



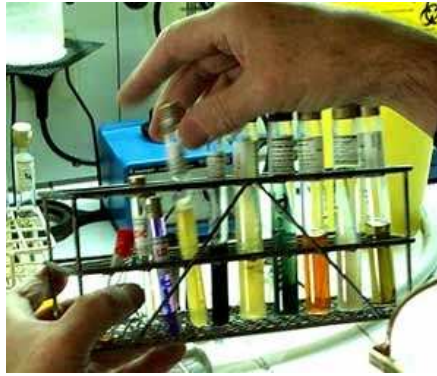
# Identification bactérienne par MALDI-TOF : Apport pour le patient

Sabrina Scellier, Etienne Carbonnelle  
HEGP

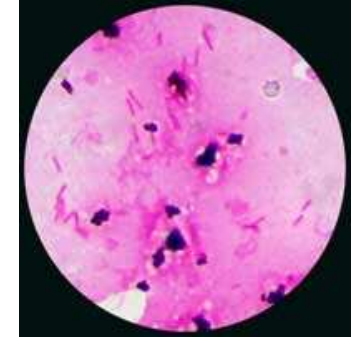
6 décembre 2013



<http://www.microbe-edu.org/>



Pr. A. Philippon



<http://www.microbe-edu.org/>

De la galerie happy....

....à la spectrométrie de masse



1970



2010

# Missions principales du laboratoire de microbiologie

## **Identification des agents pathogènes**

Etude métabolique (tests biochimiques enzymatiques)  
Biologie moléculaire  
Sérologie

## **Etude de la sensibilité aux anti-infectieux**

Antibiogramme (diffusion ou milieux liquides)  
Biologie moléculaire

## **Recherche d'un lien de clonalité, comparaison de souche**

Champs pulsé  
MLST  
Rep-PCR

# Missions principales du laboratoire de microbiologie

Exemples de systèmes commerciaux

## Identification des agents pathogènes

Galerie Api<sup>®</sup>, WalkAway<sup>®</sup>, Vitek<sup>®</sup>, Phoenix<sup>®</sup>, GeneXpert<sup>®</sup> (Cepheid) etc....

**MALDI-TOF-MS : opérationnel**

## Etude de la sensibilité aux anti-infectieux

WalkAway<sup>®</sup>, Vitek<sup>®</sup>, Phoenix<sup>®</sup>, GeneXpert<sup>®</sup> (Cepheid)

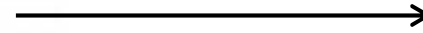
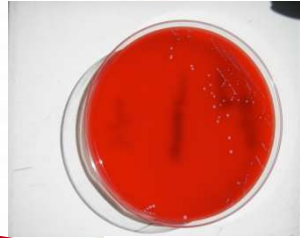
**MALDI-TOF-MS : en développement**

## Recherche d'un lien de clonalité, comparaison de souche

DiversiLab<sup>®</sup>

**MALDI-TOF-MS : en développement**

H24 :



2 minutes



Identification  
bactérienne

Tests  
phénotypiques

Résistance

Sérologie

Autres

PCR  
BM



Antibiogramme

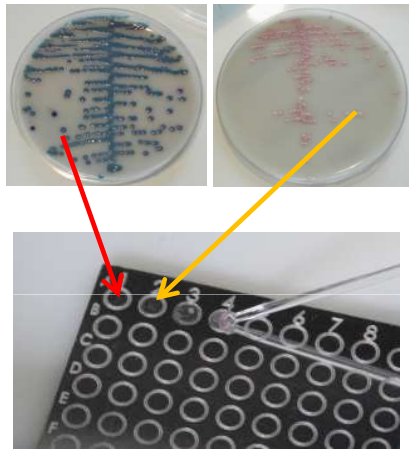


Identification bactérienne, antibiogramme

H48 ou +

# Exemple d'identification bactérienne à partir de colonies entières

Dépôt des échantillons

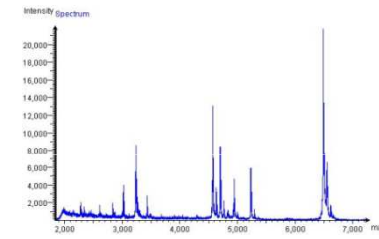


Acquisition des spectres



Analyse des spectres

Banque de données



Identification

- A1 : *Klebsiella pneumoniae*
- A2 : *Staphylococcus saprophyticus*
- A3 : etc.....

Transfert des données au système informatique du laboratoire



# Systemes disponibles

*Spectromètres de masse*

Shimadzu



Andromas<sup>®</sup>



Bruker



AXIMA@SARAMIS

(Anagnostec / BioMérieux )

Andromas<sup>®</sup>

Biotyper<sup>®</sup>

*Banque de données*

Identification bactérienne

# Plan

Spectrométrie de masse

Applications à la microbiologie clinique

Perspectives



**Question 1 :** Que signifie MALDI-TOF-MS ?

1 : C' est le slogan d' une agence de voyage pour partir aux Maldives ?



2 : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation  
Time Of Flight Mass Spectrometry

3 : Je ne sais pas et j'espère que le COFRAC  
ne me posera pas la question

**Question 1 :** Que signifie MALDI-TOF-MS ?

1 : C' est le slogan d' une agence de voyage pour partir aux Maldives ?



**2 : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation  
Time Of Flight Mass Spectrometry**

3 : Je ne sais pas et j'espère que le COFRAC ne me posera pas la question

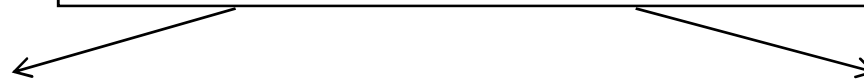
# Principe

**Transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et obtenir leur masse moléculaire en analysant le rapport masse/charge (M/z)**

Nombreuses méthodes d'ionisation des échantillons



Choix de la technique d'ionisation



## ***Nature de l'échantillon***

Gaz / Solide / Liquide  
Composé volatil  
Composé thermolabile

## ***Type d'analyse***

Elémentaire  
Structurale

# Principaux types d'ionisation

Impact électronique ou électro-ionisation (EI)

Ionisation chimique (CI)

Photo-ionisation

Electro Spray Ionization

**Ionisation-désorption**

Emission ionique secondaire (SIMS : Secondary Ion MS)

Bombardement par des atomes rapides (FAB : Fast Atom Bombardment)

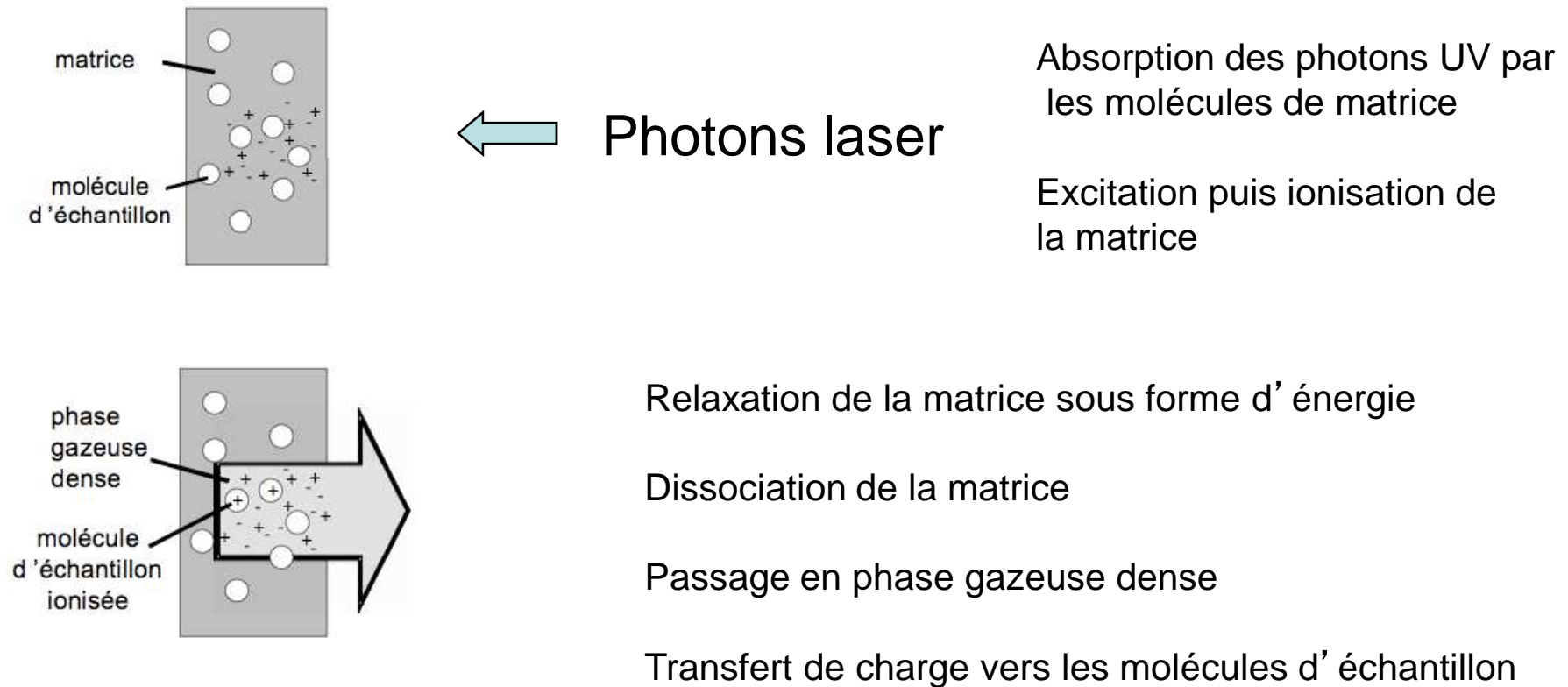
Désorption plasma (PDMS : Plasma desorption MS)

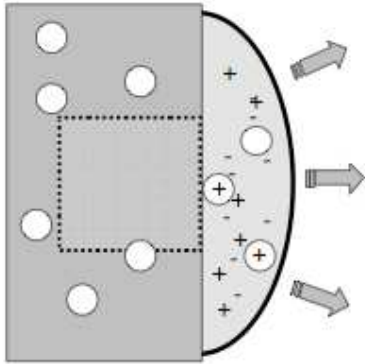
Désorption laser : (LDMS : Laser Desorption MS)  
(**MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization**)

# MALDI : Principe

## Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation

Utilisation d'un faisceau laser pulsé dans l'UV pour désorber et ioniser un mélange matrice/échantillon co-cristallisé sur une plaque métallique



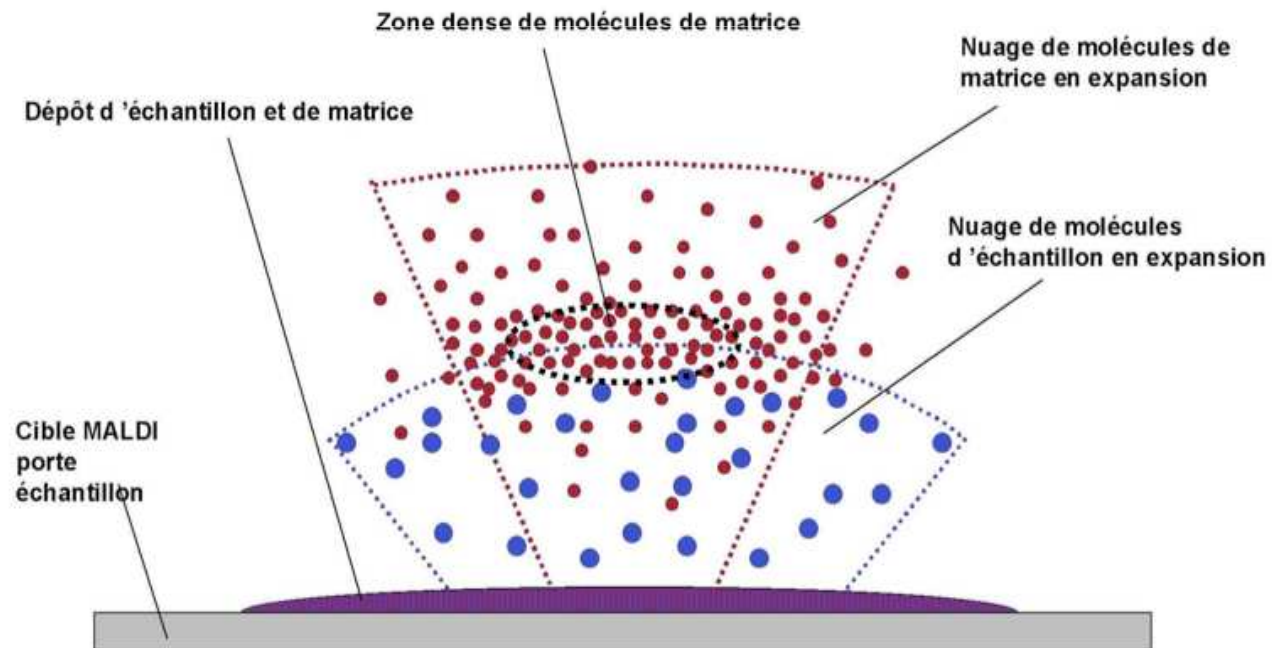


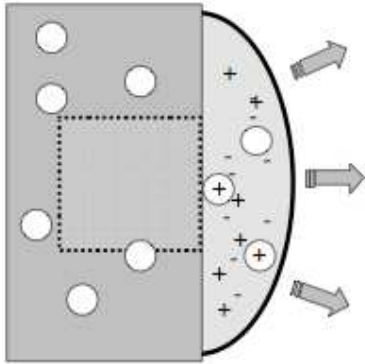
Expansion de la matrice à une vitesse super sonique

Entraînement de l'échantillon dans le nuage de matrice

Transfert de charge vers les molécules d'échantillon

Echantillon ionisé majoritairement par transfert de protons





Expansion de la matrice à une vitesse super sonique

Entraînement de l'échantillon dans le nuage de matrice

Transfert de charge vers les molécules d'échantillon

Echantillon ionisé majoritairement par transfert de protons

MALDI : essentiellement des ions monochargés

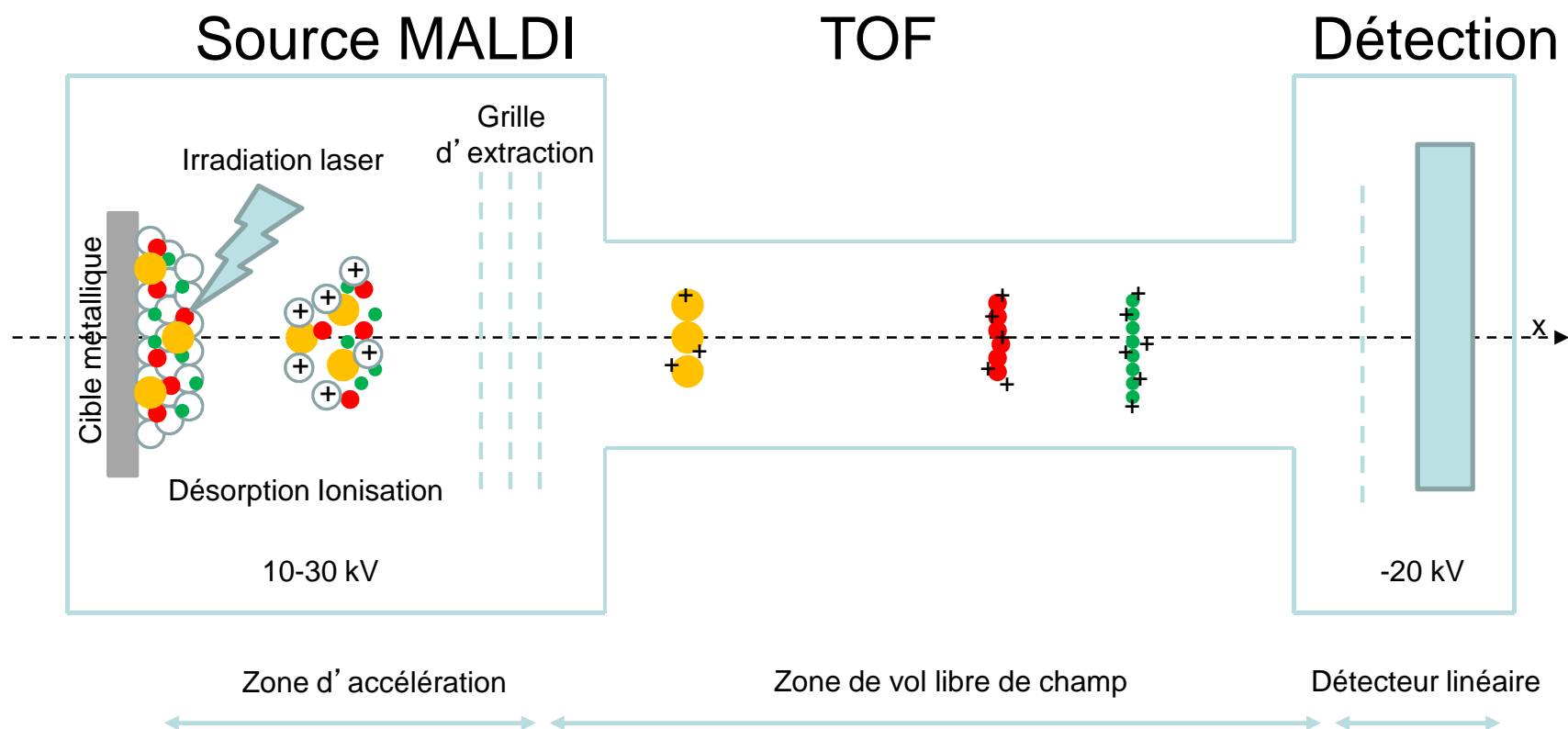
➡ Mécanisme exact du processus MALDI ?

# MALDI-TOF

Les ions formés en phase gazeuse sont accélérés par application d'un champ électrostatique

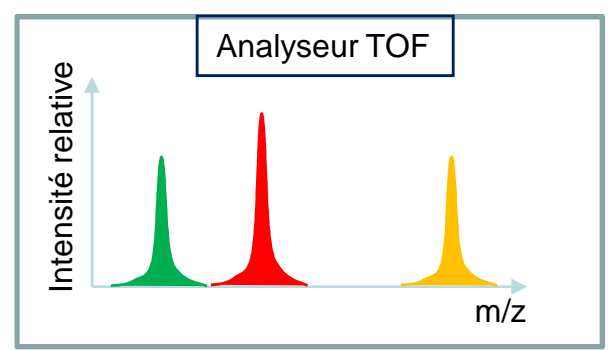
MALDI + analyseur de temps de vol = **MALDI-TOF**  
(TOF : Time Of Flight)



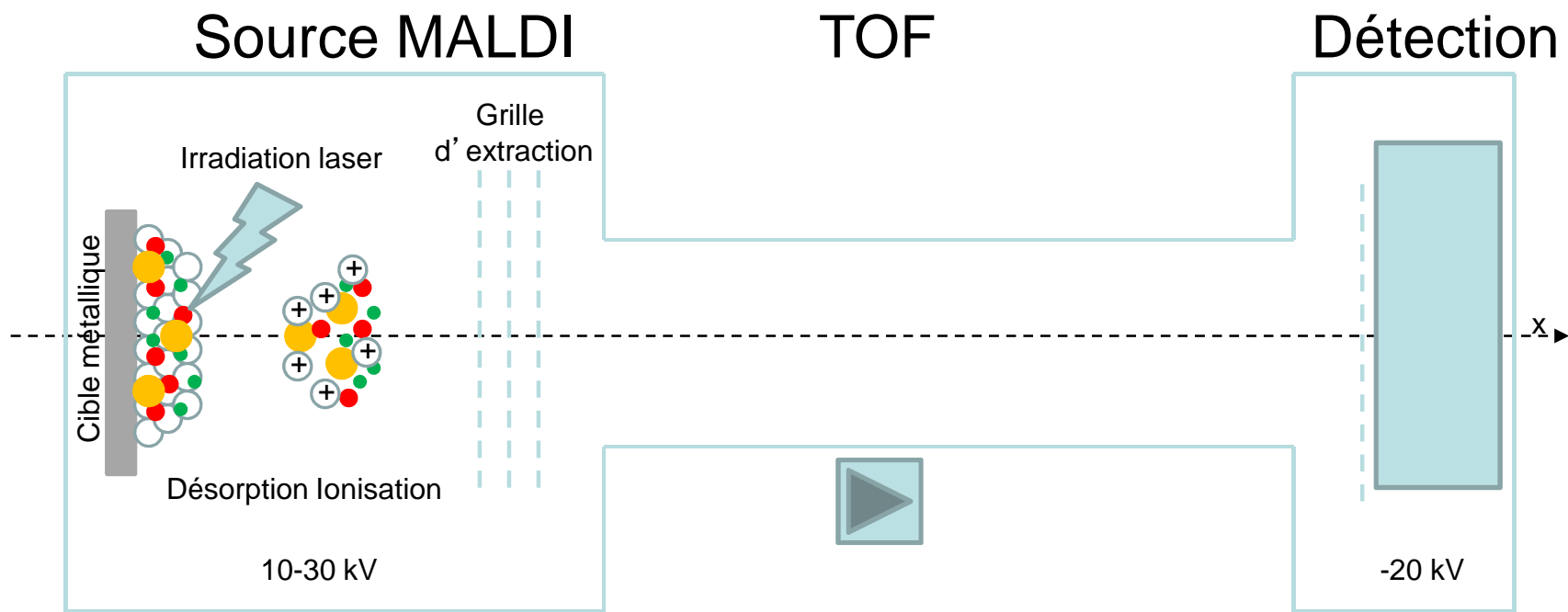


- matrice
- } analytes
- } analytes
- } analytes

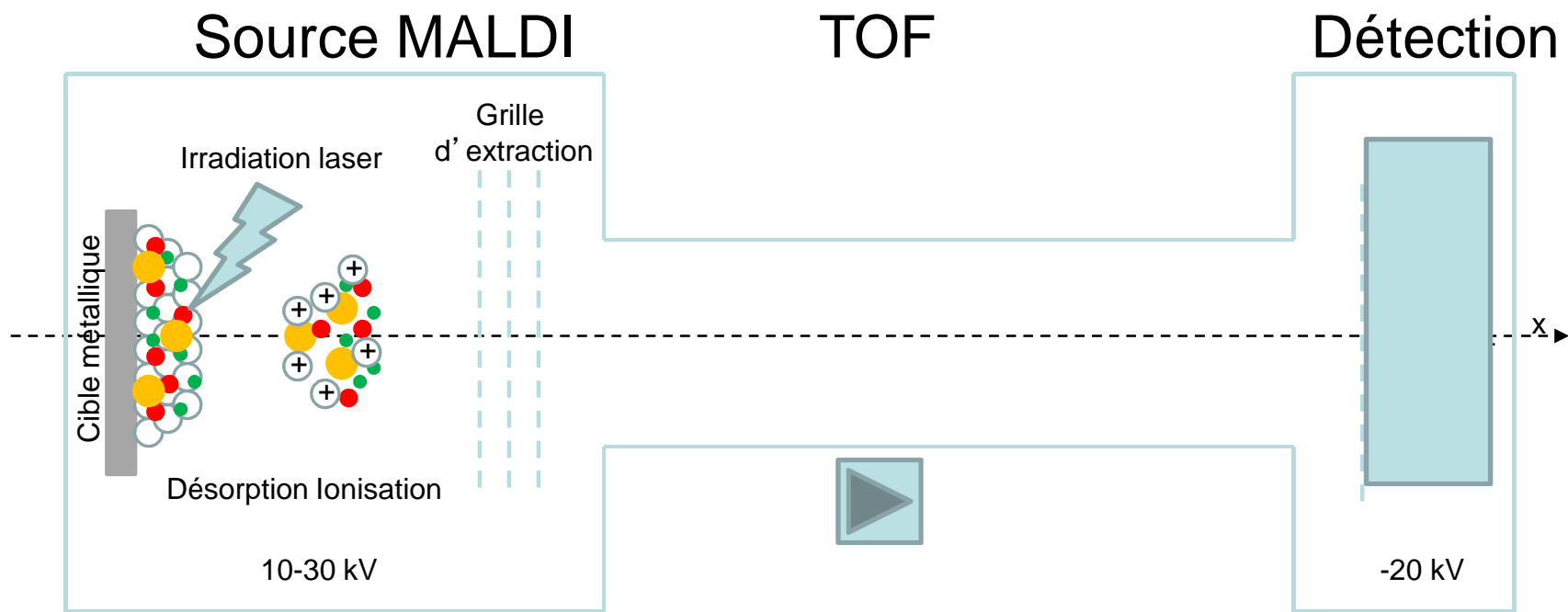
TOF : Time Of Flight



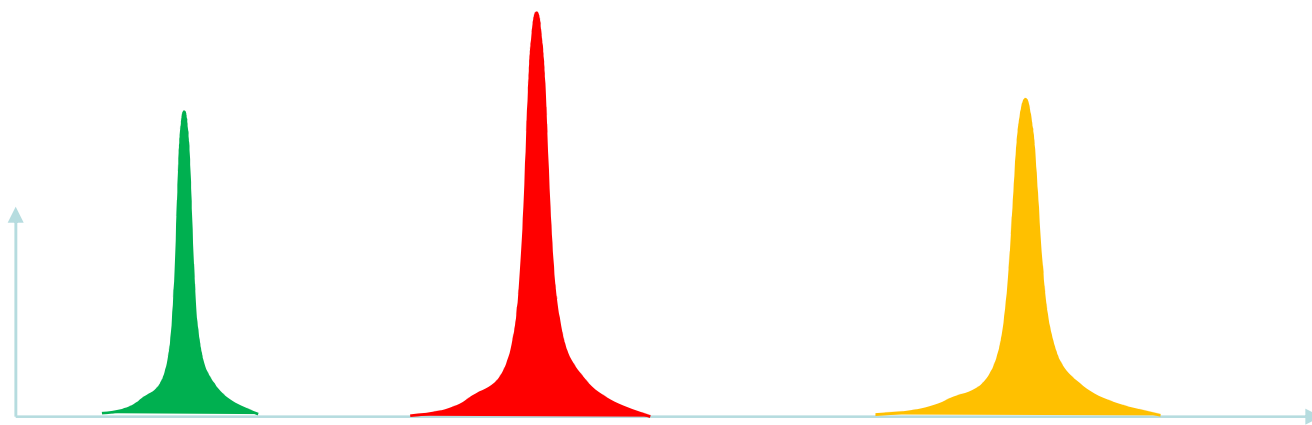
D'après les feuillets de Biologie  
VOL N° 295 - JUILLET 2010



Acquisition du 6 décembre 2013



Acquisition du 6 décembre 2013



# Acquisition en temps réel

The screenshot displays the flexControl software interface for real-time mass spectrometry acquisition. The window title is "flexControl - microflex - [MBT\_FC.par]".

**Top Panel:** Includes a menu bar (File, Display, View, Tools, Compass, Help) and a toolbar with various icons for file operations and data handling.

**Left Panel:** Shows a sample image (a textured surface) with a vertical intensity scale on the right ranging from 0 to 100. Below the image are control buttons: "Clear Sum", "Start", "Save", "Undo", "Add", and "Save As...".

**Bottom Left Panel:** Displays acquisition parameters: "Shots: 40 / 40", "Added: 80", and "Freq: 60.0". Below this is a grid of 8 rows (A-H) and 6 columns (1-11) of spots. Spots in row E are highlighted in yellow, and a spot in row D, column 9 is highlighted in blue.

**Bottom Left Panel (Parameters):** Includes fields for "Spot: D9:0", "Geometry: MSP.96", "Carrier: G\_697DA9F6\_70D1\_4426\_B8&0D7F0415482F6", and "Method: MBT\_FC.par".

**Right Panel:** Displays a mass spectrum plot with "Intens. [arb]" on the y-axis (0 to 2500) and "m/z" on the x-axis (2000 to 18000). The plot shows a complex spectrum with multiple peaks. A "Single : Cursor" label is present.

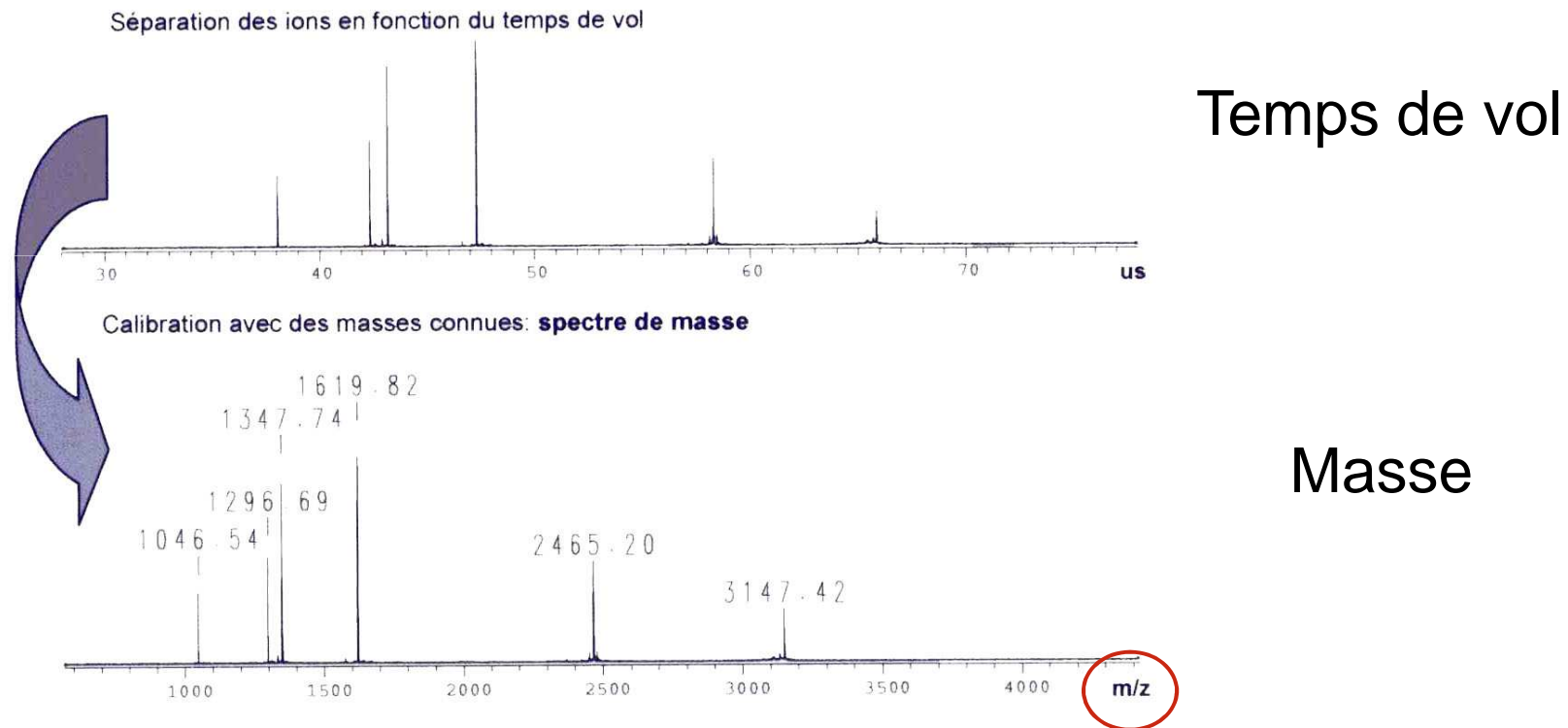
**Bottom Right Panel:** Contains a control panel with tabs: "AutoXecute", "Sample Carrier", "Spectrometer", "Detection", "Processing", "Setup", "Calibration", and "Status". It includes fields for "Method: MBT\_AutoX\_smart" and "Run: D:\Methods\AutoXSequences\ac4fa150-e64". Buttons include "Edit...", "New...", "Abort Run", "Load...", "Edit...", "New...", "Abort automatic Run", "Show Output", "Settings...", "Set Initial Laser Power", and "Pause Run".

**Legend:** A color-coded legend at the bottom of the control panel: Yellow (Prepared), Purple (For Calibration), Green (MS Measured), Dark Green (MS/MS Measured), Orange (Flatline Spectrum), Red (Aborted), and Grey (MS Laser-Tuning).

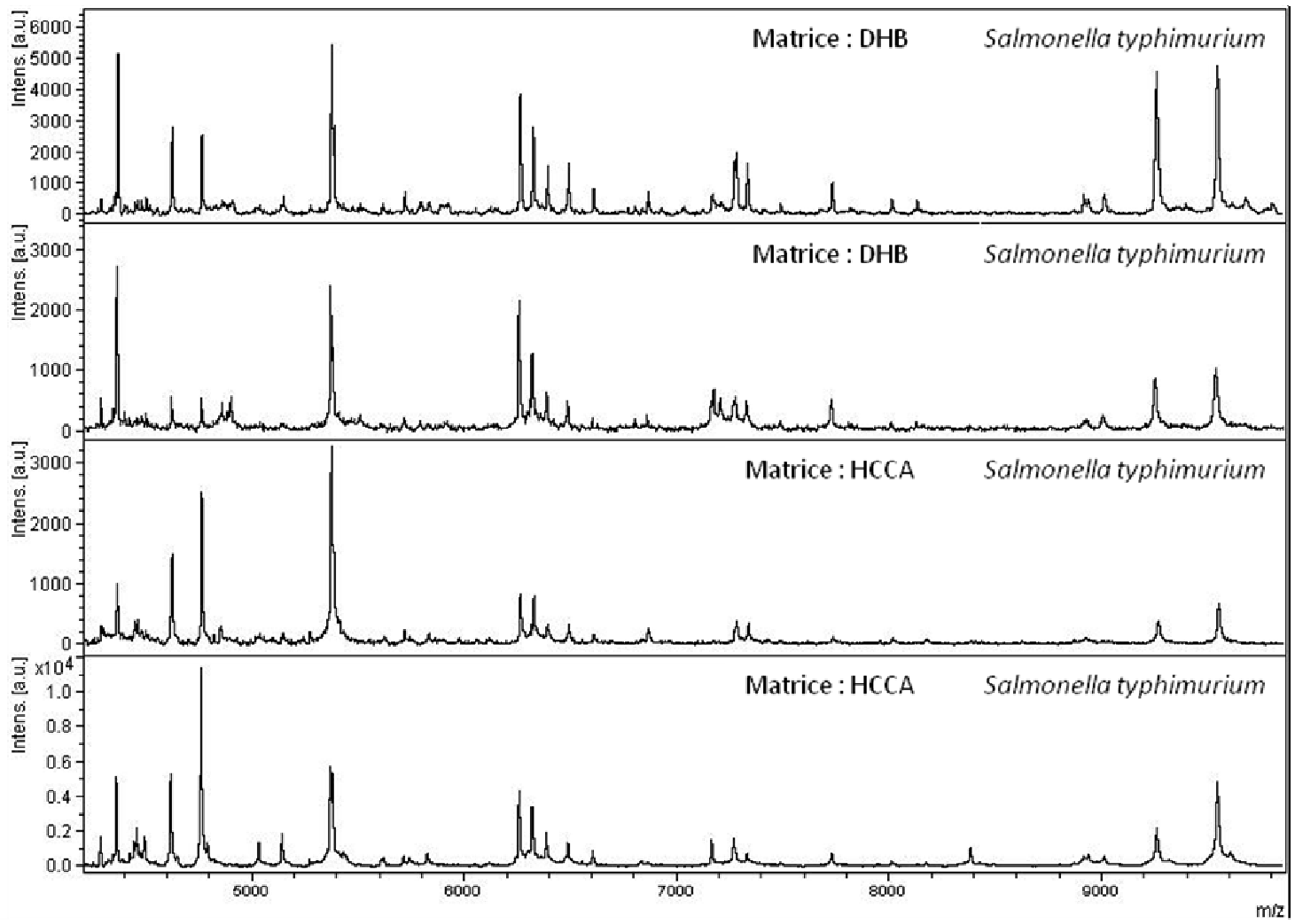
**Status Bar:** At the bottom, it shows "saving..." with a progress bar, "Linear", "BDAL@US", and "READY IN".

# Le spectre obtenu en TOF est converti en spectre de masse par calibration avec des masses connues

Passage de l'échelle temps à l'échelle masse



Le TOF de chaque molécule est caractéristique de cette molécule



# Matrices (1)

- **Solubilité**
- **Capacité d'absorption**  
transfert de protons si **affinité protonique** de l'accepteur (échantillon) est supérieure à celle du donneur (matrice)
- **Capacité de co-cristallisation**
- **Stabilité**
- Matrice **en excès** (1 pour 1000 matrice)



## Question 2 : Identification bactérienne

- 1 : permet d'identifier les micro-organismes dès la réalisation du prélèvement au lit du malade
- 2 : identifie avec certitude les *E. coli* et les *shigella*
- 3 : est la technique de référence pour l'identification des pneumocoques
- 4 : permet d'identifier correctement plus de 97% des bactéries isolées en routine



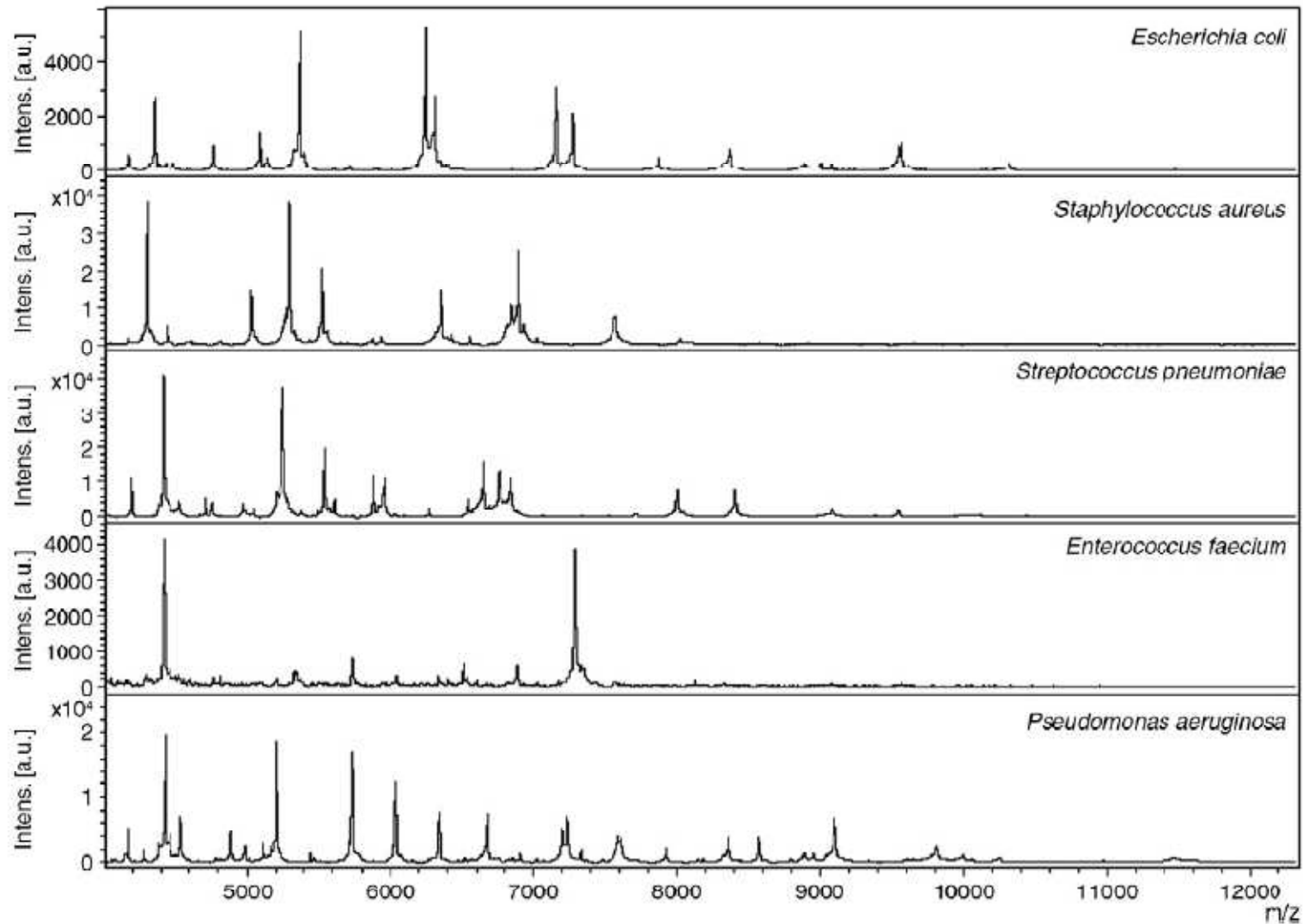
## Question 2 : Identification bactérienne

- 1 : permet d'identifier les micro-organismes dès la réalisation du prélèvement au lit du malade
- 2 : identifie avec certitude les *E. coli* et les *shigella*
- 3 : est la technique de référence pour l'identification des pneumocoques
- 4 : permet d'identifier correctement plus de 97% des bactéries isolées en routine**

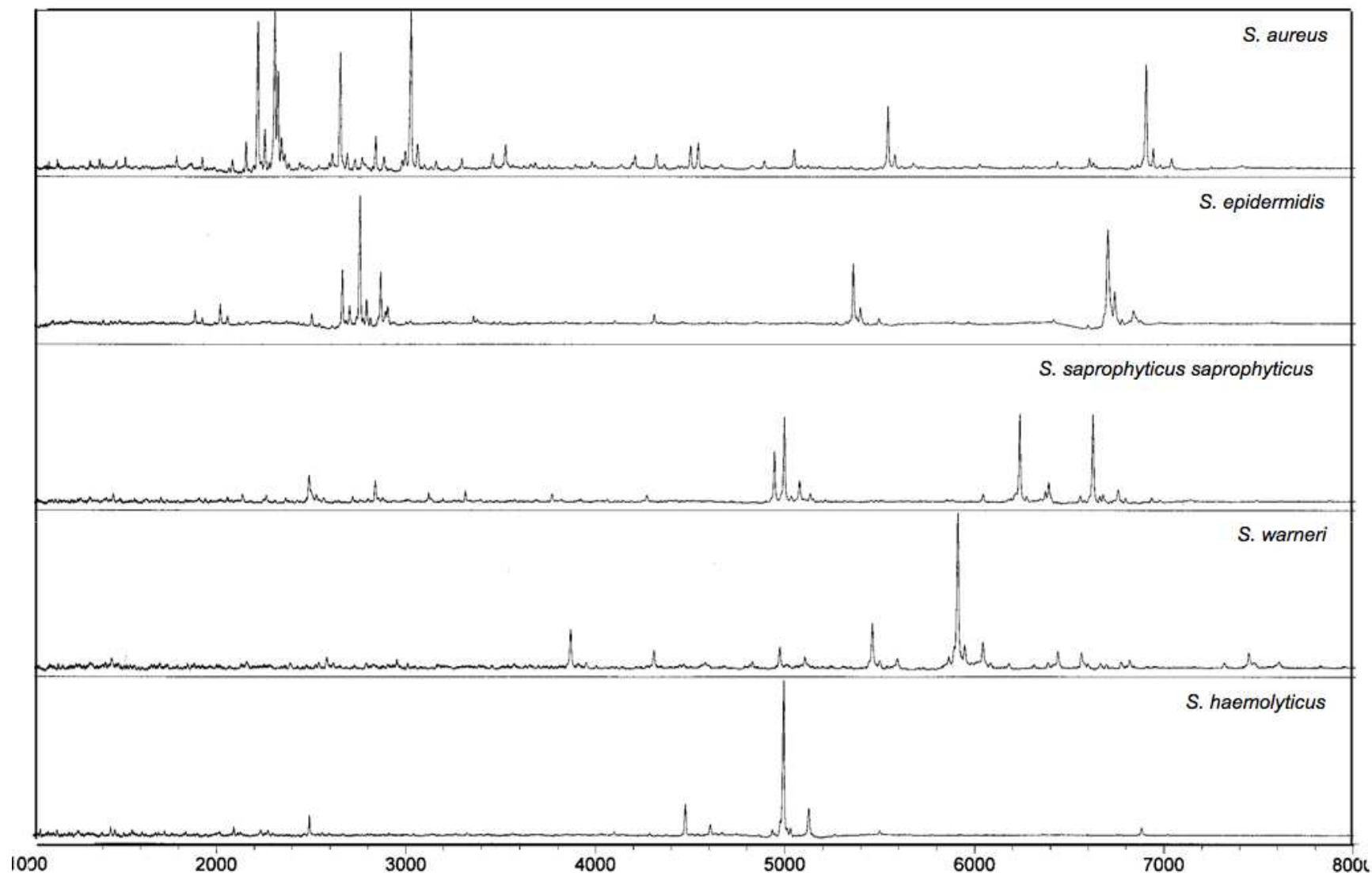
# MALDI-TOF

## Application à la microbiologie

Identification bactérienne



**Empreintes spectrales obtenues à partir de colonies entières de cinq espèces bactériennes différentes (Matrice  $\alpha$ -CHCA).**



**Empreintes spectrales obtenues à partir de colonies entières de 5 staphylocoques d'espèces différentes (Matrice  $\alpha$ -CHCA).**

# Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry

R. D. Holland,<sup>1</sup> J. G. Wilkes,<sup>1</sup> F. Rafii,<sup>1</sup> J. B. Sutherland,<sup>1</sup> C. C. Persons,<sup>1,2</sup> K. J. Voorhees,<sup>3</sup> and J. O. Lay, Jr.<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Food and Drugs Administration, National Center for Toxicological Research, Jefferson, AR 72079, USA

<sup>2</sup> Department of Chemistry, University of Arkansas at Little Rock, Little Rock, AR 72204, USA

<sup>3</sup> Department of Chemistry, Colorado School of Mines, Golden, CO 80401, USA

Constitution d' **empreintes spectrales** pour 5 espèces bactériennes:

*Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*

Puis identification par analyse visuelle des spectres de souches de ces 5 espèces

**Méthode:** Culture 24 h sur gélose Trypticase Soja

Matrice CHCA

Spectromètre: Vestec LaserTec Research

Laser Nd-Yag 355 nm

**Résultats:** identification d' espèces possible à partir d' un spectre de masse « spectral fingerprint »

Différenciation d' espèces proches comme *Escherichia coli* et *Shigella flexneri*

# Detection of Pathogenic and Non-pathogenic Bacteria by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry

T. Krishnamurthy,\* P. L. Ross and U. Rajamani

U.S. Army Edgewood RD&E Center, APG, MD 21010-5423, USA

SPONSOR REFEREE: Professor R. J. Cotter, Middle Atlantic Mass Spectrometry Laboratory, John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205, USA

---

**Espèces étudiées:** *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus thurigiensis*

**Préparation des échantillons:** Etude des **extraits protéiques** (extraction chimique ou mécanique)

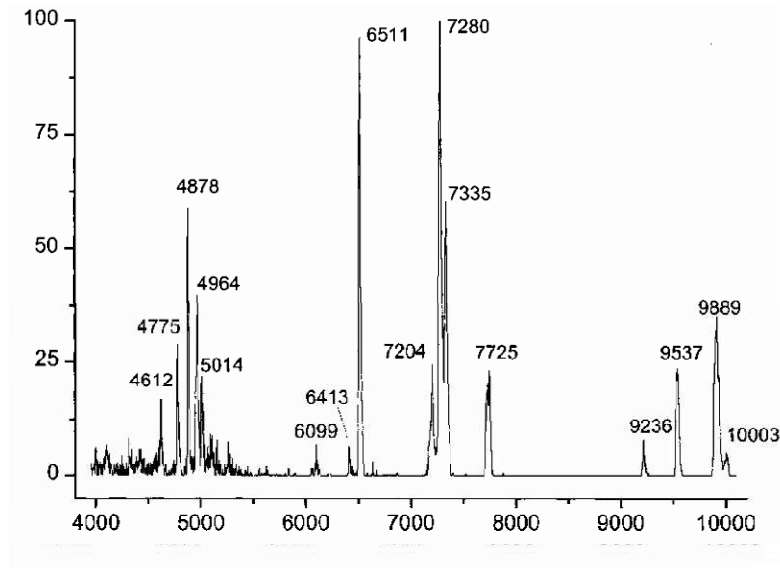
**Matrice:** acide  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamique ou acide sinapinique  
100-200 tirs lasers / échantillon

**Spectromètre:** Vestec 2000 MALDITOF (laser à N<sub>2</sub> 337nm)

# Le problème

2005 : spectres de masses de 150 genres bactériens et plus de 400 espèces

Conditions expérimentales



Comment gérer toutes ces informations ????

# Stratégie

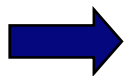
## Tests bactériologiques simples d'orientation

Gram  
Mobilité  
Catalase  
Oxydase  
Aspect des colonies etc.....

## Comparer le spectre de la souche à la database

Famille bactérienne  
Temps de culture  
Milieux

Ex : cocci à Gram positif catalase positive sur MH en 24h



Ouvrir la database *Micrococcaceae*



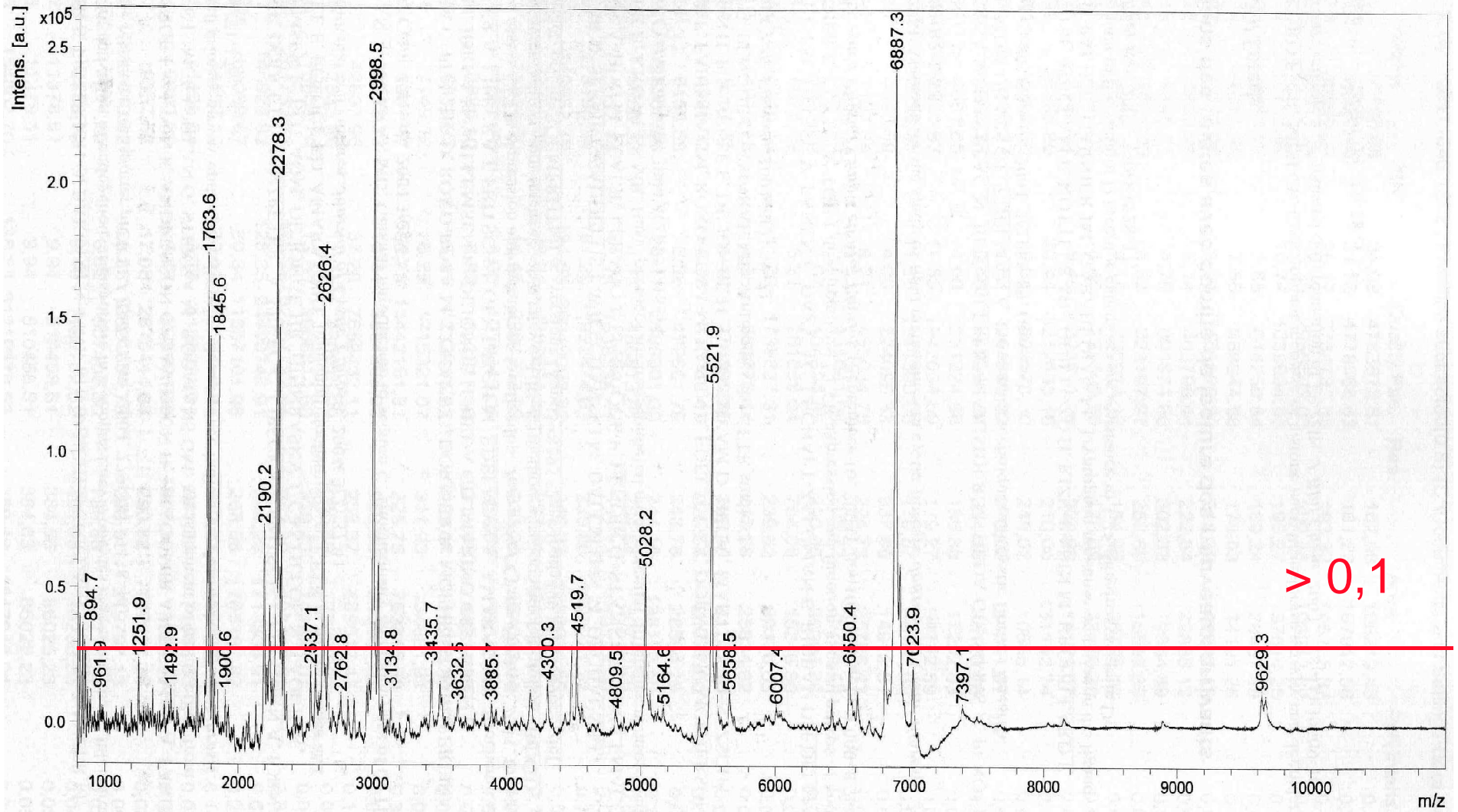
# Réalisation de la banque de données

Souches de Référence pour chaque espèce (collections)

10 acquisitions dans les mêmes conditions de culture

**1° Critère** : Pics supérieurs à 10%

Comment 1  
Comment 2



# Réalisation de la banque de données

Souches de Référence pour chaque espèce (collections)

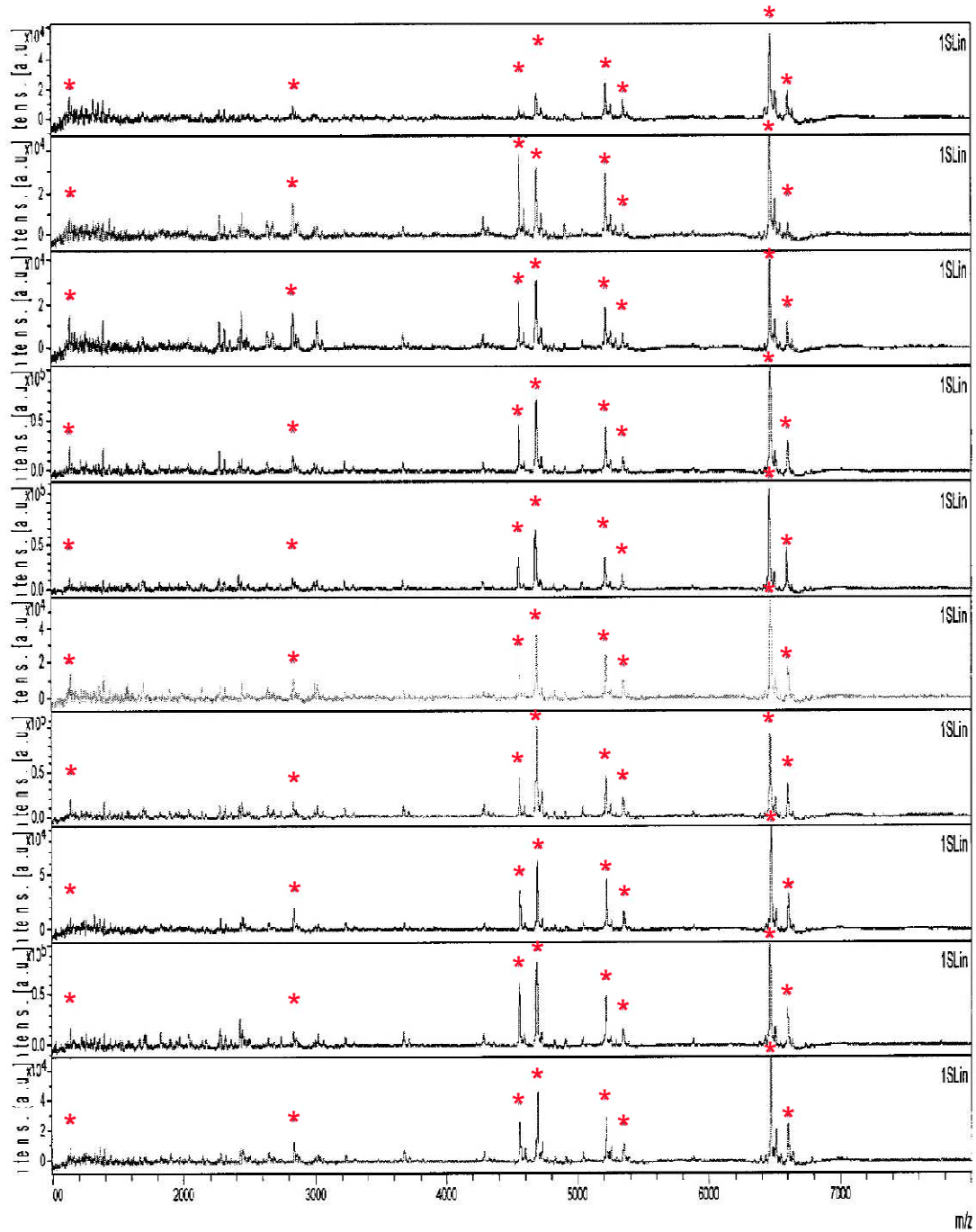
10 acquisitions dans les mêmes conditions de culture

1° **Critère** : Pics supérieurs à 10%

2° **Critère** : Pics constants dans les 10 acquisitions

*S. hominis hominis*

Pics constants > 0,1



# Exemples :

database	MH24h	MH48h	SG24h	SG48h
<i>S.aureus</i>	2196 (+/-2) 2234 (+/-2) 2284 (+/-2) 2302 (+/-2) 2323 (+/-2) 2342 (+/-2) 3005 (+/-2) 3043 (+/-2) 4526 (+/-2) 5509 (+/-2) 6893 (+/-2)	2194 (+/-2) 2217 (+/-2) 2233 (+/-2) 2282 (+/-2) 2302 (+/-3) 2340 (+/-3) 2680 (+/-3) 2719 (+/-3) 3004 (+/-3) 3042 (+/-3) 6891 (+/-4)	1696 (+/-2) 1788 (+/-2) 3007 (+/-2) 4307 (+/-2) 5035 (+/-2) 5510 (+/-2) 6892 (+/-2)	1785 (+/-2) 2682 (+/-2) 2976 (+/-2) 3005 (+/-2) 3041 (+/-3) 5512 (+/-3) 6825 (+/-5) 6896 (+/-5)
<i>S.capitis capitis</i>	2611 (+/-2) 2642 (+/-2) 2664 (+/-2) 2681 (+/-2) 2908 (+/-2) 2947 (+/-2) 5099 (+/-3) 6713 (+/-4)	2446 (+/-2) 2610 (+/-2) 2642 (+/-2) 2664 (+/-2) 2680 (+/-2) 2702 (+/-2) 2719 (+/-2) 2908 (+/-2) 2946 (+/-1) 5071 (+/-2) 5098 (+/-2) 5136 (+/-3) 6713 (+/-4) 6748 (+/-1)	2613 (+/-2) 2645 (+/-2) 5101 (+/-2) 6715 (+/-2)	2446 (+/-3) 2483 (+/-2) 2611 (+/-3) 2908 (+/-3) 5100 (+/-4) 6716 (+/-6)
<i>S.capitis ureolyticus</i>	5098 (+/-3) 5137 (+/-3) 5235 (+/-3) 6713 (+/-4) 6751 (+/-4)	2580 (+/-2) 5041 (+/-3) 5082 (+/-3) 5098 (+/-2) 5120 (+/-2) 5136 (+/-2) 5235 (+/-3) 6713 (+/-4) 6752 (+/-4)	5084 (+/-2) 5100 (+/-2) 5122 (+/-2) 5139 (+/-2) 5236 (+/-2) 6715 (+/-2)	5100 (+/-3) 5138 (+/-3) 5236 (+/-3) 6717 (+/-5)
<i>S.caprae</i>	2642 (+/-1) 2665 (+/-1) 2681 (+/-1) 2959 (+/-1) 5215 (+/-3)	1004 (+/-2) 2553 (+/-2) 2641 (+/-2) 2664 (+/-2) 2680 (+/-2) 2702 (+/-2) 2718 (+/-2) 2740 (+/-2) 2920 (+/-2) 2954 (+/-5) 5214 (+/-2) 5252 (+/-3)	2921 (+/-2) 2956 (+/-3) 5016 (+/-2) 5216 (+/-2) 5254 (+/-2) 7050 (+/-2)	2554 (+/-2) 2920 (+/-2) 2957 (+/-3) 5017 (+/-3) 5217 (+/-4) 7052 (+/-6)
<i>S.cohni cohnii</i>	2074 (+/-1) 2097 (+/-1) 2113 (+/-1) 2690 (+/-1) 4481 (+/-2) 6567 (+/-4)	1370 (+/-2) 2073 (+/-2) 2096 (+/-2) 2112 (+/-1) 2135 (+/-1) 2401 (+/-1) 2689 (+/-1) 4480 (+/-0) 5817 (+/-1)	1095 (+/-2) 1118 (+/-2) 1132 (+/-2) 1146 (+/-2) 1416 (+/-2) 2077 (+/-3) 2115 (+/-3) 2181 (+/-3) 2192 (+/-2) 2406 (+/-2)	1003 (+/-3) 2073 (+/-1) 2096 (+/-1) 2112 (+/-2) 2401 (+/-3) 2440 (+/-2) 2688 (+/-2) 4457 (+/-3) 4484 (+/-2) 4910 (+/-2) 5821 (+/-4)
<i>S.cohni urealyticum</i>	2075 (+/-1) 2098 (+/-1) 2114 (+/-1) 2136 (+/-2) 6079 (+/-3) 6541 (+/-4)	1357 (+/-1) 2074 (+/-1) 2097 (+/-1) 2114 (+/-1) 2135 (+/-2) 2153 (+/-1) 2441 (+/-1) 4895 (+/-2) 6079 (+/-3) 6118 (+/-3) 6540 (+/-4) 6579 (+/-4)	2077 (+/-2) 2115 (+/-2) 2406 (+/-3) 6080 (+/-2) 6118 (+/-2) 6542 (+/-2) 6580 (+/-2)	1318 (+/-2) 1442 (+/-3) 2075 (+/-3) 2098 (+/-3) 2114 (+/-2) 4898 (+/-3) 6083 (+/-4) 6545 (+/-4)
<i>S.epidermidis</i>	2836 (+/-4) 5340 (+/-2) 6682 (+/-4) 6720 (+/-4)	2256 (+/-1) 4102 (+/-4) 4478 (+/-4) 4938 (+/-5) 4979 (+/-5) 4996 (+/-4) 5017 (+/-4) 5035 (+/-5) 5132 (+/-4) 6890 (+/-7)	2738 (+/-2) 2882 (+/-3) 5341 (+/-2) 6684 (+/-2)	2485 (+/-2) 2735 (+/-3) 2845 (+/-3) 5340 (+/-3) 6685 (+/-5) 6821 (+/-4)

## 212 souches cliniques testées

Species	Strain
<i>Micrococcus luteus</i>	CIP A270
<i>S. epidermidis</i>	81 clinical isolates
<i>S. warneri</i>	CIP 106511
	CIP 8165
	6 clinical isolates
<i>S. xylosum</i>	CIP 103720
	CIP 104065
<i>S. intermedius</i>	CIP 81.60
<i>S. haemolyticus</i>	CIP 104114
	13 clinical isolates
<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>saprophyticus</i>	CIP 76.125T
	CIP 103545
<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>bovis</i>	CIP 105262
	CIP 105261
<i>S. saprophyticus</i> spp *	6 clinical isolates
<i>S. lugdunensis</i>	CIP 103584
<i>S. hominis</i> subsp <i>hominis</i>	CIP 81.57
	CIP 104689
<i>S. hominis</i> subsp <i>novobiosepticus</i>	CIP 105719T
<i>S. hominis</i> spp *	10 clinical isolates
<i>S. capitis</i> subsp <i>capitis</i>	CIP 103688
<i>S. capitis</i> subsp <i>ureolyticus</i>	CIP 104192T
<i>S. caprae</i>	CIP 104000T
	CIP 104520
<i>S. pasteurii</i>	CIP 105540T
	CIP 103830
	CIP 103832
<i>S. cohnii</i> subsp <i>urealyticum</i>	CIP 104024T
	CIP 104025
<i>S. scheiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	CIP 104366
<i>S. sciuri</i> subsp <i>sciuri</i>	CIP 8162T
	CIP 103583
	CIP 103825
<i>S. aureus</i>	68 clinical isolates

## Utilisation en routine

Laboratoires équipés de MALDI-TOF-MS

Toutes les identifications

- soit sur colonies
- soit directement à partir de Prélèvements
  - Hémocultures
  - Urines
  - ...



# Organisation au quotidien à l'HEGP



Nombres de lits: 800

Regroupement avec Corentin Celton et Vaugirard

2 laboratoires regroupés en services traitant les 24H  
et les 48H

1 laboratoire J0



## Notre équipement



Bact alert 3D



Sirscan 2000

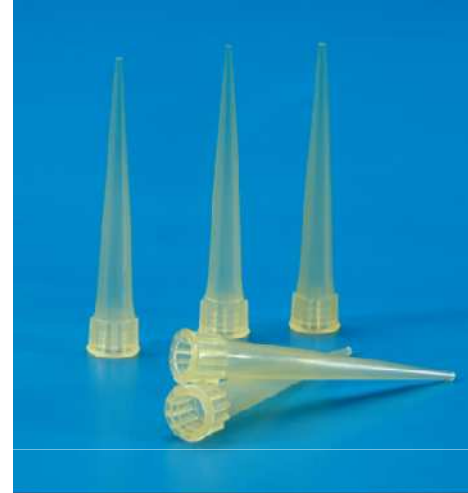
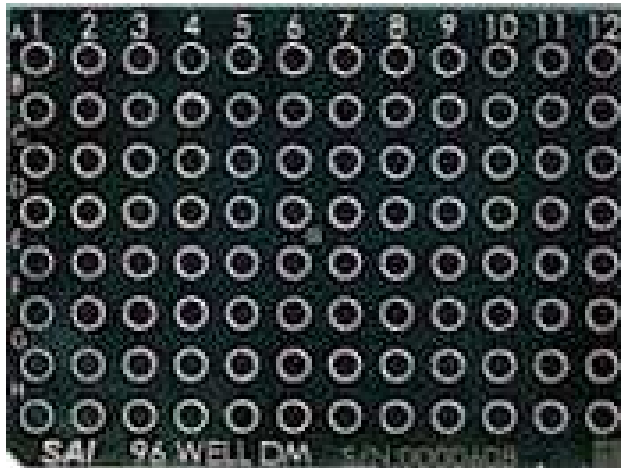


Urised



Maldi TOF

# Le matériel



# Le standard et la matrice

## Le standard:

Souche d'*Escherichia coli* + protéines

Conservation une semaine au congélateur après reconstitution

Permet une recalibration automatique de l'automate

Validation de la plaque acquise nécessaire en vue de l'accréditation

## La matrice:

permet la cristallisation du dépôt

Conservation 48h à 1 semaine (selon fournisseur) au réfrigérateur

## Utilisation en routine

Souche de 24H

Dépôt à partir d'une colonie isolée

Idéalement à partir d'une gélose au sang



# Enregistrement du projet

Saisie Projet - Spectromètre de Masse

## Création Batch Spectrométrie de masse

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	QC									<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
E	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
F	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
G	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
H	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Plaque1-2013\_11\_04\_s

Projet MS: 2013\_11\_04\_sabr    Lecteur: MICROFLEX PC    04/11/2013

N° Demande (F5 Zoom): **ESSAI**     Ajout automatique Milieu     Création des analyses

**Informations sur la demande rattachée:** **ESSAI**

**BMR**  
Nom patient: **ESSAI**    Date de prélèvement: **01/12/2011**    Service: **HPU-TEST SIGLES**  
Prénom patient:    Type de prélèvement:    Prélèvement: **TEST SIGLES**

Détails identification  
Commentaire libre:

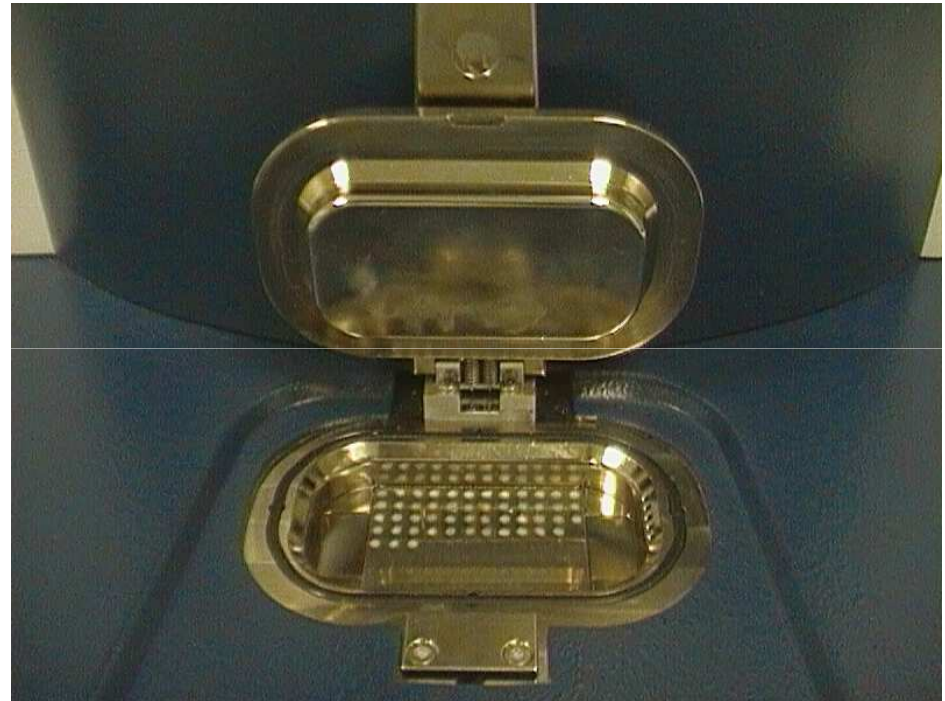
Germe:

Numéro d'ordre du germe:

Windows Taskbar: démarrer | labo1.STE - TNV... | Lexar (E:) | maldi 2.bmp - Paint | Microsoft Power... | SIRWEB-MALDI | FR | 15:22

## Insertion de la plaque de maldi TOF



# Acquisition de la plaque

The screenshot displays the flexControl software interface for a microflex system. The window title is "flexControl - microflex - [MBT\_FC.par]". The interface is divided into several sections:

- Top Panel:** Contains a menu bar (File, Display, View, Tools, Compass, Help) and a toolbar with various icons for file operations and system control.
- Sample Image Area:** Shows a grayscale image of a sample surface, divided into four quadrants. A vertical scale bar on the right indicates intensity from 0 to 100.
- Mass Spectrum Plot:** A graph showing intensity (y-axis, 0 to 3000) versus m/z (x-axis, 2000 to 18000). The plot displays a complex spectrum with numerous peaks, with the most prominent ones between 4000 and 10000 m/z.
- Spot Plate Grid:** A grid of 8 rows (A-H) and 11 columns (1-11) of spots. Spots in rows D and E are highlighted in yellow, indicating they are prepared or measured.
- Control Panel:** Contains various settings and buttons:
  - Method:** MBT\_AutoSmart
  - Run:** Includes buttons for "Abort Run", "Abort automatic Run", and "Pause Run".
  - Data Directory:** Sample Name
  - Status Legend:** Prepared (yellow), For Calibration (purple), MS Measured (green), MS/MS Measured (dark green), Flatline Spectrum (orange), Aborted (red), MS Laser-Tuning (grey).
- Bottom Panel:** Shows a progress bar for "Saving..." and a status bar with "Linear", "ION/GUS", and "READY" indicators.

# Résultat d'une acquisition

Identification MALDI Biotyper en temps réel - Projet: 2013-11-04aurelia

Fichier Affichage Outils Aide

Non occupé  
 Echantillon déposé  
 Interrompu  
 Mesuré  
 Pas de signal  
 Mesuré, classé en vert  
 Mesuré, classé en jaune  
 Mesuré, classé en rouge  
 Non identifié - pas de signal

Cacher détectées

ID	Position	Espèces détectées	Score	Commentaire
std cq	A1	Escherichia coli	2.402	proche de Shigella mais ne peut en être distingué avec certitude pour le moment
mandour	A2	Escherichia coli	2.277	proche de Shigella mais ne peut en être distingué avec certitude pour le moment
pti s1-2	A3	pas de pics détectés		
reseau endo Z2	A4	Stenotrophomonas maltophilia	2.068	appartient au ou est proche de groupe Stenotrophomonas maltophilia
		Score	Espèces détectées	Commentaire
		1.296	Pseudomonas boreopolis LMG 979T HAM	<a href="#">85183</a>
		1.479	Stenotrophomonas maltophilia (Pseudomonas_hibiscicola_#) LMG 980T HAM	<a href="#">85189</a>
		1.638	Stenotrophomonas maltophilia DSM 14322 DSM	<a href="#">40324</a>
		1.657	Stenotrophomonas acidaminiphila DSM 13117T HAM	<a href="#">128780</a>
		1.742	Stenotrophomonas maltophilia (Pseudomonas_beteli_#) LMG 978T HAM	appartient au ou est proche de group... <a href="#">40324</a>
		1.816	Stenotrophomonas maltophilia (Pseudomonas_geniculata_#) LMG 2195T HAM	appartient au ou est proche de group... <a href="#">85188</a>
		1.827	Stenotrophomonas maltophilia DSM 50173 DSM	appartient au ou est proche de group... <a href="#">40324</a>
		1.924	Stenotrophomonas maltophilia 10942 CHB	appartient au ou est proche de group... <a href="#">40324</a>
		2.029	Stenotrophomonas maltophilia DSM 50170T DSM	appartient au ou est proche de group... <a href="#">40324</a>
		2.068	Stenotrophomonas maltophilia (FX) 23086229 MLD	appartient au ou est proche de group... <a href="#">40324</a>
mc corkey	A5	Stenotrophomonas maltophilia	1.864	appartient au ou est proche de groupe Stenotrophomonas maltophilia
37	A6	pas de pics détectés		
b3s1 scope beige	A7	Bacillus simplex	1.857	La qualité des spectres (qui influe sur le score) dépend du degré de sporulation: Utilisez des colonies fraîches.
b5s5 air beige	A8	Bacillus simplex	1.976	La qualité des spectres (qui influe sur le score) dépend du degré de sporulation: Utilisez des colonies fraîches.
crenele	A9	degré de confiance insuffisant pour	1.292	

Connecté à flexControl | Serveur: localhost: Port: 8080

start Identification MALDI ... Identification IVD MA... fgi.JPG - Paint untitled - Paint 1:49 PM



## Résultat d'une acquisition

Visualisation :2013_11_04_l1sabr											
Zone de rattachement											
SIR	SIL	MSID	DEMANDE	NOM	PRENOM	SCORE	GERME	Genre MS	Espce MS		
2	NON		2100-D10	Contrôle calibration	2100-D10	2,36	ECOL	Escherichia	coli		
	NON	NON	OUI	37292789		NICOLE	2,37	CFRE	Citrobacter	freundii	
	NON	NON	OUI	31139675		JAMILA	1,98	GVAG	Gardnerella	vaginalis	
	NON	NON	OUI	31139676		JAMILA	1,97	GVAG	Gardnerella	vaginalis	
	NON	NON	OUI	37292764		HAMADI	2,42	BFRA	Bacteroides	fragilis	
	NON	NON	OUI	31140344		NICOLE	2,08	SEPI	Staphylococcus	epidermidis	
	NON	NON	OUI	31140344		NICOLE	1,88		Acinetobacter	lwoffii	
	NON	NON	OUI	37292686		MATTHIEU	2,09	SCAS	Staphylococcus	capitis	
	NON	NON	OUI	37292686		MATTHIEU	2,12	SHOS	Staphylococcus	hominis	
	NON	NON	OUI	31141244		WILLIAM	2,17	SEPI	Staphylococcus	epidermidis	
	NON	NON	OUI	31141244		WILLIAM	2,06	SEPI	Staphylococcus	epidermidis	
	NON	NON	OUI	31142551		CHANTAL	-	ECLO	#Enterobacter	#cloacae	
	NON	NON	OUI	37292790		CHANTAL	2,36	ECLO	Enterobacter	cloacae	

# Utilisation en routine : sur colonies

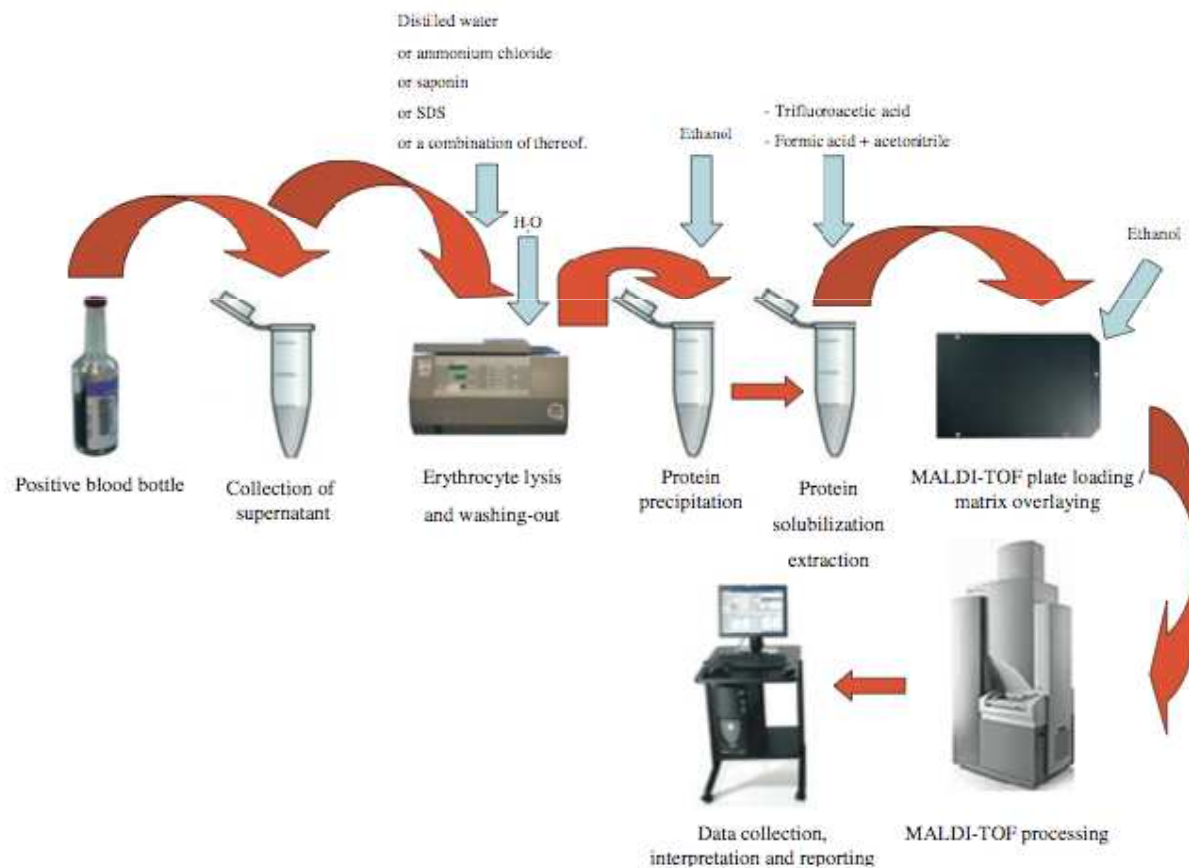
Tableau 1 Résumé des principales études utilisant le MALDI-TOF en routine pour l'identification bactérienne (Id)						
Auteurs	Échantillons		Id à l'espèce	Id au genre	Principales difficultés	Commentaires
Seng et al. 2009 [8]	Routine (n= 1660)	Tous les prélèvements de routine	83,8 %	95,0 %	<i>Propionobacterium acnes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Shigella</i> sp.	Dans cette étude, le MALDI-TOF est utilisé en première ligne pour l'identification
Blondiaux et al. 2009 [17]	Routine (n=362)	Tous les prélèvements de routine	72,9 %	87,0 %	<i>Streptococcus</i> du groupe <i>viridans</i> <i>Shigella</i> sp.	
van Veen et al. 2010 [18]	Routine (n=980)	Tous les prélèvements de routine	92,0 %	98,8 %	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Bactéries anaérobies	
Bizzini et al. 2010 [19]	Routine (n=1371)	Tous les prélèvements de routine	93,2 %	98,5 %	<i>Shigella</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Une étape d'extraction permet d'augmenter le pourcentage de résultats valides de 22,9 %
Gravet et al. 2010 [20]	Routine (n=10000)	Tous les prélèvements de routine	nd	98,8 %	<i>Corynebacterium</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Erreurs de taxonomie essentiellement Dans cette étude, le MALDI-TOF est utilisé en première ligne pour l'identification
Bessède et al. 2010 [21]	Routine (n=1013)	Tous les prélèvements de routine	97,3 %	99,0 %	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Une étape d'extraction permet d'augmenter le pourcentage d'identification à l'espèce de 14,7 % Nombre insuffisant de souches dans la banque de données pour certaines espèces
Dauwalder et al. 2011 [22]	Routine (n=323)	Tous les prélèvements de routine	94,4 %	98,5 %	Streptocoques et entérocoques Anaérobies Corynebactéries	Analyse en routine du système Axima/Saramis/SirWeb MALDI-TOF
Benagli et al. 2011 [23]	Routine (n=1019)	Tous les prélèvements de routine	nd	98,0 %		Étude de la sensibilité et de la spécificité du MALDI-TOF Sensibilité moindre pour les espèces <i>K. oxytoca</i> et <i>E. cloacae</i>
Sogawa et al. 2011 [24]	Routine (n=468)	Tous les prélèvements de routine	91,7 %	97,0 %	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Absence d'identification avec des souches muqueuses de <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Comparaison de trois MALDI-TOF de gamme différente (Bruker)
Neville et al. 2011 [25]	Routine (n=927)	Tous les prélèvements de routine	85,0 %	96,0 %	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

GN : Gram négatif ; GP : Gram positif ; nd : non disponible

# Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review

M. Drancourt

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Emergentes (URMITE) UMR CNRS 6236, IRD 198, IFR48, Université de la Méditerranée, Marseille, France



# Utilisation en routine : sur hémoculture et urine

**Tableau 2** Résumé des principales études utilisant le MALDI-TOF pour l'identification bactérienne (Id) directement à partir des prélèvements

Auteurs	Échantillons		Id à l'espèce	Id au genre	Principales difficultés	Commentaires
Prod'hom et al. 2010 [37]	Sang (n= 126)	Hémocultures positives	77,8 % GN : 89,1 % GP : 71,6 %	78,7 % GN : 89,1 % GP : 72,9 %	<i>Streptococcus mitis</i> group <i>Staphylococcus</i> sp.	La présence d'une capsule peut en partie expliquer le plus faible taux d'identification pour les bactéries <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>K. pneumoniae</i>
La Scola et al. 2009 [31]	Sang (n= 599)	Hémocultures positives	76,0 %	76,0 %	<i>Streptococcus</i> sp. Échantillons polymicrobiens	
Stevenson et al. 2009 [32]	Sang (n= 212)	Hémocultures positives (179) Flaconsensemencés (33)	80,2 %	80,2 %	<i>Streptococcus</i> du groupe <i>mitis</i> <i>Propionobacterium acnes</i>	
Feroni et al. 2010 [33]	Sang (n= 685)	Hémocultures positives (388) Flaconsensemencés (312)	89,0 %	98,0 %	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> du groupe <i>mitis</i>	En cas d'hémoculture polymicrobienne, le germe prédominant est dans la plupart des cas identifié. Méthode très rapide
Christner et al. 2010 [34]	Sang (n= 277)	Hémocultures positives	94,2 %	95,0 %	GP	Les difficultés d'identification résultent d'un nombre insuffisant de bactéries, plus fréquent avec les Gram +
Ferreira et al. 2010 [35]	Sang (n= 300)	Hémocultures positives	42,6 % GN : 83,3 % GP : 31,8 %	71,6 % GN : 96,6 % GP : 65,7 %	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i>	Pas de culture polymicrobienne
Moussaoui et al. 2010 [36]	Sang (n= 532)	Hémocultures positives	90,0 % GN : 91,1 % GP : 89 %	nd	<i>Streptococcus mitis</i> group <i>Staphylococcus</i> sp.	
Ferreira et al. 2010 [38]	Urine (n= 220)	Urines positives	91,8 % GN : 93,6 % GP : 66,6 %	92,7 % GN : 94,6 % GP : 66,6 %	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Raoultella</i> sp.	Meilleurs résultats avec >10 <sup>5</sup> CFU/mL <i>E. coli</i> >10 <sup>5</sup> CFU/mL : 97,6 % identifications correctes

GN, Gram négatif, GP : Gram positif

### Question 3 :

### Le MALDI-TOF

1 : permet de ne plus faire d'antibiogramme car les Informations concernant la résistance sont dans le spectre

2 : permet de dire à EOH que les souches sont identiques et qu'il est grand temps de prendre des mesures pour isoler le patient

3 : rend de vrais services aux patients

# Perspectives

Comparaison de souches

Facteurs de virulence

Autres ....

# Apport du MALDI-TOF dans la comparaison de bactéries ?

Intérêt de comparer des souches : évidence

Diagnostic (commensalisme, infection)  
Epidémiologie

Pas si simple

Approche phénotypique  
Approche génotypique

# Approche phénotypique

Biotype  
Antibiotype  
Sérotype  
Lysotype  
Electrophorèse des protéines  
MLEE

# Approche génotypique

Profil plasmidique  
Electrophorèse en champ pulsé  
RFLP  
Amplification génique  
Séquençage (MLST)



# Analyse MALDI-TOF



**H1:** *S. epidermidis*

**H2:** *S. epidermidis*

**H3:** *S. epidermidis*

**H4:** *S. warneri*

**H5:** *S. epidermidis*

**H6:** *S. epidermidis*

## Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 Carbapenemases by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry

Jaroslav Hrabák,<sup>a</sup> Vendula Študentová,<sup>a</sup> Radka Walková,<sup>a</sup> Helena Zemličková,<sup>b</sup> Vladislav Jakubů,<sup>b</sup> Eva Chudáčková,<sup>a</sup>

Marek Gniadkowski,<sup>c</sup> Yvonne Pfeifer,<sup>d</sup> John D. Perry,<sup>e</sup> Kathryn Wilkinson,<sup>e</sup> and Tamara Bergerová<sup>a</sup>

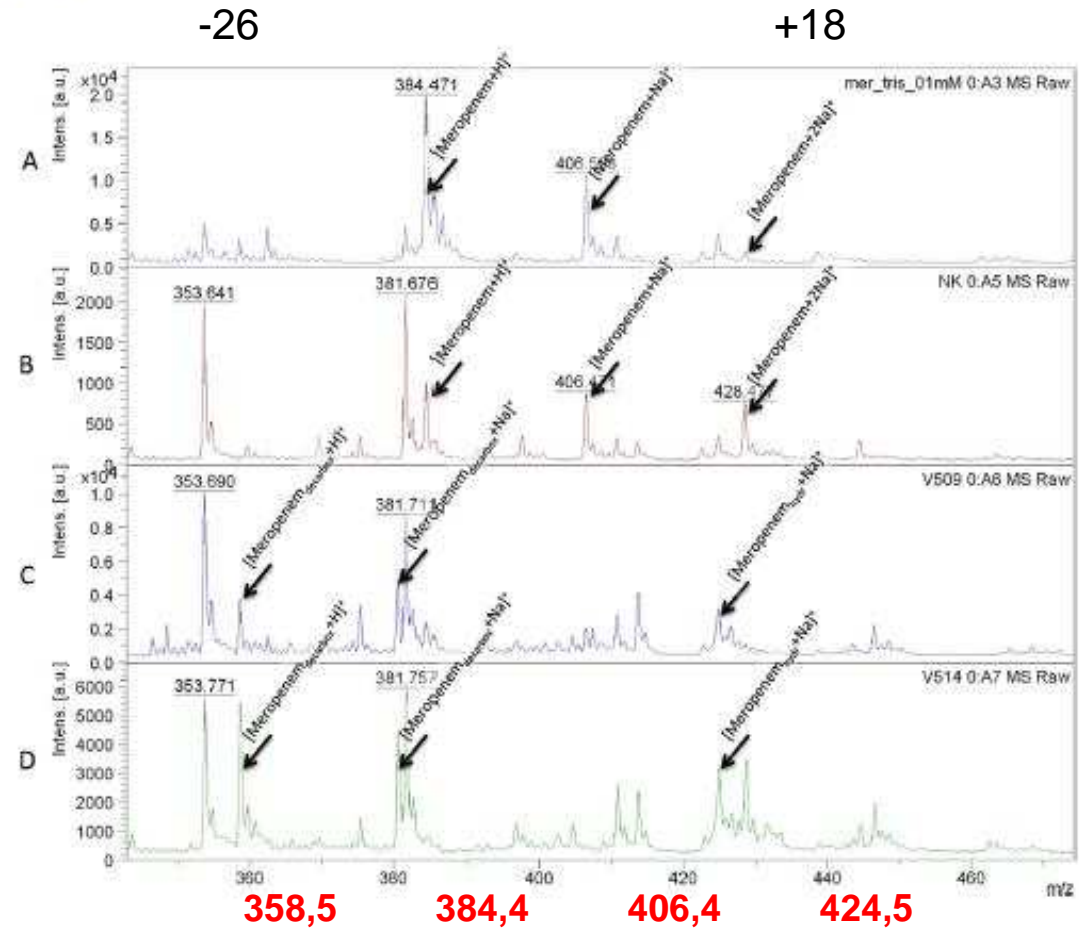
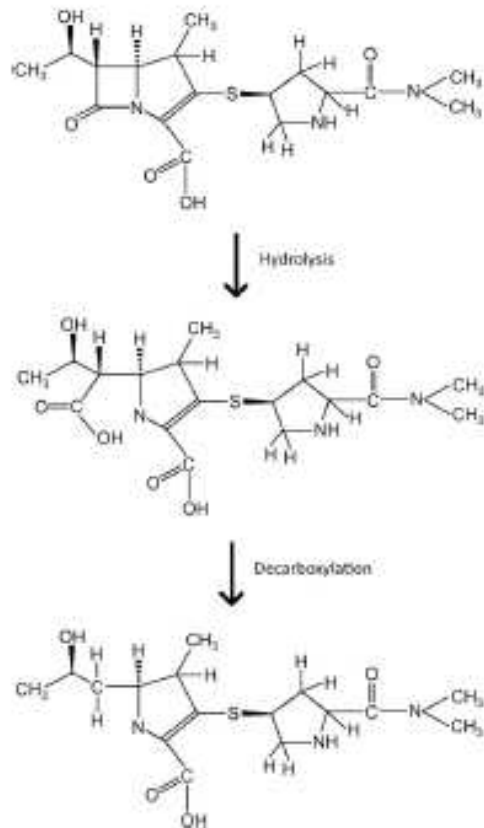
Department of Microbiology, Faculty of Medicine and University Hospital in Plzeň, Charles University in Prague, Plzeň, Czech Republic<sup>a</sup>; National Reference Laboratory for Antibiotics, National Institute for Health, Prague, Czech Republic<sup>b</sup>; National Medicines Institute, Warsaw, Poland<sup>c</sup>; Robert Koch Institute, Nosocomial Infections, Wernigerode, Germany<sup>d</sup>; and Microbiology Department, Freeman Hospital, Newcastle upon Tyne, United Kingdom<sup>e</sup>

A : Méropénème

B : Témoin –

C : *E. coli* NDM-1

D : *A. baumannii* NDM-1



# Conclusions

Technique fiable, peu coûteuse

Opérationnelle dans de nombreux laboratoires

Mise à jours et optimisation des banques de données

Améliorations nécessaires :

- Comparaison de souches

- Résistance

- Facteurs de virulence

