

# MALDI-TOF MS en Microbiologie clinique

Cécile Meex  
Microbiologie clinique  
CHU Liège

3<sup>ème</sup> BAC SBIM  
Année académique 2017-2018

# 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

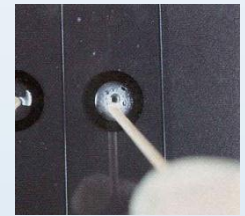
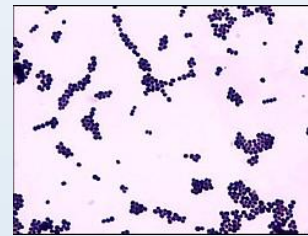
Rapide, fiable  
et coût-efficace

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

## 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**



## Stratégie classique

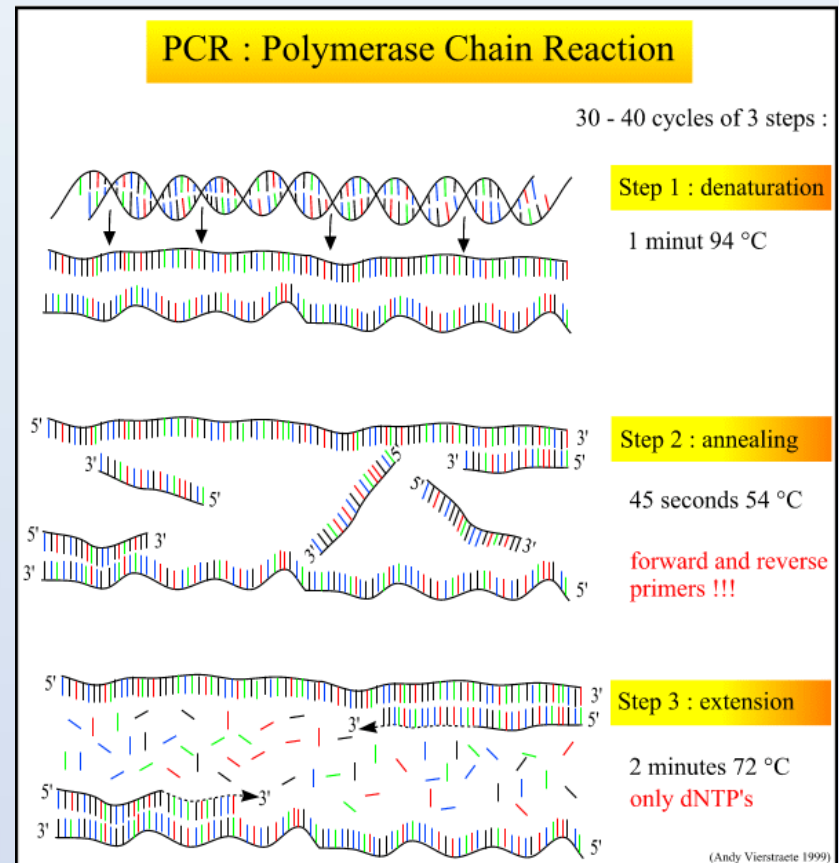
- ☹️ Strictement empirique et réservée aux espèces les plus fréquentes
- ☹️ Pas parfaitement cohérente avec la taxonomie microbiologique actuelle
- ☹️ Nécessite une présélection pour la réalisation de tests appropriés
- ☹️ Nécessite une incubation de plusieurs heures avant résultat

## Biologie moléculaire

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

- **PCR**

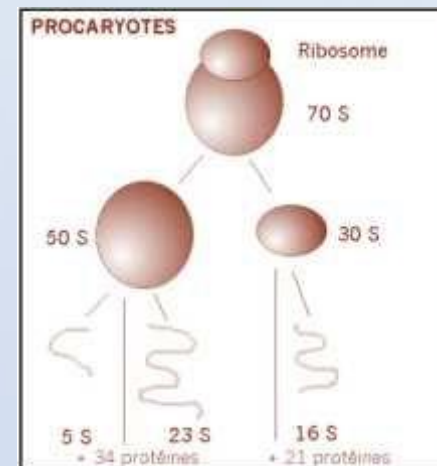
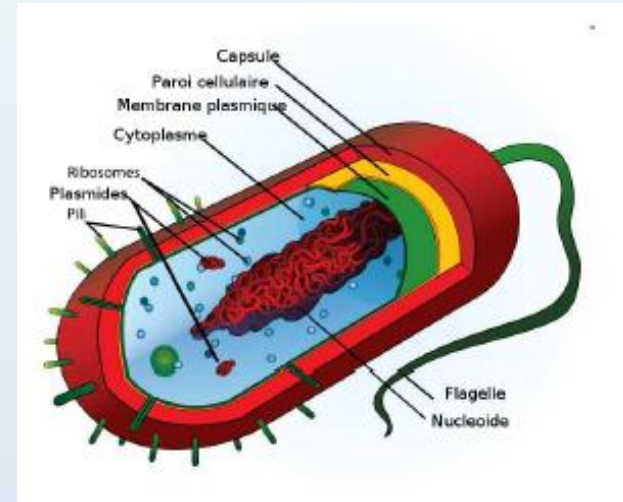
- ☹ Manipulations complexes
- ☹ Multiples analyses d'espèce ou de genre à réaliser en parallèle
- ☹ Analyse coûteuse



## Biologie moléculaire

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

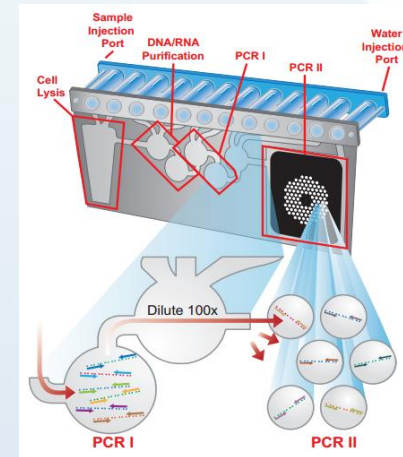
- **PCR toutes bactéries**
  - Amplification de l'ADN codant pour l'ARN 16s
  - Région conservée chez toutes les bactéries
  - Séquençage si positif
  - ☹ Faible sensibilité



## Biologie moléculaire

A partir du prélèvement primaire:

- Panels/Microarray
  - Panel méningite/encéphalite
  - Panel gastro-intestinal
- ✓ Facile à réaliser
- ☹ Coût +++



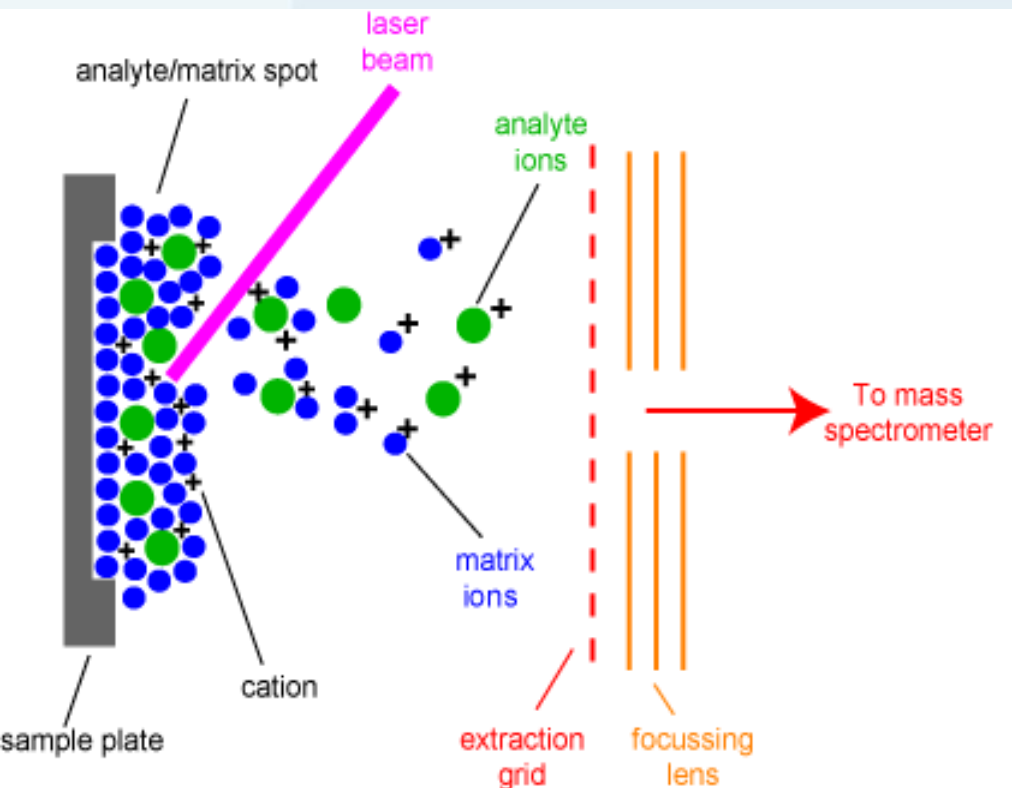
FilmArray Meningitis / Encephalitis (ME) Panel - IVD		BIO F I R E
		www.BioFireDx.com
<b>Run Summary</b>		
Sample ID:	13-171206-5238	Run Date: 06 Dec 2017 9:31 PM
Detected:	Enterovirus	Controls: Passed
<b>Result Summary</b>		
<b>Bacteria</b>		
Not Detected	<i>Escherichia coli</i> K1	
Not Detected	<i>Haemophilus influenzae</i>	
Not Detected	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Not Detected	<i>Neisseria meningitidis</i>	
Not Detected	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
Not Detected	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<b>Viruses</b>		
Not Detected	Cytomegalovirus	
✓ Detected	Enterovirus	
Not Detected	Herpes simplex virus 1	
Not Detected	Herpes simplex virus 2	
Not Detected	Human herpesvirus 6	
Not Detected	Human parechovirus	
Not Detected	Varicella zoster virus	
<b>Yeast</b>		
Not Detected	<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	
<b>Run Details</b>		
Pouch:	ME Panel v1.4	Protocol: CSF v3.0
Run Status:	Completed	Operator: assistant assistant (assistant)
Serial No.:	10175879	Instrument: 2FA02104
Lot No.:	578217	

# Spectrométrie de masse MALDI-TOF

## PRINCIPE



## 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:



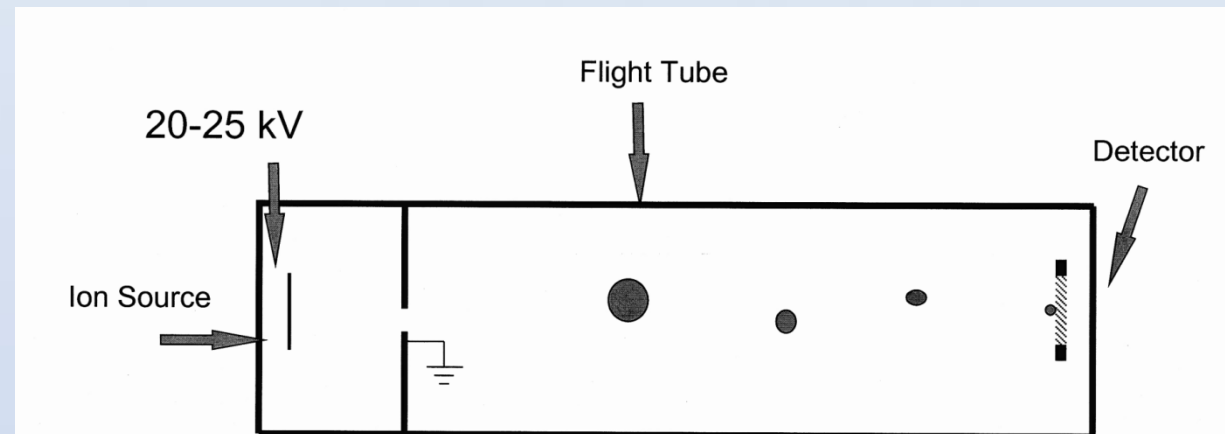
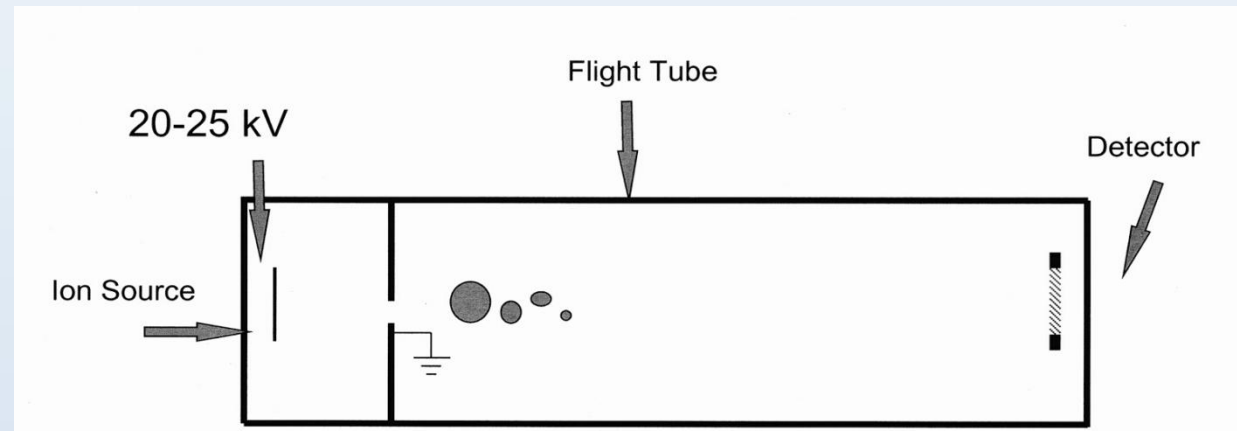
## MALDI-TOF (Time of Flight)

### 1. Différence de potentiel

Accélération des ions

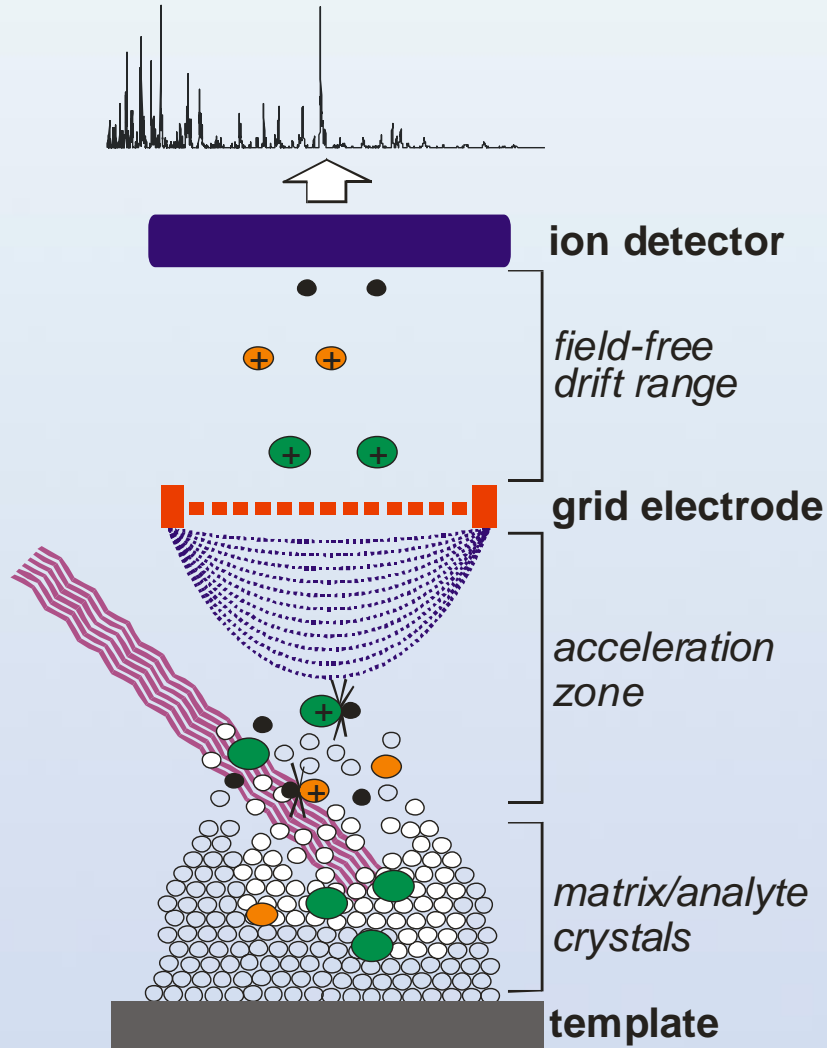
### 2. Séparation dans le tube de vol

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



# MALDI-TOF MS (3)

détection  
séparation  
accélération  
ionisation  
désorption



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

m: masse  
z: charge  
U: voltage  
L: longueur du tube  
t: temps  
e: charge élémentaire

# Spectrométrie de masse MALDI-TOF

## APPLICATIONS EN MICROBIOLOGIE

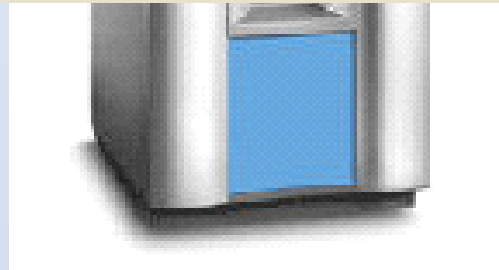
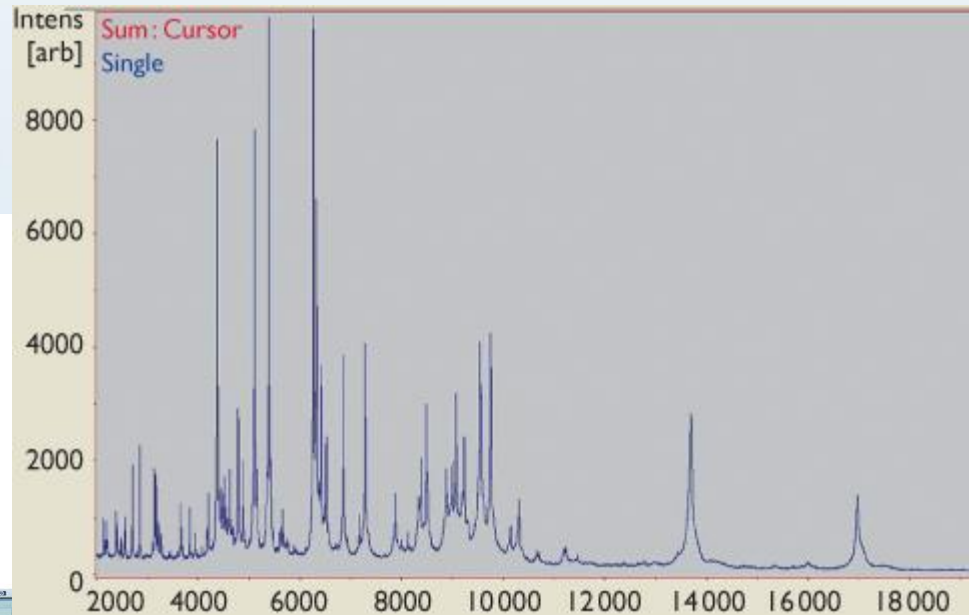
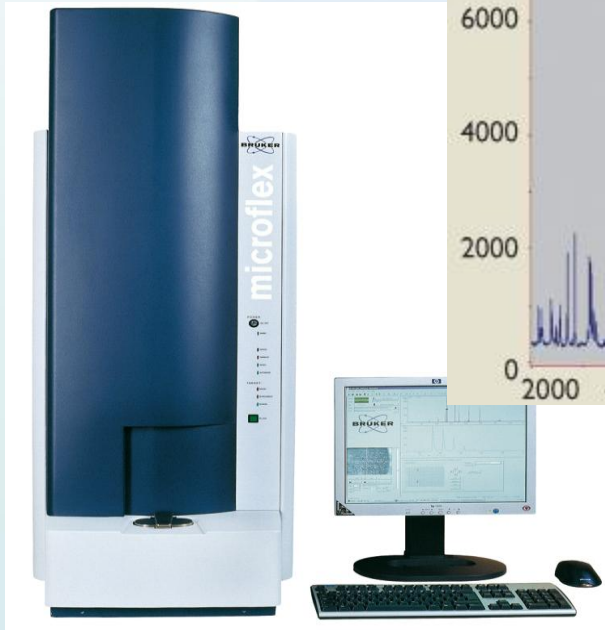
1. Identifications bactériennes et fongiques
2. Typage
3. Détection de résistance aux antibiotiques

# Spectrométrie de masse MALDI-TOF

## APPLICATIONS EN MICROBIOLOGIE

1. **Identifications bactériennes et fongiques**
2. Typage
3. Détection de résistance aux antibiotiques

# Actuellement sur le marché

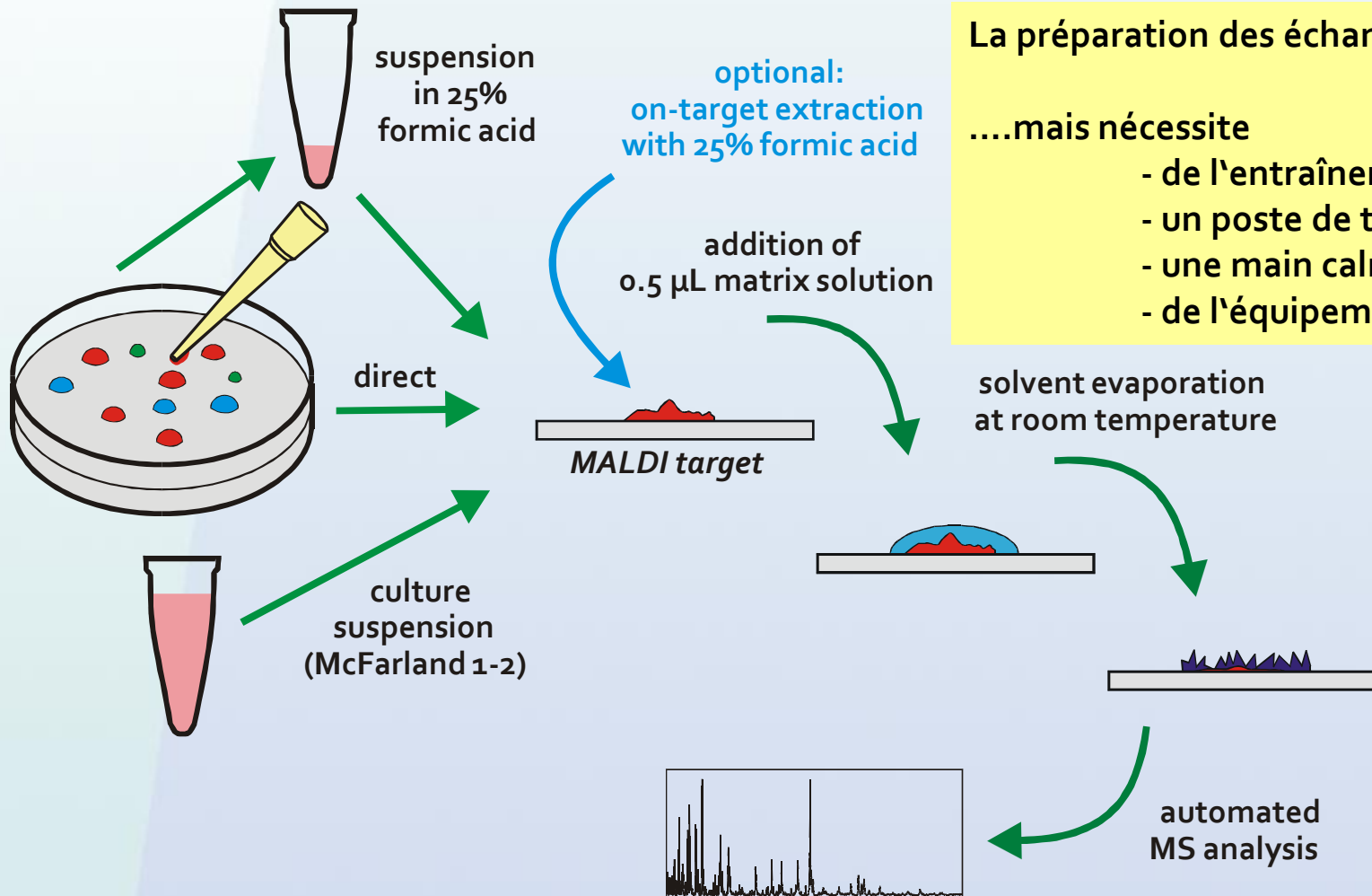


Microflex (Bruker Daltonics)

Axima (Shimadzu)

Axima (bioMérieux)

# Préparation des échantillons

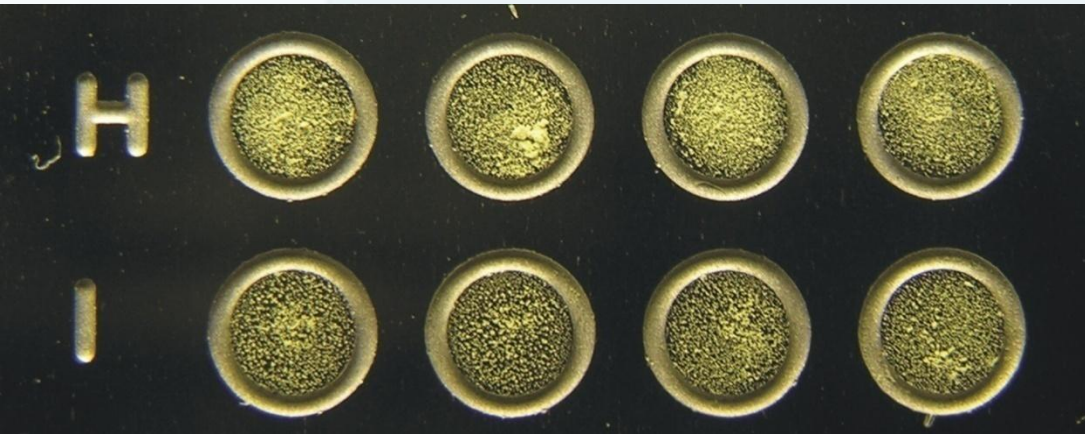


La préparation des échantillons est facile...

....mais nécessite

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

# Choix de la matrice



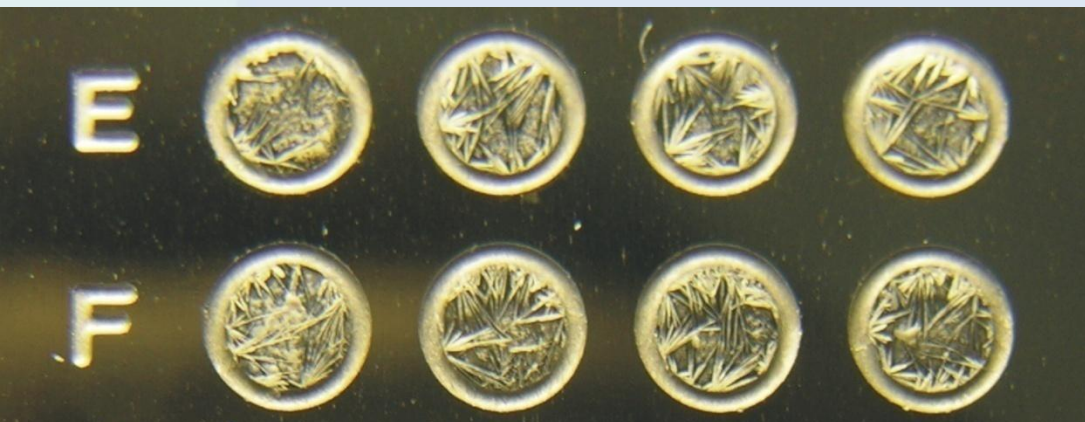
## HCCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) :

Cristallisation régulière

Spectre de qualité en peu de tirs

Spectres de 80-150 signaux

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



## DHB (2, 5-dihydroxybenzoic) :

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

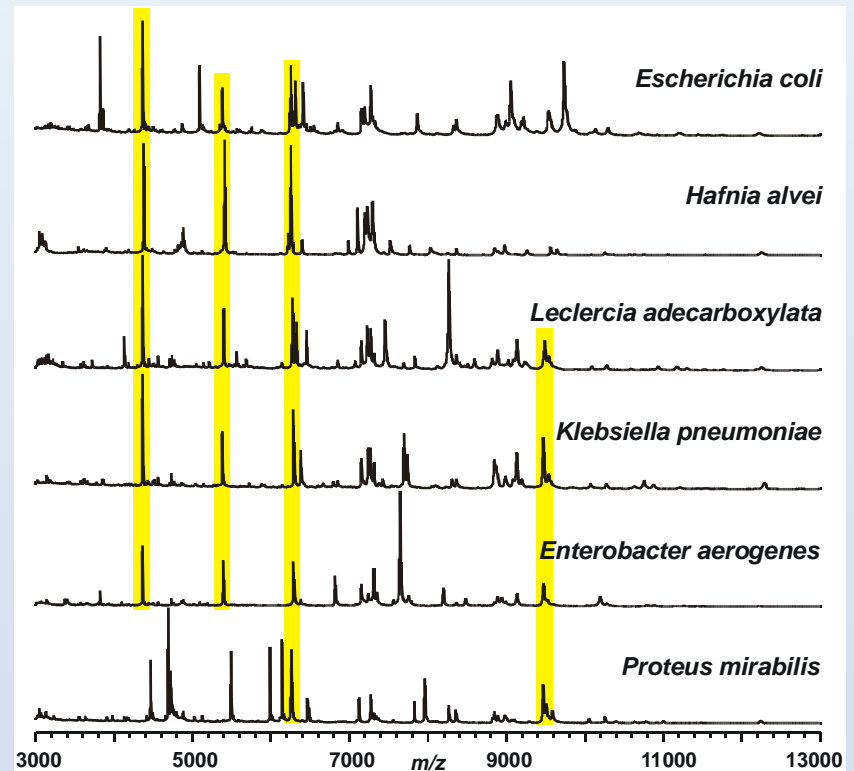
- **De quoi dépend l'intensité du signal?**

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



- Comparaison du spectre obtenu avec les spectres présents dans une base 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="#">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="#">37763</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="#">78658</a>
7 (-)	<i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50244 HAM	1.308	<a href="#">285</a>
8 (-)	<a href="#">Listeria grayi murrei DSM 20596 DSM</a>	1.262	<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>

- **Possibilité d'enrichir la base de données**
  - Par la firme: mises à jour fréquentes
  - Par l'utilisateur: à l'aide de souches bien caractérisées (séquençage)
- **!!! Attention: Mauvaise discrimination des bactéries aux profils protéiques similaires. Par exemple:**
  - *Escherichia coli* et *Shigella* sp.
  - *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus mitis* group

**Depuis juillet 2009:  
Identification bactérienne de première  
ligne:**

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

Sur base des scores d'appariement et de  
critères décisionnels définis:

- Acceptation des identifications
- Méthode d'identification de seconde ligne si  
nécessaire: méthodes phénotypiques  
classiques



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

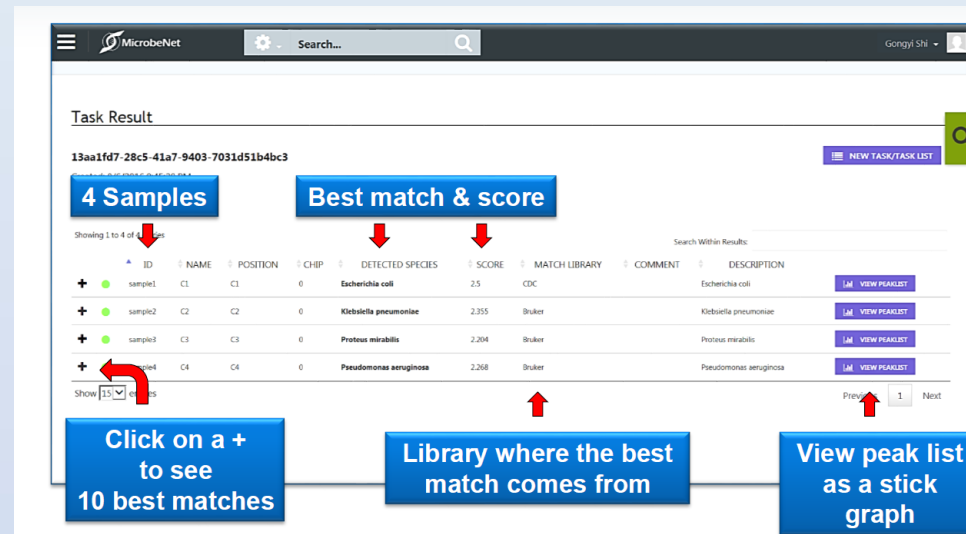
MS Score  $\geq 2.0$  et  $< 2.3$  et 3  
premiers résultats identiques:  
**Bonne identification**

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

- >7000 spectres dans la base de données classique actuelle
  - >2000 espèces différentes
  - Large gamme de microorganismes de l'environnement.
- Base de données bio-terrorisme
- Base de données champignons filamenteux
- Base de données mycobactéries

# Base de données publique: Microbenet (CDC)

- Outil web pour l'identification des microorganismes pathogènes
  - Sur base de leurs propriétés génotypiques, protéomiques et phénotypiques
- Nouvelle application pour la comparaison de spectres MALDI-TOF :
  - DB en ligne
  - Enrichissement continu

**Task Result**

13aa1fd7-28c5-41a7-9403-7031d51b4bc3

**4 Samples**      **Best match & score**

Showing 1 to 4 of 4 results

ID	NAME	POSITION	CHIP	DETECTED SPECIES	SCORE	MATCH LIBRARY	COMMENT	DESCRIPTION
sample1	C1	C1	0	Escherichia coli	2.5	CDC		Escherichia coli
sample2	C2	C2	0	Klebsiella pneumoniae	2.355	Bruker		Klebsiella pneumoniae
sample3	C3	C3	0	Proteus mirabilis	2.204	Bruker		Proteus mirabilis
sample4	C4	C4	0	Pseudomonas aeruginosa	2.268	Bruker		Pseudomonas aeruginosa

Click on a + to see 10 best matches











Library where the best match comes from

View peak list as a stick graph

# Cas clinique 1



- Entérobactérie isolée d'un prélèvement respiratoire chez un patient hospitalisé aux SI.
- Identification MALDI-TOF MS:

Detected Species	Log(Score)
 Enterobacter cloacae 13159 1 CHB	2,164
 Enterobacter asburiae DSM 17506T DSM	2,159
 Enterobacter kobei DSM 13645T DSM	2,145
 Enterobacter cloacae MB11506 1 CHB	2,020
 Enterobacter hormaechei ssp hormaechei DSM 12409T DSM	1,960
 Enterobacter ludwigii DSM 16688T DSM	1,945
 Enterobacter cloacae DSM 30062 DSM	1,941
 Enterobacter cloacae 20105 2 CHB	1,889
 Citrobacter koseri 9553 1 CHB	1,856
 Enterobacter cloacae DSM 46348 DSM	1,843



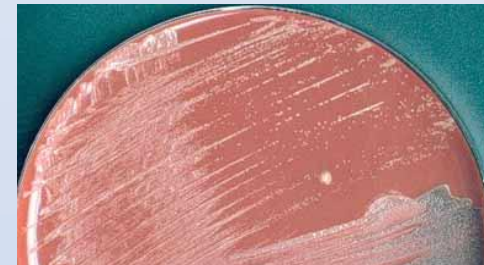
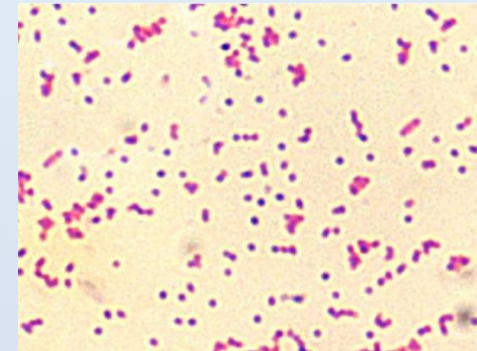
- Mauvaise discrimination des espèces au sein du complexe *E.cloacae*  
→ Rendre ***E.cloacae* complex** pour les espèces suivantes:  

<i>E. asburiae</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>E. hormaechei</i>	<i>E. kobei</i>
<i>E. ludwigii</i>	<i>E. minipressuralis</i>
- Idem pour d'autres groupes bactériens.  
Ex: *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex











- ♂ 64 ans
- Se présente aux urgences avec:
  - Douleurs lombaires irradiées dans l'abdomen
  - Pyrexie
- Laboratoire:
  - CRP 121 mg/l (0-6)
  - Urine et hémocultures prélevées
- Imagerie
  - Aspect de spondylodiscite D10-D11

- 2 HC + après 60h d'incubation (flacon aérobie)
- Coloration GRAM: Coccobacille Gram variable
- Culture: Petites colonies sur gélose au sang
- Identification MALDI-TOF MS:

Detected Species	Log(Score)
Microbacterium saperdae IMET 11076T HKJ	1,339
Delftia acidovorans DSM 39T HAM	1,292
Pandoraea norimbergensis DSM 11628T HAM	1,277
Proteus vulgaris (FX) 22086129 MLD	1,276
Thauera mechernichensis T11 MPB	1,225
Lactobacillus aviarius ssp aviarius DSM 20654 DSM	1,207
Acidovorax avenae ssp avenae DSM 7227T HAM	1,175
Corynebacterium glucuronolyticum DSM 44120T DSM	1,174
Ochrobactrum tritici DSM 13340T HAM	1,159
Delftia acidovorans CCM 283 CCM	1,131



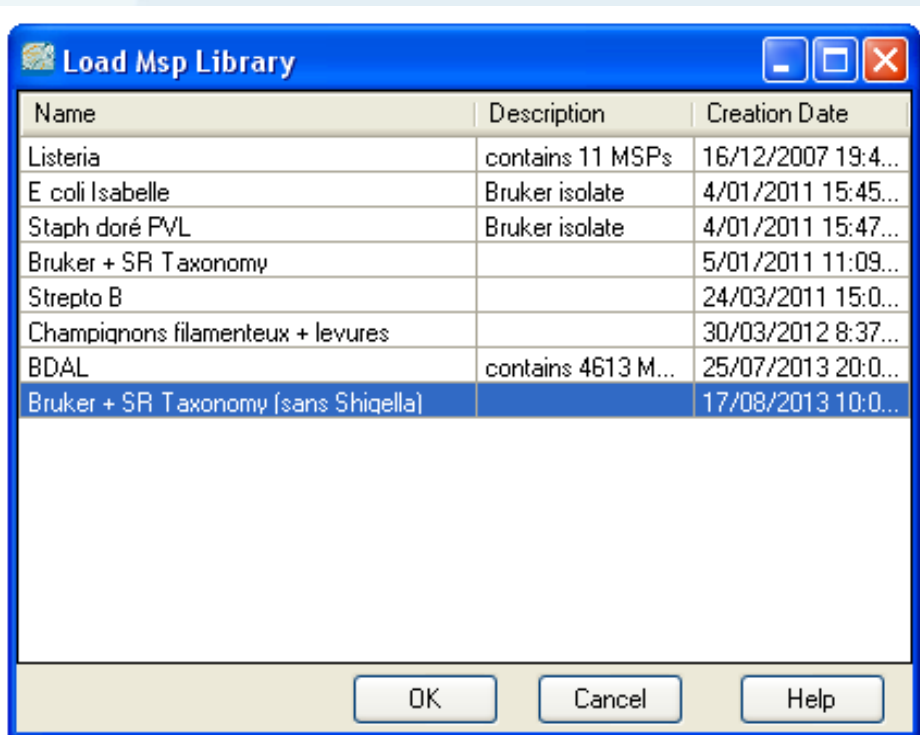
- Patient d'origine turque
- Base de données « Bio-terrorisme »:

Detected Species	Log(Score)
 Brucella melitensis 6767	2,344
 Brucella melitensis 6273	2,240
 Brucella melitensis 5520	2,138
 Brucella melitensis 6073	2,038
 Brucella melitensis 6074	2,030
 Brucella melitensis 5659	1,936
 Shigella dysenteriae 5-42	1,074
 Shigella dysenteriae 6-35	0,842
 Bacillus anthracis 5444	0,834
 Shigella dysenteriae 15-57	0,808

Brucellose en Europe



→ Fusionner les 2 bases de données « classique » et « bio-terrorisme »

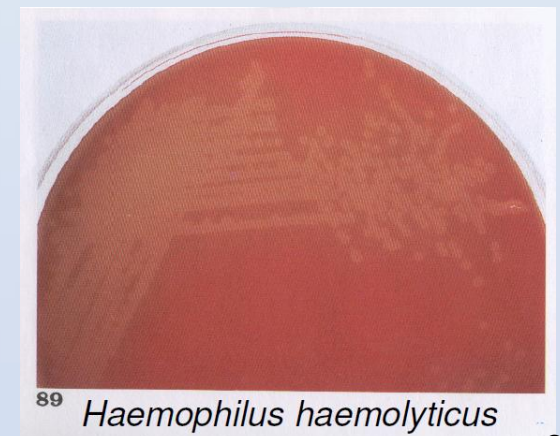


- *Haemophilus sp. humains*:
  - *H. influenzae* (capsulated types a-f)
  - *H. parainfluenzae*
  - *H. haemolyticus*
  - *H. parahaemolyticus*
  - *H. aphrophilus*
  - *H. paraphrophilus*
  - *H. parahaemolyticus*
  - *H. segnis*
  - *H. ducreyi*

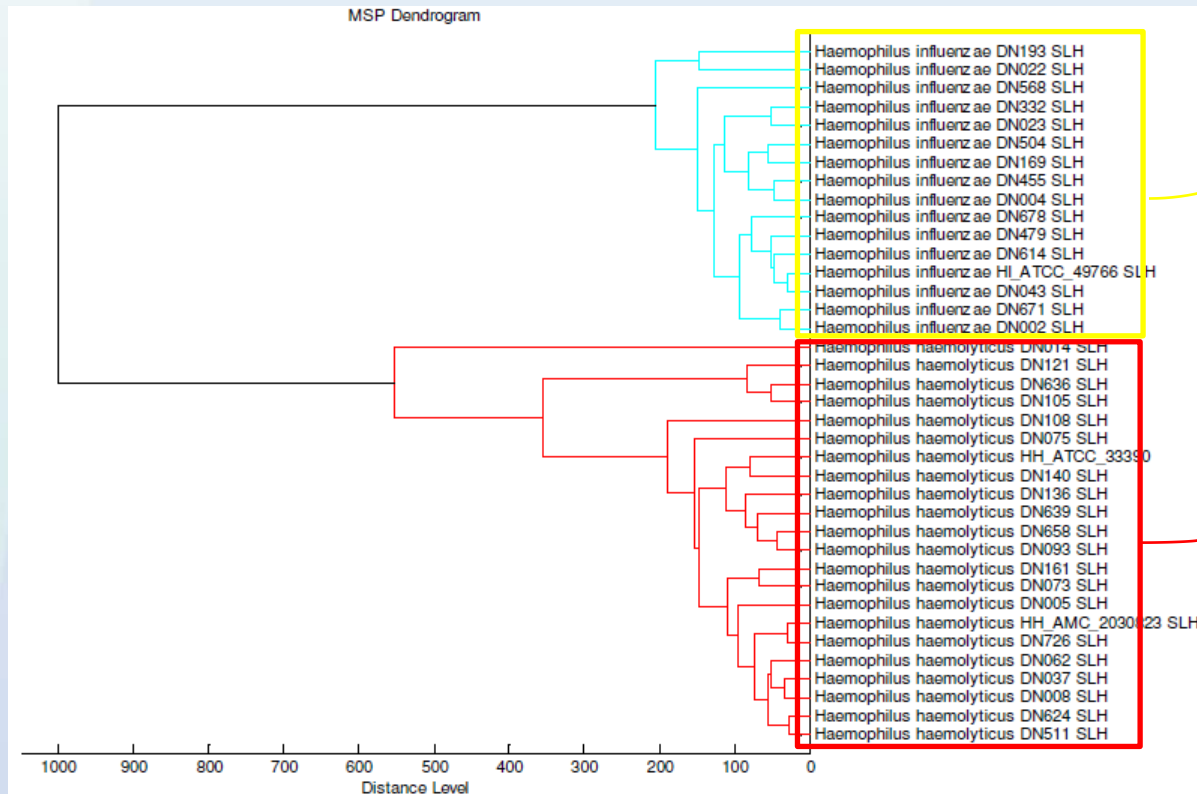
**Absents de  
l'ancienne version  
de la DB Bruker**

- *H. haemolyticus* → identifié comme *H.influenzae* par MALDI-TOF MS
- *H. haemolyticus* ne possède pas le pouvoir pathogène de *H.influenzae* → surdiagnostic
- Identification phénotypique difficile:

Species	X-factor	V-factor	Hemolysis
<i>H. influenzae</i>	+	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+



- Ajout avec succès de spectres de référence par un laboratoire  
(Regional Laboratory of Public Health – Haarlem)

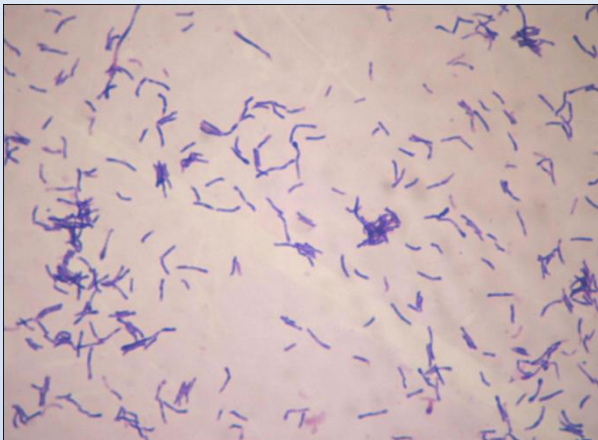


*H. influenzae*

*H. haemolyticus*



- ♂ 44 ans
- Abscès amygdalien droit
- Culture anaérobie positive après 11 jours d'incubation
- Gram: Coccobacilles Gram positif



- MALDI-TOF MS:
  - Dépôt direct: No peak found
  - Extraction Ethanol - Ac. formique:

Detected Species	Log(Score)
Actinomyces israelii DSM 43320T DSM	1,504
Propionibacterium avidum 339 RLT	1,378
Aromatoleum anaerobicus LuFRes1 MPB	1,297
Providencia rettgeri 20837 2 CHB	1,259
Agromyces italicus HKI 325 DSM 16388T HKJ	1,179
Lactobacillus curvatus DSM 20496 DSM	1,176
Pseudomonas oryzae HAM	1,174
Arthrobacter citreus DSM 20133T DSM	1,171
Lactobacillus malefermentans DSM 20570 DSM	1,162
Streptomyces avidinii B190 UFL	1,159

- Score bas et 1 seule proposition
- Identification identique lors de réanalyses
- Compatible avec la clinique
  
- Séquençage:
  - Identification bactérienne 16s sur culture bactérienne:  
*Actinomyces israelii* 99.6% sur 1020pb

- Identification difficile des bactéries à croissance lente.
- Extraction Ethanol-Ac.formique permet d'améliorer le résultat.
- Répéter les identifications sur plusieurs extraits.
- Confirmer par séquençage si score bas.

# Identifications par MALDI-TOF MS: Autres applications

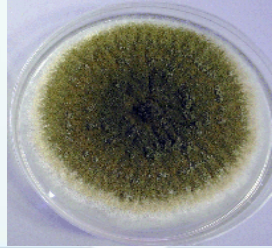
- Levures
- Champignons filamenteux
- Identifications < flacon d'hémoculture
- Mycobactéries
- Prélèvements environnementaux

- 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 au CHU Liège:

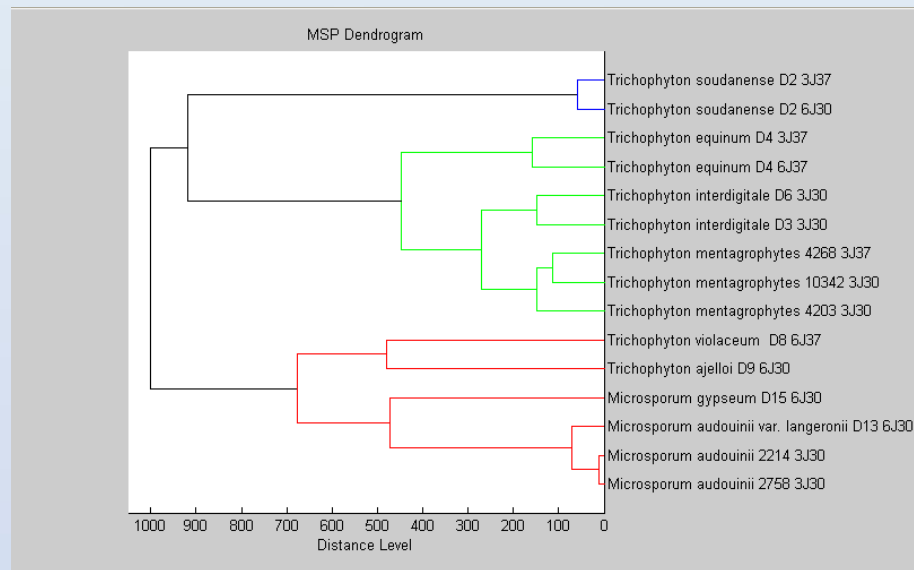
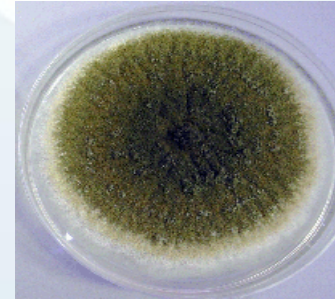
MS Score  $\geq 1.4$  **et** 3 premiers résultats identiques **et** aspect des colonies sur gélose cohérent avec l'identification: **Identification acceptable**



## Expérience du CHU Liège:

- Participation au projet international Bruker « Filamentous fungi »
  - Evaluation de différentes techniques d'extraction
  - Contribution à la création de la base de données complémentaire

- Enrichissement de la base de données
  - Avec des souches de références
  - Avec des souches cliniques bien caractérisées

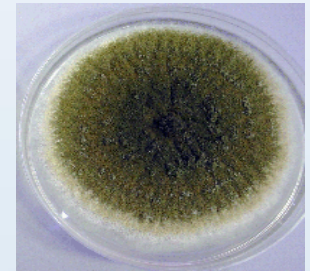




→ Extraction éthanol/ac.formique à partir d'une culture solide ou liquide

OU

→ Dépôt direct: parfois difficile



- Le contrôle microscopique demeure essentiel !!
- Le séquençage permet une identification définitive, si N



# ID directe < flacons d'hémoculture positifs

Hémocultures = Mise en culture du sang circulant  
pour diagnostiquer une bactériémie

– Différents automates sur le marché



# ID directe < flacons d'hémoculture positifs

- En cas de croissance bactérienne dans le flacon: mode opératoire classique



Mise en culture sur gélose

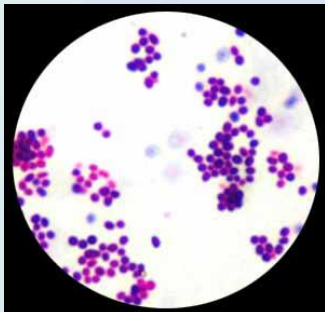
Incubation 4 → 18h  
(ou plus)



ID MALDI

5 minutes

*Staphylococcus  
epidermidis*



Coloration de Gram

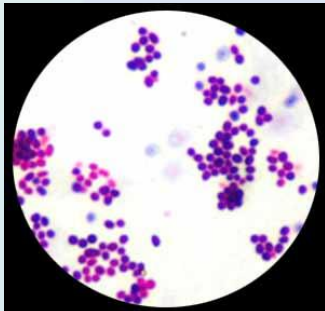
Identification complète  
en 4h (bacilles Gram -)  
à 18h, voire plus.

# ID directe < flacons d'hémoculture positifs

- MALDI-TOF MS technique directe



Mise en culture sur gélose



Coloration de Gram

## Positive Blood Culture Bottle



1 ml de sang dans un  
tube eppendorf – 1 min

Ajouter un réactif de lyse  
des GR – 10 sec

Centrifuger 2 min, éliminer  
le surnageant – 2 min

Ajouter 1 ml de tampon –  
1.5 min

Centrifuger 1 min, éliminer  
le surnageant – 1 min

Extraction  
éthanol/ac.formique – 10 min



Identification complète  
en moins de 20 minutes!!

# ID directe < flacons d'hémoculture positifs

## Expérience du CHU Liège:

- Différents protocoles d'extraction testés
  - MALDI Sepsityper<sup>®</sup> Kit (Bruker)
  - Lyse à la saponine (5%)

Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction

Cécile Meex, Florence Neuville, Julie Descy, Pascale Huynen, Marie-Pierre Hayette, Patrick De Mol and Pierrette Melin

Medical Microbiology, University Hospital of Liège, Liège, Belgium

*Journal of Medical Microbiology* (2012), **61**, 1511–1516



# ID directe < flacons d'hémoculture positifs

## **Critère décisionnel** (défini au CHU Liège)

- Acceptation de l'identification si les 3 premiers résultats rendus sont identiques, quel que soit le score obtenu.

## **Méthode de référence**

- Méthode conventionnelle : identification par MALDI-TOF après ensemencement et croissance sur gélose.

# ID directe < flacons d'hémoculture positifs

## Hémocultures monomicrobiennes

	Pourcentage d'identifications directes		
	Sepsityper kit	Lyse à la saponine	
Gram négatif (40)	82.5%	90%	p = 0.4497
Gram positif (67)	58%	52%	p = 0.5563

Aucune discordance avec la méthode de référence

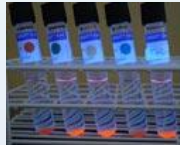
## Hémocultures polymicrobiennes:

- 1 seul microorganisme identifié par technique directe

### Nouveau logiciel MBT Compass adapté aux hémocultures:

- Adaptation des seuils d'acceptation des résultats
  - Identification des différents microorganismes en cas d'HC polymicrobienne
- A évaluer!

- Nouveau protocole avec billes de silices
- Applicable à partir de BACTEC™ MGIT™ et milieu Lowenstein-Jensen
- Pas de distinction à l'intérieur du *M. tuberculosis* complex



## Optimized method using silica beads

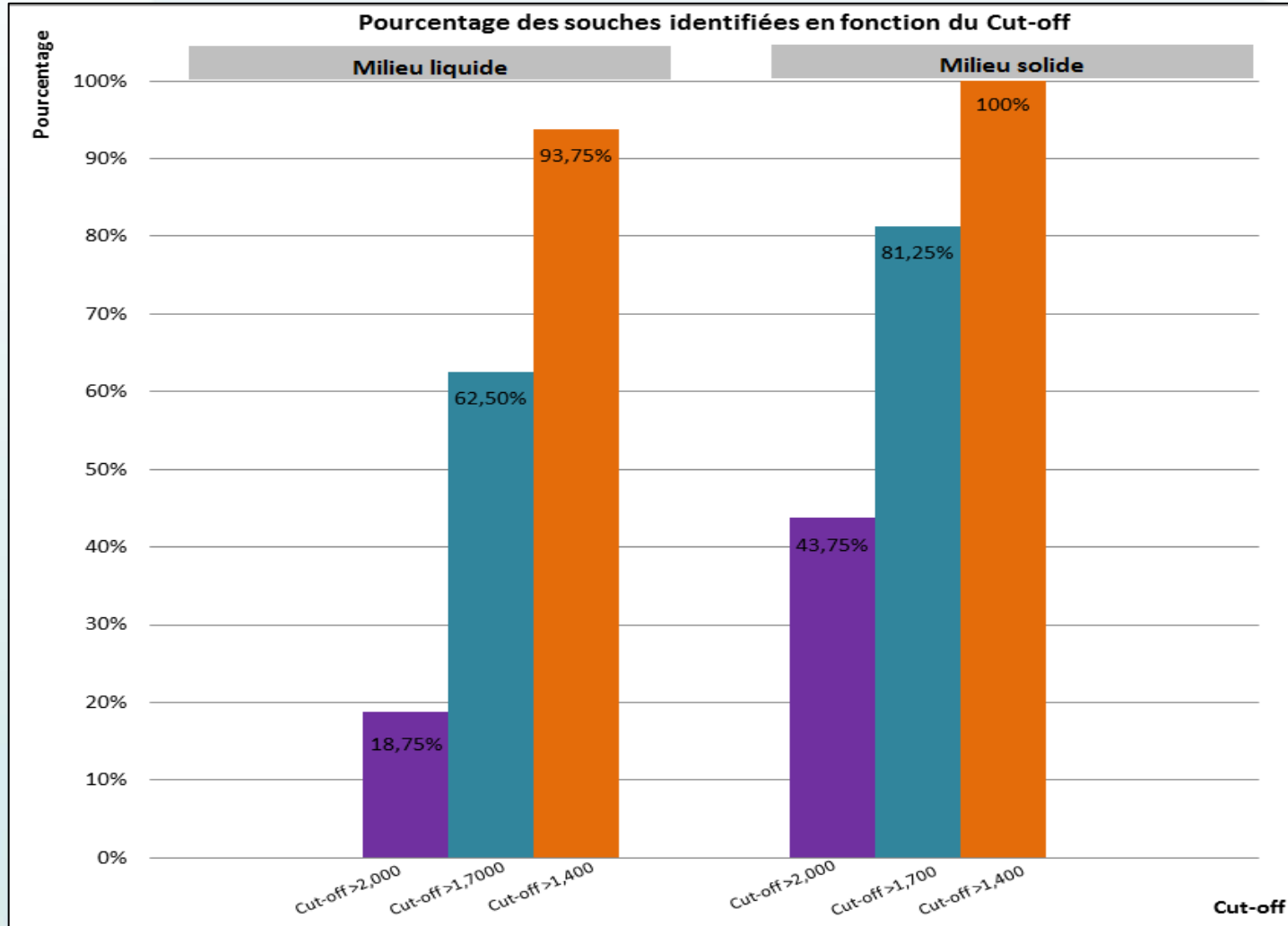
- Biomass of mycobacteria in 75% ethanol, centrifugation
- Washing step, 500 µl water
- Resuspend pellet in 50 µl of water, 30 min heating 95C
- Addition of 1,2 ml ice cold ethanol
- Centrifugation, discard supernatant
- Suspend dried pellet in acetonitrile
- Addition of silica beads (0.5 mm)
- Vortex for 1 min
- Addition of 70% formic acid
- Vortex for 10 sec
- Centrifugation
- 1 µl of supernatant on a MALDI target

## Mycobacteria Library

M. abscessus ssp abscessus	M. colombiense	M. intermedium	M. pseudoshottsii
M. abscessus ssp bolletii	M. conceptionense	M. intracellulare	M. pulveris
M. agri	M. confluentis	M. kansasii	M. rhodesiae
M. alvei	M. conspicuum	M. kumamotoense	M. saskatchewanense
M. arosiense	M. cosmeticum	M. lacus	M. scrofulaceum
M. arupense	M. diernhoferi	M. lentiflavum	M. senegalense
M. asiaticum	M. elephantis	M. mageritense	M. senuense
M. aurum	M. farcinogenes	M. malmoense	M. seoulense
M. austroafricanum	M. florentinum	M. mantenii	M. septicum
M. avium subsp. avium	M. fortuitum subsp. acetamidolyticum	M. marinum	M. setense
M. avium subsp. paratuberculosis	M. fortuitum subsp. fortuitum	M. monacense	M. shimoidei
M. avium subsp. silvaticum	M. gastri	M. montefiorensis	M. shottsii
M. boenickei	M. gilvum	M. mucogenicum	M. simiae
M. bohemicum	M. goodii	M. neoaurum	M. smegmatis
M. botniense	M. gordoniae	M. neworleansense	M. szulgai
M. bovis	M. haemophilum	M. nonchromogenicum	M. thermoresistibile
M. branderi	M. hassiacum	M. novocastrense	M. tokaiense
M. brumae	M. heckeshornense	M. parafortuitum	M. triplex
M. brisbanense	M. heidelbergense	M. parascrofulaceum	M. tuberculosis
M. canariasense	M. hiberniae	M. paraseoulense	M. vaccae
M. celatum	M. hodleri	M. parmense	M. wolinskyi
M. chelonae subsp. chelonae	M. houstonense	M. peregrinum	M. xenopi
M. chimaera	M. immunogenum	M. phlei	
M. chitae	M. insubricum	M. phocaicum	
M. chlorophenicum	M. interjectum	M. porcinum	

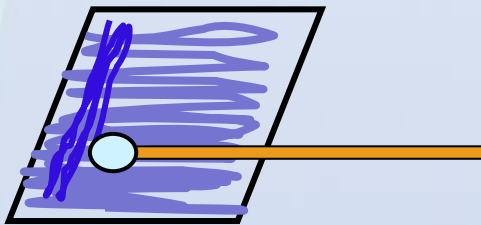
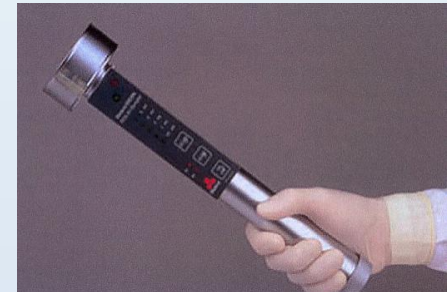


- **Validation**
  - de la technique d'extraction
  - de la base de données fournie par Bruker
- **Mycobactéries atypiques**
  - 17 souches cliniques caractérisées par INNO-LIPA ou séquençage
  - 2 souches contrôles distribuées par l'ISP

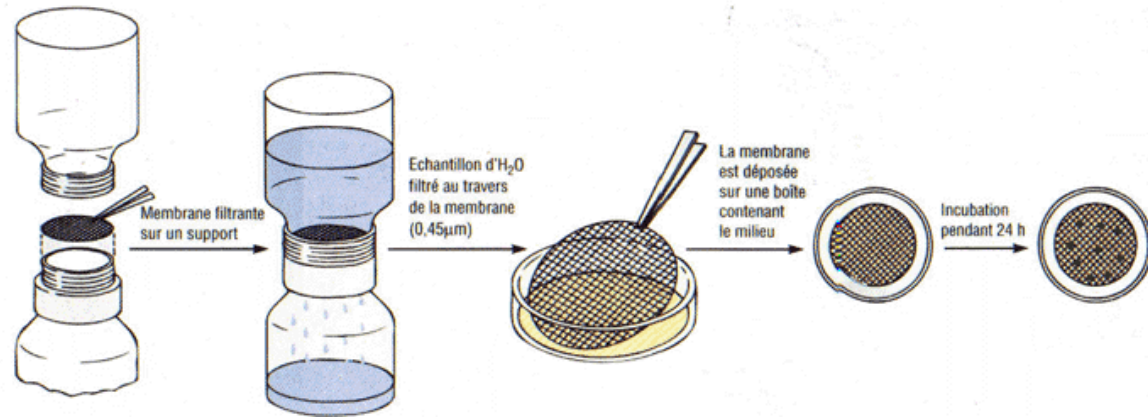


- Protocole d'inactivation/extraction efficace et facile à mettre en oeuvre
- Analyse manuelle des spectres (tirs manuels + réglage laser) → *time consuming*
- Multiplication des dépôts (3) pour résultats optimaux
- Résultats équivalents pour les deux milieux : MGIT plus intéressant
  
- Proposition de nouveaux critères d'acceptation de l'identification :
  - Cut-off >1,400
  - les 3 premiers spectres identiques
  
- Aucune erreur d'identification observé lors de l'évaluation

- **Contrôle de la contamination de l'air**
  - Aspiration
  - Sédimentation
- **Contrôle des surfaces**
  - Milieux RODAC
  - Ecouvillonnage



- **Contrôle de la contamination de l'eau**
  - Ensemencement direct
  - Filtration membranaire



- Définir un **calendrier** pour la réalisation des prélèvements de contrôle
- Pour chaque site prélevé:
  - Définir des **seuils d'acceptabilité et d'alerte**
  - Définir des **actions correctives**

## Prélèvements d'air/surface

- En général, les standards exigent **uniquement un comptage des microorganismes.**
- L'identification n'est pas exigée

MAIS...

**L'identification** peut être informative pour **détecter un problème plus rapidement**, avant que le seuil d'alerte soit atteint.

# Exemple: dans l'industrie (1)

- Unité de production 1
- Contrôle journalier de
  - 2 points de surface
  - 1 point d'air
- Seuil d'acceptabilité pour les contrôles de surface:  $\leq 2$  CFU/milieu

Points critiques	Janvier 2015 - CFU/milieu											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	0	0	1	2	0	1	2	2	2	0	1	1
S2												
A1												

→ OK, pas d'alerte



## Exemple: dans l'industrie (2)

Points critiques	Janvier 2015 - CFU/milieu											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	0	0	1	2	0	1	2	1	1	0	2	1
S2												
A1												

ID des microorg.:

*Candida albicans*

*C. alb.*  
+ CNS

*Bacillus*  
sp.

*C. alb.*  
+  
*Bacillus*  
sp.

*C. alb.*

CNS

*C. alb.*+  
*Micrococ*  
-*cus* sp.

*Bacillus*  
sp.

- Récurrence de *Candida albicans*
- *C.alb.*, réservoir = peau-muqueuse humaine/animale  
→ suggère une contamination d'origine humaine, probablement une mauvaise application des règles d'hygiène par un membre de l'équipe.

## Exemple: dans l'industrie (3)

- Action corrective/préventive: quels étaient les membres (M) de l'équipe impliqués ?

Critical points	January 2015 - CFU/plate											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	0	0	1	2	0	1	2	1	1	0	2	1
S2												
A1												

		↓	↓			↓	↓	↓	↓		↓	↓
		<i>Candida albicans</i>	<i>C. alb.</i> + CNS			<i>Bacillus</i> sp.	<i>C. alb.</i> + <i>Bacillus</i> sp.	<i>C. alb.</i>	CNS		<i>C. alb.</i> + <i>Micrococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
		M 2	M 2			M 1	M 2	M 2	M 1		M 2	M 1

- *C. alb* lié à M 2 → Actions correctives:
  - Protection des lésions cutanées
  - Nouvelles formations

- *Staphylococcus spp*
  - Contamination d'origine humaine
    - Vérifier l'adéquation des vestiaires, par ex.
- *Bacillus spp*
  - Contamination environnementale
    - Vérifier les modes d'entrée des équipement dans les salles blanches, par ex.

- **Avant MALDI Biotyper:**

- Méthodes biochimiques
- Pour les microorg. non cliniques:
  - ID au genre quand possible ou
  - Apparence du Gram uniquement

→ Frustrant!!

- *Pseudomonas sp.*
- Bacilles Gram négatif non fermentants
- *Bacillus sp.*
- B+
- C+
- ...

- **Avec MALDI Biotyper:**

- ID performante des microorg. de l'environnement
- Monitoring de la contamination par ces μorg devenu possible
- Plans d'action plus spécifiques et efficaces

## ID biochimique

- 1, Sphingomonas parapaucimobilis, ++, 2.22249083480005
- 2, Sphingomonas pseudosanguinis, +, 1.87024376503824
- 3, psepau, Sphingomonas paucimobilis, +, 1.83687465754116
- 4, Sphingomonas sanguinis, +, 1.77894953404709
- 5, psepau, Sphingomonas paucimobilis, +, 1.71784723534006
- 6, Sphingomonas sanguinis, -, 1.39996763663569
- 7, Sphingomonas yabuuchiae, -, 1.38643478386013
- 8, psespe, Pseudomonas extremorientalis, -, 1.34813786587527
- 9, psepau, Sphingomonas paucimobilis, -, 1.19291842484405
- 10, neimen, Neisseria meningitidis, -, 1.17275990650255

- 1, Exiguobacterium aurantiacum, ++, 2.27313856836564
- 2, Candida\_sorbosa[ana], -, 1.30206855546366
- 3, Lactobacillus fermentum, -, 1.28610535195844
- 4, Vibrio cholerae, -, 1.25284481101925
- 5, Streptomyces lavendulae, -, 1.25130160993391

- 1, Dermacoccus nishinomiyaensis, +++, 2.34699159530819
- 2, Dermacoccus nishinomiyaensis, ++, 2.21234456189358
- 3, Dermacoccus nishinomiyaensis, ++, 2.19597245695734
- 4, dernis, Dermacoccus nishinomiyaensis, +, 1.83187074187804
- 5, Lactobacillus crispatus, -, 1.40777636813167
- 6, psespe, Pseudomonas brassicacearum, -, 1.31255333250293
- 7, Arthrobacter creatinolyticus, -, 1.30801819401156
- 8, Arthrobacter parietis, -, 1.3052652806702
- 9, Microbacterium liquefaciens, -, 1.28138057509926
- 10, Enterococcus devriesei, -, 1.28055838185214

## ID par MALDI Biotyper

*Pseudomonas brenneri*

...

*Sphingomonas parapaucimobilis*

*Delftia acidovorans*

...

*Paenibacillus gluconolyticus*

...

*Exiguobacterium aurantiacum*

*Brevibacterium casei*

...

*Kocuria rhizophila*

*Dermacoccus nishinomiyaensis*

...

...

# Spectrométrie de masse MALDI-TOF

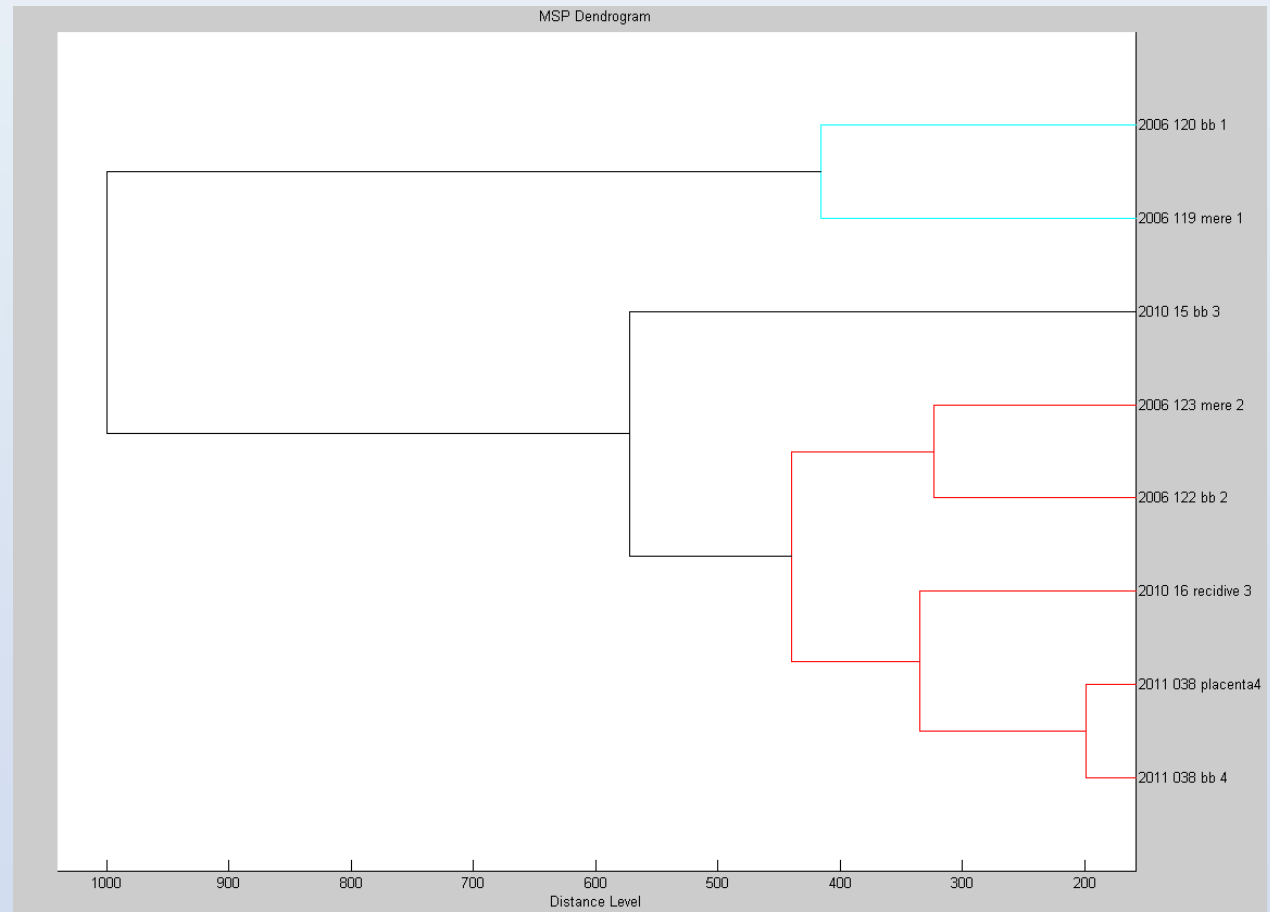
## APPLICATIONS EN MICROBIOLOGIE

1. Identifications bactériennes et fongiques
2. **Typage**
3. Détection de résistance aux antibiotiques

- **Mise en évidence de souches liées**
  - Dendrogrammes

*Streptococcus agalactiae*  
(groupe B):

Comparaison des  
souches de la  
mère et du  
nouveau-né

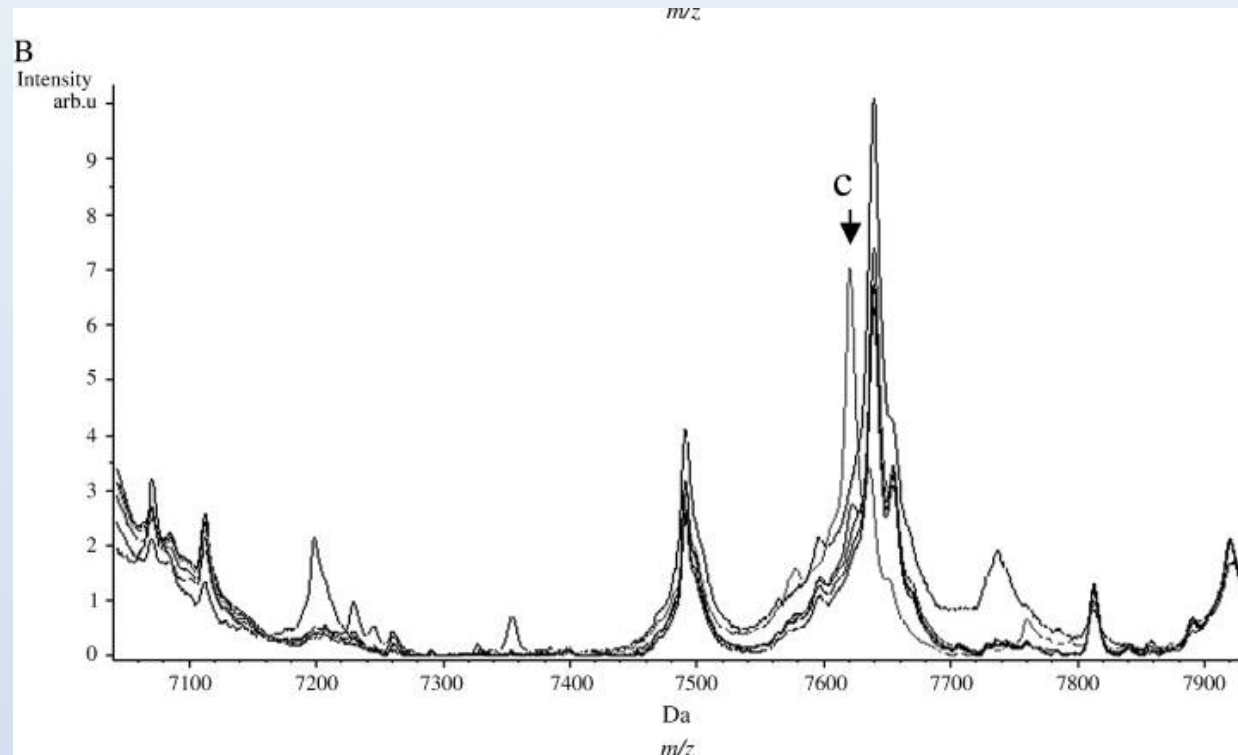


- **Identification de souches spécifiques**

*Streptococcus agalactiae* (groupe B):

Identification des souches ST-17:

Pic à  $m/z$  7625 à la place de  $m/z$  7650



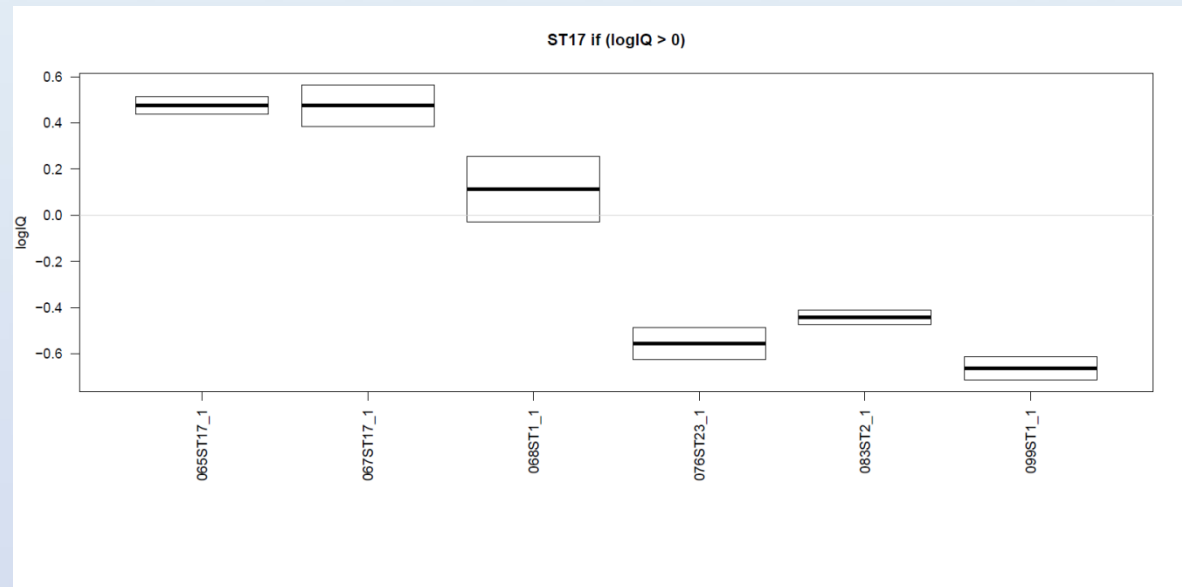


- Identification de souches spécifiques**
  - Mise au point d'un prototype de détection

*Streptococcus*
  
*agalactiae* (groupe B):

Identification des
   
 souches ST-17:

Pic à m/z 7625 à la
   
 place de m/z 7650



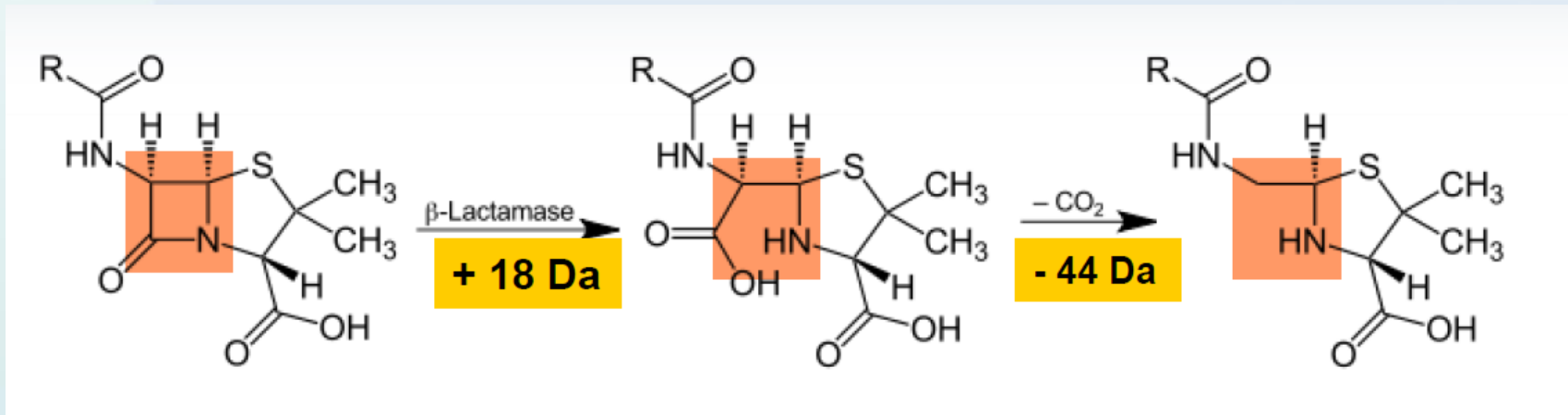
# Spectrométrie de masse MALDI-TOF

## APPLICATIONS EN MICROBIOLOGIE

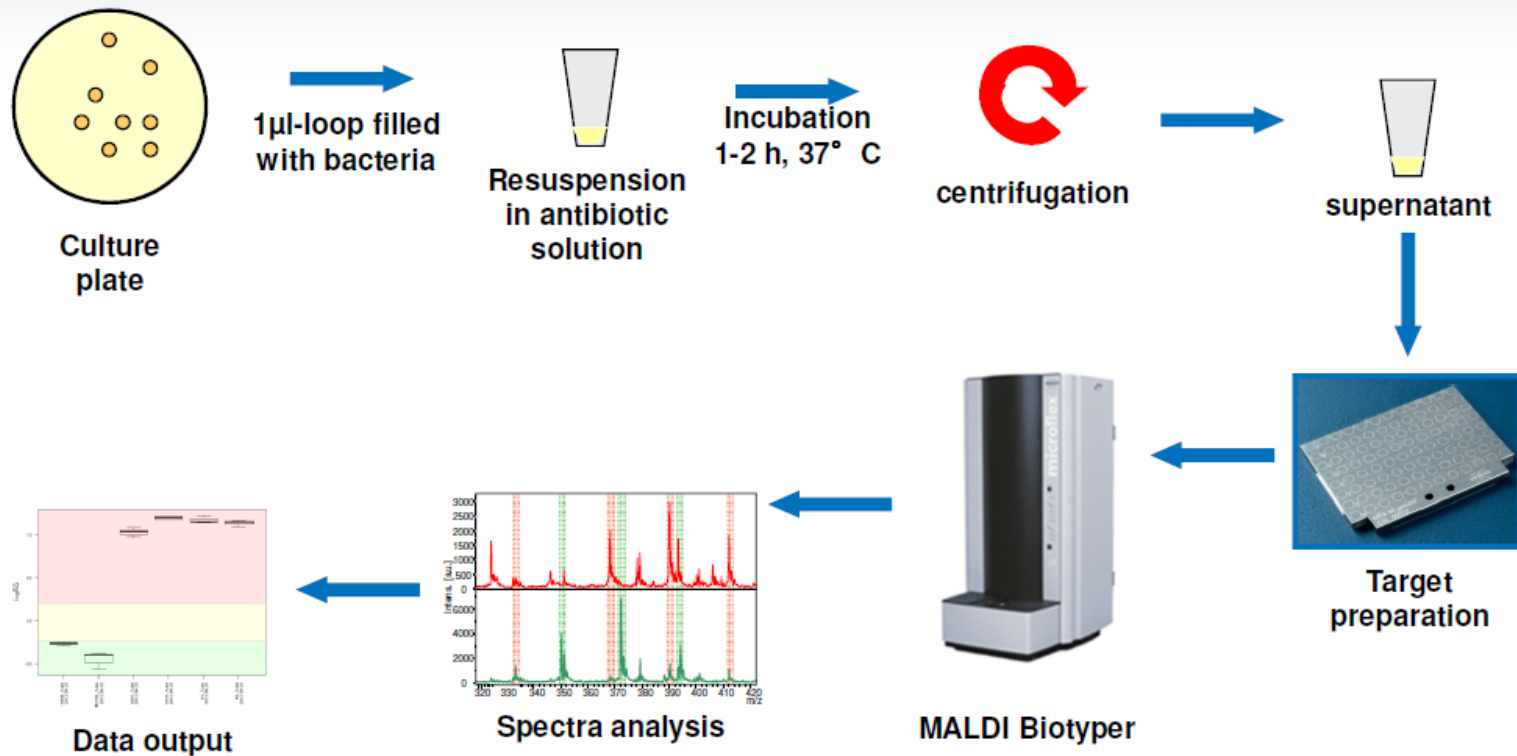
1. Identifications bactériennes et fongiques
2. Typage
3. **Détection de résistance aux antibiotiques**

## Que cherche-t-on?

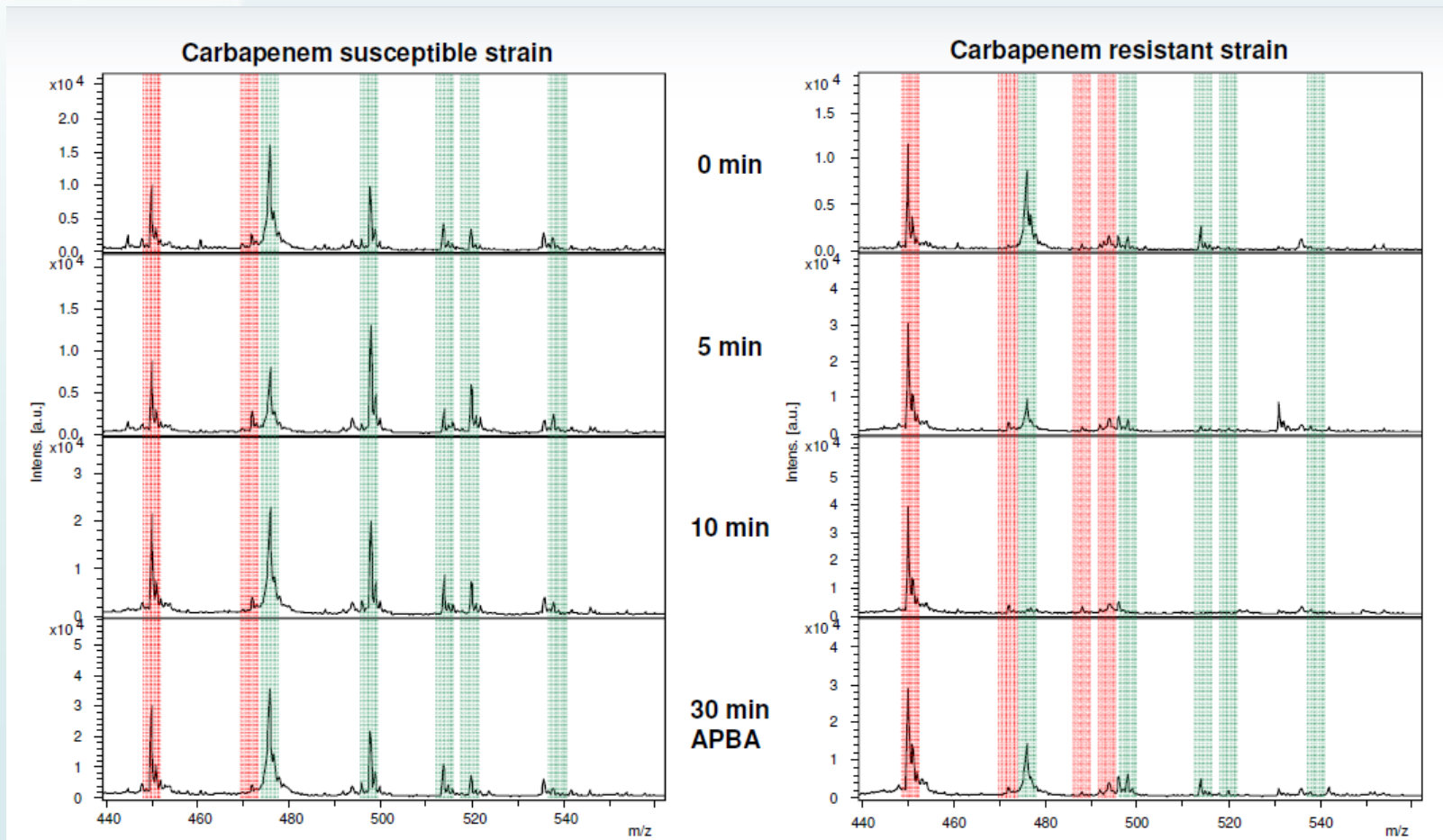
- Produits de dégradation des antibiotiques par les bêta-lactamases



## Comment?

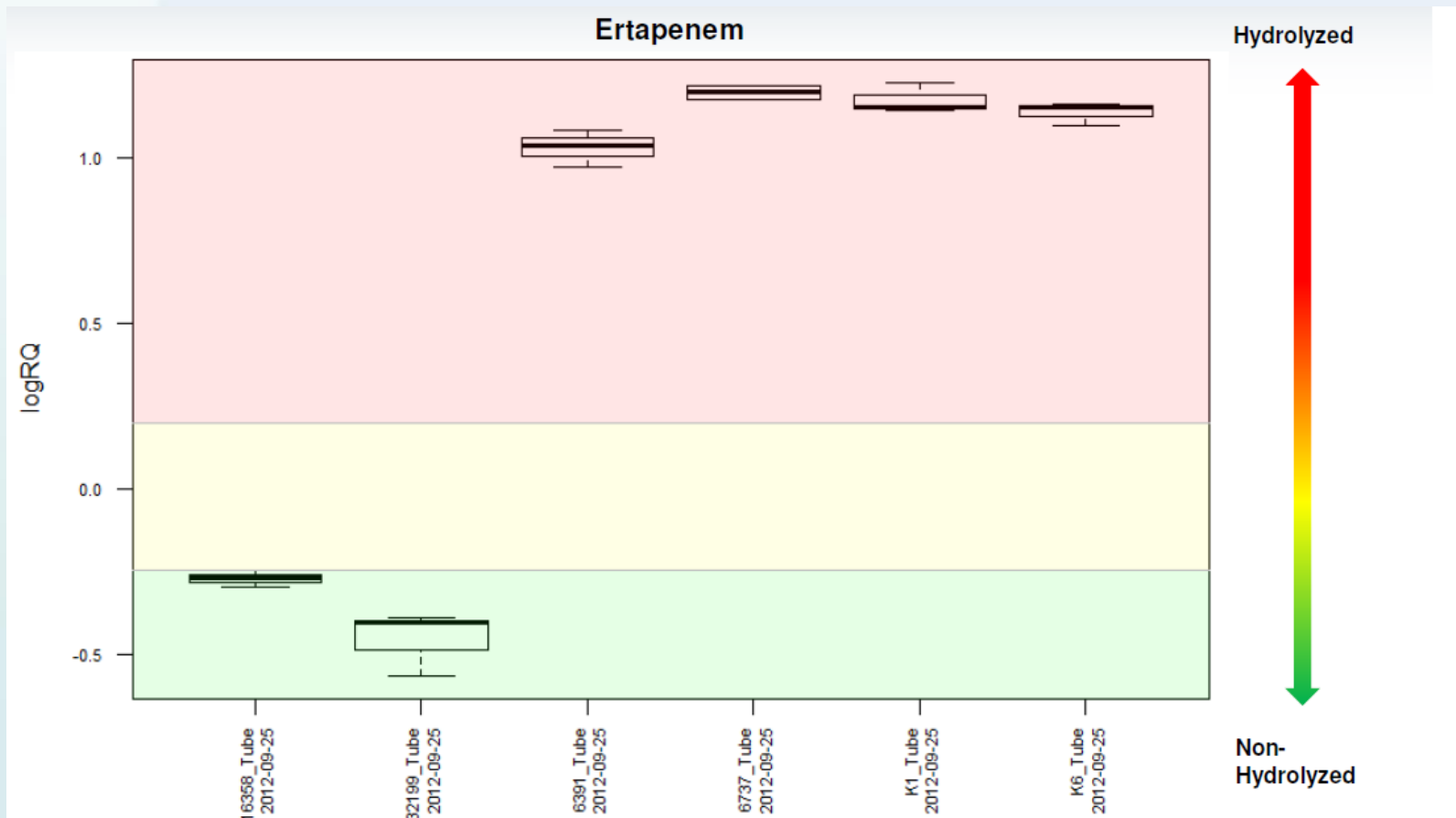


## Cinétique d'hydrolyse de l'ertapénème par un *K.pneumoniae* KPC



# MSBL assay (mass spectrometric $\beta$ -lactamase assay)

Logiciel développé pour l'analyse automatique des données



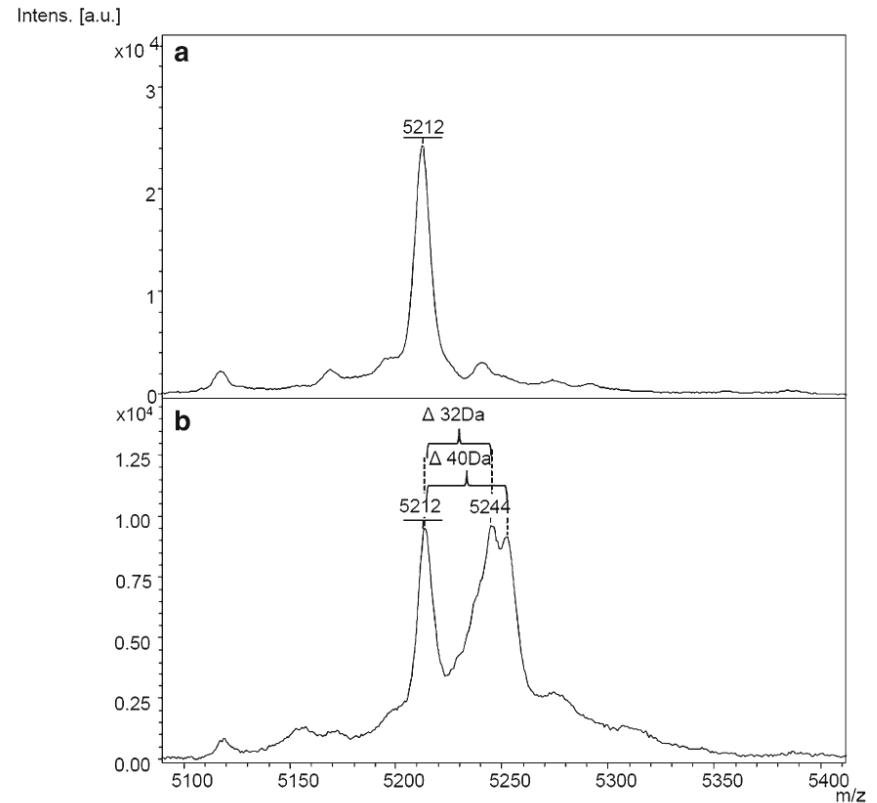
# MBT-RESIST

(resistance test with stable isotope labeled amino acids)

- Incorporation d'isotopes stables d'acides aminés dans les protéines nouvellement synthétisées
- Incubation de la bactérie à tester dans un milieu de culture supplémenté avec aa « normal » ou « lourd »
- Quantité d'aa « lourd » incorporé en présence d'un AB détermine si souche est « sensible » ou « résistante »

- Testé pour:
  - Détection du MRSA
    - oxacilline
    - ceftioxime
  - Détection de résistance du *Pseudomonas aeruginosa*
    - ciprofloxacine
    - méropénème
    - tobramycine

**Fig. 1** A representative peak shift in the matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) spectrum of *Pseudomonas aeruginosa*: **a** *P. aeruginosa* grown in a medium containing native lysine; **b** *P. aeruginosa* grown for 2.5 h in a medium containing  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -labelled lysine. The incorporation of the labelled lysine resulted in 2 new peaks at 5244.608 Da and 5252.747 Da





# **Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

## **CONCLUSIONS**

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

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

- Identification fiable pour les bactéries et levures
- Identification rapide
- Faible coût des consommables  
(!! coût de la machine et des mises à jour)
- Utilisation simple
- Intégration possible dans un système automatisé global de bactériologie
- Possibilités de typage rapide

- Croissance bactérienne sur milieu solide nécessaire dans la plupart des cas.
- Bactéries difficilement différenciables si profils protéiques similaires
- Identification plus difficile des bactéries et champignons à croissance lente.
- Développements encore nécessaires pour l'identification des champignons filamenteux.
- Procédure de détection des résistances aux antibiotiques à standardiser.

# Conclusion

## Spectrométrie de masse MALDI-TOF:



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