

Impact des conditions de culture de bactéries recherchées dans le cadre de contrôle sanitaire des eaux et du mode opératoire utilisé pour les identifier sur les résultats générés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

L. PAILLERY, JS. PY, A. WILHEM, E. RION, B.GASSILLOUD

Contacts : Benoit Gassilloud, benoit.gassilloud@anses.fr
Jean-Sébastien PY, js.py@anses.fr

La spectrométrie de masse MALDI-TOF, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight, est une méthode qui permet d'identifier et de typer rapidement des micro-organismes en fournissant une information jusqu'à la sous-espèce (typage) via la détermination de profils protéiques caractéristiques.

I. INTRODUCTION

Ce travail porte sur la capacité de la méthode à identifier des bactéries isolées d'échantillons hydriques directement après 24 h, 48h ou 72h de culture sur les milieux sélectifs préconisés dans des procédures normalisées. L'utilisation de cette méthodologie apporte une information précise sur les espèces décelées. De fait, elle offre une plus grande réactivité dans la gestion du risque en cas de non conformité microbiologie décelée dans ce type d'échantillon. La méthodologie a été testée sur plusieurs bactéries classiquement recherchées dans l'analyse microbiologique des eaux après repiquage et suivant 3 protocoles (dépôt direct, extraction simple et extraction complète). Les données permettent d'une part d'évaluer l'impact des différents milieux sur le profil spectral obtenu et ensuite de comparer ces spectres à ceux générés à partir de milieux non-sélectifs.

II. MATERIEL ET METHODE

Quatre souches bactériennes ont été utilisées. Ces souches sont issues de pastilles Bioréférences®.

Tableau I : recensements des milieux non-sélectifs et sélectifs utilisé dans l'étude.

	Milieu non sélectif	Milieux sélectifs / Norme
 <i>Staphylococcus aureus</i>	PCA	Chapman (XP T90-412, 2006)
 <i>Enterococcus faecalis</i>		Slanetz (NF EN ISO 7899-2, 2000)
 <i>Escherichia coli</i>		TTC-Tergitol (NF EN ISO 9308-1, 2000)
 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Cétrimide (NF EN ISO 16266, 2008)

Incubation : 24 heures à 36°C ±2°C
Matrice : Acide α-cyano-4-Hydroxycinnamique
Système : microflex®, de la société Bruker.

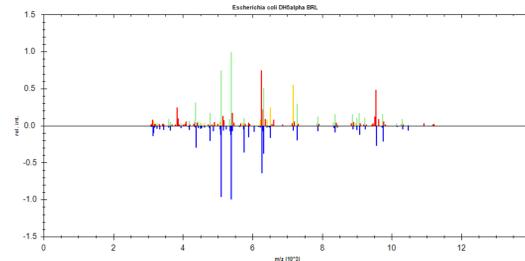


Figure 1 : illustration d'une comparaison d'un spectre mesuré à un spectre de référence.

- ❑ Comparaison du spectre mesuré au spectre de référence (bleu).
- ❑ Corrélation exprimée par le biais d'un score

III. RESULTATS ET DISCUSSION

❖ Impact du dépôt sur le score :

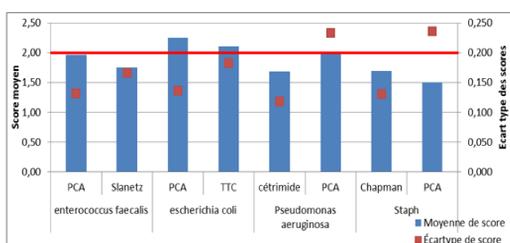


Figure 2 : score moyen et écart type issus d'un dépôt simple pour les couples « souche vs milieu ».

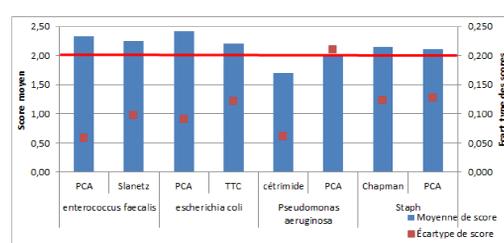


Figure 3 : score moyen et écart type issus d'une extraction simple pour les couples « souche vs milieu ».

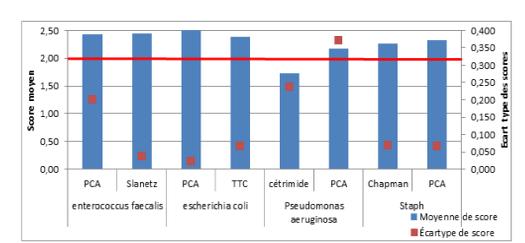


Figure 4 : score moyen et écart type issus d'une extraction complète pour les couples « souche vs milieu ».

Les informations indiquent la valeur moyenne du score (bleu) et la dispersion suivant l'écart type (carré rouge). Il ressort de la comparaison que les meilleurs scores sont obtenus lors d'une extraction complète.

❖ Impact du milieu de culture (Non sélectif / sélectif) sur le score :

Tableau II : synthèse des données souche vs milieux en extraction complète

	Score moyen	Écart type	CV %	Fréquence de score <2	Score min	Score max
Enterococcus faecalis						
PCA	2,422	0,199	8,2%	2%	1,128	2,545
Slanetz	2,451	0,037	1,5%	0%	2,391	2,526
Escherichia coli						
PCA	2,557	0,029	1,1%	0%	2,493	2,626
TTC	2,387	0,065	2,7%	0%	2,271	2,504
Pseudomonas aeruginosa						
cétrimide	1,643	0,284	17,3%	64%	0,882	2,009
PCA	2,003	0,454	22,7%	41%	1,193	2,546
Staphylococcus aureus						
Chapman	2,262	0,067	3,0%	0%	2,145	2,458
PCA	2,323	0,065	2,8%	0,0%	2,154	2,427

❖ Expression voies métaboliques

Exemple

Sur TTC, B-Galactosidase et perméase.

Tableau III : souches majoritaires obtenues et leur fréquence lors des deux essais en extraction complète.

Germe	Milieux	Germe détecté	Fréquence	Essai
Enterococcus faecalis	PCA	Enterococcus faecalis 20247_4 CHB	90%	Tous
	Slanetz	Enterococcus faecalis 20247_4 CHB	98%	Tous
	PCA	Escherichia coli DSM 1576 DSM	100%	Tous
Escherichia coli	TTC	Escherichia coli DSM 682 DSM	58%	Tous
	cétrimide	pas de pics détectés	33%	Essai 2
	cétrimide	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 THL	33%	Essai 1
Pseudomonas aeruginosa	PCA	Pseudomonas aeruginosa LMG 8029 LMG	46%	Tous
	Chapman	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 4910 DSM	81%	Tous
Staphylococcus aureus	PCA	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 799 DSM	25%	Essai 1
	PCA	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 4910 DSM	23%	Essai 2

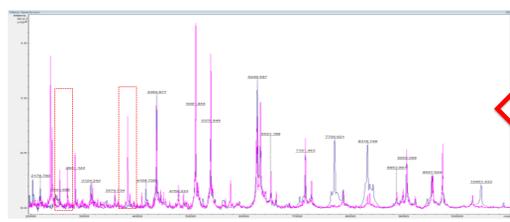


Figure 5 : spectre de masse d'Escherichia coli sur milieu PCA (bleu) et sur milieu TTC (rose)

Le tableau II, indique que seule l'identification des *Pseudomonas aeruginosa* est significativement impactée lors de l'utilisation d'un milieu sélectif (cétrimide). La figure 5 montre qu'une même bactérie, exemple *E coli*, cultivée sur deux milieux différents exprime des voies métaboliques distinctes (expression d'enzymes) se retrouveront sur le spectre final et pourront modifier le résultat de la comparaison au niveau de l'espèce.

IV. CONCLUSION

Les premiers résultats de cette étude mettent en évidence qu'une identification après repiquage des colonies sur milieux sélectifs est possible pour trois des quatre germes utilisés (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*).

La réalisation d'une étape d'extraction des protéines améliore nettement les résultats d'identification. De fait et dans les conditions opératoires retenues, nous montrons que cet outil peut s'avérer efficace pour identifier directement les bactéries ciblées en les repiquant à partir de milieux sélectifs. Dans ces conditions, il serait dès lors possible d'effectuer un screening en 24h et donc rendre une réponse robuste et très précise puisque l'espèce serait identifiée directement à l'issue de la culture après filtration sur membrane..

D'autres résultats visant à conforter l'utilisation de cet outil dans ce domaine sont en cours d'acquisition y compris l'analyse d'échantillons naturellement contaminés.