

# MICROBIOLOGIE MOLÉCULAIRE

---

Mme Baba Ahmed-Kazi Tani Z.  
Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques:  
Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique  
Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen

# Apport des techniques de biologie moléculaire en microbiologie

## Diagnostic

- Détection agent pathogène
  - Identification

## Etudes épidémiologiques

- Typage moléculaire

# DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

---

# Diagnostic bactériologique

## Processus analytique comprenant

- Examen direct (suivant les prélèvements)
- Un ou plusieurs milieux de culture
- Conditions d'incubations (aérobie, anaérobie, ..)
- Durée d'incubation des différents milieux



## Milieux chromogéniques

- Urines, recherche de BMR, prélèvements plurimicrobiens
- Repérage aisée de colonies différentes
- Identification présomptives

## Identification

- Galerie d'identification biochimique manuelle ou automatisée
- Immunologiques



# Diagnostic moléculaire

## Place dans la stratégie diagnostic

- Bactéries à croissance lente (*Neisseria meningitidis*, *Bordetella*)
- Bactéries difficilement ou non cultivables (*Tropheryma whippelii*, *Coxiella*)
- En complément d'une culture restée négative, souvent à cause d'une antibiothérapie préalable
- Dépistage syndromique (Infections respiratoires, Gastro entérites, Méningite/méningoencéphalites)

# Principe des techniques moléculaires

Détection et/ou identification d'un ADN bactérien dans un prélèvement biologique

## PCR universelle

Gène commun à toutes les eubactéries : ARN r 16S

Sans a priori sur le résultat

Identification par séquençage du produit de PCR en 48 – 72 h

## PCR spécifique

Gène amplifié ciblant une espèce, un genre, un groupe bactérien

Présomption clinique forte

Résultat positif / négatif en 24 h

# Prélèvement

Potentiellement tout type de prélèvement

## PCR universelle

- Site initialement stérile
- Pas sur les prélèvements pour lesquels il existe des seuils de pathogénicité (urines, LBA)

## PCR spécifique

- Bactérie non commensale
- Biopsie cutanée : PCR spécifique *Staphylococcus*
- Gorge : PCR *Streptococcus*

# Conditions

## Recueil du prélèvement

- Liquide de ponction, pus, tissu, biopsie, sang
- Volume 200  $\mu$ L
- Sang sur EDTA (héparine = inhibiteur)

## Nombre de prélèvements

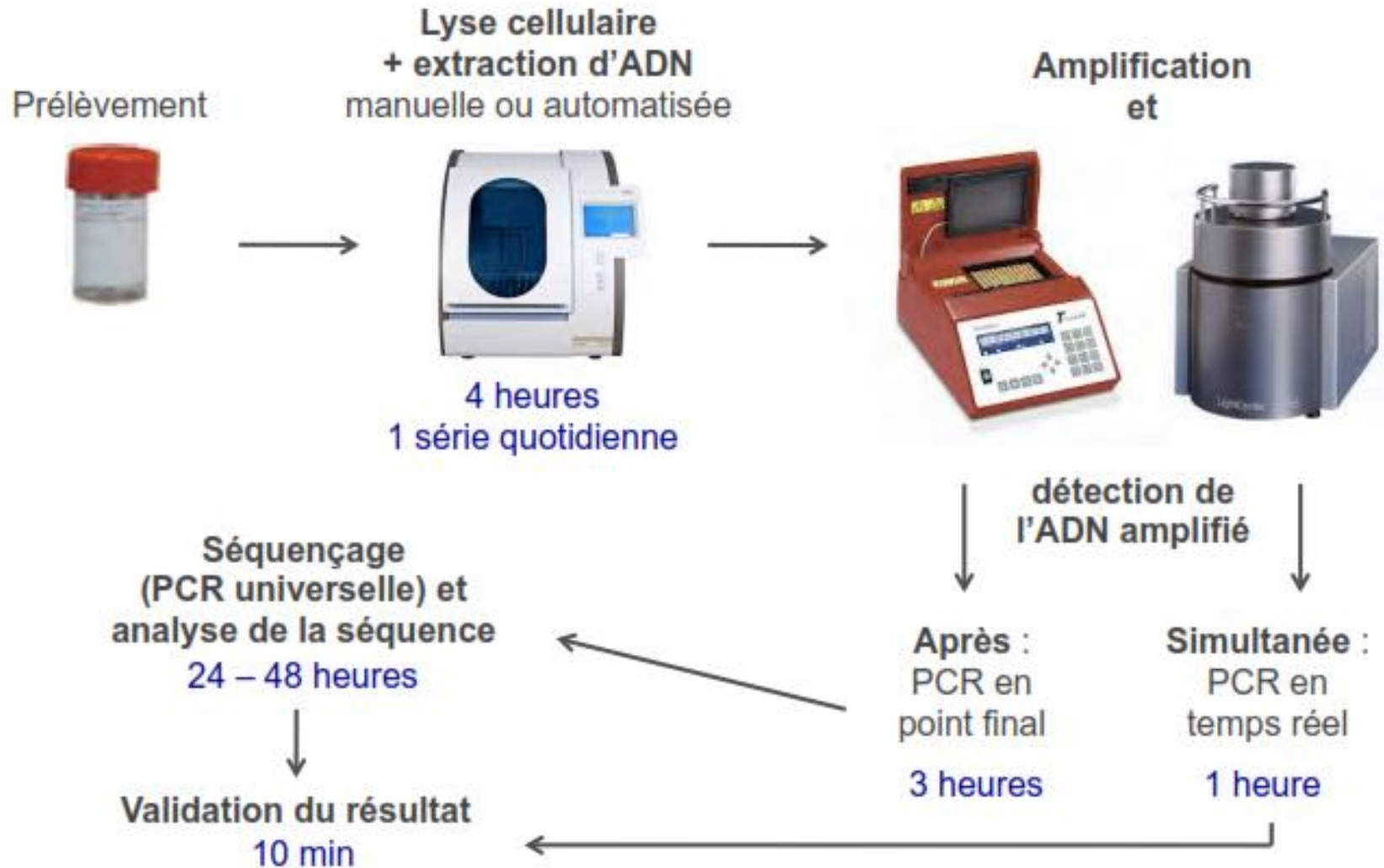
- Multiplier le nombre de prélèvement en orthopédie
- Culture et PCR sur un même prélèvement

## Acheminement au laboratoire

- < 4 heures : t° ambiante
- <24 heures : +4°C
- Au delà: -20°C (sauf le sang)

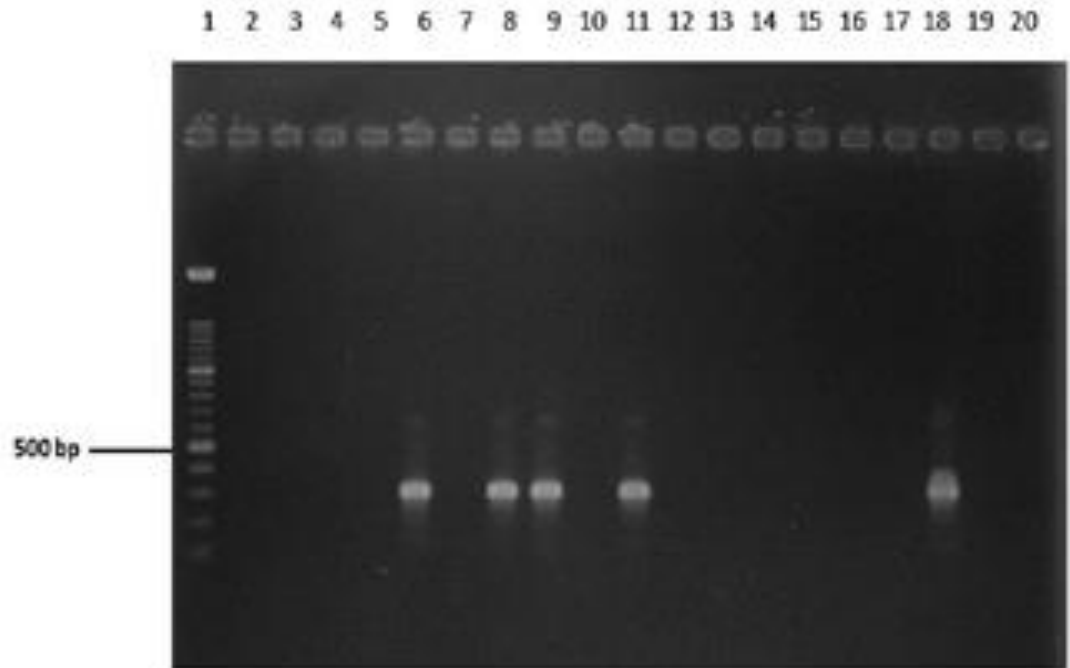


# Différentes étapes



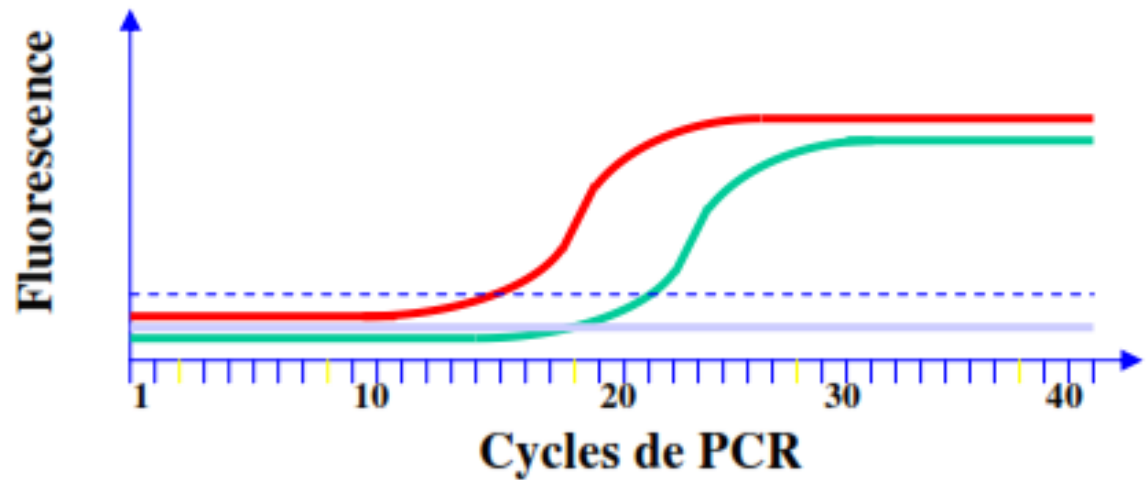
# Détection en point final

- Gel migration des produits de PCR
- Vérification de la taille attendue



# Détection en temps réel

Captation d'un signal de fluorescence au cours de la PCR



# PCR UNIVERSELLE

---

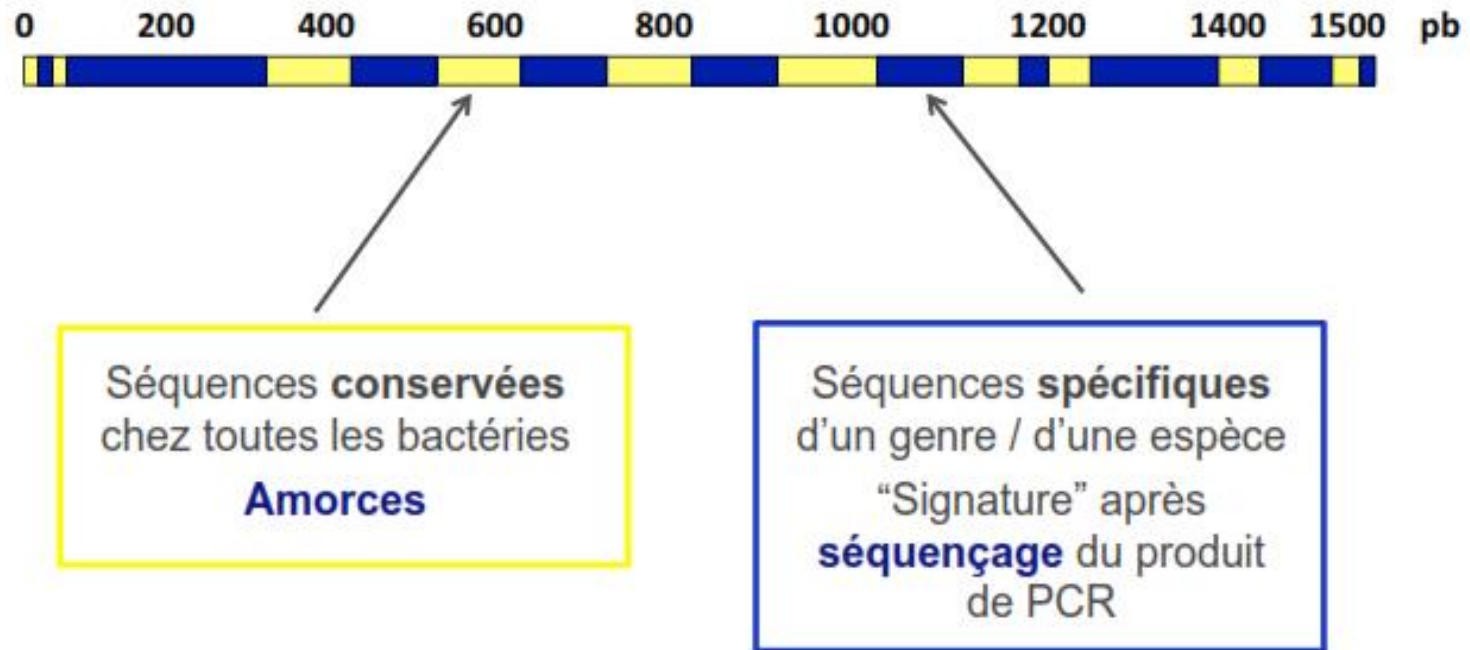
# Méthodologie

## L'ARNr 16S

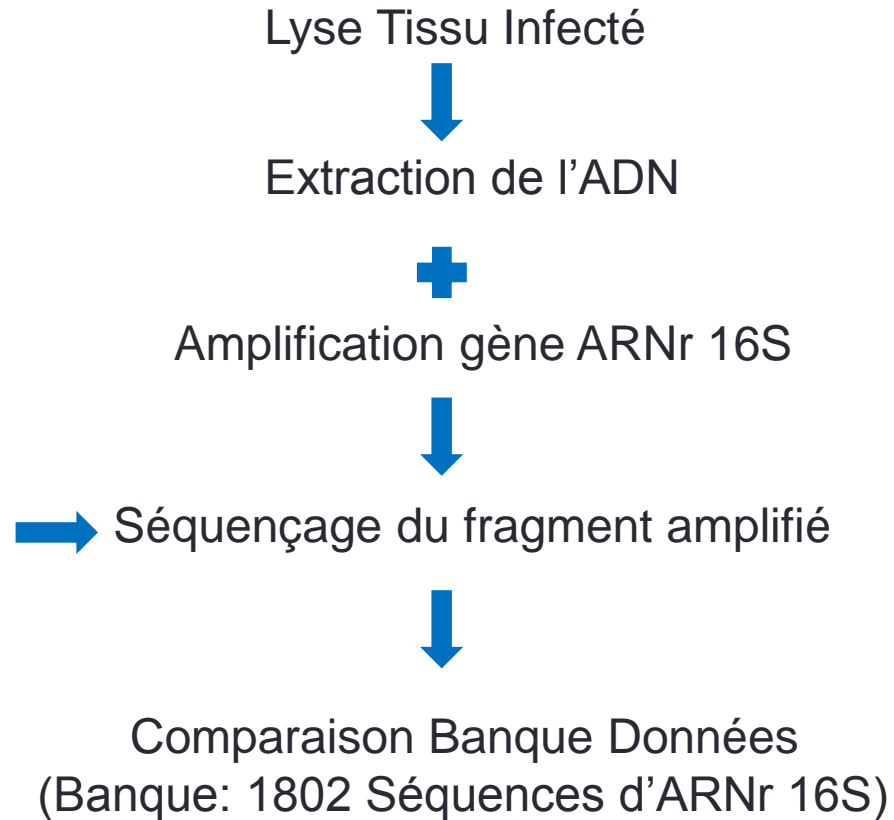
- Codé en opéron
- Nombre de copies du gènes variable en fonction de l'espèce bactérienne (1 à 10)
- Structure et fonction conservée chez toutes les bactéries
- Pas de transfert horizontal
- Nombreuses séquences déposées dans les bases de données

# Méthodologie

## L'ARNr 16S



# Méthodologie



Séquençage connue → Bactérie identifiée  
Séquence Inconnue → Positionnement Phylogénétique

# Interprétation des séquences

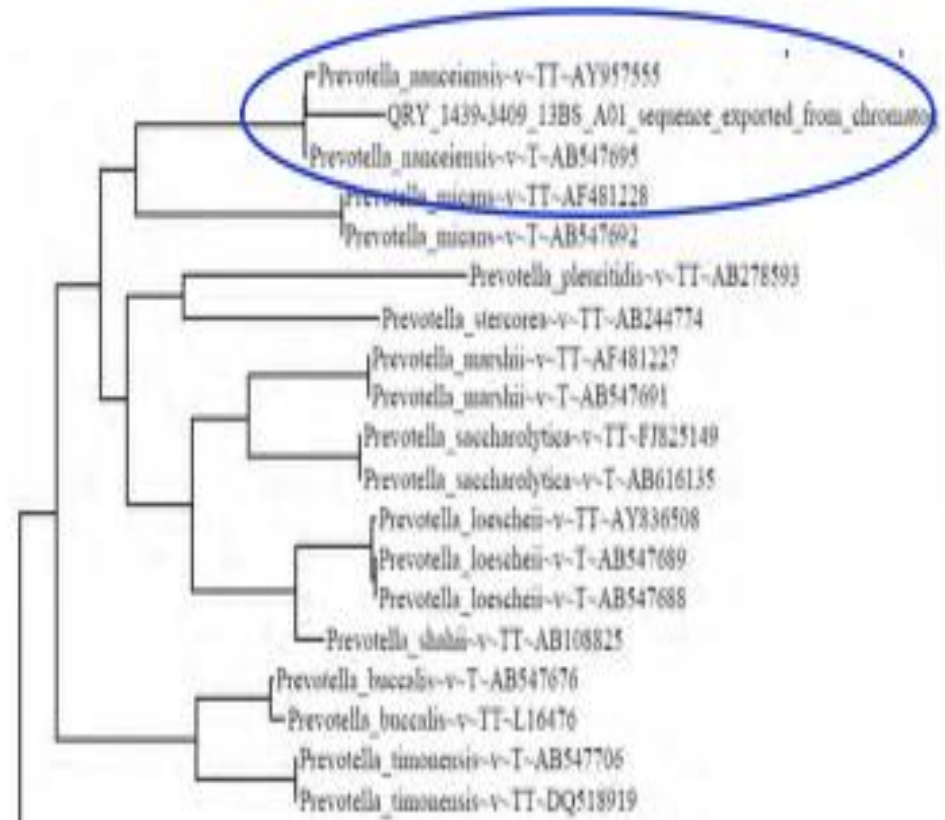
```
Score = 899 bits (428), Expect = 0.0
Identities = 438/443 (99%)
#strand = Plus / Minus

Query: 2   ggqattactagcgaatccagcttctggggctgggttgcagcccccagtcogaactgaga 61
          |||
Sujet: 1292 ggqattactagcgaatccagcttctggggctgggttgcagcccccagtcogaactgaga 1295

Query: 42   cgcacttcgaagettapattctacttgcgatgaaacaaacattctctgctgpcactgtaa 121
          |||
Sujet: 1292 cgcacttcgaagettapattctacttgcgatgaaacaaacattctctgctgpcactgtaa 1175

Query: 122  saqgtgtgtagccccgaagtaaggggcgtgtgtgatttgcagctcattccccccctcccca 181
          |||
Sujet: 1172 saqgtgtgtagccccgaagtaaggggcgtgtgtgatttgcagctcattccccccctcccca 1118

Query: 182  caacttacggtggagctatccccagctgccccagcttaccctgctggcaactcaapaaaag 241
          |||
Sujet: 1112 caacttacggtggagctatccccagctgccccagcttaccctgctggcaactcaapaaaag 1053
```



Identification du genre si > 97%  
Identification d'espèce si > 99%

➔ ***Prevotella spp***



# Rendu des résultats

## Contrôle négatif et positif de PCR 16S

- Détection de contaminants et inhibiteurs dans le mix

## Contrôle d'extraction

- Amplification parallèle du gène de la  $\beta$ -globine (eucaryote) :

Toujours positif

Si négatif

- Prélèvement acellulaire : LCR
- Présence d'inhibiteurs de PCR

## Interprétation de la séquence

- Confrontation des données cliniques et biologiques
- Distinguer un contaminant d'un pathogène
- Une PCR négative n'exclut pas un diagnostic

# PCR universelle

## Avantages

- Amplification de tous les ADN bactériens

## Inconvénients

- Pouvoir discriminant inter-espèces parfois limité (*Staphylococcus* et *Streptococcus*)
- Pouvoir discriminant inter-genres parfois limité (Mycobactéries, entérobactéries)
- Amplification des contaminants
- Biais des banques de données (Séquences surreprésentées, erronées, inconnues)

## Solution

PCR spécifiques

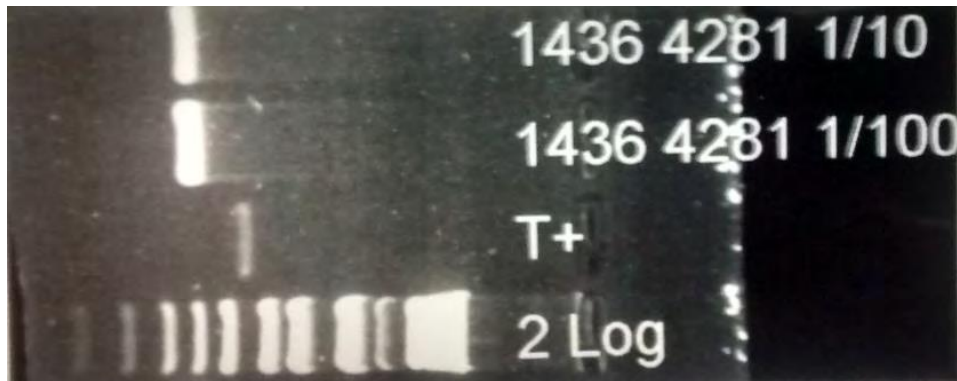
# PCR SPÉCIFIQUES

---

# PCR semi- spécifiques

PCR « semi-spécifiques » *Staphylococcus* & *Streptococcus*

- Gène *tuf*
- Gel migration



Patients : 400 pb

Témoin + : 600 pb

- **Séquençage** pour identification d'espèce (même principe que la PCR universelle)

# PCR spécifiques simplex versus multiplex

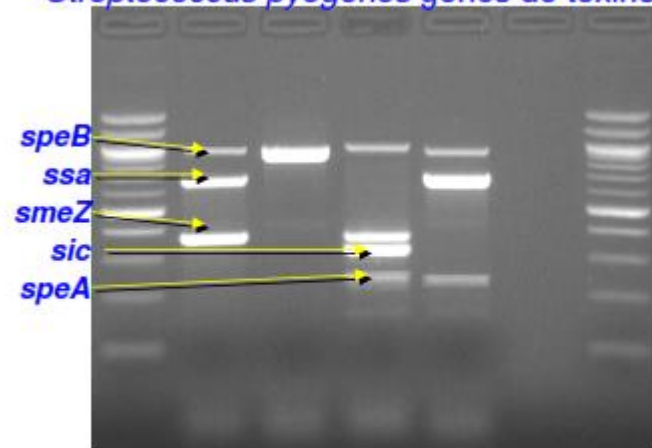
## PCR simplex

- Une seule cible
- Témoins interne le plus souvent intégrés
- Sensibilité > PCR 16S

## PCR multiplex

- 2-6 cibles ➡ 30-50 cibles
- Multiplexage ➡ baisse de la sensibilité par rapport aux PCR simplex

*Streptococcus pyogenes* gènes de toxines



# PCR spécifiques en temps réel

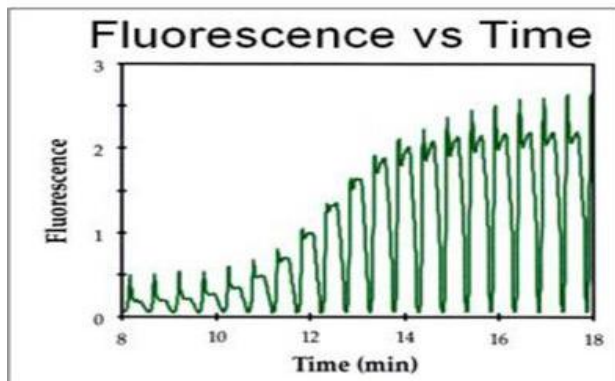
- Détection de l'amplification d'un produit basée sur la fluorescence durant une réaction de PCR
- Mesure de la quantité initial d'un acide nucléique en déterminant le nombre de cycle requis pour atteindre un niveau déterminé de produit
- Réduction du temps et des manipulation (moins de risque de contaminations)
- Chimies couramment utilisées : (SYBR Green I et Sondes TaqMan )

# PCR spécifiques en temps réel

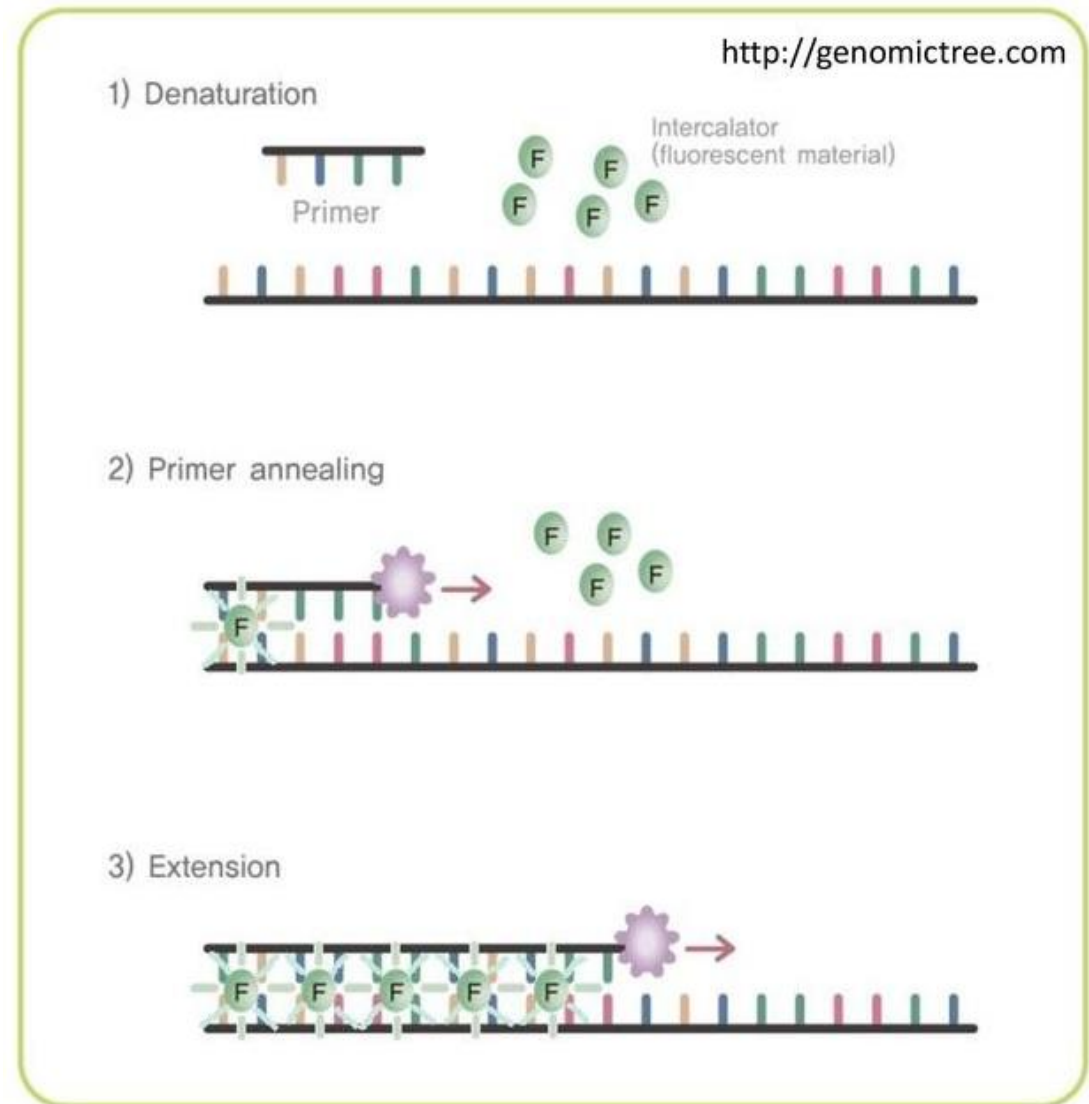
## SYBR Green I

- Agent Intercalant
- Fixation sur ADN double brin

Activation de la fluorescence



Economique et facile



# PCR spécifiques en temps réel

## Sondes TaqMan



- Les sondes TaqMan dont la taille représente environ 25-30 nucléotides portent deux molécules
  - un **fluorochrome** ou « reporter » en 5'
  - et un **extincteur** ou « quencher » en 3'
- Sur la sonde, le quencher et le reporter sont très proches. Le rôle du quencher est d'empêcher le reporter d'émettre de la fluorescence lorsque celui-ci est excité.



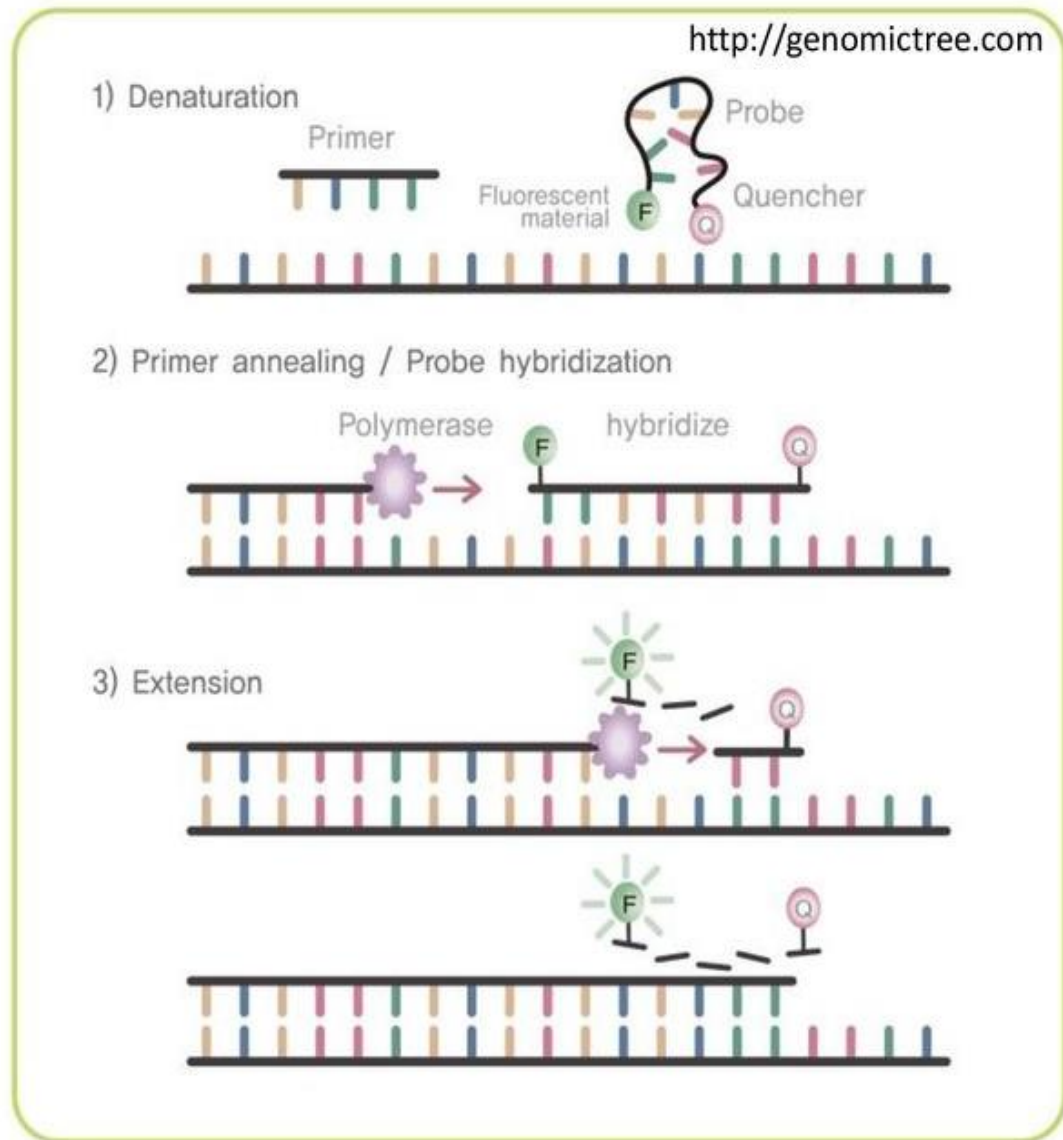
# PCR spécifiques en temps réel

## Sondes TaqMan

- Hybridation spécifique de la sonde TaqMan à l'amplicon
- Dégradation par l'activité 5'3' exonucléase de la polymérase
- Séparation reporter/quencher

Activation de la fluorescence

Coût plus élevé



# MARQUEURS ÉPIDÉMIOLOGIQUES

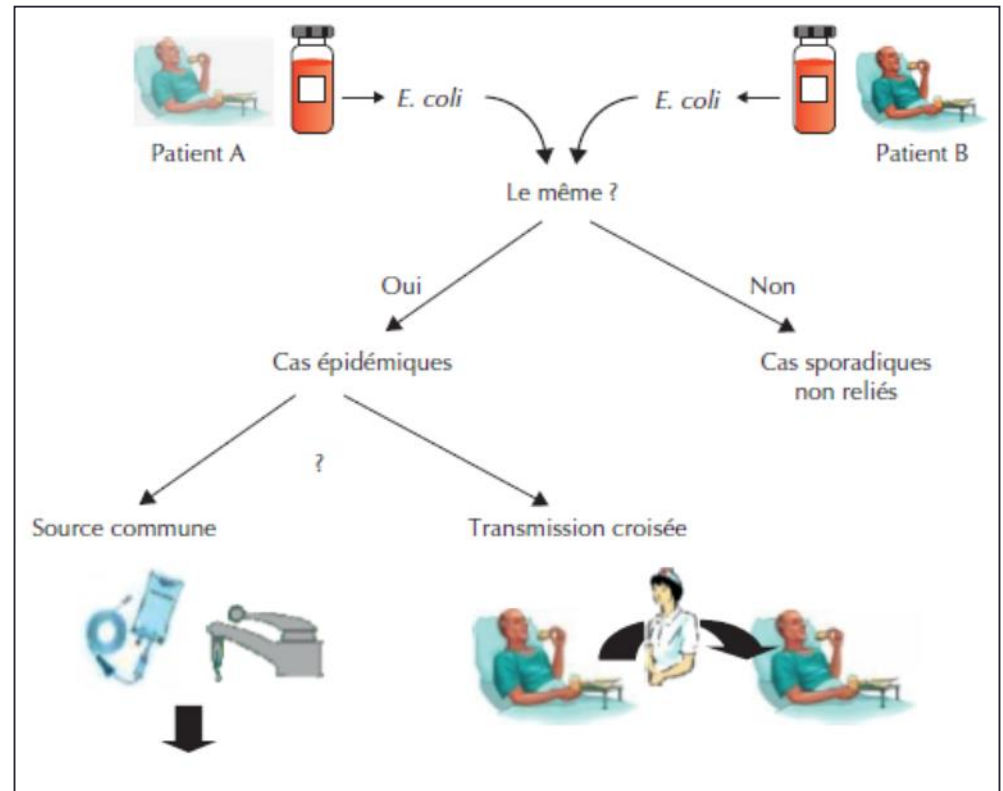
---

# Marqueurs épidémiologiques

Ce sont les caractères discriminants qui permettent de distinguer au sein d'une **espèce** bactérienne les souches d'origine distinctes ou **clones** bactérien.

**Espèce**: ensemble de souches ayant des homologies ADN-ADN se traduisant par des % d'hybridation supérieurs ou égaux à 70%

**Clone**: groupes d'isolats issus d'un ancêtre commun constituant les maillons d'une chaîne directe de réplication et de transmission d'hôte à hôte ou de l'environnement à l'hôte



# Marqueurs épidémiologiques

- **Epidémiologie**: c'est la science qui évalue l'apparition, les déterminants, la distribution et le contrôle de la santé et de la maladie dans une population humaine définie
- **Epidémie**: augmentation de l'incidence d'une pathologie infectieuse dans une zone géographique durant une période donnée
- **Pandémie**: apparition de la maladie au sein d'une large population se propageant d'un continent à l'autre et couvrant ainsi toute la planète.
- **Sporadique**: Lorsqu'une maladie se déclare occasionnellement à des intervalles irréguliers dans une population humaine
- **Endémique**: Lorsque la fréquence en est maintenue à un taux bas et régulier à intervalles moyennement réguliers

# Choix du marqueur épidémiologique

Il existe des **marqueurs phénotypiques** qui prennent en compte les caractères exprimés par les microorganismes (phénomènes post-traductionnels) et des **marqueurs génotypiques** qui analysent le génome



**Systeme de typage**

## Sur le plan diagnostic:

- De différencier entre récurrence et réinfection
- D'établir le foyer initial d'une infection disséminée

## Sur le plan épidémiologique:

- De définir le mode de diffusion (accumulation de cas indépendants ou diffusion épidémique)
- D'identifier les vecteurs de la diffusion clonale: personnel et/ou objet contaminé

## Sur le plan phylogénétique:

- De définir le niveau de similarité entre les clones (% de similitude)

# Caractéristiques d'un système de typage

## Critères de performance

- **Typabilité**: proportion de souches attribuées à un type par un système de typage. Elle doit tendre vers 100%
- **Reproductibilité**: capacité du système de typage à attribuer le même type à une souche testée lors d'essais indépendants. Elle doit tendre vers 95%.
- **Stabilité**: capacité d'un système de typage de reconnaître la relation clonale de souches dérivées in vitro ou in vivo d'une souche ancestrale commune,
- **Pouvoir discriminant ou spécificité**: probabilité qu'un système de typage attribue un type différent à deux souches non reliées, choisies au hasard, au sein d'un taxon donné (> 95%)

# Caractéristiques d'un système de typage

## Critères de praticabilité

- Rapidité
- Facilité d'emploi : coûts, équipements, simplicité de la technique, nombre d'échantillon exploitables
- Facilité d'interprétation
- Standardisation

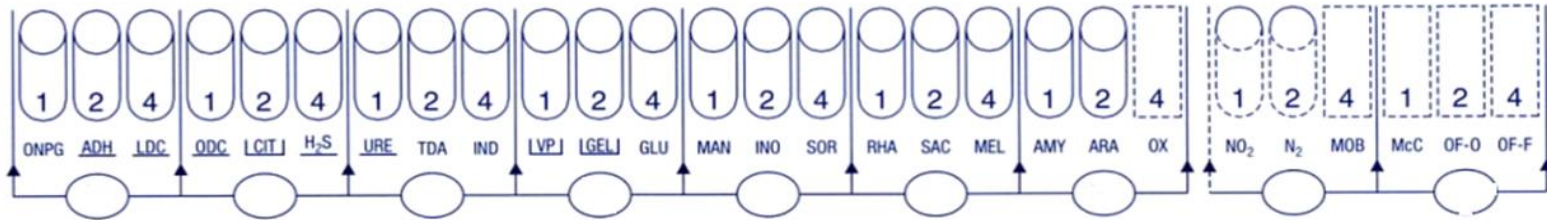
# MARQUEURS PHÉNOTYPIQUES

---



# Biotype

Dans la grande majorité des cas, c'est l'activité métabolique qui est détectée (utilisation des sucres, activités enzymatiques ....). Il est facile par exemple de coder les caractères de la galerie API, les codes pouvant ensuite être comparés.



|                    |        |
|--------------------|--------|
| Code de la souche: | Ident. |
|--------------------|--------|

se référer au catalogue API  
pour identifier la souche  
d'après le code

# Antibiotype

Le principal avantage de l'antibiogramme est que celui-ci est réalisé quotidiennement au laboratoire sur la plupart des souches isolées de malades. Son inconvénient majeur est que diverses souches hospitalières qui ont subi la pression de sélection peuvent développer des profils de résistance très similaires. Cependant, l'émergence d'un nouveau phénotype multi-résistant constitue fréquemment un signal d'alerte suggérant la dissémination épidémique d'un clone.

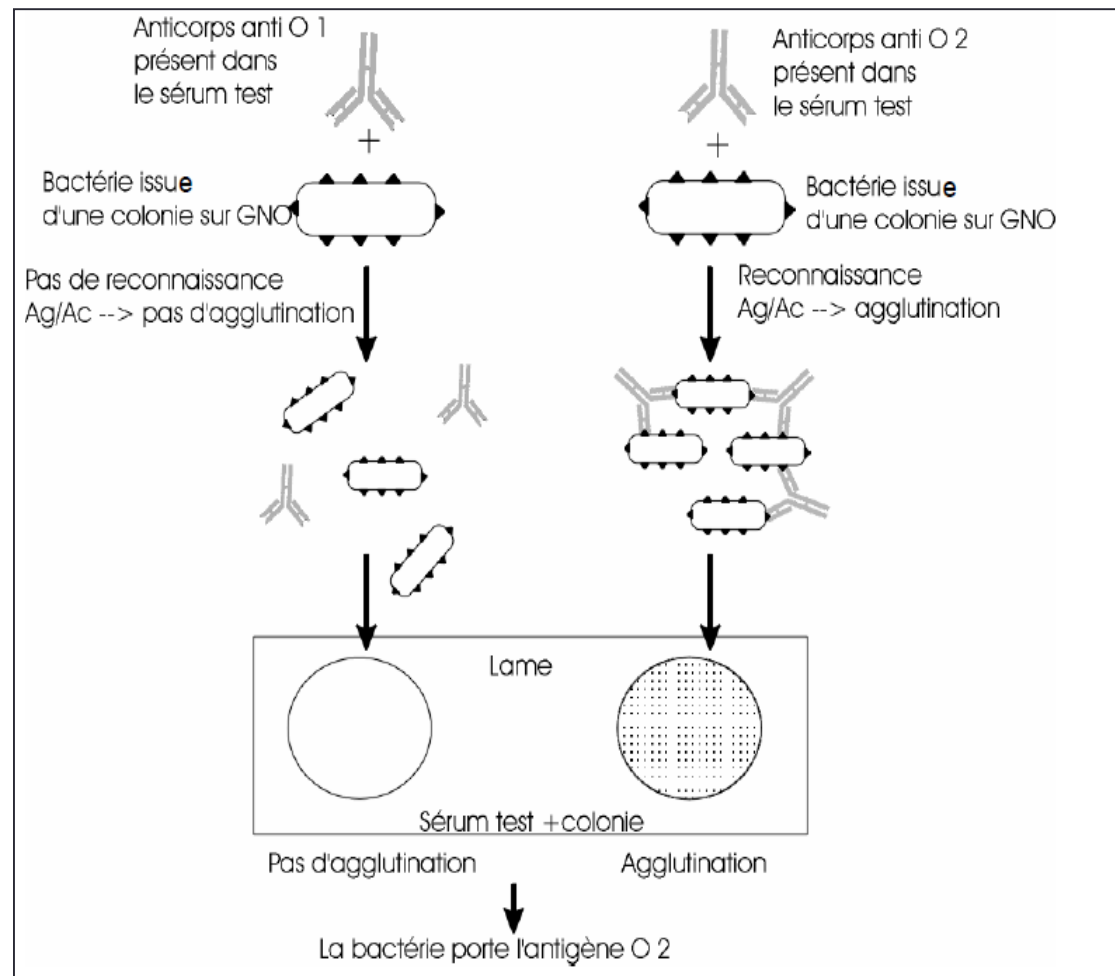
| Antibiotype profile               | Pathological samples<br>n = 28 | Nasal carriage<br>n = 36 | Total<br>n = 64 (%) |
|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|---------------------|
| P-K-T-G-E*-Pef-Te-Mno-Rif-Tsx-FuA | 14                             | 16                       | 30 (46.9)           |
| P-K-T-G-L**-Pef-Te-Mno-Rif        | 8                              | 13                       | 21 (32.8)           |
| P-E*-Pef-Te-Mno-Rif-Tsx-FuA       | 1                              | 3                        | 4 (6.3)             |
| P-K-T-G-E*-Pef-Te-Rif-Tsx-FuA     | 2                              | 1                        | 3 (4.7)             |
| P-K-T-G-E*-Pef-Te-Mno-Tsx-FuA     | 1                              | 1                        | 2 (3.1)             |
| P-K-T-G-L**-Pef-Te-Rif            | 1                              | 1                        | 2 (3.1)             |
| K-T-G-Te-Mno-Tsx                  | 1                              | 1                        | 2 (3.1)             |

P, penicillin G; K, kanamycin; T, tobramycin; G, gentamycin; L, lincomycin; E, erythromycin; Pef, pefloxacin; Te, tetracycline; Mno, minocycline; Rif, rifampin; Tsx, trimethoprim sulfamethoxazol (cotrimoxazole); FuA, fusidic acid; MRSA, methicilin-resistant *S. aureus*. \* inducible macrolides-lincosamides-streptogamines B (MLSB) phenotype, \*\* L phenotype.

# Sérotype

Différencier les souches en fonction de leur composition antigénique (sérotype ou sérovar)

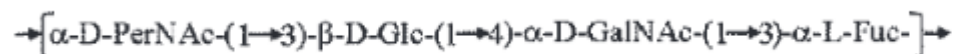
La recherche est basée sur la mise en évidence d'une réaction spécifique entre un anticorps présent dans un sérum test et un antigène porté par le microorganisme étudié. Cette réaction est visualisée par une agglutination qui est le résultat macroscopique de la réaction antigène-anticorps.



Serotypage  
d'*E. coli*



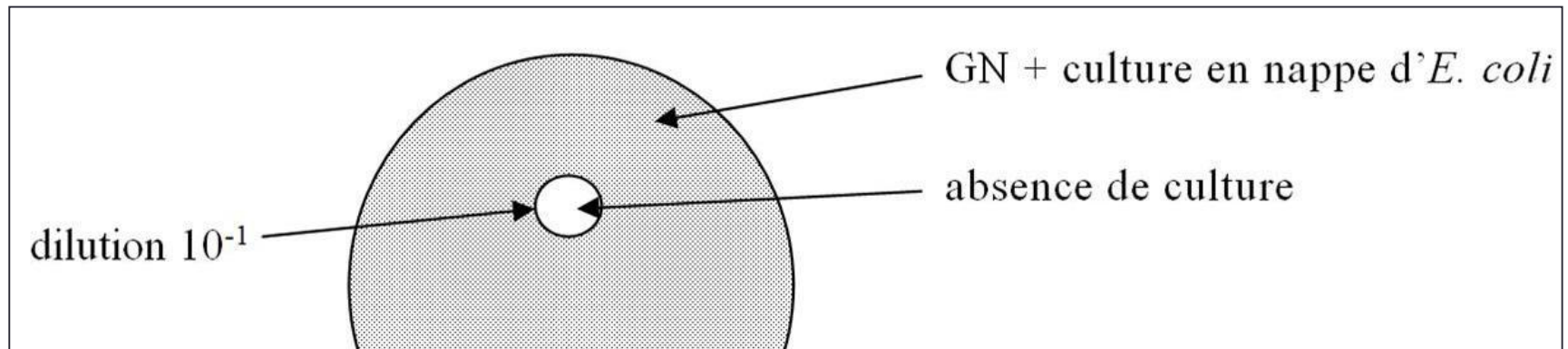
*E. coli* O8 (homo-polymère)



*E. coli* O157 (hétéro-polymère)

# Lysotype

Les souches sont testées pour leur capacité ou leur résistance à être lysées par un panel de phages. C'est une méthode généralement lourde, pour laquelle la principale difficulté est le maintien des stocks de phages biologiquement actifs et de souches témoins.



recherche de la sensibilité à des phages lytiques, qui nécessite de disposer de 15 à 24 phages lytiques



# Typage par les bactériocines

Utilise des bactériocines : protéines codées par des plasmides, produites par des bactéries, létales pour d'autres bactéries de même espèce. Portent des noms variables selon l'espèce qui les produit (ex : colicine pour *E. coli*, pyocine pour *P. aeruginosa*).

Elle consiste :

- soit à étudier la sensibilité d'une bactérie à différentes bactériocines connues,
- soit à rechercher la production de bactériocines sur des bactéries tests.

# Marqueurs phénotypiques

## Marqueurs phénotypiques peu à peu abandonnées

- Pouvoir discriminant et reproductibilité médiocre
- Faible stabilité: subissent une variation adaptative due à la sélection naturelle
- Faible typabilité: existe un grand nombre de souches non typables (dites phénotypiquement nulles)
- Variations observées qualitatives et ne permettant pas d'évaluer le degré de parenté entre souches



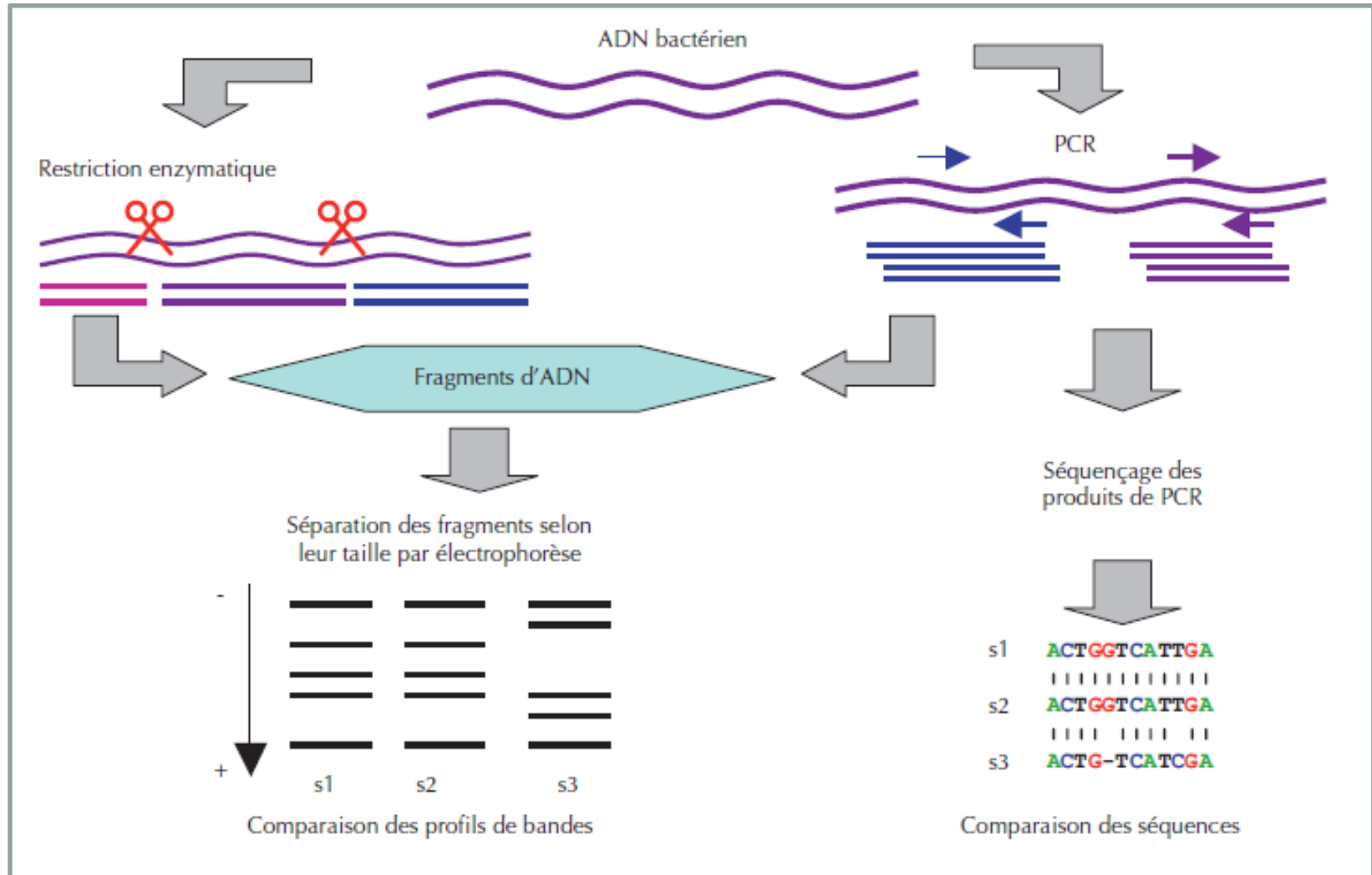
Avènement des marqueurs génotypiques plus discriminants,  
plus reproductibles

# MARQUEURS GÉNOTYPIQUES

---

# Marqueurs Génotypiques

Typage moléculaire

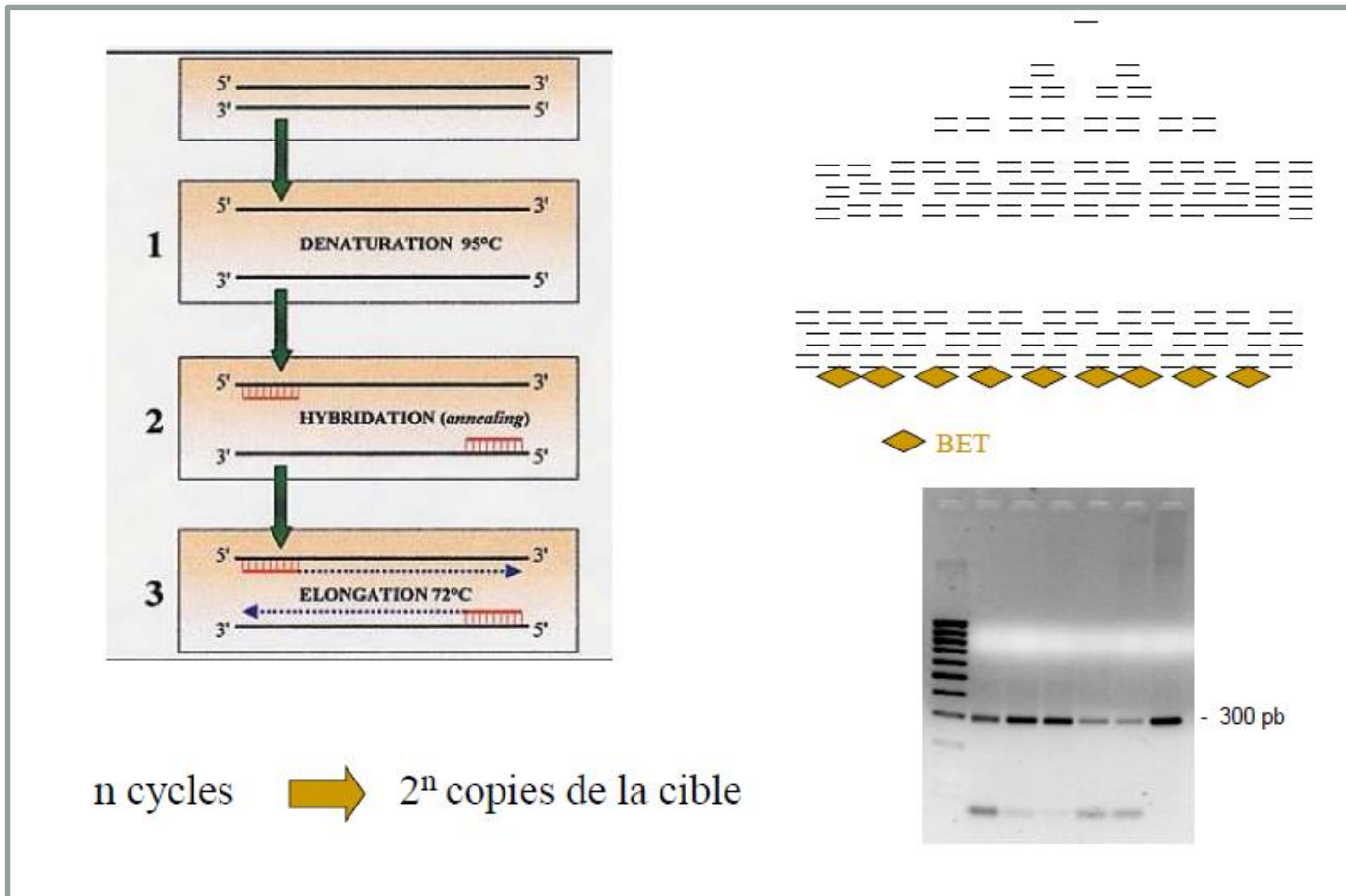


Principe général des méthodes de génotypage bactérien



# 1. Techniques d'amplification génique

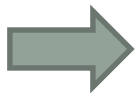
Comparaison des profils d'ADN obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose après réaction de PCR pour différentes souches



# RAPD

## Random Amplified Polymorphic DNA

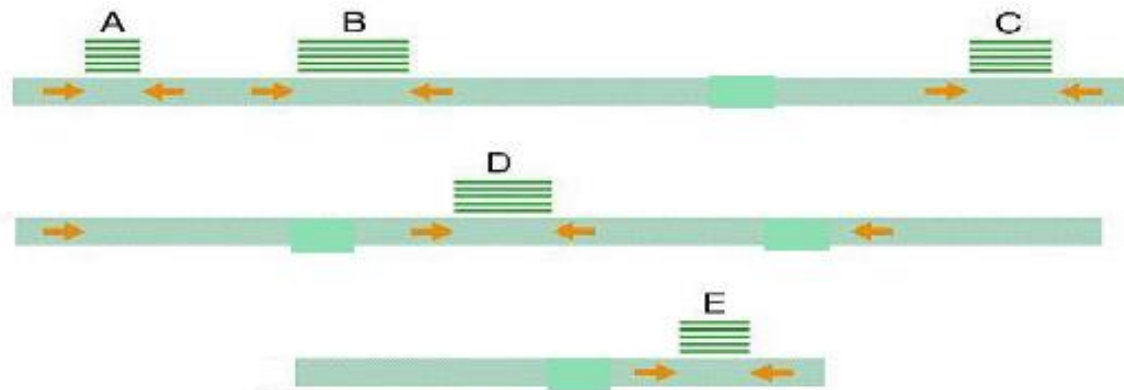
- 1 amorce unique de séquence courte: ~10 pb choisie arbitrairement
- PCR: hybridation sur tout le génome à différents sites en condition de faible stringence (~35°C)
- Séparation électrophorétique des fragments amplifiés
- Comparaison des profils



Important polymorphisme de taille et de nombre de fragments

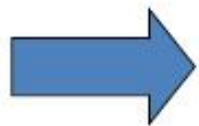
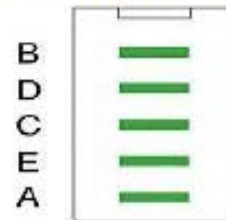
# RAPD

Typage moléculaire basé sur l'amplification aléatoire

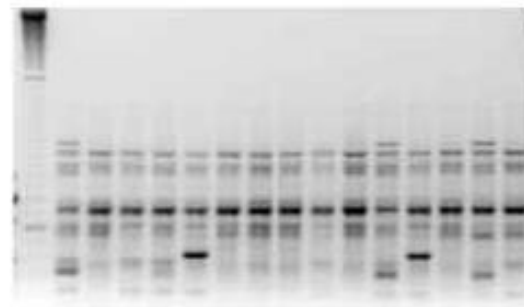


→ amorce  
≡≡≡ fragments amplifiés

Électrophorèse des produits de PCR



**Comparaison des profils obtenus sur gel d'agarose**



# RAPD

## Avantages

- Technique **simple** et **rapide** (3-4 heures)
- **Pouvoir de discrimination bon** dans des conditions strictes d'utilisation
- Méthode **flexible** (possible pour plusieurs espèces bactériennes)

## Inconvénients

- **Difficulté de lecture** et d'interprétation (bandes d'intensité faible ou inconstantes)
- **Manque de standardisation** de la technique (pas de critères d'interprétation véritablement définis)
- **Mauvaise reproductibilité inter-série et inter-laboratoire** (amorçage au hasard)

## REP-PCR

Repetitive Extragenic Palindromic elements - PCR

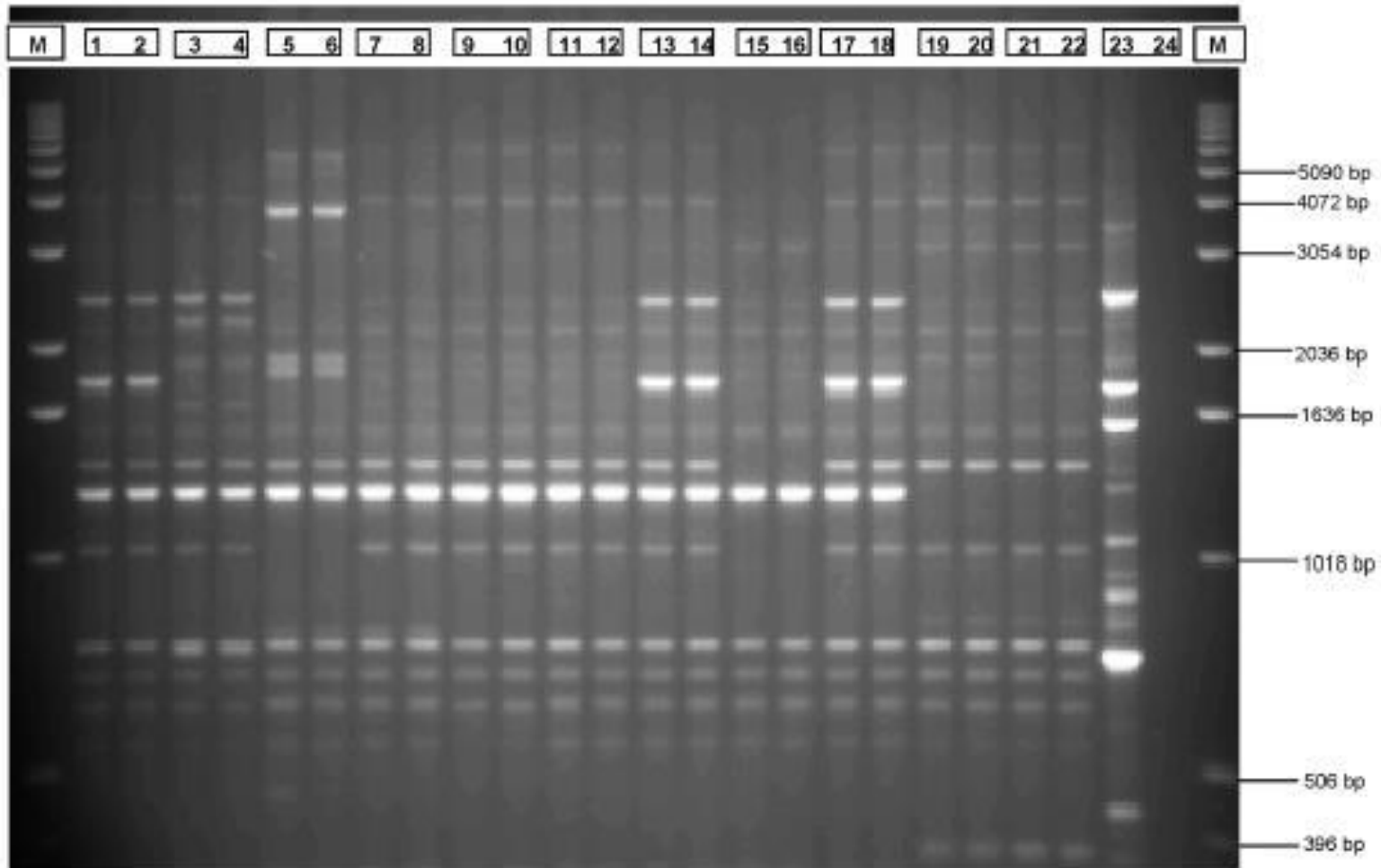
## ERIC-PCR

Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences - PCR

- Hybridation d'amorces ciblées sur des séquences courtes, répétées, conservées et dispersées sur le génome, non codantes, transcrites
- Hybridation des amorces à forte stringence
- Séparation électrophorétique des fragments amplifiés
- Comparaison des profils obtenus

# Rep-PCR *Clostridium*

Reproductibilité de la méthode



Typage moléculaire des souches de *Clostridium perfringens* par Rep-PCR

# REP-PCR / ERIC-PCR

## Avantages

- Technique **simple** et **rapide** (3-4 heures)
- **Pouvoir de discrimination bon**
- Lecture des profils **plus facile** (/RAPD)
- **Meilleure reproductibilité** inter-série (/RAPD)

## Inconvénients

- Méthode applicable uniquement à certaines bactéries
- **Manque de standardisation** de la technique (pas de critères d'interprétation véritablement définis)
- **Mauvaise reproductibilité inter-laboratoire** (mais meilleure que pour RAPD)

# MLST

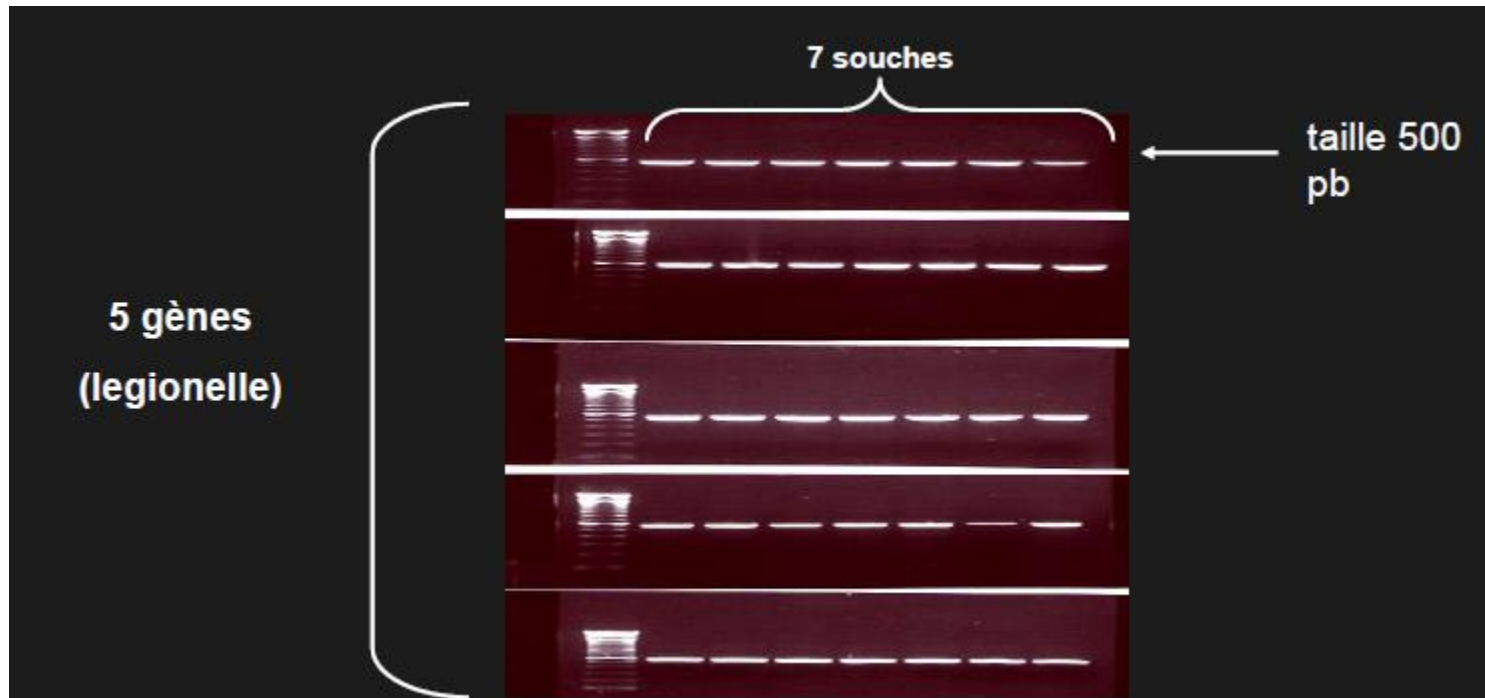
## Multiple locus sequence analysis

- Nouvelle approche moléculaire dérivée de l'électrophorèse des isoenzymes MLEE (multilocus enzyme electrophoresis)
- Basée sur le séquençage de gènes de ménage: house keeping genes (gènes important pour le métabolisme de la bactérie)
- Utilisation de gènes stable dans le temps (taux de mutation faible)



# MLST

- Amplification de 5 à 7 gènes d'environ 500pb chacun (gènes non liés)
- Contrôle des amplifiats sur gel d'agarose



- Purification des produits de PCR

# MLST

## Séquençage



## Interprétation des séquences

- Identification de l'allèle correspondant à la séquence grâce à une base de données disponible sur le site [www. MLST.net](http://www.MLST.net) (Obtention d'un numéro de séquence)
- Identification du profil allélique (ou séquence type ST) à partir des différents numéros de séquence (banque de données)

# MLST

## Avantages

- Bonne reproductibilité intra et inter-laboratoire
- Données précises (séquençage de gènes)
- Performance avec de nombreux pathogènes
- Absence de problème de lecture et d'interprétation (le séquençage remplace la photo du gel)

- Méthode excellente pour des études macro-épidémiologiques (nationales, intra et intercontinentale)
- Intérêt particulier pour le suivi des bactéries multirésistantes

## Inconvénients

- Coût +++
- Longue

## 2. Techniques de restriction enzymatique

### 2. 1. Techniques de **microrestriction** enzymatique:

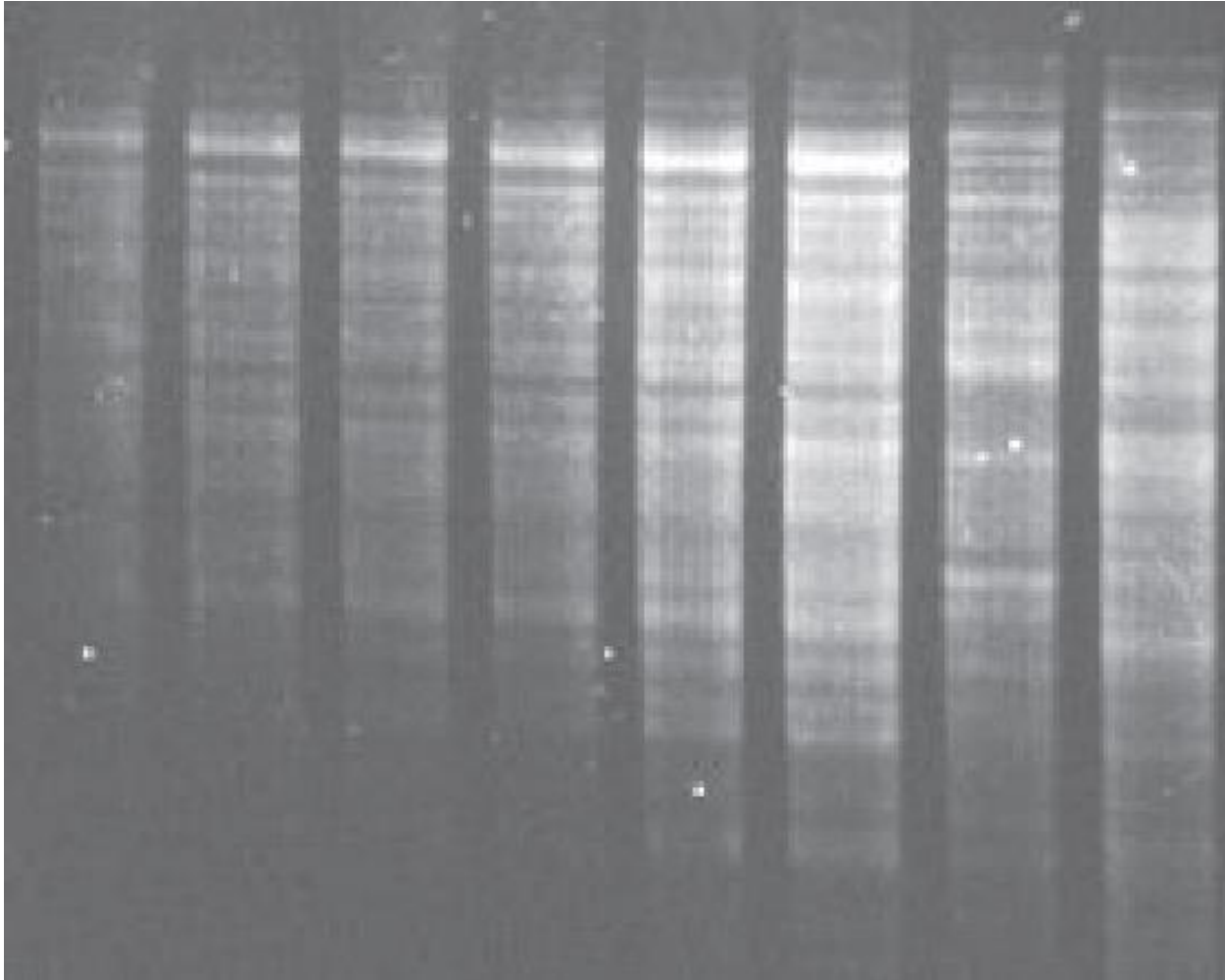
#### **RFLP: Polymorphisme de longueur de fragments de Restriction**

- Utilisation d'enzymes de restriction à haute fréquence de site de coupure
- Génération d'un grand nombre de fragments d'ADN



Difficulté de comparaison des profils du fait d'un nombre de bandes trop important (>1 000)

# RFLP



Typage moléculaire des souches de *Pseudomonas aeruginosa* par RFLP

# RIBOTYPAGE:

## Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

- Etude basée sur le polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN codant pour les ARNr
- ADN codant pour les ARNr (opérons)
  - ❑ structure stable, conservée dans le temps
  - ❑ nombre variable d'opérons selon les bactéries (1 à 11)
  - ❑ hybridation avec sonde « universelle » : ARN16s et 23s d'*E.coli*
- Profil obtenu caractéristique d'une espèce (taxonomie) ou variations intra-espèces (épidémiologie)

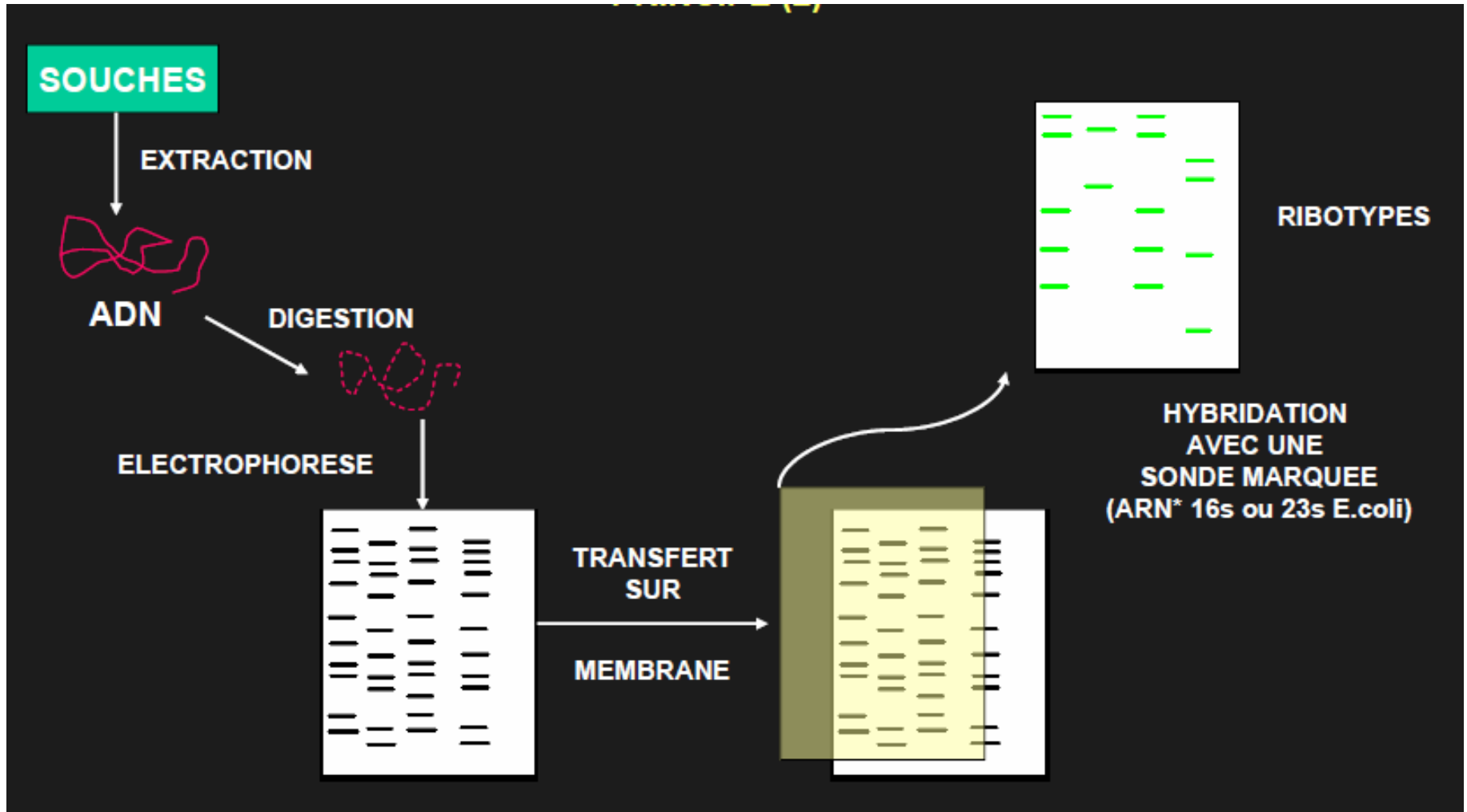
# RIBOTYPAGE:

## Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN

- Isolement des bactéries, culture
- Digestion par endonucléase(s) de restriction possédant de fréquents sites de coupure
- Migration électrophorétique ➡ nombreuses bandes (0,5 à 50 kb)
- Transfert du gel sur filtre (nitrocellulose ou nylon) = principe du Southern
- Hybridation de l'ADN par sondes nucléiques: ARN16s/23s *E.coli*

# RIBOTYPAGE:

Analyse RFLP par Southern-blot de l'ADN





# RIBOTYPAGE

## Avantages

- Technique automatisable (Riboprinter®, Qualicon®) donc plus rapide (32 ribotypes/j)
- Technique reproductible et standardisée (résultats comparables entre laboratoires)
- Marqueur taxonomique et épidémiologique

## Inconvénients

- Procédure complexe et longue si manuelle
- Pouvoir discriminant plus faible que PFGE
- Problème de standardisation notamment au niveau technique

# AFLP: Polymorphisme de longueur de fragments Amplifiés

- Méthode combinant : profil de restriction et PCR
- **Restriction** de l'ADN génomique par une ER à fréquence de coupure élevée et une ER à fréquence de coupure faible
- Ligation d'adaptateurs (oligonucléotides doubles brins) aux extrémités des fragments de restriction
- **PCR** avec sélections d'amorces complémentaires des adaptateurs
- **Séparation** sur gel d'agarose

# AFLP

## Avantages

- Bonne reproductibilité (due à l'utilisation de sites de restriction)
- Bonne discrimination (proche du champ pulsé)
- Très flexible : utilisé pour le groupe [*Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*]
- Facile, rapide (1 à 2 jours), ne nécessitant pas de matériel particulier (contrairement au champ pulsé)

## Inconvénients

- Cher
- Pas de standardisation concernant l'interprétation des profils (contrairement à la technique PFGE)

## 2. Techniques de restriction enzymatique

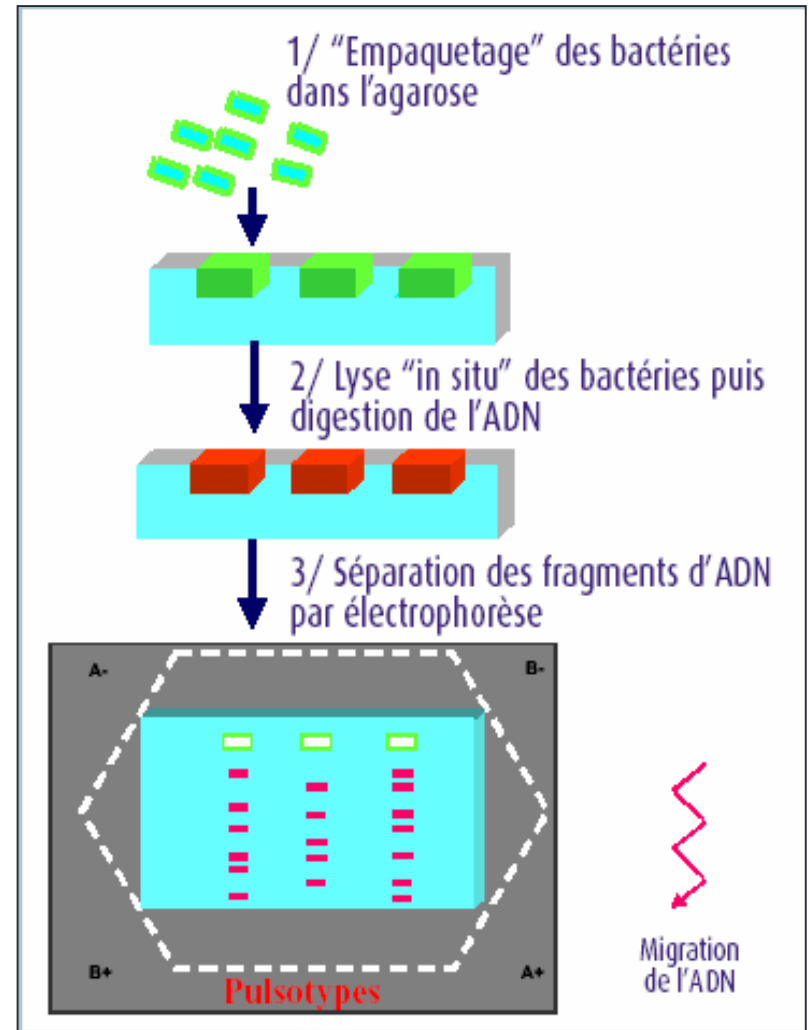
### 2. 2. Technique de **macrorestriction** enzymatique:

#### **ECP (PFGE) : Électrophorèse en champ pulse**

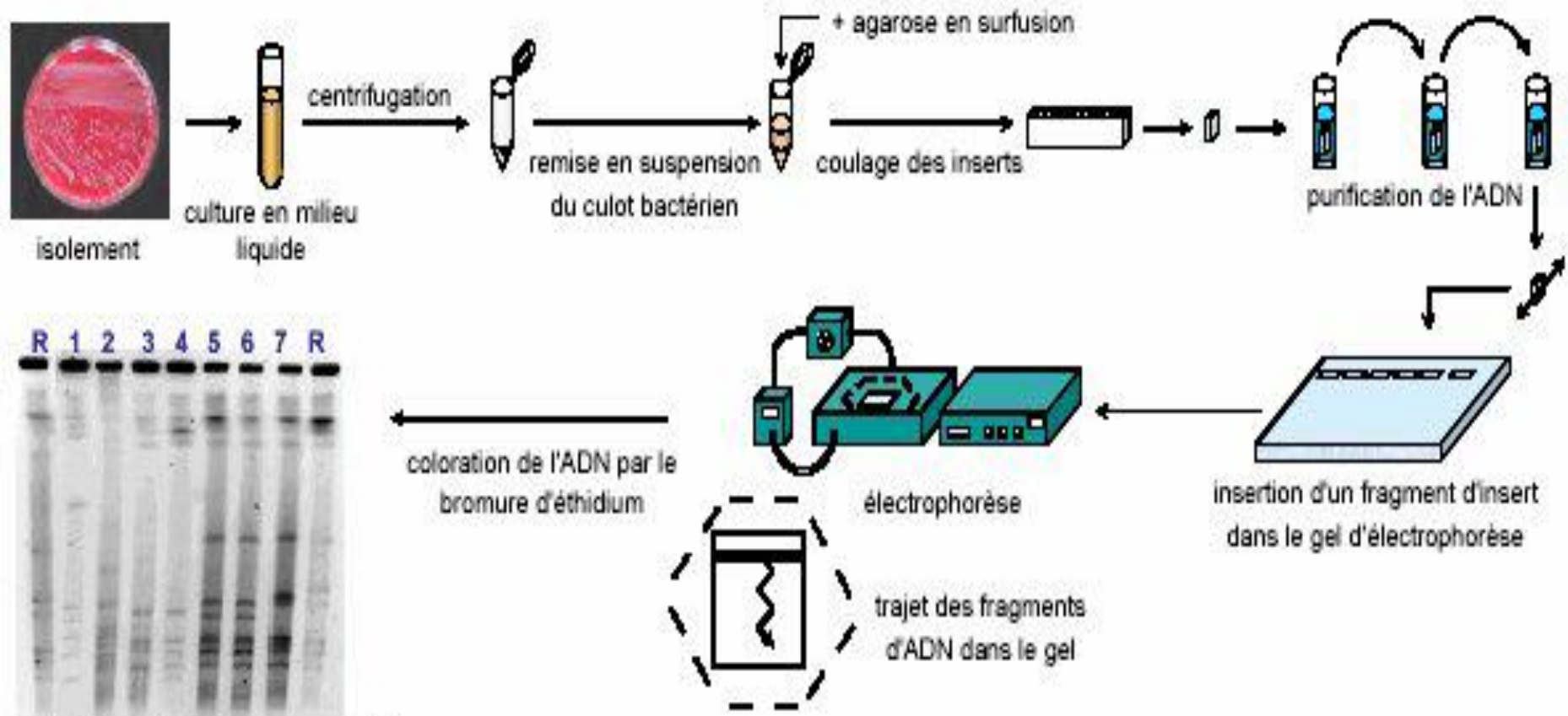
- caractérisation moléculaire qui compare le **matériel génétique** d'une même espèce
- Grande résolution
- Pouvoir discriminant supérieur à celui des autres marqueurs
- Applicable à de nombreuses espèces bactériennes
- Très bonne reproductibilité

# Électrophorèse en champ pulse (ECP) ou (PFGE)

- Isolement des souches, cultures
- Intégration des bactéries dans des blocs d'agarose « **plug** »
- Lyse et déprotéinisation **in situ** des bactéries
- Digestion par endonucléase de restriction avec un faible nombre de site de coupure = **Macrorestriction**
- Séparation des fragments d'ADN (10 à 800 kb) par électrophorèse en champ pulsé  
profils de restriction = **Pulsotypes**
- Analyse des pulsotypes par logiciel  
**Dendrogrammes**



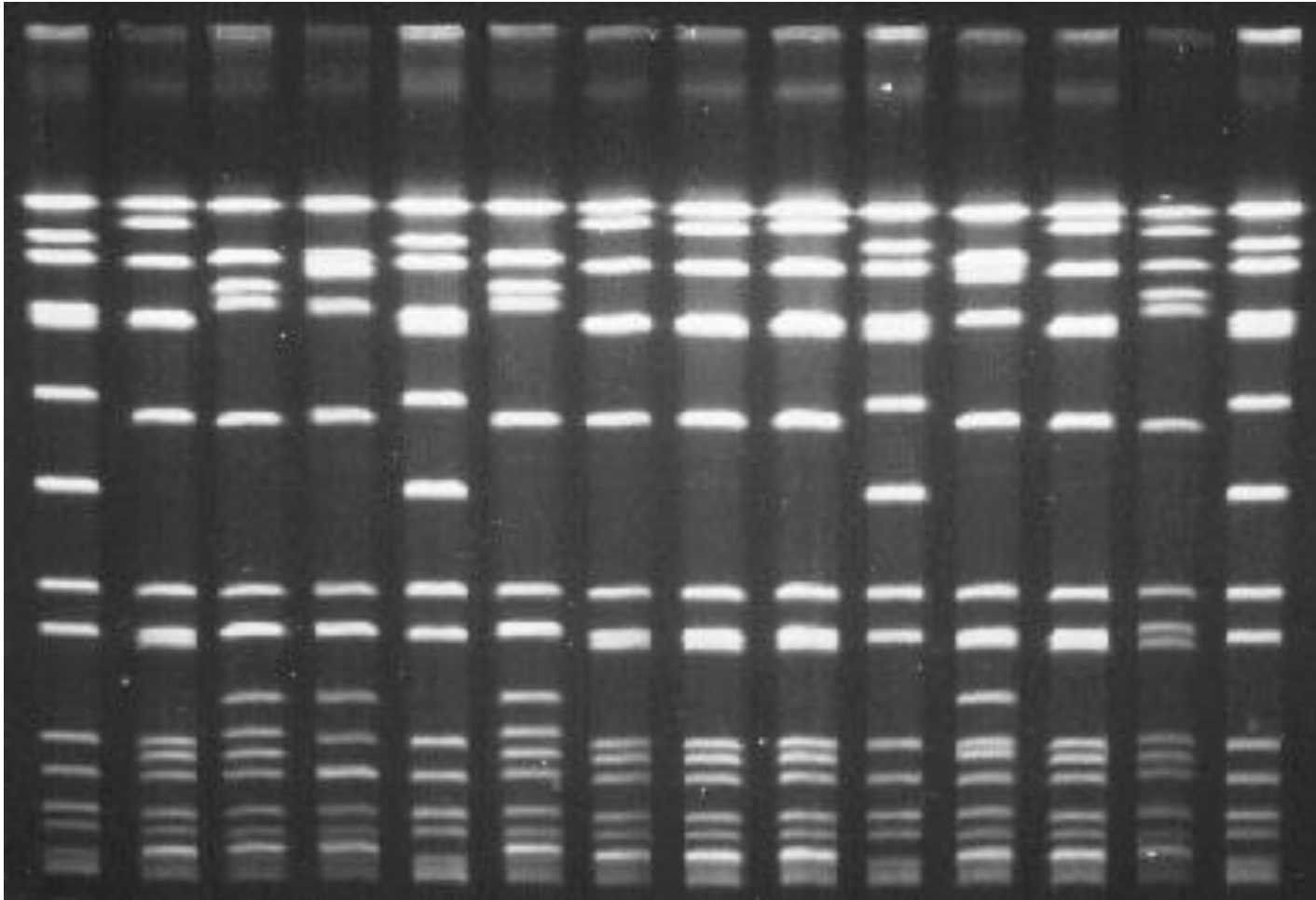
# Electrophorese en champ pulse (ECP) ou (PFGE)



visualisation des pulsotypes sous UV  
R = souche de référence

**Principe de l'électrophorèse en champ pulsé**

# Électrophorèse en champ pulse (ECP) ou (PFGE)



Typage moléculaire des souches de *Staphylococcus aureus* par PFGE

# Électrophorèse en champ pulse (ECP) ou (PFGE)

Critères d'interprétation des variations du profil de macrorestriction

| Nombre de modifications génétiques entre deux espèces | Nombre de fragments de différence | Interprétation épidémiologiques |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|
| 0   | 0                                 | Souches clonales semblables     |
| 1   | 2-3                               | Souches clonales très proches   |
| 2   | 4-6                               | Souches non clonales proches    |
| 3   | ≥7                                | Souches différentes             |

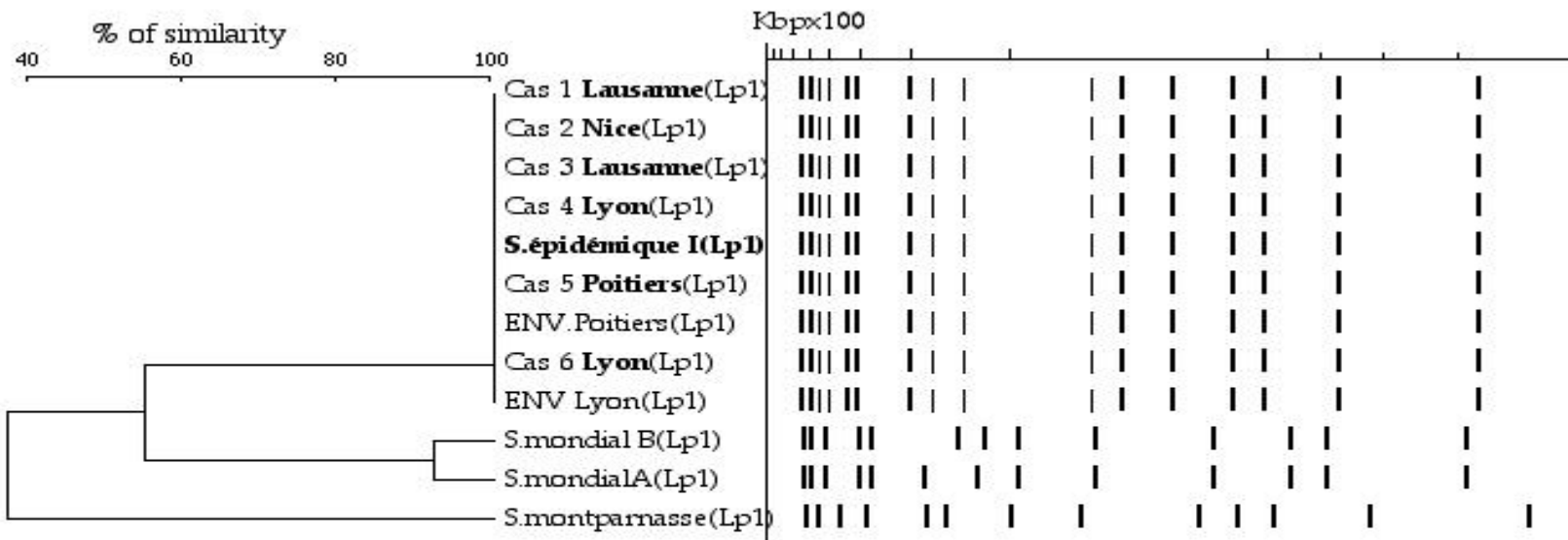


# Électrophorèse en champ pulse (ECP) ou (PFGE)

## Comparaison des profils

logiciel GelCompar® Calcul de la similitude entre 2 profils

Construction du dendrogramme Algorithme de regroupement hiérarchique



Video-captured data (double set), gelFH1

**Dendrogramme et représentation schématique des pulsotypes de 6 souches cliniques, de 2 souches environnementales et des 4 souches épidémiques de *Legionella pneumophila* isolées à PARIS**

# Électrophorèse en champ pulse (ECP) ou (PFGE)

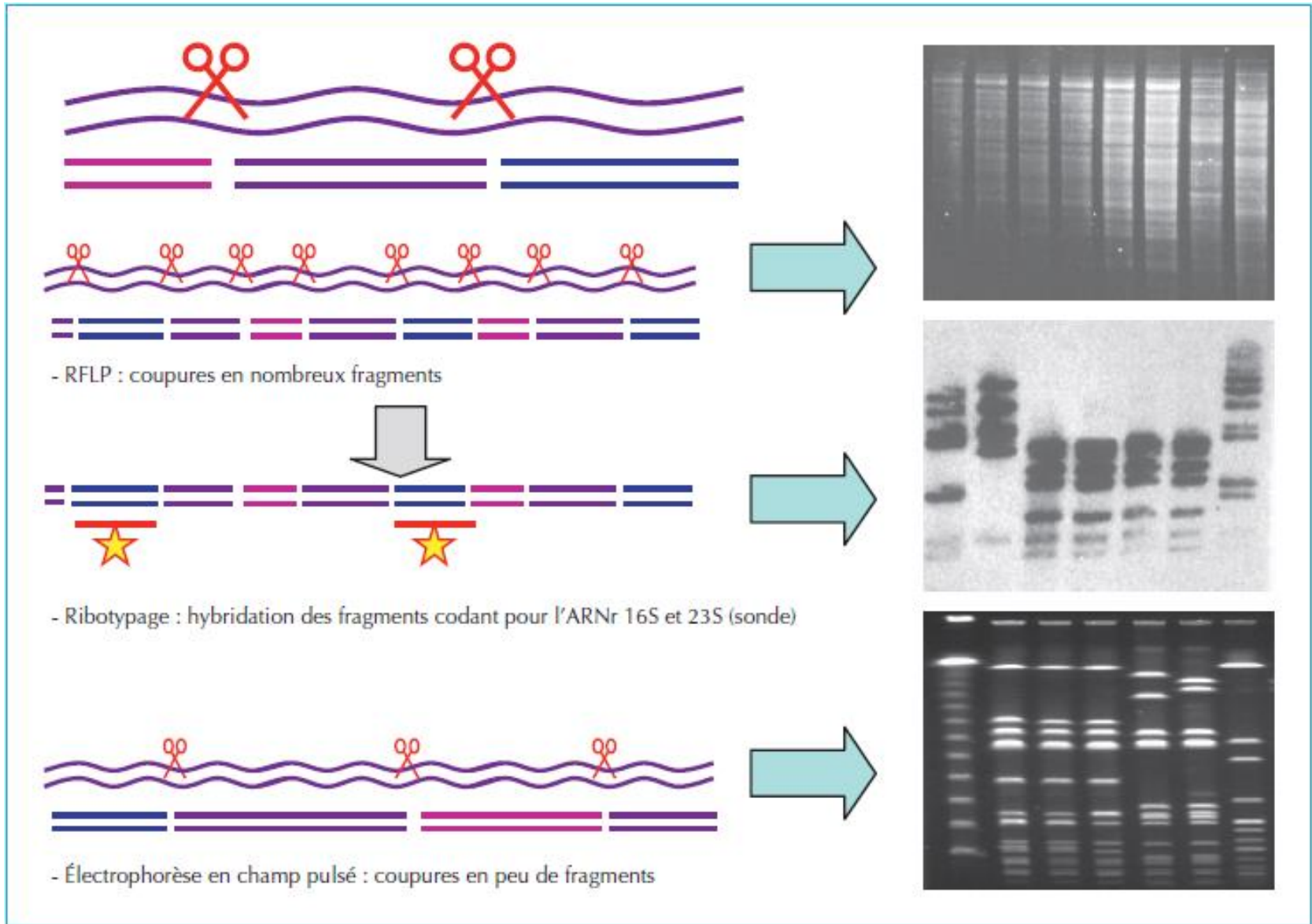
## Avantages

- Pouvoir discriminant important
- Grande résolution, bonne reproductibilité intra-laboratoire
- Applicable à un grand nombre d'espèces

## Inconvénients

- Technique longue : 4 à 5 jours en moyenne
- Technique coûteuse: appareillage, logiciel, réactifs et temps
- Technique délicate, manuelle, nécessitant du personnel qualifié

# Techniques basées sur la restriction enzymatique de l'ADN



# MALDI-TOF MS

---

# MALDI-TOF MS

## Applications du MALDI-TOF MS au laboratoire de Microbiologie

### Diagnostic

Détection agent pathogène

Identification directe sur flacon d'hémocultures et sur les urines

### Etudes épidémiologiques

Typage (détection d'une épidémie, surveillance d'une épidémie, Identification de clones)

# MALDI-TOF MS

Méthode d'ionisation permettant la séparation et l'identification d'ions moléculaires de poids moléculaires élevés (protéines, peptides, ADN, polymères synthétiques...)

## MALDI

*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*

➡ Désorption / Ionisation laser assistée par matrice

## TOF

Time of flight ➡ Temps de vol

## MS

Mass Spectrometry ➡ Spectrométrie de Masse

# MALDI-TOF MS

## Méthodologie

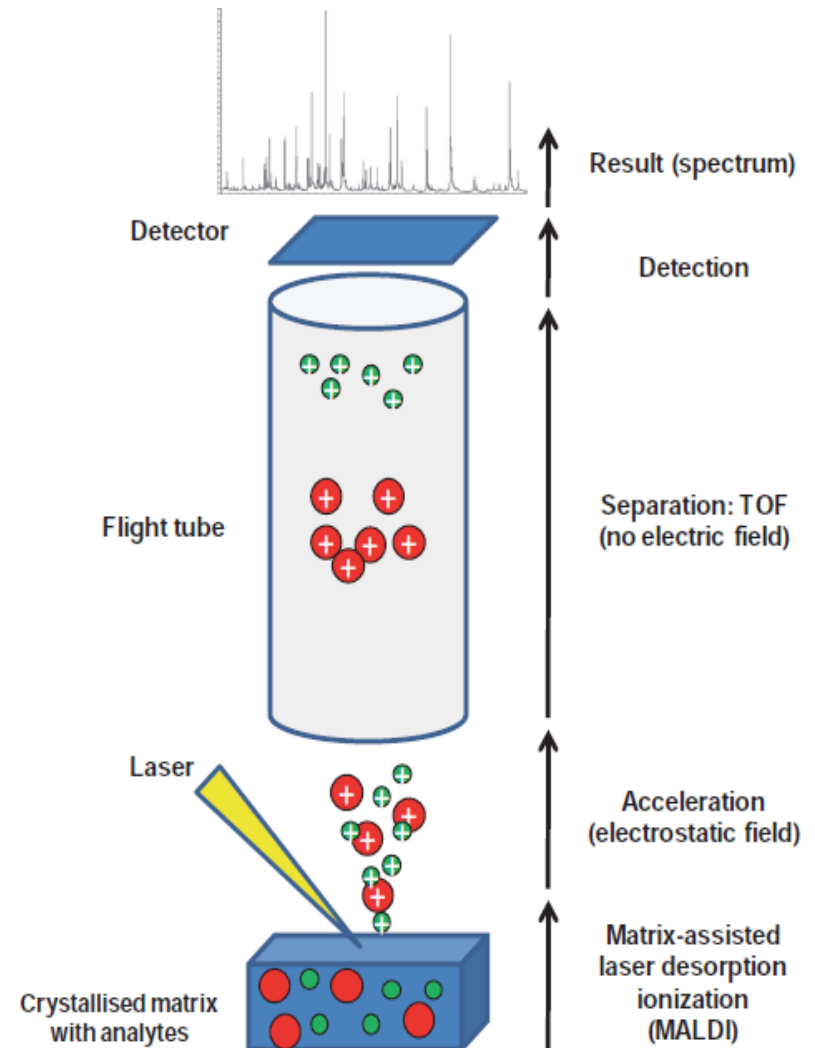
Eclatement agent pathogène par rayons laser puissants

Ionisation molécules produites avec matrice

Accélération ions produits/ champs électrique puissant

Vitesse déplacement (TOF) fonction masse molécule

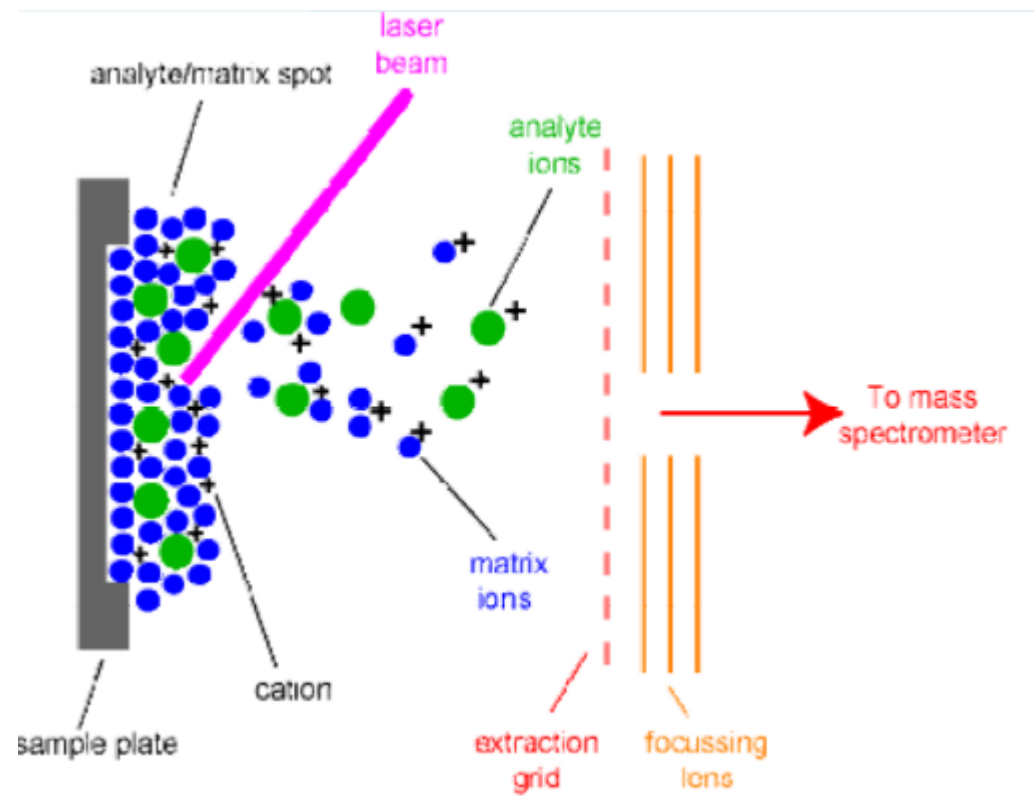
Formation spectre dont chaque pic  
→ masse ion donné



# MALDI-TOF MS

## Etape 1

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

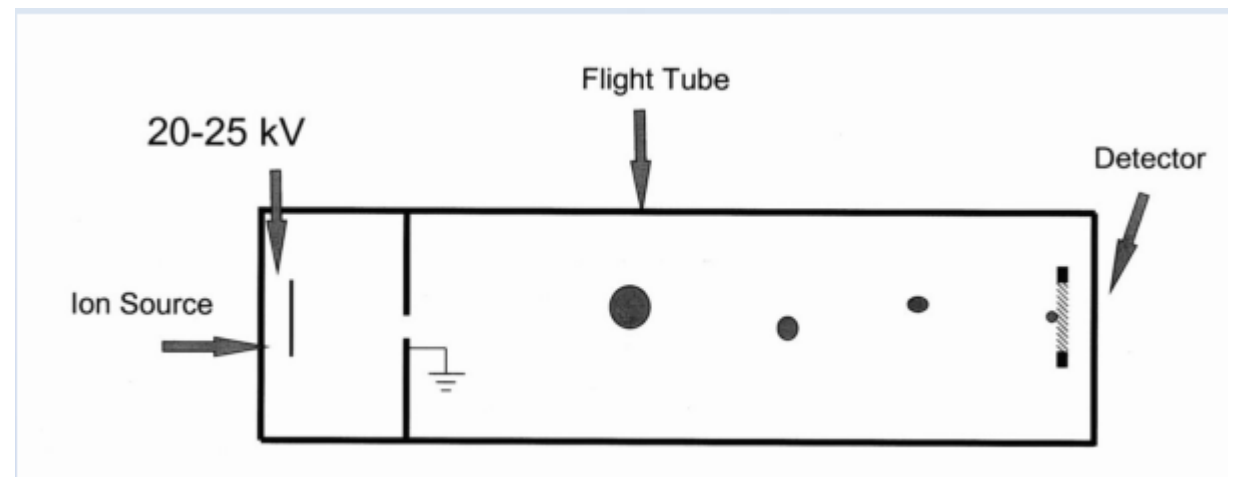
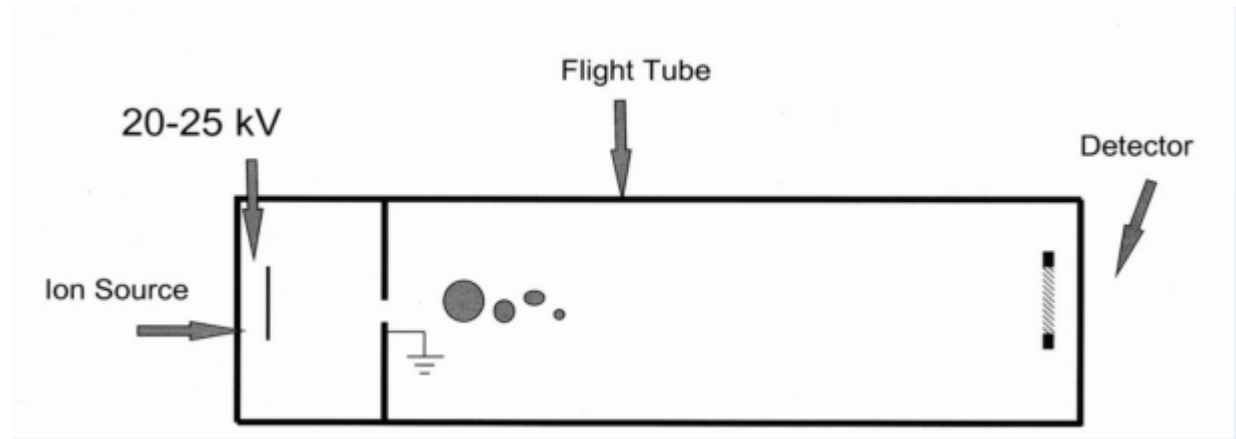




# MALDI-TOF MS

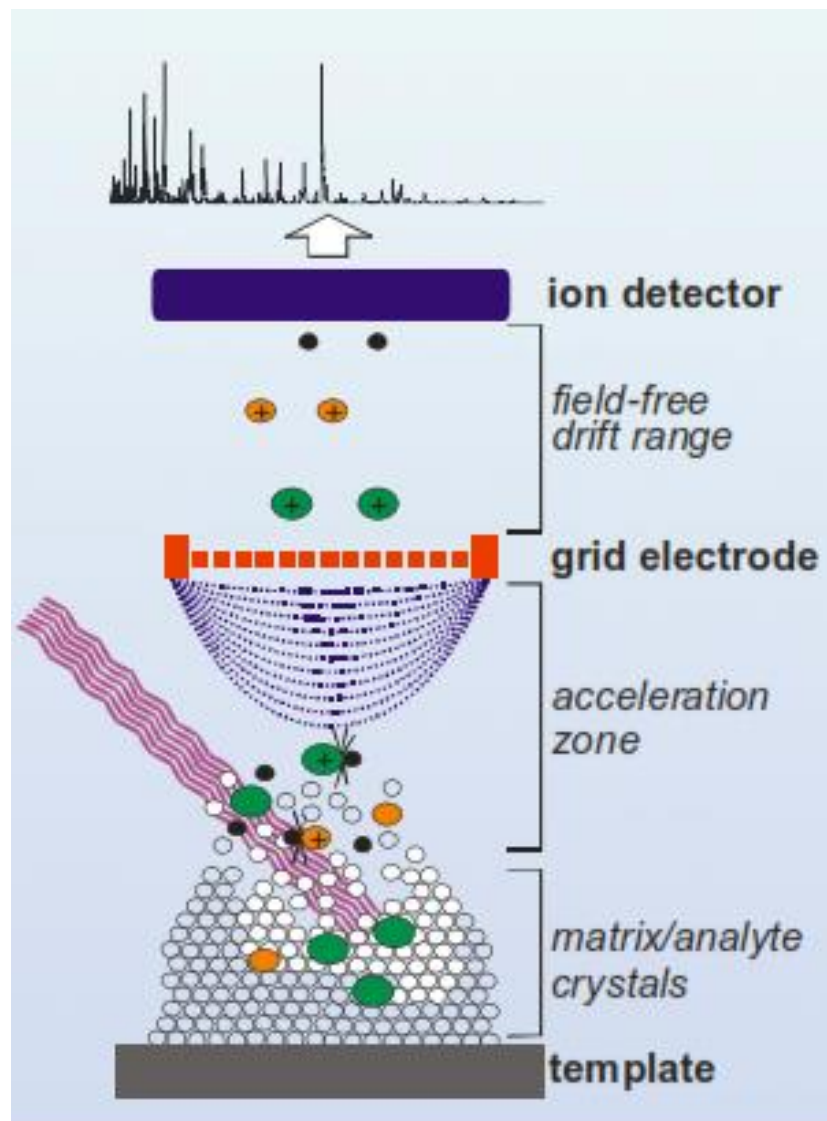
## Etape 2

- Différence de potentiel  
Accélération des ions
- 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

## Etape 3



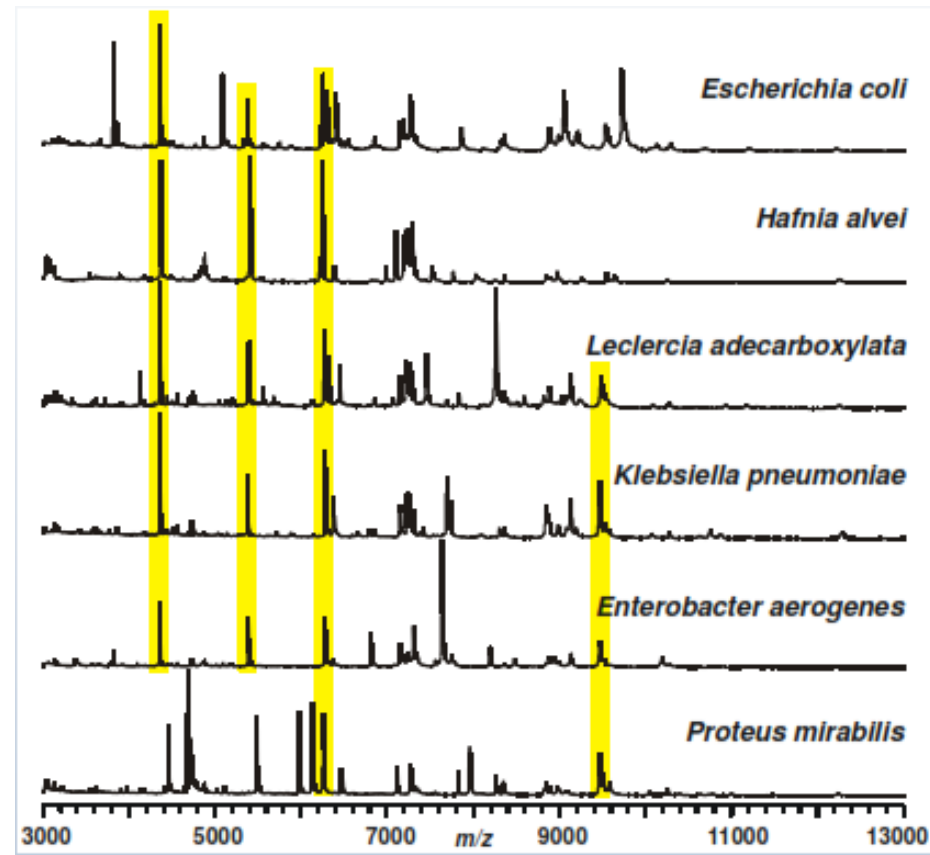
# MALDI-TOF MS

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



# MALDI-TOF MS

## Base de données de spectres

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    |

## 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)

| 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 3636_BOG  | 2.305       | <a href="#">1502</a>   |
| 4 (++)         | <i>Clostridium perfringens</i> A 1037_NCTC 8237_BOG  | 2.254       | <a href="#">37263</a>  |
| 5 (++)         | <i>Clostridium perfringens</i> D 2150_NCTC 8346_BOG  | 2.250       | <a href="#">107819</a> |
| 6 (++)         | <i>Clostridium perfringens</i> C 1041_NCTC 10720_BOG | 2.111       | <a href="#">79668</a>  |
| 7 (-)          | <i>Comamonas testosteroni</i> DSM 50244 HAM          | 1.308       | <a href="#">285</a>    |
| 8 (-)          | <a href="#">Listeria grayi mares DSM 20596 DSM</a>   | 1.260       | <a href="#">1641</a>   |
| 9 (-)          | <a href="#">Bacillus strophaceus DSM 473 DSM</a>     | 1.160       | <a href="#">1452</a>   |
| 10 (-)         | <i>Clostridium beijerinckii</i> 1072_ATCC 25752_BOG  | 1.136       | <a href="#">1520</a>   |

# MALDI-TOF MS

## Avantages

- Rapide et peu couteuse (hors coût appareil)
- Peu de gestes techniques
- Simplification de la démarche d'identification

## Inconvénients

- En cas de prélèvement contaminé, ou de mauvais dépôt, l'identification est impossible ou erronées

## Améliorations nécessaires

- Comparaison de souches
- Résistance
- Facteurs de virulence