



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire  
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

# Apport des géloses Id-Fungi Plates™ pour l'identification des champignons filamenteux par MALDI-Biotyper™

Marie Gladys ROBERT, Charlotte ROMERO, Céline DARD,  
Tahinamandranito RASAMOELINA, Muriel CORNET,  
Danièle MAUBON



# Constats

Introduction



Grands brûlés

Diabètes

Traumatismes cutanés

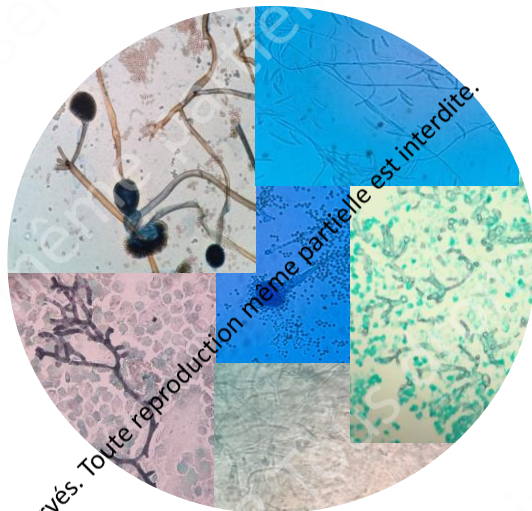
SOT

Corticoïdes au long terme

Chimiothérapie

VIH

hémopathie maligne



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# Constats

Introduction



Espèces cryptiques

Différenciation difficile

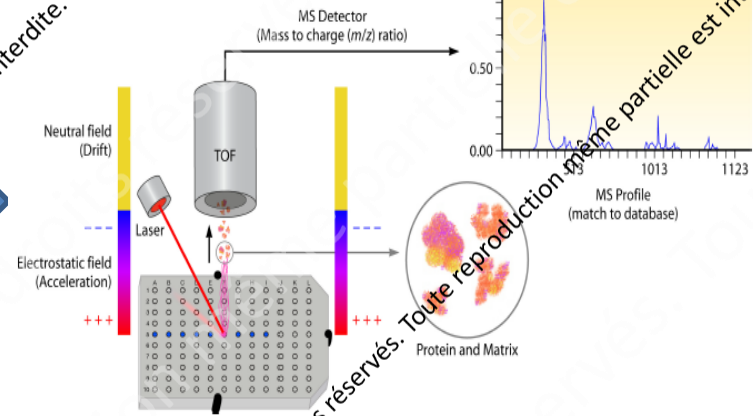
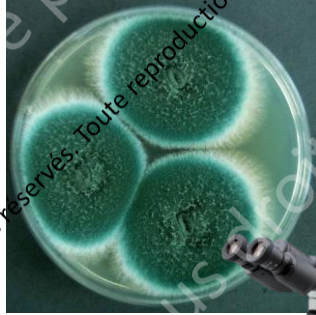
	AMB	CSP	ITC	VRC	POS
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Aspergillus lentulus</i>	Red	Green	Red	Red	Green
<i>A. fumigatiaffinis</i>	Red	Green	Red	Red	Green
<i>Aspergillus terreus</i>	Orange	Green	Green	Green	Green
<i>Fusarium oxysporum</i>	Green	Red	Orange	Orange	Red
<i>Fusarium solani</i>	Orange	Red	Red	Red	Red
<i>Rhizopus spp.</i>	Green	Red	Red	Red	Green
<i>Mucor spp.</i>	Green	Red	Red	Red	Orange
<i>Lomentospora prolificans</i>	Red	Red	Red	Red	Red
<i>Scedosporium apiospermum</i>	Orange	Red	Orange	Orange	Green

Niveau de sensibilité

- Elevé
- Intermédiaire / Variable
- Bas

# Constats

## Introduction



Clark et al., 2013

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# Constats

## Difficultés d'identification des filamenteux par MALDI-TOF

Introduction



### Impact des CF dans la gélose

Prélèvement difficile

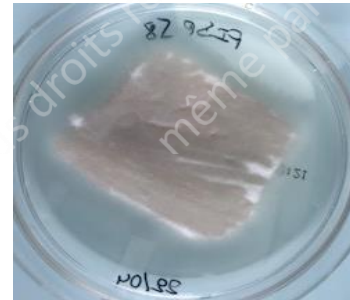
Temps +++

Scores faibles

### Nécessité de protocole d'extraction

Temps +++

Nécessité de Standardisation



# Les géloses IdFP

## Développement



Nouvelle **gélose** pour **faciliter** l'**identification** des champignons filamenteux en **MALDI-TOF MS**



## Principe

Membrane de 4 x 4 cm sur la gélose

- Laisse passer les nutriments
- Limite l'ancrage du CF dans la gélose

## Avantages

- Prélèvement du CF facilité
- Gain de temps ++
- Pas d'interférence des composés de la gélose

Membrane



Introduction



# Objectifs



1

## IDENTIFICATION

- Temps gagné/praticabilité
- Performances
  - Genres / espèces
  - Scores MALDI-TOF MS

### 2 protocoles :

Dépôt direct  
Extraction Et-OH

2

## IdFP comme seule gélose de repiquage

- Antifongigramme
- Microscopie



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



# Champignons testés

83

<i>Aspergillus</i>	36
<i>fumigatus</i>	24
<i>flavus/oryzae</i>	8
autre	14
Mucorales	4
<i>Fusarium</i>	9
Dermatophytes	9
Others	24

11 Prélèvements  
patients

72 repiquages



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

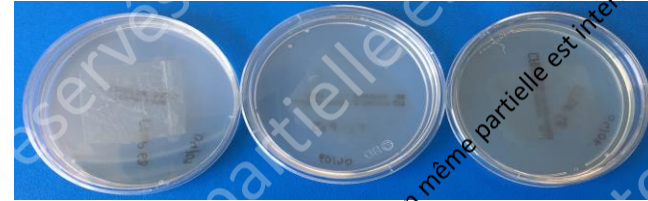
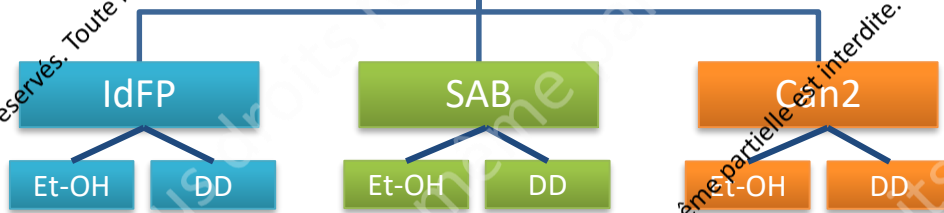

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



# Protocole

Suspension de spores  
OU  
Prélèvement patient

Bruker Taxonomy (8691 MSP)  
Filamentous fungi (364 MSP)  
NIH (365 profiles)

Valeur	Description	Symboles	Couleur
2.00 - 3.00	Identification avec une haute confiance	(+++)	vert
1.70 - 1.99	Identification avec une faible confiance	(+)	jaune
0.00 - 1.69	Aucune identification possible	(-)	rouge

Identification  
Score

JD échantillon :

Nature : BA  Crachat  LBA  Ongle  Piquage  Autre

Espèce : \_\_\_\_\_

Date ensemencement géloses : \_\_\_\_\_

Temps entre repliquage et passage (J) : \_\_\_\_\_

FIDP : \_\_\_\_\_

Aspect macroscopique :  
 Pauvre/non sporulé  / Pevre/sporulé  / Riche/non sporulé  / Riche/sporulé

Prélèvement sur boîte :  
 Aisé  / Modéré  / Fastidieux

Taille du cutoz final :  
 Invisible/à peine visible  / Petit  / Important

Maldi direct + AF  
 Positions : \_\_\_\_\_ Identification : \_\_\_\_\_ Scores : \_\_\_\_\_

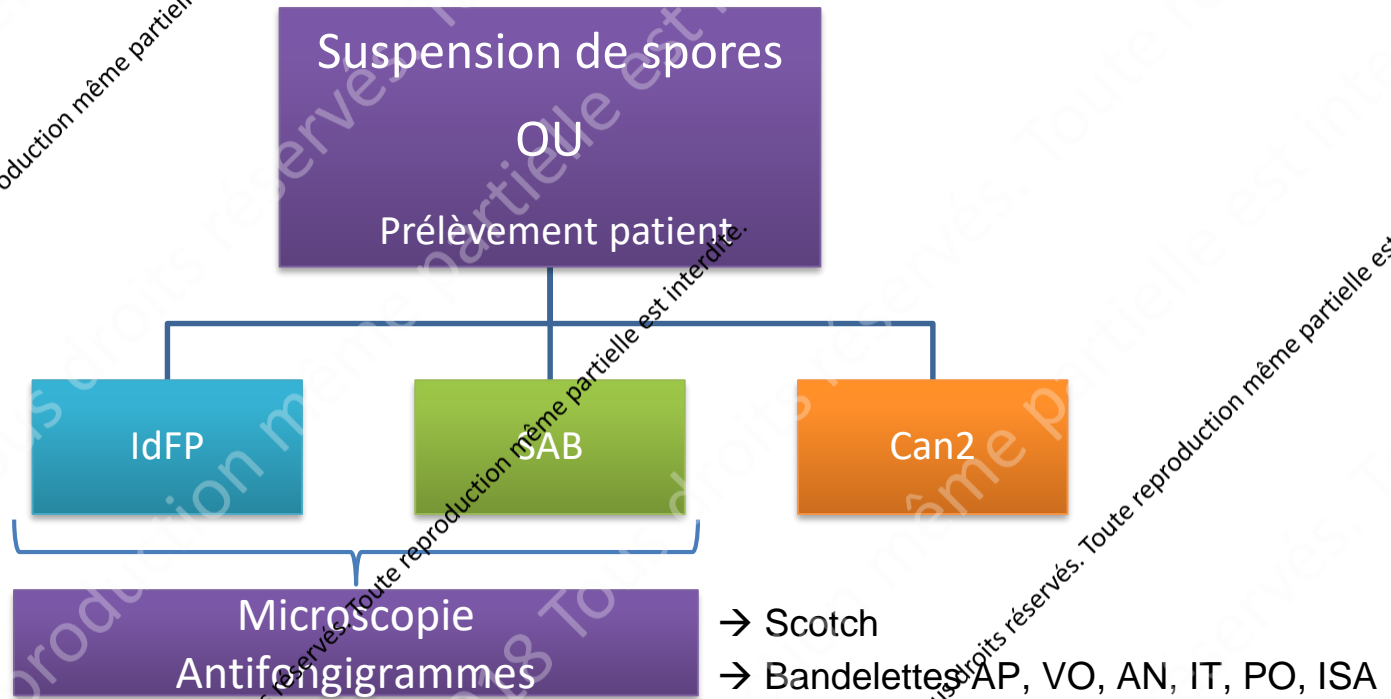
Maldi EtOH/AF  
 Positions : \_\_\_\_\_ Identification : \_\_\_\_\_ Scores : \_\_\_\_\_

Dernière croissance détectée à J + X jours (max = 14) : \_\_\_\_\_

Nouvelle espèce détectée : \_\_\_\_\_

Croissance  
Facilité  
Matériel

# Protocole



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# CROISSANCE

■ Pauvre/ non sporulé

■ Pauvre/sporulé

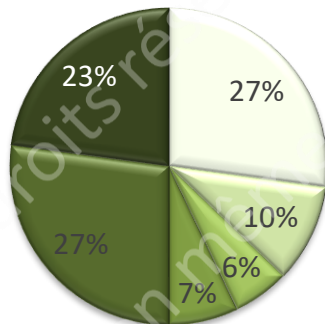
■ Modéré/sporulé

■ Modéré/non sporulé

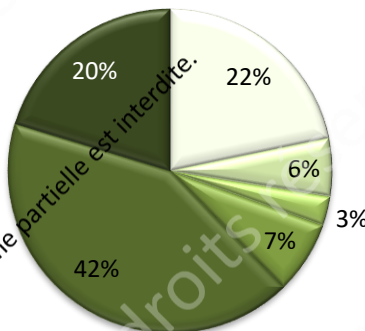
■ Riche/non sporulé

■ Riche/sporulé  
(orientation ident)

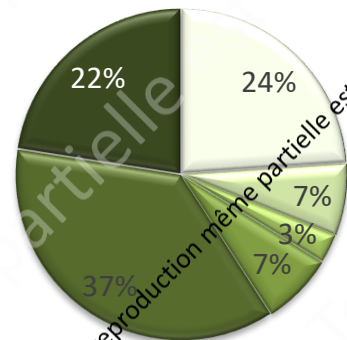
## IdFP



## SAB



## CAN2

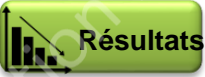


**IdFP : léger retard de croissance**

Id préférable sur CFU jeune et non sporulée

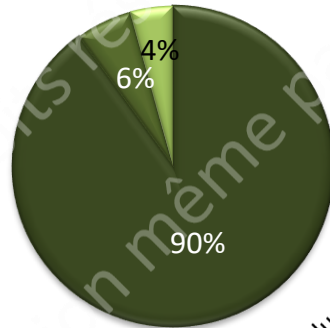


# GESTE TECHNIQUE

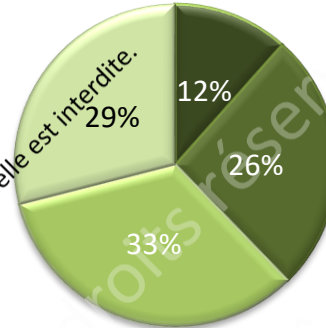


- Aisé
- Moyen
- Fastidieux
- Très fastidieux

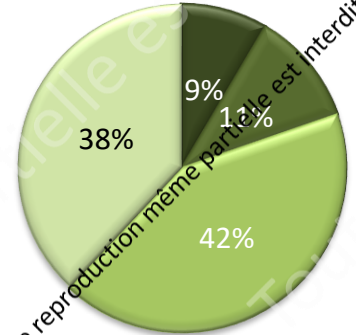
## IdFP



## SAB



## CAN2



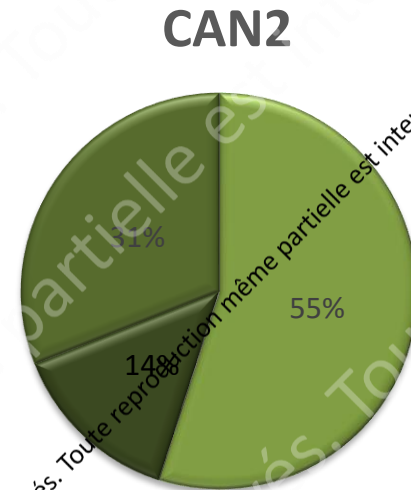
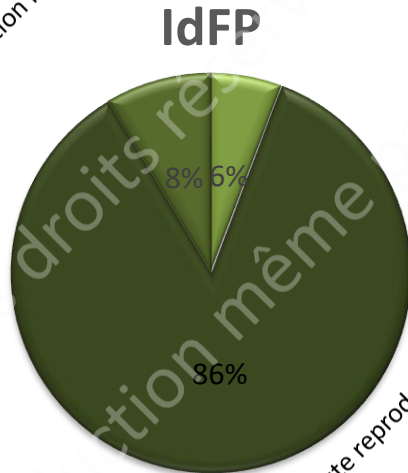
Prélèvement plus aisé sur IdFP

→ Gain de temps +++

# MATERIEL



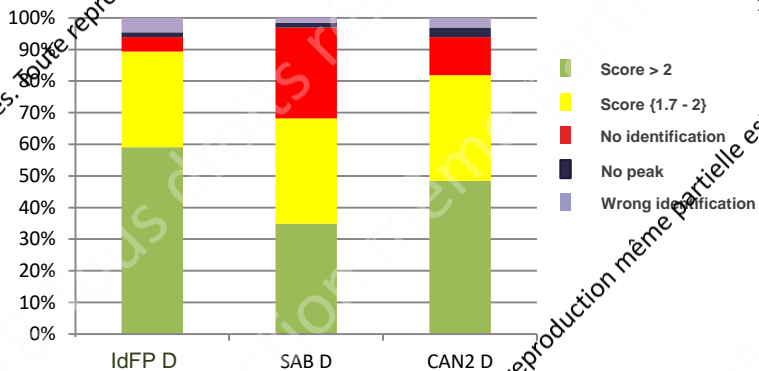
- à peine visible/invisible
- Important
- Petit



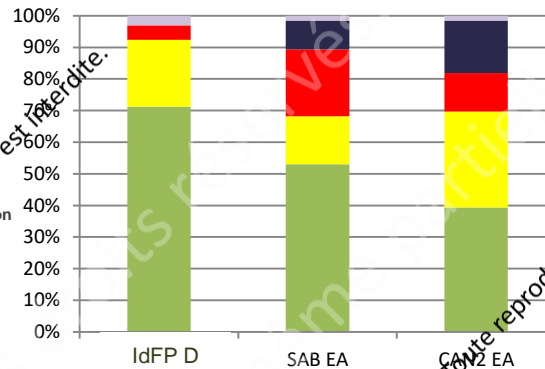
Culot plus important sur IdFP  
→ Qualité des spectres

# IDENTIFICATION

DT + AF



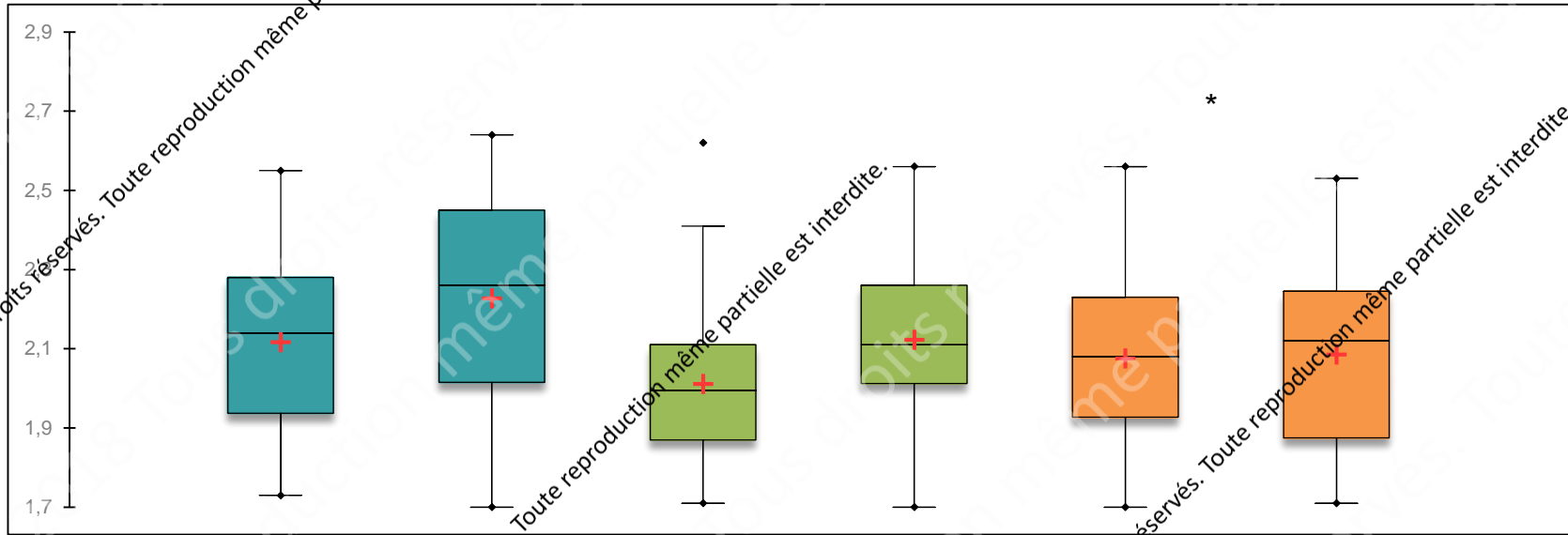
Et-OH




**Et-OH: scores > 2 +++**  

**IdFP: DT + AF:  +  = 80%**  
**Et-OH:  +  = 92%**

# SCORES > 1,7



\* : Différence non significative

IdFP

Sab

CAN2

EtOH : Higher scores  
IdFP: Higher scores

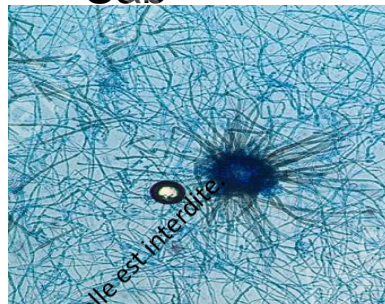


# MICROSCOPIE

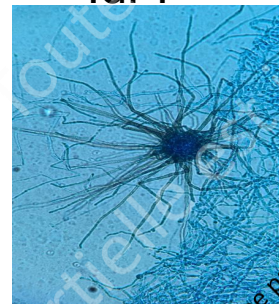


Identification par  
microscopie  
réalisable à partir  
des IdFP

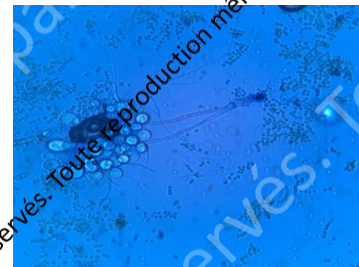
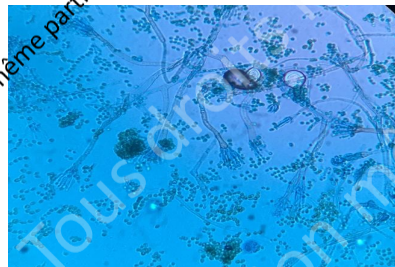
*Chaetomium globosum*



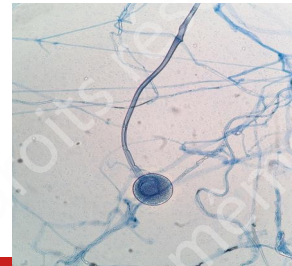
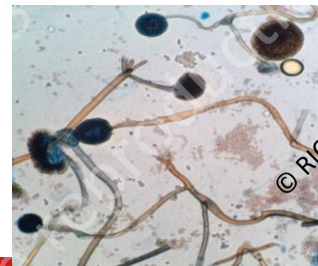
IdFP



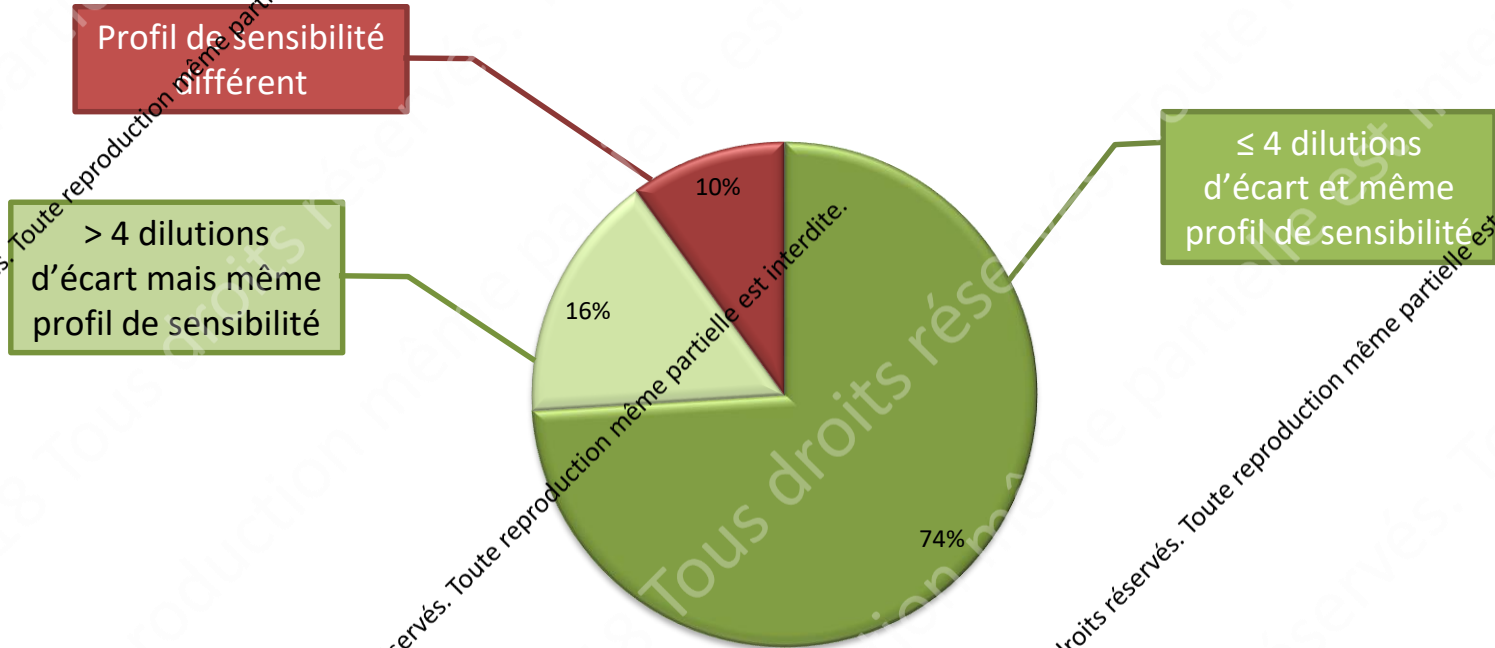
*Aspergillus nidulans*



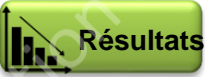
*Rhizopus oryzae*



# ANTIFONGIGRAMME



ATF à partir de IdFD et de Sab ne diffèrent pas significativement ( $p = 0,22$ )



© RICAI 2018 Tous droits réservés.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# En résumé

## Les géloses IdFP améliorent l'identification de CF par Maldi

- Technique : Temps ++
- Matériel : Qualité
- Identification : Plus d'identification acceptées
- Scores : Amélioration des scores

## IdFP peut être utilisée comme seule gélose de repiquage

- Aspects microscopiques comparables (sab vs IdFP)
- ATF comparables (sab vs IdFP)



# Discussion

## Ensemencement direct des prélèvements sur IdFP

- Pas de plus-value dans notre étude
- Membrane sur une surface restreinte de la gélose
- Mélanges nécessitant des repiquages
- Autres applications ? Dermatophytes ? Hygiène ?

## ATF : Rares différences de sensibilité vs Sabouraud

- Reproductibilité ? Variabilité inter-opérateur ? Délais d'incubation ?
- Clones différents

## Autres applications

- Création de MSP/ Matériel pur / qualité des spectres



# Merci



Charlotte ROMERO, Céline DARD, Tahinamandranto RASAMOELINA,  
Muriel CORNET & Danièle MAUBON

CONIDIA |



Sébastien VACHER & Nicolas BELLE

Guillaume BOIS-SALVARO

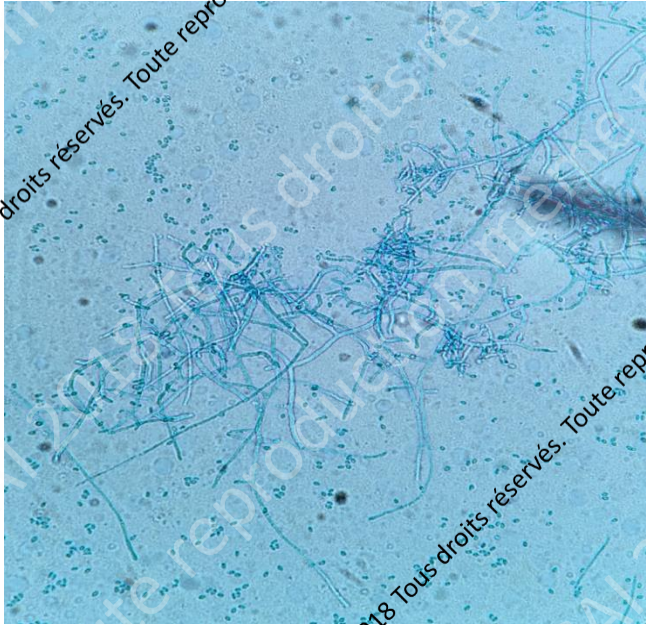
# References

1. Normand A-C, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, et al. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. BMC Microbiol
2. Stein M, Tran V, Nichol KA, Lagacé-Wiens P, Pieroni P, Adam HJ, et al. Evaluation of three MALDI-TOF mass spectrometry libraries for the identification of filamentous fungi in three clinical microbiology laboratories in Manitoba, Canada. Mycoses. 1 oct 2018;61(10):743-53.
3. Becker PT, de Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. Med Mycol. 1 nov 2014;52(8):826-34.
4. Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Clin Microbiol. févr 2017;55(2):369-79.
5. Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. Expert Review of Proteomics. avr 2013;10(3):151-64.
6. Ranque S, Normand A-C, Cassagne C, Murat J-B, Bourgeois N, Dalle F, et al. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. Mycoses. 1 mars 2014;57(3):135-40.
7. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. Clin Microbiol Rev. juill 2013;26(3):547-603.
8. Cassagne C, Ranque S, Normand A-C, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. PLoS One
9. Cassagne C, Normand A-C, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. Mycoses. 1 nov 2016;59(11):678-90.



# 65 : *Trichoderma longibrachiatum*

**SAB**



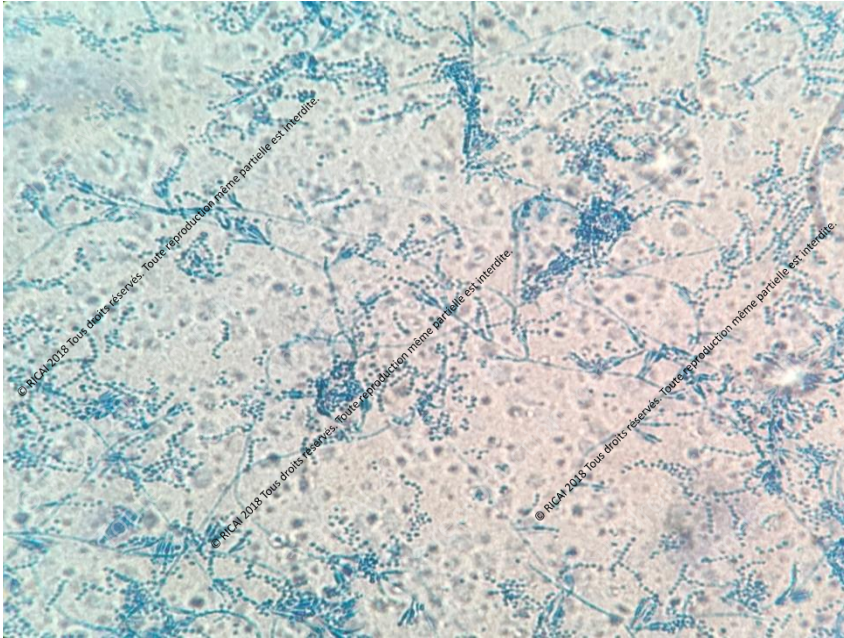
**FIDP**



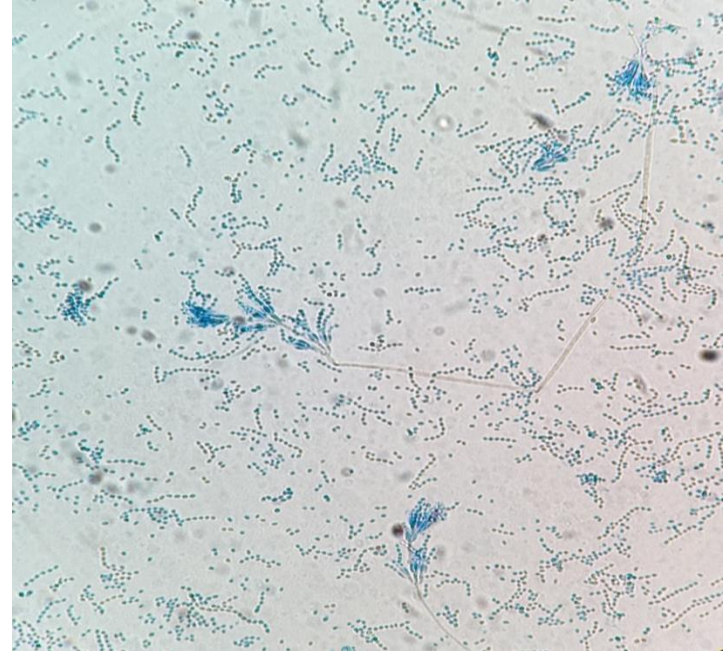


# 66 : *Purpureocillium lilacinum*

**SAB**

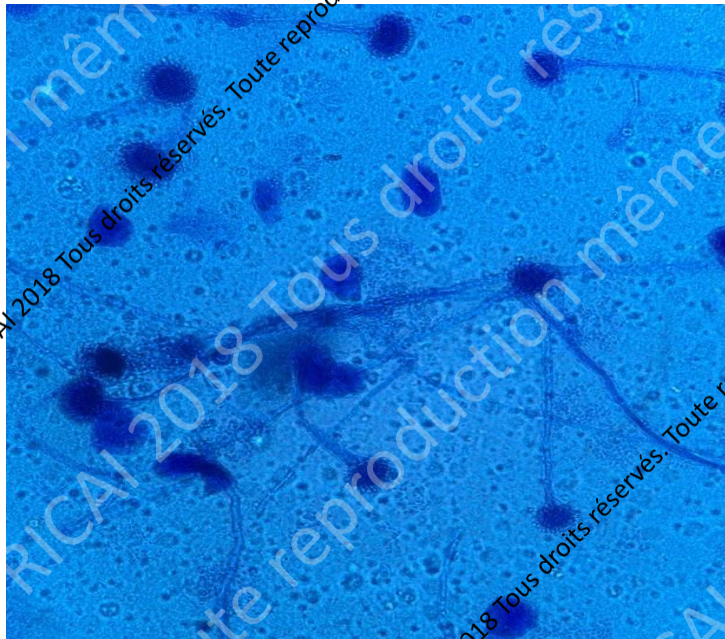


**FIDP**

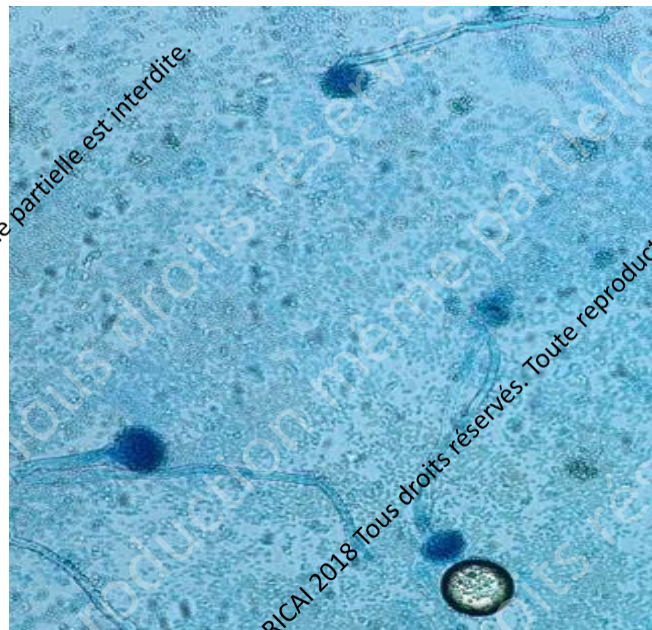


# 68 : *Aspergillus fumigatus*

**SAB**



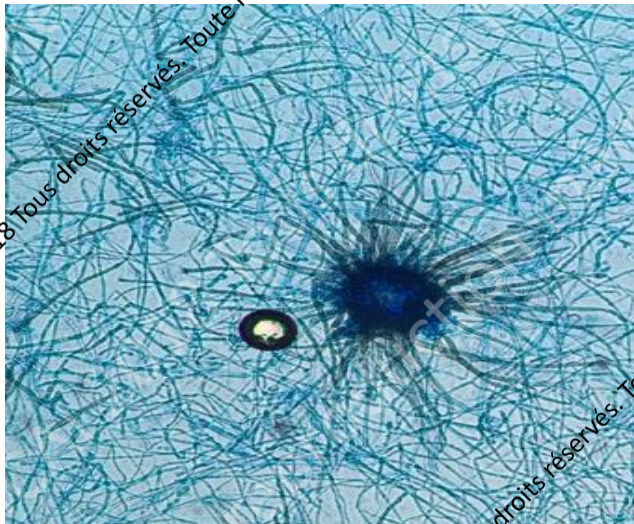
**FIDP**





# 71 : *Chaetomium globosum*

**SAB**

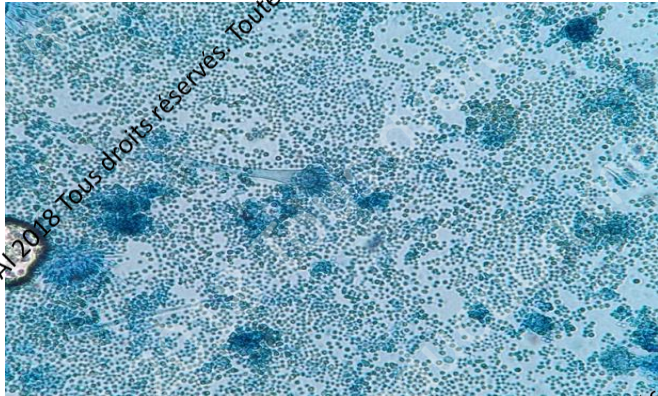


**FIDP**

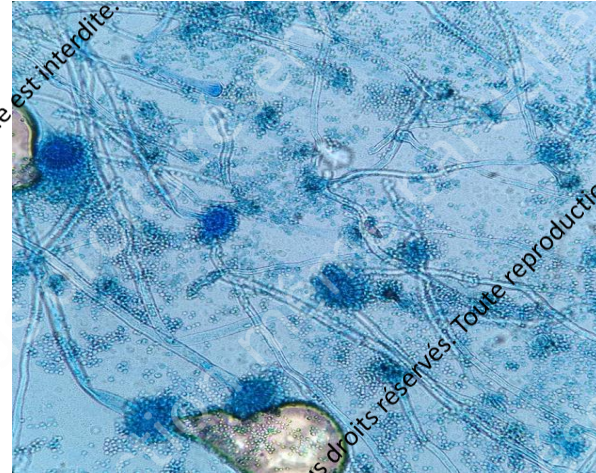


# 73 : *Aspergillus fumigatus*

**SAB**



**FIDP**



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

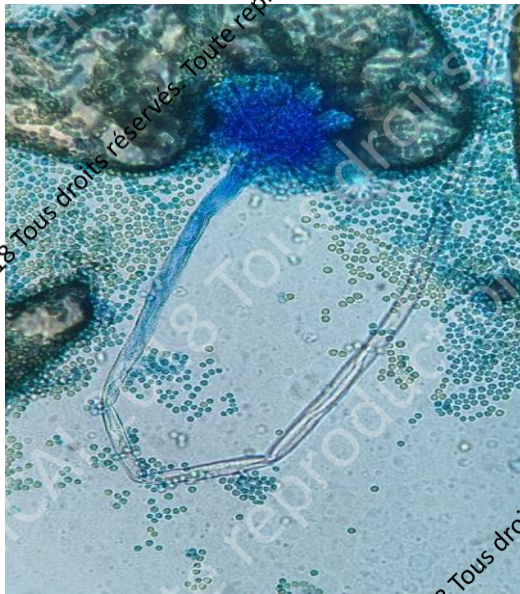
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

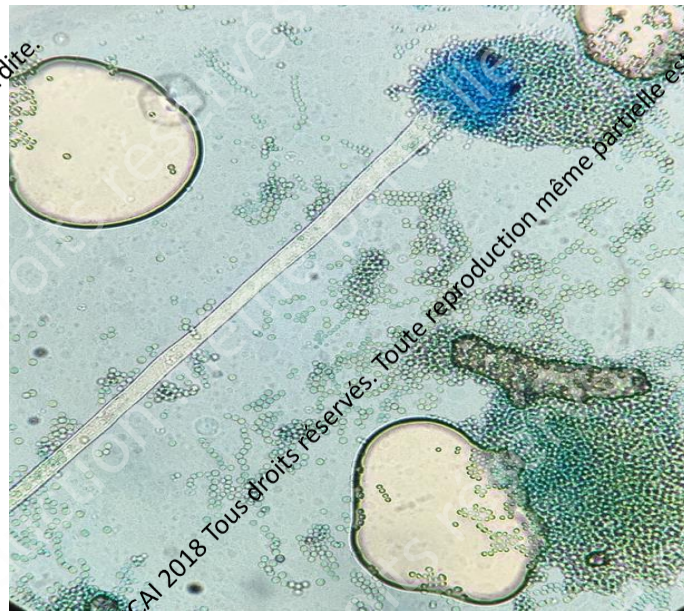


# 74 : *Aspergillus flavus* / *oryzae*

**SAB**



**FIDP**



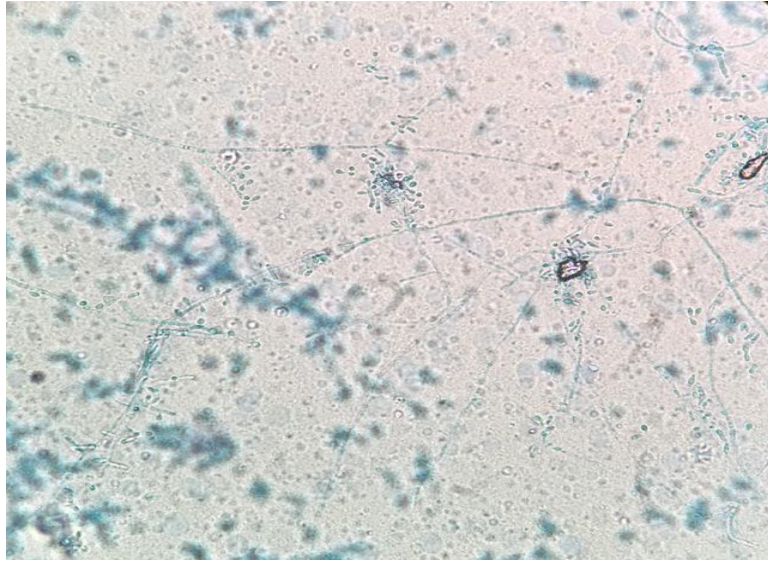
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

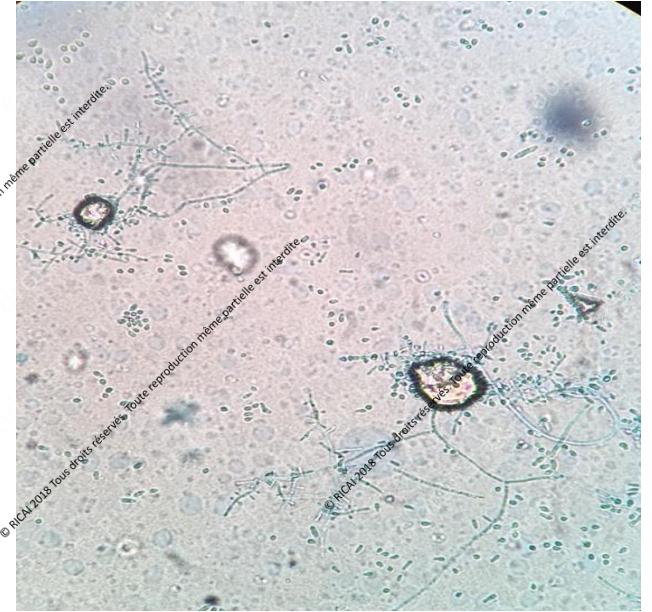
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# 76 : *Trichophyton tonsurans* ou *mentagrophytes*

SAB



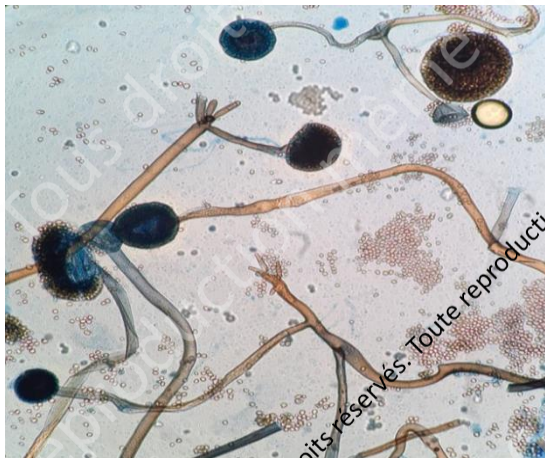
FIDP



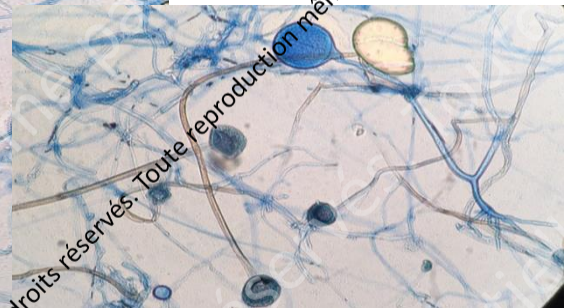
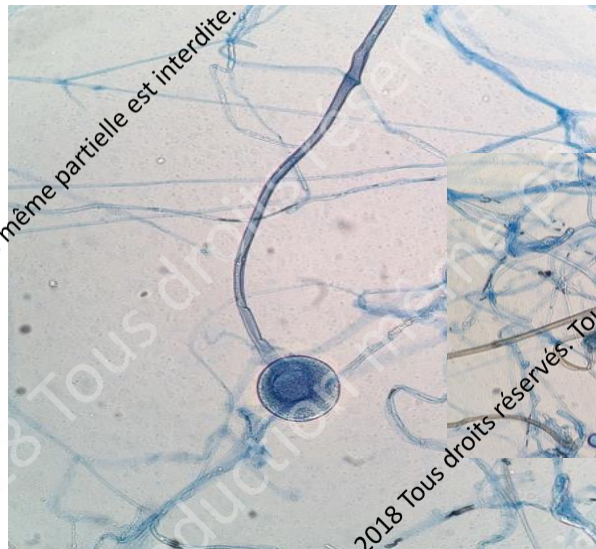


# 78 : *Rhizopus oryzae*

**SAB**



**FIDP**



Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

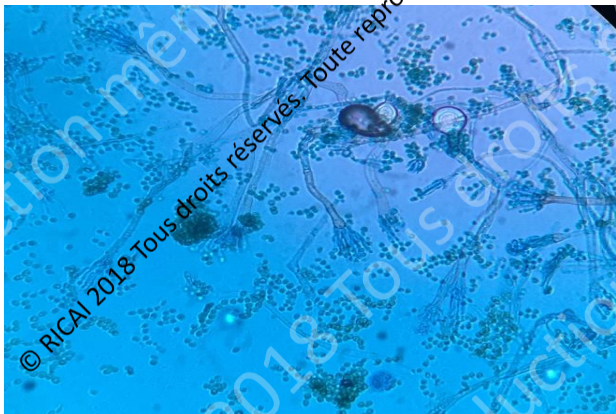
Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

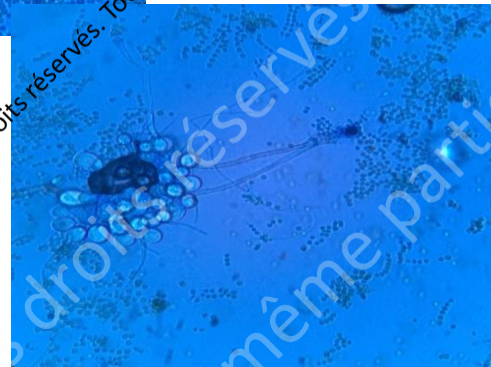
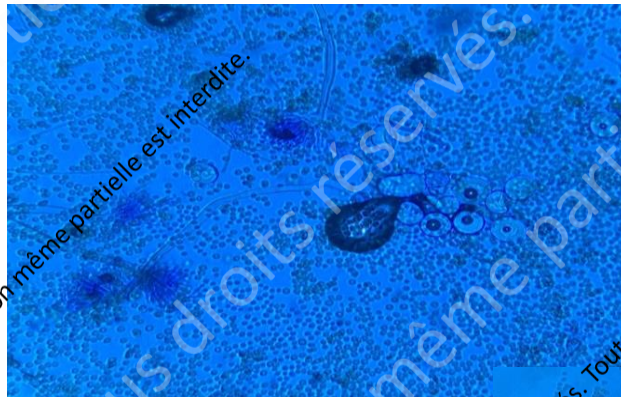


# 79 : *Aspergillus nidulans*

**SAB**



**FIDP**



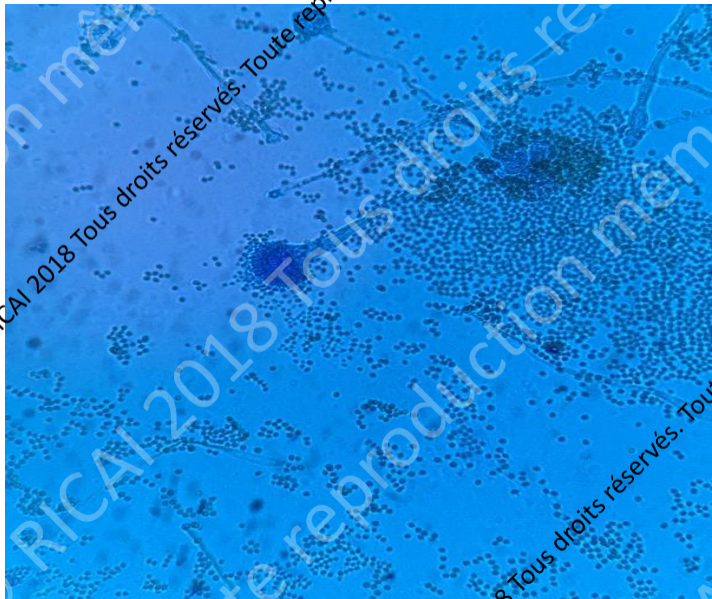
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

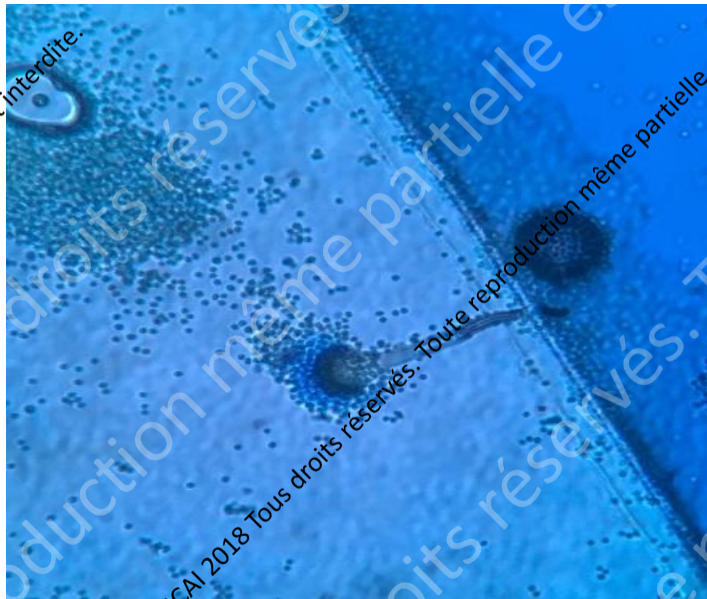
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# 80 : *Aspergillus fumigatus*

**SAB**



**FIDP**



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



# 82. *Aspergillus niger*

SAB



FIDP



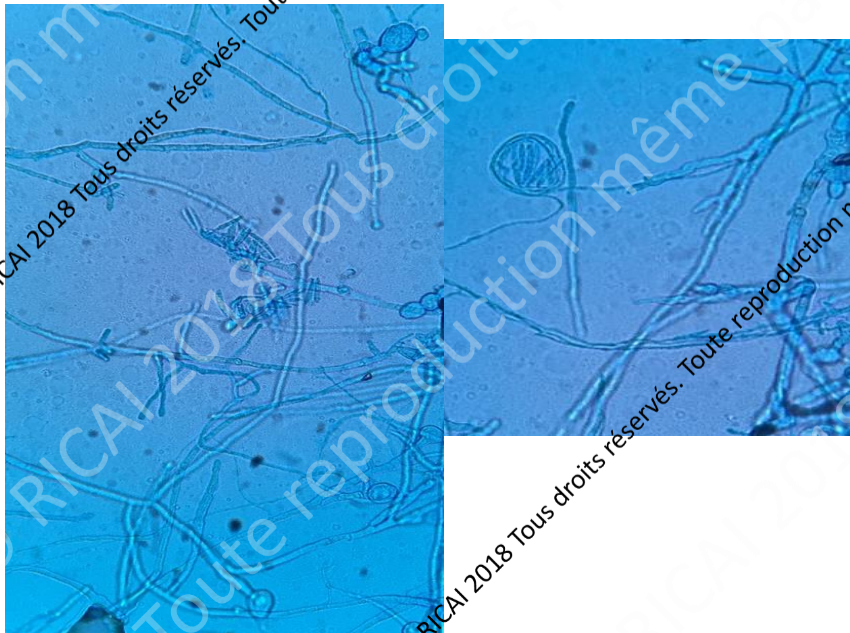
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# 81 : *Fusarium equiseti*

**SAB**



**FIDP**



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

# Résultat : NOUVELLE BASE



## Nouvelles dénomination

<i>Paecilomyces</i>	→	<i>Purpureocillium</i>
<i>Microsporium gypseum</i>	→	<i>Nannizzia gypsea</i>
<i>Acremonium strictum</i>	→	<i>Sarocladium kiliense</i>
<i>Scedosporium prolificans</i>	→	<i>Lomentospora prolificans</i>

## Amélioration des scores

*Fusarium* +++  
*Microsporium canis*

## Meilleure discrimination

*Fusarium petroliphilum*