



Méthodes

Identification bactérienne de routine par spectrométrie de masse MALDI-TOF au CHU de Lille: impact médical et économique

N. Blondiaux, O. Gaillot et R.-J. Courcol

Laboratoire de bactériologie-hygiène, centre de biologie-pathologie, centre hospitalier régional universitaire de Lille, boulevard du Pr J. Leclercq, 59037 Lille cedex, France



L'introduction récente de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans les laboratoires de bactériologie médicale a profondément bouleversé la manière d'identifier les micro-organismes isolés d'échantillons biologiques et environnementaux. Dans notre laboratoire du CHU de Lille, cette technique d'analyse a rapidement supplanté les méthodes d'identification phénotypique traditionnelles. Comparée à ces dernières, la spectrométrie de masse nous a permis en moyenne de réduire le délai d'identification des micro-organismes de 24 heures, à un coût huit fois moindre. Toutefois, l'identification de la totalité des bactéries rencontrées en bactériologie médicale reste tributaire de la richesse des banques de spectres, aujourd'hui encore incomplètes. L'incrémentation régulière de nouvelles données devrait cependant permettre d'atteindre rapidement une plus grande spécificité.

La spectrométrie de masse permet l'étude du déplacement d'entités ioniques dans des champs électromagnétiques et peut permettre l'identification des micro-organismes grâce à l'analyse de leur contenu protéique (Claydon *et al.*, 1996). L'ionisation de l'échantillon est essentielle et réalisée grâce à une matrice, en général, un dérivé de l'acide cinnamique, qui permet l'ionisation et la désorption homogène de l'échantillon biologique avec lequel elle est co-cristallisée sur une surface métallique. La source d'énergie est un faisceau laser pulsé émettant dans le domaine des ultraviolets. Les ions ainsi générés à partir d'une colonie finement étalée sur la cible en acier, sont séparés en fonction de leur temps de vol (TOF), c'est-à-dire la mesure du temps qu'ils mettent, lorsqu'ils sont soumis à une tension accélératrice pour parcourir la longueur du tube de vol. La zone de vol étant hors du champ électrique, la séparation des ions ne dépend que de la vitesse acquise lors de la phase d'accélération. Ainsi, les ions de rapport masse sur charge (m/z) le plus petit parviendront au détecteur les premiers. Pour chaque groupe d'ions de même rapport m/z , un signal est enregistré au niveau du détecteur sous la forme d'une fonction temps/intensité, l'ensemble des pics ainsi enregistrés constituant un spectre de masse (Fenselau et Demirev, 2001). La source d'ions de type MALDI, source dite « douce », permet la formation d'espèces ioniques principalement monochargées, la séparation des ions ne dépendant ainsi principalement que de leur masse. Parmi les nombreux pics produits, les principaux correspondent à des protéines ribosomales et semblent spécifiques d'espèce et peu influencées par les variations intraspécifiques. Les spectres générés à partir de bactéries entières sont ensuite comparés aux spectres de référence présents dans la base de données d'un système expert. Ces spectres de référence ont été obtenus à partir des souches types et d'isolats cliniques issus de collections internationales. Depuis octobre 2009, notre laboratoire utilise un spectromètre de masse Microflex (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) pour l'identification des isolats issus de prélèvements cliniques et environnementaux. Les spectres générés à partir de colonies isolées sont comparés à ceux de la base de données Biotyper fournie avec l'équipement. La concordance d'un spectre obtenu à partir d'une bactérie étudiée avec ceux des souches de référence est traduite par un score qui

indique le degré de confiance à accorder à l'identification (Tableau 1). Les techniques phénotypiques, tels que galeries API et carte d'identification Vitek2 (bioMérieux, Marcy-L'étoile, France) utilisées jusqu'alors ont totalement été remplacées par la spectrométrie de masse. Lorsque l'identification par spectrométrie de masse est impossible, des techniques génétiques de PCR puis séquençage des gènes *rrs*, *rpoB* ou *sodA* sont mises en œuvre, comme c'était le cas antérieurement, en cas d'échec d'identification conventionnelle.

Tableau 1. Score de concordance des spectres obtenus à partir d'une bactérie d'intérêt avec ceux de la base de données Biotyper, reflétant le degré de confiance à accorder à l'identification

Score	Description	Symbole
2.300 – 3.000	Forte probabilité d'identification à l'espèce	+++
2.000 – 2.299	Identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable	++
1.700 – 1.999	Identification au genre probable	+
0.000 – 1.699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification	-

Le principal avantage de la spectrométrie de masse est le gain de temps significatif pour l'identification des bactéries puisqu'il suffit de quelques minutes à partir du prélèvement d'une colonie isolée sur un milieu de culture solide pour obtenir une identification sécurisée au niveau de l'espèce, là où vingt-quatre heures supplémentaires sont nécessaires avec les techniques d'identification phénotypiques. De plus, le spectromètre permet un diagnostic d'urgence, notamment en période de garde et l'analyse rapide des flores polymicrobiennes (Figure 1) avec mise en route des antibiogrammes adaptés. Après dix-huit mois d'utilisation de la spectrométrie de masse en routine, nous avons constaté qu'une identification définitive a été obtenue pour 93 % des isolats cliniques, la plupart du temps dans les vingt-quatre heures suivant la réalisation du prélèvement. Ce gain de temps a eu un impact majeur sur le

Méthodes

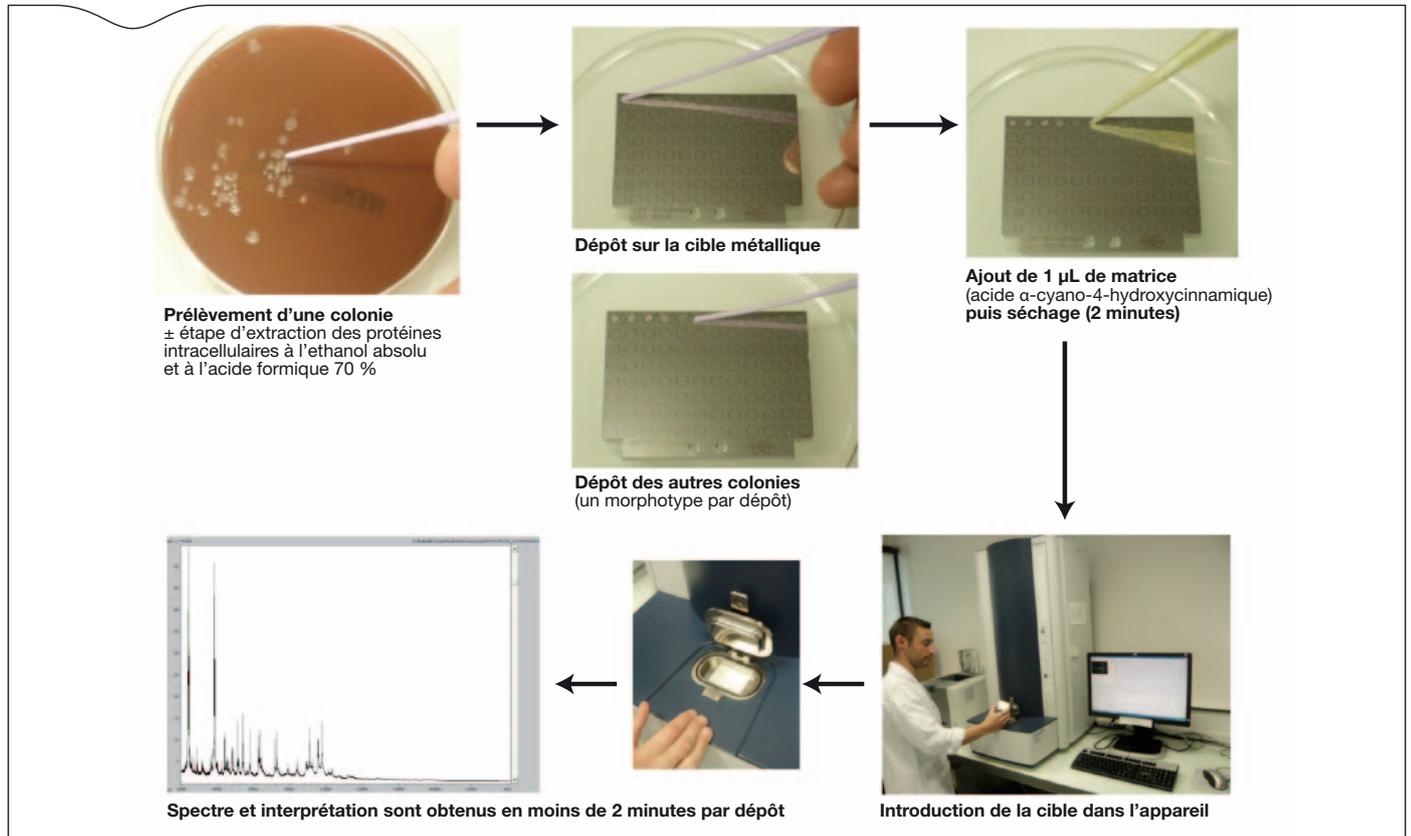


Figure 1. Séquence d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne dans un laboratoire de microbiologie clinique. (Photographies: Olivier Gaillot, Laboratoire de bactériologie-hygiène, CHRU de Lille)

service rendu au patient, améliorant la prise en charge avec une adaptation plus précoce de l'antibiothérapie probabiliste et la mise en place rapide d'éventuelles mesures d'isolement. Même si le délai d'obtention de l'antibiogramme est resté inchangé, soit au mieux quarante-huit heures après la réalisation du prélèvement, sa pertinence a été accrue par un choix d'antibiotiques précisément adapté à la bactérie identifiée.

En outre, le spectromètre de masse a permis la détection et l'identification de pathogènes classiquement difficiles à cultiver et/ou à identifier. Ainsi, pendant la première année d'utilisation du Microflex, nous avons diagnostiqué trois endocardites à *Cardiobacterium hominis*, trois autres à *Erysipelothrix rhusiopathiae*, quatorze abcès à *Aggregatibacter aphrophilus*, six bactériémies à *Acinetobacter ursingii* et deux autres à *Aerococcus urinae*, confirmant le potentiel invasif de ce pathogène urinaire méconnu.

Autre avantage de taille en faveur de l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des micro-organismes: le coût. En effet, nous avons évalué à un peu moins de 0,08 euro le coût d'une identification coloniale par spectrométrie, nous permettant de réaliser une économie de 88 % sur le budget alloué aux identifications par rapport à l'année précédente, à activité constante. L'impact économique a également été important en terme de coûts indirects comme ceux liés à la gestion des déchets. Ainsi en un an, l'utilisation du spectromètre de masse n'a requis l'élimination que d'une

vingtaine de litres des solvants nécessaires au nettoyage quotidien des cibles en acier (correspondant à 2 mL d'eau, 1 mL d'éthanol à 70 % et 100 µL d'acide trifluoroacétique à 80 % par cible et par jour), alors que les techniques d'identification phénotypiques, automatisées ou non, nécessitaient auparavant le traitement de plusieurs centaines de kilogrammes de déchets solides contaminés de type DASRI pour une activité comparable.

L'identification des bactéries par spectrométrie de masse dépend étroitement de la richesse et de la qualité de la base de données constituée des spectres de référence. Si la robustesse de la méthode est éprouvée pour de nombreux micro-organismes, qu'il s'agisse d'isolats cliniques (Carbannelle *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2009) ou environnementaux (Mellmann *et al.*, 2008; Verroken *et al.*, 2010), la base de données spectrales dont nous disposons reste incomplète et de qualité inconstante pour certains groupes bactériens. Dans notre expérience par exemple, le spectromètre de masse ne peut différencier les espèces du genre *Aeromonas* de façon satisfaisante. Les spectres de souches de référence de chacune des espèces de ce genre sont pourtant présents dans la base, mais probablement en quantité insuffisante ou ne provenant que d'un nombre limité d'isolats (Blondiaux *et al.*, 2010). Cependant, l'incrémention de nouveaux spectres de souches génétiquement caractérisées devrait permettre d'augmenter la spécificité de la méthode. Quelques autres limitations diagnostiques demeurent: la



Méthodes

technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF ne permet pas de distinguer *Shigella* de *Escherichia coli* et ne semble pas, comme d'ailleurs l'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16S (Wang *et al.*, 1997), être un outil adapté à l'identification de ces bactéries de grande importance médicale. De même l'identification des mycobactéries, notamment à croissance lente, reste inconstante. Dans ce cas toutefois, un protocole adapté d'extraction des protéines intracellulaires pourrait permettre l'identification de ces bactéries à la paroi particulièrement résistante.

Enfin, la facilité d'utilisation de l'appareil et la rapidité d'obtention de résultats fiables ont entraîné une importante dépendance du personnel du laboratoire à la technique au détriment des méthodes conventionnelles. Dans un service universitaire comme le nôtre, la formation à la bactériologie des futurs professionnels, médicaux et techniques en est aujourd'hui profondément affectée, le corpus des techniques disponibles dans notre structure s'étant considérablement réduit.

En conclusion, la spectrométrie de masse MALDI-TOF est une méthode rapide et fiable pour l'identification des micro-organismes d'intérêt médical. Si la non-exhaustivité des banques de spectre ne permet pas encore l'identification de toutes les bactéries rencontrées en bactériologie médicale, l'incrémentation de nouvelles données permettra sans doute, dans un avenir proche, d'atteindre une grande spécificité.

Références bibliographiques

Blondiaux N, Gaillot O, Courcol, RJ. 2010. MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in a teaching hospital in Lille. *Pathol Biol (Paris)*, 58(1): 55-57.

Carbone E, Beretti JL, Cottyn S, Quesne G, Berche P, Nassif X, Ferroni A. 2007. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 45(7): 2156-2161.

Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 14(11): 1584-1586.

Fenselau C, Demirev PA. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 20(4): 157-171.

Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, Dunn J, Hall G, Wilson D, Lasala P, Kostrzewa M, Harmsen D. 2008. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol*, 46(6): 1946-1954.

Nagy E, Maier T, Urban E, Terhes G, Kostrzewa M. 2009. Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*, 15(8): 796-802.

Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang TD, Wauters G, Glupczynski Y. 2010. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol*, 48(11): 4015-4021.

Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. 1997. Phylogenetic analysis and identification of *Shigella* spp. by molecular probes. *Mol Cell Probes*, 11(6): 427-432.