



## **Роль «MALDI-TOF» в диагностике бактериальных инфекций в период пандемии**

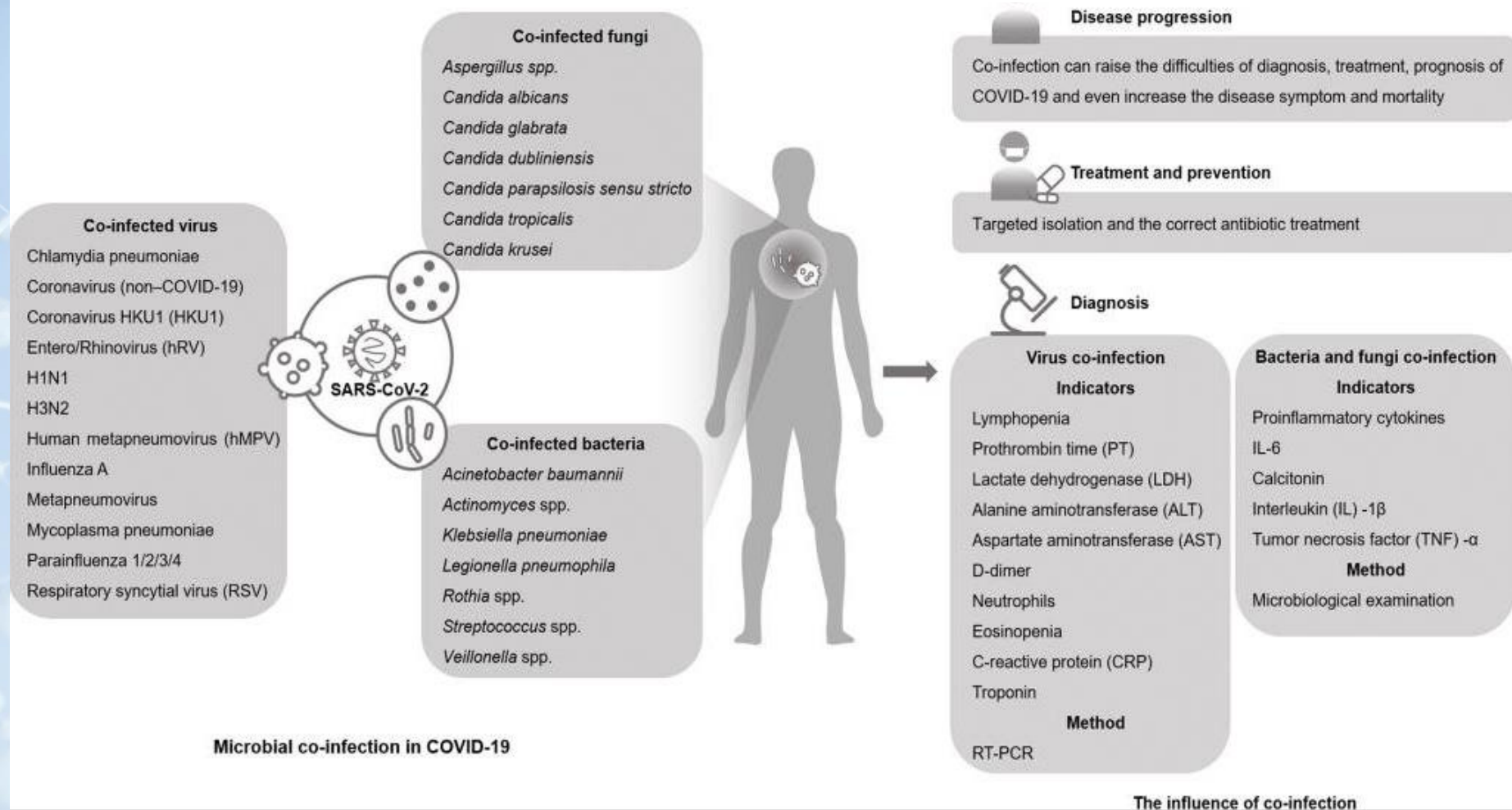


Лавриненко А.В.

27.10.2021

## The microbial coinfection in COVID-19

Xi Chen,<sup>#1,2</sup> Binyou Liao,<sup>#1</sup> Lei Cheng,<sup>1,2</sup> Xian Peng,<sup>1</sup> Xin Xu,<sup>1,2</sup> Yuqing Li,<sup>1</sup> Tao Hu,<sup>1,2</sup> Jiyao Li,<sup>1,2</sup> Xuedong Zhou,<sup>1,2</sup> and Biao Ren<sup>1</sup>



## The microbial coinfection in COVID-19

Xi Chen,<sup>#1,2</sup> Binyou Liao,<sup>#1</sup> Lei Cheng,<sup>1,2</sup> Xian Peng,<sup>1</sup> Xin Xu,<sup>1,2</sup> Yuying Li,<sup>1</sup> Tao Hu,<sup>1,2</sup> Jiyao Li,<sup>1,2</sup> Xuedong Zhou,<sup>1,2</sup> and Biao Ren<sup>✉1</sup>

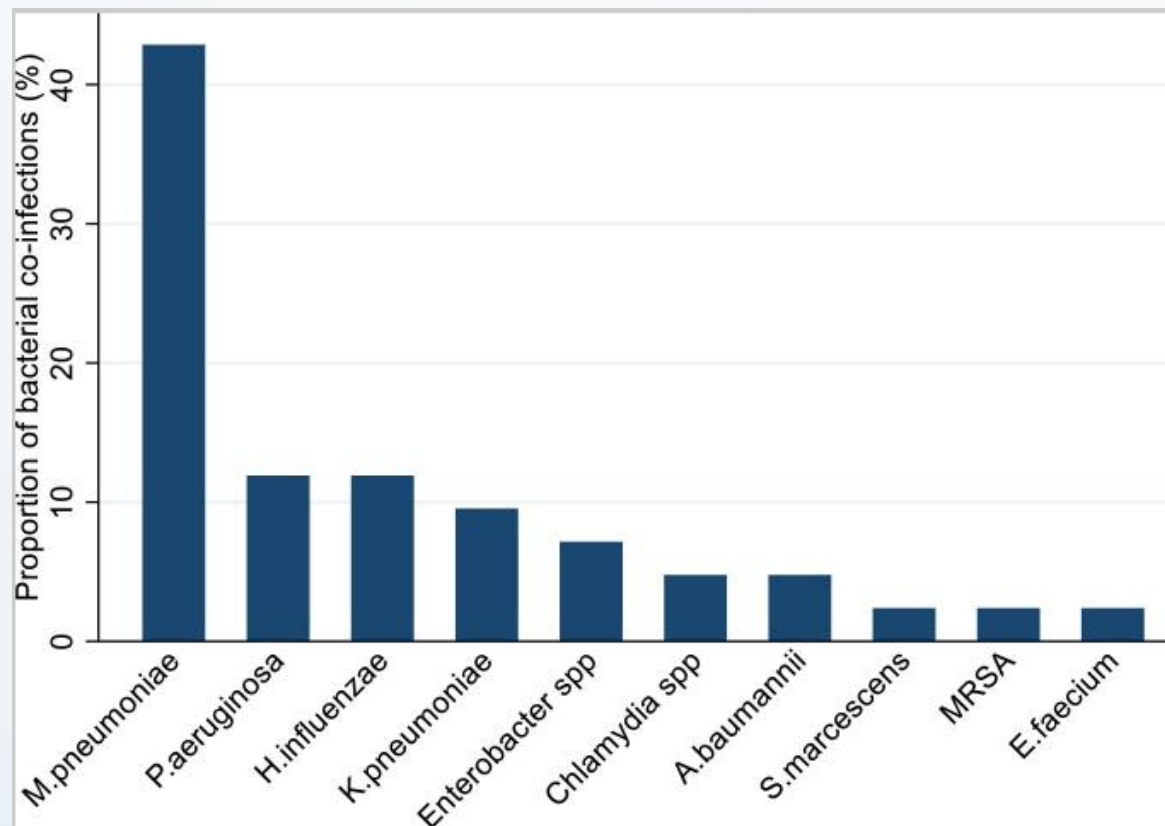
Appl Microbiol Biotechnol. 2020 Aug 11 : 1–9.

doi: [10.1007/s00253-020-10814-6](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10814-6) [Epub ahead of print]

| Microbial species | Coinfected microorganisms         | References                                |
|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|
| Virus             | Chlamydia pneumoniae              | (Lin et al. <a href="#">2020</a> )        |
|                   | Coronavirus (nonCOVID-19)         | (Richardson et al. <a href="#">2020</a> ) |
|                   | Coronavirus HKU1 (HKU1)           | (Wang et al. <a href="#">2020a, b</a> )   |
|                   | Enterorhinovirus (hRV)            | (Kim et al. <a href="#">2020</a> )        |
|                   | H1N1                              | (Zhang et al. <a href="#">2020</a> )      |
|                   | H3N2                              |                                           |
|                   | Human metapneumovirus (hMPV)      |                                           |
|                   | Influenza A                       |                                           |
|                   | Metapneumovirus                   |                                           |
|                   | Mycoplasma pneumoniae             |                                           |
|                   | Parainfluenza 1/2/3/4             |                                           |
|                   | Respiratory syncytial virus (RSV) |                                           |
| Bacteria          | <i>Acinetobacter baumannii</i>    | (Zhang et al. <a href="#">2020</a> )      |
|                   | <i>Actinomyces</i> spp.           | (Gu et al. <a href="#">2020</a> )         |
|                   | <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | (Chen et al. <a href="#">2020</a> )       |
|                   | <i>Legionella pneumophila</i>     |                                           |
|                   | <i>Rothia</i> spp.                |                                           |
|                   | <i>Streptococcus</i> spp.         |                                           |
|                   | <i>Veillonella</i> spp.           |                                           |
| Fungi             | <i>Aspergillus</i> spp.           | (Verweij et al. <a href="#">2020</a> )    |
|                   | <i>Candida albicans</i>           | (Chen et al. <a href="#">2020</a> )       |
|                   | <i>Candida glabrata</i>           | (Salehi et al. <a href="#">2020</a> )     |

- Первичная/вторичная бактериальная пневмония при вирусной инфекции от 11 до 35% (Klein, 2016)
- При SARS COV от 20 до 70,6% (Zheng, 2003)
- SARS-CoV-2 – 7,7% (Zhang, 2020)
- SARS-CoV-2 - 11% (Huttner, 2020)

## Бактериальные патогены, обнаруженные у пациентов с COVID-19.



[Infect Control Hosp Epidemiol. 2020 Apr 13 : 1–2.](#)

Published online 2020 Apr 13. doi: [10.1017/ice.2020.126](https://doi.org/10.1017/ice.2020.126)

| Pathogen isolates                        | 43 |      |
|------------------------------------------|----|------|
| <i>Coagulase negative staphylococcus</i> | 12 | 27.9 |
| <i>Acinetobacter</i>                     | 9  | 20.9 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>            | 6  | 14.0 |
| <i>Enterococcus faecium</i>              | 5  | 11.6 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>             | 4  | 9.3  |
| <i>Escherichia coli</i>                  | 2  | 4.6  |
| <i>Candida albicans</i>                  | 2  | 4.6  |
| <i>Mucor</i>                             | 2  | 4.6  |
| Other                                    | 1  | 2.3  |
| <b>Mortality</b>                         | 10 | 15.4 |

## Bacterial co-infections with SARS-CoV-2

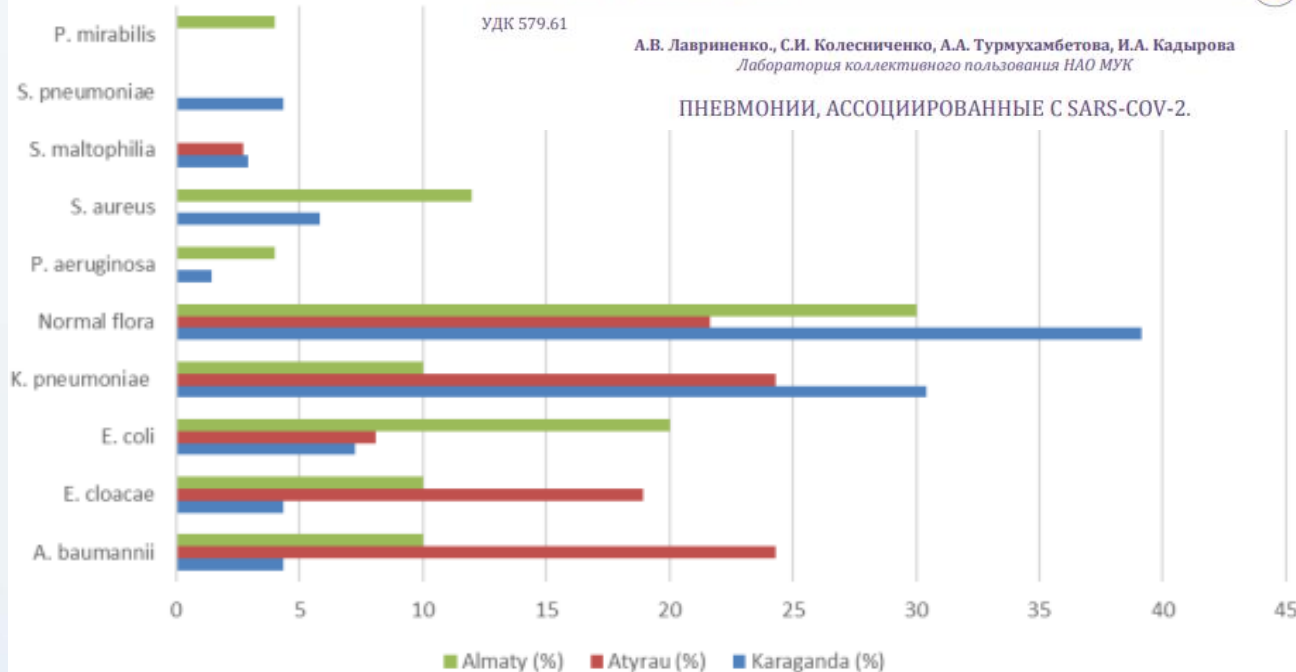
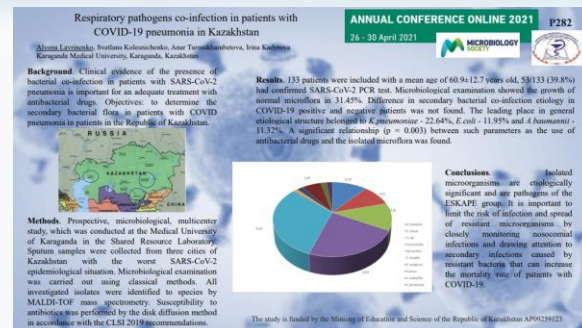
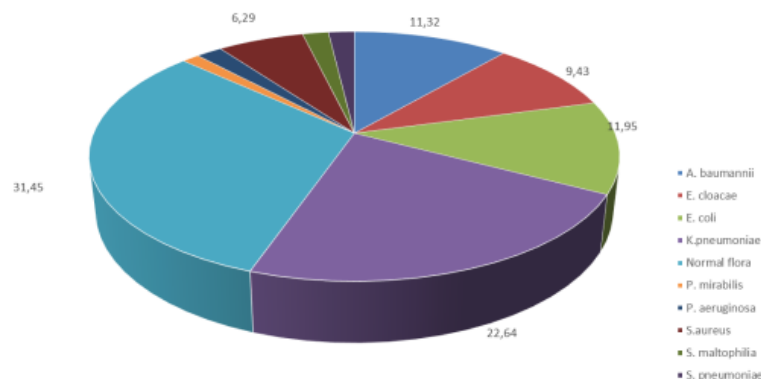
Rasoul Mirzaei<sup>1,2</sup> | Pedram Goodarzi<sup>3</sup> | Muhammad Asadi<sup>4</sup> | Ayda Soltani<sup>5</sup> |  
Hussain ali abraham Aljanabi<sup>4,6</sup> | Ali Salimi Jeda<sup>7</sup> | Shirin Dashtbin<sup>8</sup> |  
Saba Jalalifar<sup>8</sup> | Rokhsareh Mohammadzadeh<sup>8</sup> | Ali Teimoori<sup>9</sup> |  
Kamran Tari<sup>2,10</sup> | Mehdi Salari<sup>2,10</sup> | Sima Ghiasvand<sup>1</sup> | Sima Kazemi<sup>1</sup> |  
Rasoul Yousefimashouf<sup>1</sup> | Hossein Keyvani<sup>1</sup> | Sajad Karampoor<sup>7</sup>

**TABLE 3** List of bacterial co-infection with COVID-19

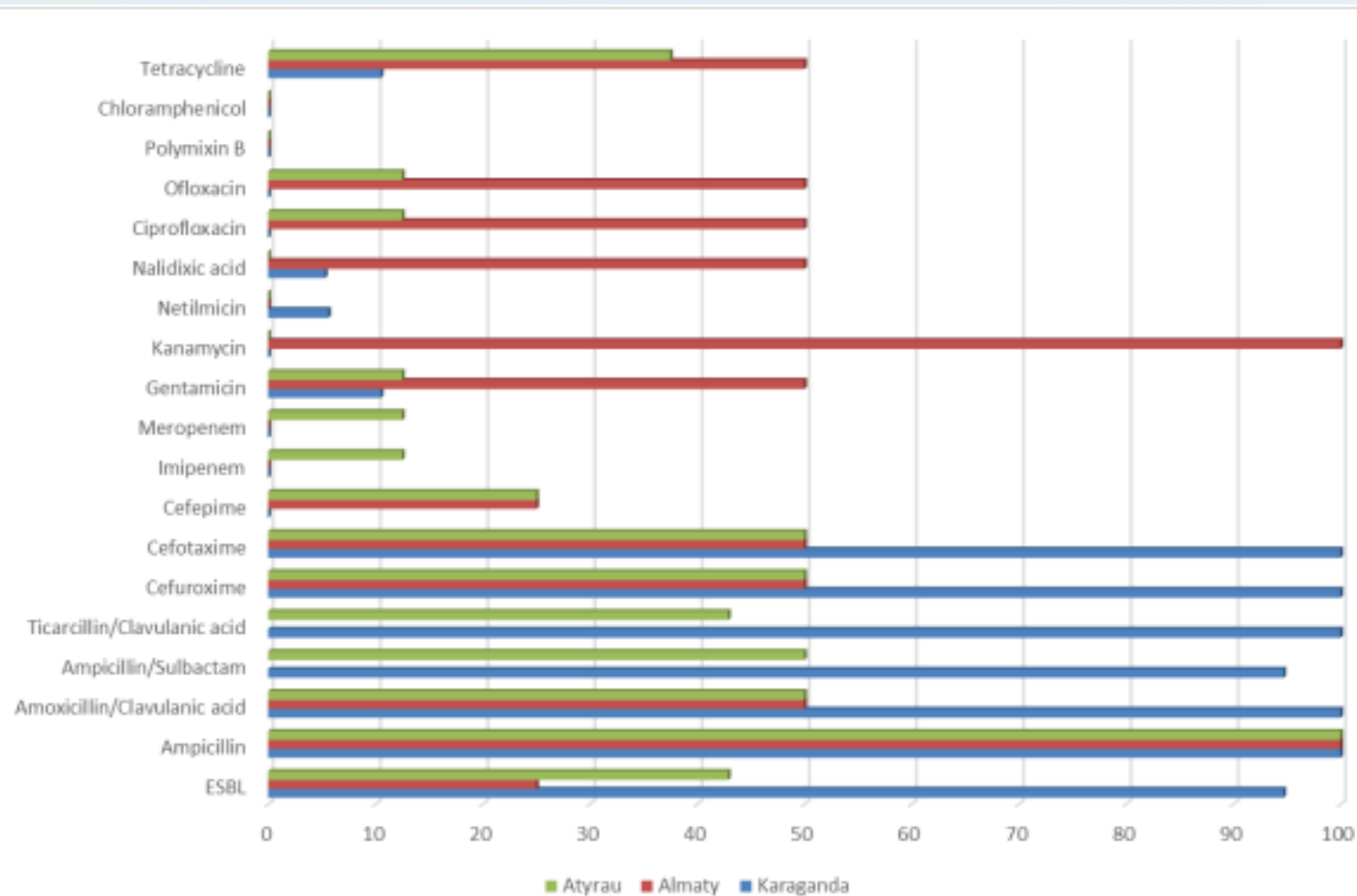
| Bacterium                       | Infection                                                                               | References |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>    | Necrotizing pneumonia                                                                   | 152        |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>    | Exacerbate clinical symptoms, increase morbidity and prolonged intensive care unit stay | 153        |
| <i>Legionella pneumophila</i>   | Pneumonia                                                                               | 154        |
| <i>Enterobacter cloacae</i>     | Pneumonia                                                                               | 155        |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>  | Pneumonia                                                                               | 146,155    |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>    | Pneumonia                                                                               | 146        |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>    | Interstitial pneumonia                                                                  | 149        |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>    | Not reported                                                                            | 151        |
| <i>Legionella pneumophila</i>   | Not reported                                                                            | 151        |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Not reported                                                                            | 151        |
| <i>Prevotella</i>               | Not reported                                                                            | 156–158    |
| <i>Haemophilus</i>              | Not reported                                                                            | 158,159    |
| <i>Lautropia</i>                | Not reported                                                                            | 159        |
| <i>Cutibacterium</i>            | Not reported                                                                            | 159        |



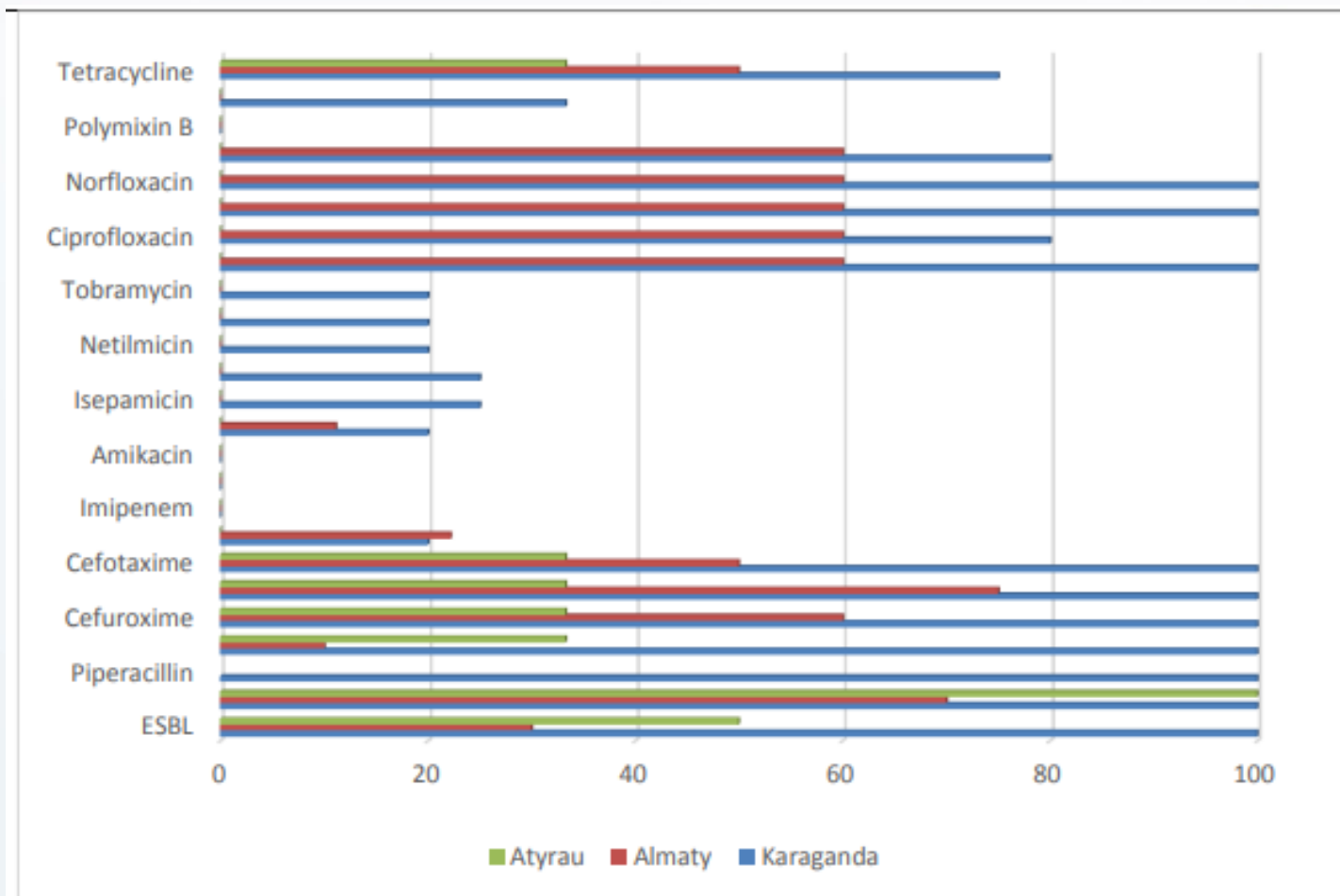
# Микроорганизмы, выделенные из мокрот пациентов с пневмонией (%)



## Процент устойчивых *K.pneumoniae*

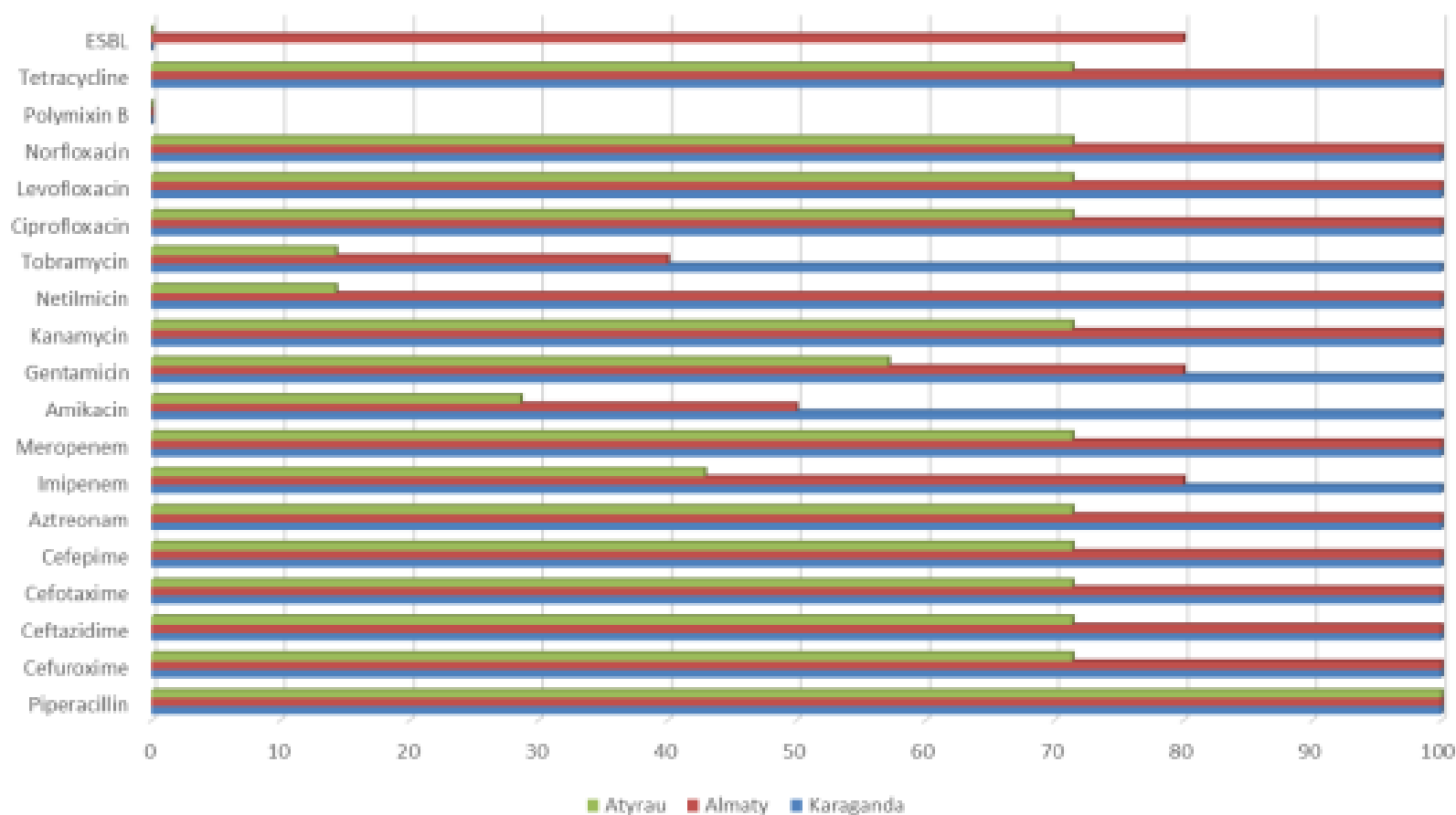


## Процент устойчивых *E.coli*

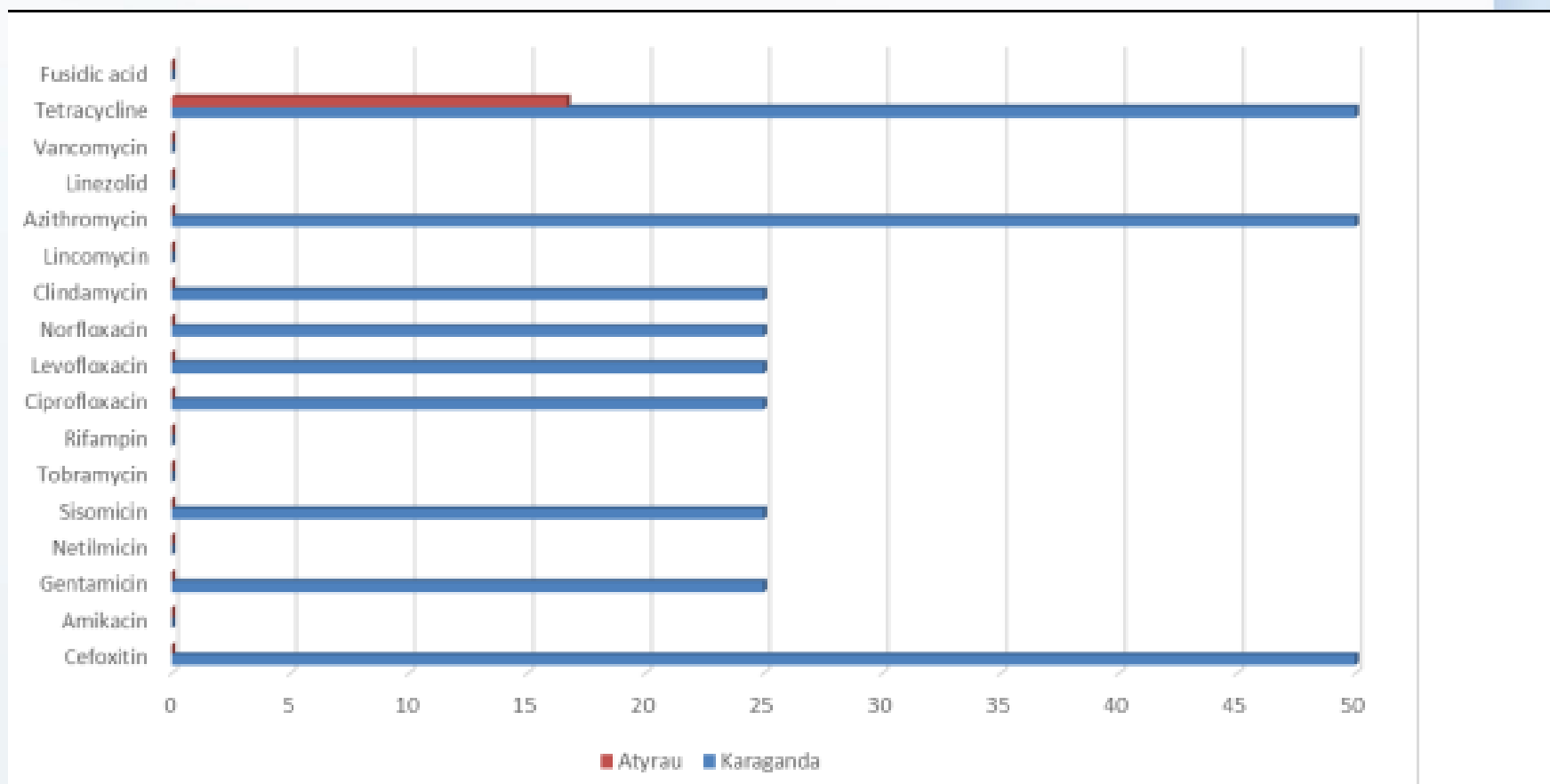




## Процент устойчивых *A.baumannii*



## Процент устойчивых *S.aureus*





**EP838**  
**GROWTH OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN THE HEMATOLOGY DEPARTMENT OF**  
**CENTRAL KAZAKHSTAN DURING THE COVID-19 PANDEMIC**

Topic: 30. Infections in hematology (incl. supportive care/therapy)

Keywords: COVID-19 Drug resistance

Ludmila TURGUNOVA<sup>1</sup>, Anton KLODZINSKIY<sup>2</sup>, Alena LAVRINENKO<sup>3</sup>, Svetlana KOLESNICHENKO<sup>3</sup>, Nazar SEIDALIN<sup>2</sup>, Alena ZINCHENKO<sup>2</sup>

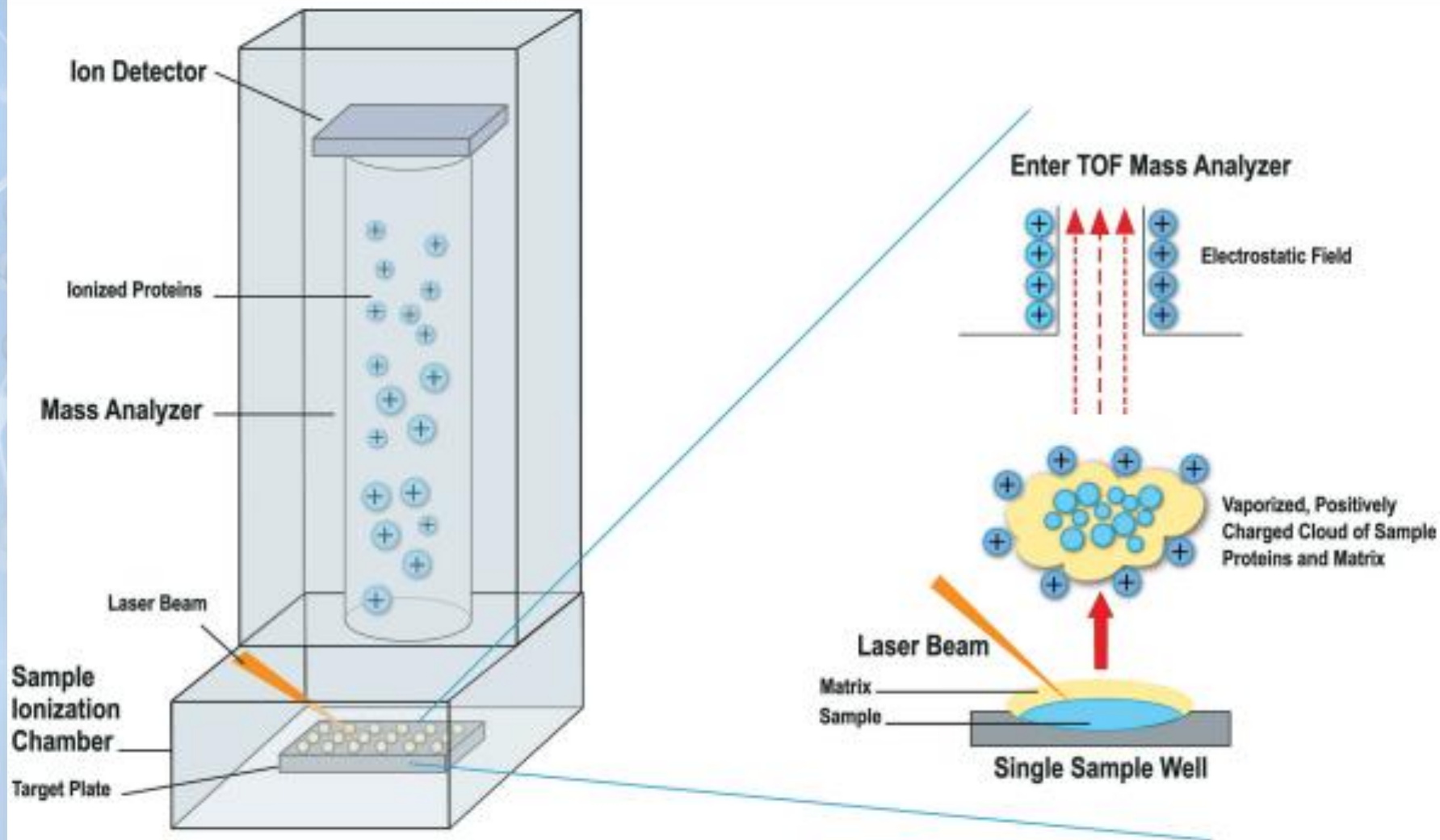
- ❑ грамотрицательная флора
- ❑ различия в структуре бактерий до и во время пандемии:
  - увеличение *P. aeurogenosa* с 29,7% до 55,3%
  - резкое снижение роста *Enterococcus faecalis*, с 40,5% до 10,6%
  - появление штаммов *P. aeurogenosa*, продуцирующих карбапенемазы до 30,4% в период пандемии
- MRSA после локдауна с 11,8% до 35%

- Рутинное биохимическое определение

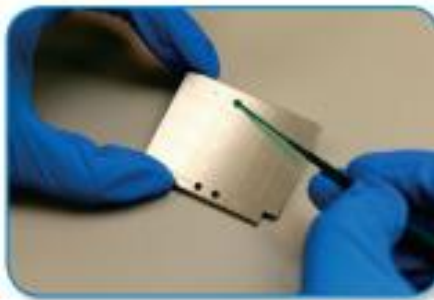


- Автоматизированная система
- Идентификация+АБ
- Идентификация
- АБ









**Add Formic Acid  
and Matrix and Dry**



**Mayo Clinic  
Laboratory Services Report  
MICROBIOLOGY**

Fungal Culture, Routine

FINAL

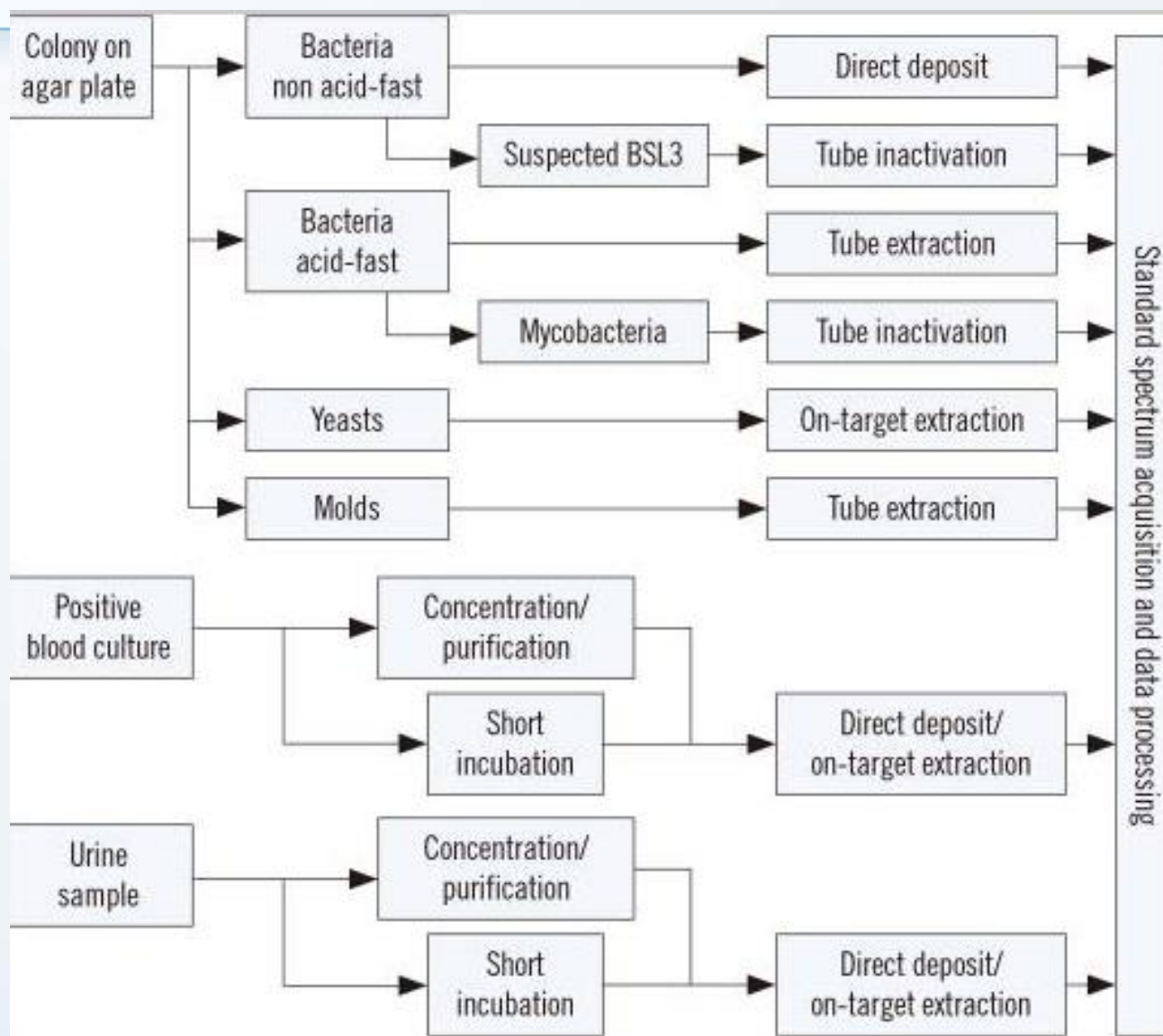
07/25/2012 14:42

MCR

**CANDIDA PARAPSILOSIS Many**  
*Identified by mass spectrometry.*



## Блок-схемы применимых процедур подготовки образцов в (MALDI-TOF MS)



| Прибор                                                           | MALDI Biotyper (Microflex LT)                                     | Бак.анализатор                            |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Используемый образец                                             | первичный посев                                                   | вторичный посев (пересев)                 |
| Скорость идентификации образца после загрузки в прибор           | 60-90 секунд                                                      | 6-8 часов                                 |
| Время идентификации от получения первичного образца              | около суток                                                       | около 2-3 суток                           |
| Идентификация МО из первичного материала                         | моча, ликвор, положительные гемокультуры, кал                     | нет                                       |
| Точность идентификации относительно 16S рРНК                     | 98-95%                                                            | 85-75%                                    |
| Возможность идентификации смешанной культуры                     | одновременная идентификация смеси 2х культур разнородовых МО, mix | нет                                       |
| Особые возможности                                               | микобактерии, грибы, вирусы, MBT Star BL, MBT RESIST, MBT ASTRA   | определение антибиотико-резистентности МО |
| Максимальная производительность прибора за рабочий день (8часов) | 1600 identifications МО                                           | 96 identifications МО                     |
| Стоимость реагентов для одной идентификации                      | 15-25 тенге                                                       | 2500 – 4000 тенге                         |

Сепсис - это опасное для жизни нарушение функции органа, вызванное нерегулируемой реакцией хозяина на инфекцию (ВОЗ)

### Ручной метод

- 10 дней



### Автоматизированный метод

- 5-7 дней



- Аэробы/анаэробы
- Взрослые/дети



- Sygnal (5 дней)
- Аэробный/анаэробный
- Любая биологическая жидкость
- Объемы



# Идентификация бактерий из положительной гемокультуры

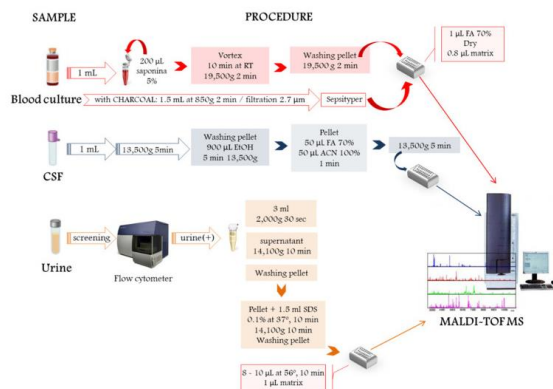
## Набор MALDI Sepsityper™ Kit

### Идентификация бактерий из положительной гемокультуры

- Прямое нанесение осадка после центрифугирования
- Применение набора MALDI Sepsityper
  - Обеспечивает достоверный результат в положительных образцах гемокультур.
  - При анализе инфекций крови, идентификация будет проведена на день раньше по сравнению с «классическими» методами.

#### Протокол MALDI Sepsityper

1. Отберите 1 мл гемокультуры в реакционную пробирку
2. Добавьте Lysis Buffer, перемешайте и отцентрифугируйте
3. Добавьте Washing Buffer перемешайте и отцентрифугируйте
4. Растворите осадок в воде
5. Проведите экстракцию белков по стандартному протоколу Bruker для идентификации микроорганизмов
6. Нанесите 1мкл экстракта на мишень и после высыхания покройте сверху HCCA-матрицей



### 5. Прямая идентификация микробов в моче или спинномозговой жидкости (CSF)

[Molecules](#). 2020 Oct; 25(20): 4775.

Published online 2020 Oct 17. doi: [10.3390/molecules25204775](https://doi.org/10.3390/molecules25204775)

PMCID: PMC7587594

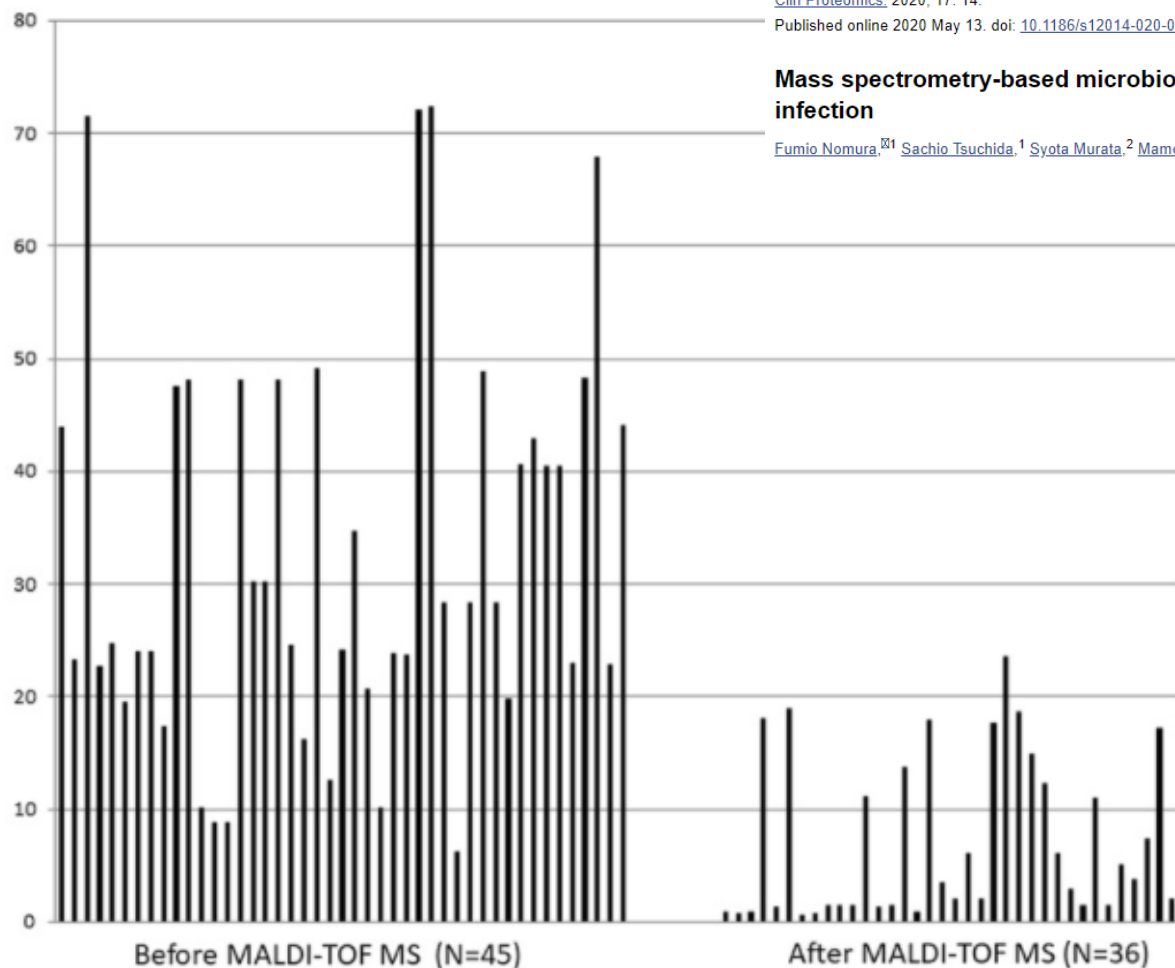
PMID: [33080897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33080897/)

#### Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology

[Sachio Tsuchida](#), [Hiroshi Umemura](#),\* and [Tomohiro Nakayama](#)



[hours]



[Clin Proteomics](#), 2020; 17: 14.

Published online 2020 May 13. doi: [10.1186/s12014-020-09278-7](https://doi.org/10.1186/s12014-020-09278-7)

PMCID: PMC722329

PMID: [32435163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32435163/)

## Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection

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>



# Сравнение различных технологий для определения устойчивости к противомикробным препаратам

| Технология                | LOD<br>(КОЕ / мл)<br><sup>a</sup>     | Чувствительность<br>(%) <sup>b</sup> | Специфичность<br>(%) <sup>b</sup> | TAT<br><sup>c</sup> | Цена / образец (\$)                                       |
|---------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------|
| Молекулярная генетика     | 10 <sup>2</sup> – 2 × 10 <sup>4</sup> | 96–99                                | 96–99                             | 1–3 ч               | 5–50 <sup>2</sup>                                         |
| Биохимические методы      | 6 × 10 <sup>8</sup>                   | 90–99                                | 96–100                            | 30 мин – 2 ч        | 1–5 <sup>2</sup>                                          |
| Иммуноанализы             | 10 <sup>4</sup> – 10 <sup>6</sup>     | 96–100                               | 97–100                            | 20 мин.             | 7–15 <sup>2</sup> ЖС                                      |
| Электрохимические анализы | 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>9</sup>     | 95–96                                | 100                               | 5–30 мин.           | 1 (плюс 100 долларов за самодельную читалку) <sup>2</sup> |
| MALDI-TOF MS              | 10 <sup>5</sup> – 10 <sup>6</sup>     | 98–100                               | 92–100                            | 30 мин – 3 ч        | 1–10                                                      |

[Clin Microbiol Rev. 2019 Jan; 32\(1\): e00037-18.](#)

Published online 2018 Nov 28. doi: [10.1128/CMR.00037-18](#)

PMCID: PMC6302359

PMID: [30487165](#)

**Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for the Rapid Detection of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Beyond**

[Marina Oviaño<sup>a,b,\\*</sup>](#) and [German Bou<sup>da,b,\\*</sup>](#)

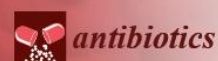


Clinical Microbiology Reviews®



## MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology as a Tool for the Rapid Diagnosis of Antimicrobial Resistance in Bacteria

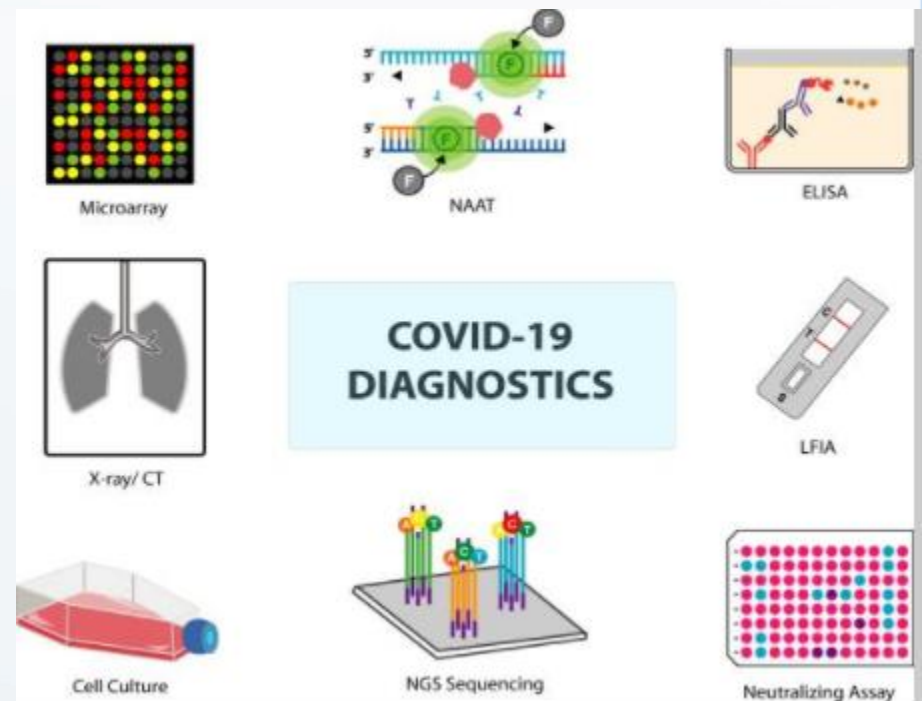
Eun-Jeong Yoon<sup>1,2,3</sup> and Seok Hoon Jeong<sup>2,3,\*</sup>

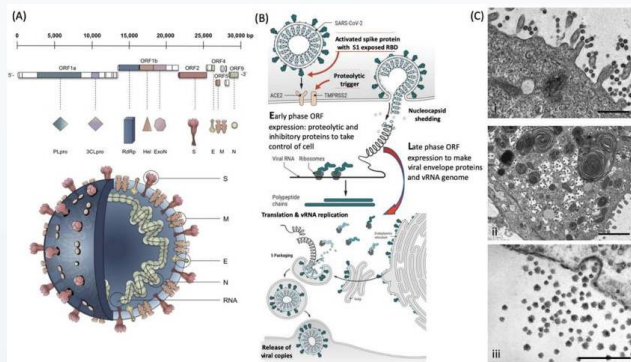


| Strategy                                | Target                                   | Target Resistance                             | Commercialized (Company) and/or Developing Products                                                                  |
|-----------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Antimicrobial susceptibility testing    | AUC <sup>1</sup> shift spectra (isotope) | All antimicrobials                            | MBT-ASTRA (Bruker)<br>MBT-Resist (Bruker)<br>DoT-MGA <sup>2</sup> (inv. <sup>3</sup> )                               |
| ID of the AMR clonal group              | Clone-specific spectra                   | Methicillin (MRSA)                            | ClinProtTools (Bruker)                                                                                               |
| ID of the modified antimicrobial drug   | Shift peak of the modified drug          | Beta-lactams<br>Cephalosporins<br>Carbapenems | MBT STAR <sup>®</sup> -BL (Bruker)<br>MBT STAR <sup>®</sup> -Cepha (Bruker)<br>MBT STAR <sup>®</sup> -Carba (Bruker) |
| ID of the modified antimicrobial target | Shift peak of the modified drug target   | Colistin                                      | MALDIxin test (inv.)                                                                                                 |
| Direct detection of the AMR determinant | Protein-specific peak                    | Carbapenems                                   | Aprodete <sup>TM</sup> KPC-CPE (Aprilis)                                                                             |
| Biomarker detection                     | Protein-specific peak                    | Carbapenems                                   | ClinProtTools (Bruker)                                                                                               |

| Mode of Detection            | Detection Methods                                                                                                                                                             |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Culture-based detection      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Virus propagation in cell lines</li> </ul>                                                                                             |
| Radiology based technology   | <ul style="list-style-type: none"> <li>X-Ray</li> <li>Chest Computed Tomography</li> </ul>                                                                                    |
| Molecular technology         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Real-Time RT-PCR</li> <li>Isothermal amplification</li> <li>CRISPR-Cas technology</li> <li>Lab-on-chip</li> </ul>                      |
| Immunoassay technology       | <ul style="list-style-type: none"> <li>ELISA</li> <li>Neutralization assay</li> <li>Chemiluminescent assay</li> <li>Lateral Flow Assay</li> <li>Dip-stick</li> </ul>          |
| Technology under development | <ul style="list-style-type: none"> <li>Aptamer</li> <li>Molecular imprinting technology (MIT)</li> <li>Microarray</li> <li>Biosensors</li> <li>MALDI-TOF profiling</li> </ul> |
| Sequencing technologies      | <ul style="list-style-type: none"> <li>Sanger-sequencing</li> <li>Next-generation sequencing</li> <li>Nanopore sequencing</li> </ul>                                          |

## Методы тестирования SARS-CoV-2

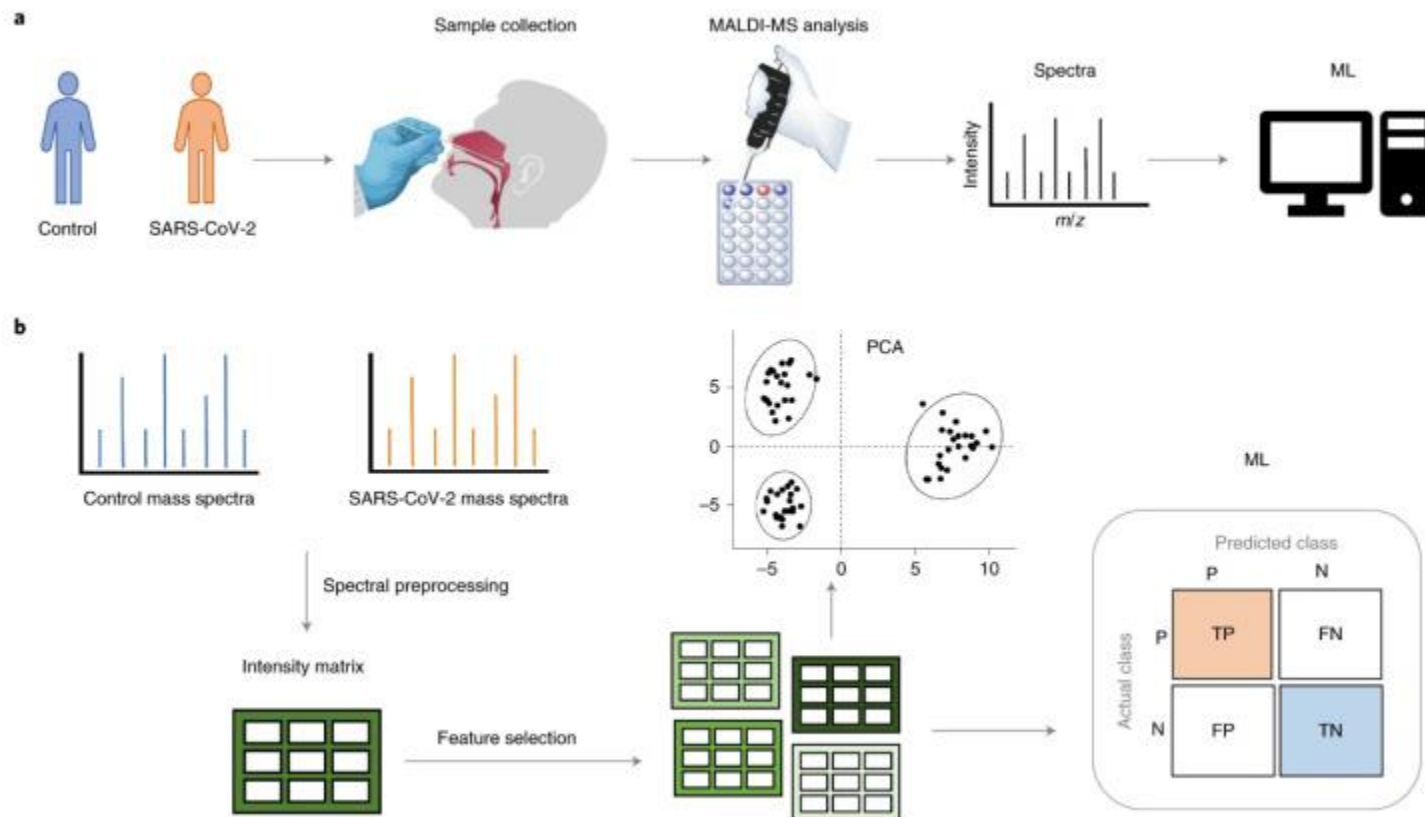




- Низкое содержание белка в вирусе ([Kliem and Sauer, 2012](#) )
- более высокая молекулярная масса вирусных белков (> 20000 Да)
- Использование стандартной матрицы (CHCA)

- Альтернативная матрица (синапиновая кислота (SA) (3- (4-гидрокси-3,5-диметоксифенил) проп-2-еновая кислота)
- Сохранение вирусной оболочки и белка, разрушая функциональную нуклеиновую кислоту ( облучение пробирок с образцами УФ-С в течение 15 мин)
- мазки, слюна и / или полоскание ротовой полости водой, сыворотка, моча
- Осаждение (удаление нежелательных объектов: альбумин) ацетоном
- Использование детергентов «LBSD-X» - разрушение вирусной оболочки и солубилизация вирусных белков

# Обнаружения SARS-CoV-2 в слизистой оболочке носа



*Nat. Biotechnol.* 38, 1168–1173

(2020). <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0644-7>

## Development of a Clinical MALDI-ToF Mass Spectrometry Assay for SARS-CoV-2: Rational Design and Multi-Disciplinary Team Work

Ray K. Iles,<sup>1,2,3,\*</sup> Raminta Zmuidinaite,<sup>1,2</sup> Jason K. Iles,<sup>1,2</sup> George Carnell,<sup>2</sup> Alex Sampson,<sup>2</sup> and Jonathan L. Heeney<sup>2</sup>

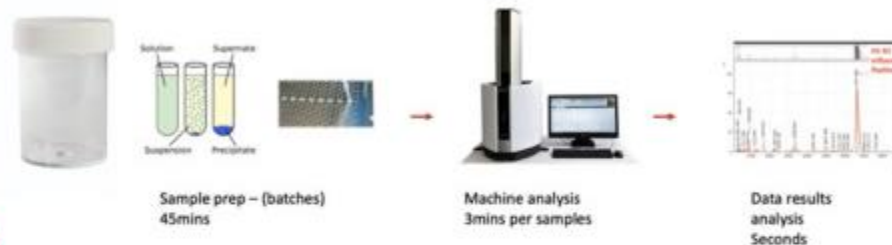


### (A) Home sampling

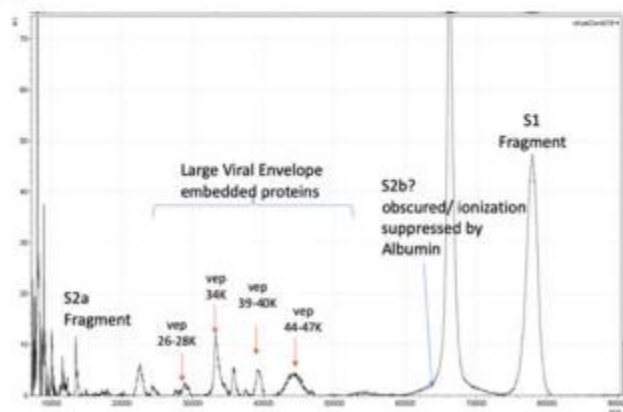


**LABEL & SEND SEALED SAMPLE TO LAB**

### (B) Laboratory process



### (C) Reference spectra of SARS-COV-2 Virus in culture



### (D) Overlaid spectra of a gargle samples, one (ID2) displaying spectral features seen in SARS-COV-2 cultures

