

Implantation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie : quels changements pour les cliniciens ?

Implementation of MALDI-TOF mass spectrometry in microbiology laboratories: what changes for clinicians?

É. Carbonnelle · X. Nassif

Reçu le 7 décembre 2011 ; accepté le 28 mars 2012
© SRLF et Springer-Verlag France 2012

Résumé Depuis quelques années, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) se développe dans les laboratoires de microbiologie clinique. Cette technologie, initialement réservée au domaine de la recherche, permet au laboratoire l'identification rapide et précise des principaux micro-organismes isolés en routine. Ces derniers sont identifiés à partir de colonies obtenues en cultures sur milieu solide, ou encore directement à partir de certains prélèvements (hémocultures, urines). D'autres applications sont en cours de développement comme le typage des souches, la recherche de facteurs de virulence ou encore de marqueurs de résistance aux antimicrobiens.

Mots clés Identification microbienne · Prélèvement clinique · Spectrométrie de masse · MALDI-TOF-MS

Abstract Mass spectrometry (MS) has emerged as a particularly powerful tool for analysis and characterization of proteins in research for twenty years. More recently, matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has been introduced in clinical laboratories for routine identification. This method is reliable and safe for the identification of bacteria, yeasts, filamentous fungi, and dermatophytes isolated from clinical samples by

intact cell mass spectrometry or directly from positive blood culture or urines. Other applications are currently in development, including bacterial typing, detection of antibiotic resistance, and identification of virulent strains.

Keywords Microbial identification · Clinical sample · Mass spectrometry · MALDI-TOF-MS

Introduction

La prise en charge de patients suspectés d'infection fait intervenir d'une part le service clinique et les cliniciens, et d'autre part le laboratoire de microbiologie. Cette concertation vise à mettre en évidence un agent pathogène au site d'infection, à étudier sa sensibilité aux différentes molécules antimicrobiennes pour adapter secondairement le traitement probabiliste initié dans un premier temps afin de limiter l'utilisation de molécules à large spectre. Dans certains cas, le laboratoire peut être sollicité afin de rechercher des facteurs de virulence ou pour comparer différentes souches afin d'établir un lien de clonalité, notamment en cas d'épidémies. Pour répondre à toutes ces questions, il est bien souvent nécessaire de mettre en œuvre différentes techniques dont certaines sont lourdes et coûteuses. De nombreuses études ont démontré qu'un traitement antibiotique débuté précocement et adapté à la sensibilité du germe en cause réduit la morbidité ainsi que la mortalité [1]. Les laboratoires de microbiologie sont donc confrontés à un besoin de « gagner du temps » sur l'identification et l'étude de la sensibilité aux antimicrobiens par rapport aux techniques classiquement utilisées. Actuellement, l'identification et l'étude de la sensibilité des microorganismes nécessitent plusieurs étapes qui reposent principalement sur la détection des caractéristiques phénotypiques du germe étudié. L'utilisation de coloration (coloration de

É. Carbonnelle (✉)
Service de microbiologie, hôpital Européen Georges Pompidou,
20 rue Leblanc, F-75908 Paris cedex
e-mail : etienne.carbonnelle@egp.aphp.fr

É. Carbonnelle · X. Nassif
Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité,
Faculté de médecine, Paris France

X. Nassif
Hôpital Necker-Enfants Malades,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

Gram par exemple), la morphologie des colonies, l'examen au microscope, l'isolement en culture sur différents milieux, les tests biochimiques, qu'ils soient réalisés manuellement ou par des automates, sont les principes mêmes de la classification et de l'identification des microorganismes. Ces approches, utilisées depuis de nombreuses années, permettent le rendu des résultats dans un laps de temps compris entre 24 heures et 72 heures ; mais elles nécessitent, condition sine qua non, que les microorganismes présentent un métabolisme actif, ce qui est heureusement le cas la plupart du temps.

Pour les microorganismes dits « fastidieux », dont la croissance est lente ou difficile ou pour lesquels les tests phénotypiques classiquement utilisés ne sont pas performants, l'identification par ces techniques usuelles est impossible. L'identification par biologie moléculaire (amplification puis séquençage des gènes codant pour les ARN 16S, *rpoB*, *sodA* etc.) est alors une alternative [2,3]. Ces techniques nécessitent une certaine expertise et les délais de rendus ainsi que les coûts sont augmentés.

L'identification des microorganismes par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) représente une vraie révolution technologique pour la microbiologie. La question est de savoir si la spectrométrie de masse peut aider la prise en charge des patients admis en réanimation. Cette technique permet d'obtenir en quelques secondes un spectre de masses moléculaires des différentes protéines (empreinte spectrale) présentes dans un échantillon, cet échantillon pouvant être les bactéries obtenues en culture. En comparant les empreintes spectrales obtenues aux spectres spécifiques des microorganismes de référence inclus dans les banques de données, il est alors possible d'obtenir en quelques minutes une identification précise pour un coût d'utilisation inférieur aux tests classiques. Par ailleurs, cette technologie peut être utilisée directement à partir des flacons d'hémoculture détectés positifs ou d'urines.

Principe du MALDI-TOF MS

Le principe général de la spectrométrie de masse repose sur la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Ceci donne lieu à la caractérisation sous forme d'un « spectre » des masses moléculaires des différents composés présents dans un échantillon. Pour aboutir à ce spectre, la transformation de molécules présentes dans l'échantillon est nécessaire. Elles doivent passer de leur état naturel à celui d'ions au cours d'un processus de désorption-ionisation. Une fois l'échantillon séché sur la plaque cible, il est recouvert par la matrice dont la nature est adaptée au type d'analyse que l'on souhaite réaliser. Grâce aux propriétés intrinsèques de la matrice, l'ensemble cristallise à température ambiante lors de l'éva-

poration des solvants contenus dans le mélange : c'est la co-cristallisation. La matrice, qui est choisie pour absorber à la longueur d'onde du laser (λ : 337 nm), absorbe l'énergie photonique de celui-ci. L'étape suivante, appelée désorption, correspond à l'expansion en phase gazeuse du mélange matrice-échantillon. Elle s'explique par le fait que l'énergie absorbée par la matrice provoque la rupture des liaisons intermoléculaires à l'origine de la cohésion du cristal. Après cette étape, les molécules présentes dans l'échantillon sont transformées en ions au cours du processus d'ionisation. Au cours de ce processus, l'ionisation des molécules se fait par transfert de protons H^+ (formation d'ions positifs) ou d'électrons (formation d'ions négatifs) provenant de la matrice ionisée vers les molécules de l'échantillon. Les protons à l'origine de l'ionisation sont issus de groupements carboxyliques ou hydroxyliques de la matrice ou des molécules d'échantillon elles-mêmes. Une fois formés, ces ions de masse et de charges différentes sont soumis à un champ électrique. Ils « volent » ensuite jusqu'à un détecteur situé à l'extrémité du tube de vol et la distance parcourue en un temps donné (« Time-Of-Flight ») est fonction du rapport de leur masse sur la charge (m/z). Le temps de vol des ions est inversement proportionnel à leur masse. Ainsi les ions ayant une masse élevée atteindront le détecteur moins rapidement que les ions ayant une masse plus faible. Leur arrivée au bout du tube de vol est détectée et enregistrée par un multiplicateur d'électrons et le signal obtenu est traité informatiquement. Chaque molécule détectée est caractérisée par : la masse moléculaire (m), la charge (z), le rapport masse/charge (m/z) et l'intensité relative du signal. La grande majorité des ions formés étant monochargés en MALDI-TOF, le rapport (m/z) correspond en fait à la masse de la molécule. L'intensité relative permet une approche quantitative correspondant à la représentation de la molécule dans l'échantillon étudié. Les informations essentielles utilisées pour l'identification sont donc contenues dans une liste de pics contenant les rapports m/z et les intensités relatives de chaque pic, l'ensemble de ces données caractérisant l'empreinte spectrale de l'échantillon. Les applications de la spectrométrie de masse sont très vastes et concernent principalement l'identification de peptides ou de protéines, l'analyse de leur séquence en acides aminés ou encore la mise en évidence de modifications post-traductionnelles.

L'identification bactérienne par MALDI-TOF-MS repose sur le principe détaillé précédemment. Les microorganismes à identifier sont obtenus à partir de colonies sur milieux solides, on parle alors d'acquisition sur bactéries intactes. Cette méthode de préparation de l'échantillon est simple et très rapide, pouvant être réalisée par du personnel non spécialisé en spectrométrie de masse. Les bactéries obtenues en culture sont déposées directement sur une plaque métallique support. Dans cette application, aucune étape complexe de purification de l'échantillon n'est nécessaire. L'obtention d'un

spectre de qualité dépend essentiellement de la qualité du dépôt effectué.

Spectrométrie de masse par MALDI-TOF et identification bactérienne

Historique

Les premières tentatives d'identification bactérienne par spectrométrie de masse furent menées par Fenselau et Anhalt en 1975. Après traitement des bactéries par la chaleur, les résidus obtenus étaient analysés en spectrométrie de masse par impact électronique [4]. L'émergence de techniques d'ionisation douce comme le MALDI-TOF et l'ESI (*Electrospray Ionization*) [5,6] a permis d'augmenter les rendements d'ionisation et d'aboutir ainsi à la caractérisation de macromolécules, parmi lesquelles les protéines. En effet, avec les autres techniques d'ionisation, les macromolécules ne sont pas assez volatiles ni stables pour résister au processus d'ionisation. De ces deux techniques, le MALDI-TOF s'est avéré être le plus performant et le plus adapté pour l'identification bactérienne. En effet, il permet la détection de macromolécules dans des mélanges complexes sans purification préalable des échantillons directement à partir des colonies.

Holland et al. sont les premiers à proposer une approche fondée sur l'analyse MALDI-TOF de bactéries intactes [7]. À la différence des études précédentes, les bactéries ne

subissent aucun traitement avant l'analyse par MALDI-TOF et restent sous forme de cellule entière. Cette nouvelle approche sur bactérie intacte représente un gain de temps considérable, car elle s'affranchit de l'étape de préparation de l'extrait protéique jusque-là effectuée avant l'analyse MALDI-TOF. Le temps estimé est inférieur à une minute par échantillon. Le nombre de publications concernant l'identification bactérienne, mais aussi l'identification des champignons augmente de façon exponentielle. À l'heure actuelle, on peut affirmer que des empreintes spectrales de toutes les espèces bactériennes cultivables ont été obtenues, mais l'identification de certaines espèces reste d'interprétation difficile : c'est le cas, par exemple, des espèces génomiquement proches (*Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus mitis* ou *Escherichia coli* et *Shigella* sp.), ainsi que de certains bacilles à Gram positif, dont les empreintes spectrales contiennent peu de pics et sont donc peu discriminants (*Propionibacterium acnes*) [8].

Analyse des ions du spectre MALDI-TOF

L'identification par cette technique repose sur le fait que le spectre obtenu varie d'un genre à l'autre, d'une espèce à l'autre, voire d'une sous-espèce à l'autre, permettant ainsi de discriminer les microorganismes entre eux (Figs. 1,2). La réalisation de banques de données repose sur ces constatations, et même si plusieurs stratégies existent, elles consistent toutes à sélectionner les plus spécifiques, parmi tous ces

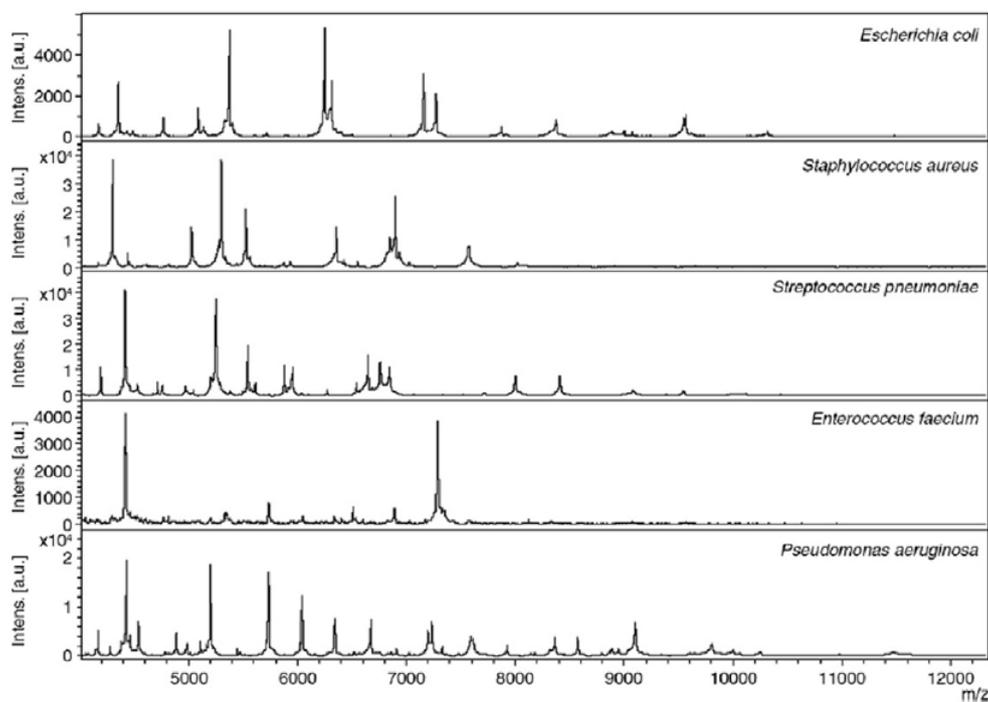


Fig. 1 Empreintes spectrales obtenues à partir de colonies entières de cinq espèces bactériennes différentes (matrice α -CHCA)

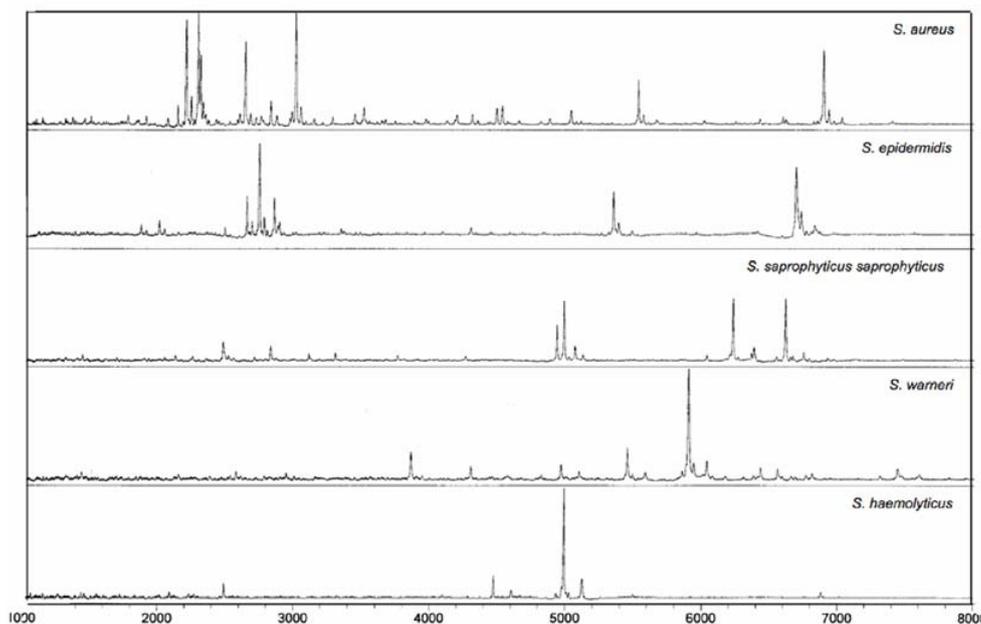


Fig. 2 Empreintes spectrales obtenues à partir de colonies entières de cinq staphylocoques d'espèces différentes (matrice α -CHCA)

pics, afin d'obtenir l'identification avec la plus grande certitude. Avant même la sélection de ces pics, il est important de rappeler que la première étape consiste à maîtriser les différents paramètres expérimentaux qui jouent un rôle important sur la qualité et la spécificité des spectres, afin d'obtenir la plus grande reproductibilité d'une acquisition à l'autre.

Emonet et al. ont récemment publié une revue détaillant les principes des trois principales banques de données disponibles sur le marché (MALDI Biotyper Bruker, SARAMIS Anagnostec BioMérieux, ANDROMAS) [9]. L'identification du microorganisme étudié repose sur la comparaison du spectre obtenu ceux de référence contenus dans la base de données. Comme pour les analyses des séquences nucléotidiques par BLAST ou FASTA, la plus forte concordance (« matches ») est retenue et les résultats sont rendus avec un coefficient de similarité.

Les progrès réalisés dans le domaine de la génomique, avec l'augmentation du nombre de génomes séquencés disponibles, ont permis d'identifier certains pics au sein des empreintes spectrales. Il est maintenant établi que la grande majorité des pics détectés entre 2 et 20 kDa correspond aux protéines ribosomales et à des protéines des gènes de ménage (*house keeping gene*) ce qui explique en partie le caractère spécifique et constant des spectres par espèce malgré les variations rencontrées lors des différentes acquisitions. Ces données laissent envisager le développement de stratégies permettant, au même titre que le MLST, de typer les bactéries et de réaliser des comparaisons phylogénétiques. Parmi les autres protéines identifiées, on retrouve des protéines de choc thermique (*cold shock proteins*), des DNA

(deoxyribonucleic acid) *binding proteins* ou encore des « ARN (acide ribonucléique) chaperones » [10].

Afin d'obtenir des identifications fiables, il est important de maîtriser les différents paramètres expérimentaux qui influencent la qualité des spectres. En effet, une fois la majorité des paramètres standardisés, la reproductibilité et la précision des identifications sont parfaitement fiables au sein d'un laboratoire et d'un laboratoire à l'autre [11]. La production d'ions par MALDI-TOF dépend de la bonne préparation du matériau composite, constitué de la matrice et du biopolymère analysé. De nombreuses études ont montré que la qualité des spectres de masse dépend de certains facteurs liés à la préparation de l'échantillon : i) la méthode de préparation des cristaux ; ii) la sélection et la nature de la matrice ; iii) les caractéristiques intrinsèques de l'analyte (milieu et temps de culture bactérienne) ; iiiii) le pH, la concentration en NaCl et la nature des tampons utilisés ainsi que les solvants utilisés.

Pour Vaidyanathan et al., le mode de dépôt utilisé joue un rôle dans les empreintes spectrales obtenues [12]. Ainsi, le mode de dépôt dit en « *bottom layer* » ou « couche mince », consistant à déposer la suspension bactérienne sur la plaque dans un premier temps puis la matrice dans un second temps, permettrait de mieux caractériser les protéines de faible masse moléculaire. En revanche, le mode de dépôt dit en « goutte sèche » ou « *dried droplet* », consistant à déposer ensemble le mélange matrice-échantillon, permettrait de mieux caractériser les protéines de haute masse moléculaire. Pour Keys et al., le mode de dépôt dit en « *bottom layer* » est le plus simple et donne des résultats plus reproductibles [13].

Le mode de dépôt dit en « sandwich », où l'échantillon est placé entre deux couches de matrice, engendre un nombre d'ions inférieur. Des protocoles plus complexes ont été proposés afin d'augmenter la qualité des empreintes spectrales, mais dans la grande majorité des cas, ils ne sont pas nécessaires pour une utilisation de routine [14]. En revanche, pour certains microorganismes comme les levures ou les mycobactéries, certains auteurs préconisent de réaliser auparavant une étape d'extraction [15].

À côté de ces paramètres, les conditions de culture jouent également un rôle. La technique du MALDI-TOF repose sur l'analyse de composants bactériens dont certains sont variables en fonction des milieux de culture et des temps d'incubation utilisés. Plusieurs études se sont intéressées à l'impact des milieux de culture sur le spectre (milieu gélosé ou liquide, milieu Muller-Hinton ou gélose au sang) [11,16], et toutes ont constaté des variations dans les empreintes spectrales obtenues. Le temps d'incubation de la culture bactérienne influence aussi la qualité des spectres [13].

La nature de la matrice utilisée est aussi un paramètre de première importance car elle influe sur la qualité des spectres obtenus en termes de nombre de pics et d'intensités relatives des pics (Fig. 3). Il existe un certain nombre de matrices disponibles pour l'analyse MALDI-TOF. Elles doivent toutes avoir des caractéristiques physicochimiques requises pour absorber la longueur d'onde du laser. Elles doivent de plus permettre un bon rendement d'ionisation et être suffisamment inertes pour ne pas interférer dans le spectre de

masses de l'échantillon étudié. L'utilisation des différentes matrices est fonction de la nature de l'échantillon étudié et de la nature des molécules à analyser. Les matrices les plus utilisées sont l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (ou acide gentisique ou DHB), l'acide trans-3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (ou acide sinapinique ou SA) et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -CHCA). Elles permettent entre autre l'analyse de substrats peptidiques, glycopeptidiques et lipidiques. Actuellement, l' α -CHCA est largement utilisé pour les identifications de routine. En effet, la cristallisation obtenue est homogène, contrairement au DHB, permettant une utilisation automatique des acquisitions par le spectromètre avec une excellente qualité de spectres.

Pour une même souche bactérienne, la figure 3 illustre, d'une part les variations que l'on observe lors de deux acquisitions différentes avec la même matrice, et d'autre part les variations en fonction de la matrice utilisée. Malgré ces variations, la majorité des pics est présente et seules les intensités relatives présentent des différences significatives.

La composition des solvants, la concentration en NaCl et le pH des tampons utilisés influencent aussi la qualité des spectres en modifiant la cristallisation de l'échantillon avec la matrice et, par conséquent, l'efficacité d'ionisation des molécules testées.

Comme nous venons de le voir, l'influence des conditions expérimentales est importante et il est donc indispensable d'harmoniser ces différents paramètres pour obtenir les conditions optimales de reproductibilité. Ainsi, lorsque ceux-ci sont

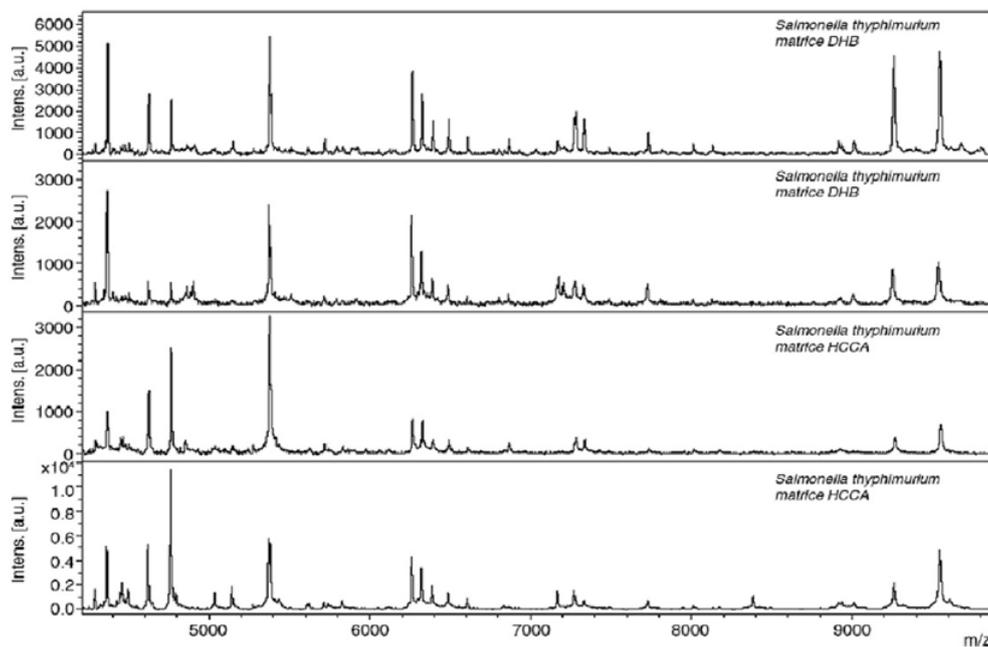


Fig. 3 Empreintes spectrales d'une même souche de *Salmonella typhimurium* obtenues avec deux matrices différentes : DHB et CHCA. Les deux spectres du haut correspondent à deux répétitions avec la matrice DHB et les deux spectres du bas à deux répétitions avec la matrice CHCA

contrôlés, la technique est très reproductible [13]. Malgré ces différences liées aux paramètres expérimentaux, la majorité des pics est retrouvée, et seules les intensités relatives présentent des différences significatives : l'identification reste donc toujours possible. En effet, la construction des banques de données pour l'identification microbiologique repose sur des pics spécifiques, constants et communs aux différentes acquisitions, à savoir des pics dont l'intensité relative est élevée et par conséquent, non sujets à d'importantes variations.

Applications pratiques du MALDI-TOF-MS en microbiologie

La spectrométrie devient un outil majeur en routine de microbiologie clinique pour essentiellement deux raisons : d'une part, il est maintenant possible de travailler directement sur des bactéries cultivables intactes et d'autre part, les bases de données permettant de comparer les spectres de masse sont disponibles pour l'ensemble des pathogènes isolés en routine (Fig. 4).

Cette méthode permet en quelques minutes, par une approche technique simple et peu coûteuse (hors achat de l'appareil), d'obtenir une identification précise et fiable, et au final d'optimiser la prise en charge des patients. Après un début plutôt « timide » avec moins de 10 laboratoires équipés en France en 2009, le MALDI-TOF s'implante rapidement maintenant, aussi bien dans les laboratoires hospitaliers que dans les laboratoires d'analyses médicales.

Seng et al. sont parmi les premiers à avoir utilisé cette technologie en routine sur bactéries intactes à partir de prélèvements cliniques [8]. Leur étude, qui concerne un nombre important de souches (1660 souches réparties sur 45 genres), évalue la performance d'identification, le délai pour le rendu des résultats et le coût en comparaison aux techniques classiquement utilisées. L'ensemble des résultats de cette étude et des principales publications sont résumés dans le Tableau 1 [8,17-25]. Pour l'ensemble de ces études, les identifications obtenues au genre et à l'espèce varient de 95 % à 98 % et de 85 % à 95 % respectivement. Ces excellents résultats ont été obtenus aussi bien avec le système Biotyper Bruker qu'avec SARAMIS Anagnostec BioMérieux et ANDROMAS. Une seule étude a comparé les deux systèmes commercialisés (Bruker Biotyper et Shimadzu/Anagnostec) pour une utilisation en routine [26]. Les résultats d'identification correcte à l'espèce sont de 93,6 % et 88,3 % pour Bruker et Shimadzu respectivement.

Ces résultats fort encourageants ne doivent pas masquer certaines difficultés rencontrées par tous ces systèmes, dont certaines sont majeures, en particulier avec les bactéries à Gram positif.

À l'heure actuelle, il est difficile de distinguer les streptocoques du groupe *mitis/oralis* et les *Streptococcus pneumoniae*. Des tests complémentaires conventionnels sont recommandés par les constructeurs, comme la recherche de la sensibilité à l'optochine. Cette recherche peut être menée conjointement à la réalisation de l'antibiogramme, ce qui permet de confirmer l'identification avec certitude en même

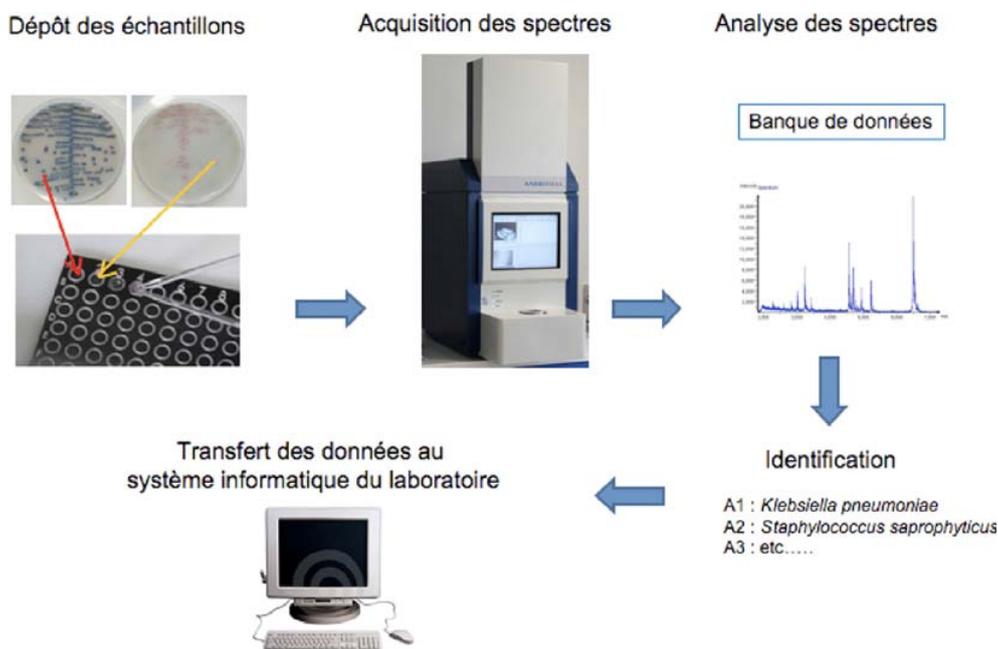


Fig. 4 Principales étapes de l'identification par MALDI-TOF à partir de colonies. Le temps nécessaire pour l'ensemble de ces étapes est de l'ordre d'une vingtaine de minutes

Tableau 1 Résumé des principales études utilisant le MALDI-TOF en routine pour l'identification bactérienne (Id)

Auteurs	Échantillons	Tous les prélèvements de routine	Id à l'espèce	Id au genre	Principales difficultés	Commentaires
Seng et al. 2009 [8]	Routine (n=1660)	Tous les prélèvements de routine	83,8 %	95,0 %	<i>Propionobacterium acnes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Shigella</i> sp.	Dans cette étude, le MALDI-TOF est utilisé en première ligne pour l'identification
Blondiaux et al. 2009 [17]	Routine (n=362)	Tous les prélèvements de routine	72,9 %	87,0 %	<i>Streptococcus</i> du groupe <i>viridans</i> <i>Shigella</i> sp.	
van Veen et al. 2010 [18]	Routine (n=980)	Tous les prélèvements de routine	92,0 %	98,8 %	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Bactéries anaérobies	
Bizzimi et al. 2010 [19]	Routine (n=1371)	Tous les prélèvements de routine	93,2 %	98,5 %	<i>Shigella</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Une étape d'extraction permet d'augmenter le pourcentage de résultats valides de 22,9 %
Gravet et al. 2010 [20]	Routine (n=10000)	Tous les prélèvements de routine	nd	98,8 %	<i>Corynebacterium</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Erreurs de taxonomie essentiellement Dans cette étude, le MALDI-TOF est utilisé en première ligne pour l'identification
Bessède et al. 2010 [21]	Routine (n=1013)	Tous les prélèvements de routine	97,3 %	99,0 %	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Une étape d'extraction permet d'augmenter le pourcentage d'identification à l'espèce de 14,7 %
Dauwalder et al. 2011 [22]	Routine (n=323)	Tous les prélèvements de routine	94,4 %	98,5 %	Streptocoques et entérocoques Anaérobies Corynebactéries	Nombre insuffisant de souches dans la banque de données pour certaines espèces Analyse en routine du système Axima/Saramis/SirWeb MALDI-TOF
Benagli et al. 2011 [23]	Routine (n=1019)	Tous les prélèvements de routine	nd	98,0 %		Étude de la sensibilité et de la spécificité du MALDI-TOF
Sogawa et al. 2011 [24]	Routine (n=468)	Tous les prélèvements de routine	91,7 %	97,0 %	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Absence d'identification avec des souches muqueuses de <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Sensibilité moindre pour les espèces <i>K. oxytoca</i> et <i>E. cloacae</i> Comparaison de trois MALDI-TOF de gamme différente (Bruker)
Neville et al. 2011 [25]	Routine (n=927)	Tous les prélèvements de routine	85,0 %	96,0 %	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	

GN : Gram négatif ; GP : Gram positif ; nd : non disponible

temps que la sensibilité de la souche aux antibiotiques. Cette difficulté n'est pas propre à la spectrométrie de masse MALDI-TOF, certaines techniques d'identification par PCR (*polymerase chain reaction*)/séquence peinent aussi à donner une identification fiable [27]. Par contre, les streptocoques bêta-hémolytiques comme *S. pyogenes* (SGA), *S. agalactiae* (SGB) ou *S. dysgalactiae* ne présentent pas de difficulté majeure d'identification comme le montre une étude récente [28]. Les entérobactéries sont correctement identifiées dans 97 à 99 % des cas. Mais il est impossible actuellement de différencier par cette technique *Shigella* sp. d'*Escherichia coli*.

Les difficultés rencontrées pour l'identification des microorganismes varient en fonction des études (Tableau 1). Une explication peut être la qualité du dépôt qui est plus difficile à partir de certains type de colonies, comme par exemple les espèces muqueuses de *Pseudomonas aeruginosa*, ou des colonies incrustées d'*Eikenella corrodens*, mais aussi, parce que certains genres bactériens produisent naturellement peu de pics (*Nocardia* sp., *Propionibacterium* sp.). L'identification des mycobactéries est plus délicate, et l'obtention de spectre de qualité correcte nécessite des protocoles de préparation particuliers [29,30]. Les résultats dépendent à la fois des protocoles de préparation, mais aussi des méthodes de comparaisons des spectres obtenus, de la qualité et du nombre d'espèces représentées dans les bases de données.

Une autre application de cette technologie est son utilisation pour identifier les microorganismes directement à partir des prélèvements, soit à partir de flacons d'hémocultures détectés positifs [31-37] soit à partir des urines [38]. Le gain de temps est alors très important pour la mise en route d'une antibiothérapie. Concernant les hémocultures, les résultats sont obtenus avec les protocoles les plus rapides en une vingtaine de minutes après quelques étapes intermédiaires qui permettent la séparation des globules blancs des hématies. Les pourcentages d'identification correcte au genre varient de 72 à 98 % selon les études (Tableau 2). On retrouve les mêmes difficultés d'identification que pour celles réalisées directement à partir des colonies. Dans le cas des hémocultures polymicrobiennes, les spectres obtenus sont plus difficiles à interpréter et, dans le meilleur des cas, le germe prédominant est identifié. La qualité des milieux de cultures contenues dans les flacons, et particulièrement la présence de charbon, rend l'identification plus difficile, spécialement celle des cocci à Gram positif [39,40]. Pour les urines, les résultats sont très encourageants à condition d'avoir un inoculum bactérien supérieur à 10^5 CFU/mL [38].

Afin d'améliorer les résultats, certains auteurs préconisent de réaliser une étape d'extraction protéique lors de la préparation des échantillons à analyser. Ceci peut se justifier pour certaines espèces comme nous l'avons déjà

signalé (mycobactéries, corynébactéries), ou en cas de plus faible inoculum comme c'est parfois le cas avec les hémocultures [21,41,42]. Bien évidemment, ces approches toutes récentes doivent être perfectionnées, notamment en testant différents prélèvements (ascite, LCR...) et en améliorant l'identification de certains genres bactériens. Une autre problématique concerne le couplage identification/étude de la résistance. En effet, même si l'identification est obtenue plus rapidement, l'antibiogramme réalisé en parallèle reste nécessaire.

Perspectives

Cette nouvelle technique d'identification bactérienne offre de nombreuses applications comme la possibilité de diagnostics rapides d'infections bactériennes ou fongiques, mais aussi la détection des bactéries de l'air, de l'eau, des aliments, la détection des agents pathogènes impliqués dans le bioterrorisme. En dehors de l'approche d'identification microbiologique fondée sur la confrontation du spectre de masse d'une souche donnée à ceux d'une banque de données d'empreintes spectrales, il existe d'autres perspectives comme la mise en évidence de facteurs de virulence, de résistance aux antibiotiques ou la détection de toxines.

La recherche et la détection de souches particulièrement virulentes préoccupent à juste titre les cliniciens. Tout comme la résistance aux antibiotiques, il est intéressant de rechercher dans les spectres d'éventuels marqueurs de virulence. Plusieurs études ont tenté de mettre en évidence directement à partir des colonies, la présence de la Leucocidine de Pantone-Valentine (PVL) chez *Staphylococcus aureus*. Les résultats sont contradictoires [43-45]. Devant la présence de pic pouvant faire évoquer un facteur de virulence, il est donc important de chercher à l'identifier afin de pouvoir l'incriminer avec certitude. D'autres se sont intéressés à l'identification des pics permettant de prédire précocement, lors de l'identification, la résistance à certains antibiotiques. Camara et al. ont ainsi pu différencier des souches d'*E. coli* sensibles à l'ampicilline de souches résistantes sur la présence de pics spécifiques [46]. La distinction entre les souches de *S. aureus* sensibles à la méticilline et des souches résistantes a fait l'objet de différents travaux. Dans l'ensemble de ces études, la présence d'un nombre important de faux positifs et de faux négatifs ne permet pas une utilisation de ces résultats en routine [16,47,48]. Récemment, une nouvelle approche a donné des résultats intéressants. Il s'agit de mettre en évidence une activité enzymatique à partir d'une culture bactérienne. L'activité des carbapénémases a ainsi pu être mise en évidence en étudiant la dégradation des carbapénèmes introduites dans une culture bactérienne produisant cette enzyme. En étudiant les variations au niveau des spectres engendrés par l'hydrolyse de l'antibiotique (méropénème,

Tableau 2 Résumé des principales études utilisant le MALDI-TOF pour l'identification bactérienne (Id) directement à partir des prélèvements

Auteurs	Échantillons	Id à l'espèce	Id au genre	Principales difficultés	Commentaires
Prod'hom et al. 2010 [37]	Sang (n= 126)	77,8 % GN : 89,1 % GP : 71,6 %	78,7 % GN : 89,1 % GP : 72,9 %	<i>Streptococcus mitis</i> group <i>Staphylococcus</i> sp.	La présence d'une capsule peut en partie expliquer le plus faible taux d'identification pour les bactéries <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>K. pneumoniae</i>
La Scola et al. 2009 [31]	Sang (n= 599)	76,0 %	76,0 %	<i>Streptococcus</i> sp. Échantillons polymicrobiens	
Stevenson et al. 2009 [32]	Sang (n= 212)	80,2 %	80,2 %	<i>Streptococcus</i> du groupe <i>mitis</i> <i>Propionibacterium acnes</i>	
Ferroni et al. 2010 [33]	Sang (n= 685)	89,0 %	98,0 %	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus</i> du groupe <i>mitis</i>	En cas d'hémoculture polymicrobienne, le germe prédominant est dans la plupart des cas identifié. Méthode très rapide
Christner et al. 2010 [34]	Sang (n= 277)	94,2 %	95,0 %	GP	Les difficultés d'identification résultent d'un nombre insuffisant de bactéries, plus fréquent avec les Gram +
Ferreira et al. 2010 [35]	Sang (n= 300)	42,6 % GN : 83,3 % GP : 31,8 %	71,6 % GN : 96,6 % GP : 65,7 %	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i>	Pas de culture polymicrobienne
Moussaoui et al. 2010 [36]	Sang (n= 532)	90,0 % GN : 91,1 % GP : 89 %	nd	<i>Streptococcus mitis</i> group <i>Staphylococcus</i> sp.	
Ferreira et al. 2010 [38]	Urine (n= 220)	91,8 % GN : 93,6 % GP : 66,6 %	92,7 % GN : 94,6 % GP : 66,6 %	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Raoultella</i> sp.	Meilleurs résultats avec >10 ⁵ CFU/mL <i>E. coli</i> >10 ⁵ CFU/mL : 97,6 % identifications correctes

GN, Gram négatif, GP : Gram positif

imipénème ou encore ertapénème) et en suivant l'apparition des produits de dégradation, il a été possible de mettre en évidence chez certaines entérobactéries (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*) ou chez *Pseudomonas aeruginosa*, la présence de carbapénémases (par exemple : VIM, IMP, KPC, NDM1) [49,50]. Ces résultats encourageants devront être confirmés et adaptés pour une utilisation en routine.

Conclusions

Cette nouvelle technique apporte un gain pour la microbiologie ce qui explique l'essor et le développement du MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie. Il est maintenant établi qu'un laboratoire peut réaliser l'ensemble de ses identifications par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, en tout cas aussi bien sinon mieux qu'avec les méthodes dites conventionnelles. Des mises à jour régulières des banques de données sont nécessaires afin d'intégrer les évolutions taxonomiques qui expliquent en partie les discordances rencontrées et de prendre en compte les clones circulants isolés en clinique. L'achat et l'entretien d'un tel système peuvent apparaître onéreux mais la balance à long terme est très en faveur du MALDI-TOF. En effet, obtenir une identification rapidement et avec précision directement à partir des prélèvements permet une optimisation de la prise en charge du patient. Ceci se traduit par une réduction de la prescription empirique d'anti-infectieux à large spectre dont les conséquences sont multiples : lutte contre l'émergence des résistances, diminution du coût des traitements, diminution des journées d'hospitalisation. D'autres applications sont en cours d'étude et suggèrent la possibilité, à partir des spectres, d'obtenir d'autres informations comme le typage de souches, la recherche de facteurs de virulence, ou encore de marqueurs de résistance aux antimicrobiens.

Conflit d'intérêt : E. Carbone et X. Nassif déclarent avoir une participation financière dans le capital de l'entreprise Andromas

Références

1. Leone M, Bourgoin A, Cambon S, et al (2003) Empirical antimicrobial therapy of septic shock patients: adequacy and impact on the outcome. *Crit Care Med* 31:462-7
2. Goldenberger D, Kunzli A, Vogt P, et al (1997) Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 35:2733-9
3. Drancourt M, Raoult D (2002) *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 40:1333-8
4. Anhalt JP, Fenselau C (1975) Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 47:219-25
5. Fenn JB, Mann M, Meng CK, et al (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246:64-71
6. Hillenkamp F, Karas M (1990) Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* 193:280-95
7. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, et al (1996) Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10:1227-32
8. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49:43-51
9. Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J (2010) Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 16:1604-13
10. Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B (2008) Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74:7767-78
11. Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, et al (2005) Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 71:58-64
12. Vaidyanathan S, Winder CL, Wade SC, et al (2002) Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (>20 kDa) proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16:1276-86
13. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, et al (2004) Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterization of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol* 4:221-42
14. Liu H, Du Z, Wang J, Yang R (2007) Universal sample preparation method for characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 73:1899-907
15. Amiri-Eliasi B, Fenselau C (2001) Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Anal Chem* 73:5228-31
16. Bernardo K, Pakulat N, Macht M, et al (2002) Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* 2:747-53
17. Blondiaux N, Gaillot O, Courcol RJ (2010) [MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: Evaluation in a teaching hospital.]. *Pathol Biol (Paris)* 58:55-7
18. van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ (2010) High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in routine medical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 48:900-7
19. Bizzini A, Greub G (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 16:1614-9
20. Gravet A, Camdessouens-Miehé G, Gessier M, et al (2010) [The use in routine of mass spectrometry in a hospital microbiology laboratory.]. *Pathol Biol (Paris)* 59:19-25
21. Bessède E, Angla-Gre M, Delagarde Y, et al (2011) MALDI Biolyser, experience in the routine of a University hospital. *Clin Microbiol Infect* 17:533-8
22. Dauwalder O, Freydiere AM, Meugnier H, et al (2011) Utilisation de la spectrométrie de masse pour l'identification bactérienne : Évaluation du système Axima/Saramis/SirWeb MALDI TOF. *BioTribune* 37:30-5

23. Benagli C, Rossi V, Dolina M, et al (2011) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One* 6:e16424
24. Sogawa K, Watanabe M, Sato K, et al (2011) Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Anal Bioanal Chem* 400:1905–11
25. Neville SA, Lecordier A, Ziochos H, et al (2011) Utility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry following Introduction for Routine Laboratory Bacterial Identification. *J Clin Microbiol* 49:2980–4
26. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, et al (2010) Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 48:1169–75
27. Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova MV, et al (2011) Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect Genet Evol* 11:1709–15
28. Cherkaoui A, Emonet S, Fernandez J, et al (2011) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of Beta-hemolytic streptococci. *J Clin Microbiol* 49:3004–5
29. Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, et al (2010) Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by MALDI-TOF MS. *J Clin Microbiol* 48:4481–6
30. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM (2011) Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 49:1790–4
31. La Scola B, Raoult D (2009) Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 4:e8041
32. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR (2009) Rapid Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Broths by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 48:444–7
33. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, et al (2010) Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48:1542–8
34. Christner M, Rohde H, Wolters M, et al (2010) Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol* 48:1584–91
35. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Porrás-Guerra I, et al (2011) Microorganisms Direct Identification from Blood Culture by Maldi-Tof Mass Spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 17:546–51
36. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, et al (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90 % of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect* 16:1631–8
37. Prod'homme G, Bizzini A, Durussel C, et al (2010) MALDI-TOF mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* 48:1481–3
38. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, et al (2010) Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48:2110–5
39. Schmidt V, Jarosch A, Marz P, et al (2012) Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:311–7
40. Romero-Gomez MP, Mingorance J (2011) The effect of the blood culture bottle type in the rate of direct identification from positive cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Infect* 62:251–3
41. Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al (2010) Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 48:1549–54
42. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM (2011) Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by MALDI-TOF MS: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect* 17:1007–12
43. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, et al (2009) MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents* 34:467–70
44. Dauwalder O, Carbonnelle E, Benito Y, et al (2010) Detection of Panton-Valentine toxin in *Staphylococcus aureus* by mass spectrometry directly from colony: time has not yet come. *Int J Antimicrob Agents* 36:193–4
45. Szabados F, Becker K, von Eiff C, et al (2011) The matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based protein peaks of 4448 and 5302 Da are not associated with the presence of Panton-Valentine leukocidin. *Int J Med Microbiol* 301:58–63
46. Camara JE, Hays FA (2007) Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 389:1633–8
47. Walker J, Fox AJ, Edwards-Jones V, Gordon DB (2002) Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J Microbiol Methods* 48:117–26
48. Jackson KA, Edwards-Jones V, Sutton CW, Fox AJ (2005) Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Methods* 62:273–84
49. Burckhardt I, Zimmermann S (2011) Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 49:3321–4
50. Hrabak J, Walkova R, Studentova V, et al (2011) Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 49:3222–7