



# **MALDI-TOF MS en Microbiologie clinique**

## **Interprétations difficiles: quelques cas**

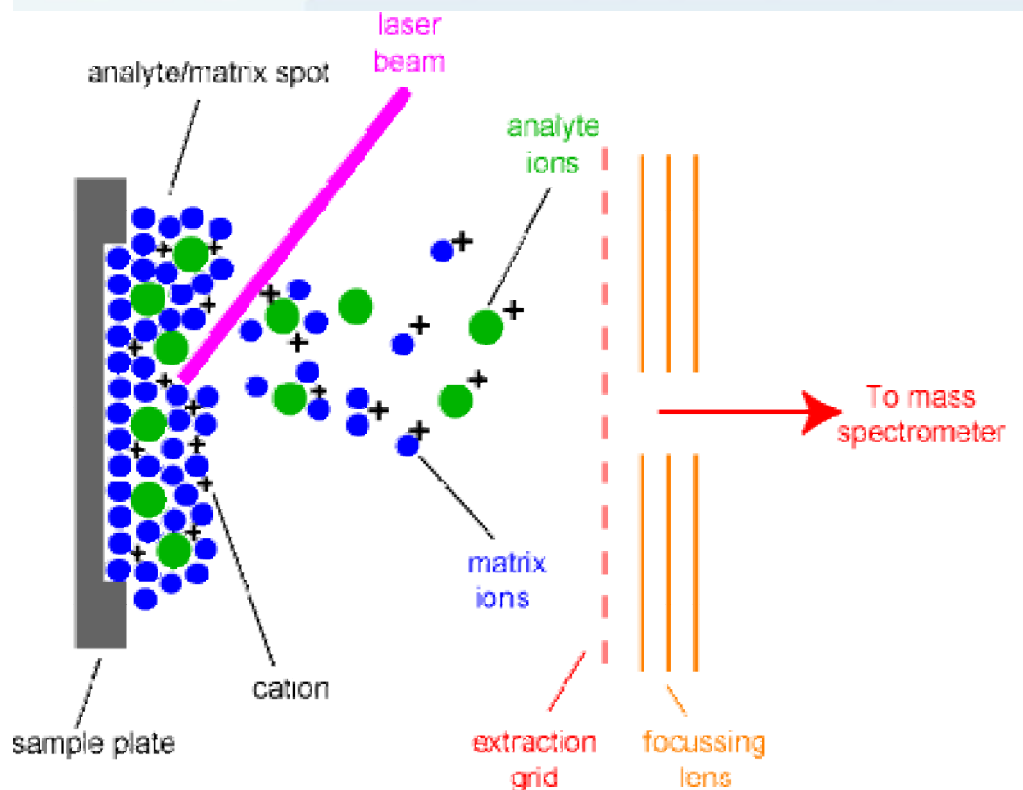
Cécile Meex  
Microbiologie clinique  
CHU Liège



# **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:



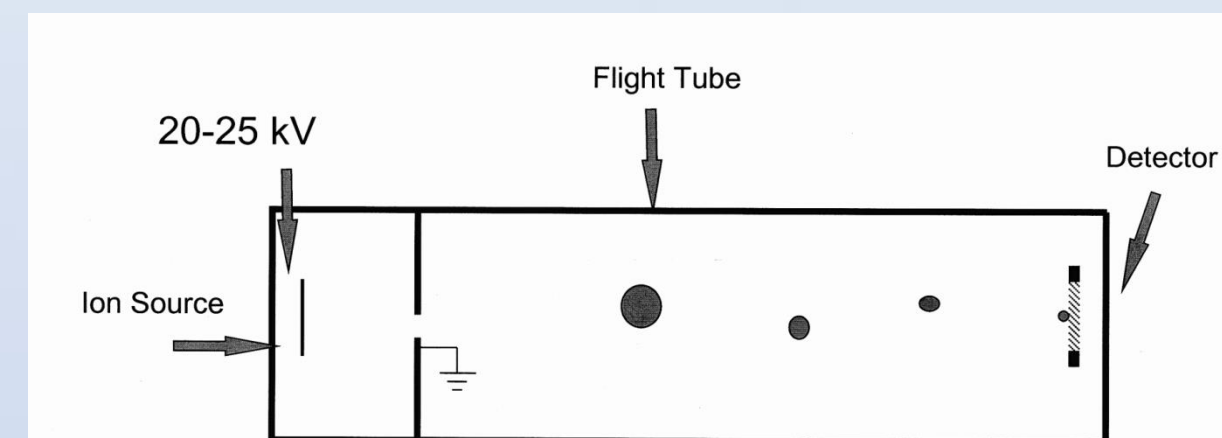
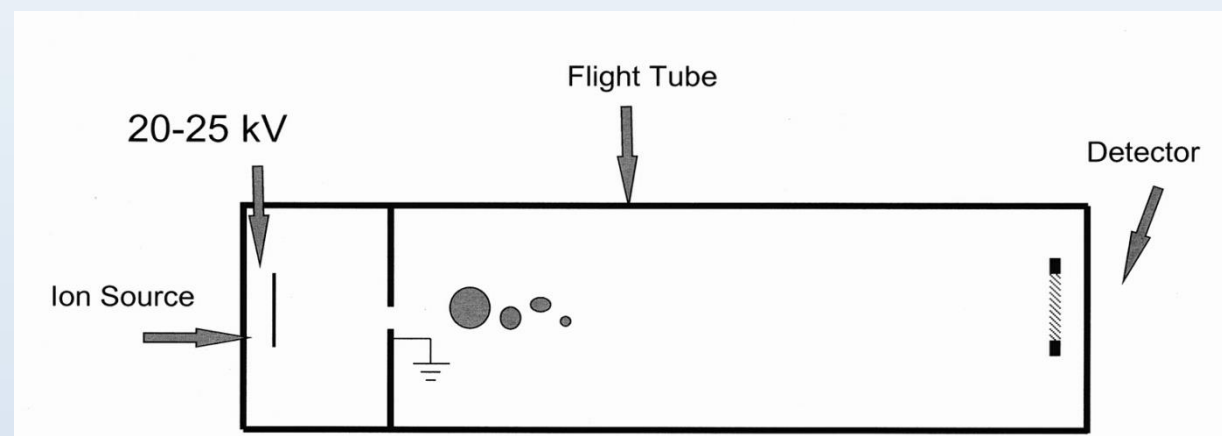
## MALDI-TOF (Time of Flight)

### 1. Différence de potentiel

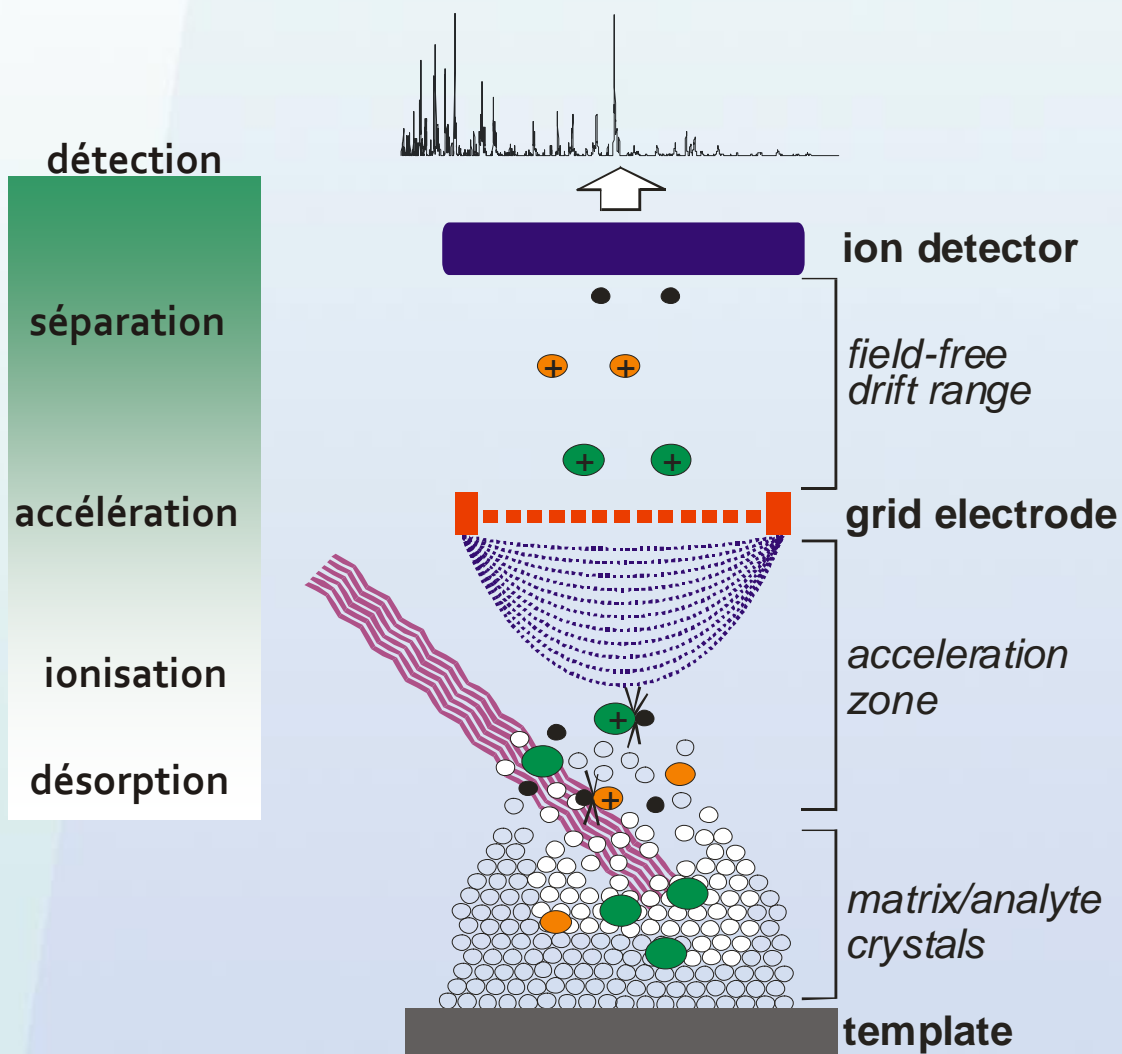
Accélération des ions

### 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**

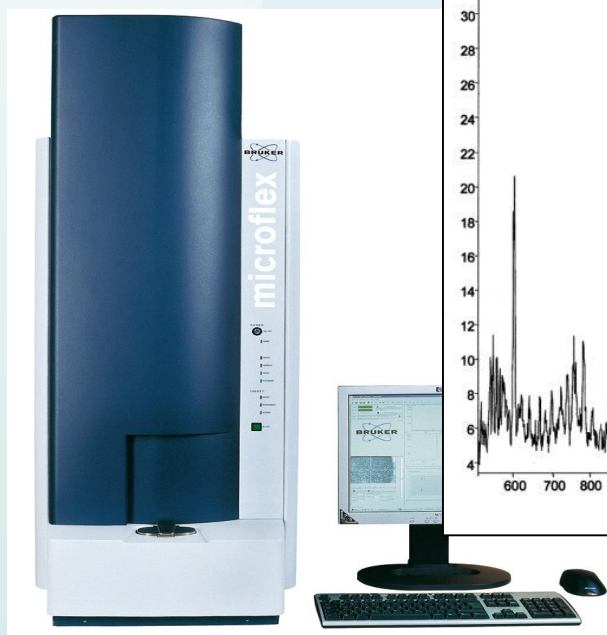
1. Identifications bactériennes et fongiques
2. Typage



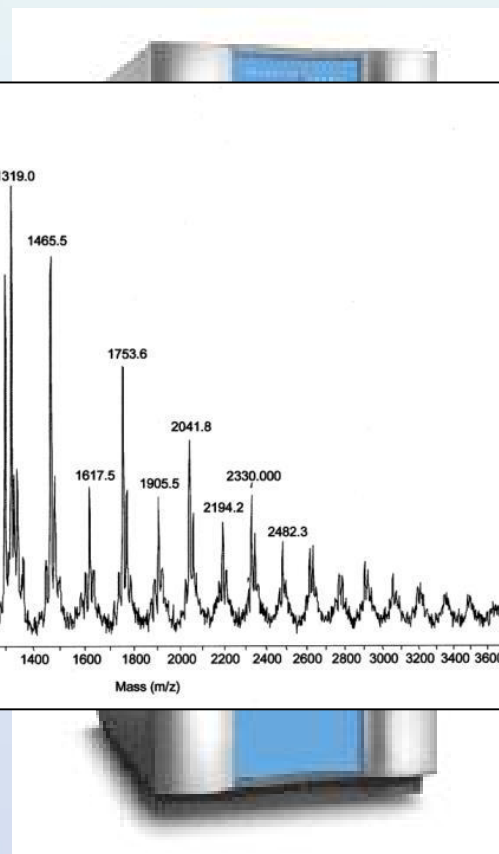
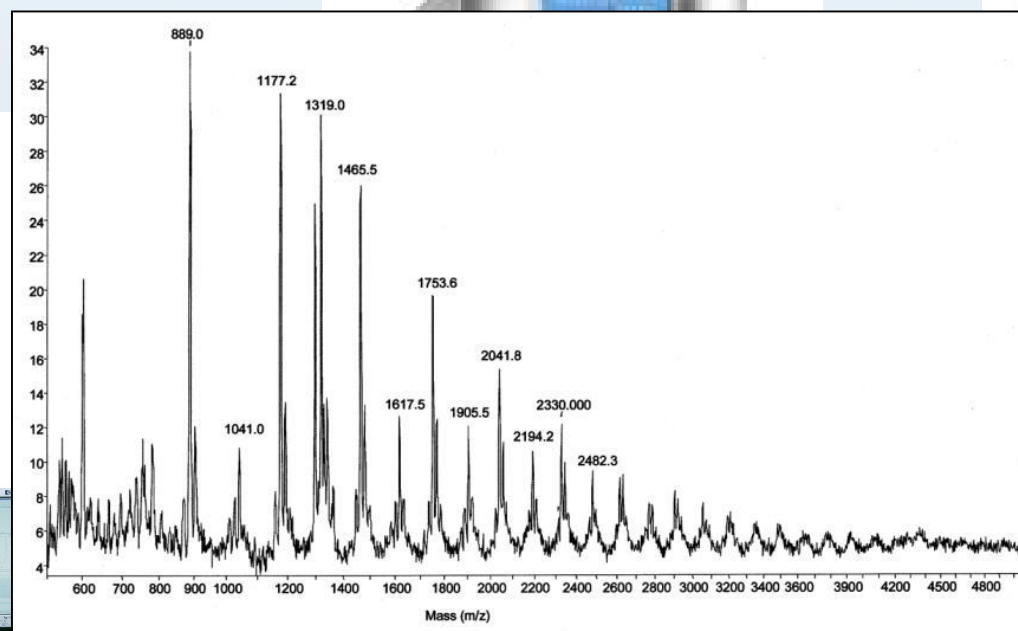
# **Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

## **APPLICATIONS EN MICROBIOLOGIE**

- 1. Identifications bactériennes et fongiques**
2. Typage



Microflex (Bruker Daltonics)



Axima (Shimadzu)



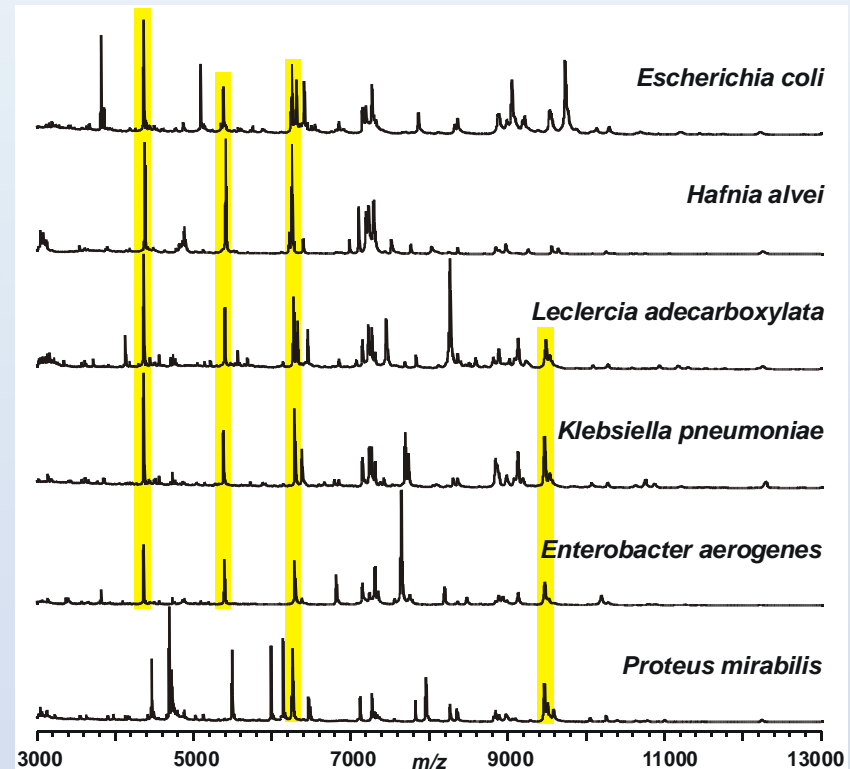
Axima (bioMérieux)



# 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	2.11	<a href="#">79668</a>
7 (-)	<i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50244 HAM	1.308	<a href="#">285</a>
8 (-)	<a href="#">Listeria grayi marvei DSM 20596 DSM</a>	1.262	<a href="#">1641</a>
9 (-)	<a href="#">Bacillus atrophaeus DSM 675 DSM</a>	1.163	<a href="#">1432</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<sup>®</sup> 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**

- Base de données classique : 4613 spectres d'organismes cellulaires (bactéries et levures)
- Base de données bio-terrorisme: 120 spectres de bactéries
- Base de données champignons filamenteux: 272 spectres
- (Base de données mycobactéries: 97 spectres)

# 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

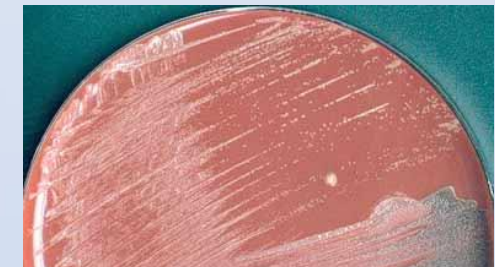
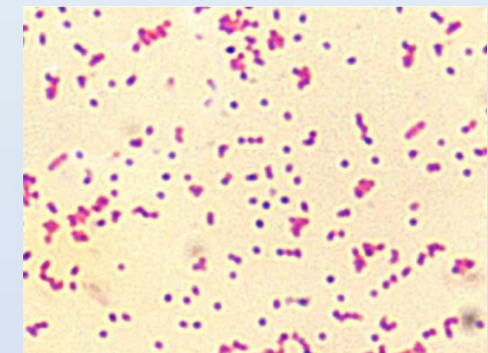
- “ 64 ans
- “ Se présente aux urgences avec:
  - . Douleurs lombaires irradiées dans l'abdomen
  - . Pyrexie
- “ Laboratoire:
  - . CRP 121 mg/l (0-6)
  - . Urine et hémocultures prélevées
- “ Imagerie
  - . Aspect de spondylodiscite D10-D11



## Cas clinique 2











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



## Cas clinique 2

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

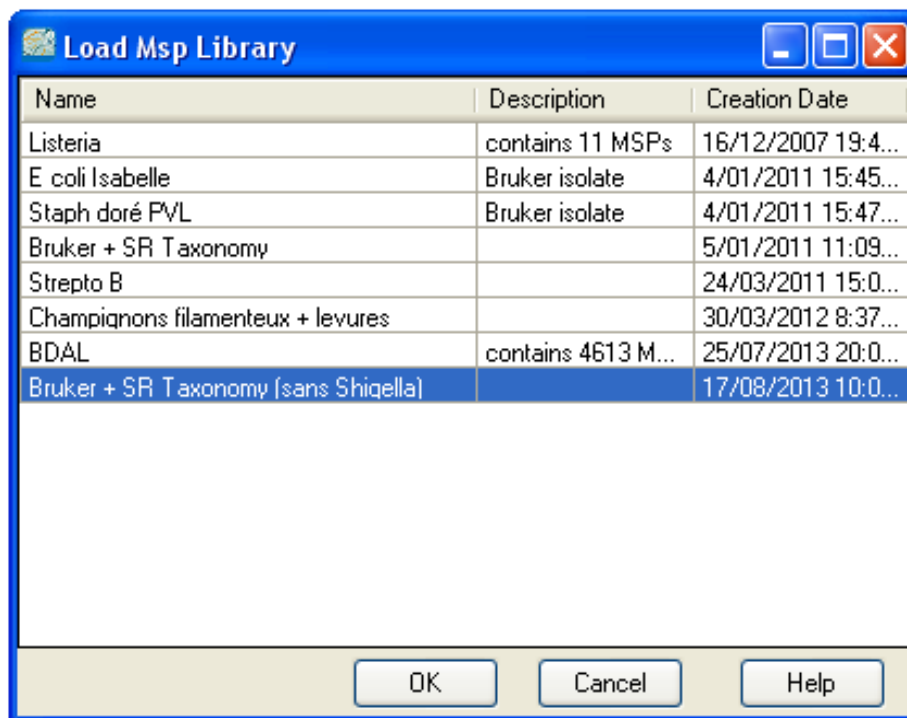
Detected Species	Log(Score)
 Brucella melitensis 6767	2,344
 Brucella melitensis 6273	2,240
 Brucella melitensis 5520	2,138
 Brucella melitensis 6073	2,038
 Brucella melitensis 6074	2,030
 Brucella melitensis 5659	1,936
 Shigella dysenteriae 5-42	1,074
 Shigella dysenteriae 6-35	0,842
 Bacillus anthracis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

Brucellose en Europe



## Cas clinique 2

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



Name	Description	Creation Date
Listeria	contains 11 MSPs	16/12/2007 19:4...
E coli Isabelle	Bruker isolate	4/01/2011 15:45...
Staph doré PVL	Bruker isolate	4/01/2011 15:47...
Bruker + SR Taxonomy		5/01/2011 11:09...
Strepto B		24/03/2011 15:0...
Champignons filamenteux + levures		30/03/2012 8:37...
BDAL	contains 4613 M...	25/07/2013 20:0...
Bruker + SR Taxonomy (sans Shigella)		17/08/2013 10:0...

**Retirer les *Shigella sp.* !!**

Prudence lorsque  
*E.coli* lactose négatif  
isolée d'une selle

” *Haemophilus sp.* humains:

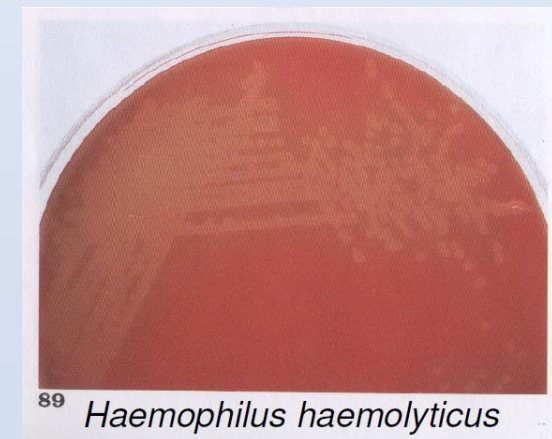
- . *H. influenzae* (capsulated types a-f)
- . *H. parainfluenzae*
- . *H. haemolyticus*
- . *H. parahaemolyticus*
- . *H. aphrophilus*
- . *H. paraphrophilus*
- . *H. parahaemolyticus*
- . *H. segnis*
- . *H. ducreyi*

**Absents de la  
DB Bruker**

## Cas clinique 3

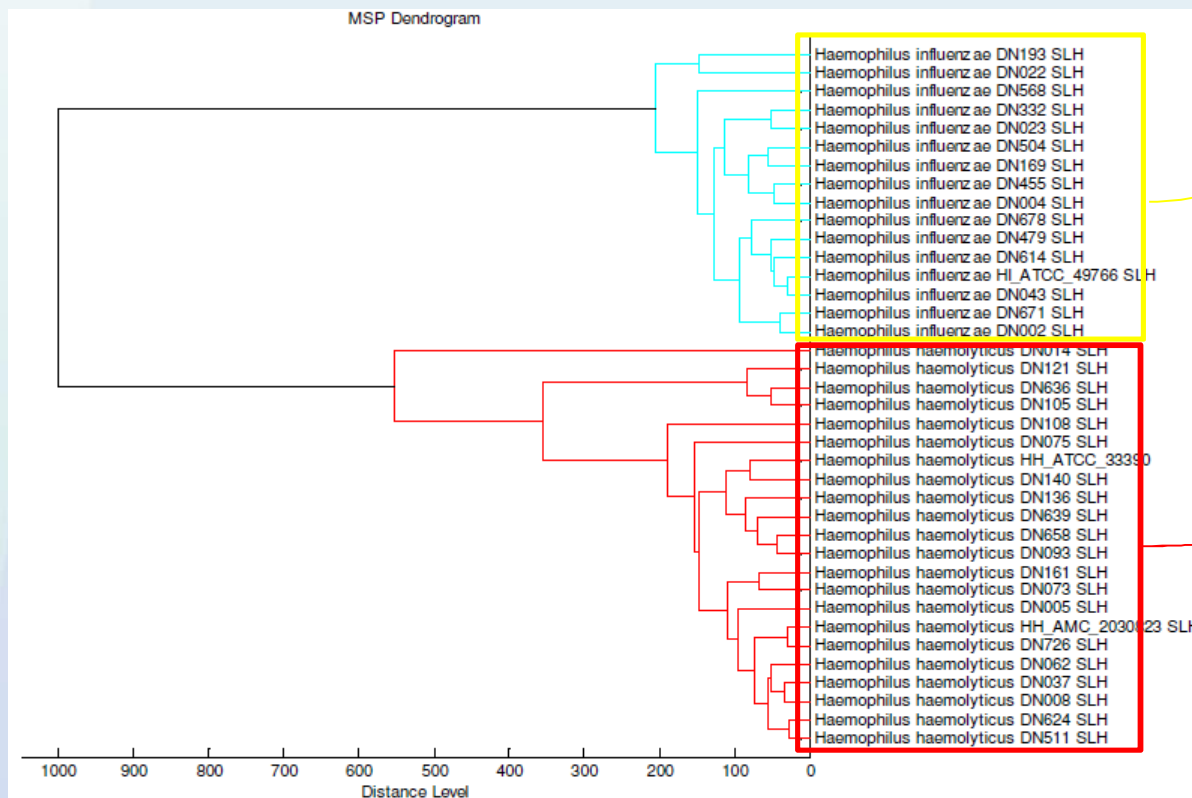
- ” *H. haemolyticus* identifié comme *H.influenzae* par MALDI-TOF MS
- ” *H. haemolyticus* ne possède pas le pouvoir pathogène de *H.influenzae* surdiagnostic
- ” Identification phénotypique difficile:

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>	-	+	+



# Cas clinique 3

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



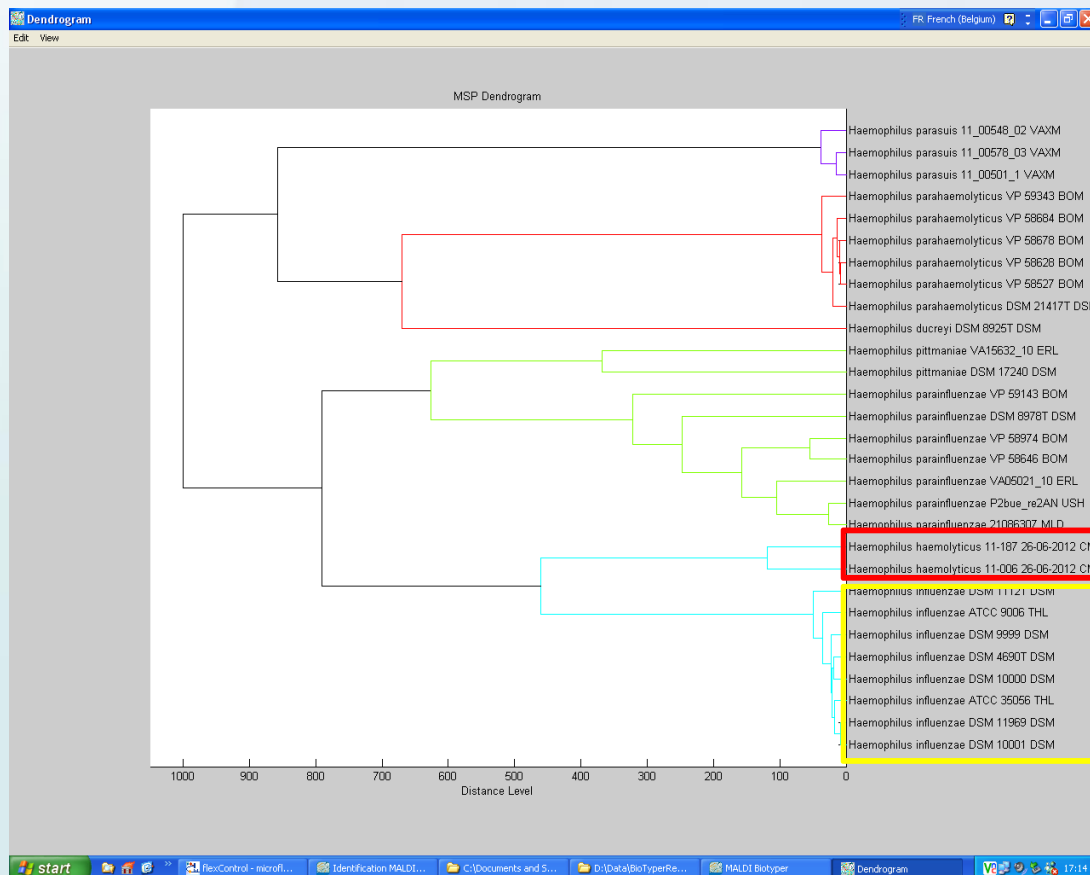
*H. influenzae*

*H. haemolyticus*

- ” CHULg: Création de 2 spectres de référence à partir de souches séquencées
- ” Intégration de ces spectres à la DB Bruker
- ” Analyse des échantillons de routine:

Detected Species	Log(Score)
● Haemophilus haemolyticus 11-006 26-06-2012 CM	1,888
● Haemophilus influenzae ATCC 9006 THL	1,871
● Haemophilus influenzae DSM 4690T DSM	1,866
● Haemophilus influenzae ATCC 35056 THL	1,860
● Haemophilus influenzae DSM 11121 DSM	1,855
● Haemophilus influenzae DSM 10001 DSM	1,835
● Haemophilus influenzae DSM 11969 DSM	1,825
● Haemophilus influenzae DSM 10000 DSM	1,638
● Haemophilus influenzae DSM 9999 DSM	1,631
● Haemophilus haemolyticus 11-187 26-06-2012 CM	1,630

” Contrôle de similarité des spectres à l'aide d'un dendrogramme:



*H. haemolyticus*

*H. influenzae*

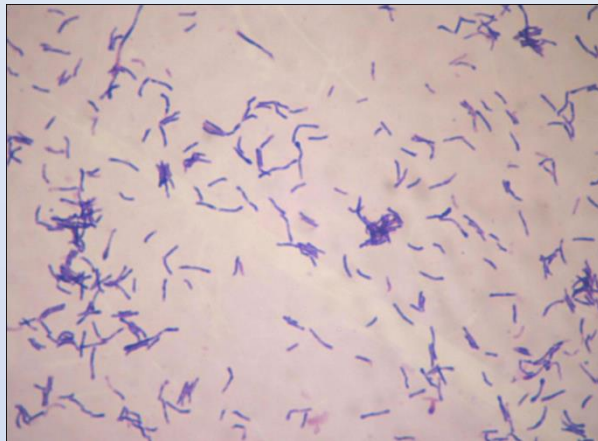


” Conclusion: spectres introduits trop similaires pour permettre une distinction par MALDI-TOF MS

Vérifier la bonne distinction des genres et espèces après introduction d'un nouveau spectre dans la DB

Attendre une mise au point de la Database par Bruker

- “ 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 inhabitans DSM 6835T 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 de améliorer le résultat.

Répéter les identifications sur plusieurs extraits.

Confirmer par séquençage si score bas.

## Levures

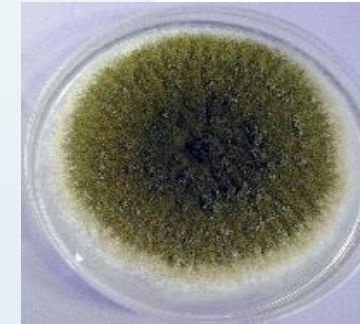
- Identification directe
    - mauvais résultats si on utilise l'algorithme choisi
  - Extraction liquide à l'acide formique
    - peu contributive et trop longue en routine
- **Extraction directe** à l'acide formique et double dépôt



### Algorithme adapté:

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

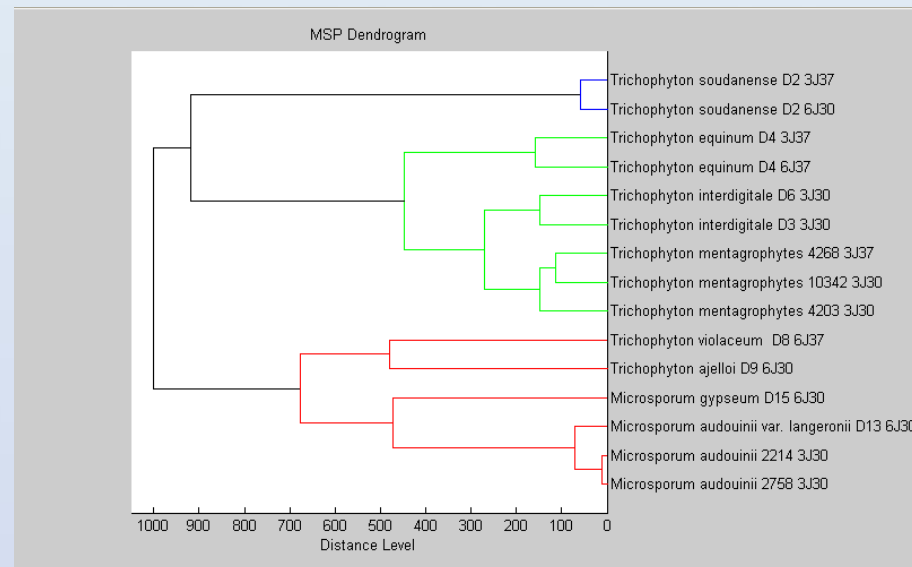
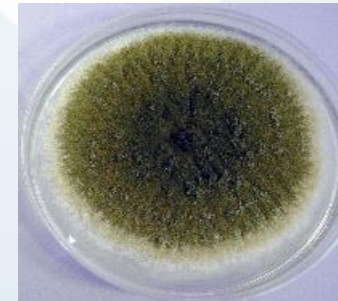
## Champignons filamenteux



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

## Champignons filamenteux

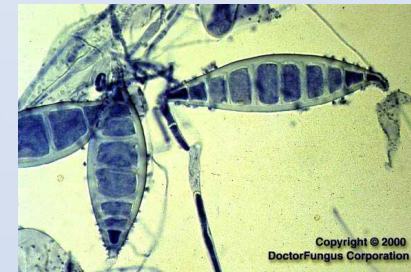
- Enrichissement de la base de données
  - Avec des souches de références
  - Avec des souches cliniques bien caractérisées





## Champignons filamenteux

- Triple dépôt direct de cultures jeunes (3-4 jours)
- Extraction à l'acide formique sur la cible
- Le contrôle microscopique demeure essentiel !!



## Identification directe à partir des flacons d'hémocultures positifs (1)

- 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



## Identification directe à partir des flacons d'hémocultures positifs (2)

### Critère décisionnel

- 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.

## Identification directe à partir des flacons d'hémocultures positifs (3)

### 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

## Identification des mycobactéries:

- ” Nouveau protocole avec billes de silices
- ” Applicable à partir de BACTECi MGITi 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. canariense	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	



# **Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

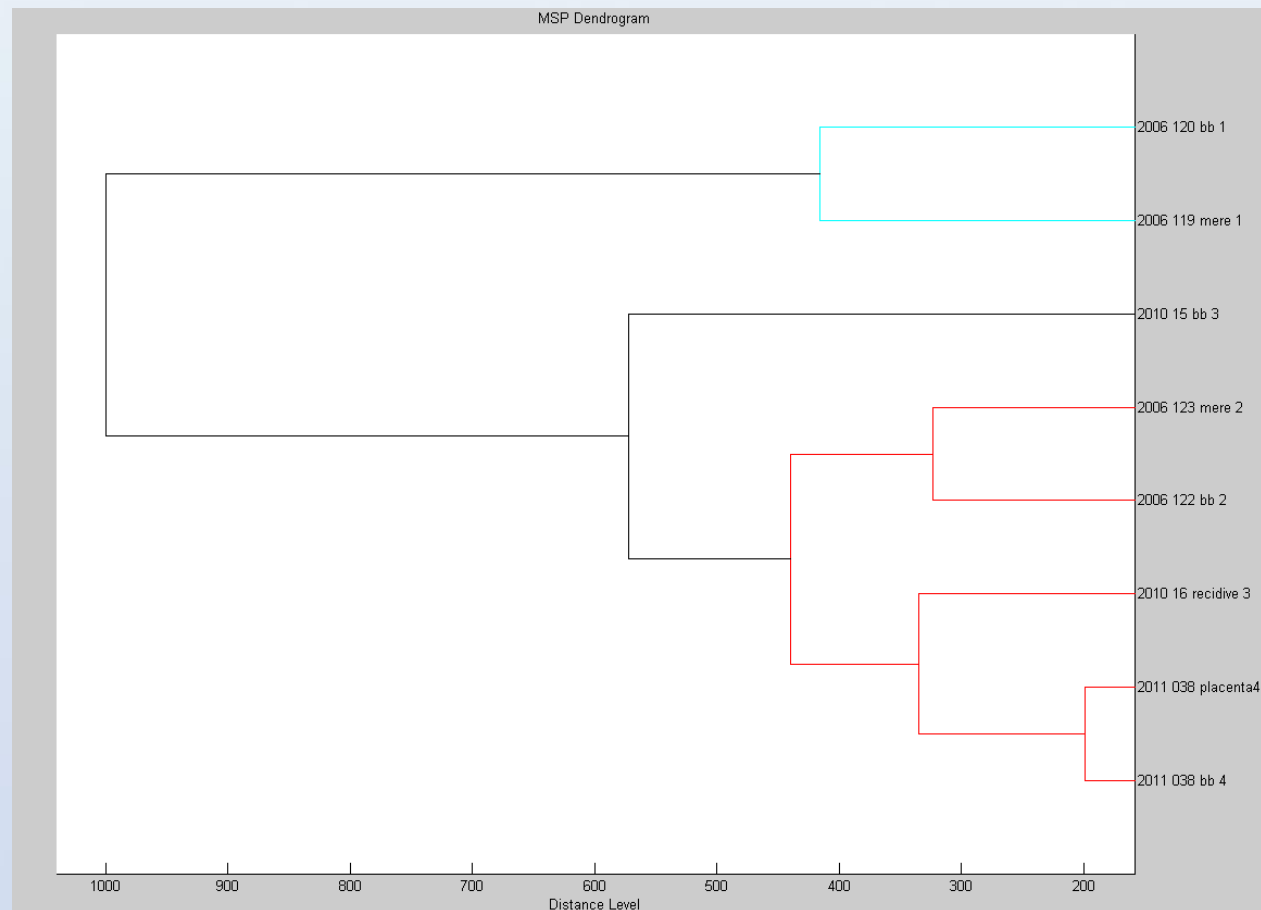
## **APPLICATIONS EN MICROBIOLOGIE**

1. Identifications bactériennes et fongiques
2. **Typage**

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

*Streptococcus  
agalactiae*  
(groupe B):

Comparaison des  
souches de la  
mère et du  
nouveau-né

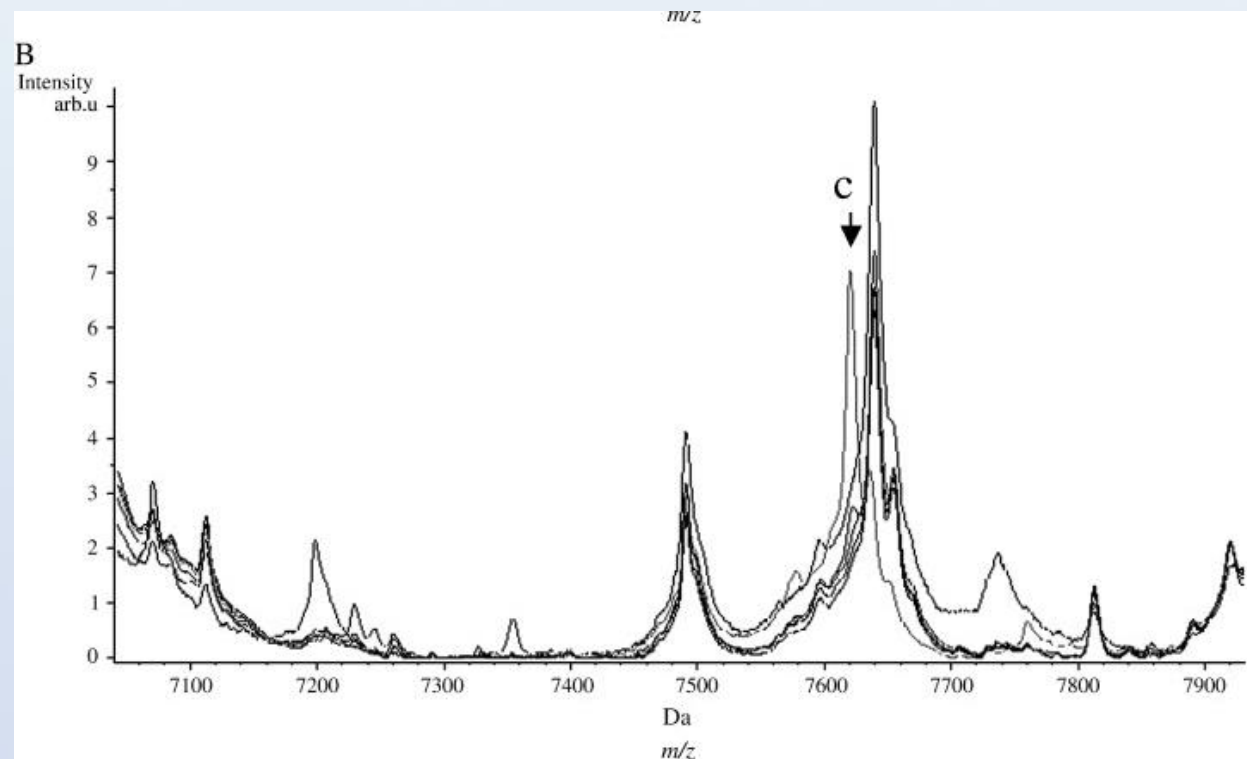


- **Identification de souches spécifiques**

*Streptococcus agalactiae* (groupe B):

Identification des souches ST-17:

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



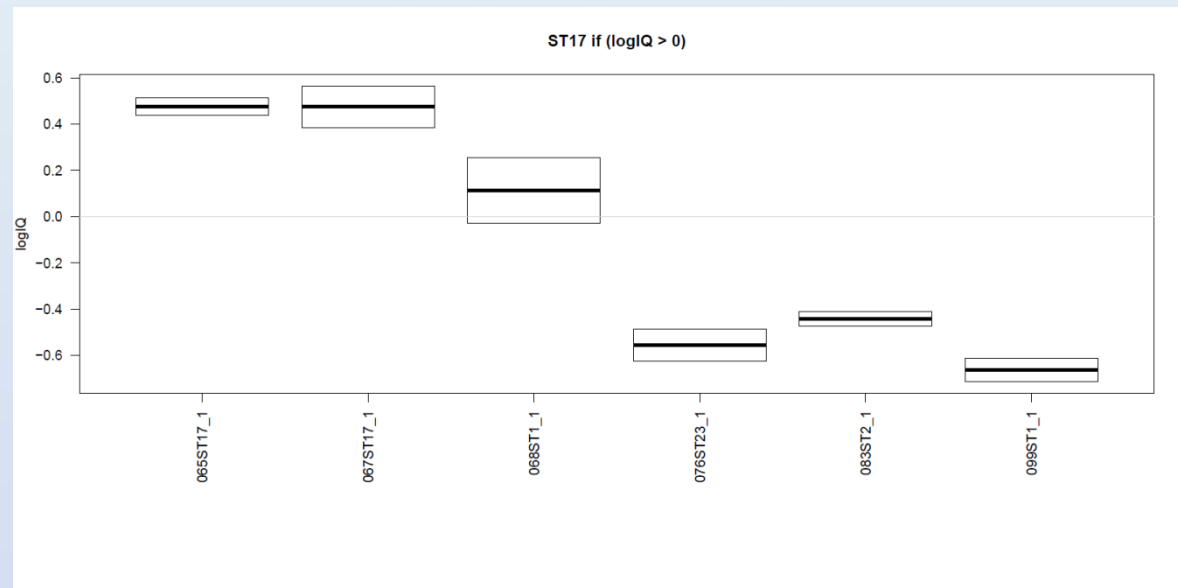


- ” **Identification de souches spécifiques**
  - . Mise au point d'un prototype de détection

*Streptococcus agalactiae* (groupe B):

Identification des souches ST-17:

Pic à m/z 7625 à la place de m/z 7650



# Détection de résistance aux antibiotiques

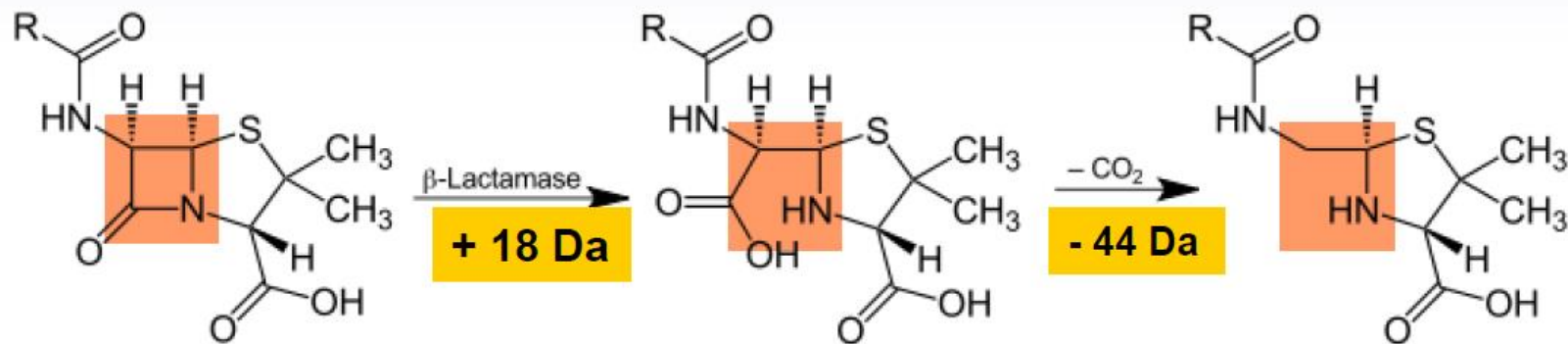
## Que cherche-t-on?

- “ Marqueurs de résistance
  - . MRSA (produit du gène Mec): Pas encore au point!
  
- “ Enzymes
  - . Béta-lactamases: Pas encore au point!

# Détection de résistance aux antibiotiques

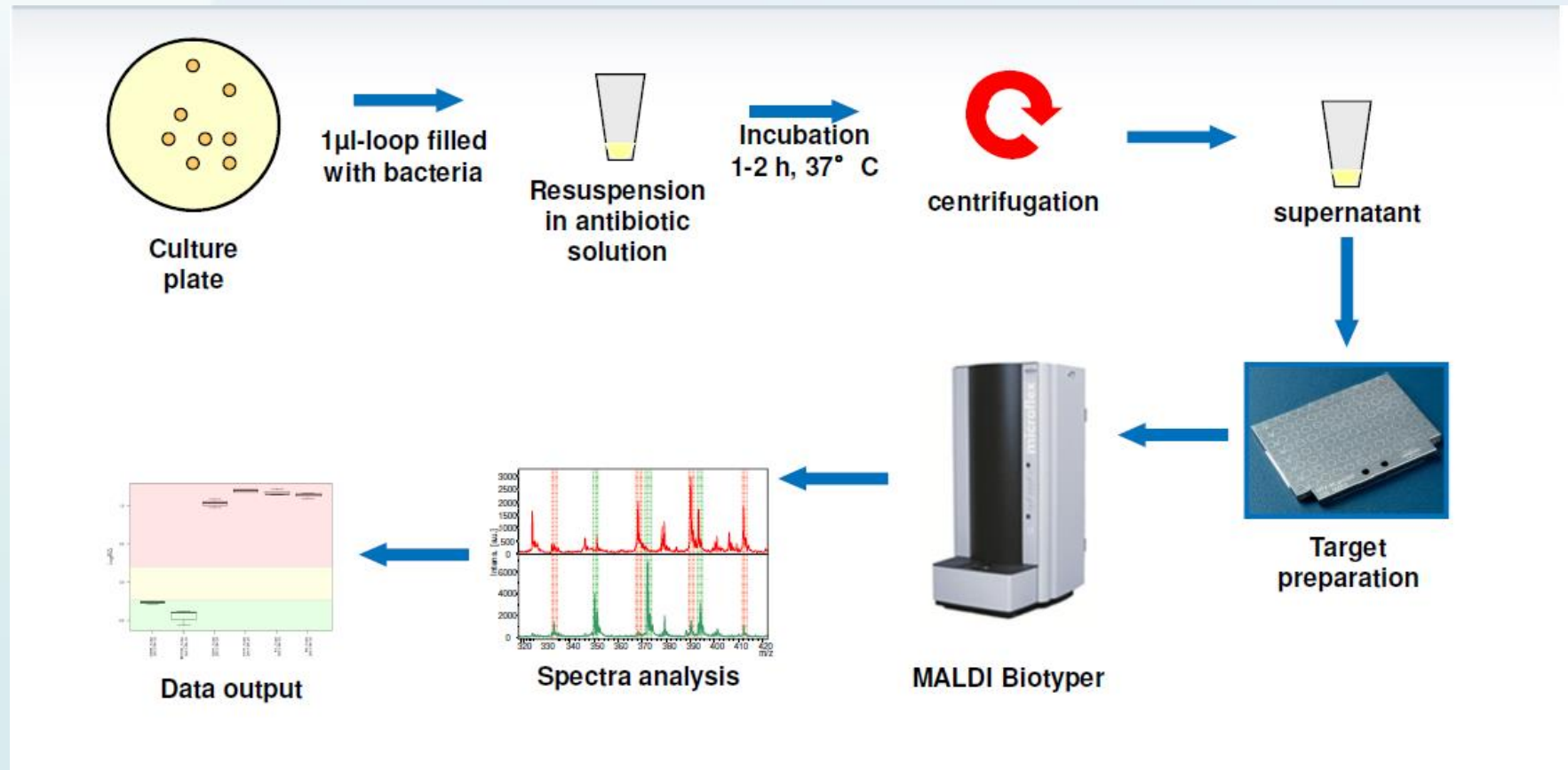
## Que cherche-t-on?

” Produits de dégradation des antibiotiques par les bêta-lactamases



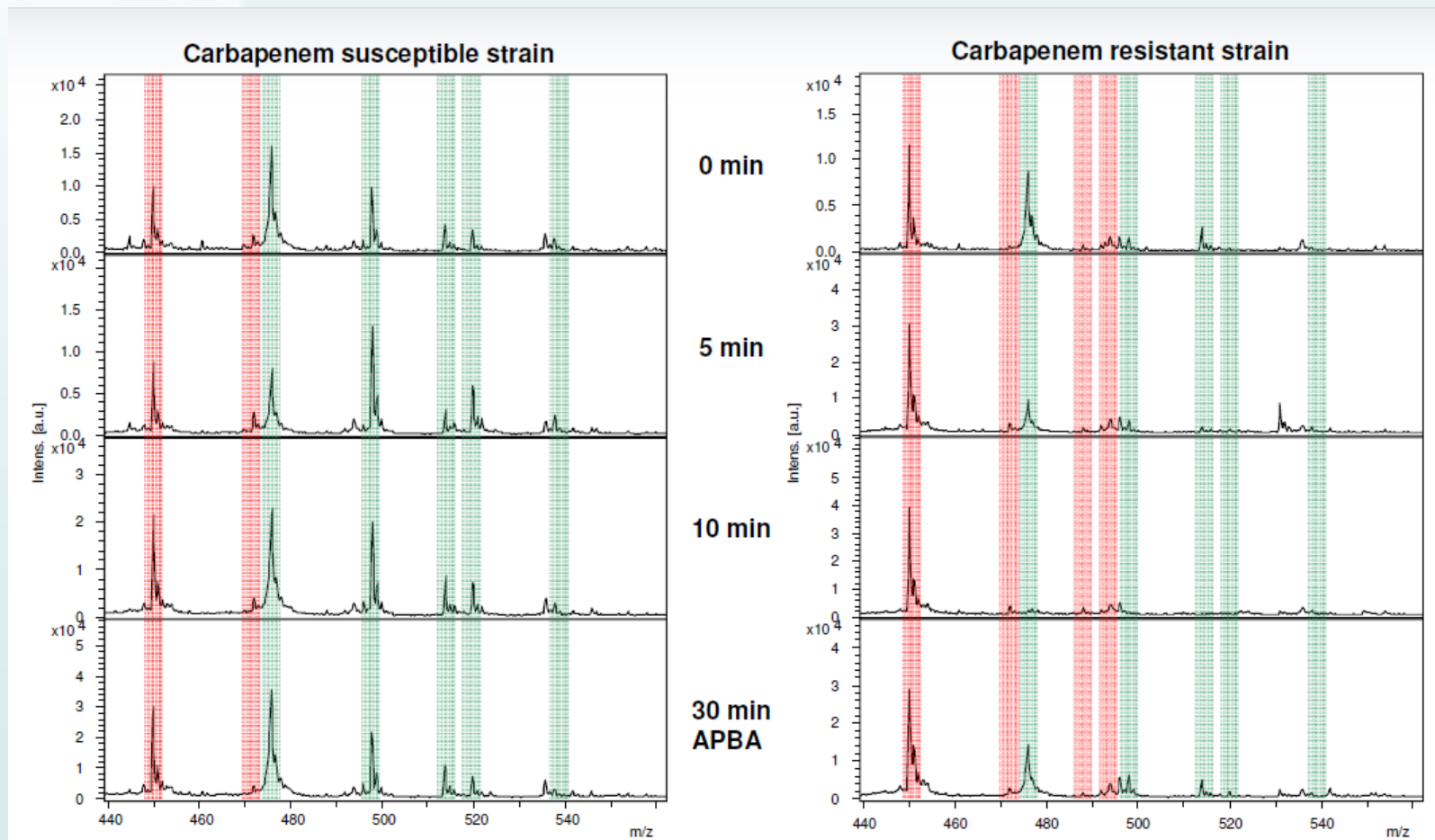
# Détection de résistance aux antibiotiques

## Comment?



# Détection de résistance aux antibiotiques

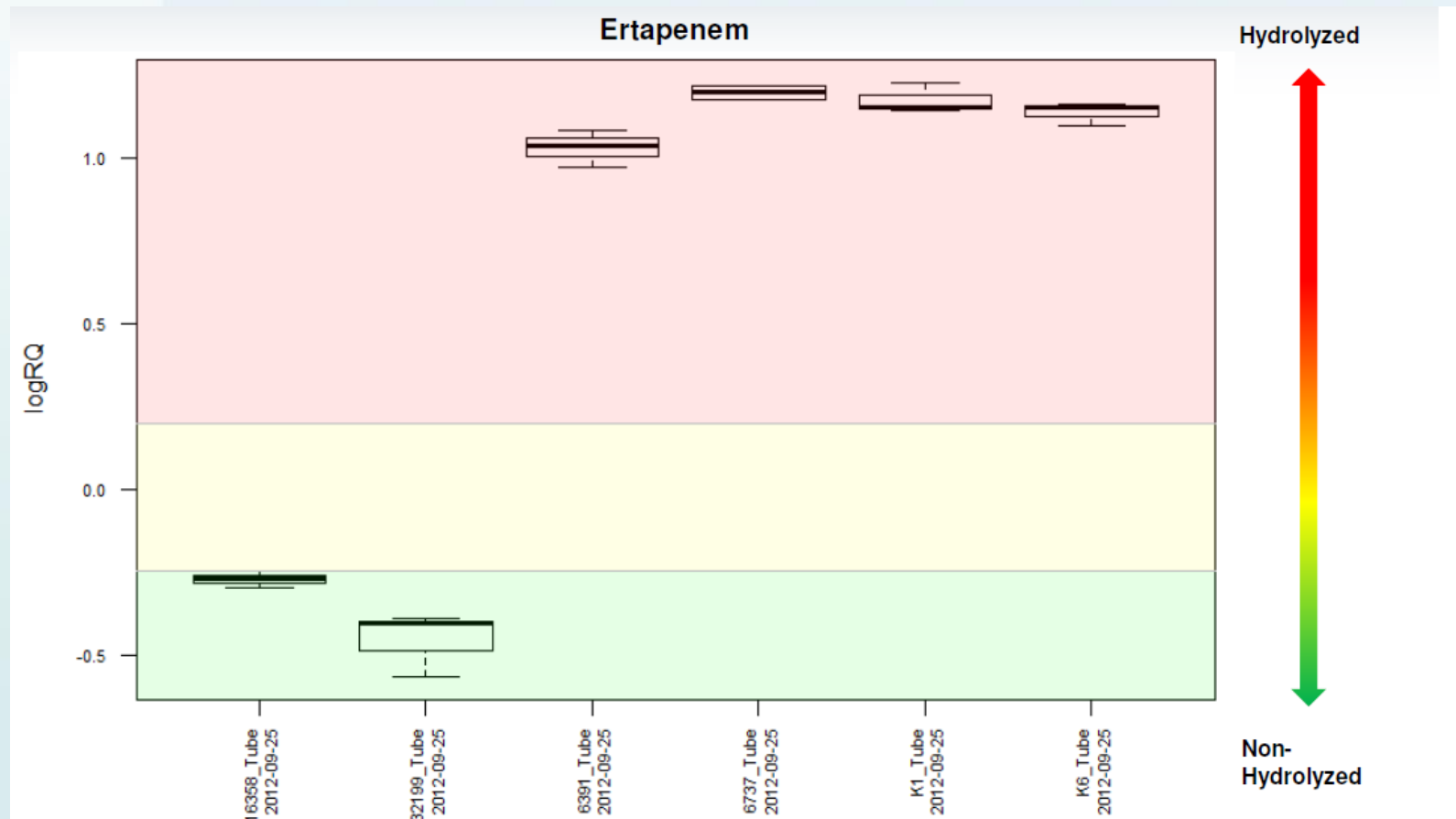
## Cinétique de l'hydrolyse de l'ertapénème par un *K.pneumoniae* KPC



(Détection des carbapénémases OXA-48: incubation de min. 4h)

# Détection de résistance aux antibiotiques

Logiciel développé pour l'analyse automatique des données





# **Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

## **CONCLUSIONS**

## MALDI-TOF MS : Avantages

- ” 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