



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



INFECTIONS BACTÉRIENNES - ANTIBIOTIQUES

Intérêts et les limites actuelles du MALDI-TOF en microbiologie clinique

Interests and current limits of MALDI-TOF in clinical bacteriology

N. Degand^a, R. Ruimy^{b,c,d,*}

^a Laboratoire de bactériologie, hôpital L'Archet II, CHU de Nice, 151, route de Saint-Antoine-de-Ginestière, BP 3079, 06202 Nice cedex 3, France

^b Laboratoire de bactériologie, hôpitaux universitaires Paris Nord Val-de-Seine, hôpital Bichat–Claude-Bernard, AP–HP, 46, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France

^c EA 3964, université Paris Diderot - Paris 7, UFR de médecine Paris Diderot - Paris 7 (site Xavier Bichat), 16, rue Henri-Huchard, BP 416, 75877 Paris cedex 18, France

^d Service de biologie médicale, hôpital Bichat, 46, rue Henri-Huchard, 75877 Paris, France

MOTS CLÉS

MALDI-TOF ;
Spectrométrie de masse ;
Identification
bactérienne ;
Hémoculture positive ;
Résistances
aux antibiotiques ;
Détection
carbapénémases

KEYWORDS

MALDI-TOF;
Mass spectrometry;
Bacterial identification;
Positive blood culture;
Antibiotic
resistance;

Résumé Jusqu'au début des années 2000, au sein des laboratoires de microbiologie clinique, l'identification bactérienne reposait essentiellement sur l'analyse de caractères biochimiques dont l'interprétation nécessitait une expertise. Pour la plupart des cas, le résultat n'était obtenu qu'au bout de 18 heures. En cas d'échec, l'identification était acquise par des analyses de biologie moléculaire comme celles des séquences du gène de l'*ARNr 16S*. Depuis près de cinq ans, des automates utilisant la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF ont révolutionné l'identification bactérienne. À partir de colonies, des résultats d'identification fiables sont acquis en moins de cinq minutes avec une facilité d'utilisation technique. Ces atouts ont largement contribué à son succès. Dès lors qu'un laboratoire s'équipe avec ce type d'automate, l'essentiel des identifications est assuré par cette nouvelle approche. L'objectif de cette revue est d'analyser les raisons du succès du MALDI-TOF en bactériologie clinique, d'en connaître les limites et les nouvelles applications.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary Until the early 2000s, in the clinical microbiology laboratories, the bacterial identification was based mainly on the biochemical analysis of phenotypic characters whose interpretation required expertise. In most cases, the results was obtained after more than 18 h. When it was taken in default, the identification was mainly obtained by molecular biology analysis such as 16S rDNA sequences. For nearly 5 years, using MALDI-TOF mass spectrometry machine revolutionized bacterial identification in clinical bacteriology laboratories. From bacterial colonies, the results of reliable identifications are easily obtained in less than 5 minutes. These advantages have greatly contributed to its success. When a laboratory is equipped by this device, the bulk of the identifications are provided by this new approach. The

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : ruimy.r@chu-nice.fr (R. Ruimy).

Introduction

L'application de la spectrométrie de masse de type *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight* (MALDI-TOF) à l'identification bactérienne constitue une avancée majeure dans le domaine de la bactériologie médicale. La commercialisation d'automates intégrant le MALDI-TOF couplé à un logiciel d'analyse et une base de donnée de spectre a permis sa large diffusion dans les laboratoires. La facilité d'utilisation de ces automates a été un atout essentiel qui a contribué à son succès. Au sein des laboratoires équipés, l'identification par MALDI-TOF remplace presque complètement l'approche d'identification classique phénotypique. En effet, cette dernière reposait essentiellement sur l'analyse d'un ensemble de caractères phénotypiques obtenus après 18 à 48 heures d'incubation de galerie d'identification de type API le plus souvent. Les délais pouvaient être plus réduits pour les laboratoires équipés d'automates d'identification type Phoenix, Vitek ou Microscan. Quel que soit le type d'identification utilisé (manuelle ou automatique), il fallait, selon le résultat de la coloration de Gram des bactéries, choisir le type de galerie le plus approprié. Cette démarche était donc non universelle. Le nombre d'espèce susceptibles d'être identifiées était limité. Toute erreur de Gram pouvait être à l'origine d'une identification erronée. Pour les galeries non automatisées, l'interprétation était parfois difficile, variant selon l'opérateur et pouvant être la source d'erreur d'identification. Une expertise était le plus souvent nécessaire. L'avènement de la biologie moléculaire appliqué au gène de l'ARNr 16S a permis de pallier certains de ces défauts. Cependant, elle n'a pas remplacé l'identification phénotypique essentiellement en raison de son coût plus élevé, de la nécessité d'avoir un personnel qualifié pour la mise en œuvre de ces techniques et du délai plus important pour obtenir un résultat, pouvant atteindre plusieurs jours. La spectrométrie de masse a complètement révolutionné l'identification bactérienne. Il s'agit ici d'une approche complètement universelle et évolutive. Aucun test préalable n'est nécessaire pour identifier une colonie et aucune expertise n'est requise pour l'interprétation. En théorie, toute espèce bactérienne peut être identifiée par cette approche dès lors que nous disposons du spectre de l'espèce de référence dans la base données de l'automate. La mise à jour des bases de données est un point fort du MALDI-TOF qui constitue un progrès considérable dans le domaine de l'identification par rapport aux techniques conventionnelles qui sont peu évolutives. La mise en œuvre est simple pour la majorité des espèces bactériennes. Le coût pour une analyse est très réduit. Le résultat est obtenu en cinq minutes réduisant le délai requis pour l'identification classique de 24 à 48 heures. Il existe cependant quelques limites qu'il faut connaître pour obtenir un résultat fiable. L'objectif de ce travail est de présenter les intérêts, les limites et les développements de cette approche dans le domaine de l'identification bactérienne en bactériologie médicale.

Historique de la spectrométrie pour l'identification en microbiologie

Le principe général de la spectrométrie de masse est d'obtenir sous forme d'un spectre les masses moléculaires des différents composants présents dans un échantillon. À la fin des années 1980, Karas et al. ont mis au point une technique d'ionisation douce appelée MALDI-TOF pour obtenir des spectres de masses protéiques [1]. Les premières utilisations sur des spores bactériennes puis sur des bactéries entières (ou « intactes »), ont révélés que les spectres de souches appartenant à des espèces différentes présentaient des profils de spectre différents, d'où le terme employé d'« empreinte spectrale » caractéristique. Cette constatation, couplée à la rapidité d'obtention des spectres de masse ont très vite placé le MALDI-TOF comme un outil d'identification bactérienne révolutionnaire. Dans les premières publications sur le sujet, l'identification reposait sur l'homologie d'un spectre inconnu à celui d'un spectre de référence, en termes de présence ou d'absence de pics spécifiques. Ainsi, le MALDI-TOF a initialement été évalué sur des entérobactéries [2], des souches bactériennes impliquées dans le bioterrorisme [3] et des staphylocoques et mycobactéries [4]. Depuis ces premiers travaux, les performances de cette technologie ont évolué ainsi que l'exhaustivité des banques de données et de ses applications en routine.

Principe analytique

Le principe de la spectrométrie de masse appliquée à l'identification bactérienne est d'obtenir, en quelques minutes, le spectre de protéines bactériennes issues soit de colonies, soit de prélèvement biologique dans le but de le comparer à des spectres de références présents dans des banques de données. L'obtention du spectre, également appelée « acquisition », passe par différentes étapes (Fig. 1). La première étape est le dépôt de l'échantillon sur une plaque et l'ajout d'une matrice organique dont les propriétés physicochimiques permettent une co-cristallisation du mélange matrice/échantillon à température ambiante. Différentes matrices possèdent les caractéristiques physicochimiques adaptées telles que l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (ou acide gentisique), l'acide trans-3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (ou acide sinapinique) et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique. L'étape suivante correspond à l'irradiation par un laser du mélange cristallisé matrice-échantillon qui aboutit à un échauffement et une désorption des molécules (expansion en phase gazeuse). À l'issue de cette étape, la matrice absorbant à la longueur d'onde du laser UV (337 nm), supporte l'essentiel de l'énergie du laser, ce qui permet de préserver les protéines et l'échauffement génère une ionisation des protéines matricielles. Une fois la désorption obtenue, un transfert de charges des molécules de matrice ionisées vers les molécules d'échantillon se produit au sein même du nuage gazeux. Cette étape est appelée

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/3405468>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/3405468>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)