Apport du MALDI-TOF en bactériologie

Microbiologie Médicale – CHU de Liège
Cécile Meex

Objectifs du laboratoire de Microbiologie clinique

Collection de l'échantillon

Analyse de l'échantillon: présence de pathogènes

Identification

Sensibilité aux antibiotiques

Prise en charge optimale du patient

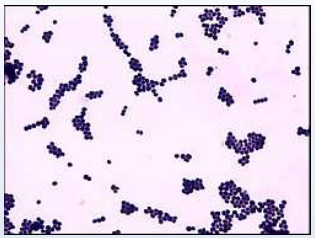
!!! Dialogue clinicien / biologiste !!!

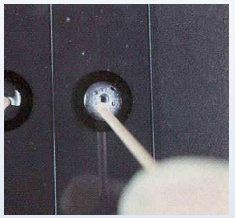
Le **plus rapide** et le **moins coûteux** possible!!

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

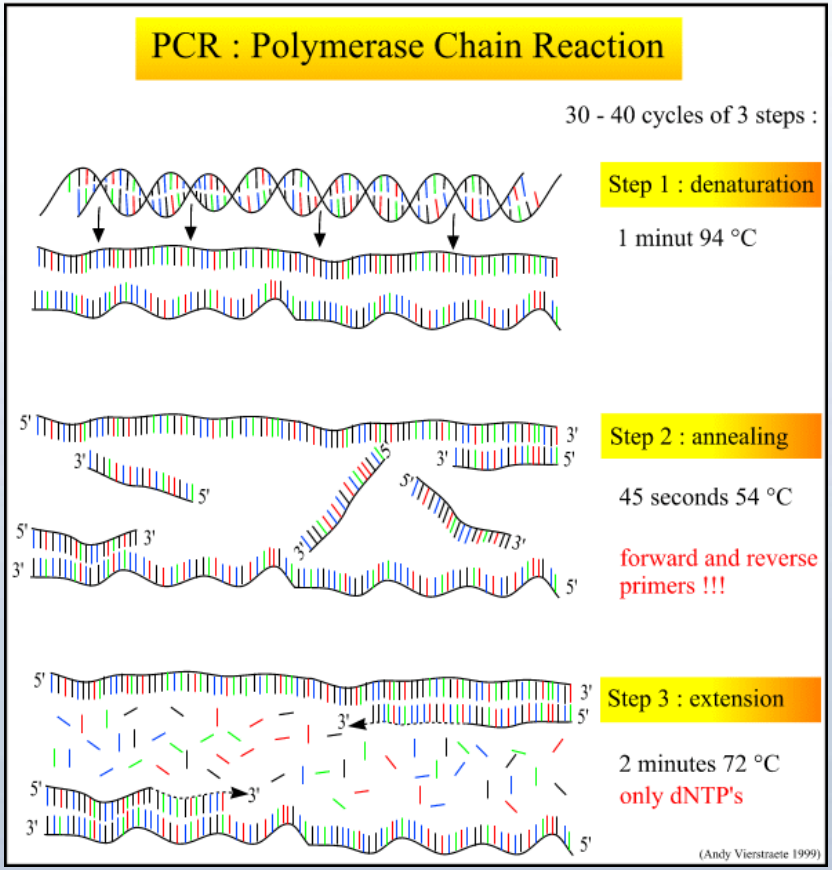
- ☹ Strictement empirique et réservée aux espèces les plus fréquentes
- ☹ Pas parfaitement cohérente avec la taxonomie microbiologique actuelle
- ☹ Nécessite une présélection pour la réalisation de tests appropriés
- ☹ Nécessite une incubation de plusieurs heures avant résultat

Identification bactérienne (3)

Biologie moléculaire

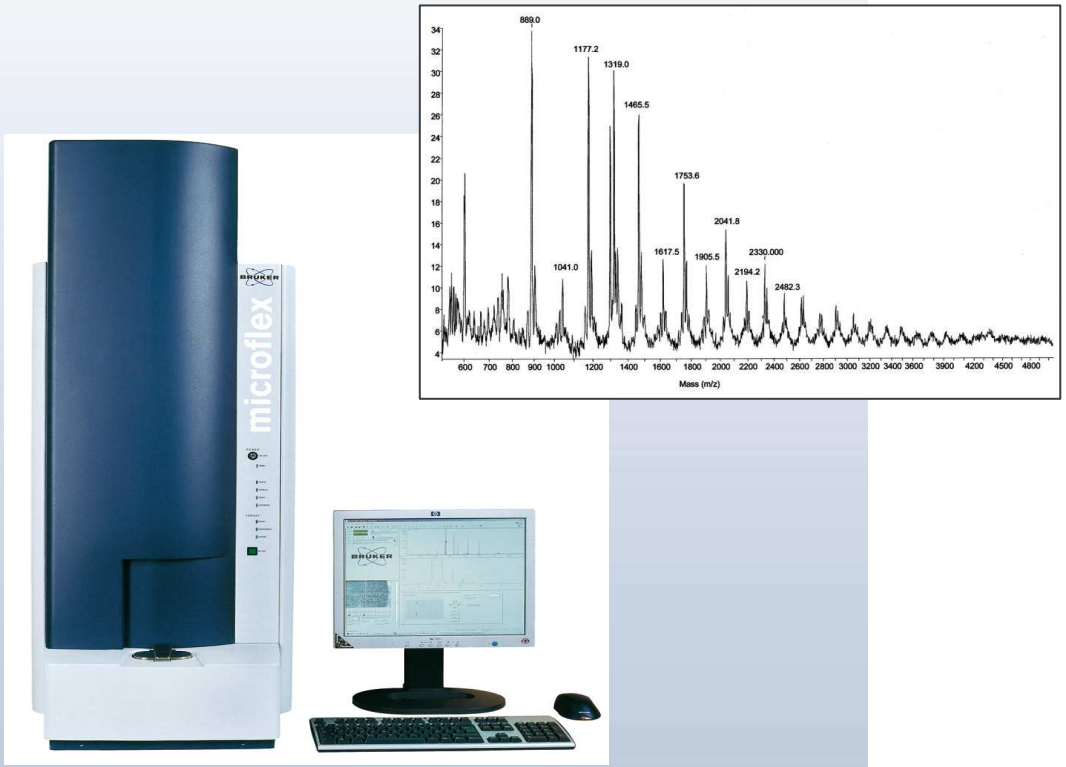
A partir d'une culture sur milieu solide ou du prélèvement primaire:

- **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 **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization **T**ime-**O**f-**F**light **M**ass **S**pectrometry

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†, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida and Tamio Yoshida
Shimadzu Corporation, Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604, Japan

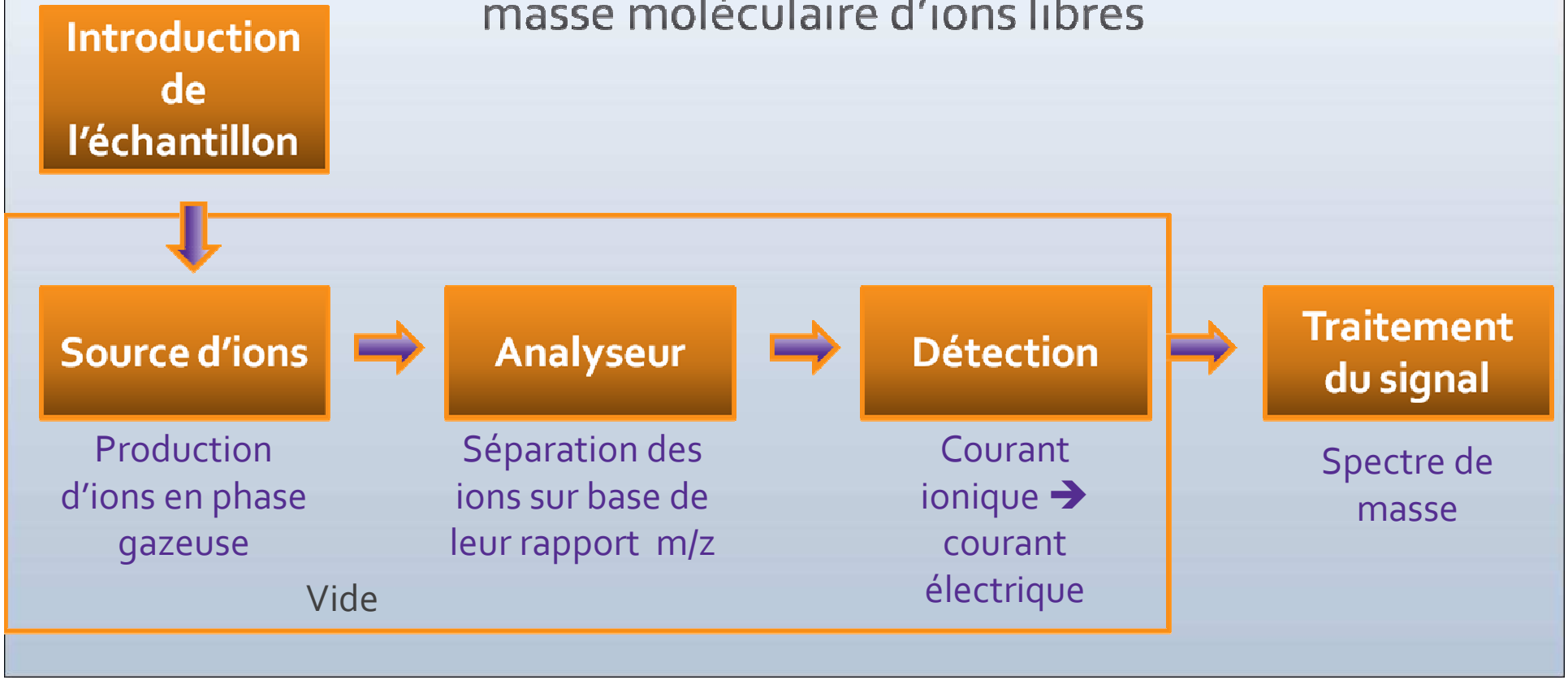
RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, VOL. 2, NO. 8, 1988 151

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

Spectrométrie de masse

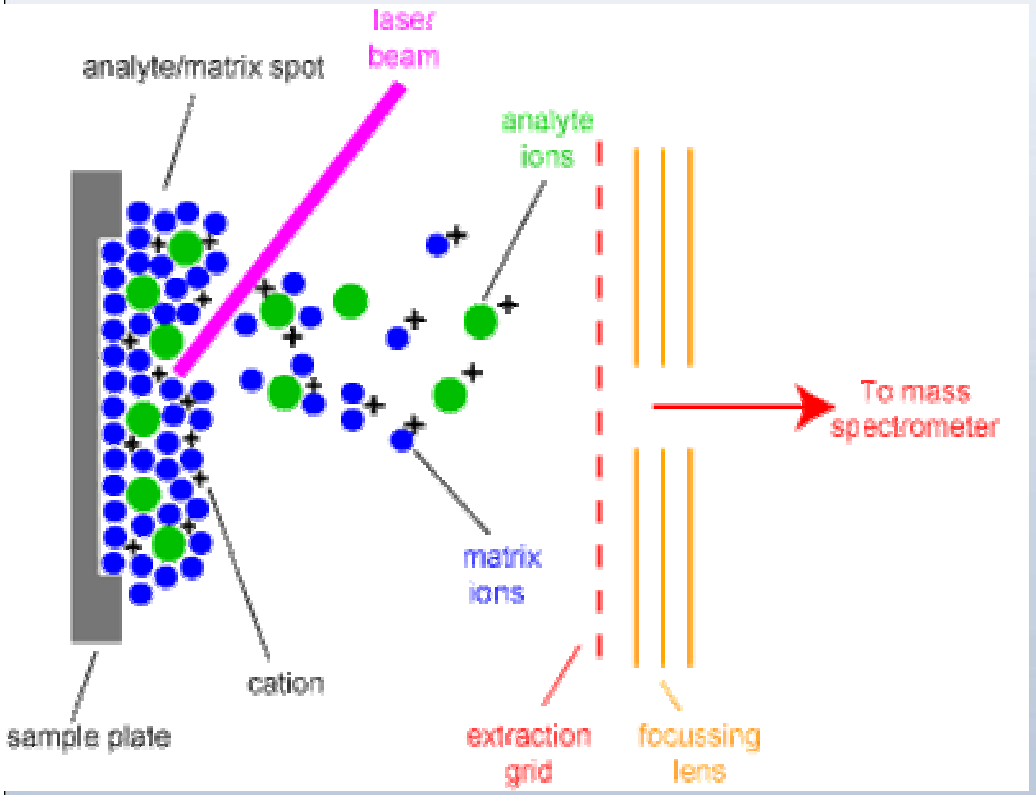
Principe:

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



Spectrométrie de masse MALDI-TOF (1)

MALDI: **M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization



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

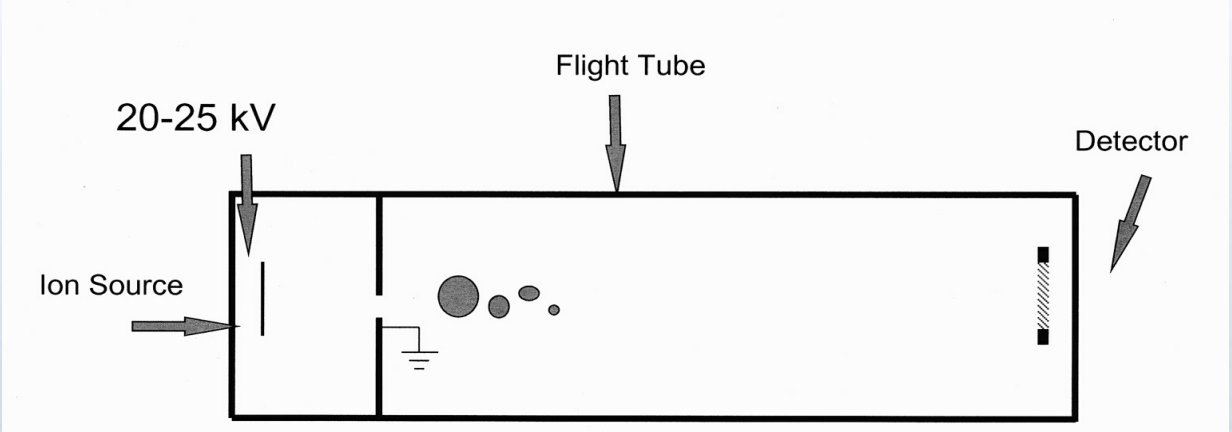
   $MH^+ + A \rightarrow M + AH^+$.

Spectrométrie de masse MALDI-TOF (2)

MALDI-**TOF** (Time **o**f **F**light)

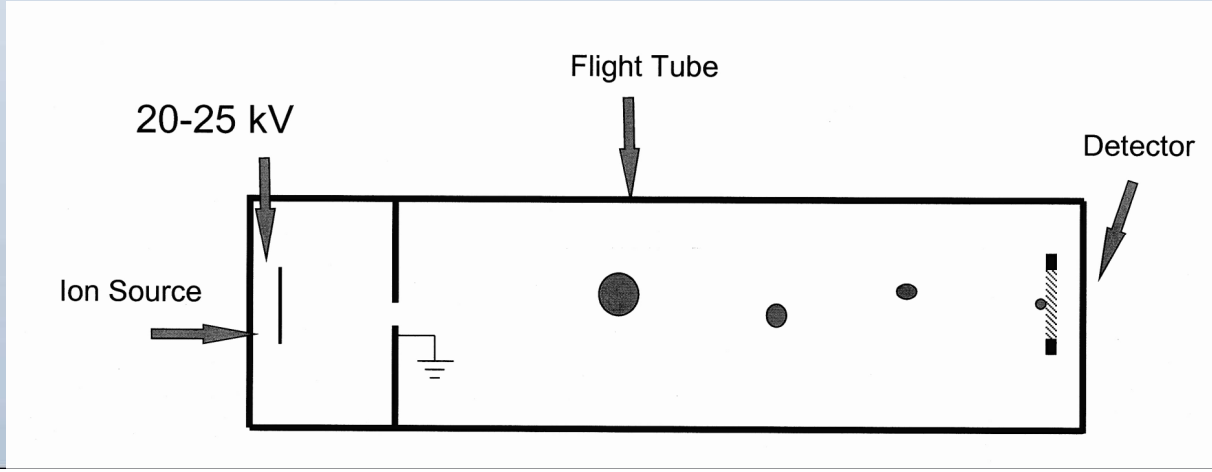
1. **Différence de potentiel**

Accélération des ions



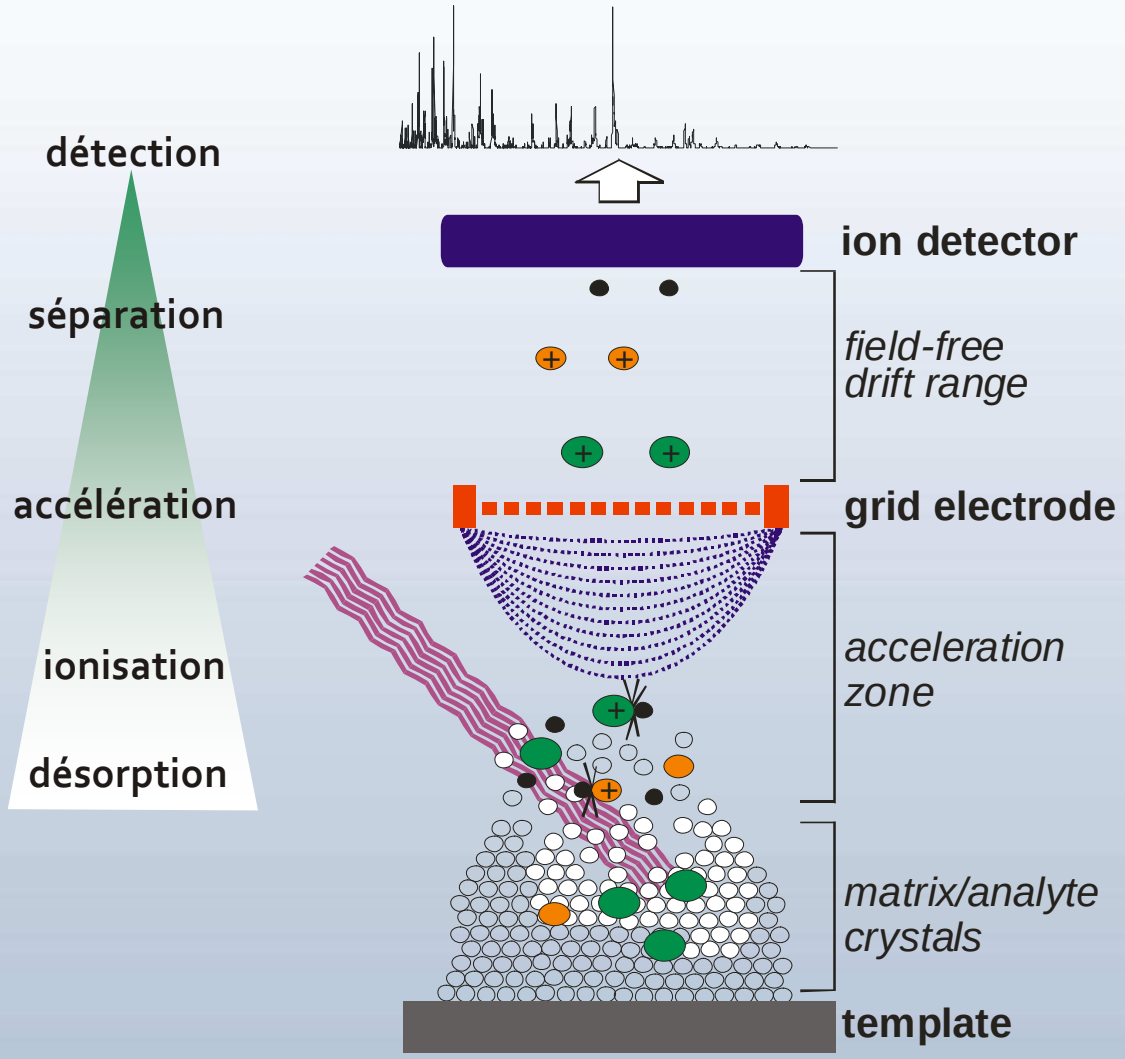
2. **Séparation dans le tube de vol**

- 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

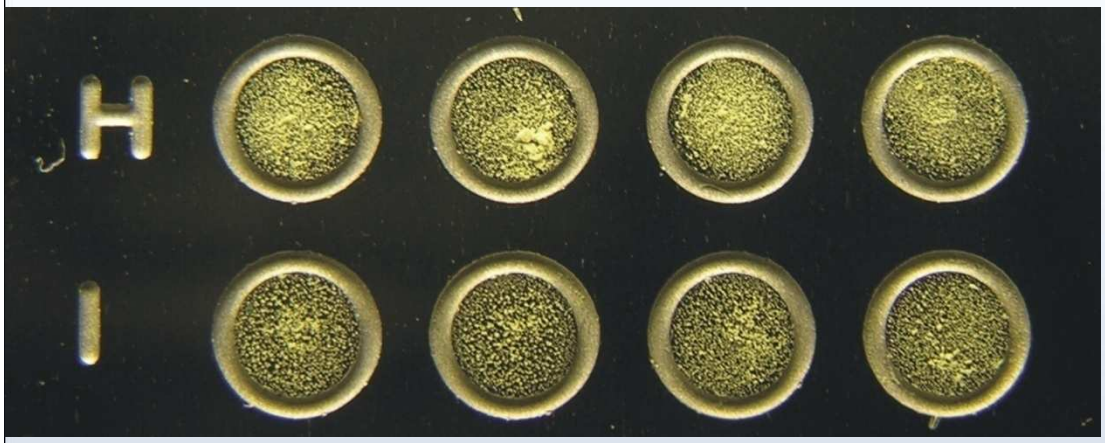
U: voltage

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 > 10kDa

DHB:

Cristallisation irrégulière

Nombreux tirs de laser pour un spectre de qualité

Spectres de100-200 signaux

Beaucoup de signaux dont m/z > 10kDa

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

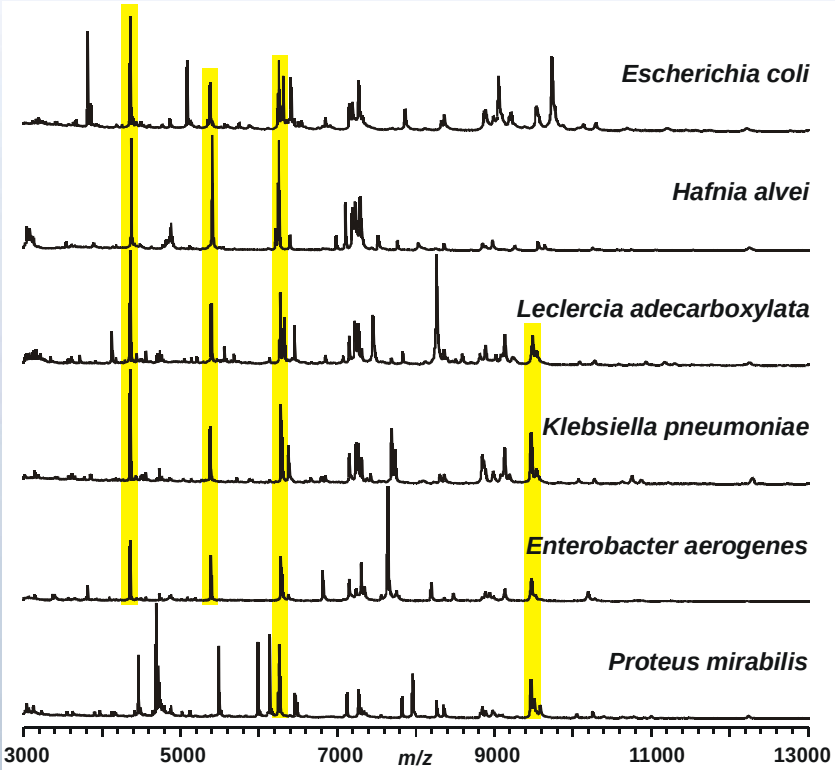
- **De quoi dépend l'intensité du signal?**

  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 (3679bactéries 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

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Clostridium perfringens B 1968_NCTC 3110_BOG	2.514	1502
2 (++)	Clostridium perfringens B 1038_NCTC 4964_BOG	2.454	1502
3 (++)	Clostridium perfringens B 1971_ATCC 3626_BOG	2.305	1502
4 (++)	Clostridium perfringens A 1037_NCTC 8237_BOG	2.254	37763
5 (++)	Clostridium perfringens D 2150_NCTC 8346_BOG	2.253	107819
6 (++)	Clostridium perfringens C 1041_NCTC 10720_BOG	2.11	79668
7 (-)	Comamonas testosteroni DSM 50244 HAM	1.308	285
8 (-)	Listeria grayi murrei DSM 20596 DSM	1.262	1641
9 (-)	Bacillus atrophaeus DSM 675 DSM	1.163	1452
10 (-)	Clostridium beijerinckii 1072_ATCC 25752_BOG	1.136	1520

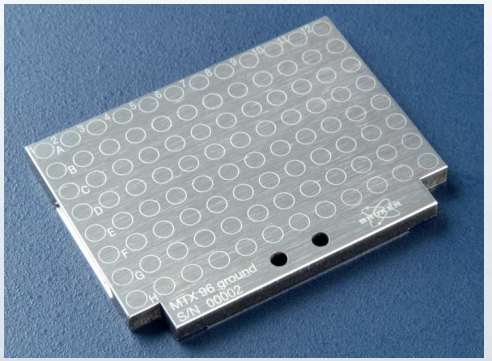
Possibilité d'enrichir la base de données

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

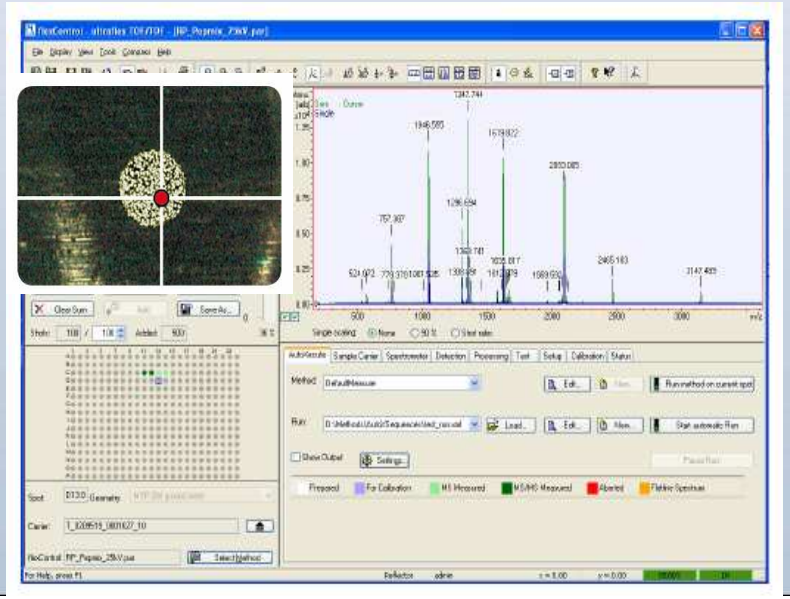
Au laboratoire (1)

Analyse de culture bactérienne sur gélose

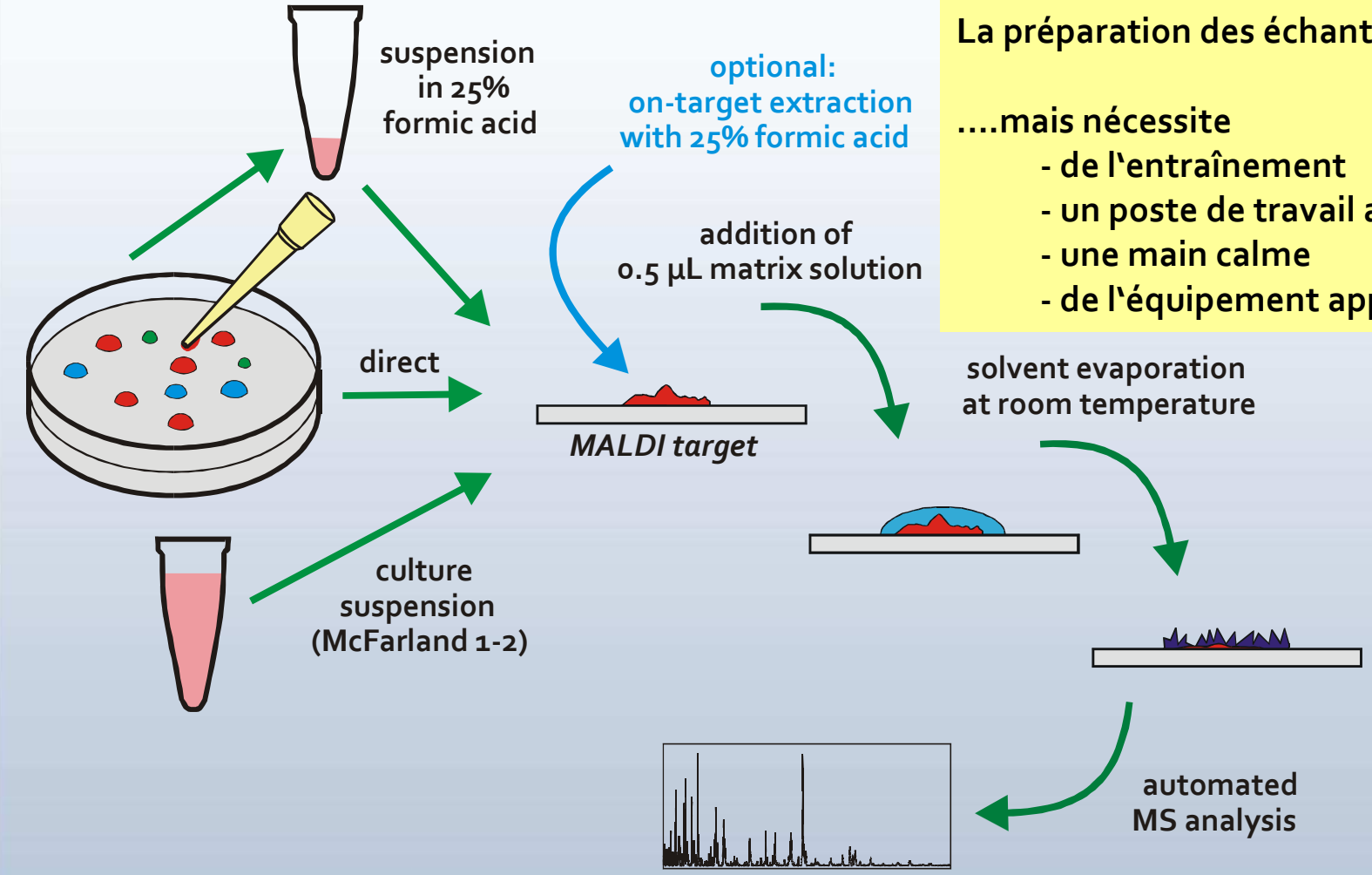
1. Dépôt direct sur la cible
2. Ajout de la matrice
3. Séchage
4. Introduction dans le spectromètre



Première identification en moins de 2 minutes!



Préparation des échantillons



La préparation des échantillons est facile…

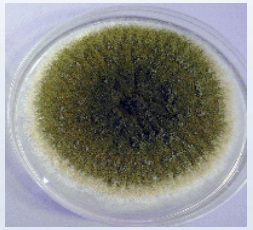
….mais nécessite

- **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

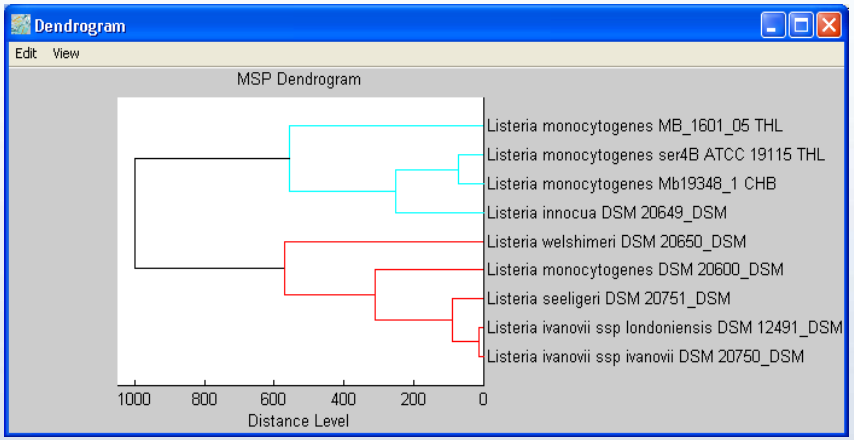
Hémocultures

- **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. Apll 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 ≥ 2.3: **Identification excellente**

MS Score ≥ 2.0 et < 2.3 et 3 premiers résultats identiques: **Bonne identification**

MS Score ≥ 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
Haemophilus / Moraxella	42	97,6
Neisseria sp.	4	100
Campylobacter *sp.*	5	100
Anaérobies	21	95,2
TOTAL	1013	96,7

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 ≥ 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)

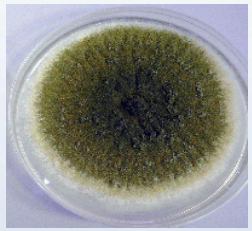
MALDI Sepsityper kit (Bruker)

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

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

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%

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

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