



L'émergence des espèces bactériennes rarement impliqué en pathologie humaine : impact de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight).

Piseth Seng^{1,2,*}, Cédric Abat¹, Jean Marc Rolain^{1,2}, Philippe Colson^{1,2}, Jean-Christophe Lagier^{1,2},
Frédérique Gouriet^{1,2}, Pierre Edouard Fournier^{1,2}, Michel Drancourt^{1,2},
Bernard La Scola^{1,2}, Didier Raoult^{1,2}

1. Aix Marseille Université, URMITE, UM63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, 13005 Marseille, France.
2. APHM, CHU Timone, Pôle Infectieux, 13005 Marseille, France.



INTRODUCTION

La méthode d'identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI-TOF a été adaptée avec succès pour l'identification de routine des microorganismes dans les laboratoires de microbiologie clinique au cours des dix dernières années [1, 2]. Cette technique révolutionnaire permet de faire le diagnostic plus facilement et plus rapidement des agents pathogènes avec la fiabilité, et la rentabilité incontestable par rapport aux méthodes d'identification phénotypique conventionnel et d'identification par moléculaires [3].

Le MALDI-TOF a été utilisé dans le diagnostic clinique de routine pour identifier des espèces, des sous-espèces [3, 4], des clones épidémiques et des toxines des bactéries [5-7]. Récemment, MALDI-TOF a été utilisé pour détecter les agents pathogènes précédemment mal-identifiés [8-13]. Quelques études de détection des résistances aux antibiotiques par MALDI-TOF ont été rapportées chez les *Staphylococcus aureus* [14-21], *Acinetobacter baumannii* [26], *Escherichia coli* et autres entérobactéries [22-24]. Plusieurs nouvelles espèces bactériennes émergent en pathogènes humains ont été identifiées utilisant MALDI-TOF [25-34].

Dans cet étude nous évaluons en analysant nos expériences de 11 dernières années, la performance de MALDI-TOF dans l'identification de routine des microorganismes dans notre laboratoire de microbiologie clinique en comparant avec les techniques d'identification phénotypique conventionnelle (CPI). Nous évaluons également la capacité de MALDI-TOF à identifier les espèces bactériennes rarement rapportées en étant pathogène chez l'homme.

MATERIELS & METHODES

- Etude rétrospective, du 1er janvier 2002 au 31 décembre 2012 (~ 11 ans)
- Prélèvements cliniques : hémocultures, liquide céphalo-rachidien, plaies, abcès, prélèvements respiratoires, génito-urinaires, ostéo-articulaires et digestifs.
- 1^{ère} Identification bactérienne par des méthodes phénotypiques :
 - Période de CPI (90 mois): Coloration de Gram, détermination par catalase et oxydase, Vitek 2 (BioMérieux) et galerie API 20A, API Coryne, API Campy, API 20E, API 20NE, API Strep, API Staph, API NH, and API Listeria (BioMérieux)
 - Période de MALDI-TOF (40 mois): 2 dépôts sur 4 d'un isolat sont analysés
 - AutoFlex du 1^{er} septembre 2009 au 30 novembre 2010
 - MicroFlex : 1^{er} décembre 2010 au 31 décembre 2012
 - Base de données de MALDI-TOF: contient 6 213 microorganismes = Banque de Bruker (3 993 microorganismes) + 2 220 autres microorganismes nouvellement créés dans notre laboratoire (souches types, souches bien caractérisées par biologie moléculaire).
- 2^{ème} Identification bactérienne par des méthodes phénotypiques:
 - Période de CPI (90 mois): Répétition de CPI
 - Période de MALDI-TOF: si le score < 1,9 ⇒ tester 2 autres dépôts. En cas de non-identification ou discordance: on analyse 4 autres dépôts (nouvel run)
- Identification par biologie moléculaire (PCR de 16S rRNA, *rpoB*): en cas d'absence d'identification par la 2^{ème} Identification bactérienne par des méthodes phénotypiques.
- Définition des rares espèces bactériennes= de ≤ 10 publications dans la base de données de PubMed comme un agent pathogène chez l'homme.
- Délai d'identification d'un isolat clinique: dépôt de colonie - Résultat d'identification
- Coût d'identification d'un isolat clinique= coût de l'appareil amorti sur 5 ans + salaire de techniciens de laboratoire + coût des réactifs et de la matrice + coût de témoins positifs.

REFERENCES

- Seng, P., et al. Clin Infect Dis 49, 543-551 (2009).
- La Scola, B. & Raoult, D., PLoS One 4, e8041 (2009).
- Seng, P., et al., Future Microbiol 5, 1733-1754 (2010).
- Drancourt, M., Clin Microbiol Infect 16, 1620-1625 (2010).
- Bittar, F., et al. Emerg Infect Dis 16, 1231-1236 (2010).
- Williamson, Y.M., et al. Appl Environ Microbiol 74, 5891-5897 (2008).
- Griffin, P.M., et al. J Clin Microbiol 50, 2918-2931 (2012).
- Werno, A.M. et al. J Clin Microbiol 50, 2863-2867 (2012).
- Hinic, V., et al. J Clin Microbiol 50, 2561-2567 (2012).
- Djelouadi, Z. et al. Vet Microbiol 158, 142-146 (2012).
- Alvarez-Buylla, A. et al. Infect Genet Evol 12, 345-349 (2012).
- Lista, F., et al. BMC Microbiol 11, 267 (2011).
- Fournier, P.E. et al. J Med Microbiol 58, 1154-1159 (2009).
- Hrabak, J. et al. J Clin Microbiol 49, 3222-3227 (2011).
- Kempf, M., et al. PLoS One 7, e31676 (2012).
- Edwards-Jones, V., et al. J Med Microbiol 49, 295-300 (2000).
- Walker, J. et al. J Microbiol Methods 48, 117-131 (2002).
- Jackson, K.A. et al. J Microbiol Methods 62, 273-284 (2005).
- Du, Z., et al. Anal Chem 74, 5487-5491 (2002).
- Rajakaruna, L., et al. Infect Genet Evol 9, 507-513 (2009).
- Majcherczyk, P.A. et al., FEMS Microbiol Lett 255, 233-239 (2006).
- Camara, J.E. & Hays, F.A. Anal Bioanal Chem 389, 1633-1638 (2007).
- Russell, S.C. et al. Anal Chem 79, 5399-5406 (2007).
- Sparbier, K. et al. J Clin Microbiol 50, 927-937 (2012).
- Zbinden, A., et al. J Clin Microbiol 50, 2969-2973 (2012).
- Tani, A., et al. PLoS One 7, e40784 (2012).
- Chan, J.F., et al. J Clin Microbiol 50, 2525-2528 (2012).
- Gouriet, F. et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31, 2469-2480 (2012).
- Angelakis, E. et al. J Food Sci 76, M568-572 (2011).
- Dridi, B. et al. APMIS 120, 85-91 (2012).
- Fernandez-Olmos, A. et al. J Clin Microbiol 50, 1096-1098 (2012).
- Ng, L.S. et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31, 1749-1752 (2012).
- Huber, H., et al. BMC Vet Res 7, 6 (2011).
- La Scola, B. et al. Anaerobe 17, 106-112 (2011).
- van Veen, S.Q. J Clin Microbiol (2010).
- Bizzini, A. J Clin Microbiol (2010).
- Cherkaoui, A. J Clin Microbiol (2010).
- Eigner, U., et al. Clin Lab 55, 289-296 (2009).
- Lagier, J.C., et al. Clin Microbiol Infect 18, 1185-1193 (2012).
- Lagier, J.C. Frontiers in cellular and infection microbiology 2, 136 (2012).
- Dubourg, G., et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2013).
- Bizzini, A., et al. J Clin Microbiol 49, 693-696 (2011).

RÉSULTATS

Au total de 500 179 isolats ont été analysés au cours de 11 dernières années. Nous avons identifié 459 espèces bactériennes par les 1^{er} tests phénotypiques (CPI; MALDI-TOF). 1 951 isolats ont été ré-identifiés par la 2^{ème} test phénotypique (670 isolats) et par la biologie moléculaire (1 273) [tableau 1].

Tableau 1: Résumé de 11 ans d'identifications bactériennes dans notre laboratoire

Technique d'identification (période d'étude)	Période d'étude (mois)	Nombre total d'analyse	N° d'isolats clonaux	N° d'isolats identifiés par 1 ^{er} test phénotypique	N° d'espèces identifiées par 1 ^{er} test phénotypique	N° d'espèces identifiées /an	N° d'isolats identifiés par 2 ^{ème} test phénotypique	N° d'isolats identifiés par biologie moléculaire	N° d'isolats mal identifiés par 1 ^{er} test phénotypique	% mauvaise identification
Période de CPI (1-Jan-02 au 30-Août-09)	91	322 291	175 999	174 636	336	44	620	743	1 363	0,77%
Période de MALDI-TOF (1-Sep-09 au 30-Dec-12)	40	177 888	110 843	110 263	382	112	50	530	580	0,52%
AutoFlex II (1-Sep-09 au 30-Nov-10)	15	52 695	34 839	34 497	264	211	32	310	342	0,98%
MicroFlex (1-Dec-10 au 31-Dec-12)	25	125 193	76 004	75 766	340	163	18	220	238	0,31%
Totale	131	500 179	286 842	284 899	459	42	670	1 273	1 951	0,68%

On observe une augmentation de la capacité d'analyse de 46 079 isolats en 2002 à 66 989 en 2012 [figure 1] et de nombre d'espèce bactérienne identifiée (163 en 2002 et 340 en 2012) [figure 2]

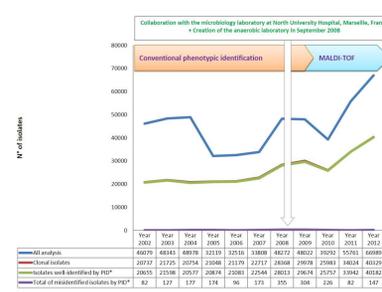


Figure 1: Nombre total des isolats testés, des isolats clonaux testés, des isolats clonaux identifiés par 1^{er} test phénotypique.

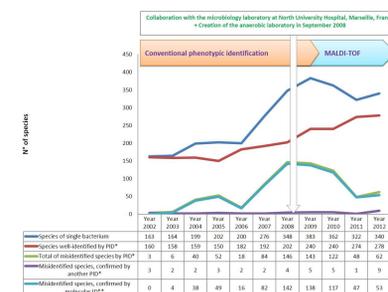


Figure 2: Nombre total des espèces bactériennes identifiées, des espèces identifiées par 1^{er} test phénotypique conventionnel et par biologie moléculaire.

Nous avons identifié 128 espèces des bactéries rarement rapportées en étant pathogène chez l'homme, dont 48 par les techniques phénotypiques (22 par CPI, 37 par MALDI-TOF) et 75 par biologie moléculaire.

Parmi 516 isolats de 196 espèces souvent mal-identifiées par MALDI-TOF, 365 isolats (71%) représente par 10 genres qui sollicitaient souvent l'identification par la biologie moléculaire

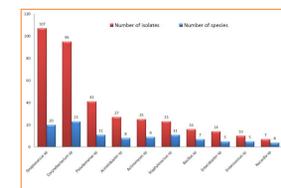


Figure 3: les 10 genres bactériens mal identifiés par MALDI-TOF

MALDI-TOF a réduit le temps requis pour une identification d'un isolat de 55 fois par rapport à l'identification phénotypique conventionnelle, et de 169 fois par rapport à l'identification moléculaire. MALDI-TOF MS réduit le coût par 5 fois à l'identification phénotypique conventionnelle et 169 fois par rapport à l'identification moléculaire.

Tableau 2: Comparaison le délai et le coût des différents techniques d'identification bactérienne dans notre laboratoire

Technique d'identification	Temps pour l'identification d'un isolat	Coût (Euros) d'une identification d'un isolat	Niveau d'entraînement de techniciens
Coloration de Gram	6 min	0,6	Moyen - Avancé
Galerie d'API (BioMérieux)	18 - 48 h	4,6 - 6	Moyen
Identification par Vitek 2 (BioMérieux)	5 - 8 h	5,9 - 8,23	Moyen
Identification par Biologie Moléculaire (16S rRNA, <i>rpoB</i>)	24 h	137,7	Moyen - Avancé
MALDI-TOF par AutoFlex II (Bruker Daltonik)	6 - 8 min 30 sec	1,43	Débutant - Moyen
MALDI-TOF par MicroFlex (Bruker Daltonik)	1 min 46 sec	1,35	Débutant - Moyen

DISCUSSION & CONCLUSION

La capacité d'identification bactérienne dans notre laboratoire est augmentée au cours des 11 dernières années, on pourrait expliquer par : 1. L'arrivée d'un laboratoire de CHU Nord de Marseille, 2. La création d'un laboratoire d'anaérobie, 3. L'arrivée de l'outil révolutionnaire d'identification bactérienne qui est MALDI-TOF.

En 2008, nous avons évalué la performance de MALDI-TOF dans l'identification bactérienne de routine en comparant avec CPI [1]. Depuis plusieurs laboratoires de microbiologie clinique adopte ce technique et abandonne les CPI [3, 35-38]. MALDI-TOF a été utilisé récemment dans 3 études de Culturomics qui permettait identifier 32 nouvelles espèces bactériennes et 177 autres espèces qui n'étaient pas connues dans les tubes digestifs humains [39-41]. Après avoir intégré des spectres dans la base de données de MALDI-TOF, seulement 4 des 4000 colonies avaient besoins d'identification par biologie moléculaire [41].

Nous avons montré que MALDI-TOF a une capacité à identifier les bactéries rares. MALDI-TOF a également la capacité d'identifier des microorganismes initialement inconnus [42].

La mauvaise identification de MALDI-TOF sont lié non seulement à l'absence totale de spectre de la bactérie concerné mais également au nombre insuffisant de spectres dans la base de données (<10 spectres) [1, 42]. Cette difficulté est observé chez les groupes de bactéries qui ont une biodiversité importante intra-espèces par exemples chez les 10 genres bactériens (*Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, et *Nocardia*) qui sollicite plus souvent l'identification de biologie moléculaire.

En conclusion, MALDI-TOF est un outil puissant pour l'identification bactérienne de routine dans les laboratoires de microbiologie clinique. La capacité de MALDI-TOF à identifier des bactéries rarement décrites chez l'homme nous aideront à étudier l'émergence de ces espèces en pathologie humaine. MALDI-TOF peuvent être considérés une alternative aux méthodes moléculaires dans les laboratoires cliniques dans l'avenir proche.