



Le ReJMiC présente :



# Introduction Travaux pratiques

Journée d'initiation à la bio-informatique n°2  
24 juin 2022

A. Godmer  
N. Mohammad

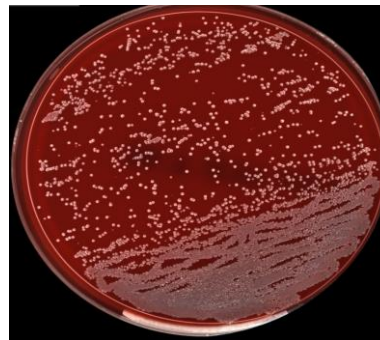


# Diagnostic conventionnel en bactériologie

Examen  
microscopique



24h  
culture



48h  
identification/antibiogramme

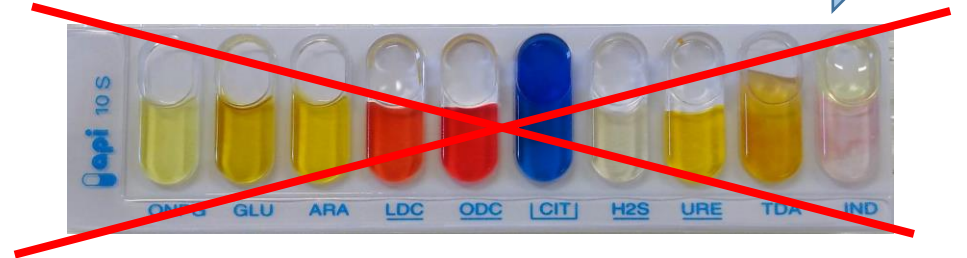


# Diagnostic conventionnel en bactériologie

Examen  
microscopique

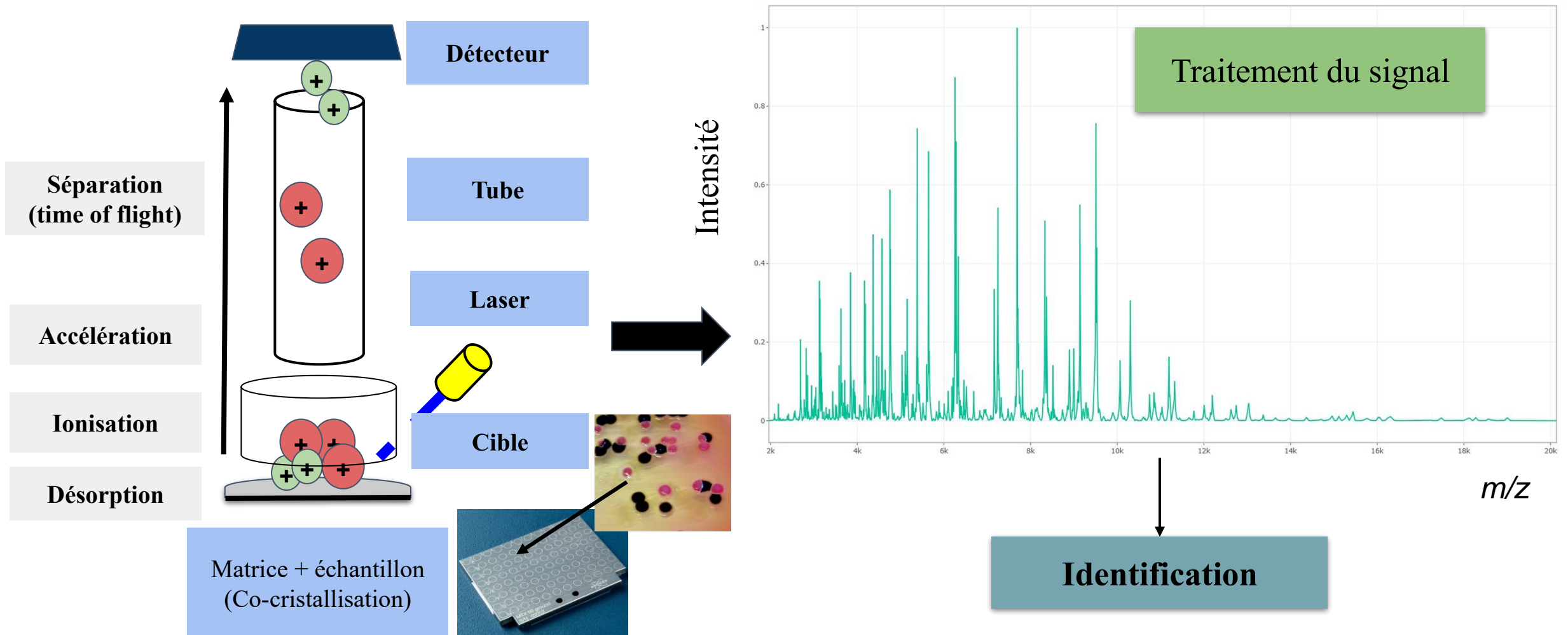
24h  
culture

48h  
identification/antibiogramme

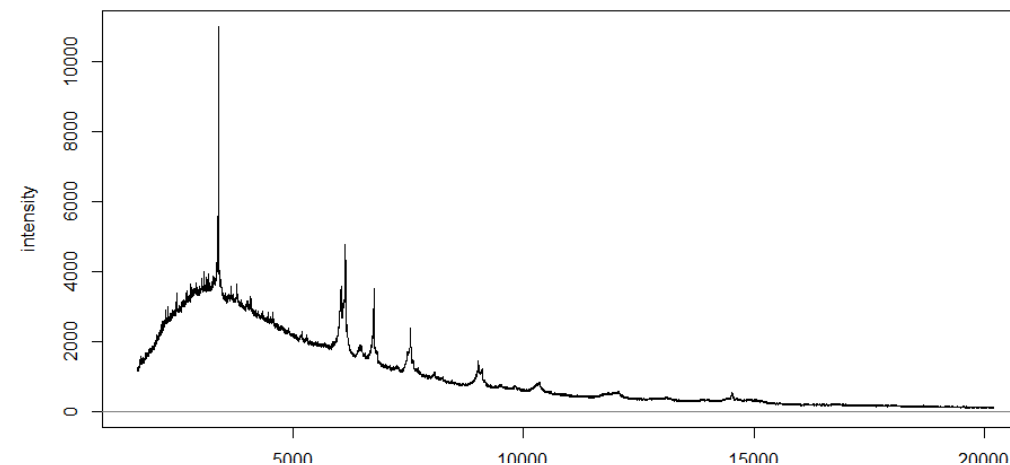


Matrix Assisted Laser Desorption Ionization  
Time Of Flight

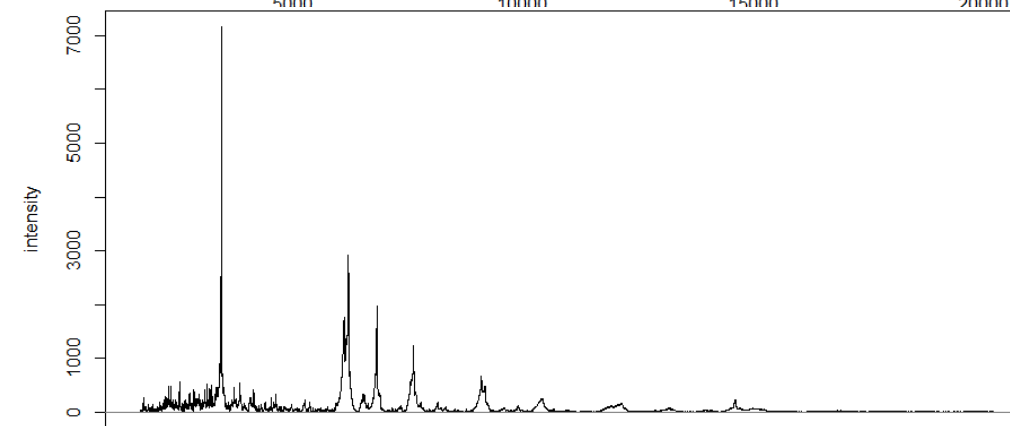
# Principe du MALDI-TOF MS



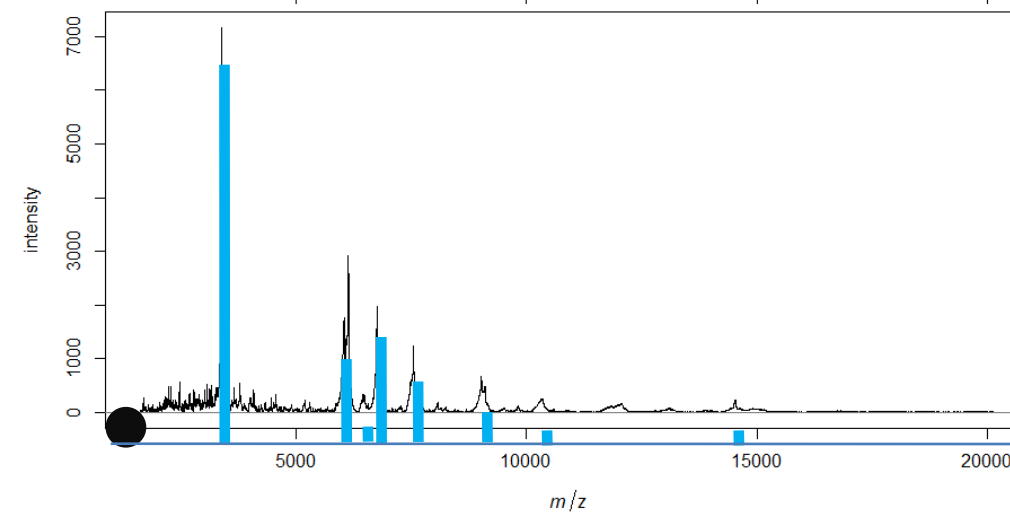
Raw spectrum



Baseline correction



Smoothing and  
Selection of relevant peaks  
among 22,000 acquired values



Matrice d'intensités

	Pic 1 (m/z)	Pic .. (m/z)	Pic n (m/z)
Souche A			
Souche B			
Souche ...			
Souche n			

# Les limites du MALDI-TOF SM

## Identification

- Espèces proches spectralement
- Bases de données erronées
- Espèces peu adaptée à la SM



→ Complexe *Enterobacter cloacae*

→ Complexe *Mycobacterium abscessus*

## Résistance aux antimicrobiens



→ Complexe *Mycobacterium abscessus* et clarithromycine

## Virulence

- Peu utilisé
- En recherche uniquement



→ *Clostridioides difficile*

→ *E. coli* et Shigatoxines



# Les limites du MALDI-TOF SM

## Identification

- Espèces proches spectralement
- Bases de données erronées
- Espèces peu adaptée à la SM



→ Complexe *Enterobacter cloacae*

→ Complexe *Mycobacterium abscessus*

## Résistance aux antimicrobiens



→ Complexe *Mycobacterium abscessus* et clarithromycine

## Virulence

- Peu utilisé
- En recherche uniquement



→ *Clostridioides difficile*

→ *E. coli* et Shigatoxines



# A vous de jouer !

## Rapid MALDI-TOF Mass Spectrometry Strain Typing during a Large Outbreak of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*

Martin Christner<sup>1\*</sup>, Maria Trusch<sup>2</sup>, Holger Rohde<sup>1</sup>, Marcel Kwiatkowski<sup>3</sup>, Hartmut Schlüter<sup>3</sup>, Manuel Wolters<sup>1</sup>, Martin Aepfelbacher<sup>1</sup>, Moritz Hentschke<sup>1</sup>

### Abstract

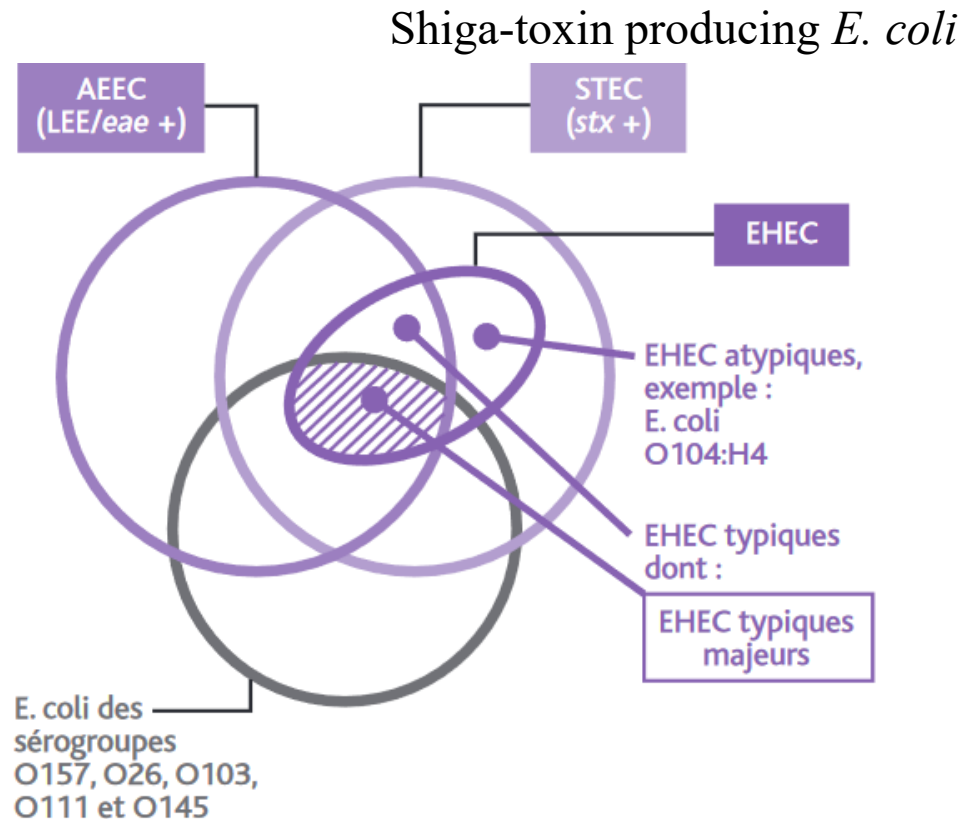
**Background:** In 2011 northern Germany experienced a large outbreak of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O104:H4. The large amount of samples sent to microbiology laboratories for epidemiological assessment highlighted the importance of fast and inexpensive typing procedures. We have therefore evaluated the applicability of a MALDI-TOF mass spectrometry based strategy for outbreak strain identification.

**Methods:** Specific peaks in the outbreak strain's spectrum were identified by comparative analysis of archived pre-outbreak spectra that had been acquired for routine species-level identification. Proteins underlying these discriminatory peaks were identified by liquid chromatography tandem mass spectrometry and validated against publicly available databases. The resulting typing scheme was evaluated against PCR genotyping with 294 *E. coli* isolates from clinical samples collected during the outbreak.

**Results:** Comparative spectrum analysis revealed two characteristic peaks at m/z 6711 and m/z 10883. The underlying proteins were found to be of low prevalence among genome sequenced *E. coli* strains. Marker peak detection correctly classified 292 of 293 study isolates, including all 104 outbreak isolates.

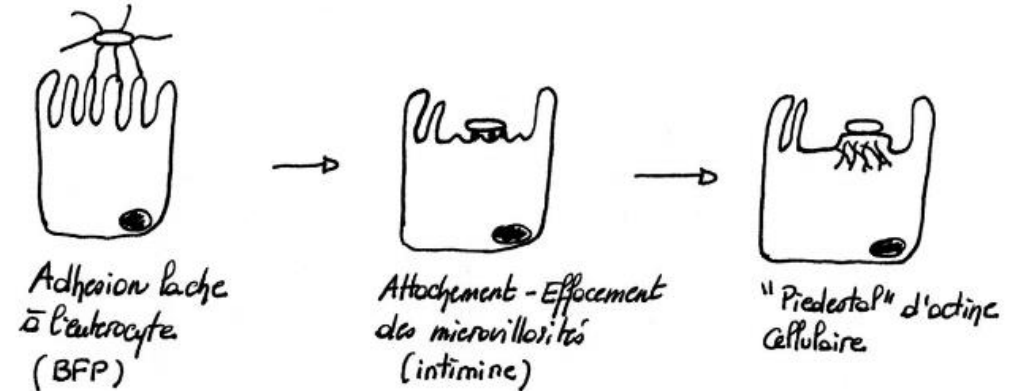
**Conclusions:** MALDI-TOF mass spectrometry allowed for reliable outbreak strain identification during a large outbreak of Shiga-Toxigenic *E. coli*. The applied typing strategy could probably be adapted to other typing tasks and might facilitate epidemiological surveys as part of the routine pathogen identification workflow.

# La terreur *E. coli* O104:H4



**Légende :** toutes les souches possédant le LEE, incluant le gène *eae*, quels que soient les signes cliniques associés, appartiennent au groupe des AEEC. Toutes les souches possédant les gènes codant pour les toxines Stx, quels que soient les signes cliniques associés, sont des STEC. Les EHEC sont associées chez l'Homme à une colite hémorragique et/ou à un syndrome hémolytique et urémique et produisent des toxines Stx. Ainsi, toutes les EHEC sont des STEC mais toutes les souches STEC, même celles qui possèdent le LEE, ne sont pas systématiquement associées à la maladie chez l'Homme. La grande majorité des EHEC possèdent le LEE et les souches EHEC LEE+ sont dénommées EHEC typiques. Les souches EHEC typiques appartenant aux sérotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, et O145:H28 (et leurs dérivés non mobiles) sont les souches le plus souvent associées à des signes cliniques graves (SHU) et aux épidémies et sont dites souches « EHEC typiques majeures ».

- Adhésion à la surface des entérocytes :
  - Facteur d'adhésion codé par un plasmide EAF
  - Facteurs de pathogénécité codés par le gène *eae* de l'intimine
  - Lésions histopathologiques de la bordure en brosse



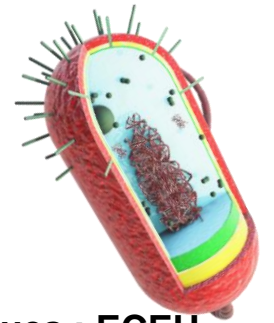
**Souches entéro-hémorragiques : ECEH O157, H7**  
= Syndrome dysentérique avec invasion et destruction de la muqueuse  
→ Colites hémorragiques.  
→ Possible complication en SHU  
- Production de **Vérotoxines Shiga-like (VT)** codées par un bactériophage (gène *Stx1* et *Stx2*)

<https://beep.i12.dir/MEM14>

<https://microbiologiemeintestinales/>

# La terreur *E. coli* O104:H4

- Production d'une shigatoxine,
- Facteur d'adhésion à la muqueuse digestive est liée à la présence des *fimbriae* (*E. coli* entéroaggrégants (EAEC))
- Facteurs de virulence de *E. coli* extra-intestinaux (EXPEC).
- Production d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu type CTXM15

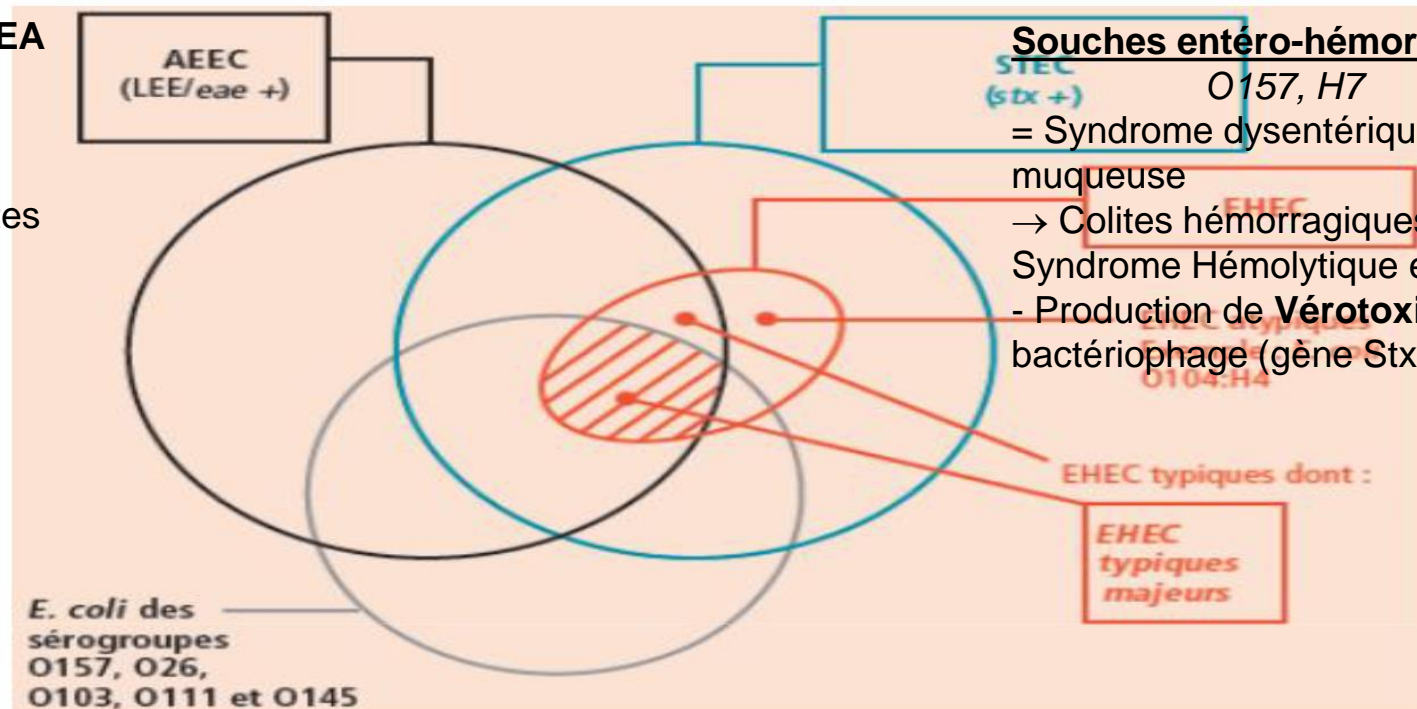


## Souches entéro-aggrégatives : ECEA

= Syndrome dysentérique avec inflammation de la sous muqueuse

→ Diarrhées infantiles

- Adhésion à la surface des entérocytes
- Formation d'agrégats en aspect d'« amas de briques », lésions histopathologiques



## Souches entéro-hémorragiques : ECEH

O157, H7

= Syndrome dysentérique avec invasion et destruction de la muqueuse

→ Colites hémorragiques. Possible complication en SHU (Syndrome Hémolytique et Urémique)

- Production de **Vérotoxines Shiga-like (VT)** codées par un bactériophage (gène Stx1)

# Typage

## ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE (ECP)(PFGE)

### PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

- isolement des souches, cultures
- intégration des bactéries dans des blocs d'agarose (« plug »)
- lyse in situ des bactéries
- digestion par endonucléase(s) 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 → **dendogrammes**

