

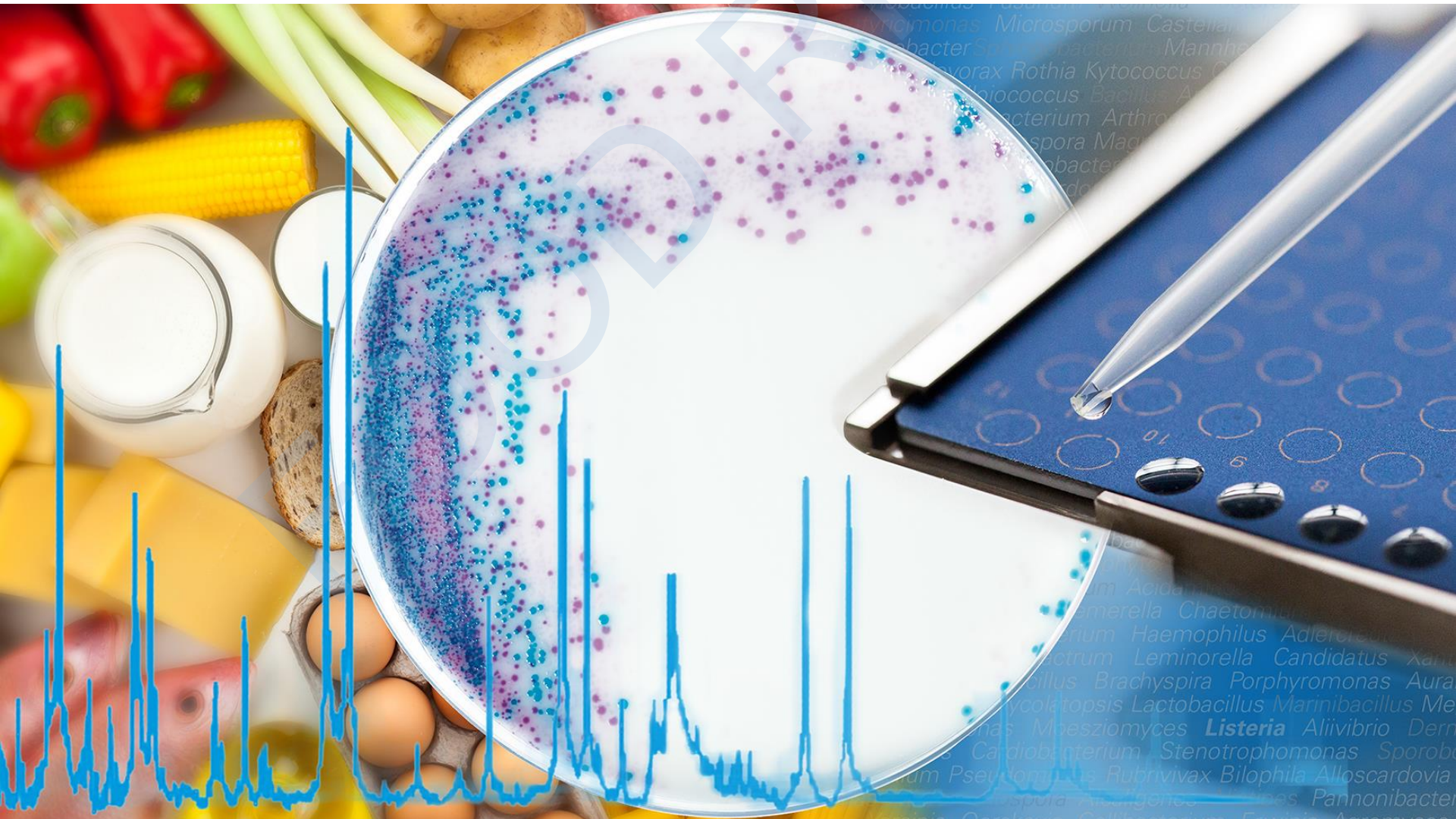
# MALDI Biotyper

Nouveau Paradigme en Microbiologie Agroalimentaire



Claude Marfisi- Responsable Commercial Bruker pour le Sud-Est de la France

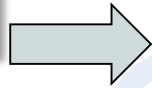
**Food Risk Nîmes 31 Janvier 2020**



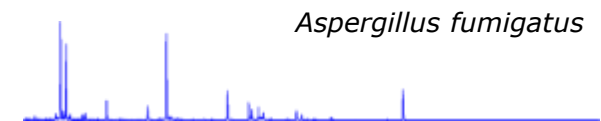
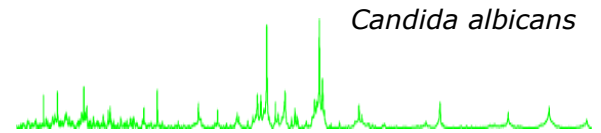
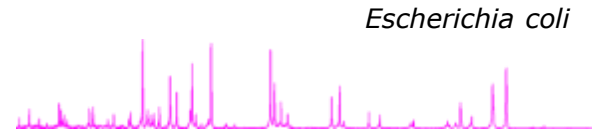
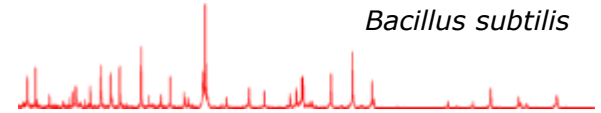
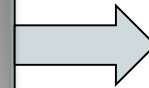
# Le MALDI Biotyper une technique universelle

Qui identifie les bacteries Gram+, Gram-, les levures et les moisissures sur la base de leur empreinte protéique

type **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**

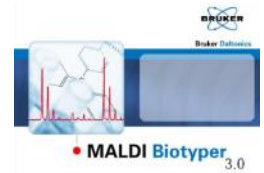


15 sec



Bruker Daltonics

# MALDI Biotyper : Qu'est-ce que c'est ?



Des bases de données

Un logiciel qui automatise l'analyse

Des protocoles de préparation

Spectromètre de masse MALDI-TOF

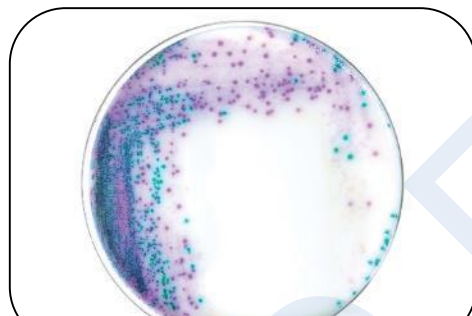
Une intégration informatique



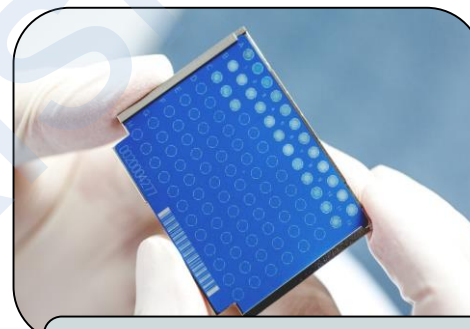


# MALDI Biotyper

## Principe & Flux de travail



prélèvement d'1 colonie de microorganisme inconnu  
Avec un cône

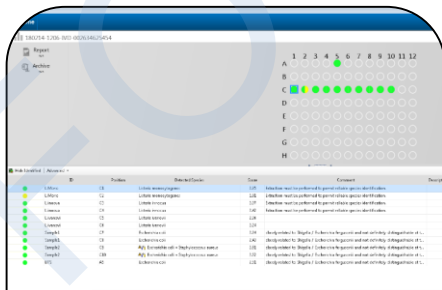


Preparation sur cible MALDI

96 échantillons identifiés en ~60 minutes (temps préparation inclus)



Acquisition de profils spectraux MALDI-TOF



Identification par pattern matching

# MALDI Biotyper

## Configuration pour la microbiologie alimentaire



### Spectromètre de masse MALDI Biotyper

- Instrument Paillasse
- Operation autonome

### Logiciel MBT Compass dédié et automatisé pour:

- Acquisition des données
- Traitement des spectres
- Comparaison des empreintes
- Création Rapport

### Bibliothèque MBT Compass

- 2969 espèces / 8468 souches
- Continuellement mise à jour

### MBT Subtyping Module

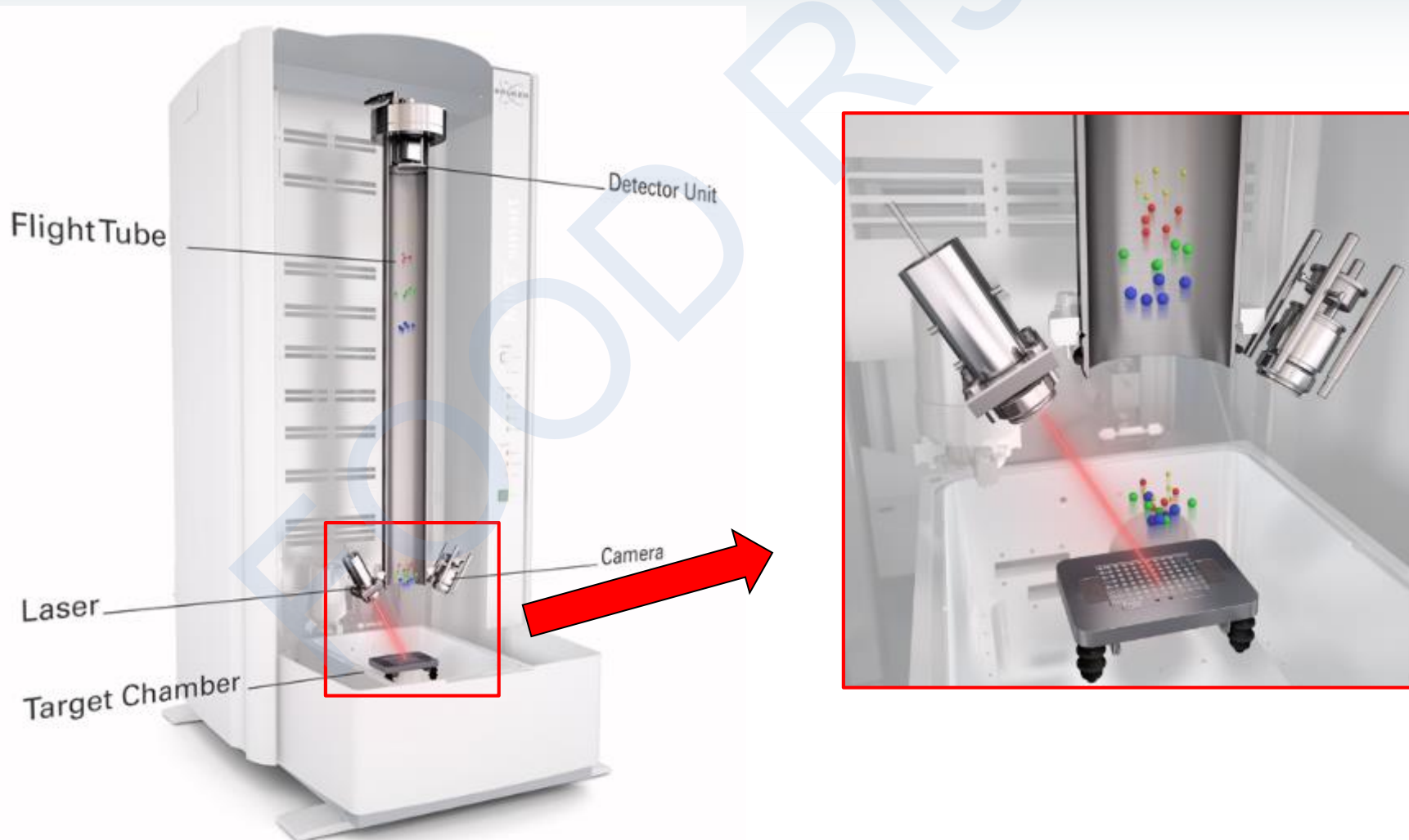
- Différenciation rapide et facile des espèces de *Listeria*
- Détection marqueurs de Résistance

### Consommables

- Bruker HCCA =  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)Matrix
- Bruker Bacterial Test Standard
- MBT Biotarget 96

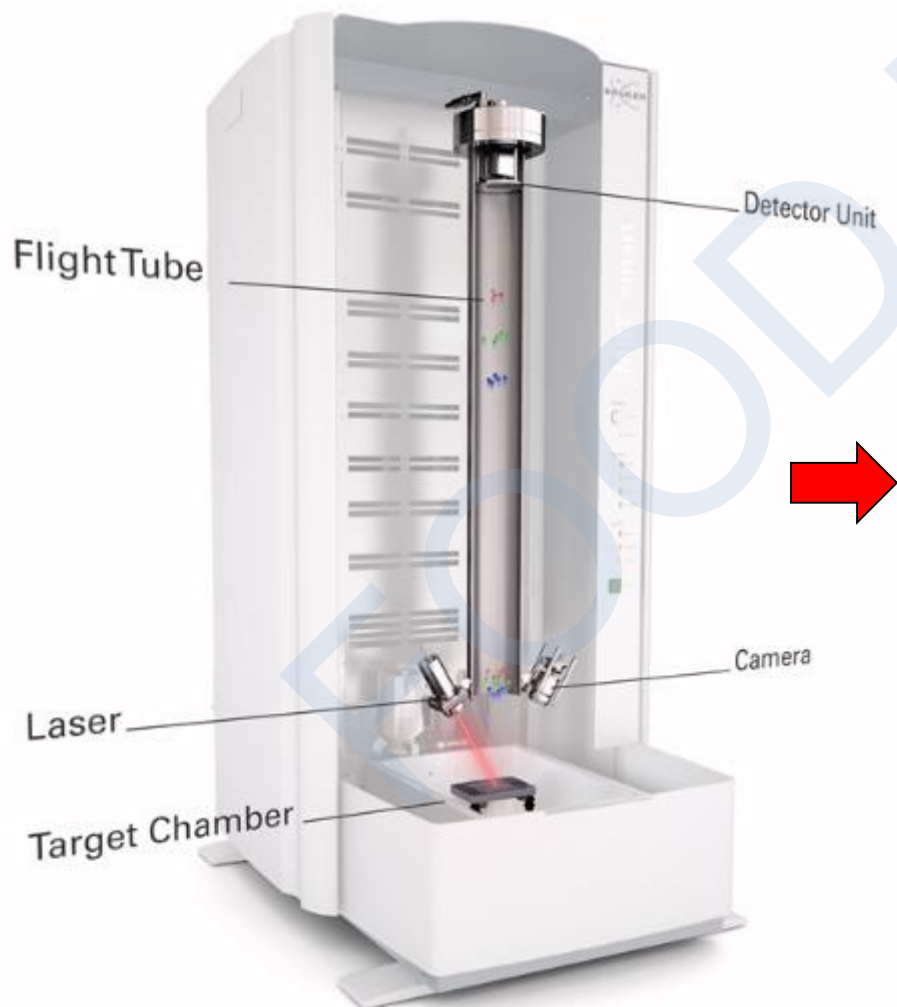
# MALDI Biotyper - Principe

**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption / **I**onization  
**T**ime **O**f **F**light Mass Spectrometry



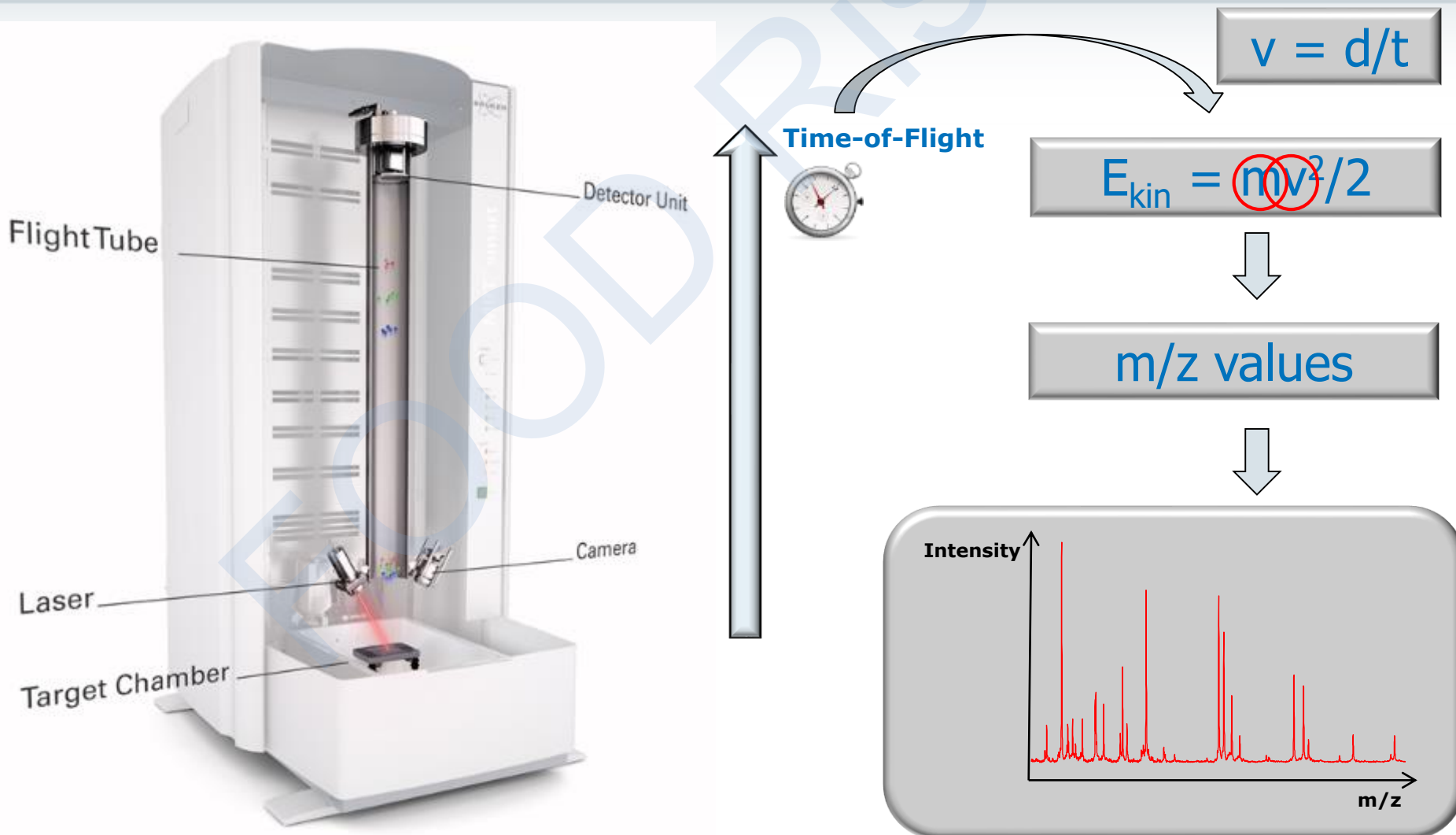
# MALDI Biotyper - Basics

**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption / **I**onization  
**T**ime **O**f **F**light Mass Spectrometry



# MALDI Biotyper - Basics

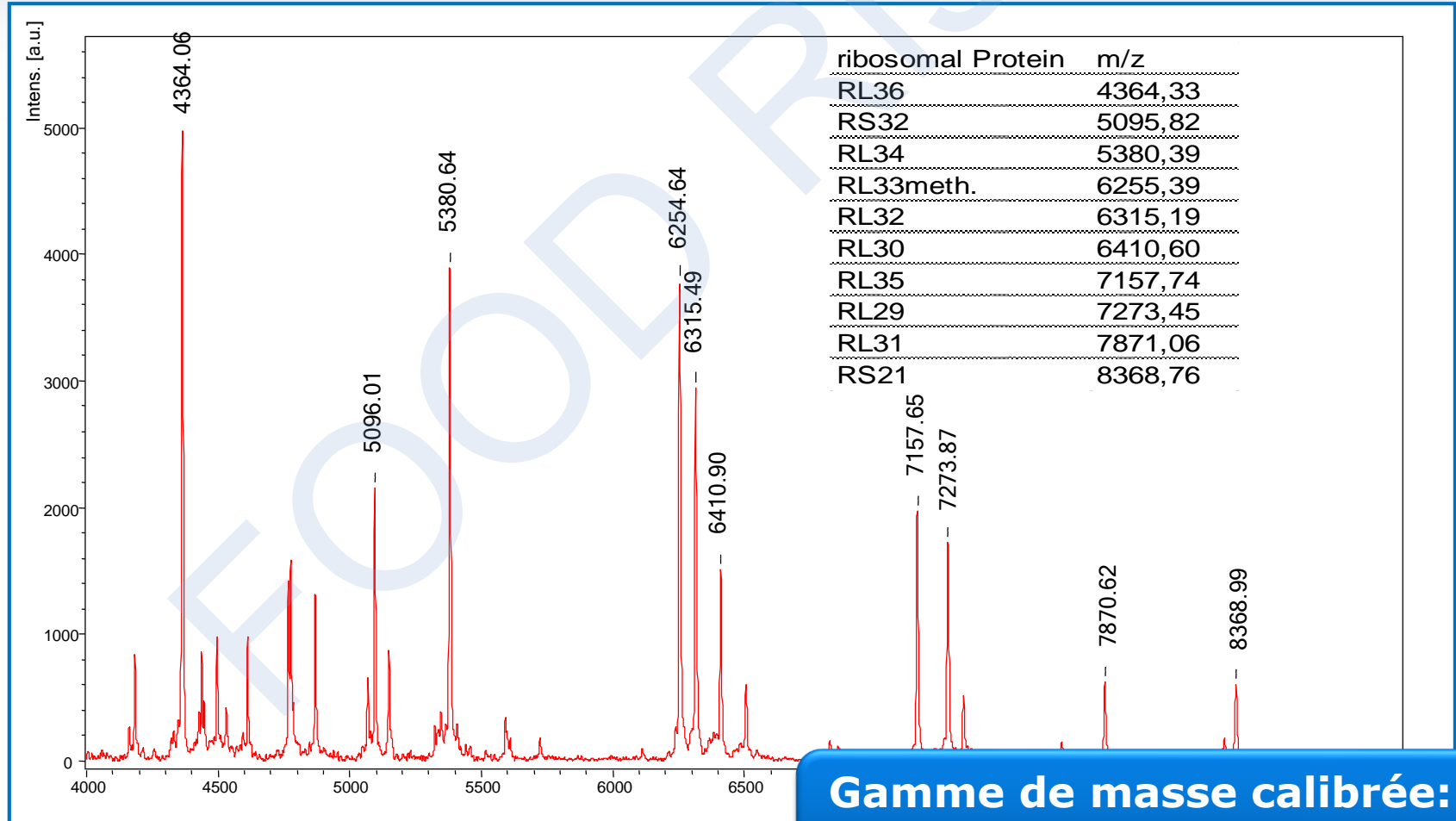
**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption / **I**onization  
**T**ime **O**f **F**light Mass Spectrometry





# MALDI Biotyper – Spectre MALDI TOF

## Méthode de confirmation/identification robuste, basée sur la présence et l'abondance de protéines

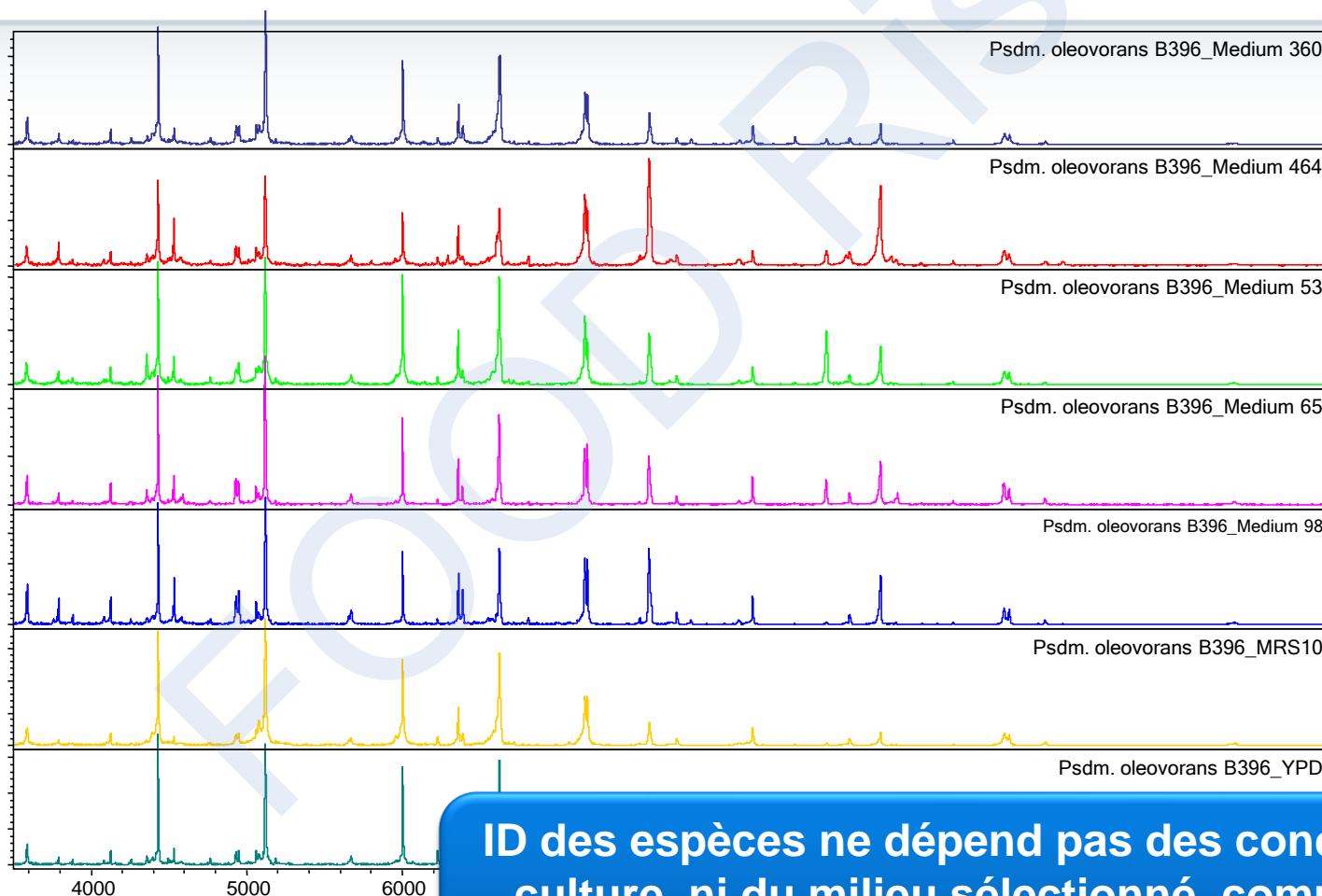


*E. coli*

**Gamme de masse calibrée:  
2,000 – 20,000 Da**

# MALDI Biotyper

## Flux de travail indépendant des milieux de culture

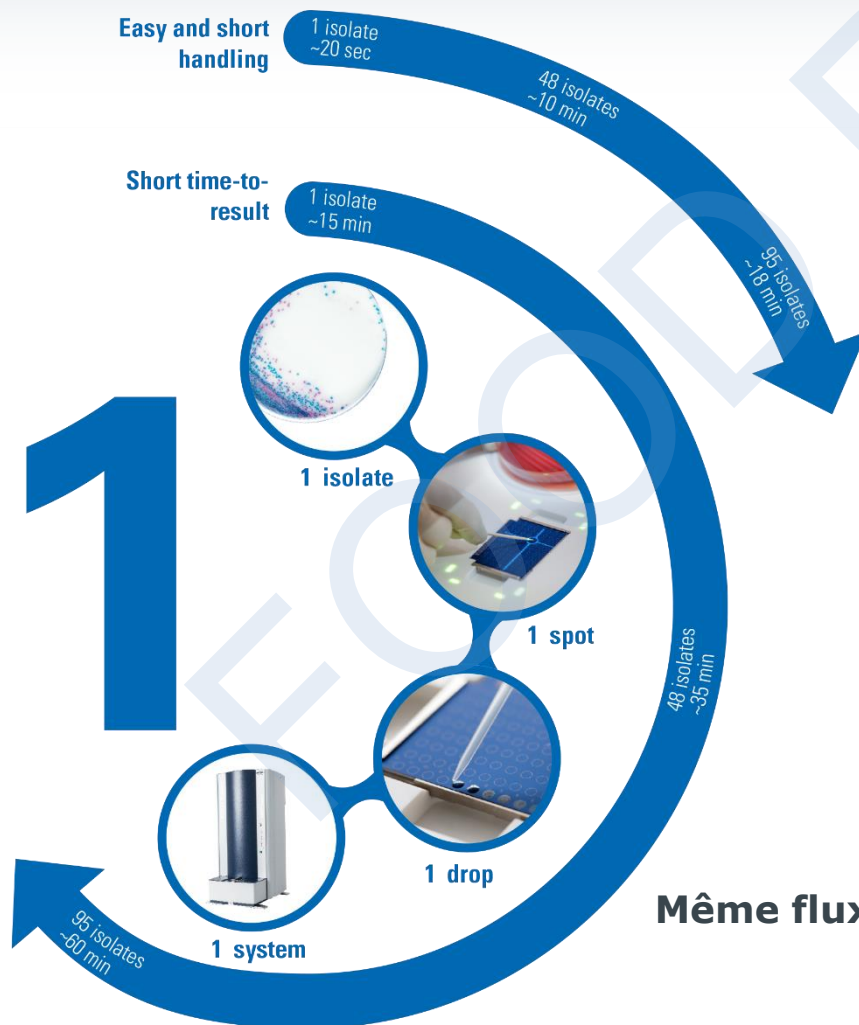


Profil du Pseudo

**ID des espèces ne dépend pas des conditions de culture, ni du milieu sélectionné, comme testé lors des études de certification**

# MALDI Biotyper

## 1 Système – 1 Flux de travail: résumé



### Temps court de manipulation

- Transfert Direct
- **Bacterial Test Standard (QC)**
- Séchage Matrice HCCA
- Acquisition & comparaison Spectrale

N° d'isolats	TTR
1 isolat	~ 10 min
48 isolats	~ 35 min
95 isolats	~ 60 min

Même flux pour bactéries, levures et moisissures

**Bibliothèque MBT Compass  
Comparaison d'empreintes protéiques**

**Mises à jour continues, facile à valider**



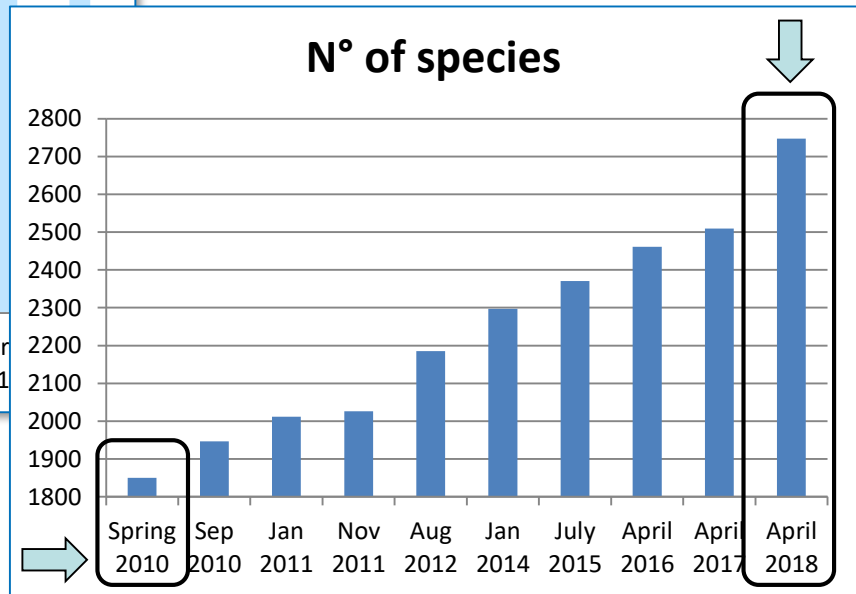
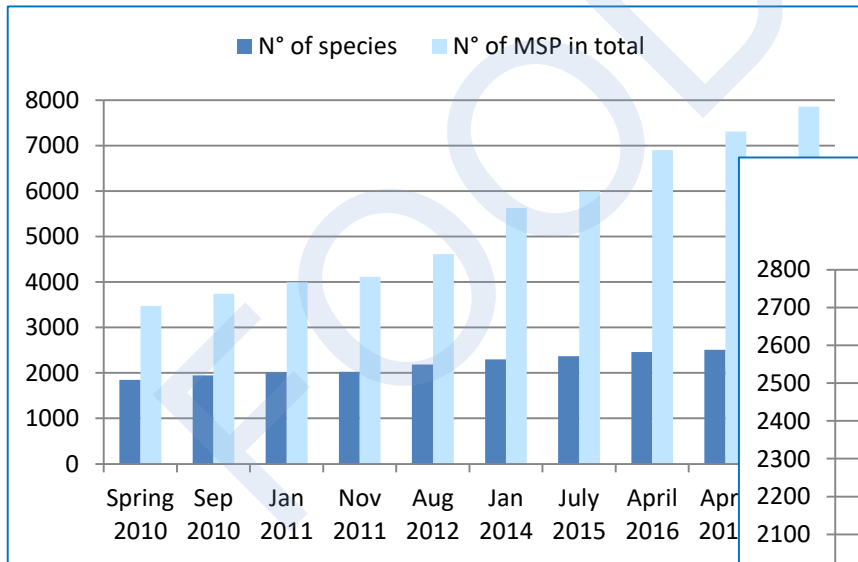
# MALDI Biotyper®

## Base de Données BRUKER principale



**Base de données (Avril 2019): 2969 espèces / 8468 MSPs**

- ✓ Contenant des **bactéries, levures**
- ✓ 1 mise à jour / an



# MALDI Biotyper®

## Bases De Données complémentaires



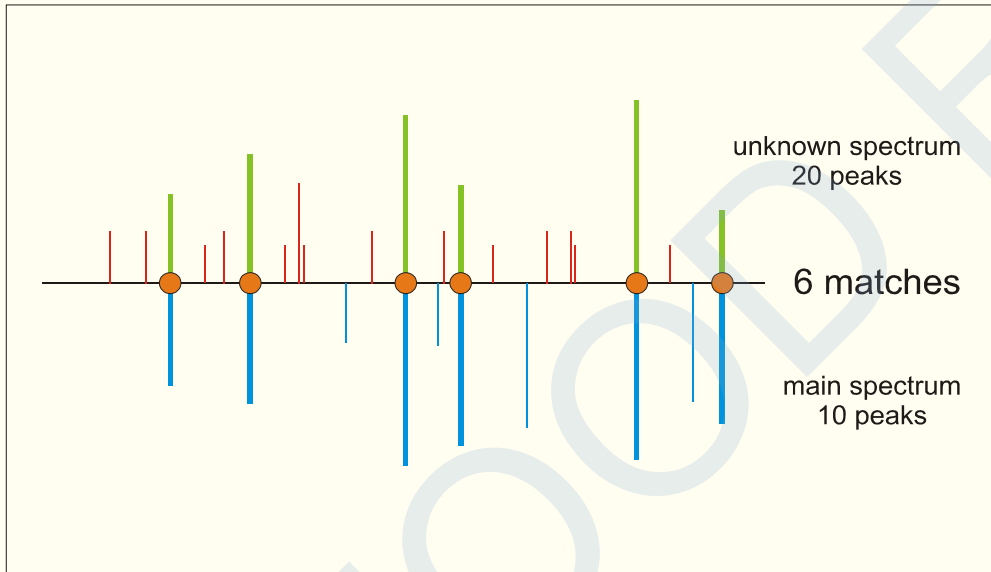
### Base de données « **Fungi** » (champignons filamenteux) :

- ✓ 180 espèces
- ✓ 577 MSPs pour la Version 3.0 (Avril 2019)



### Base de données « **Mycobacteria** » :

- ✓ 164 espèces différentes / 912 MSPs pour la Version 5.0
- ✓ Fonctionne conjointement avec le module informatique adapté



## Pattern Matching

Calcul du score de correspondance:

### Correspondance MSP à l'inconnu

% de correspondance du spectre de référence  
(e.g. 6 / 10 = 0.6)

### Correspondance inconnu aux MSPs

% de correspondance du spectre inconnu  
(e.g. 6 / 20 = 0.3)

### Corrélation Intensités

Correlation de l'intensité: somme des ratios  
(0,4+1+0,5+0,9+1+0,8)/6= 0,76



Range	Interpretation	Symbols	Color
2.000 - 3.000	High Confidence Identification	(+++)	green
1.700 - 1.999	Low Confidence Identification	(+)	yellow
0.000 - 1.699	No Organism Identification Possible	(-)	red

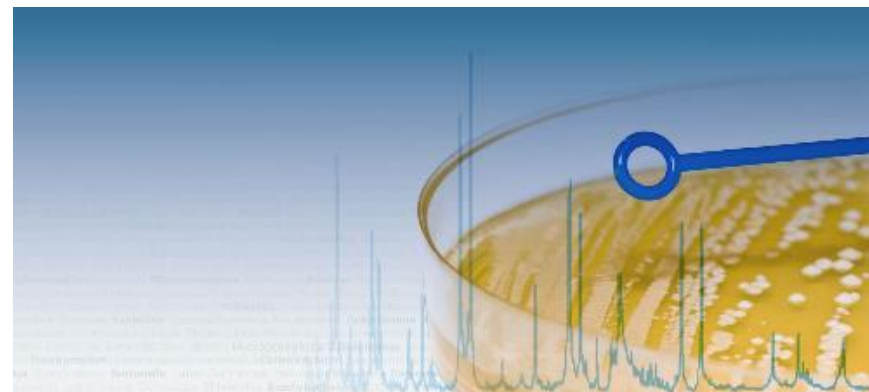
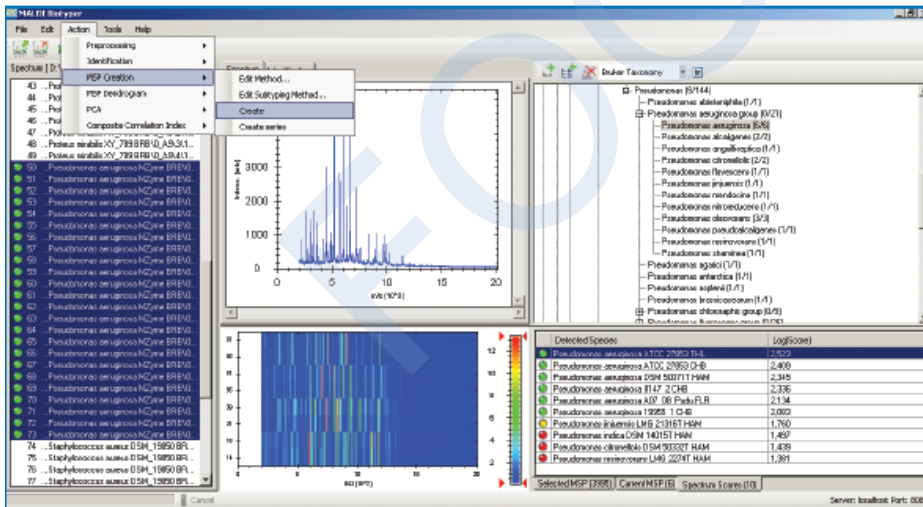
# MALDI Biotyper®

## Créer sa propre Base de Données:



### Formation sur le **Module MBT Explorer** :

- Génération d'entrées **facilitée & automatisée** de spectres de référence
- Utilisation de la **bioinformatique similaire** aux Bibliothèques Bruker
- Permet **export/import** de MSPs d'autres laboratoires possédant un MBT: collaboratif !!
- Permet l'utilisation **simultanée** des bibliothèques Bruker & Homemade





# MALDI Biotyper

A composite image illustrating the MALDI Biotyper workflow in food microbiology. The background shows various food items: red and yellow bell peppers, green onions, a yellow corn cob, a carton of eggs, and a piece of cheese. In the center, a petri dish contains a white agar surface with numerous small, colorful spots (purple, blue, green) representing microbial colonies. A pipette is shown dispensing a liquid onto the surface. A blue line graph, resembling a mass spectrum, is overlaid at the bottom of the image. A semi-transparent white box with a blue border contains the text "Flux de travail en Microbiologie Alimentaire".

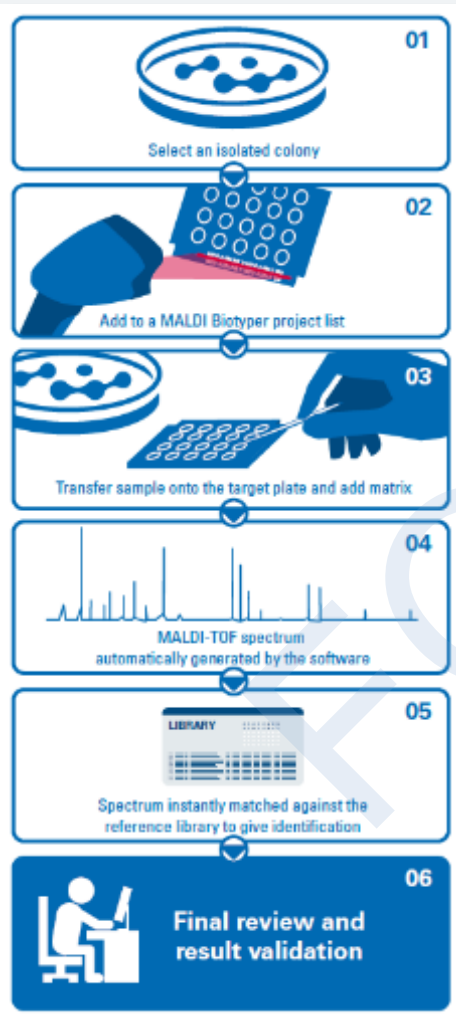
## Flux de travail en Microbiologie Alimentaire

# MALDI Biotyper

## Flux de travail pour confirmation des pathogènes

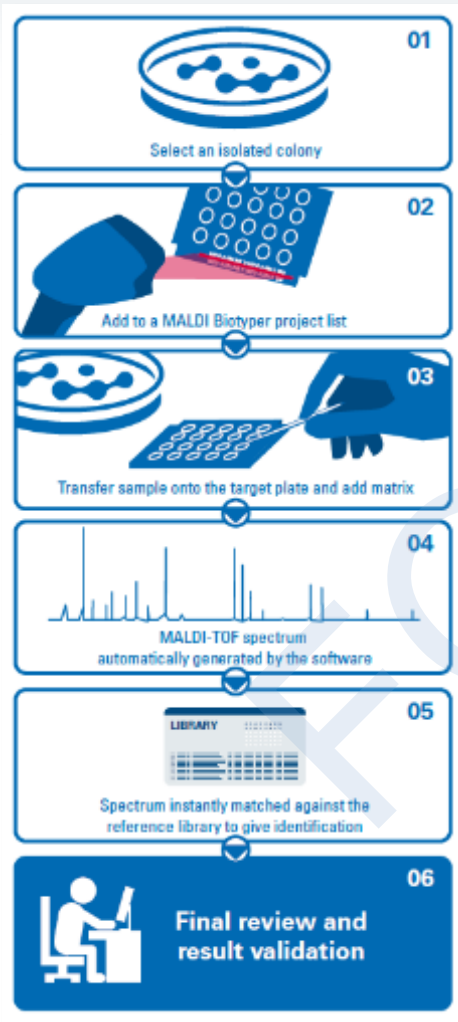


Confirmation et identification directes depuis le milieu de culture validé et tout milieu non sélectif  
**Pas d'étape de purification => 24 h gagnées!**



# MALDI Biotyper

## Flux de travail pour confirmation des pathogènes



Sélectionner une colonie ISOLÉE  
Pas de subculture requise sur milieu non-sélectif

### Approved culture media

- Xylose Lysine Deoxycholate (XLD)
- Brilliant Green Sulfa Agar (BGA)
- RAPID' *Salmonella* Agar
- Brilliance *Salmonella*
- ASAP
- *Enterobacter Sakazakii* Isolation Agar (ESIA)
- *Cronobacter* Chromogenic Isolation Agar (CCI)
- Ottaviani & Agosti (O&A)
- PALCAM
- Oxford Agar
- Modified Oxford Agar (MOX)
- RAPID' *L.mono*
- modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (mCCDA)
- CampyFood Agar
- RAPID' *Campylobacter* Agar
- Campy Cefex Agar
- Non-selective agar, e.g. Tryptic Soy Agar (TSA), Tryptic Soy Yeast Extract Agar (TSYEA), Columbia Blood Agar (CBA)



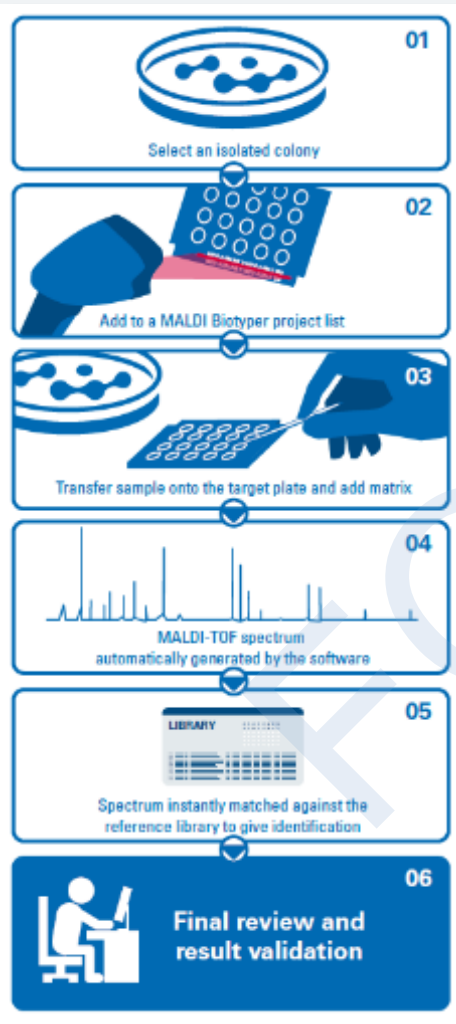
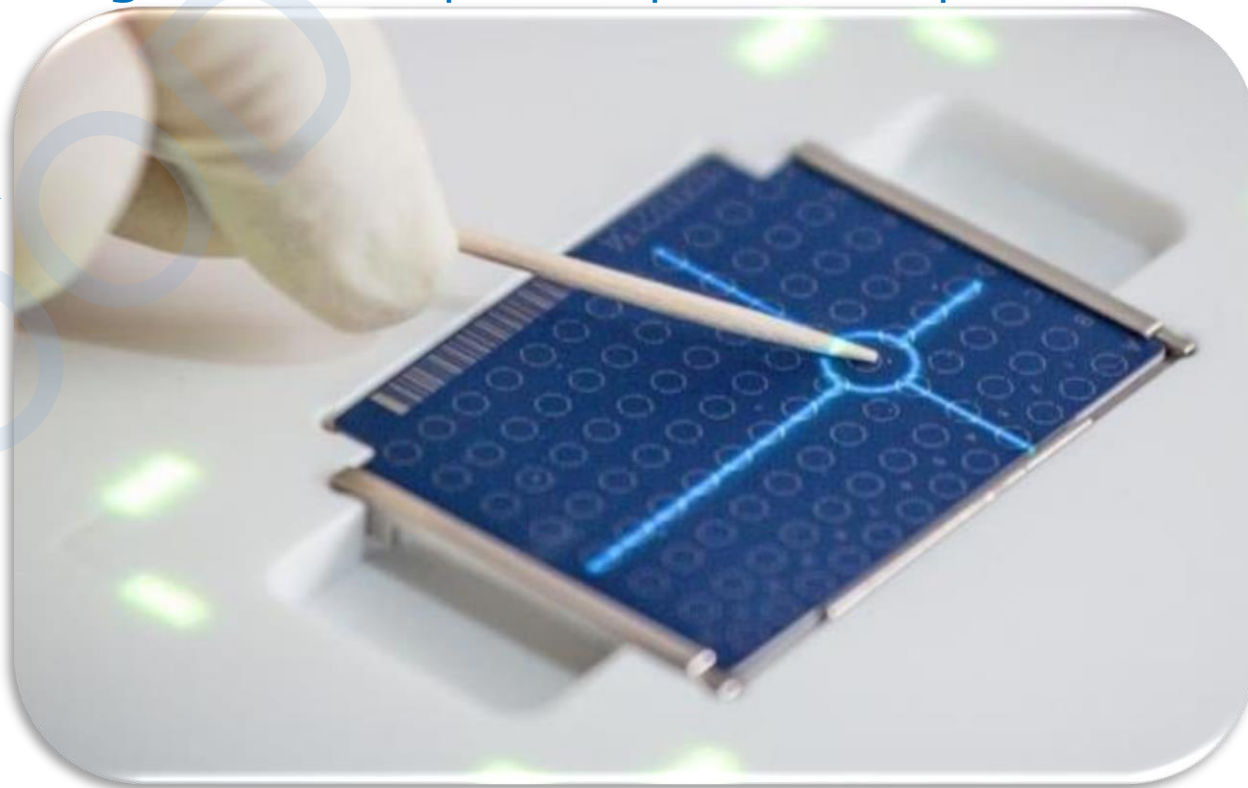
# MALDI Biotyper

## Flux de travail pour confirmation des pathogènes



Préparation échantillon: transférer le matériel biologique et ajouter 1  $\mu$ L matrice HCCA  
→ 20 sec par isolat

**Obligatoire:** 1 dépôt BTS par cible et par run validé





# MALDI Biotyper

## QC AUTOMATISÉ par le BTS: les étapes ?



- **Étape 1 : Calibration**

Calcule la corrélation entre le temps de vol et les masses attendues

- **Étape 2 : Vérification des Performances du spectromètre**

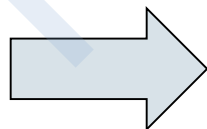
Les pics sont-ils optimaux (non saturés)?

Ligne de base trop basse (energie laser ajusté)? Bruit de fond élevé (préparation des réactifs? alimentation électrique?)

- **Étape 3 : Identification**

*L'E. coli* est-il identifié comme *E. coli* avec un log(score) supérieur ou égale à 2.0?

Presse  
bouton  
pour  
QC



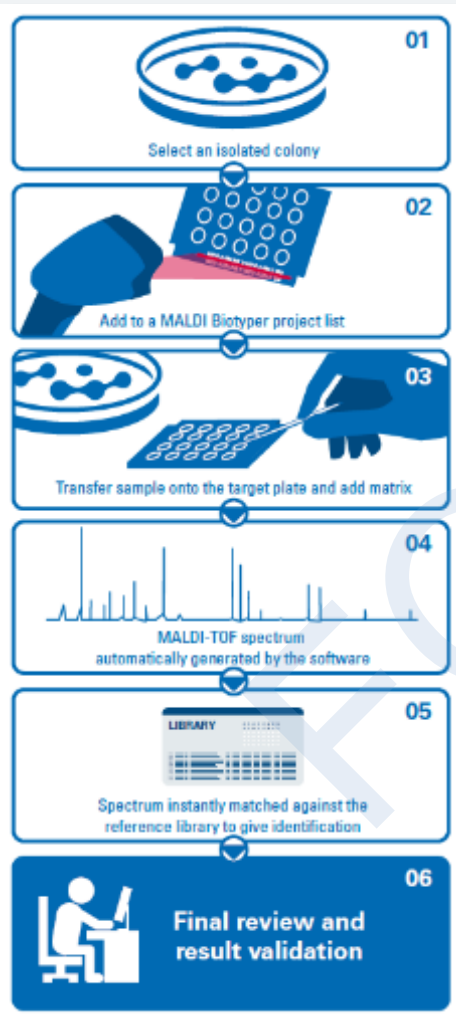
Lancement du Run  
avec confiance sur les  
performances du  
système

# MALDI Biotyper

## Flux de travail pour confirmation des pathogènes



Enregistrement et traçabilité simples



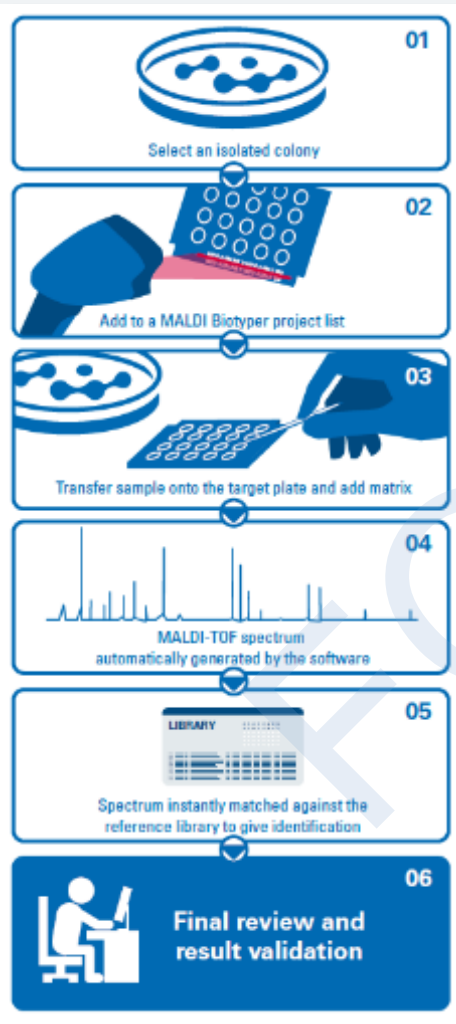
# MALDI Biotyper

## Flux de travail pour confirmation des pathogènes



Acquisition Spectrale et comparaison à la MBT Library 8468 MSPs ou toute version ultérieure

### MBT Subtyping Module pour différenciation facile et rapide des espèces *Listeria*



170727-1440-1018800001

Report  
Archive

Result Interpretation Table		
Sample name	Sample ID	Sample Confirmation
A1	BTS (BTS)	Escherichia coli identification
A2	180610 (Standard)	Cronobacter spp. confirmation
A3	180611 (Standard)	L. monocytogenes confirmation
A4	180612 (Standard)	Listeria spp. confirmation L. welshimeri identification
A5	180613 (Standard)	Campylobacter spp. confirmation Campylobacter jejuni identification
A6	180614 (Standard)	Enterococcus faecalis identification
A7	180615 (Standard)	Listeria spp. confirmation L. innocua identification

Hide Identified | Group by species | Advanced

ID	Name
015	litc
15015482-1 TSA_ALOXA 24 h EDT	Sample
15015482-2 TSA_ALOXA 24 h EDT2	Sample
15015482-3 TSA_ALOXA 24 h EDT3	Sample
15015734-1 TSA_ALOXA 24 h Art EDT1	Sample
15015734-2 TSA_ALOXA 24 h Art EDT2	Sample
15015734-3 TSA_ALOXA 24 h Art EDT3	Sample
18-002180-1 TSA_ALOXA 24 h Art EDT 1	Sample
16-002160-1 TSA_ALOXA 24 h Art EDT 2	Sample
18-002180-1 TSA_ALOXA 24 h Art EDT 2	Sample
Listeria EDT sample A_1	Sample
Listeria EDT sample A_2	Sample
Listeria EDT sample A_3	Sample
Listeria EDT sample B_1	Sample
Listeria EDT sample C_1	Sample
Listeria EDT sample C_2	Sample

# MALDI Biotyper

## Protocoles d'Opérations Standardisés Rapides & Faciles



### Transfert Direct (DT) (pour la majorité des germes)

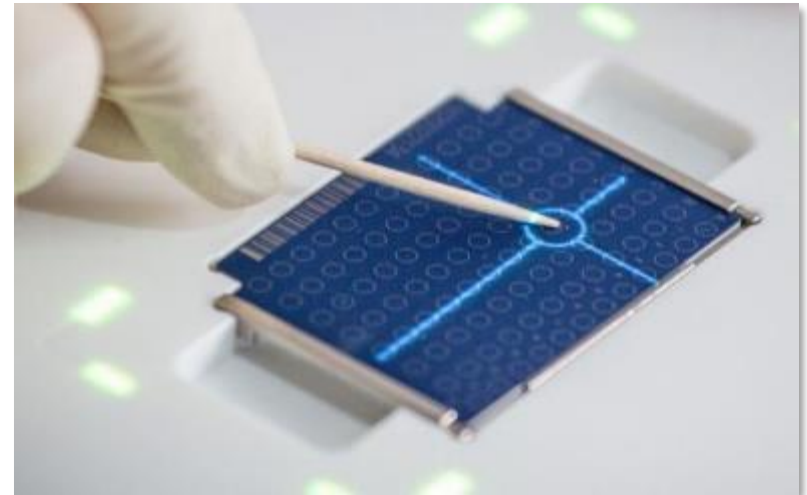
- Transfert Direct de matériel biologique sur cible MALDI
- Après dépôt ds échantillons, ajout Matrice MALDI
- Bon résultat sur GRAM négatifs et plupart des GRAM positifs

### Transfert Direct Étendu (eDT) (ex. paroi cellulaire difficile)

- Transfert Direct de matériel biologique sur cible MALDI
- Ajout d'1µL d'acide formique 70%
- Séchage
- Ajout d'1µL de Matrice MALDI

### Extraction Complète (EX) (rare)

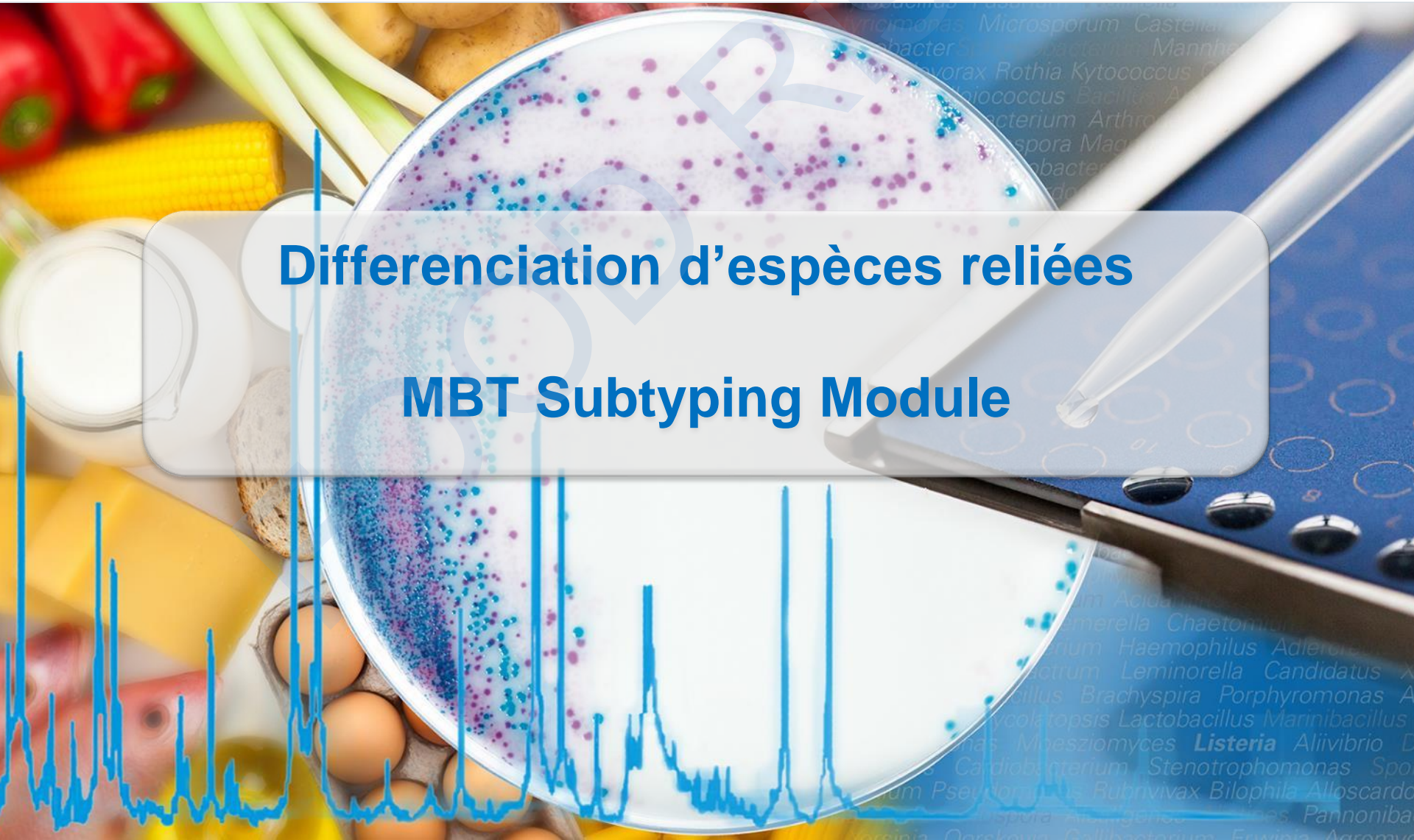
- Une succession d'étape permet d'extraire les protéines dans un tube Eppendorf à partir de colonies isolées





Differenciation d'espèces reliées

MBT Subtyping Module



# Bénéfices du MBT Subtyping Module



- ✓ Étendre les applications d'identification du MBT à la **détection de marqueurs de la Résistance**, et à la **séparation d'espèces proches**.
- ✓ Identification en 2 étapes automatisées: typage directement à partir d'une ID en transfert direct: **Aucune étape supplémentaire n'est requise!!**
- ✓ Applications actuelles:
  - ❑ ***Bacteroides fragilis*** et la résistance aux Carbapénèmes
  - ❑ ***Staphylococcus aureus*** et la résistance à la Méricilline
  - ❑ Différenciation de la ***Listeria monocytogenes*** des autres espèces proches (*L.ivanovii*, *L.innocua*, *L.welshimeri* et *L.seeligeri*)
  - ❑ Différenciation entre ***Mycobacterium intracellulare*** et ***chimaera***
  - ❑ Détection du pic provenant du **plasmide bla<sub>kpc</sub>** chez ***K.pneumoniae***
- ✓ Bruker **continuera de développer** ce genre d'approche dans les années à venir

- **Identification Rapide et précise** des souches de *Listeria* est essentielle pour une gestion appropriée et de contrôle en sécurité alimentaire



# MBT Subtyping Module

## *Listeria monocytogenes*



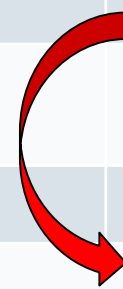
- **Pics caractéristiques** dans les spectres de *Listeria* sont utilisés pour confirmer l'identification, en utilisant la préparation d'échantillon en transfert direct:



Sans le Module MBT Subtyping les 100% d'IDs nécessite l'extraction complète

Avec le Module MBT Subtyping les 100% d'IDs corrects sont obtenus en transfert direct

Method	Accuracy for genus ID	Accuracy for species ID
Direct Transfer	100%	96.5%
Extended Direct Transfer	100%	95.4%
Formic Acid Extraction	100%	100%
Direct Transfer + MBT Subtyping Module	100%	100%



# MBT Subtyping Module

## *Listeria monocytogenes*

### Résultat dans MBT Compass: Rapport



- *Listeria monocytogenes* typing pour confirmer les espèces

→ **directement depuis** le transfert direct (et transfert direct étendu)

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<u>0 E1</u> (+++)(A)	15015734-1 (LM) TSA_ALOA 24 h Art EDT3 (standard)	Listeria monocytogenes typed as <u>L. monocytogenes</u>	<u>2.30</u>	<u>Listeria monocytogenes</u>	<u>2.29</u>
<u>0 E2</u> (+++)(A)	15015734-1 (LM) TSA_ALOA 24 h Art EDT4 (standard)	Listeria monocytogenes typed as <u>L. monocytogenes</u>	<u>2.31</u>	<u>Listeria monocytogenes</u>	<u>2.30</u>

ID en dépôt direct => ID ≥ 2.0 => lancement du Subtyping

**PAS d'étapes additionnelles requises**



# MALDI Biotyper

The background of the slide is a collage of images related to food safety and microbiology. It includes a petri dish with a white agar surface and numerous small, colorful (purple, blue, green) spots representing microbial colonies. To the left, there are various fresh food items: a red bell pepper, a yellow corn cob, green onions, and a potato. In the bottom left, there is a carton of brown eggs. A blue line graph with several sharp peaks is overlaid at the bottom of the image. A semi-transparent white box with a blue border is centered over the petri dish, containing the certification text. The Bruker logo is also visible in the top right corner. Faint, large, light blue text "BRUKER" is visible in the background, partially obscured by the petri dish and other elements.

**Certification  
AOAC OMA et  
ISO 16140-part 6**

# MALDI Biotyper

## Certification ISO 16140-Part 6 par MicroVal



- Le MBT est le **PREMIER** la **et SEULE** méthode de confirmation certifié **par MicroVal** d'après le nouveau **standard ISO 16140-part 6**



pour la **confirmation de:**

- ✓ ***Cronobacter spp.***
- ✓ ***Salmonella spp.***
- ✓ ***Campylobacter spp.***
- ✓ ***Listeria spp. and Listeria monocytogenes***

Certificate N° 2017LR72

Certificate N° 2017LR73

Certificate N° 2017LR74

Certificate N° 2017LR75





# MALDI Biotyper

## Official Method of Analysis par AOAC International



- Le MBT a été certifié selon

**Official Method of Analysis program  
(OMA) of the AOAC International**

pour la **confirmation et l'identification de:**

- ✓ ***Salmonella* spp.**  
***Cronobacter* spp.**  
***Campylobacter* spp.**  
and other GRAM-negative bacteria
- ✓ ***Listeria* spp.**  
***Listeria monocytogenes***  
and other GRAM-positive bacteria



First Action AOAC Official Method<sup>SM</sup>  
2017.09

First Action AOAC Official Method<sup>SM</sup>  
2017.10

# MALDI Biotyper

The background image is a composite. At the top, it shows a variety of fresh produce including red and yellow bell peppers, green onions, and corn. Below this, a petri dish is shown with a white agar surface covered in numerous small, multi-colored spots (purple, blue, green) representing microbial colonies. To the right, a pipette is shown dispensing liquid into a blue microplate. At the bottom, a blue line graph with several sharp peaks is overlaid on the scene. A large, semi-transparent watermark "BRUKER" is oriented diagonally across the center of the image.

**Conclusion**

# MALDI Biotyper

## Confirmation / Identification de pathogènes et autres bactéries dans la minute



Confirmation et identification de colonies caractéristiques par:



Résultat dans la minute

Après détection ou énumération de:

- *Salmonella* spp.
- *Cronobacter* spp.
- *Campylobacter* spp.
- *Listeria* spp. et *L. monocytogenes*
- Indicateurs Qualité
- Spoilers Microbiens
- Flore technologique ou probiotique



Confirmation de Pathogène :

- *Salmonella* spp.
- *Cronobacter* spp.
- *Campylobacter* spp.
- *Listeria* spp. et *L. monocytogenes*

Identification des autres bactéries

Temps précieux gagné au laboratoire