

Identification des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse type MALDI-TOF

Céline Tournus, Ludovic Lemée, Michèle Nouvellon, Martine Pestel-Caron

► **To cite this version:**

Céline Tournus, Ludovic Lemée, Michèle Nouvellon, Martine Pestel-Caron. Identification des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse type MALDI-TOF. RICAI, Dec 2016, Paris, France. hal-02269271

HAL Id: hal-02269271

<https://hal-normandie-univ.archives-ouvertes.fr/hal-02269271>

Submitted on 22 Aug 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Introduction

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont décrites selon les espèces comme dépolluants, pathogènes des végétaux, poissons, insectes, et potentiellement humains ; mais aussi contaminants des denrées alimentaires, et des eaux hospitalières, voire comme des réservoirs de gène de résistance aux antibiotiques. L'identification au rang d'espèce des *Pseudomonas* sp. constitue donc un défi pour le laboratoire d'hygiène hospitalière.

Objectifs

- Procéder à la validation de méthode en portée B flexible de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse type MALDI-TOF (Bruker®) des *Pseudomonas* non *aeruginosa* en utilisant comme méthode de référence l'identification moléculaire par séquençage d'un fragment du gène de l'ADNr 16S et de *rpoD*,

Matériels et Méthodes

❖ Validation de méthode en portée B flexible

- 7 souches ATCC de genre *Pseudomonas* (*aeruginosa*, *fluorescens*, *putida*, *stutzeri*, *syringae*) et apparentés (*Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*)
- Colonies issues de 4 milieux différents : gélose au sang, TSA, cétrimide, CFC
- Après une incubation de 24, 48 et 72 heures à 30°C
- Automate Microflex (Bruker®), DB 5989 (Juillet 2015)

▪ Evaluation des performances de la méthode

- | | |
|--------------------------------|---|
| - Répétabilité | - Sensibilité et spécificité analytique |
| - Fidélité intermédiaire | - Incertitude de mesure |
| - Maîtrise des risques | - Contamination |
| - Variabilité inter-opérateurs | - Robustesse et stabilité des réactifs |

▪ Comparaison de méthodes

- 85 souches environnementales (n=74) et cliniques (n=11) de *Pseudomonas stricto sensu*
- Identification par méthode de référence et par MALDI-TOF

❖ Identification par méthode de référence : séquençage de deux fragments de gènes

▪ Amorces

- Séquençage fragment de gène ADNr 16S : amorces « maison »
- Séquençage fragment de gène *rpoD* : amorces de Mulet *et al.* (Mol Cell Probes 2009)

▪ Bases de données

- ADNr 16S : BIBI, PseudoMLSA Database, Genbank
- *rpoD* : PseudoMLSA Database, Genbank

▪ Construction de 2 arbres enracinés de séquences-types

❖ Propositions d'identification

- Au rang de :
 - Genre (*Pseudomonas* sp.)
 - Groupe (*aeruginosa*, *fluorescens*, *putida*, *oleovorans*)
 - Espèce

Résultats

❖ Identification par méthode de référence

▪ Concordance entre bases de données

Concordance (%)	Genre	Groupe	Espèce
16S	100	84,5	15
<i>rpoD</i>	100	98,8	43,6

Le séquençage du fragment du gène *rpoD* est retenu pour la comparaison de méthodes car il est le plus discriminant

❖ Validation de méthode

▪ Performances de la méthode

- Répétabilité : 92% de scores corrects
- Fidélité intermédiaire : 97 % de scores corrects
- Pas de variabilité inter-opérateurs
- Analyse de risques : méthode des 5M
- Pas de contamination inter-échantillon
- Robustesse : pas d'influence des milieux/délais de culture : 96% de scores corrects
- Stabilité des réactifs : recommandations fournisseur

❖ Comparaison de méthodes

Identification (%)	Groupe	Espèce
Séquençage <i>rpoD</i>	35	65
MALDI-TOF	7	93

▪ Etude des concordances

- **100%** au rang de genre
- **100%** au rang de groupe
- **27,3%** au rang d'espèce

▪ Identification MALDI-TOF

- Groupes qui posent problème : *aeruginosa*, *fluorescens*, *putida*
- Groupe qui ne pose pas problème : *oleovorans*

Performances comparables au séquençage d'un fragment du gène ADNr 16S (étude des protéines ribosomiques)

Conclusion

- L'identification des *Pseudomonas* non *aeruginosa* est difficile au rang de l'espèce du fait de leur évolution taxonomique, la proximité phylogénétique entre les espèces et la faiblesse des bases de données existantes.
- L'identification moléculaire au rang d'espèce des souches de *Pseudomonas* a montré le pouvoir plus discriminant du séquençage du gène *rpoD* par rapport à celui de l'ADNr16S mais c'est le séquençage de plusieurs gènes domestiques (*rpoB*, *rpoD*, *oprF*, etc) qui permet de discriminer les espèces de *Pseudomonas* sp. entre elles.
- La spectrométrie de masse type MALDI-TOF permet en routine d'identifier les *Pseudomonas* sp. au niveau du rang de groupe. Elle ne permet pas d'identifier de façon fiable les espèces des groupes *aeruginosa*, *putida* et *fluorescens*.