

Spectrométrie de masse **MALDI-TOF** en  
bactériologie clinique

OU

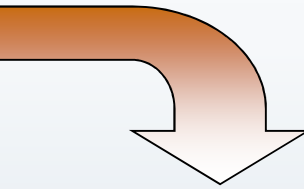
Comment identifier une bactérie  
en **une minute**

Microbiologie Médicale – CHU de Liège  
Cécile Meex

# Objectifs du laboratoire de Microbiologie clinique

Collection de l'échantillon

Prise en charge optimale du patient

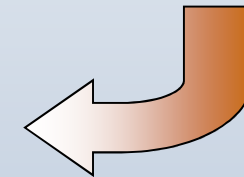


Analyse de l'échantillon: présence de pathogènes



Identification

Sensibilité aux antibiotiques



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

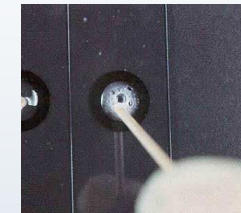
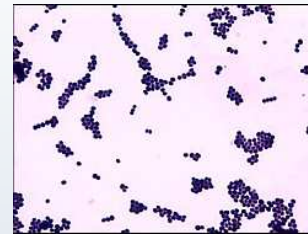
**Le plus rapide et le moins coûteux possible!!**

# 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**

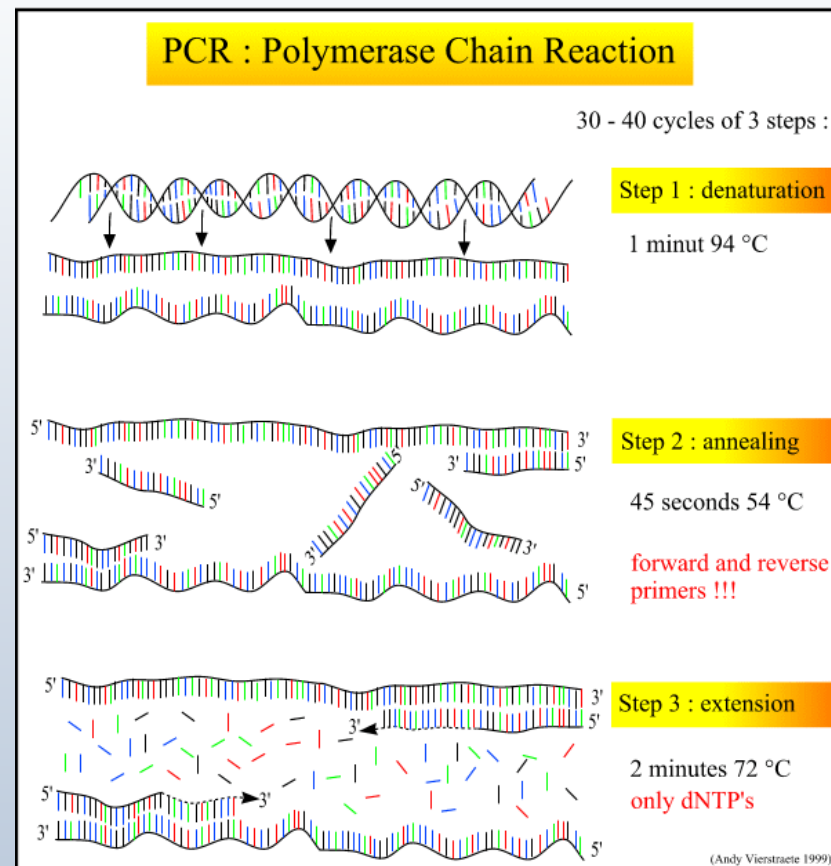


# Identification bactérienne (2)

## Biologie moléculaire

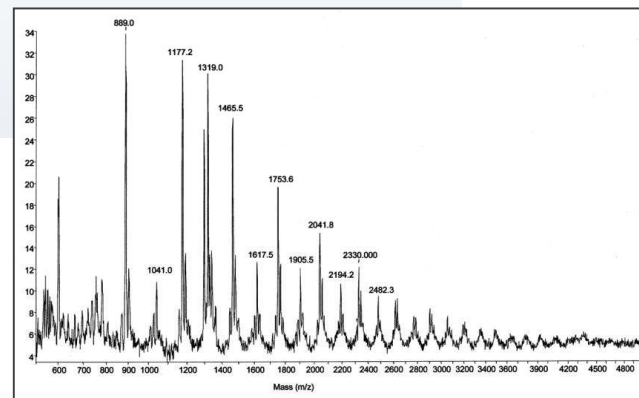
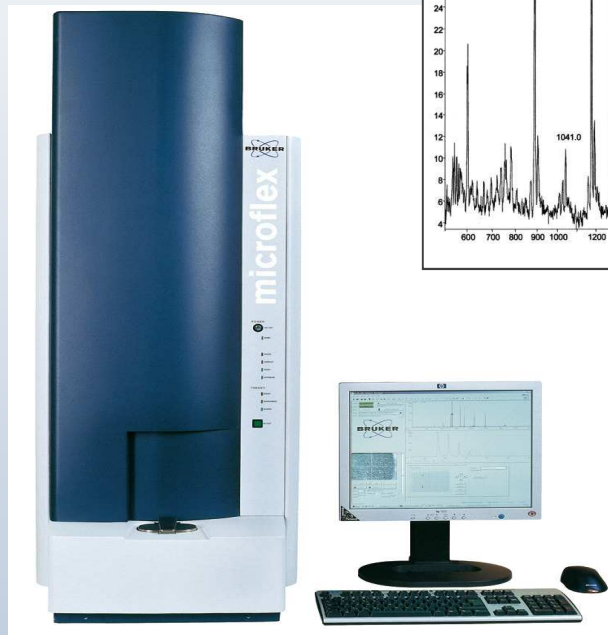
A partir d'une culture sur milieu solide ou du prélèvement primaire:

- PCR
- Microarrays



# Identification bactérienne (3)

## Spectrométrie de masse MALDI-TOF

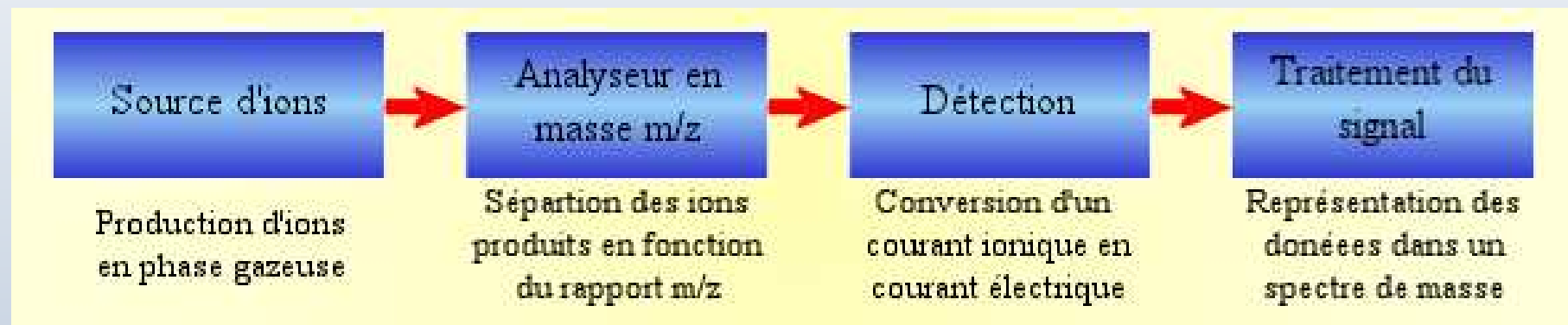


Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics)

Axima (Shimadzu)

# Spectrométrie de masse

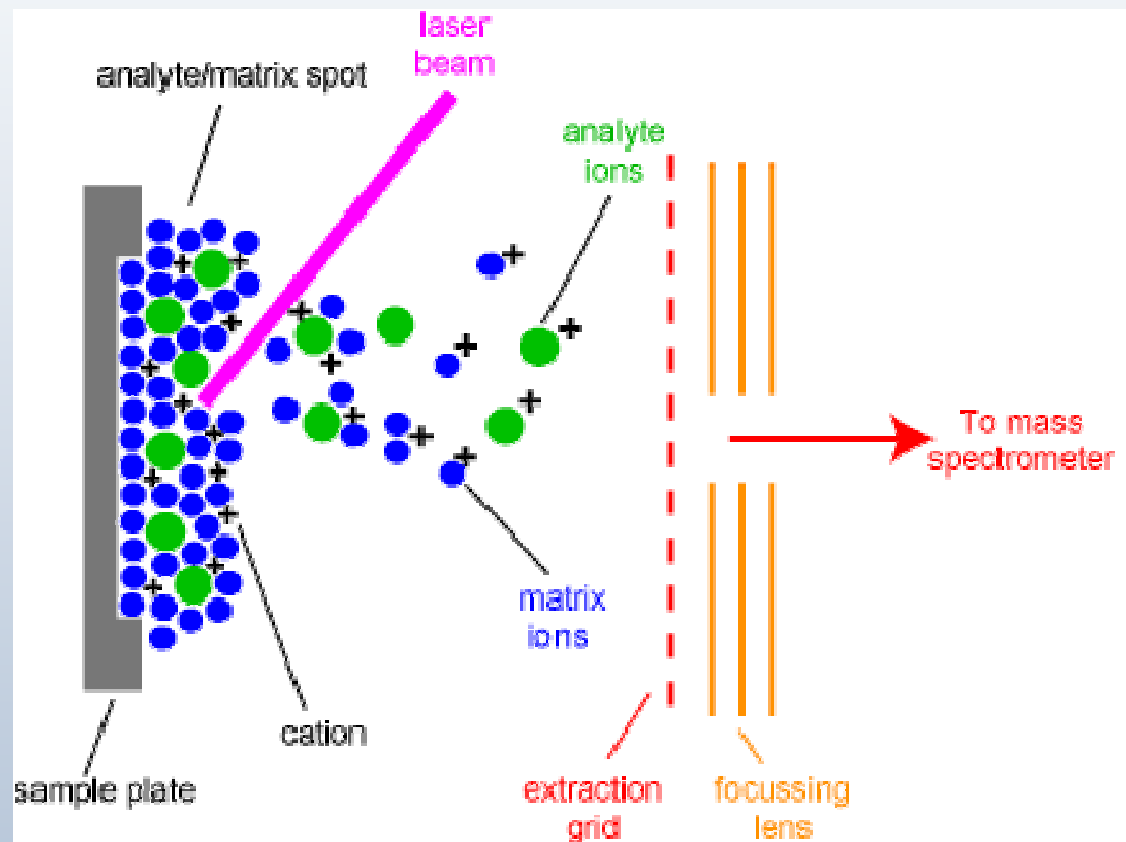
Déterminer à l'aide d'un spectromètre de masse la masse moléculaire d'ions libres



# Spectrométrie de masse

## MALDI-TOF (1)

MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

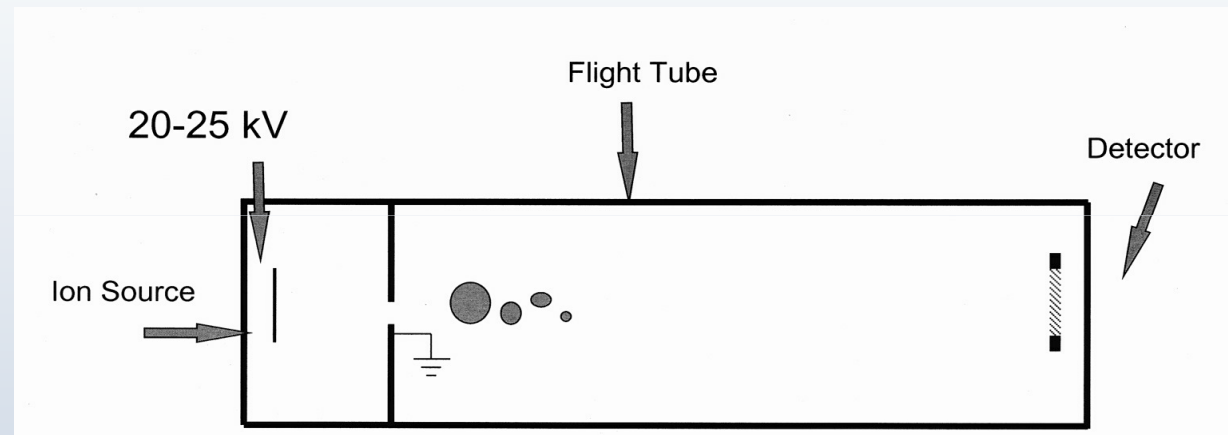


# Spectrométrie de masse

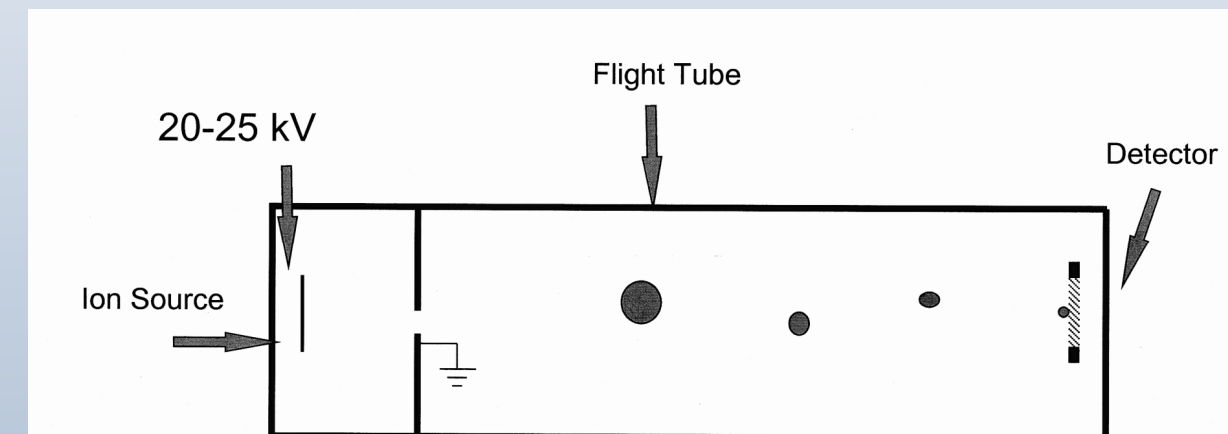
## MALDI-TOF (2)

MALDI-TOF (Time of Flight)

1. Différence de potentiel



2. Séparation dans le tube de vol

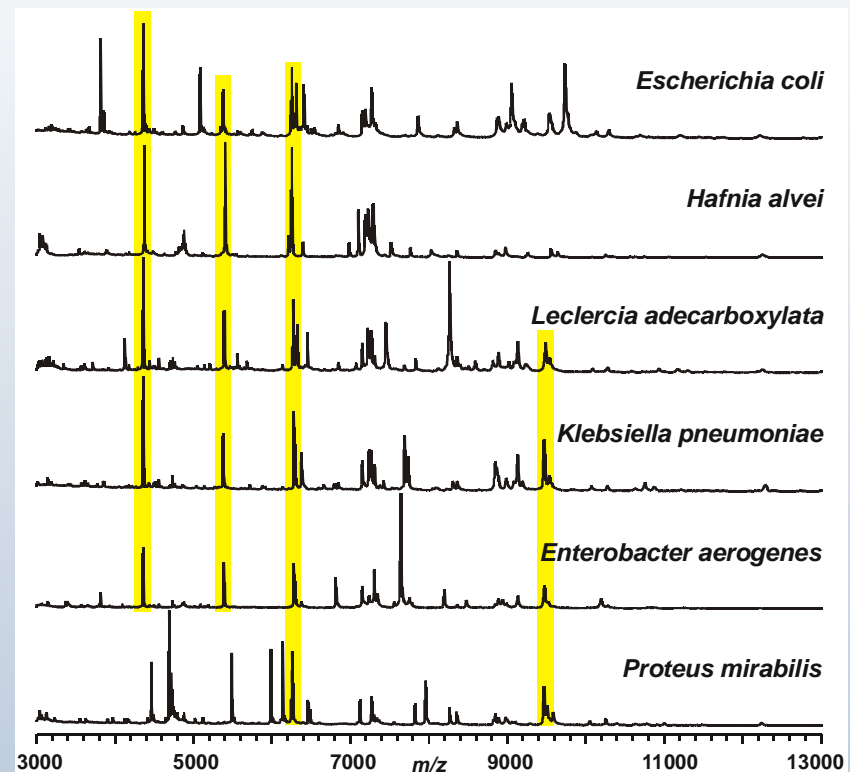




# Principe de l'identification

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: 3476 organismes cellulaires (3216 bactéries et 260 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

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="#">1202</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	2.11	<a href="#">72668</a>
7 (-)	<i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50244 HAM	1.308	<a href="#">285</a>
8 (-)	<a href="#">Listeria grayi murrei</a> DSM 20596 DSM	1.262	<a href="#">1641</a>
9 (-)	<a href="#">Bacillus atrophaeus</a> DSM 675 DSM	1.163	<a href="#">1452</a>
10 (-)	<i>Clostridium beijerinckii</i> 1072_ATCC 25752_BOG	1.136	<a href="#">1520</a>

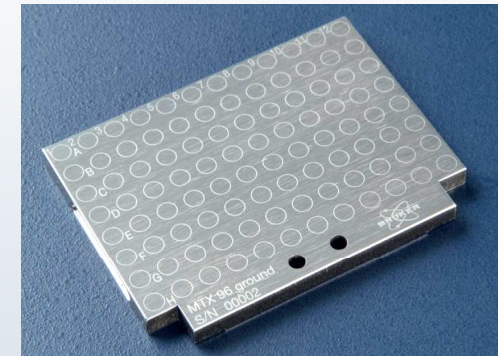
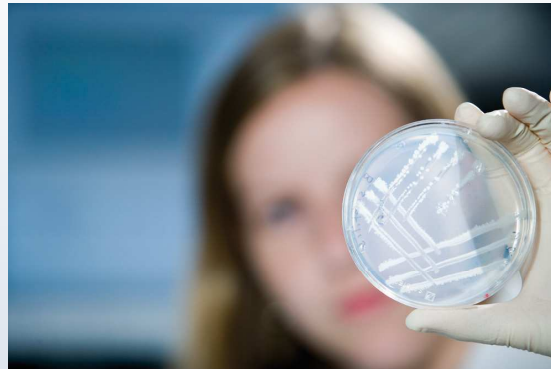
Possibilité d'enrichir la base de données

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

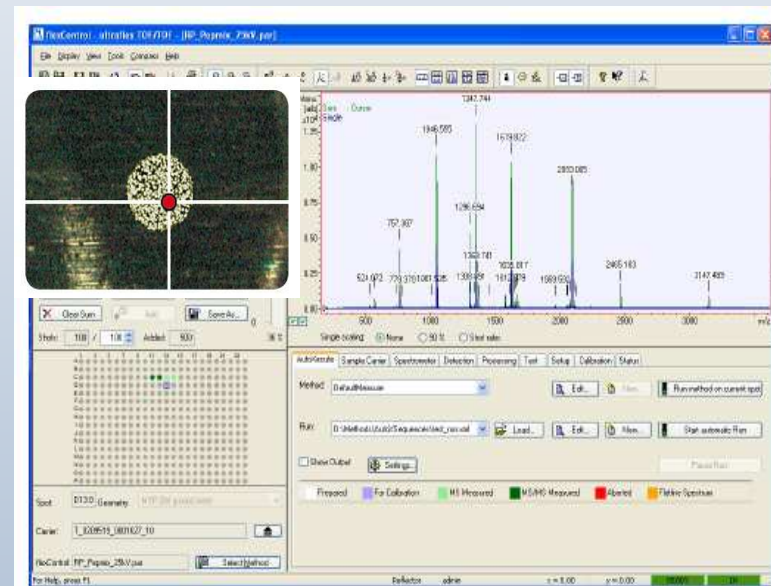
# Au laboratoire (1)

## Analyse de culture bactérienne sur gélose

1. Dépôt direct sur la cible
2. Ajout de la matrice
3. Séchage



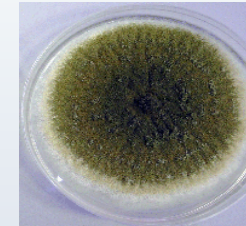
**Première identification  
en moins de 2 minutes!**



# Au laboratoire (2)

## Analyse de microorganismes après extraction

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



# Hémocultures

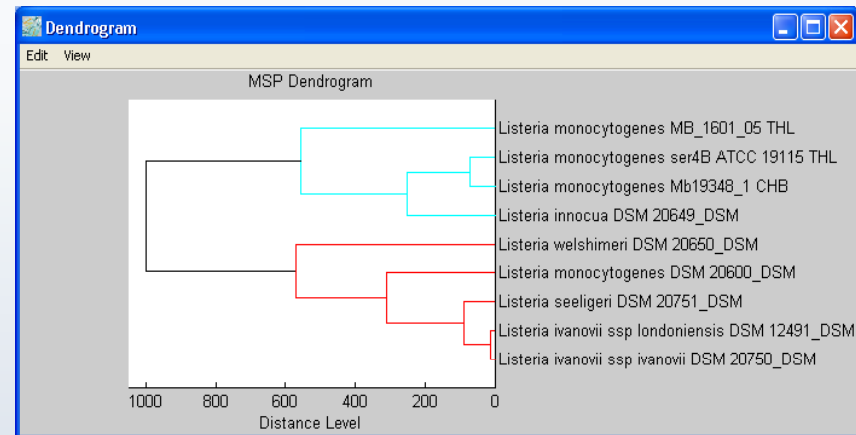
- Prélèvement le plus significatif pour le diagnostic des infections bactériennes aiguës sévères.
  - Mortalité réduite si antibiotique adapté précoce\*
- MALDI-TOF: Identification bactérienne le jour de positivité du flacon d'hémoculture.
- Sélection de l'antibiotique le plus adéquat en se basant sur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

Depuis juillet 2009:

Identification bactérienne de première  
ligne: **Microflex MALDI-TOF MS**  
(Bruker Daltonics)

- Analyse par spectrométrie de toutes les bactéries destinées à l'identification par tests phénotypiques.
- Acceptation des identifications sur base des scores d'appariement selon un algorithme défini.



# Microbiologie médicale – CHU Liège (2)

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>

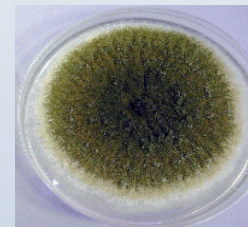


# Microbiologie médicale – CHU Liège (3)

Développements en cours:

- **Identification directe des bactéries présentes dans les hémocultures positives**

- **Identification des:**
  - Anaérobies
  - Champignons
  - Mycobactéries



# 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
Identifications possibles	Bactéries aérobies/anaérobies Levures Mycobactéries Champignons filamenteux		Espèces les plus fréquentes d'intérêt clinique	Toutes théoriquement
Compétence requis	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