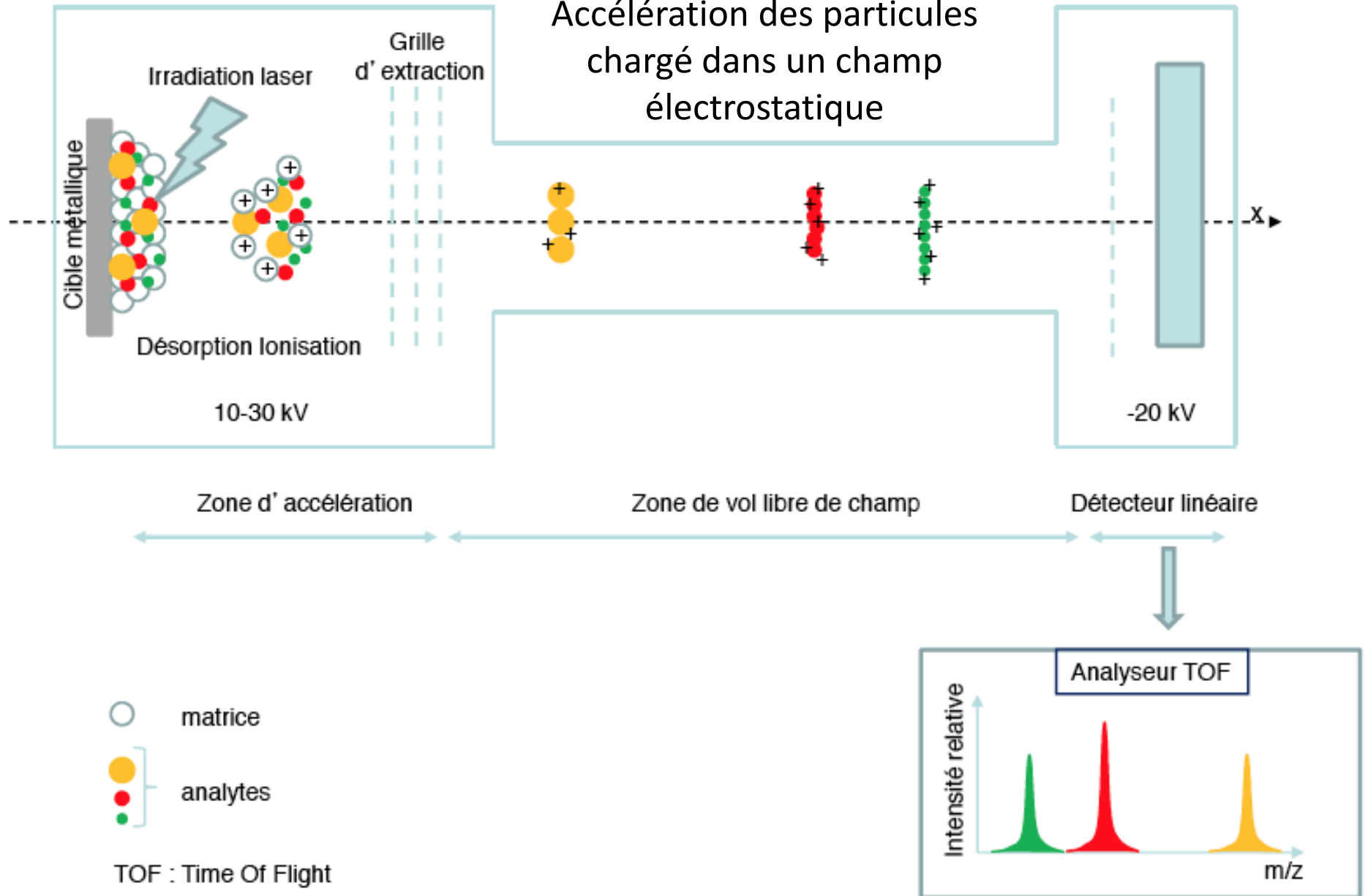
- Absorption de photons UV (émis par le laser) par la matrice
- Excitation puis ionisation de la matrice
- Relaxation de la matrice
- Dissociation de la matrice entraînant l'échantillon
- Passage en phase gazeuse (nuage matrice + échantillon)
- Transfer de charge vers les molécules de l'échantillon

Source MALDI

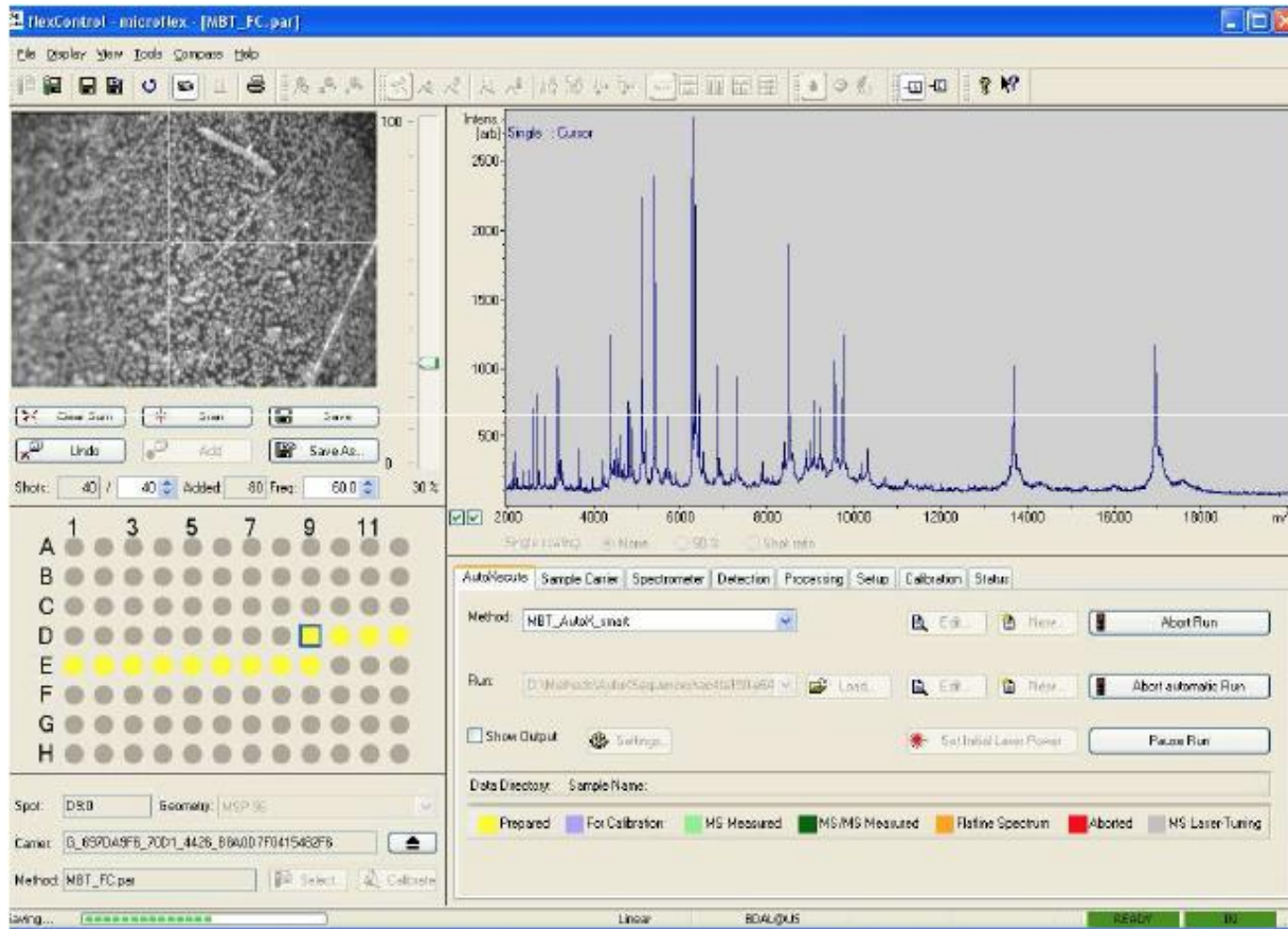
Phase TOF : Time of Flight

Accélération des particules
chargé dans un champ
électrostatique

Détection



Acquisition et Détection d'un spectre en temps réel

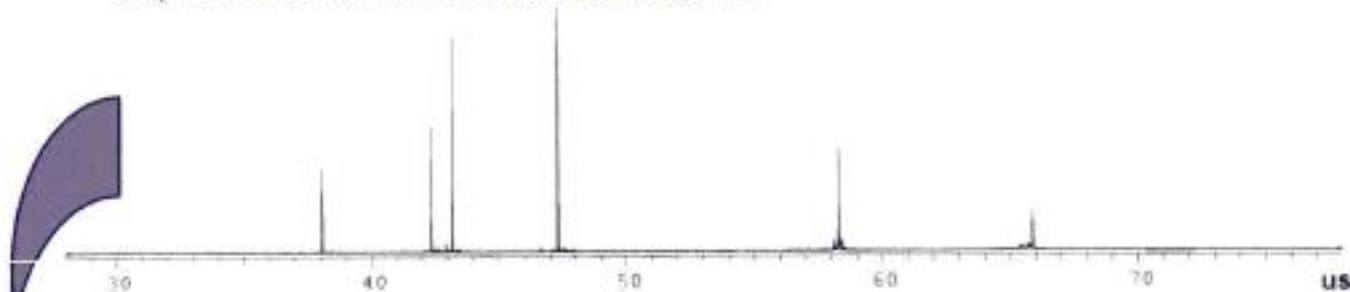


Le spectre obtenu en TOF est converti en spectre de masse par calibration avec des masses connues

Passage de l'échelle temps à l'échelle masse

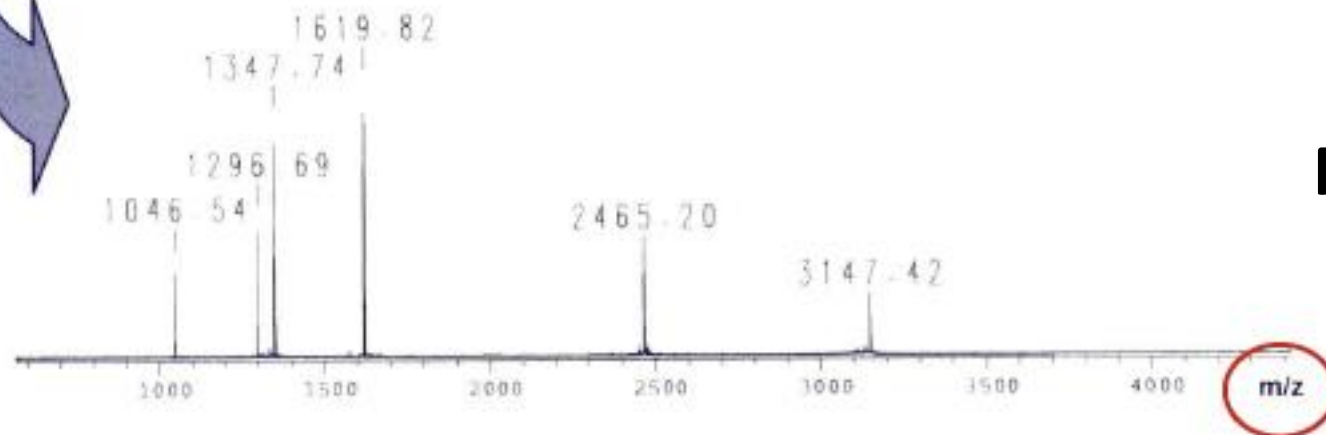
Séparation des ions en fonction du temps de vol

Temps de vol



Calibration avec des masses connues: **spectre de masse**

Masse

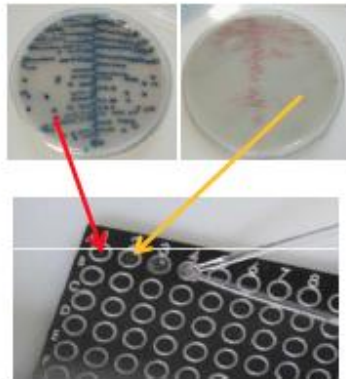


Le TOF de chaque molécule est caractéristique de cette molécule

Rôle de la technologie MALDI-TOF MS dans un laboratoire de microbiologie

❑ Identification des microorganismes (bactéries, levures)

Dépôt des échantillons

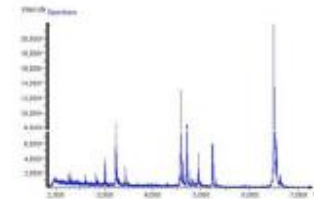


Acquisition des spectres



Analyse des spectres

Banque de données



Identification

A1 : *Klebsiella pneumoniae*
A2 : *Staphylococcus saprophyticus*
A3 : etc.....

Transfert des données au système informatique du laboratoire



Rôle de la technologie MALDI-TOF MS dans un laboratoire de microbiologie

❑ Etude de clonalité, comparaison de souches

En développement

❑ Etude de la sensibilité aux agents anti-infectieux

- Identification de clones résistants par spectrométrie de masse globale
- Détection de la croissance bactérienne en présence d'antibiotique
- Détection de la dégradation d'un antibiotique
- Détection de la modification de la cible d'un antibiotique
- Détection de protéines responsable de la résistance par MS/MS

Identification de clones résistants par spectrométrie de masse globale

(WCMS: whole-cell mass spectrometry)

- ❑ Utilisation du spectre obtenu pour l'identification pour effectuer le typage
- ❑ Nécessité que le **marqueur** de résistance utilisé soit **dans le range de détection** des protéines détectées par WCMS
- ❑ Ex: Détection de la **résistance à la méthiciline chez *Staphylococcus aureus* (SARM)**
 - PLP2a (76 kDa) est trop grosse et en trop faible abondance pour être détectable par MALDI-TOF-MS
 - Psm (Phenol-soluble moduline) présent chez des souches de SARM possédant une cassette *SCCmec* de type II, II et VIII
 - *m/z* 2415 facilement identifiable par MALDI-TOF MS
 - **Présence du pic = SARM mais absence du pic ne signifie pas SASM**

Détection de la croissance bactérienne en présence d'antibiotique

- ❑ **Principe** : Détection et quantification de la biomasse bactérienne globale après culture en présence d'antibiotique
- ❑ Utilisation d'un contrôle interne
- ❑ Applicable pour **tous les antibiotiques** après optimisation
- ❑ Applicable sur **colonies** ou directement à partir **d'hémocultures positives**
- ❑ Etapes: - Mise en **culture** en bouillon MH **avec et sans antibiotique**
 - **Incubation** à 37°C (**1h à 4h** selon l'antibiotique et la bactérie)
 - Récupération + Lavage culot bactérien
 - Extraction protéique (acétonitrile / Ac. Formique) + addition du **contrôle interne**
- ❑ **Inconvénients majeurs:** - Chaque étape nécessite une **optimisation**
 - **Pas de corrélation avec la CMI**
 - **Pas de système commercial**

(1) The MALDI Biotyper Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay (MBT-ASTRA)



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

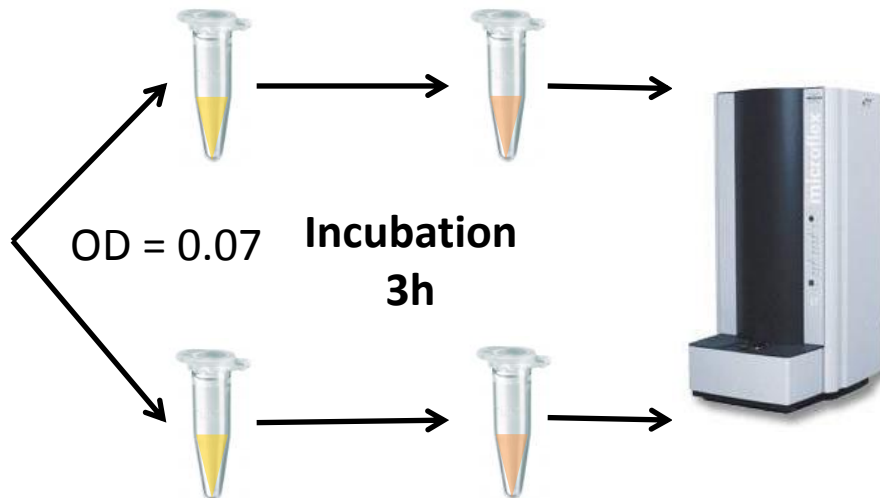
Journal of
Clinical Microbiology



CrossMark
click for updates

Evaluation of a Semiquantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures

200 μ l Mueller-Hinton
Sans antibiotique

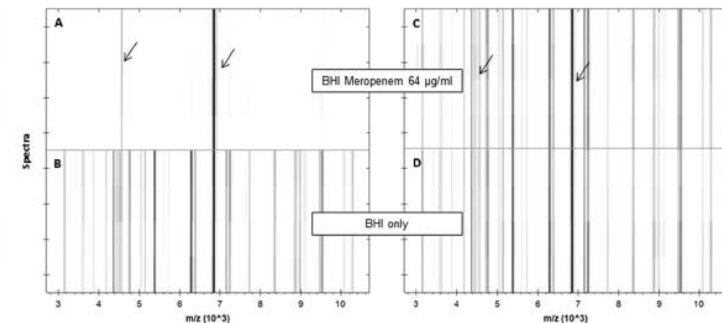


200 μ l Mueller-Hinton
+ Antibiotique
(1 dilution au dessus
du cut off EUCAST)

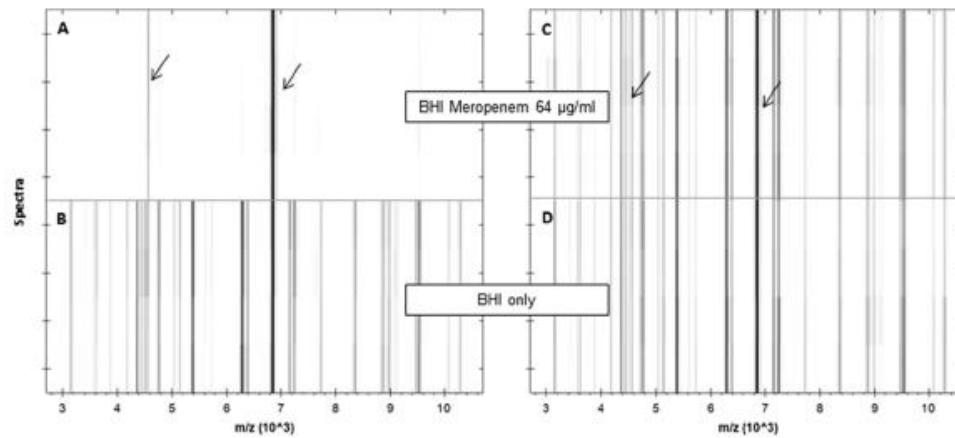
Spectre global

Souche sensible

Souche résistante



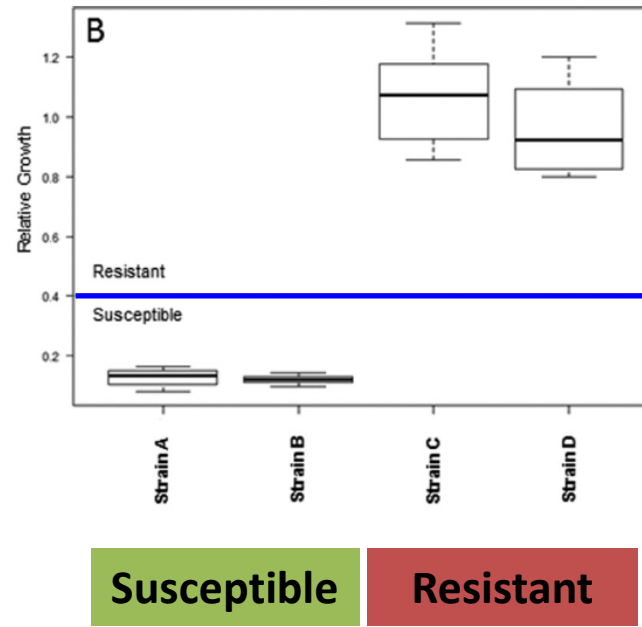
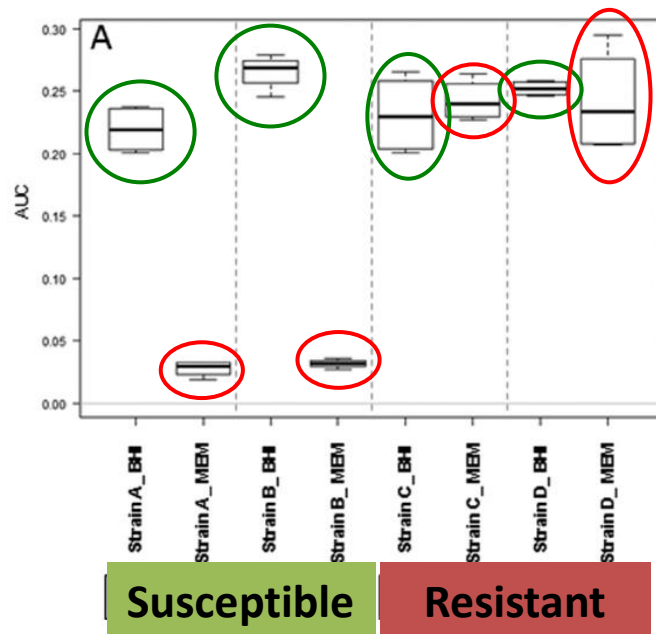
$$\text{Relative Growth} \approx \frac{\text{AUC avec antibiotique}}{\text{AUC sans antibiotique}}$$



Spectre

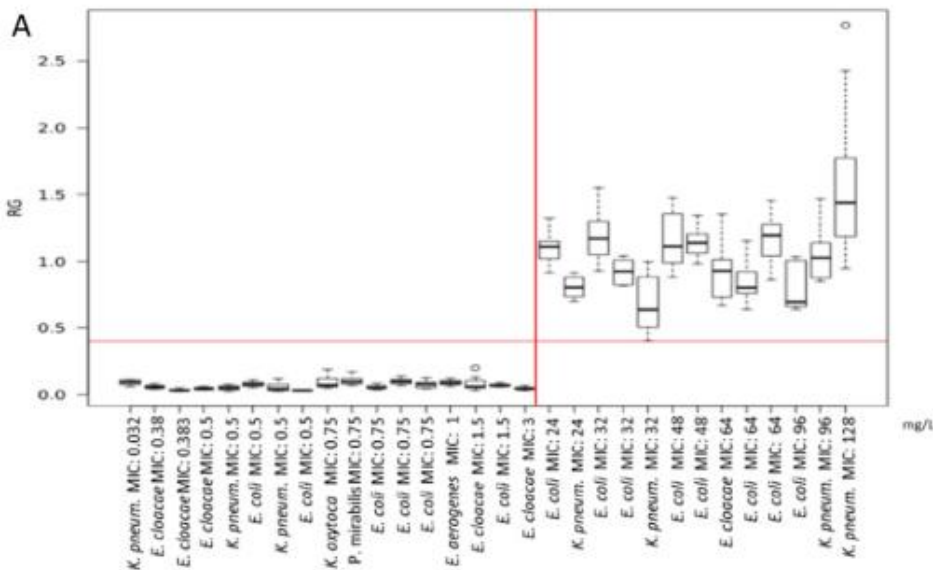
AUC

$$\text{Relative Growth} \approx \frac{\text{AUC avec antibiotique}}{\text{AUC sans antibiotique}}$$

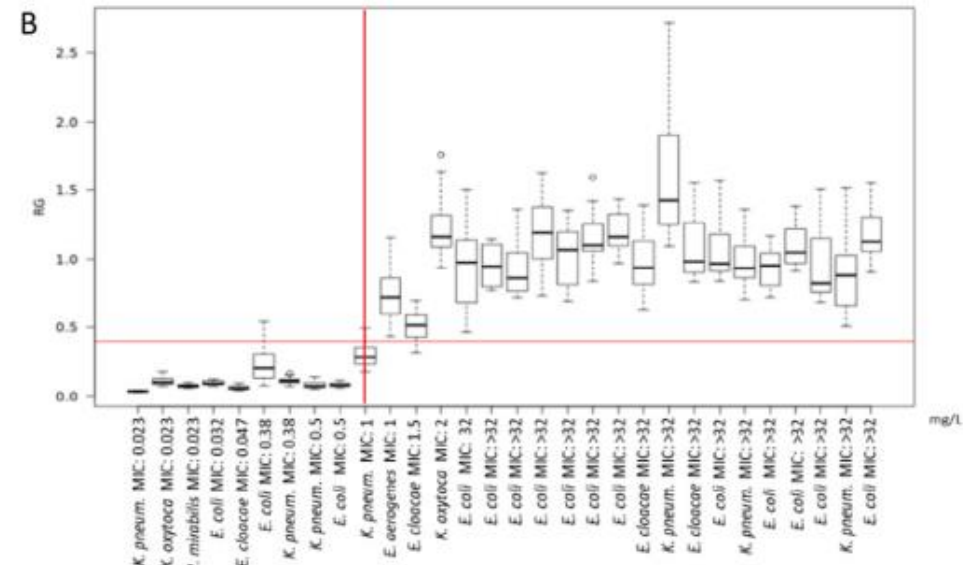


Evaluation of a Semiquantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Method for Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures

Gentamicine



Ciprofloxacin



Réponse « rapide » sur S ou R

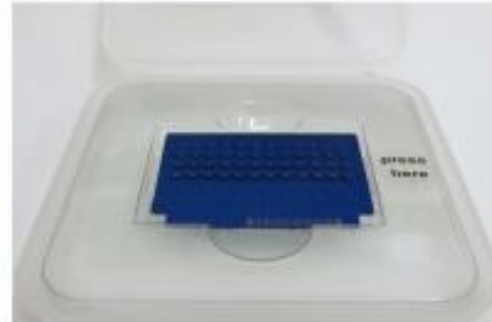
Pas de corrélation avec la CMI

Pas d'indication sur le mécanisme de résistance

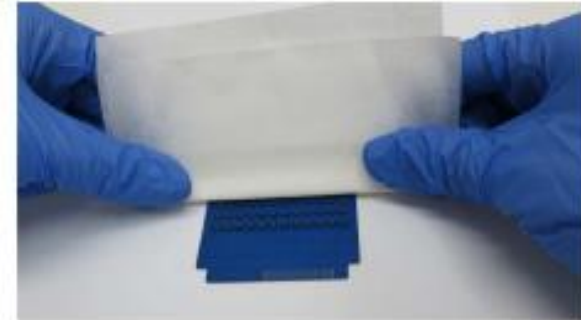
(2) Direct-on-target microdroplet growth assay for detection of antibiotic resistance within a few hours



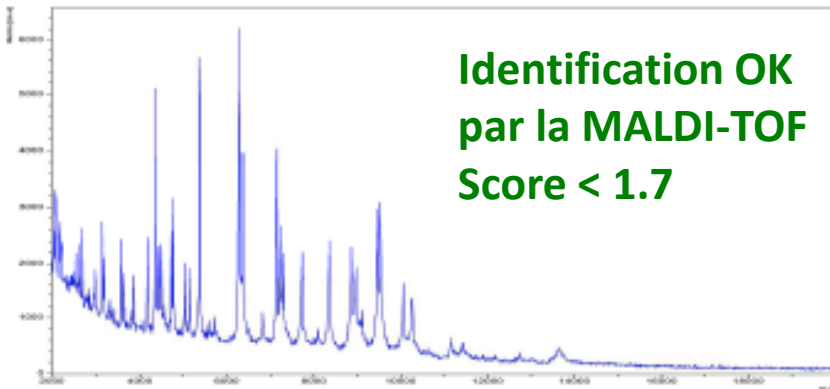
Microgouttes de MH (6 μ l) avec et sans antibiotique + Bactérie ($5 \cdot 10^5$ / ml)



Chambre humide d'incubation (4h pour *K. pneumoniae*, 5h pour *P. aeruginosa*)



Séparation du milieu de culture des bactéries par absorption puis addition de la matrice HCCA sur le spot



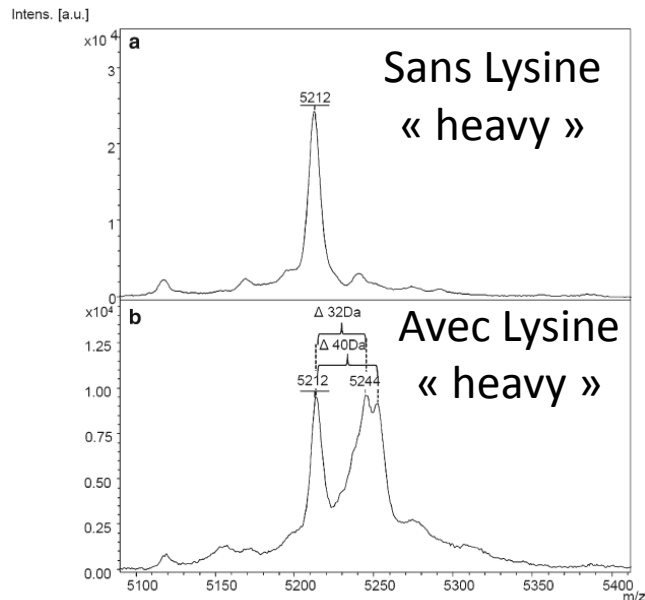
Spectre d'un souche de *K. pneumoniae* résistante ayant poussée dans du milieu de culture contenant du méropénème



Spectre d'un souche de *K. pneumoniae* sensible n'ayant poussée pas dans du milieu de culture contenant du méropénème

(2) MBT-RESIST

- ❑ Détection de **protéines ayant incorporées** des acides aminés marqués par des **isotopes non radioactifs**
- ❑ En présence d'antibiotique seules les souches résistantes incorporent les acides aminés radioactifs en trainant un différence de masse globale des protéines par rapport aux souches sensibles.



MALDI Biotyper-Based Rapid Resistance Detection by Stable-Isotope Labeling

Katrin Sparbier,^a Christoph Lange,^a Jette Jung,^b Andreas Wieser,^b Sören Schubert,^b Markus Kostrzewa^a
BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany^a; Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany^b

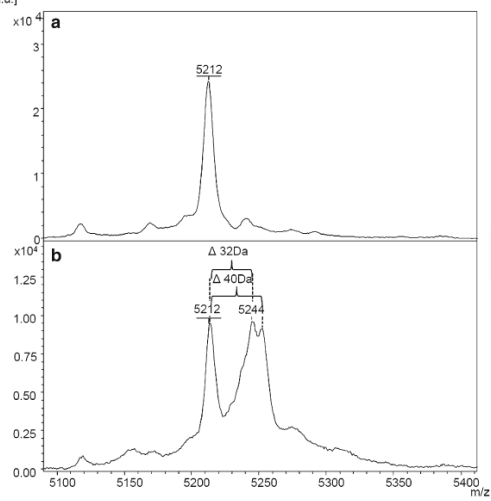
Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2014) 33:949–955
DOI 10.1007/s10096-013-2031-5

ARTICLE

Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes

J. S. Jung • T. Eberl • K. Sparbier • C. Lange •
M. Kostrzewa • S. Schubert • A. Wieser

Intens. [a.u.]



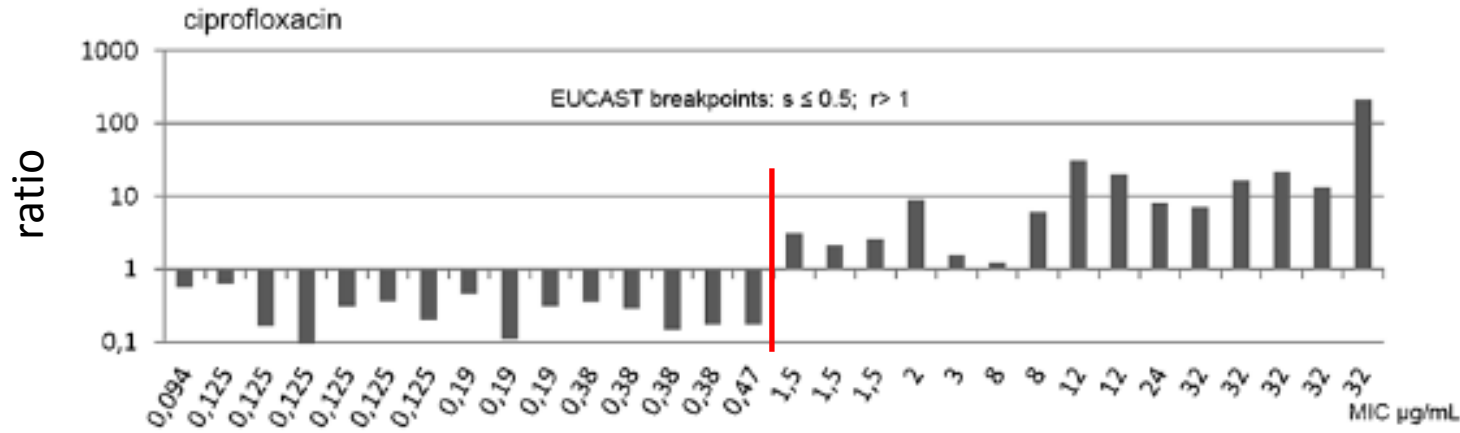
Etude de plusieurs
(10 à 20) pics
entre 2 et 10 kDa

Table. 1 Ten peak shifts that were identified by visual analysis as being suitable for automated evaluation

Peak no.	<i>P. aeruginosa</i> biomarker mass native [Da]	<i>P. aeruginosa</i> biomarker mass with ¹³ C- ¹⁵ N-labelled lysine [Da]
1	3337	3353
2	4545	4577
3	4996	5020
4	5212	5244
5	5737	5793
6	6048	6104
7	6350	6382
8	6677	6709
9	7205	7245
10	9091	9155

$$\frac{\frac{\text{set} - \text{upC} \sum_{i(1-10)} \text{heavy peaks}}{\sum_{i(1-10)} \text{normal peaks}} - \text{set} - \text{upA} \frac{\sum_{i(1-10)} \text{heavy peaks}}{\sum_{i(1-10)} \text{normal peaks}}}{\frac{\text{set} - \text{upB} \sum_{i(1-10)} \text{heavy peaks}}{\sum_{i(1-10)} \text{normal peaks}} - \text{set} - \text{upC} \frac{\sum_{i(1-10)} \text{heavy peaks}}{\sum_{i(1-10)} \text{normal peaks}}}$$

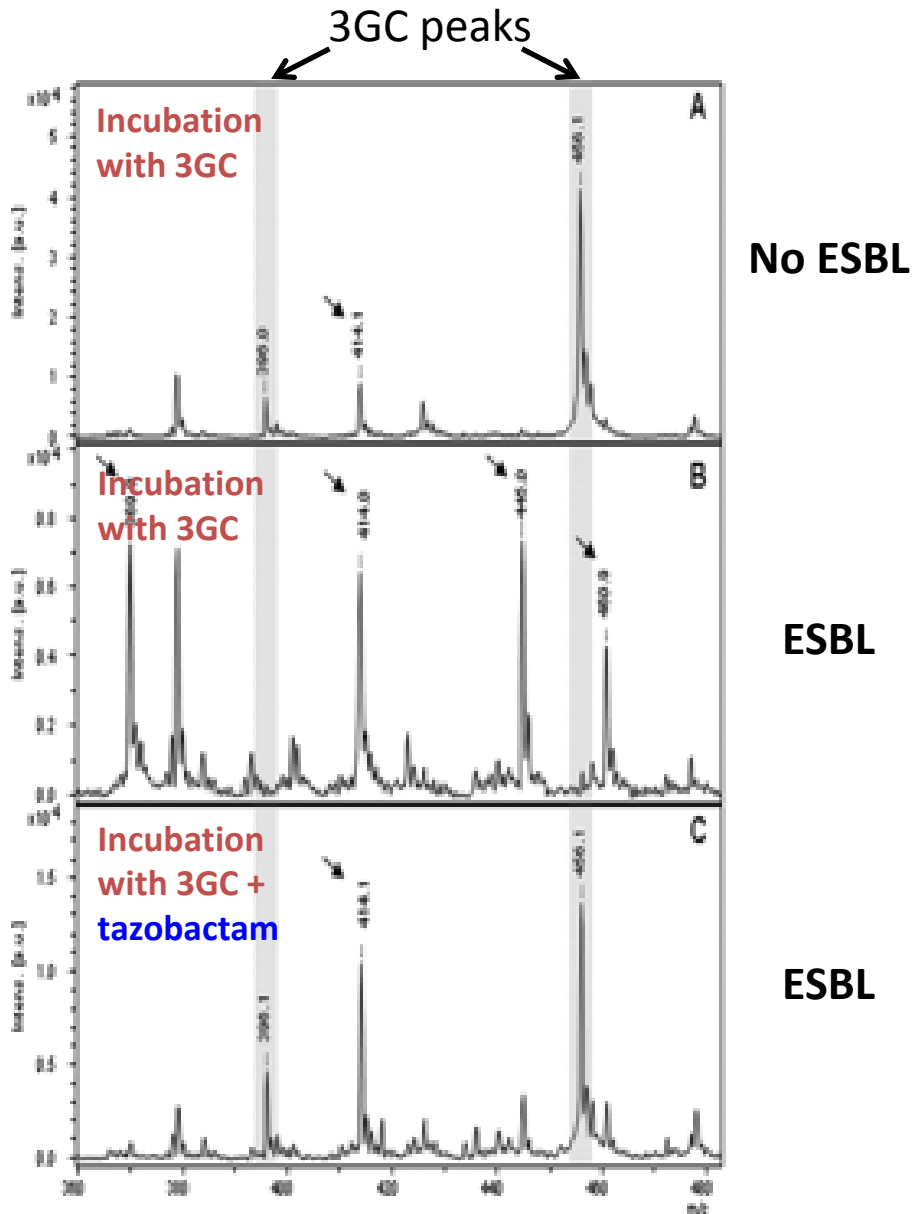
Si ratio ≤ 1
Souche sensible



Détection de la dégradation d'un antibiotique

- ❑ **Principe** : Détection et quantification de l'antibiotique résiduel après incubation avec la bactérie
- ❑ Applicable pour les mécanismes de résistance impliquant la dégradation de l'antibiotique : β -lactamines +++ (STAR-BL, Bruker)
- ❑ Applicable sur colonies ou directement à partir d'hémocultures positives
- ❑ Etapes: - Mise en culture en bouillon MH avec antibiotique
 - Incubation à 37°C (30 min à 2-3h selon l'antibiotique et la bactérie)
 - Lavage culot bactérien + Dépôt direct sur la plaque MALDI
- ❑ Inconvénients: - Pas de corrélation avec la CMI
 - Plage de valeur différente de celle utilisée pour l'identification bactérienne
 - Reproductibilité inter-laboratoire

Détection rapide des BLSE par MALDI-TOF MS



- **Sur colonies**
(Li B et al., Med Sci Monit Basic Res 2014)

- **A partir d'hémocultures positives** (Oviaño M et al., CMI 2014)

Système commercial en cours de développement pour la détection des BLSE et des céphalosporinases

Détection rapide des carbapénèmases par MALDI-TOF MS

**Carbapenem
solution**



Bacteria: loop 1-10 μ L



**Incubation 37° C
20 min – 4h**



**Centrifugation
2 min 12000G**



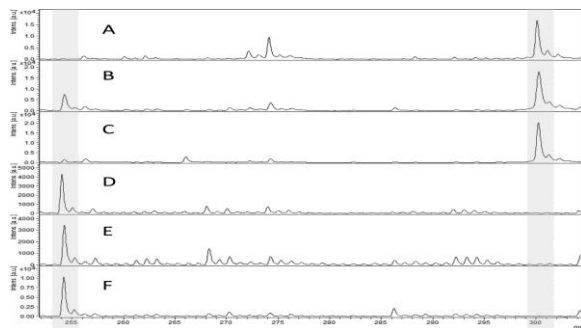
Surpnatant



**Target :
1 μ L supernatant + 1 μ L matrix
STAR-BL**



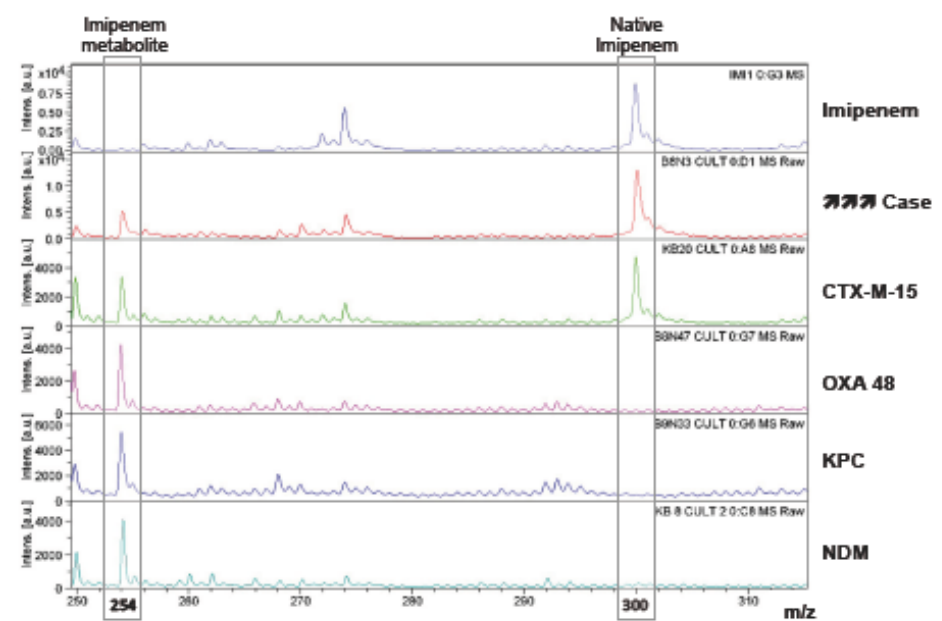
MALDI-TOF



Analysis of the spectra

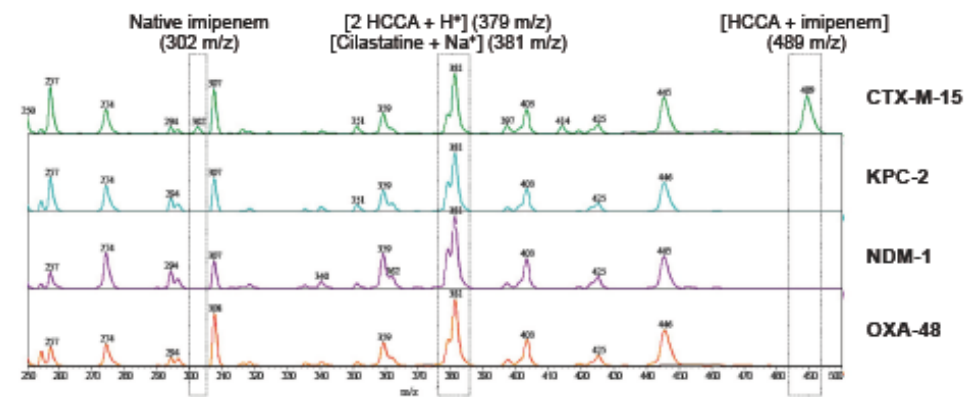
Principe :

Disparition du pic correspondant à l'imipénème natif (+/- apparition du métabolite résultant de l'hydrolyse en présence d'une carbapénémase



Reproductibilité variable du fait de pratiques différentes :

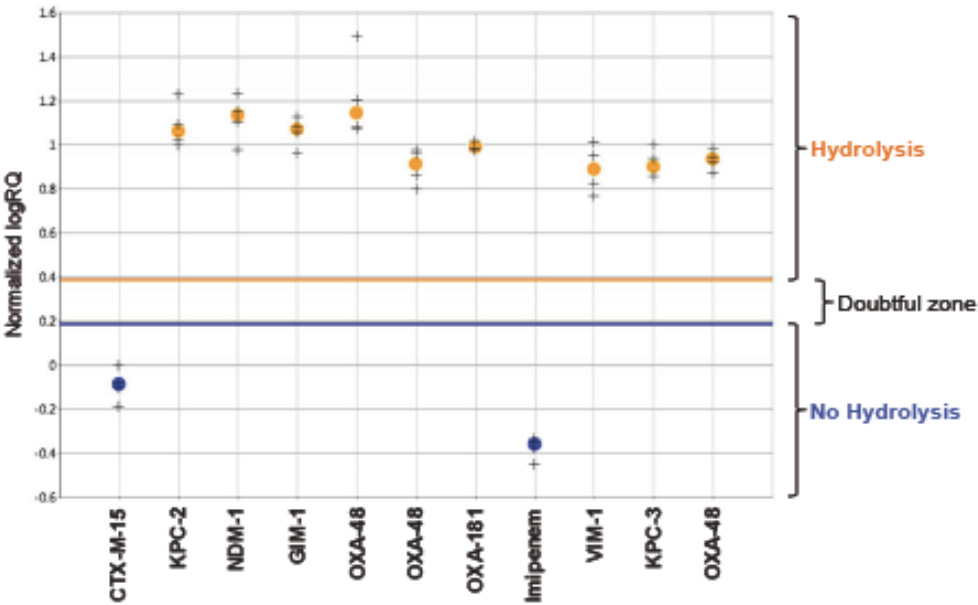
- Carbapénème utilisé
- Equipement MALDI-TOF
- Read-out (+/- métabolite)
- Inoculum
- Temps d'incubation



Système commercial disponible 2017



MALDI Biotyper®

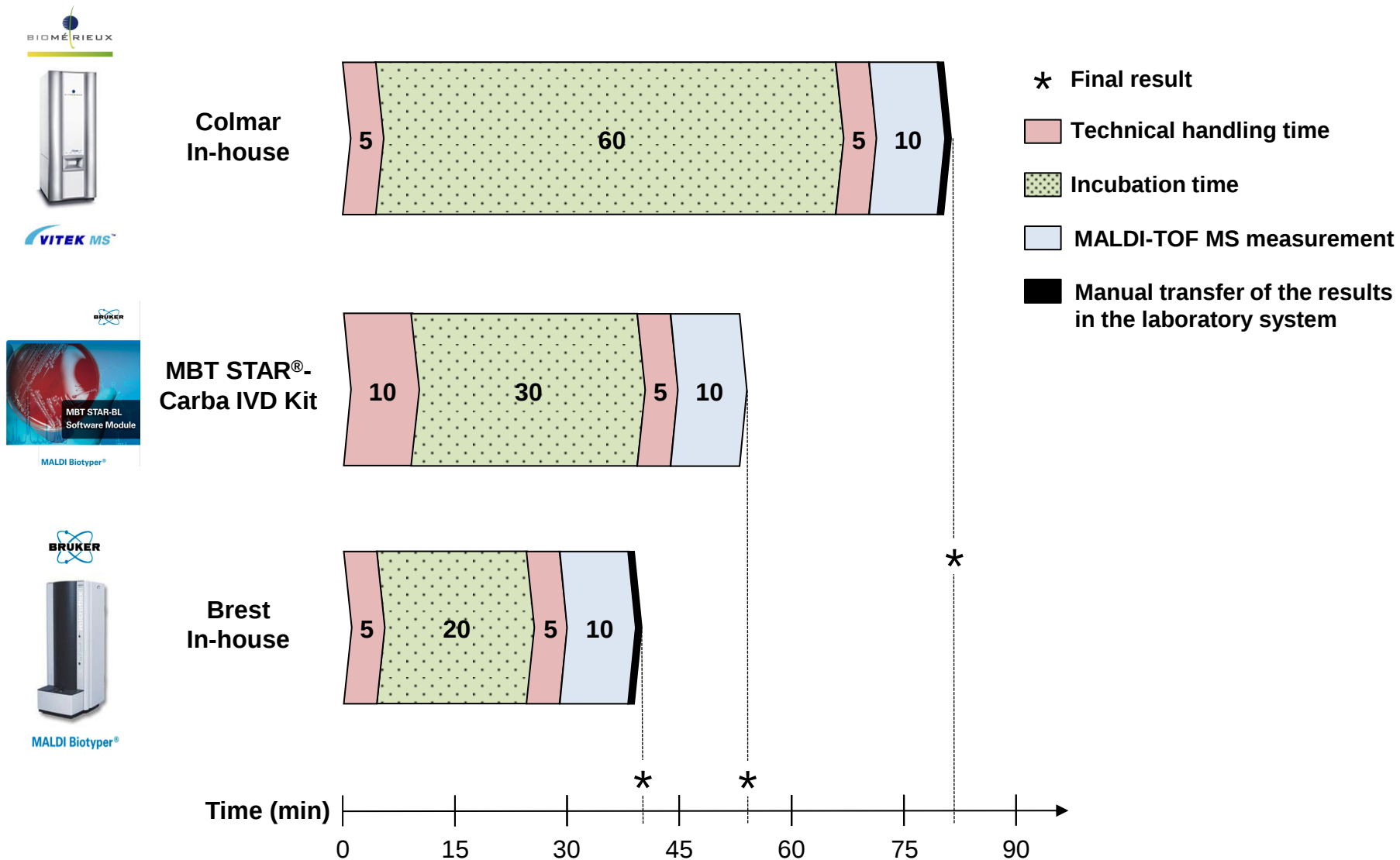


Sample	Species	Control ID	IMI	
<i>E. coli</i> NDM-1	cfr B7	not performed	1.13	H
<i>E. cloacae</i> GIM-1	E cloacA3o56	not performed	1.07	H
<i>E. cloacae</i> OXA-48	E cloac TUR	not performed	1.15	H
<i>E. coli</i> OXA-48	E coli BOK	not performed	0.91	H
<i>E. coli</i> OXA-181	E coli BON	not performed	0.99	H
Imipenem	IMP test	not performed	-0.36	NH
<i>K. pneumoniae</i> VIM-1	Kpn DAL	not performed	0.89	H
<i>K. pneumoniae</i> KPC-3	Kpn NGU	not performed	0.90	H
<i>K. pneumoniae</i> OXA-48	Kpn ROB	not performed	0.94	H
<i>E. coli</i> CTX-M-15 (Negative control)	neg. control	not performed	-0.09	NH
<i>E. coli</i> KPC-2 (Positive control)	pos. control	not performed	1.06	H
Δ controls			1.62	

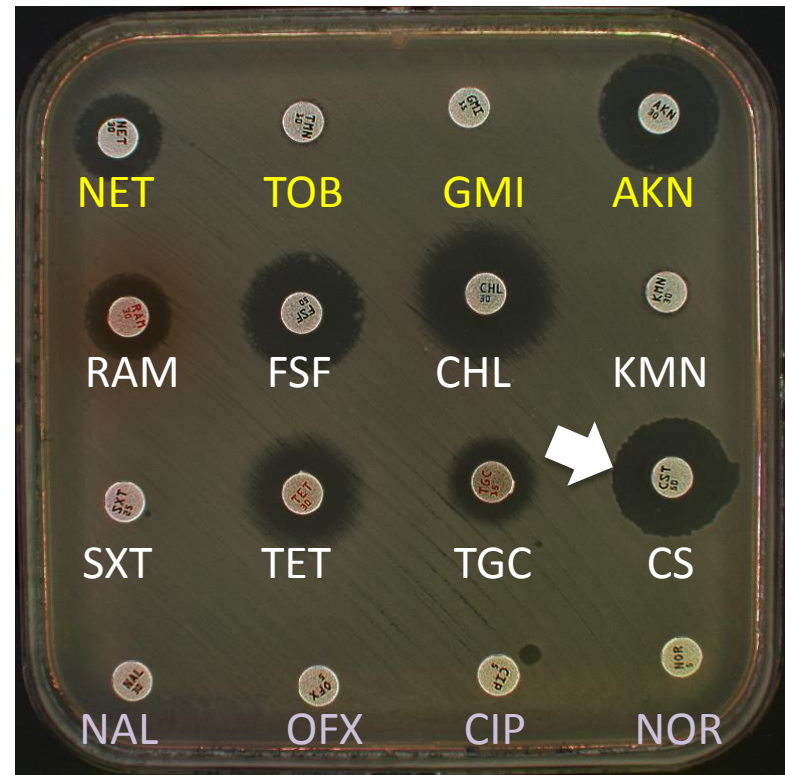
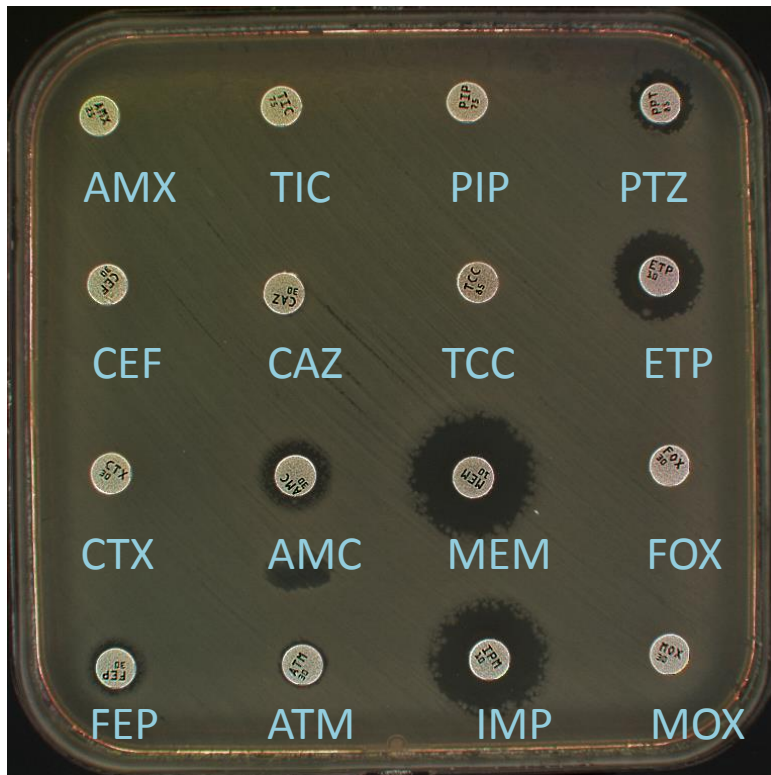
Hydrolysis H

No Hydrolysis NH

Workflow pour la détermination de la production d'une carbapénèmase par MALDI-TOF MS

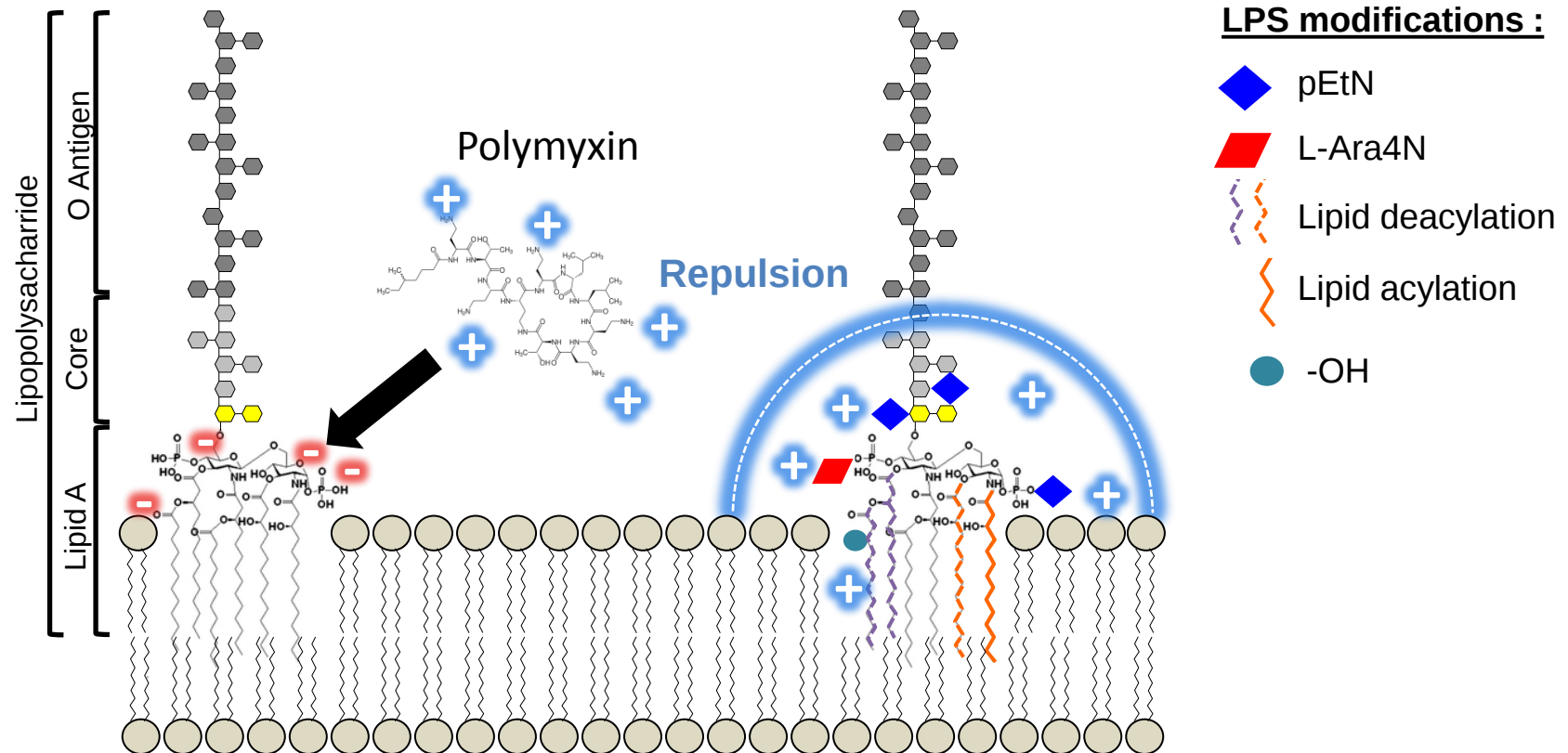


Détection de la modification de la cible d'un antibiotique: la résistance à la colistine

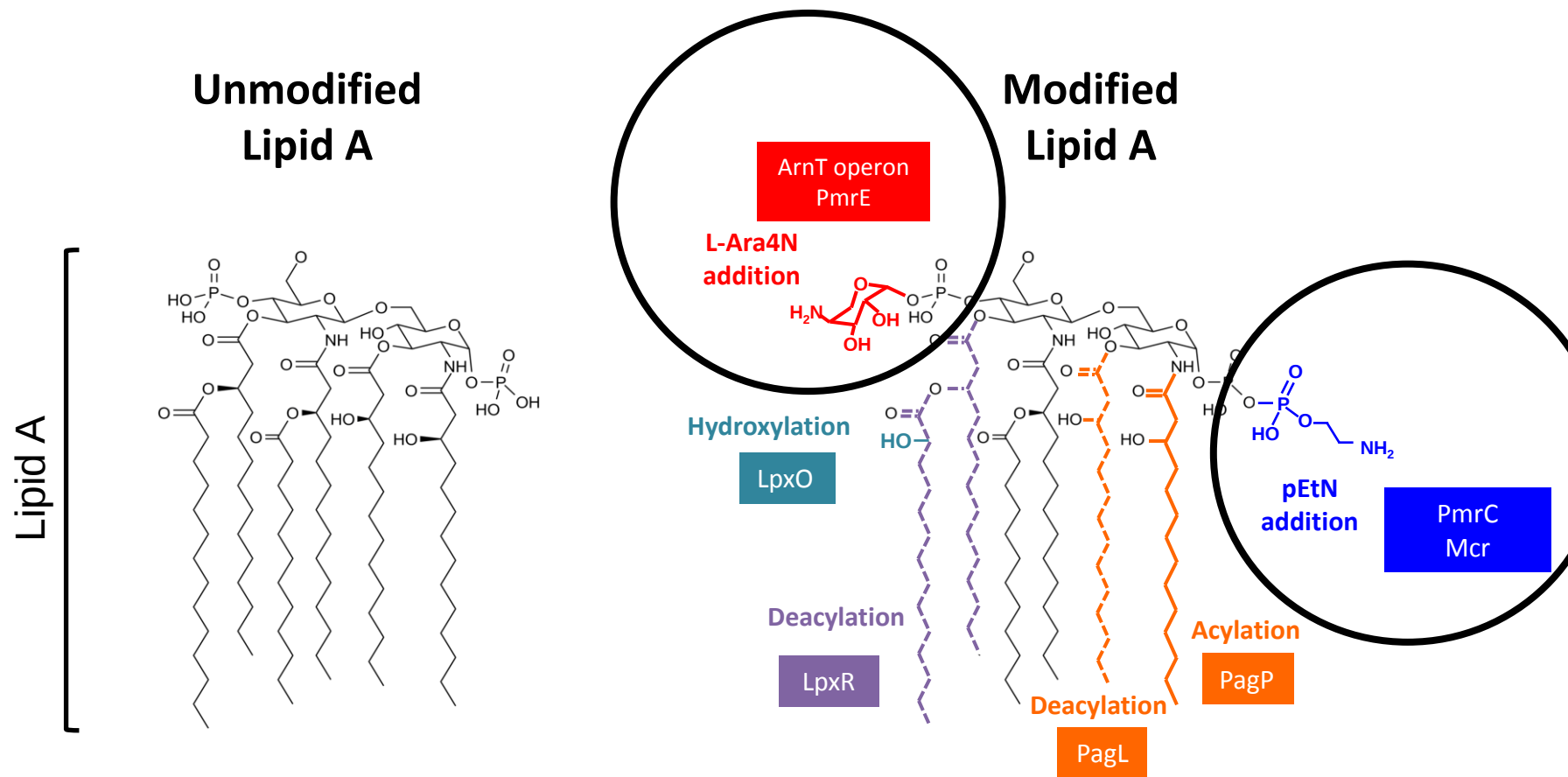


E. coli NDM-1 + CTX-M-15

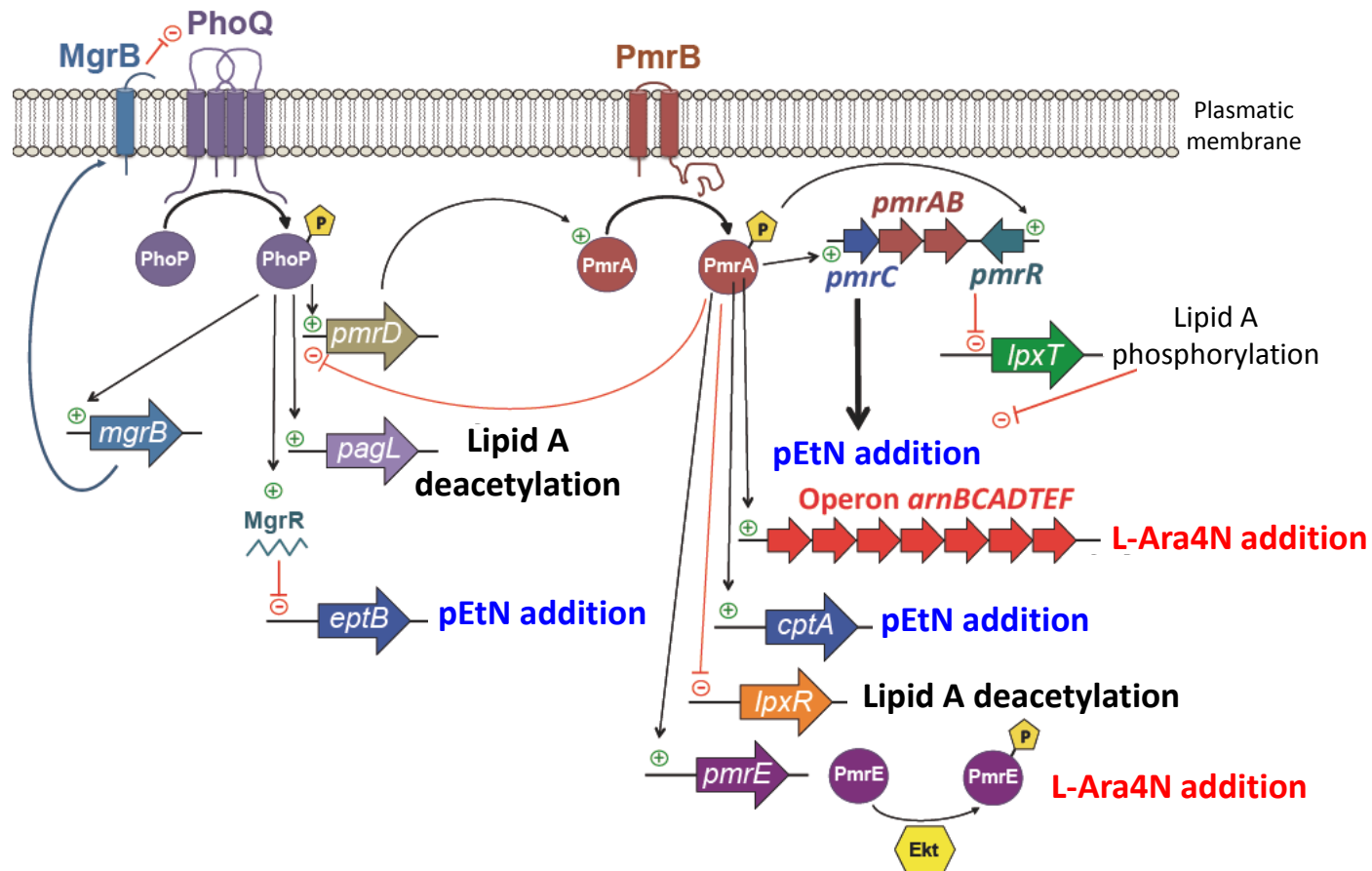
Polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*



Lipid A modifications result in polymyxin resistance



Until november 2015, acquired resistance to polymyxins involved **ONLY** chromosome encoded genes



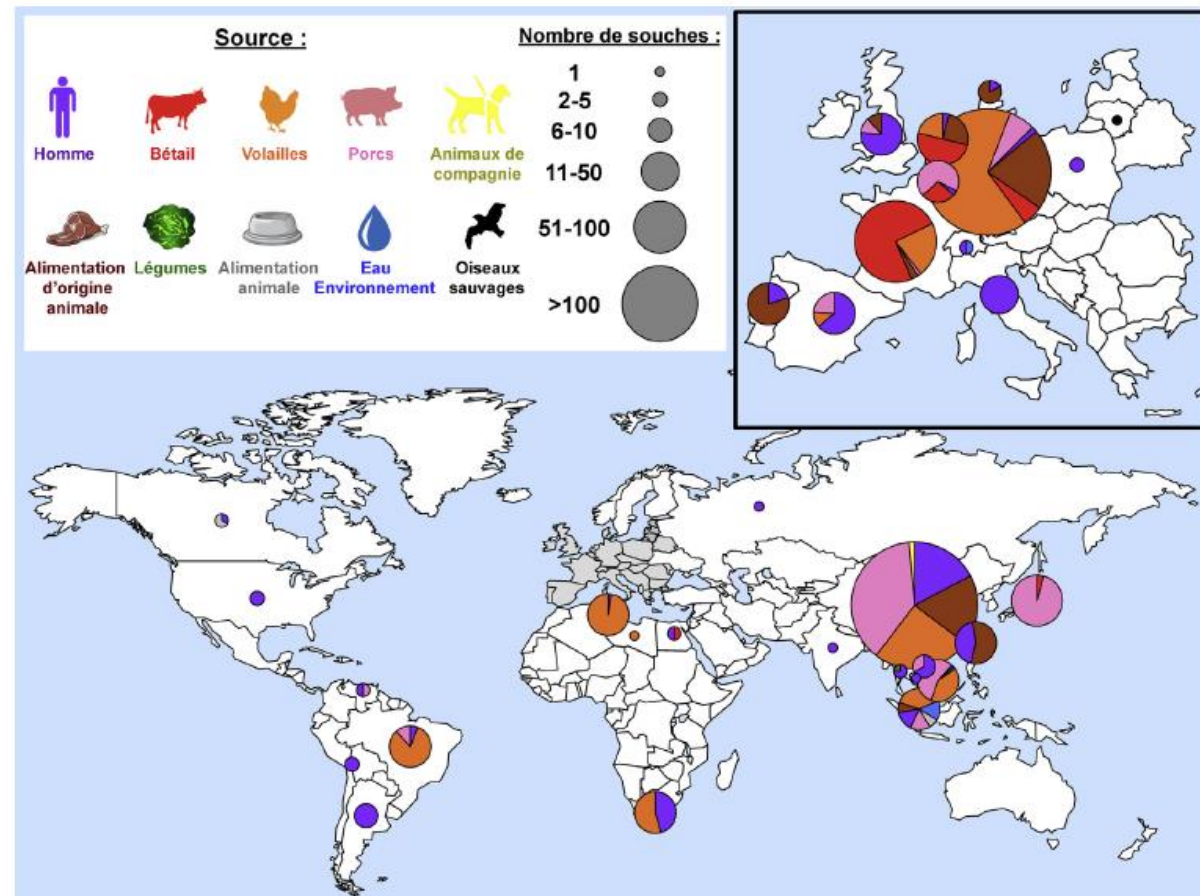
Since november 2015, acquired resistance to polymyxins involves **ALSO** plasmid mediated resistance

Lancet Infect Dis

Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study

Yi-Yun Liu*, Yang Wang*, Timothy R Walsh, Ling-Xian Yi, Rong Zhang, James Spencer, Yohel Doi, Guobao Tian, Baoli Dong, Xianhui Huang, Lin-Feng Yu, Danxia Gu, Hongwei Ren, Xiaojie Chen, Luchao Lv, Dandan He, Hongwei Zhou, Zisen Liang, Jian-Hua Liu, Jianzhong Shen

MCR-1
Plasmid encoded
phosphoethanolamine
transferase



Day 0

Day 1

Day 2

Day 3

Day 4

1-3 weeks

Research workflow

Liters of
bacterial
culture



Lipid
extraction



MALDI-TOF

Readout
Lipid A

Day 0 Day 1 Day 2 Day 3 Day 4 1-3 weeks

Research workflow

Liters of
bacterial
culture



Lipid
extraction

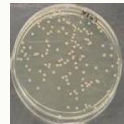


MALDI-TOF

Readout
Lipid A

Routine workflow

Patient
samples

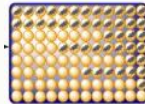


Colonies



Standard
susceptibility
testing

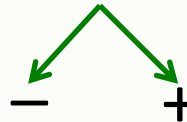
16-24 h



Polymyxin
MICs



DNA
extraction
+ PCR (*mcr-1/-2*)



Chromosome Plasmid

Polymyxin
resistant
isolate

3-5 h

Readout
Gene(s)

MALDI-TOF

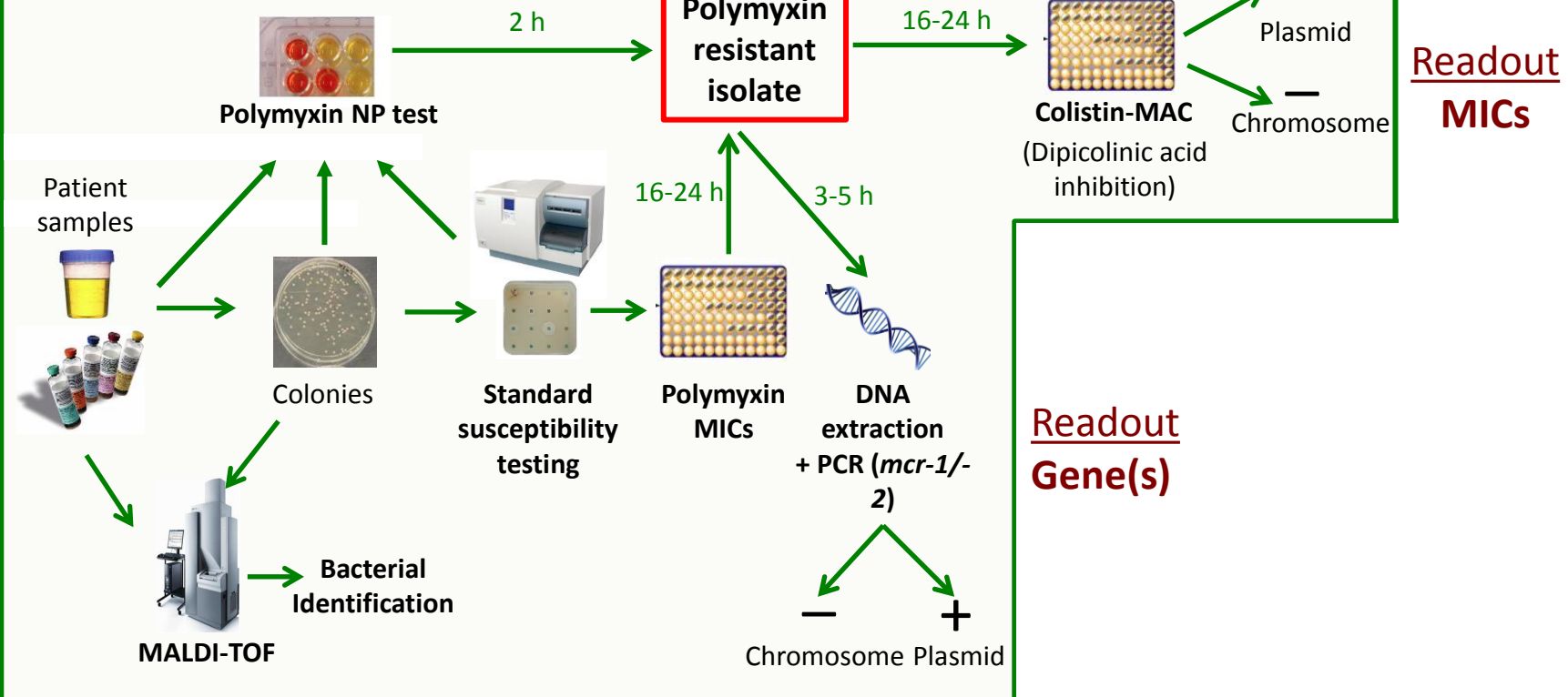
Bacterial
Identification

Day 0 Day 1 Day 2 Day 3 Day 4 1-3 weeks

Research workflow

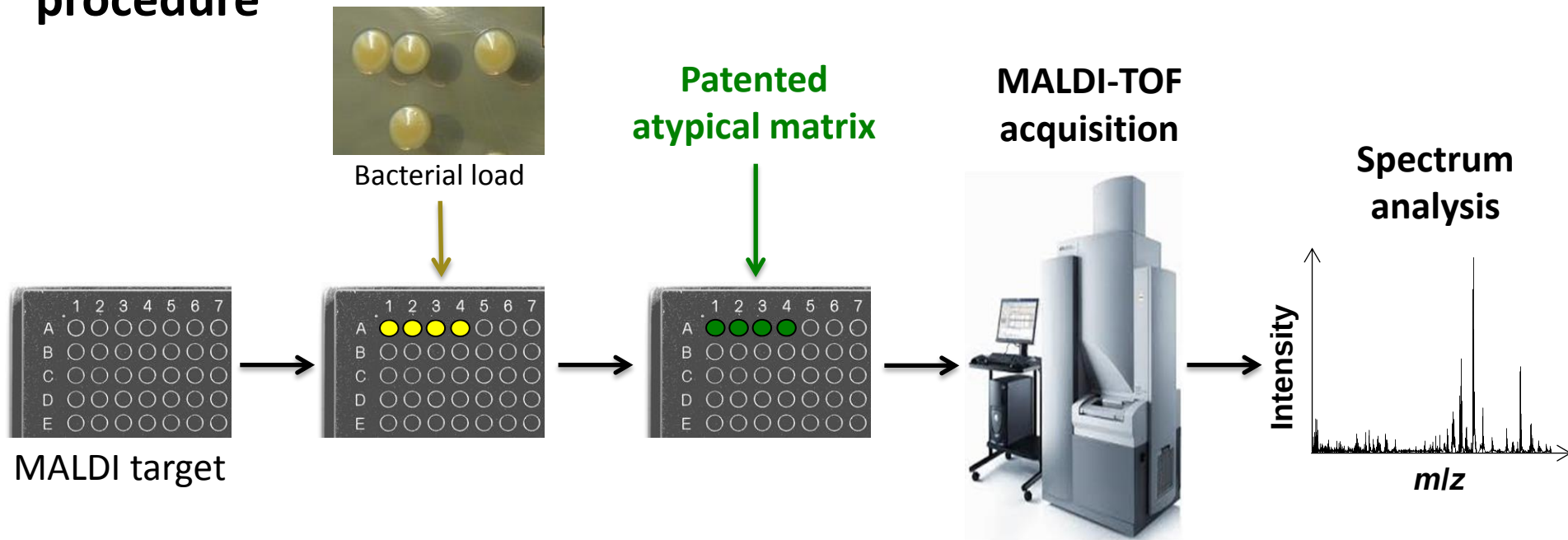


Routine workflow



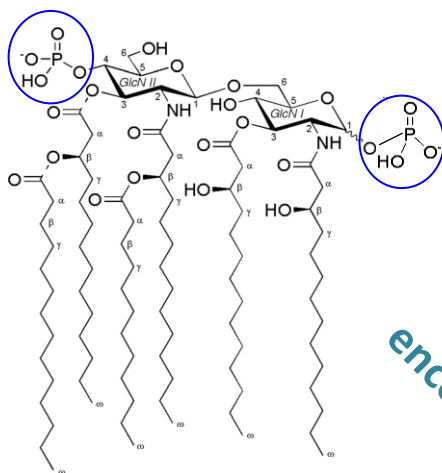
METHOD : Extraction and identification of lipid A modifications directly on intact bacteria

**15 min total
procedure**



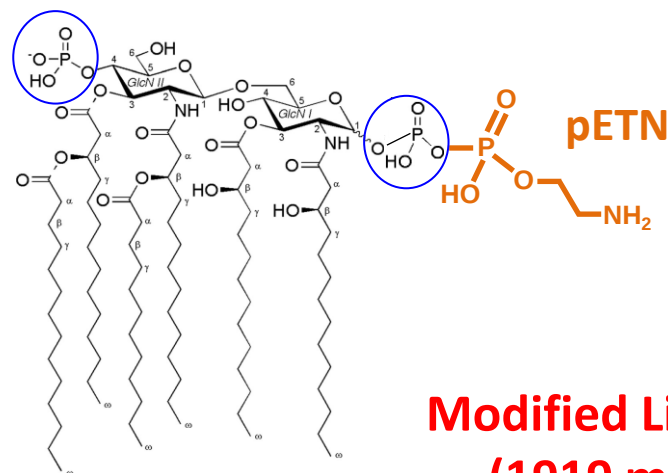
SUSCEPTIBLE

RESISTANT



Lipide A natif
(1796 m/z)

--- Chromosome
encoded resistance



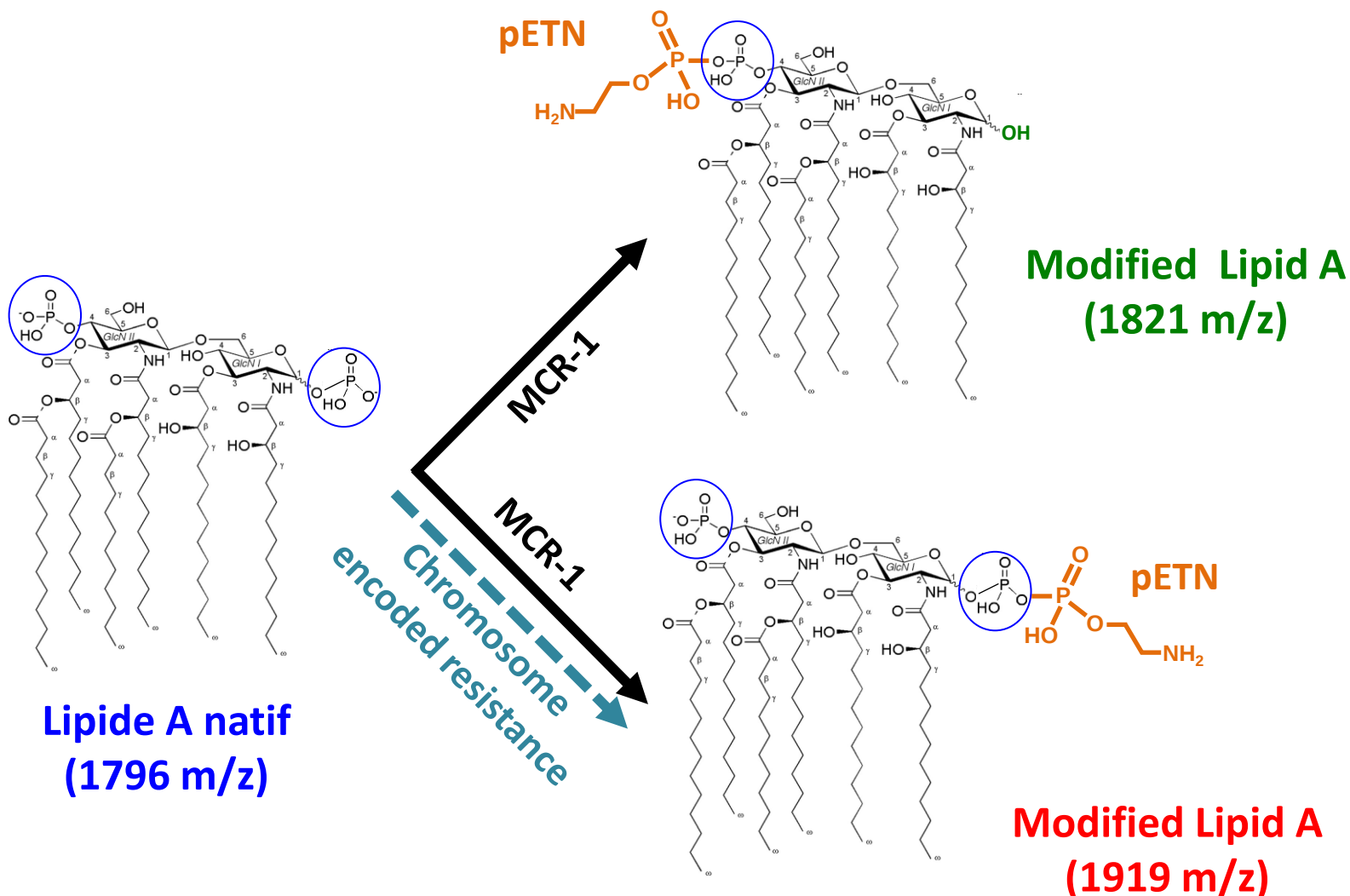
Modified Lipid A
(1919 m/z)

→ Plasmid encoded
resistance

pETN = Phosphoethanolamine
group

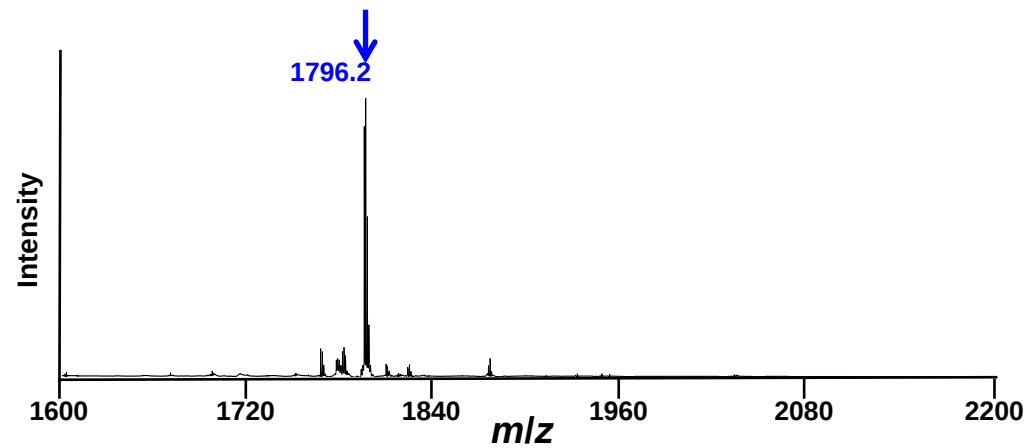
SUSCEPTIBLE

RESISTANT



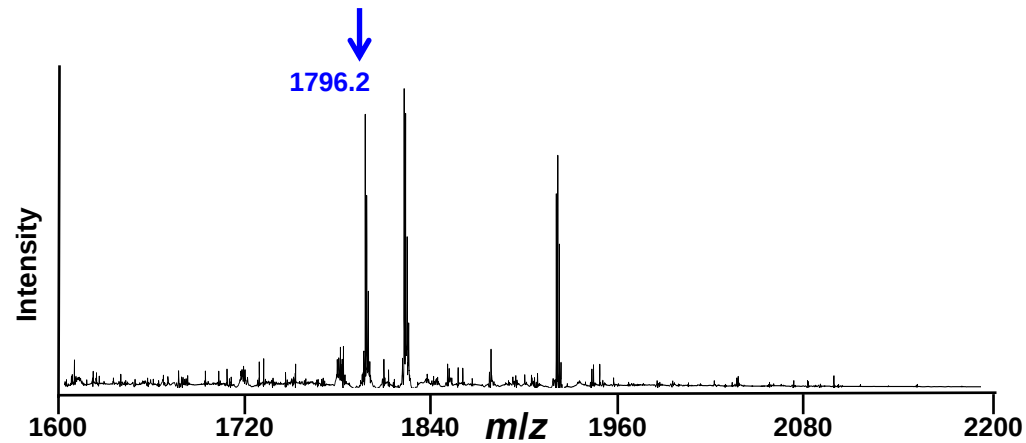
E. coli

Polymyxin
susceptible

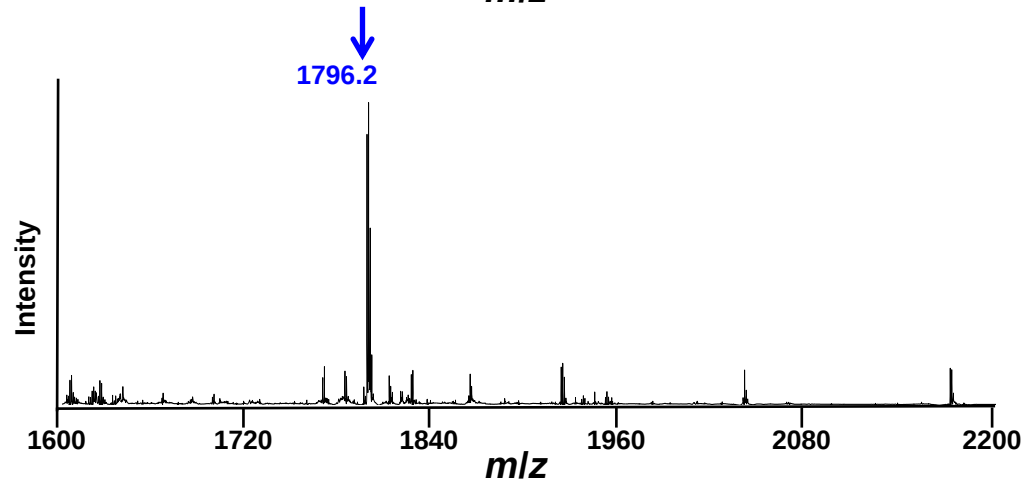


Native Lipid A
(1796.2 m/z)

Polymyxin
resistant
mcr-1 positive

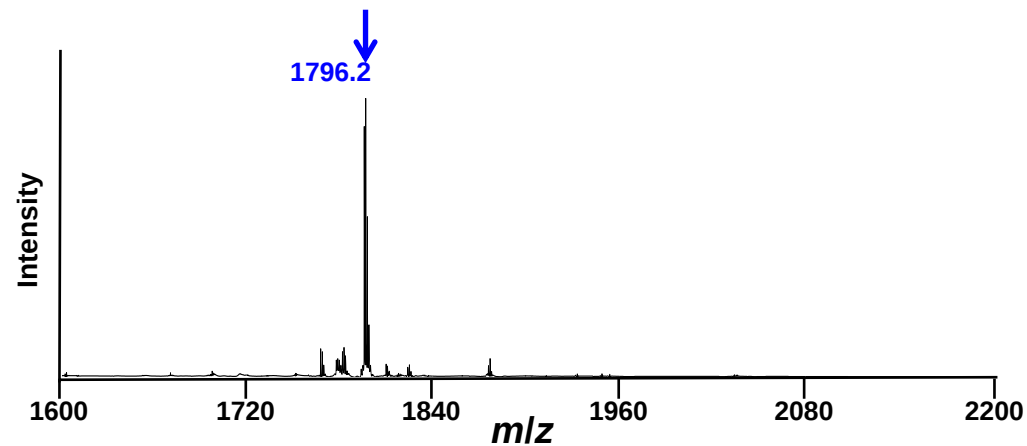


Polymyxin
resistant
mcr-1 negative



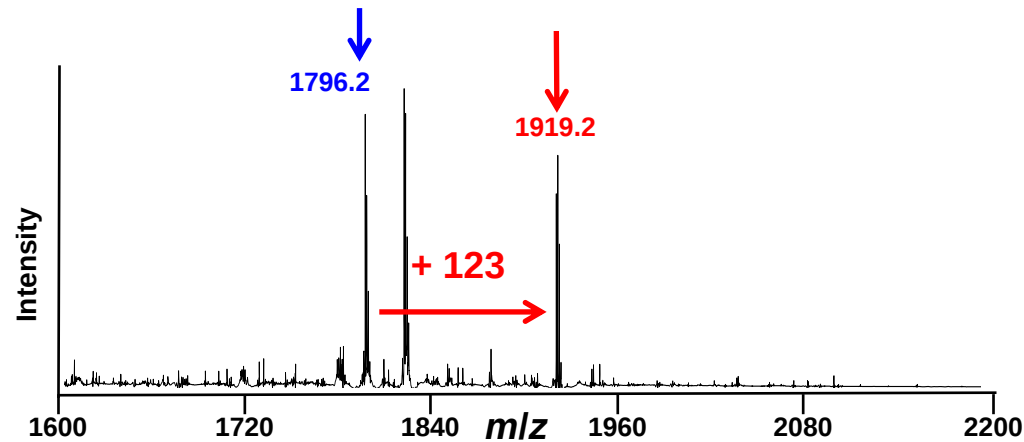
E. coli

Polymyxin
susceptible



Native Lipid A
(1796.2 m/z)

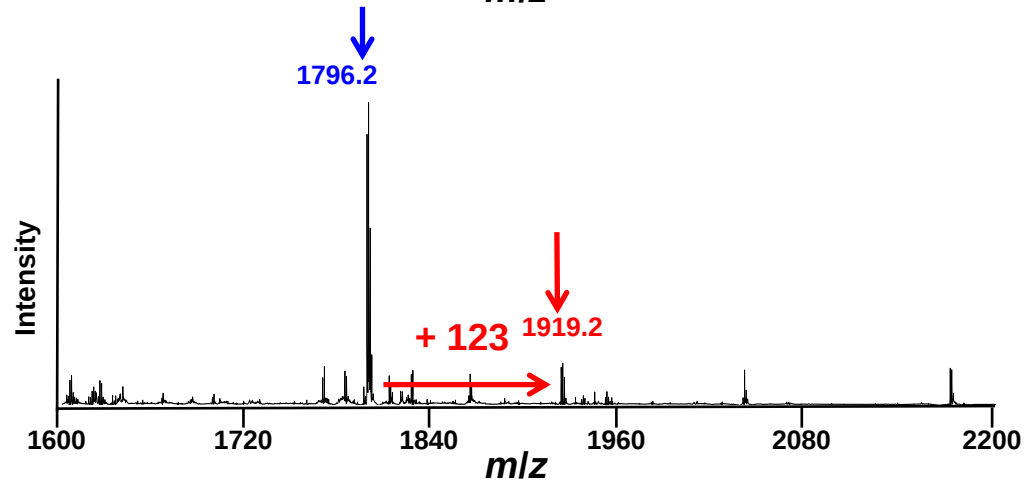
Polymyxin
resistant
mcr-1 positive
(Plasmid)



Native Lipid A
(1796.2 m/z)

Modified Lipid A
(1919.2 m/z)

Polymyxin
Resistant
(Chromosome)

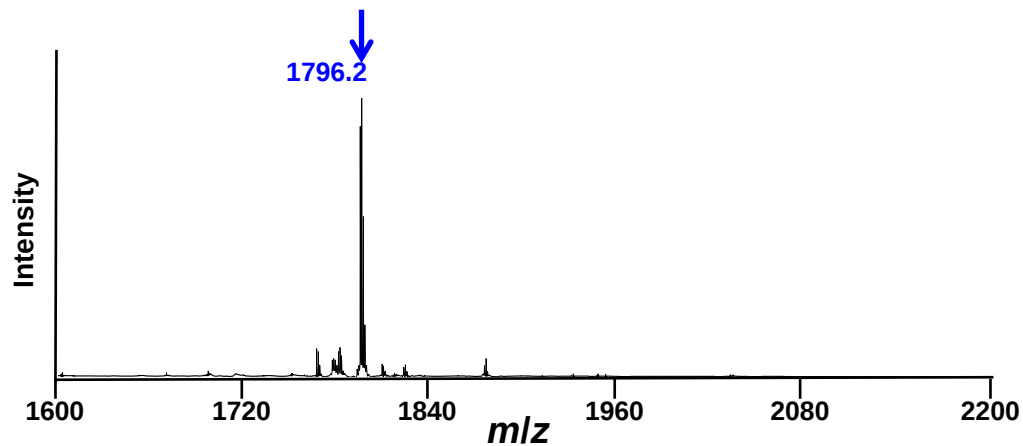


Native Lipid A
(1796.2 m/z)

Modified Lipid A
(1919.2 m/z)

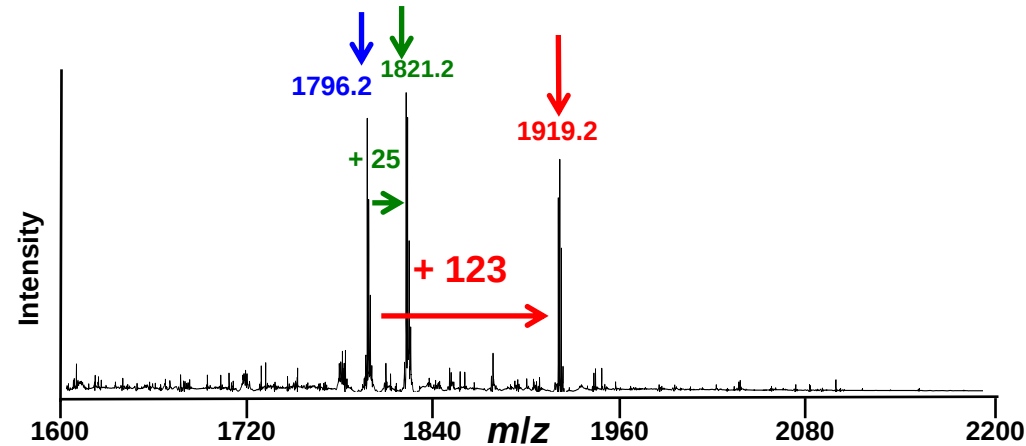
E. coli

Polymyxin
susceptible



Native Lipid A
(1796.2 m/z)

Polymyxin
resistant
mcr-1 positive

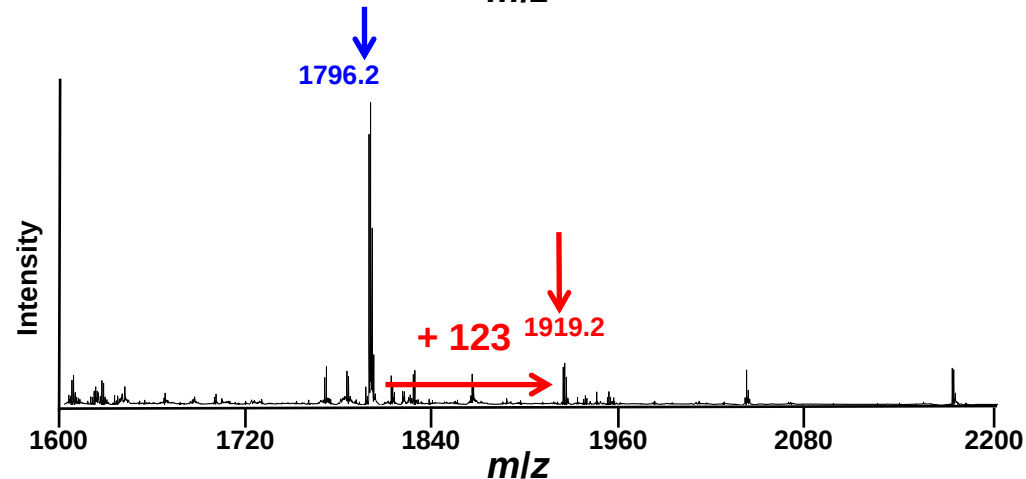


Native Lipid A
(1796.2 m/z)

Modified Lipid A
(1919.2 m/z)

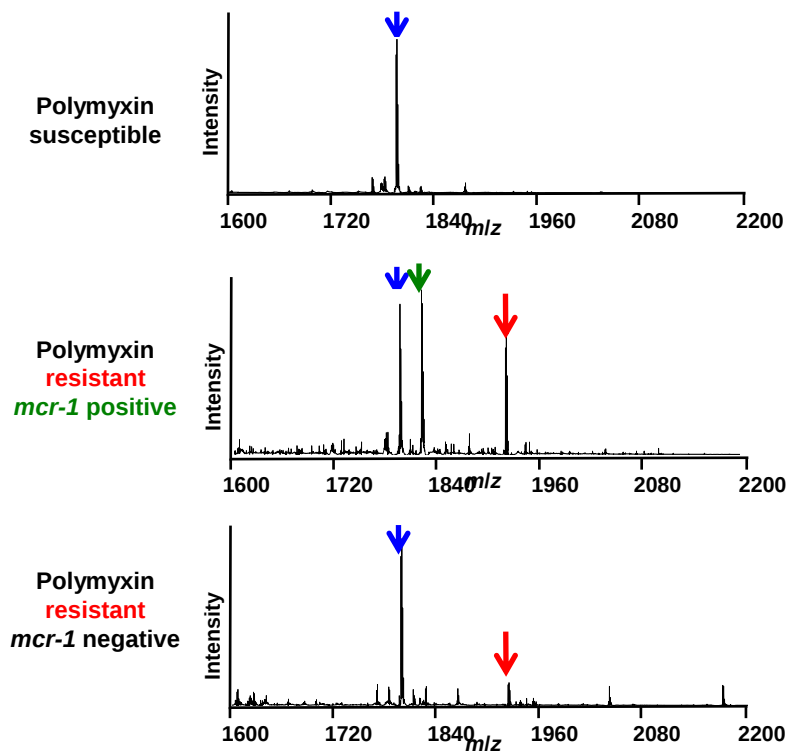
Modified Lipid A
(1821.2 m/z)

Polymyxin
resistant
mcr-1 negative

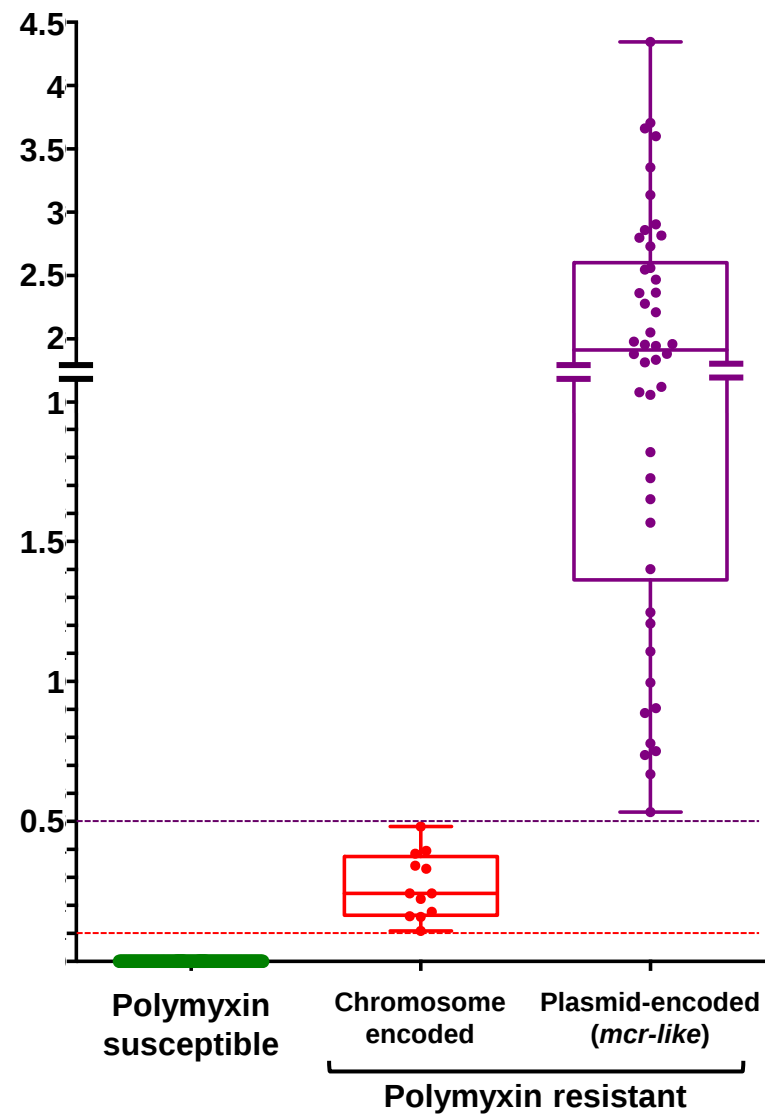


Native Lipid A
(1796.2 m/z)

Modified Lipid A
(1919.2 m/z)



$$PRR_{E. coli} = \frac{I_{1919} + I_{1821}}{I_{1796}}$$



Already validated on :

- ***E. coli*** (n=79) including 33 polymyxin-resistant strains within 29 MCR producers (18 MCR-1, two MCR-1.5, three MCR-2, two MCR-3 and four MCR-5)
- **Prospective study : 78 carbapenemase-producing *E. coli*** including 3 MCR-1 producers

Conclusions

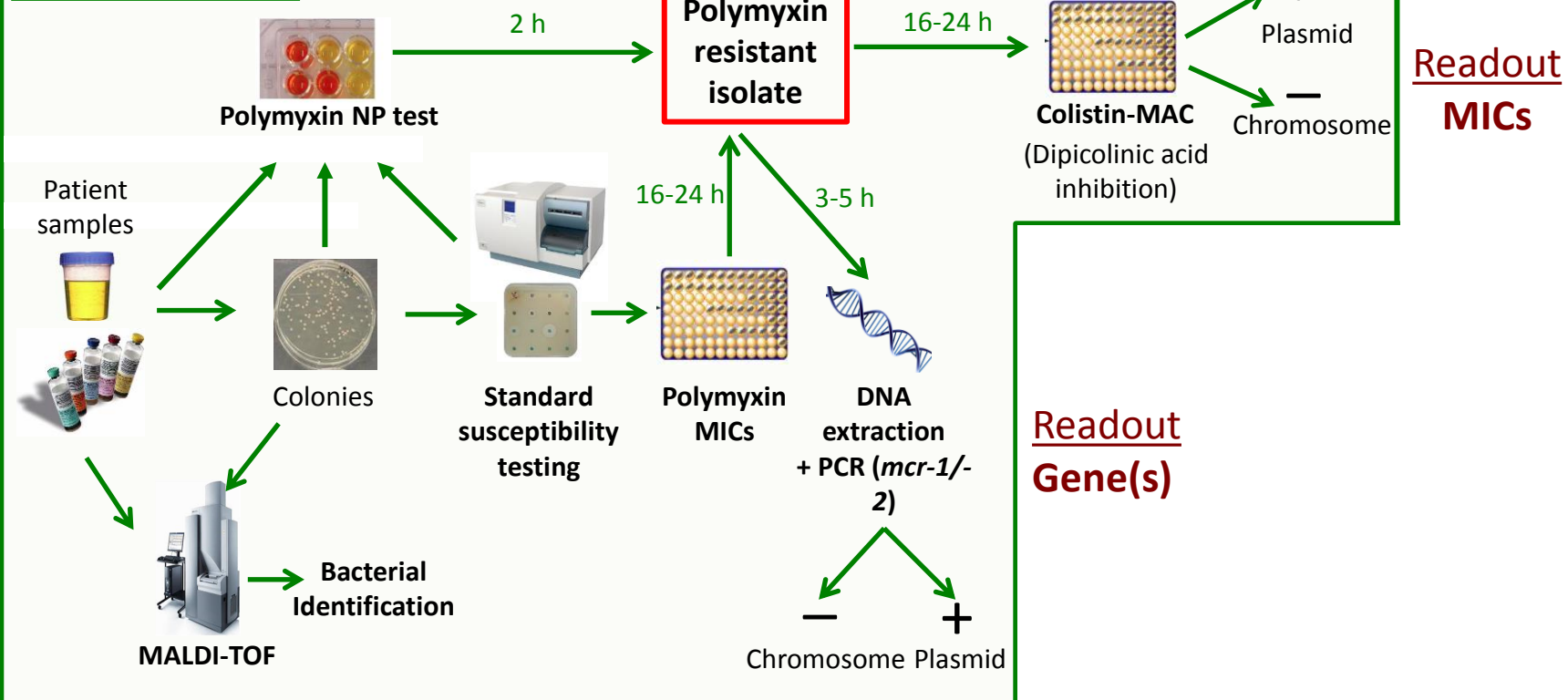
- **Rapid** (< 15 min) and **cost-effective** technique that offers a reliable tool for identification of polymyxin resistant *Enterobacteriaceae*
- **Discrimination between chromosome and plasmid-encoded** resistance in *Enterobacteriaceae*
- **Also works on non-fermenters** such as *Acinetobacter baumannii*

Day 0 Day 1 Day 2 Day 3 Day 4 1-3 weeks

Research workflow



Routine workflow



Day 0 Day 1 Day 2 Day 3 Day 4 1-3 weeks

Research workflow

Liters of bacterial culture



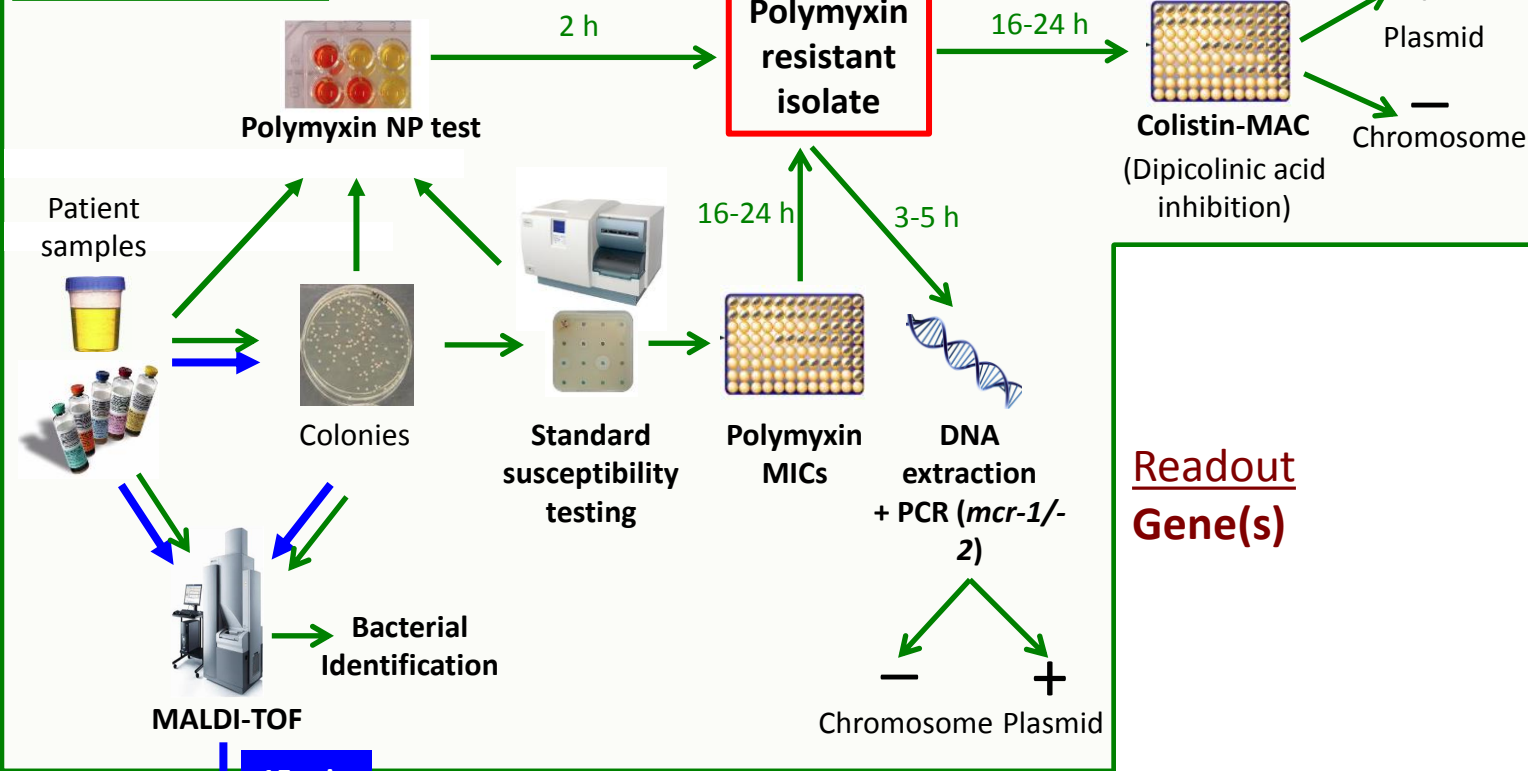
Lipid extraction



MALDI-TOF

Readout
Lipid A

Routine workflow



Readout
MICs

Readout
Gene(s)

MALDI assay
Polymyxin susceptibility (R / S)
AND
Plasmid vs chromosome
encoded resistance

Readout
Lipid A

Détection de protéines directement responsables de la résistance (β -lactamases, PLP2a)

- ❑ Pour les **protéines non détectables par spectrométrie de masse globale** sur bactéries entières, possibilité d'utiliser **une approche MS/MS**
- ❑ Extraction protéique + digestion + LC-MS/MS
- ❑ Identification profil de fragmentation compatible avec la masse ionisée du peptide parental
- ❑ Applications: PLP2a (SARM), quelques BLSE (CTX-M-1 groupe), quelques carbapénèmases (VIM-1)

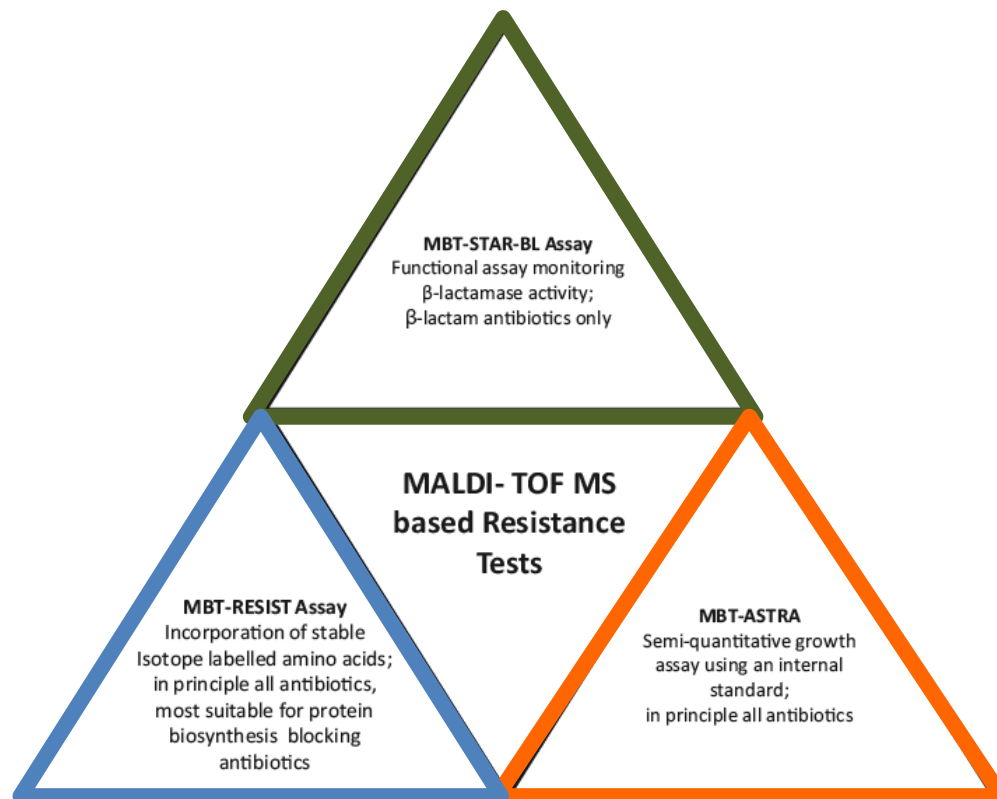
CONCLUSIONS

- ❑ Différentes techniques utilisant la technologie MALDI-TOF sont en cours de développement avec **2 types de stratégies** :
 - Détection de la sensibilité sans aucune notion sur le mécanisme de résistance = Antibiogramme. Ex: Système ASTRA
 - Détection d'un mécanisme de résistance sans notion sur la sensibilité = Tests complémentaires Ex: Détection des carbapénèmases
- ❑ **Une seule technique commercialisée** pour la détection des carbapénèmases
- ❑ **Difficultés de standardisation**

MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing?



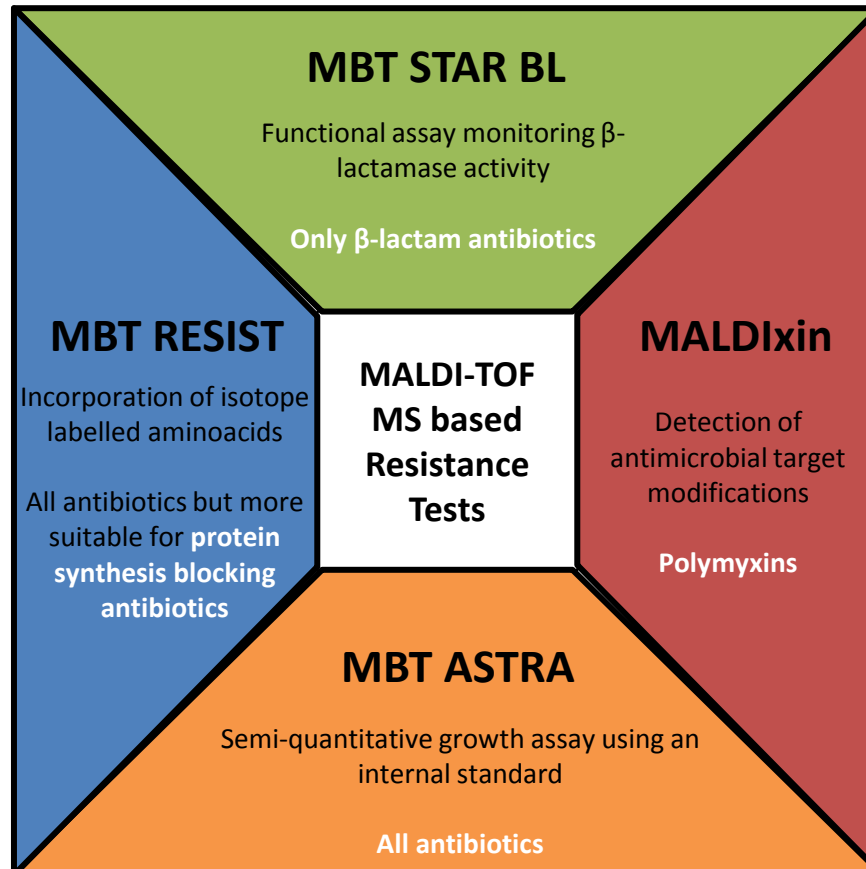
Katrin Sparbier^a, Sören Schubert^b, Markus Kostrzewa^{a,*}



MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing?



Katrin Sparbier^a, Sören Schubert^b, Markus Kostrzewa^{a,*}



Merci de votre attention



Imperial College
London



MRC | MRC Centre for
Molecular Bacteriology
and Infection