

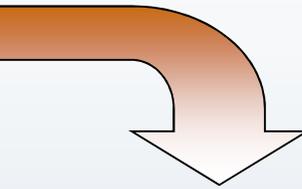
# Apport du **MALDI-TOF** en bactériologie

Microbiologie Médicale – CHU de Liège  
Cécile Meex

# Objectifs du laboratoire de Microbiologie clinique

Collection de l'échantillon

Prise en charge optimale du patient

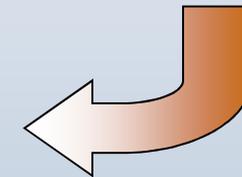


Analyse de l'échantillon: présence de pathogènes



Identification

Sensibilité aux antibiotiques



**!!! Dialogue clinicien / biologiste !!!**

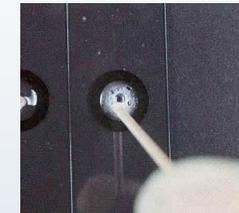
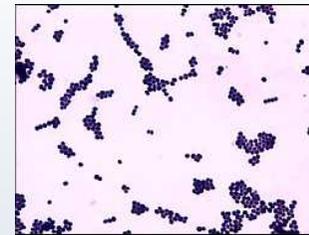
**Le plus rapide et le moins coûteux possible!!**

# Identification bactérienne (1)

## Stratégie classique

A partir d'une culture sur milieu solide:

- Coloration de Gram
- Tests rapides: oxydase, catalase...
- Tests phénotypiques
  - Caractères biochimiques



Unique évolution au cours  
des années:  
**Automatisation et  
miniaturisation**



# Identification bactérienne (2)

## Stratégie classique

- ☹️ **Strictement empirique et réservée aux espèces les plus fréquentes**
- ☹️ **Pas parfaitement cohérente avec la taxonomie microbiologique actuelle**
- ☹️ **Nécessite une présélection pour la réalisation de tests appropriés**
- ☹️ **Nécessite une incubation de plusieurs heures avant résultat**

# Identification bactérienne (3)

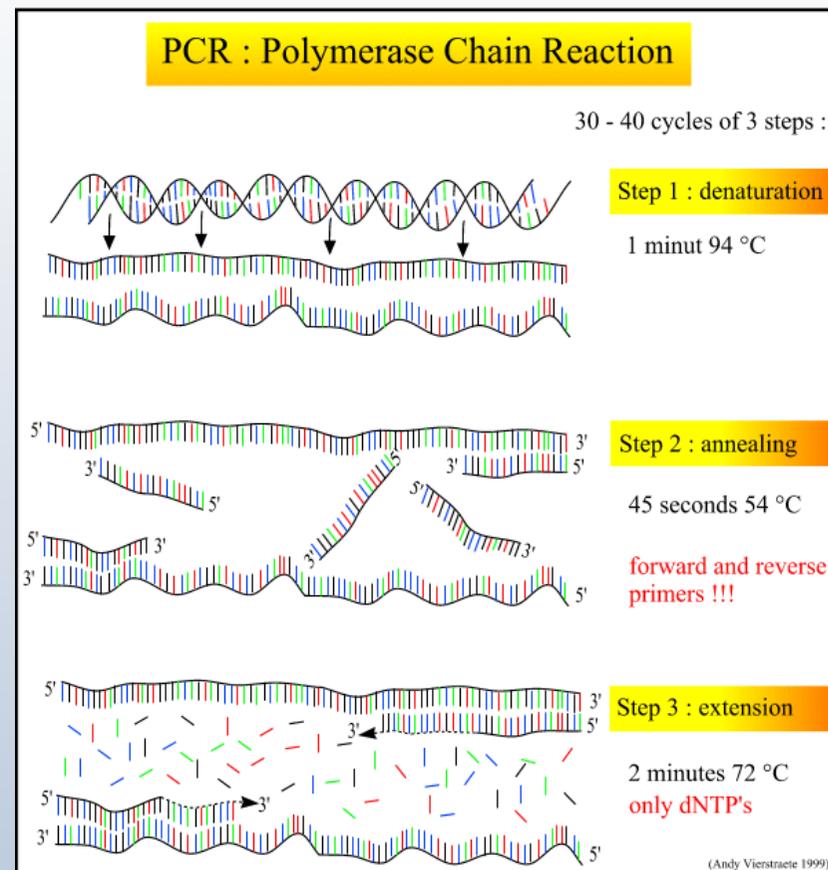
## Biologie moléculaire

A partir d'une culture sur milieu solide ou du prélèvement primaire:

- PCR

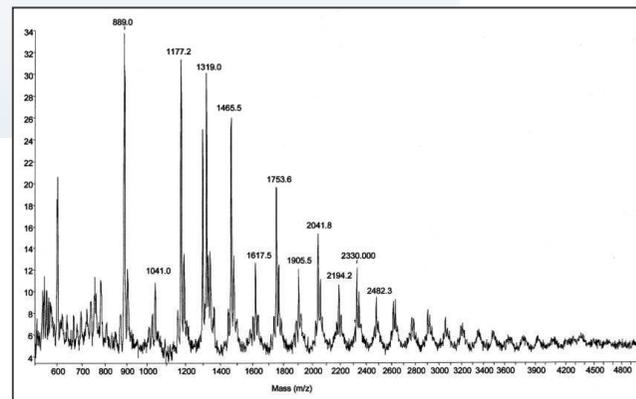
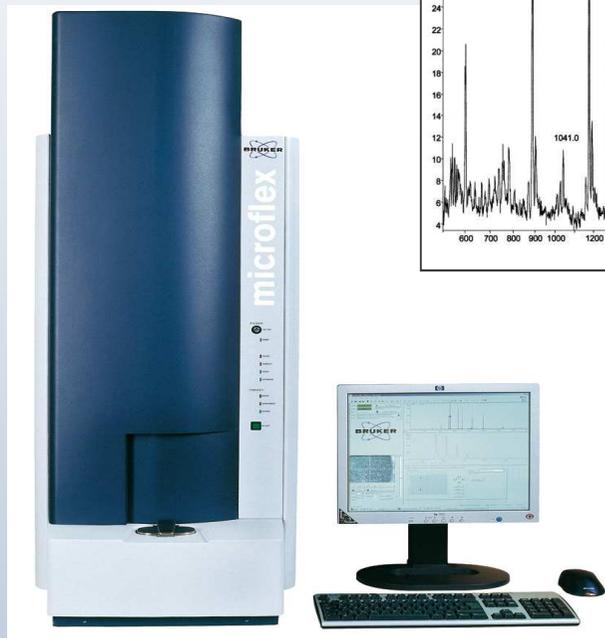
- ☹ Manipulations complexes
- ☹ Multiples analyses d'espèce ou de genre à réaliser en parallèle
- ☹ Analyse coûteuse

- Microarrays



# Identification bactérienne (4)

## Spectrométrie de masse MALDI-TOF



Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics)

Axima (Shimadzu)

# MALDI-TOF MS: Historique

## Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry

Développé en 1980 par Karas & Hillenkamp and Tanaka *et al.*

*Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2301–2303

Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses  
Exceeding 10 000 Daltons

**Michael Karas\***  
**Franz Hillenkamp**

**Protein and Polymer Analyses up to  $m/z$  100 000  
by Laser Ionization Time-of-flight Mass  
Spectrometry**

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

Shimadzu Corporation, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604, Japan

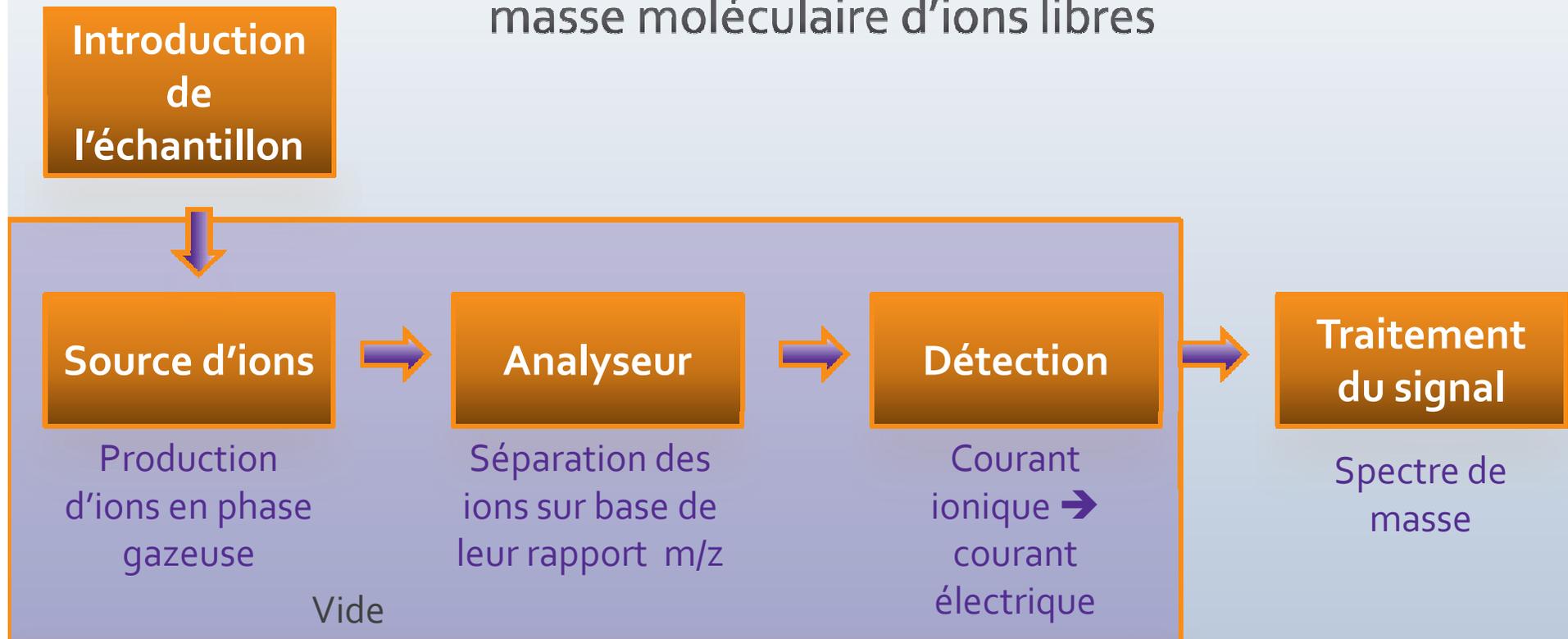
RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 2, NO. 8, 1988 151

- Premier appareil commercial en 1991
- Prix Nobel de Chimie à K. Tanaka en 2002

# Spectrométrie de masse

## Principe:

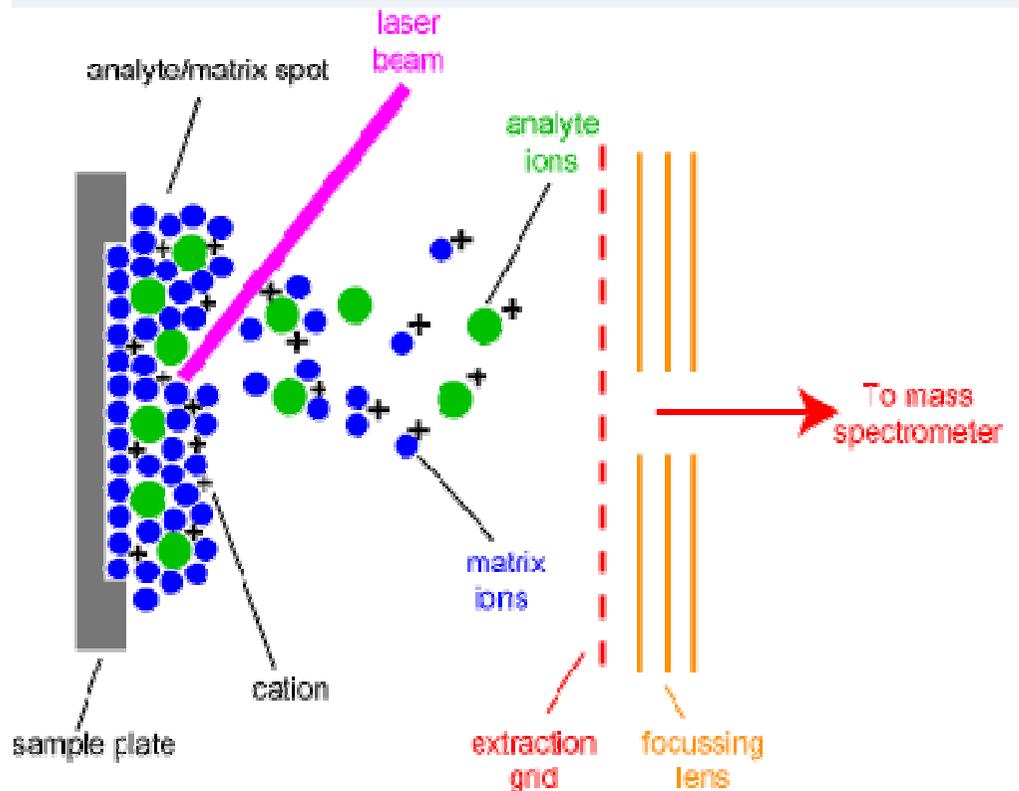
Déterminer à l'aide d'un **spectromètre de masse** la masse moléculaire d'ions libres



# Spectrométrie de masse

## MALDI-TOF (1)

MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization



1. L'échantillon est mélangé à de la matrice en excès et séché sur la cible MALDI.
2. Le laser ionise les molécules de matrice.
3. Les molécules d'échantillons sont ionisées par transfert de protons à partir de la matrice:



# Spectrométrie de masse

## MALDI-TOF (2)

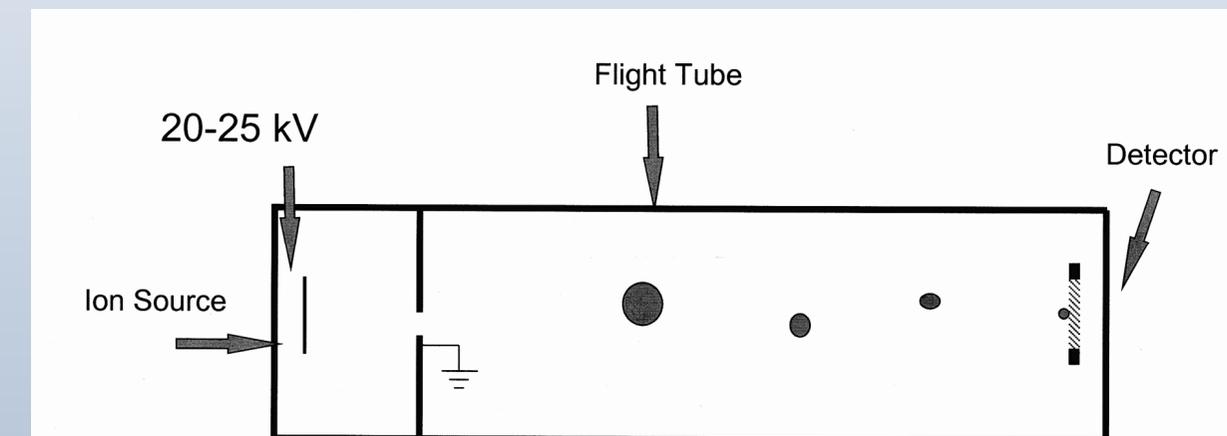
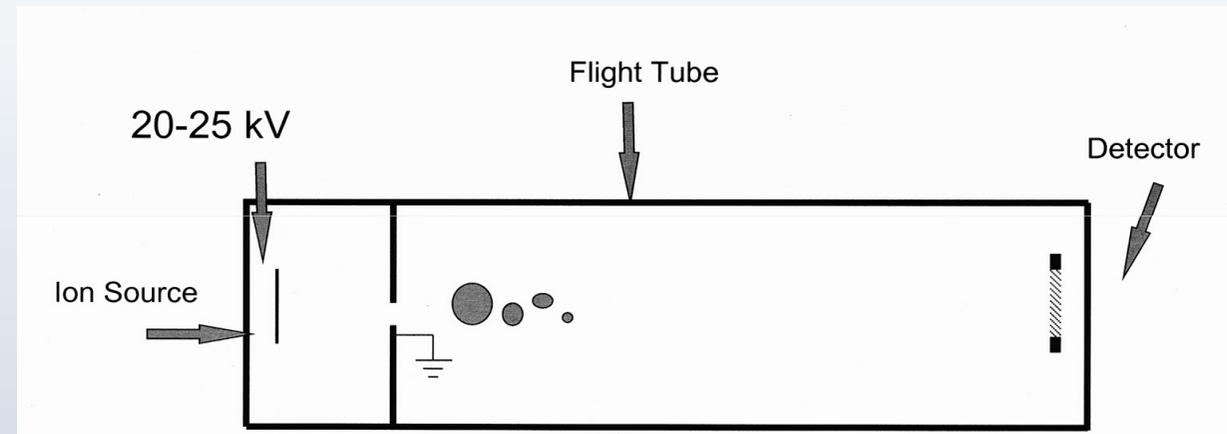
### MALDI-TOF (Time of Flight)

#### 1. Différence de potentiel

Accélération des ions

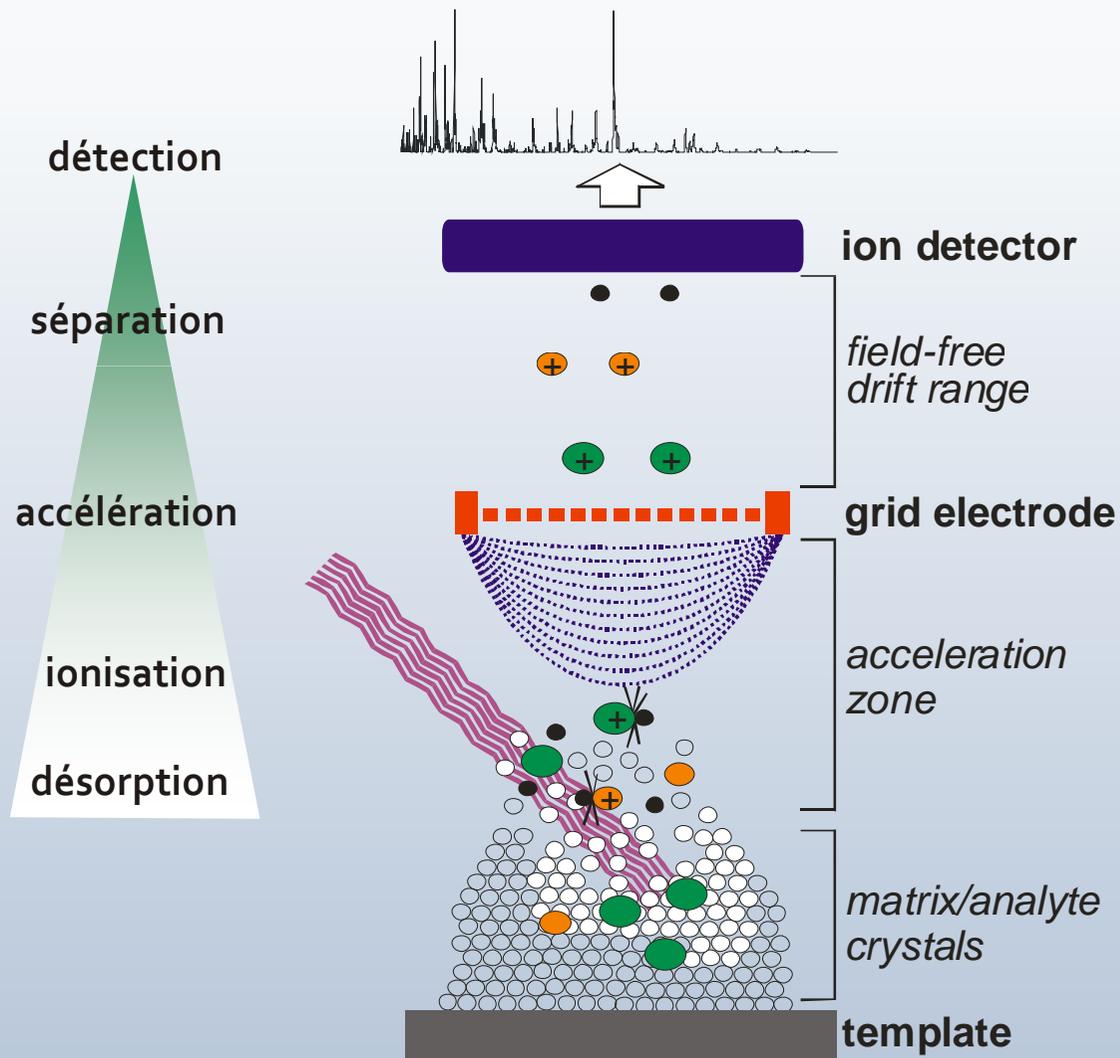
#### 2. Séparation dans le tube de vol

- Les petits ions atteignent plus vite le détecteur que les gros
- Mesure du temps mis par les ions



# Spectrométrie de masse

## MALDI-TOF (3)



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

m: masse

z: charge

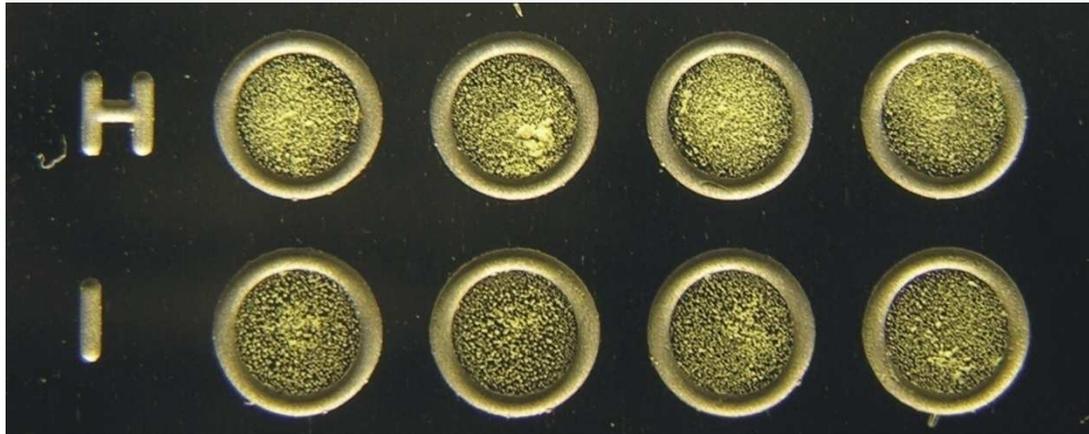
U: voltage

L: longueur du tube

t: temps

e: charge élémentaire

# Choix de la matrice



## HCCA:

Cristallisation régulière

Spectre de qualité en peu de tirs

Spectres de 80-150 signaux

Peu de signaux dont  $m/z > 10\text{kDa}$



## DHB:

Cristallisation irrégulière

Nombreux tirs de laser pour un spectre de qualité

Spectres de 100-200 signaux

Beaucoup de signaux dont  $m/z > 10\text{kDa}$

# Cellules entières/intactes: composants cellulaires détectés

- **Quels sont les composants cellulaires détectés?**

Principalement des protéines, mais aussi des lipides et des polysaccharides

- **Quelles protéines sont détectées?**

Les protéines extractibles, solubles, modérément hydrophiliques, stables et abondantes

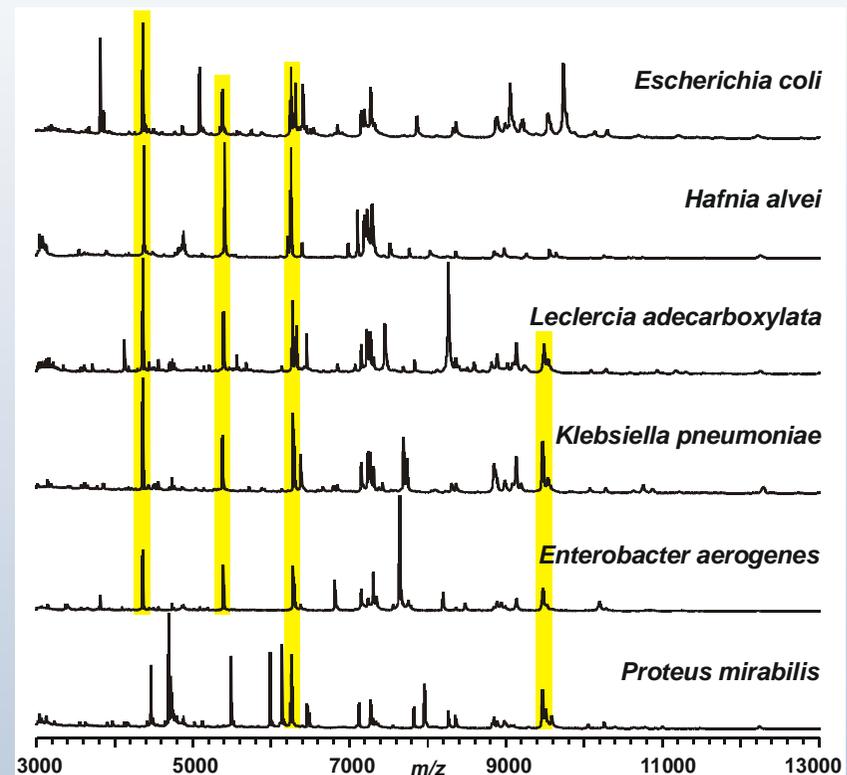
- **De quoi dépend l'intensité du signal?**

Un signal de haute intensité est favorisé par l'abondance de la protéine, sa stabilité et sa composition en acides aminés (Arg et Lys)

# Principe de l'identification

Détection de larges molécules comme des protéines (1000 – 300000 Da)

- Empreinte spectrale variable entre les microorganismes
- Spectres reproductibles
- Pics spécifiques de genre, d'espèce ou de sous-espèce



# Banque de données de spectres

- Fournie par la firme.
  - Bruker: 3995 spectres d'organismes cellulaires (3679 bactéries et 316 champignons)
- Comparaison du spectre obtenu avec les spectres présents dans la banque de données
- Scores d'appariement et identification bactérienne la plus plausible.

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	no reliable identification	(-)	red

Possibilité d'enrichir la base de données

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	<i>Clostridium perfringens</i> B 1968_NCTC 3110_BOG	2.514	<a href="#">1502</a>
2 (++)	<i>Clostridium perfringens</i> B 1038_NCTC 4964_BOG	2.454	<a href="#">1502</a>
3 (++)	<i>Clostridium perfringens</i> B 1971_ATCC 3626_BOG	2.305	<a href="#">1502</a>
4 (++)	<i>Clostridium perfringens</i> A 1037_NCTC 8237_BOG	2.254	<a href="#">37263</a>
5 (++)	<i>Clostridium perfringens</i> D 2150_NCTC 8346_BOG	2.253	<a href="#">107819</a>
6 (++)	<i>Clostridium perfringens</i> C 1041_NCTC 10720_BOG	2.111	<a href="#">79668</a>
7 (-)	<i>Comamonas testostereoni</i> DSM 50244 HAM	1.308	<a href="#">285</a>
8 (-)	<a href="#">Listeria grayi murrei DSM 20596 DSM</a>	1.282	<a href="#">1641</a>
9 (-)	<a href="#">Bacillus atrophaeus DSM 675 DSM</a>	1.163	<a href="#">1452</a>
10 (-)	<i>Clostridium beijerinckii</i> 1072_ATCC 25752_BOG	1.136	<a href="#">1520</a>

!!! Attention: Mauvaise discrimination des bactéries aux profils protéiques similaires

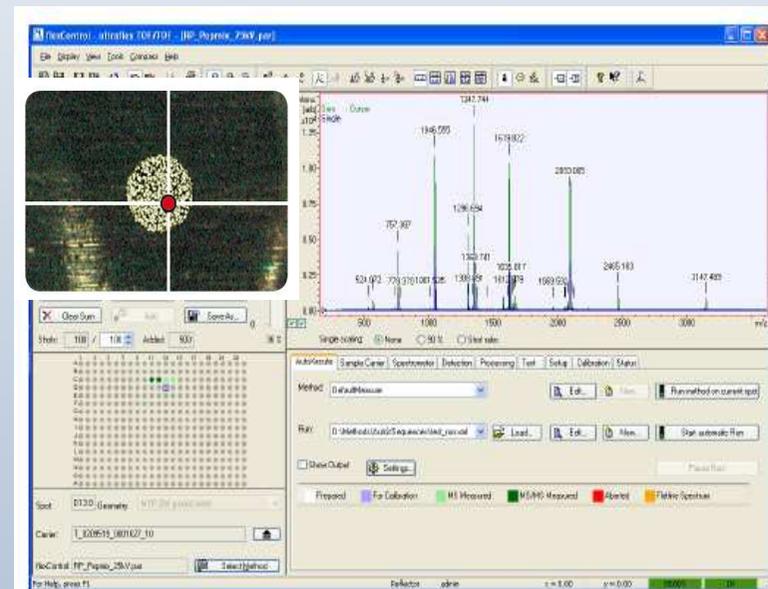
# Au laboratoire (1)

## Analyse de culture bactérienne sur gélose

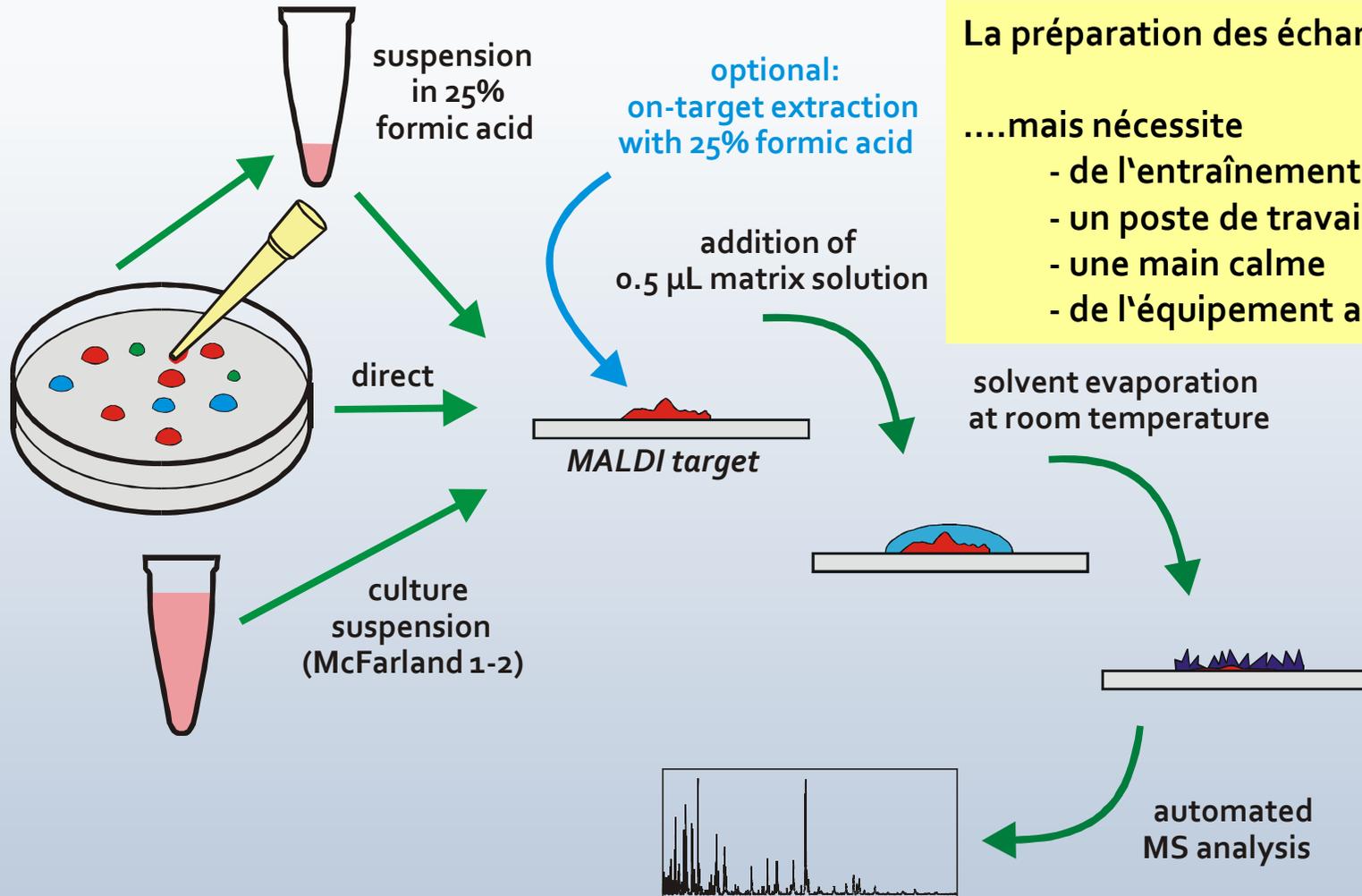
1. Dépôt direct sur la cible
2. Ajout de la matrice
3. Séchage
4. Introduction dans le spectromètre



**Première identification  
en moins de 2 minutes!**



# Préparation des échantillons



La préparation des échantillons est facile...

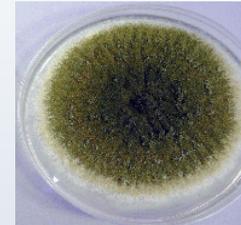
....mais nécessite

- de l'entraînement
- un poste de travail adapté
- une main calme
- de l'équipement approprié

# Au laboratoire (2)

## Analyse de microorganismes après extraction

- Cultures de:
  - Levures
  - Champignons filamenteux
  - Mycobactéries
- Hémocultures positives
- Echantillons primaires:
  - Urines



# Hémocultures

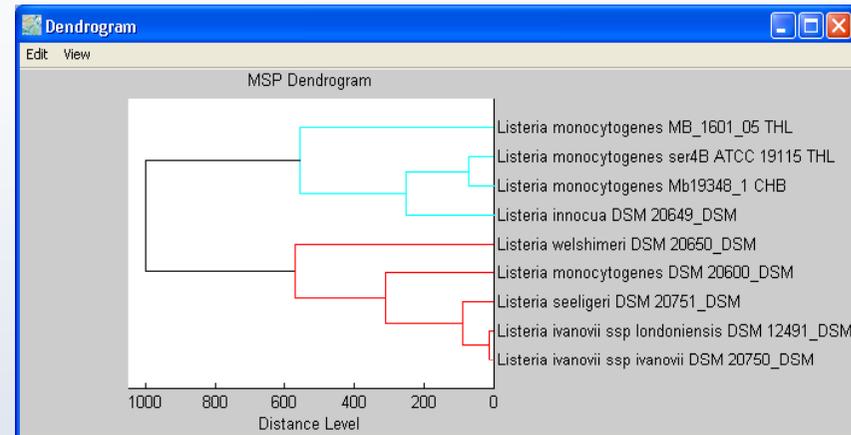
- **Prélèvement le plus significatif pour le diagnostic des infections bactériennes aiguës sévères.**
  - Mortalité réduite si antibiotique adapté précoce\*
- **MALDI-TOF: Identification bactérienne le jour de positivité du flacon d'hémoculture.**
- **Sélection de l'antibiotique le plus adéquat en se basant sur les données épidémiologiques locales et de l'hôpital.**

\* Joan Barenfanger *et al*, Decreased mortality associated with prompt Gram staining of blood cultures , Am J Clin Pathol 2008;130:870-876

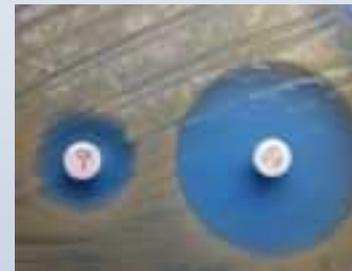


# Autres applications

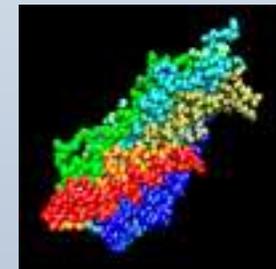
- **Etudes épidémiologiques**
  - Mise en évidence de clones
  - Dendrogrammes



- ? **Détection de marqueurs de mécanismes de résistance aux antibiotiques: distinction MRSA-MSSA**



- ? **Détection de marqueurs de virulence: toxine PVL**



\* Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74, 5402-5407

\* Rapid discrimination of Legionella by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res*, 2010, Mar 25

# Microbiologie médicale – CHU Liège (1)

Mai 2009: MALDI Biotyper (Bruker)

1. Evaluation de la base de données en parallèle des méthodes classiques pendant 2 mois

Algorithme décisionnel:

MS Score  $\geq 2.3$ : **Identification excellente**

MS Score  $\geq 2.0$  et  $< 2.3$  et 3 premiers résultats identiques: **Bonne identification**

MS Score  $\geq 1.7$  et  $< 2.0$  et 3 premiers résultats identiques: **Identification acceptable**

# Microbiologie médicale – CHU Liège (2)

## 418 microorganismes testés

	Nombre	En accord avec la méthode de référence
Identifications excellentes	90	100%
Bonnes identifications	190	100%
Identifications acceptables	42	100%
Identifications non concluantes	36	
Non identifiés	60	

- **Total: 322 identifications sur 418 soit 77%**
- **Pas de mauvaises identifications**

# Microbiologie médicale – CHU Liège (3)

## 2. Evaluation par groupes bactériens

Passage de x souches de chaque espèce  
fréquente:

→ Pas de discordance décelée \*

# Microbiologie médicale – CHU Liège (4)

3. Depuis juillet 2009:

Identification bactérienne de première  
ligne:

**Microflex MALDI-TOF MS**  
(Bruker Daltonics)

- Acceptation des identifications sur base des scores d'appariement selon un algorithme défini.
- Méthode d'identification de seconde ligne si nécessaire: méthodes phénotypiques classiques



# Microbiologie médicale – CHU Liège (5)

Evaluation: Février 2010

Groupe bactérien	Nombre de souches testées	Identifications acceptées selon l'algorithme (%)
Entérobactéries	541	98,7
Non fermentants	207	95,6
Staphylocoques	83	97,5
Streptocoques	110	89
<i>Haemophilus / Moraxella</i>	42	97,6
<i>Neisseria sp.</i>	4	100
<i>Campylobacter sp.</i>	5	100
Anaérobies	21	95,2
<b>TOTAL</b>	<b>1013</b>	<b>96,7</b>

# Levures



- Identification directe: mauvais résultats si on utilise l'algorithme choisi
  - Extraction liquide à l'acide formique: peu contributive et trop longue en routine
- Extraction directe à l'acide formique et double dépôt

## Algorithme adapté:

MS Score  $\geq 1.4$  et 3 premiers résultats identiques et aspect des colonies sur gélose cohérent avec l'identification: **Identification acceptable**

# Microbiologie médicale – CHU Liège (6)

## Développements en cours:

- **Identification directe des bactéries présentes dans les hémocultures positives**
  - A partir des flacons d'hémoculture anaérobie BacT/Alert (BioMérieux) sans charbon
- **Différents protocoles testés**
  - Centrifugations différentielles
  - Lyse à la saponine
  - MALDI Sepsityper Kit (Bruker)



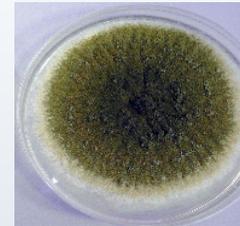
# MALDI Sepsityper kit (Bruker)

Espèces	Nombre de souches testées	Identifications acceptées en fonction de l'algorithme (%)
<b>Gram négatifs (pas d'extraction)</b>		
<i>K. pneumoniae</i>	4	4 (100%)
<i>P. rettgeri</i>	1	1 (100%)
<i>S. marcescens</i>	2	2 (100%)
<i>E. cloacae</i>	1	1 (100%)
<i>E. coli</i>	4	4 (100%)
<b>TOTAL Gram négatifs</b>	<b>12</b>	<b>12 (100%)</b>
<b>Gram Positifs (Extraction)</b>		
<i>S. aureus</i>	3	3 (100%)
<i>S. epidermidis</i>	5	4 (80%)
<i>S. hominis</i>	1	0 (0%)
<i>S. capitis</i>	2	2 (100%)
<i>E. faecium</i>	1	1 (100%)
<i>S. pneumoniae</i>	3	0 (0%) (Pas de culot)
<b>TOTAL Gram positifs</b>	<b>15</b>	<b>10 (66%)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>27</b>	<b>22 (81%)</b>

# Microbiologie Médicale– CHU Liège (7)

## Développements en cours :

- Identification de:



- **Champignons**

- Projet international Bruker: Champignons filamenteux

- **Anaérobies**



- **Mycobactéries**



# Bruker VS Shimadzu

- ❖ Bases de données fiables
- ❖ Facilités d'utilisation comparables
- ❖ Coûts comparables

- Service commercial efficace
- Interlocuteur francophone
- Service après-vente excellent:  
Helpdesk, technicien belge très disponible

- Service commercial peu satisfaisant

# Discussion (1)

Comparaison spectrométrie de masse MALDI-TOF vs autres méthodes d'identification

	MALDI-TOF MS		Identifications phénotypiques par caractères biochimiques	Biologie moléculaire
	Dépôt direct	Extraction		
Durée de préparation	5 minutes	20 minutes	1 à 20 minutes	60 minutes
Durée d'identification	2 minutes	2 minutes	5 à 48 heures	45 minutes à 48 heures
Coût (consommables)	0,1 €/éch	0,5 €/éch	5 €/éch	30-50 €/éch
	Sepsityper kit: 4 €/éch			
Identifications possibles	Bactéries aérobies/anaérobies Levures Mycobactéries Champignons filamenteux		Espèces les plus fréquentes d'intérêt clinique	Toutes théoriquement
Compétence requise	Basique		Modérée	Elevée

# Discussion (2)

## Avantages

- Identification fiable
- Identification rapide
  - Délai d'identification réduit d'une journée: traitement antibiotique présomptif ajusté en fonction des données épidémiologiques locales et de l'hôpital.

Intranet du CHU  
Hygiène hospitalière

\* Decreased mortality associated with prompt Gram staining of blood cultures. Am J Clin Pathol 2008;130:870-876

### Evolution des taux de sensibilité aux antibiotiques

SANG		2007	2008	2009
Organismes	Antibiotiques	(n=31)	(n=21)	(n=27)
Acinetobacter baumannii	Amikacine	94%	76%	81%
	Amoxicilline/Ac.clav.	3%	-	-
	Céfépime	52%	38%	44%
	Céfotaxime			4%
	Ceftazidime	19%	24%	26%
	Ciprofloxacine	55%	43%	52%
	Colistine	100%	100%	
	Gentamicine	90%	67%	63%
	Imipénème	50%	100%	
	Méropénème	100%	100%	100%
	Norfloxacine	50%	43%	48%
	Pipéracilline/Tazob.	84%	76%	78%
	Tobramycine	93%	95%	100%
	Triméthoprime/sulfa.	87%	90%	96%

# Discussion (3)

## Avantages

- Faible coût des consommables (!! coût de la machine)
- Utilisation simple
- Intégration possible dans un système automatisé global de bactériologie



# Discussion (4)

## Inconvénients

- Croissance bactérienne sur milieu solide nécessaire à l'exception des hémocultures et des échantillons urinaires
- Bactéries difficilement différenciables:
  - *E. coli* vs *Shigella* sp.
  - *S. pneumoniae* vs *S. mitis/oralis*
  - *N. meningitidis* vs *N. flava/perflava*

# Conclusion

## Spectrométrie de masse MALDI-TOF:



Technique d'identification bactérienne  
incontournable dans un laboratoire de routine  
bactériologique