

Détection rapide des Streptocoques du groupe B de sequence-type 1 et 17 par MALDI-TOF MS :

Avantages au laboratoire et en clinique

Cécile Meex
Microbiologie clinique
CHU Liège

Streptocoques du groupe B

= *Streptococcus agalactiae*

- Streptocoque β -hémolytique
- Groupe B de Lancefield
- 10 sérotypes capsulaires (Ia, Ib, II-IX)
- Commensal du tractus gastro-intestinal et génito-urinaire.
- ~ 30% des adultes colonisés

- Infections néonatales:
 - Infections précoces
 - Infections tardives



- Infections chez la femme enceinte
- Infections chez le sujet âgé ou avec maladie sous-jacente



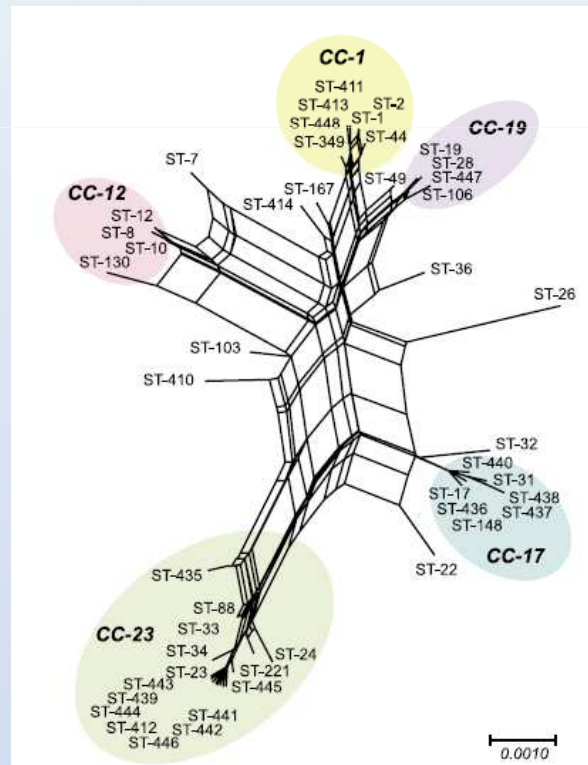
SGB: Infections néonatales

	Infection précoce	Infection tardive
Incidence pour 1000 naissances	0.3 - 3	0.5
Apparition des symptômes	0 – 6 jours	1 semaines – 3 mois
Age moyen à l'apparition des symptômes	12h	1 mois
Transmission	Verticale Intrapartum	Horizontale A l'accouchement Nosocomiale Dans la communauté
Porte d'entrée	Inhalation → pneumonie → translocation sanguine	Probablement intestinale
Présentation clinique	Détresse respiratoire avec pneumonie fulminante Sepsis (Méningite 5-15%)	Fièvre Bactériémie Méningite (25-70%)
Mortalité	<10%	0-6%
Sérotypes capsulaires	Tous (Ia, III, V)	III, principalement Clone hypervirulent ST17

- Méthode de typage par séquençage
 - 7 gènes conservés de ~500 pb.
 - *AdhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK*, *tkt*
 - Plusieurs allèles décrits pour chaque gène en fonction des variations de séquence observées.
 - Isolats avec le même profil allélique classés dans le même sequence-type.
 - Distinction potentielle de 4.4×10^5 génotypes

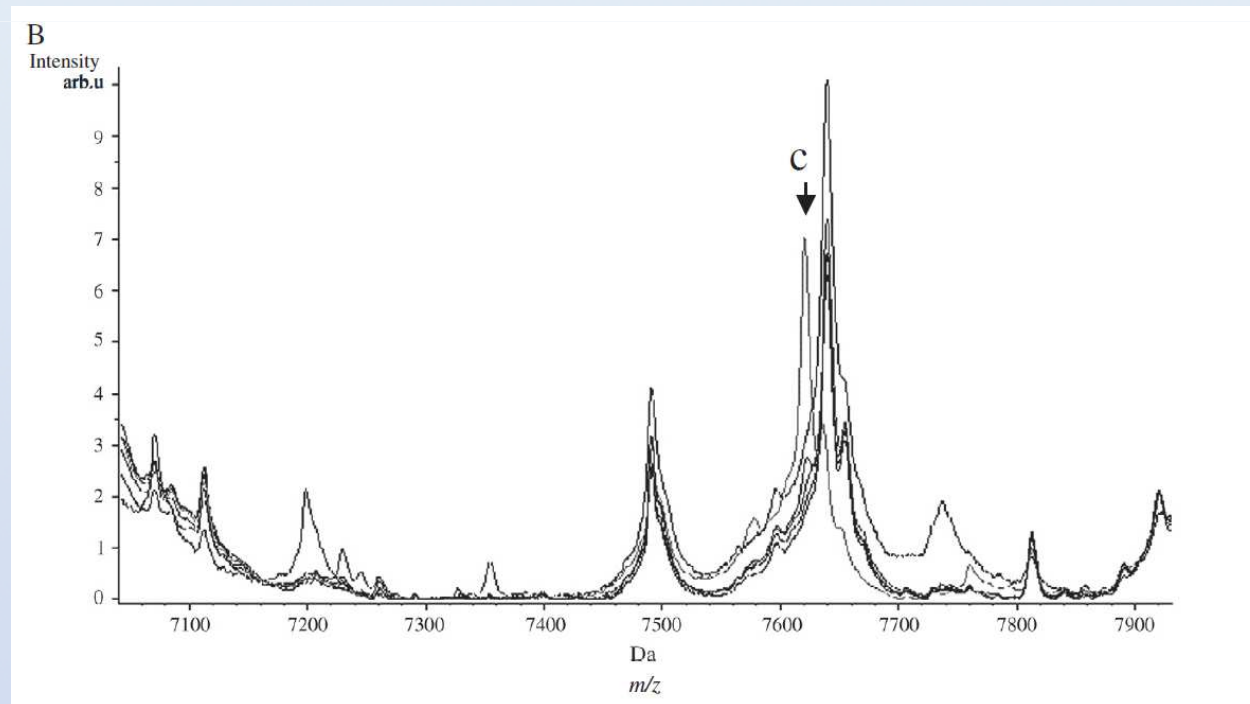
SGB: sequence typing

- Classification des ST en clonal complex (CC) sur base de leur similarité génétique



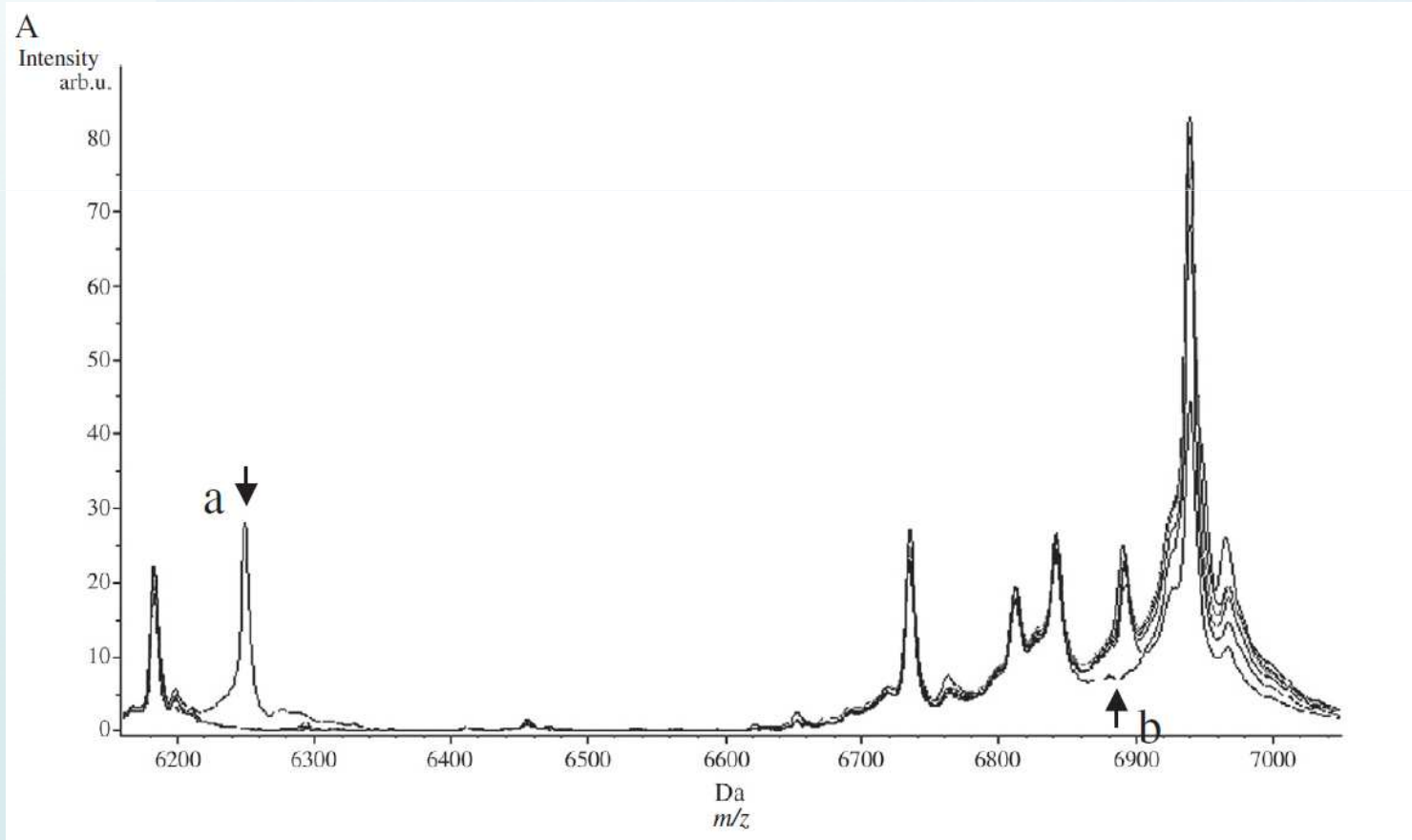
- D'après l'article de *Lartigue et al.*
- 139 souches sequence-typées
 - dont 45 ST-17 et 45 ST-1
- Ultraflex TOF/TOF III (Bruker) en mode linéaire
- Extraction éthanol-acide formique
- 5 spectres par isolats, 500 shots par spectre

- Mise en évidence de variations du spectre spécifiques de :
 - ST-17: shift du pic de 7650 Da à 7625 Da



Détermination du ST par MALDI-TOF MS

- ST1: shift du pic de 6888 Da à 6250 Da



Détermination du ST par MALDI-TOF MS

- Résultats de l'étude de *Lartigue et al.*

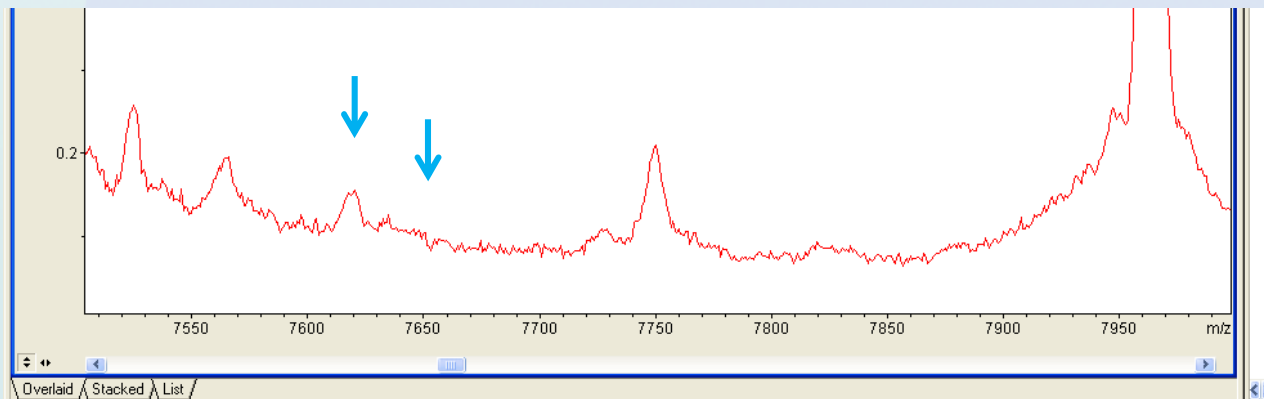
	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
ST-17	100 %	98 %	94 %	100 %
ST-1	100 %	95 %	86 %	100 %

Evaluation 1 au CHU de Liège (1)

- Printemps 2012
- Collection de 67 souches cliniques sequence-typées issues des CNR de Belgique et Tchèque

	ST1	ST17	Autres ST	Total
Origine belge	6	8	33	47
Origine tchèque	10	10	0	20
Total	16	18	33	67

- Extraction éthanol-acide formique
- Analyse sur Microflex (Bruker)
- 1 spectre par isolat, 240 tirs par spectre
- Analyse visuelle dans FlexAnalysis:
laborieux!



Exemple de
souche ST-17

- Résultats

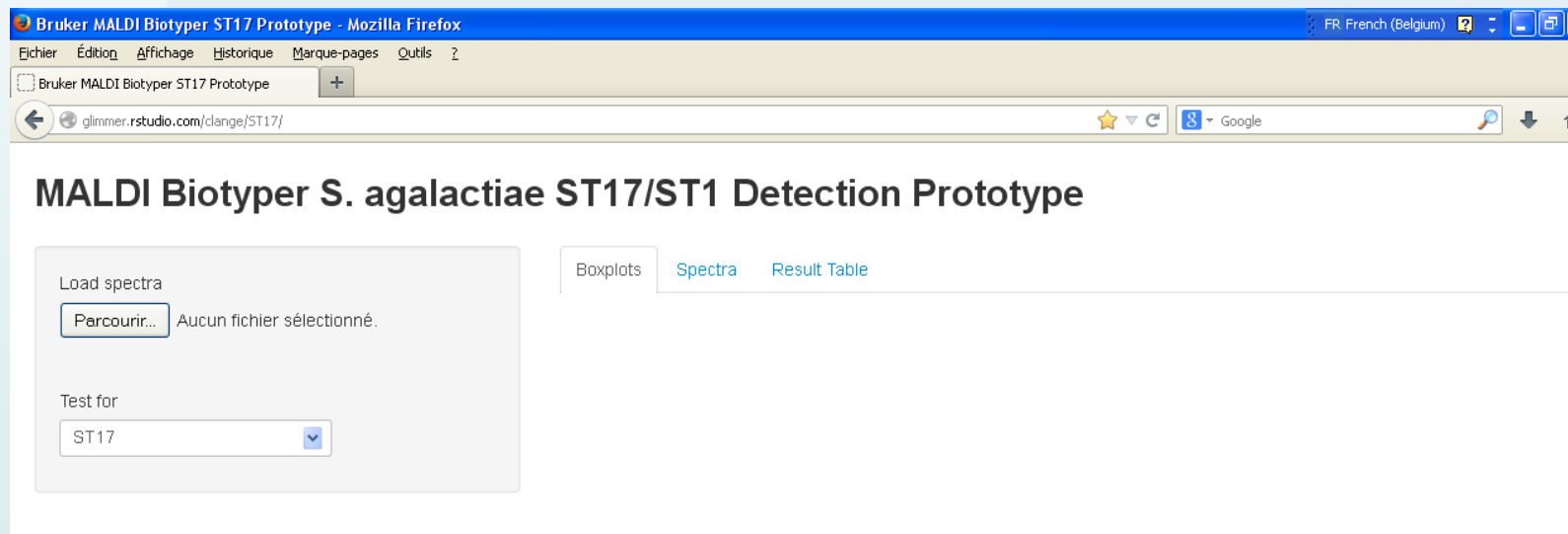
ST-17	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
article	100 %	98 %	94 %	100 %
visuel	38.80 %	100 %	100 %	81.60 %

ST-1	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
article	100 %	95 %	86 %	100 %
visuel	93.70 %	96 %	88.20 %	98 %

Bruker ST17/ST1 prototype

- Logiciel pour la détermination rapide des ST-1 et ST-17
- Calibration du spectre avec le pic à 6736 Da, conservé chez le SGB.
- Mesure d'intensité du pic présent et absent pour le ST-17 et le ST-1 → LogIQ
- $\text{LogIQ} > 0$ signifie la présence du sequence-type spécifique

- Accès via <http://glimmer.rstudio.com/clange/ST17/>



- Télécharger le fichier contenant les spectres en format .zip

- Boxplots

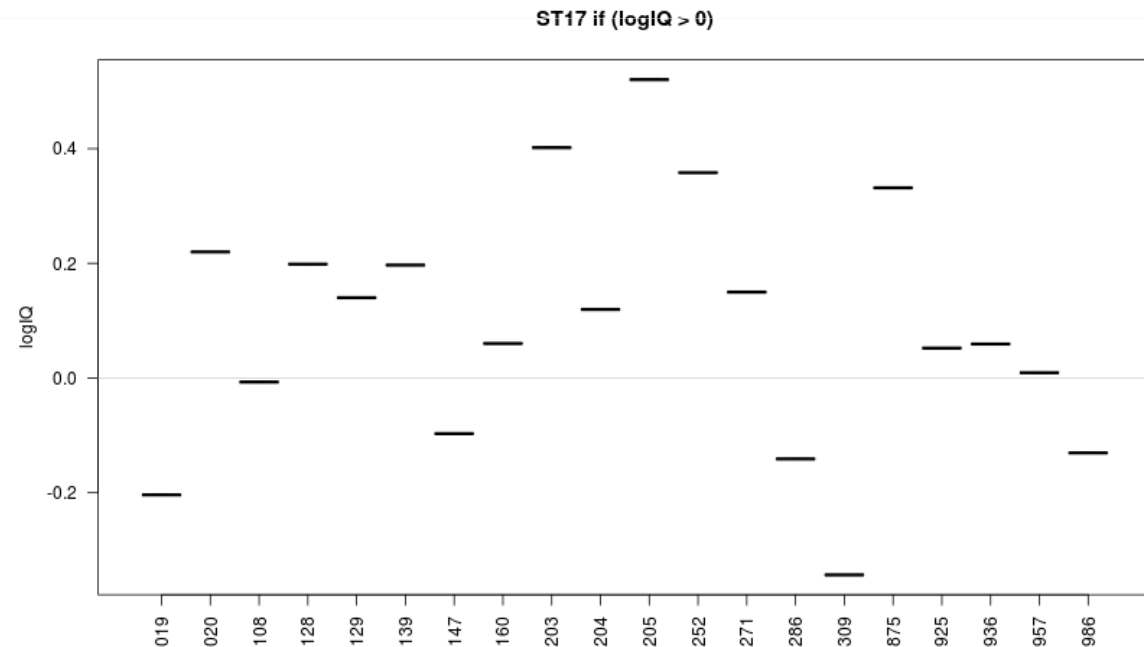
MALDI Biotyper *S. agalactiae* ST17/ST1 Detection Prototype

Load spectra
 Rn20131030.zip

Upload complete

Test for

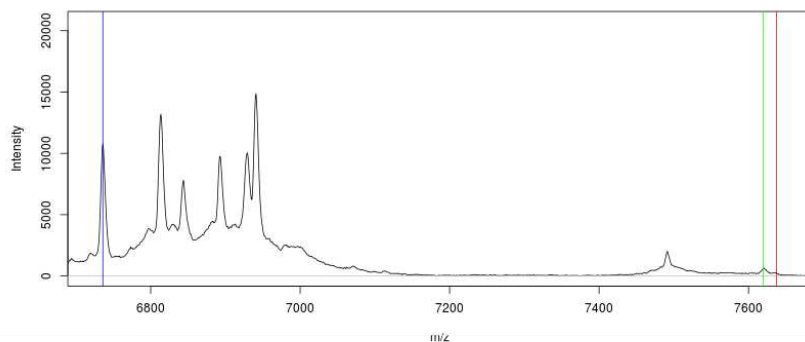
Boxplots [Spectra](#) [Result Table](#)



Bruker ST17/ST1 prototype

Boxplots Spectra Result Table

205.F1 0.52036104420406

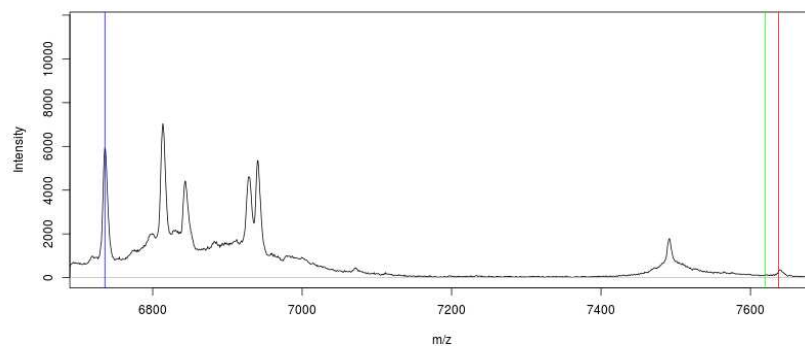


Number of Spectrum:



Boxplots Spectra Result Table

309.E9 -0.343253371120979



Number of Spectrum:



Boxplots Spectra Result Table

Download

	logIQ	sample
1	-0.20	019
2	0.22	020
3	-0.01	108
4	0.20	128
5	0.14	129
6	0.20	139
7	-0.10	147
8	0.06	160
9	0.40	203
10	0.12	204
11	0.52	205
12	0.36	252
13	0.15	271
14	-0.14	286
15	-0.34	309
16	0.33	875
17	0.05	925
18	0.06	936
19	0.01	957
20	-0.13	986

Evaluation 2 au CHU de Liège (1)

- Même collection de 67 souches
- Extraction éthanol-acide formique
- 1 spectre par isolat, 240 tirs par spectre

- ST-17 ST-1 prototype
- Zone grise de LogIQ -0.1 à 0.1
- Si zone grise: réextraction et réanalyse

- Résultats ST-17 (18)
 - 2 faux négatifs: positifs après contrôle
 - 9 faux positifs: 2 négatifs après contrôle
 - ST-1, ST-2, ST-8, ST-22, ST-182, ST-196 et ST-484 (appartient au CC 17)

ST-17	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
article	100 %	98 %	94 %	100 %
visuel	38.80 %	100 %	100 %	81.60 %
prototype	88.9 %	81.3 %	64 %	95.2 %

- Résultats ST-1 (16)
 - 1 faux positif: ST-530 (appartient au CC1)
 - 1 faux négatifs

ST-1	Sensibilité	Spécificité	Valeur prédictive positive	Valeur prédictive négative
article	100 %	95 %	86 %	100 %
visuel	93.70 %	96 %	88.20 %	98 %
prototype	93.75 %	98 %	93.75 %	98.04 %

- Identification des ST-17 et -1 du SGB par MALDI-TOF MS:
 - Rapide:
 - Extraction éthanol-acide formique + acquisition spectre: **30 minutes**
 - Extraction ADN + PCR (7) + séquençage (7) + analyse des séquences: **1 semaine**
 - Bon marché:
 - MALDI-TOF MS: ~ **0.50 euros/souche**
 - Biologie moléculaire: ~ **150 euros/souche**

- Identification des ST-17 et -1 du SGB par MALDI-TOF MS:
 - Qualité des résultats
 - Très bonne pour ST-1
 - Sensibilité et spécificité moyennes pour ST-17
 - Augmenter le nombre de spectres enregistrés par échantillon
 - Augmenter le nombre de tirs par spectre

- Intérêt de l'identification rapide des ST-17:
 - Groupe génotypique hautement associé aux méningites du nouveau-né
 - Persistance de la colonisation des SGB ST-17 après prophylaxie intrapartum.
 - **Assurer un suivi plus attentif des mamans détectées positives à 35 semaines de grossesse**
 - ❖ S'assurer d'une prophylaxie efficace
 - ❖ Informer la maman sur les mesures d'hygiène à respecter pour éviter une transmission horizontale
 - **Assurer une surveillance plus étroite des bébés nés de mamans colonisées par du ST-17**
 - ❖ Réagir rapidement en cas de fièvre