

Les Laboratoires Ketterthill utilisent au sein de leur département de bactériologie d'une nouvelle technologie unique au Luxembourg basée sur la technique MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time-Of-Flight).



# IDENTIFICATION BACTÉRIENNE PAR LA TECHNOLOGIE MALDI-TOF\_

Dr. Stéphane Gidenne



© Bohumil KOSTOHRYZ | boshua

La principale application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF en microbiologie clinique est l'identification des microorganismes par analyse de leurs protéines totales.

Cette technique permet en particulier d'identifier la plupart des bactéries en quelques minutes seulement, contre 4 à 18 heures par des procédés classiques habituellement employés par tous les laboratoires.

Actuellement, il est possible d'identifier pas moins de 3.200 bactéries et 260 champignons par cette nouvelle technique. La méthode est rapide, précise et fiable en comparaison des méthodes conventionnelles.

D'autres applications de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sont en cours de développement et paraissent très prometteuses telle que la mise en évidence de toxines bactériennes ou de mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Aujourd'hui, en Europe, près de 250 laboratoires de biologie médicale utilisent cette technique dans leur pratique quotidienne. Les laboratoires Ketterthill sont les premiers et

seuls utilisateurs de cette technologie au Luxembourg dans le domaine de la bactériologie médicale. Cette installation nouvelle s'inscrit dans la volonté des laboratoires Ketterthill de poursuivre leur développement en matière d'innovation au service de leurs clients, patients et médecins, afin d'apporter une prise en charge médicale la plus optimale en termes de qualité.

[www.ketterthill.lu](http://www.ketterthill.lu)

[www.llam.lu](http://www.llam.lu)

L'identification des micro-organismes cliniquement importants est l'une des tâches-clés du laboratoire de microbiologie. Jusqu'à présent, la technique standard restait encore toujours basée sur les galeries 'multicolores' développées par Pasteur et Koch. La spectrophotométrie de masse combinée à une désorption-ionisation laser assistée par une matrice d'une bactérie isolée permet maintenant de réaliser cette identification en quelques minutes et avec une haute précision. Une nouvelle époque est née.

NOUVELLE TECHNOLOGIE AU LUXEMBOURG EN BIOLOGIE MÉDICALE

## \_MALDI-TOF EN MICROBIOLOGIE CLINIQUE

Dr. Erik Briers

Dans les années quatre-vingts, la microbiologie-bactériologie restait fort comparable à la bactériologie des années de ses débuts lorsque Pasteur et Koch faisaient la pluie et le beau temps. La microscopie, l'isolation par culture, l'identification et la détermination de l'antibiogramme restaient essentielles. La détermination de l'antibiogramme a été la plus grande évolution depuis les débuts de la microbiologie pour la simple et bonne raison que les antibiotiques n'ont été découverts qu'aux alentours de la deuxième guerre mondiale. Les premières évolutions n'étaient pas des révolutions: la galerie multicolore classique a été remplacée par la même, mais sous une forme plus maniable et miniaturisée. La lecture automatique a été introduite, ce qui a permis de parfois lire la galerie déjà après cinq heures, ce qui était un gain de temps évident.

Dans les années quatre-vingts, on a rêvé que l'identification allait s'accélérer grâce à l'utilisation d'anticorps (monoclonaux) spécifiques. Mais cela a rapidement menacé de devenir problématique à cause des réactions croisées et du grand nombre d'anticorps nécessaires. Actuellement, il y a bien entendu quelques systèmes qui utilisent des anticorps, surtout quand la culture pose un grand problème, comme lors d'infections mycosiques systémiques où la détection du galactomannane circulant offre une solution efficace.

Un autre espoir a été mis dans les techniques PCR ou dans l'analyse du génome microbien. Mais, ici aussi, il y avait le problème du grand nombre d'amorces qui étaient nécessaires. Ici aussi, il y a des applications qui résistent comme le séquençage de l'ARNr 16S.

Toutes ces techniques nouvelles et anciennes exigent toutefois du temps et une coloration de Gram. Ce ne sont pas les systèmes adaptables à tout et rapides que le bactériologue souhaiterait avoir. Le résultat en est que, actuellement, la plupart des laboratoires travaillent encore toujours en grande partie suivant des procédures très anciennes.

### Chimie

La bactériologie est restée longtemps le dernier bastion où la chimie devait se tenir respectueusement un peu en retrait. La bactériologie était un peu un travail de détective où, presque littéralement, le coupable était recherché avec une loupe au

moyen d'un profil fin et détaillé. Un certain flou artistique et un peu d'insécurité restaient attachés à la bactériologie.

La chimie aime la clarté et utilise des appareils qui peuvent démêler les choses avec une grande sécurité. Il s'avère maintenant qu'une de ces techniques est particulièrement adaptable à la bactériologie.

Du cours de biochimie, nous nous rappelons de l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines d'une bactérie avec ses centaines de petits dépôts (Figure 1). Nous nous souvenons également que les modèles de ces dépôts différaient suivant l'espèce et le genre. Mais nous nous souvenons également qu'il était irréaliste de faire une telle électrophorèse bidimensionnelle pour une bactérie isolée. Nous nous rappelons que les différentes bactéries sont caractérisées par leur propre modèle de protéines, leur propre empreinte protéique.

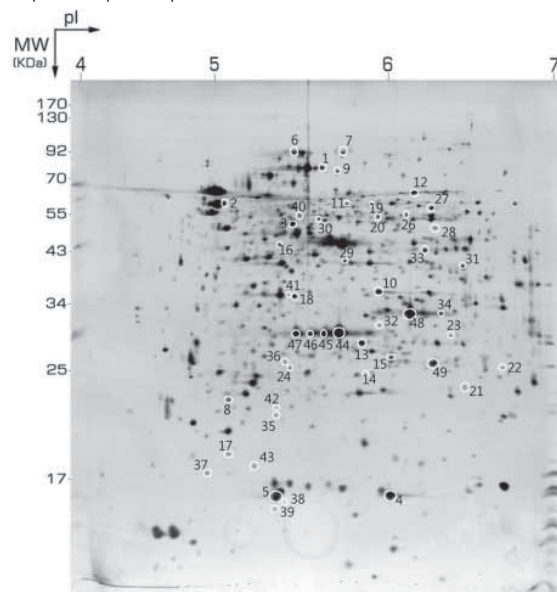


Figure 1\_Séparation électrophorétique bidimensionnelle des protéines. La séparation est basée, dans une direction, sur le pI (point isoélectrique) des protéines et, dans l'autre direction (y), sur le poids moléculaire (PM). (Le MALDI-TOF compte les protéines ayant une masse entre 2 et 20 kDaltons.) En utilisant des colorations spécifiques, d'autres protéines peuvent également être mises en évidence. (Cheng & Lee Microbial Cell Factories 2010;9:63)

### MALDI-TOF

En chimie, également, le temps ne reste pas immuable. La spectrométrie de masse était une technique qui, à l'origine, a été utilisée en chimie pour déterminer le poids moléculaire de molécules initialement assez petites. Les protéines étaient rapidement trop lourdes. Les premiers appareils étaient également utilisés par des docteurs en chimie qui ne faisaient rien d'autre et qui devaient régulièrement démonter leur appareil pour les maintenir en état de fonctionnement.

La spectrométrie de masse a beaucoup changé: actuellement, on utilise de moins en moins de vrais aimants gigantesques pour séparer les masses les unes des autres. Il existe maintenant d'autres techniques d'une utilisation plus confortable pour cette séparation et de nouveaux moyens de produire les ions nécessaires.

L'un d'eux, qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de cet article, est assez connu sous le nom de spectrométrie de masse 'désorption ionisation laser assistée par une matrice – temps de vol (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of flight)' (MALDI-TOF). 'MALDI' signifie technique d'ionisation et 'TOF' analyse spectrométrique des ions produits.

### MALDI

Dans ce type d'analyse de la masse, le matériel à étudier est enfermé dans une matrice. Dans le cas d'une analyse microbiologique, on utilise de l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (Figure 2). Si c'est nécessaire, le matériel bactérien (ou mycosique ou de la levure...) peut être extrait ou préparé.

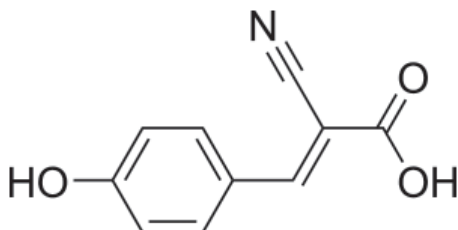


Figure 2\_ Acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique.

C'est un dérivé de l'acide cinnamique qui, par sa structure, d'une part forme une couche homogène de très fins cristaux 'lamelliformes' et, d'autre part, absorbe très bien la lumière UV. La double liaison a également comme propriété secondaire, sous une exposition à une lumière, de pouvoir réagir avec une autre double liaison du voisinage et ainsi de pouvoir lier les molécules l'une à l'autre (liaison croisée). C'est dans cette matrice que les bactéries sont fixées. Une solution de la matrice est déposée sur la suspension des micro-organismes. Ensuite, le solvant est évaporé et la matrice reste avec le micro-organisme (Figure 9).

La matrice ainsi formée est stable: il n'est pas nécessaire de travailler rapidement, on peut faire tranquillement d'autres dépôts de matrice sur la plaque-cible (target plate). Cette plaque-cible est une petite plaque de métal gravée de petites cuvettes. Le modèle classique 8x12 permet de charger 96 dépôts simultanément dans l'appareil.

Le laser est un laser à azote qui est réglé à 335nm. Ce rayonnement est très riche en énergie: une mole de photons porte 357 kJoules pouvant ainsi briser toutes les liaisons. La figure 3 montre une image schématique de cette étape.

Le mécanisme précis de l'ionisation n'est actuellement toujours pas bien connu, mais nous supposons que cela se passe de la manière suivante. Le laser lance une série d'impulsions lumineuses courtes et riches en énergie dirigées sur des endroits différents du dépôt. Chaque tir dure de 1 à 5

nanosecondes et transmet beaucoup d'énergie. L'énergie est tellement élevée que le laser fait des petits trous dans le tapis de la matrice. Elle induit des réactions photochimiques et thermiques qui provoquent un nuage de molécules protonées dans la phase gazeuse. Nous avons donc formé une masse d'ions moléculaires qui peuvent être analysés. La plaque-cible même se trouve en tension positive et repousse donc les ions moléculaires qui sont chargés positivement.

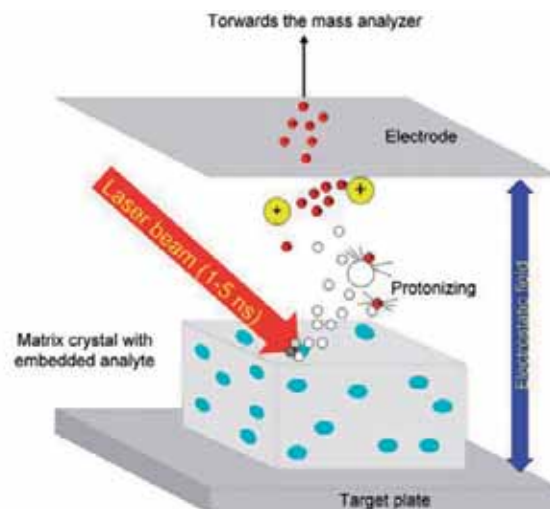


Figure 3\_ Représentation schématique d'une désorption-ionisation laser.

### TOF

Les ions subissent, dans la source d'ions, une accélération due à une différence de potentiel appliquée entre la cible et l'électrode d'accélération. Les ions acquièrent ainsi tous la même énergie (Figure 4). Ces ions quittent la source en traversant un certain nombre de lentilles pour ensuite voler en direction du détecteur qui se trouve à une certaine distance à la fin d'un trajet dans une chambre (le tube de vol ou 'flight tube') qui se trouve sous un vide poussé et dans lequel il n'y a aucun champ électrique ou magnétique.

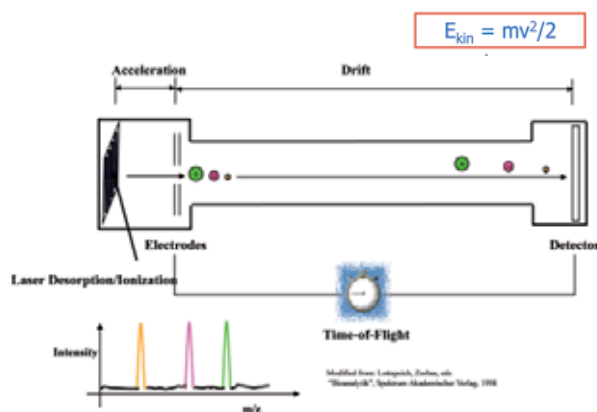


Figure 4\_ Schéma complet d'un appareil MALDI-TOF.

La base de l'analyse est que toutes les particules portent la même énergie. Cette énergie est une énergie cinétique. La vitesse de toutes les particules dépend donc de leur masse. Le trajet à parcourir par toutes les particules étant toujours le même, les particules les plus rapides (les plus légères) arriveront les premières, suivies par des particules de plus en plus lourdes.

Cela va très vite. Le premier tir du laser est suivi par toute une série de tirs (à une fréquence de 60 éclairs par secondes) et toutes les particules seront comptées en fonction de leur temps d'arrivée. En mesurant et comptant quelques centaines de faisceaux de particules (200 à 300), on obtient un modèle spécifique (Figure 5).

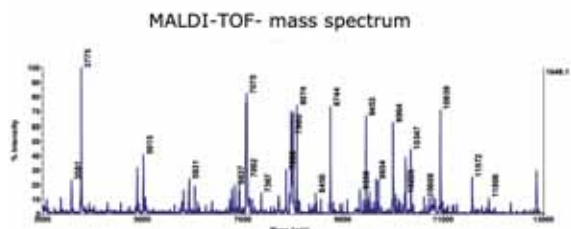


Figure 5\_ Un spectre de masse par SM MALDI-TOF après quelques manipulations, avec les masses retrouvées et leurs intensités relatives. Le pic le plus élevé a une intensité relative de 100%.

Tous les nuages d'ions moléculaires provoqués par les différents tirs du laser ne sont pas identiques à 100%. C'est pourquoi tous les pics sont additionnés par masse. Cela donne un spectre statistique moyen qui est celui qui sera utilisé. Ce n'est donc pas important si une petite quantité d'un autre type de bactérie est présente: son signal se noie dans le signal de la bactérie prédominante.

Le domaine de mesure du MALDI-TOF qui est utilisé en microbiologie est limité aux ions ayant une masse entre 2.000 et 20.000 Dalton (Figure 1). Il n'est donc pas important de connaître précisément la nature des molécules, elles peuvent être n'importe quoi. Par comparaison, on sait cependant qu'il s'agit souvent de protéines ribosomiales connues. Un seul *E. Coli*, par exemple, contient facilement 20.000 ribosomes, quelle que soit la phase physiologique dans laquelle la bactérie se trouve; ces protéines sont donc toujours présentes en grande quantité. De ce fait et à cause du domaine de masse fixé de 2.000 à 20.000 Daltons qui ignore les petits métabolites, le milieu sur lequel la bactérie a été cultivée n'est également pas important: le spectre SM est stable et donne un signal d'une forte intensité.

Par contre, ce qui est important est qu'il y ait une densité suffisante dans le domaine de masse examiné, que les pics soient suffisamment forts et que leurs rapports soient constants pendant le cycle de vie. Si une seule molécule d'un certain type est présente par bactérie, elle n'est pas visible.

Le spectre qui est établi de cette façon est spécifique de chaque type de bactérie jusqu'au niveau de l'espèce. Parfois, il s'arrête au niveau de genre. Le spectre obtenu consiste en une série de pics qui sont tous caractérisés par leur rapport masse-charge ( $m/z$ ) (la charge est presque toujours +1) et par une intensité. Cette dernière peut être normalisée.

La figure 6 présente des exemples de spectres de masse de différents organismes analysés par MALDI-TOF.

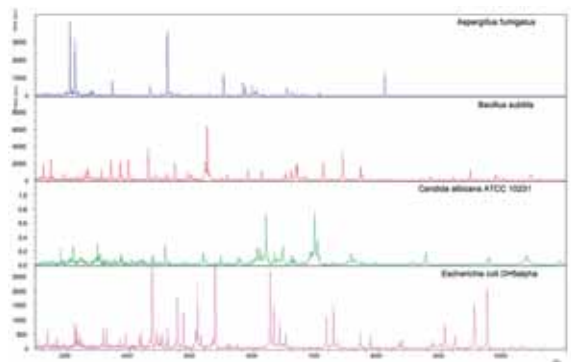


Figure 6\_ Spectres par SM MALDI-TOF pour toute une série d'espèces appartenant à différents genres. Il apparaît clairement que ces différents spectres peuvent être utilisés pour leur identification.

### Analyse du spectre

Il n'est pas possible de calculer théoriquement le spectre d'une bactérie déterminée. On ne peut exclusivement le

trouver qu'en utilisant des organismes types. Pour cela, on a établi un fichier où sont mémorisés les spectres de milliers de bactéries typées. Ces souches proviennent, entre autres, de collections dans lesquelles des organismes-modèles pour chaque espèce ou sous-espèce sont mémorisés et étudiés à fond. De chacune de ces espèces, après une procédure d'extraction, on prend au moins 20 spectres de bonne qualité; on en calcule la moyenne pour la reprendre dans la base de données.

Le spectre d'un micro-organisme à identifier obtenu avec le Biotyper de MALDI est ensuite comparé avec les spectres de masse enregistrés. Le logiciel utilisé s'appelle le 'MALDI Biotyper' (Figure 7). Aussi bien les pics que leur intensité relative sont comparés et repris dans un calcul de corrélation. Le score est le résultat de ce calcul. Si le logarithme de ce  $[\log(\text{score maximal}) + 3]$  est plus grand que 2, l'identification se fait au niveau de l'espèce. Si la valeur se situe entre 1,7 et 2, l'identification ne va pas plus loin que le genre. Des valeurs inférieures à 1,7 ne permettent pas une identification. Lors d'une identification, le plus haut score 'gagne'.

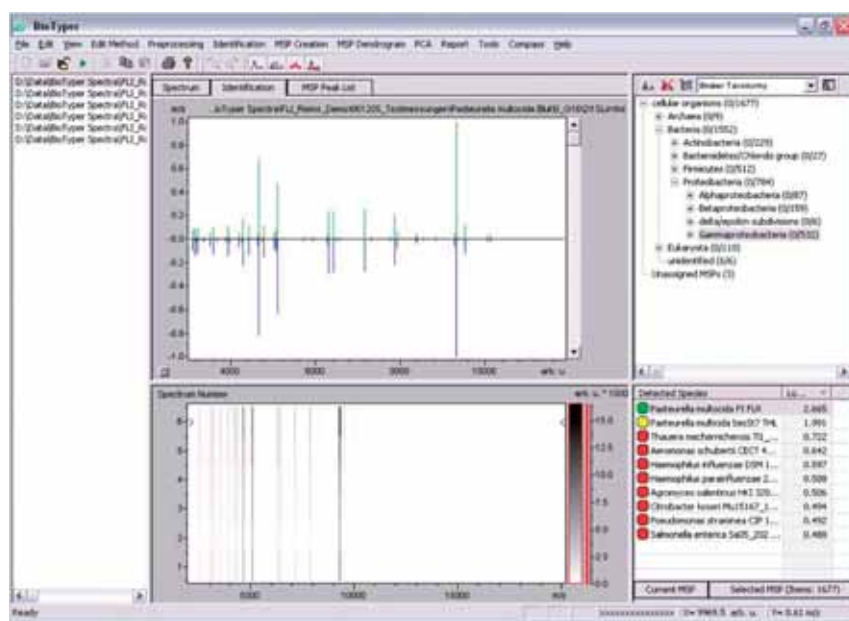


Figure 7\_ Un exemple de l'utilisation du logiciel 'MALDI Biotyper'. Le spectre vert est le spectre qui doit être identifié, l'exemplaire bleu donné en dessous est le spectre de la meilleure 'concordance'. Dans ce cas, la correspondance est de 2,665, ce qui correspond à une identification fiable au niveau de l'espèce.

La qualité et l'étendue du système de reconnaissance de spectre sont déterminées par l'ampleur de sa base de données. Dans le cas du MALDI Biotyper, la base de données est fournie par Bruker Daltonics. La version de décembre 2010 reprend les spectres d'environ 4.000 souches (2.000 espèces, 330 genres). Mais ce système est assez récent. Des lacunes existent donc encore et, pour certaines espèces, il n'y a pas suffisamment de spectres mémorisés dans la base de données. Tout laboratoire peut créer lui-même sa propre base de données et l'intégrer dans la base de données existante. Cela peut être particulièrement pratique chaque fois que l'on trouve un organisme singulier qui n'est pas repris dans la base de données ou si l'on est intéressé par de la recherche de 'petites spécialités'. Les deux bases de données restent cependant séparées l'une de l'autre, de sorte que l'on ne puisse pas 'abîmer' la grande base de données standard. La base de données maître est régulièrement mise à jour, ce qui est l'une des forces du système.

### Une visite à domicile

L'utilisation du MALDI-TOF dans le laboratoire de microbiologie a été introduite très rapidement. La technique n'existe que depuis quelques années. Comme toujours, nous avons

voulu aller examiner et admirer en personne l'appareil au travail. Nous avons donc pris rendez-vous au laboratoire de microbiologie de l'hôpital Oost-Limburg (HOL) avec le docteur Coppens et monsieur De Sutter, technologue.

L'HOL est, comme tant d'hôpitaux modernes, le résultat de fusions entre, dans ce cas-ci, l'hôpital Sint-Jans, l'hôpital André Dumont et l'hôpital Sint-Barbara. Il compte 814 lits avec, en 2009, 33.044 patients hospitalisés pour une moyenne de 7,04 jours d'hospitalisation et un total de 50.767 jours d'hospitalisation. 1.902 collaborateurs équivalents temps-plein y travaillent et 223 médecins sont liés à l'hôpital.

Comme dans de nombreux hôpitaux, le laboratoire clinique est peu à peu en train d'exploser. La charge de travail augmente continuellement et, vu l'automatisation croissante, le besoin d'espace aussi. Il n'est donc pas étonnant que le laboratoire de l'HOL commence à penser à déménager.

Jusqu'à présent, le laboratoire de microbiologie, qui nous accueille à bras ouverts, a essentiellement travaillé suivant la méthode classique. Coloration de Gram et, ensuite, galeries colorées. Ils avaient très peu automatisé. Ils ne faisaient qu'un séquençage de l'ARNr 16S, quand une confirmation moléculaire était nécessaire.

Pour eux, le passage au MALDI-TOF était donc réfléchi et plutôt drastique. C'est un pas radical d'abandon de Pasteur et Koch pour une nouvelle méthode fondamentale.

Etant l'un des premiers laboratoires qui ont installé le MALDI-TOF de Bruker Daltonics en Belgique, ils ont pu vivre les aventures des débutants. Après la formation, la prise en main de l'appareil s'est particulièrement bien passée. La nouvelle procédure est spectaculaire. Dans la plupart des cas, elle donne déjà une identification le jour après la prise d'échantillon. Il ne reste plus qu'à attendre un jour de plus pour l'antibiogramme. Mais, l'identité de la bactérie étant déjà connue, il est préférable de déjà commencer ou mettre au point un traitement antibiotique. De plus, l'identification est faite sans qu'une coloration de Gram ne soit nécessaire.

Il n'y a évidemment pas que des succès, le MALDI-TOF n'arrive pas à (bien) différencier certaines espèces. Ainsi l'E. Coli et la Sigella ne peuvent être différenciées l'une de l'autre. Mais, lorsque l'on veut différencier ces espèces au moyen du séquençage de l'ARNr 16S, le même problème se pose. Ce n'est naturellement pas étonnant si nous savons que de beaucoup de protéines identifiées par le MALDI-TOF sont des protéines ribosomiales.

Pour les microbiologistes de l'HOL, le retour en arrière n'est plus possible.

Persiste-t-il encore quelques points faibles pouvant être améliorés? C'est évident, la technique étant relativement neuve, il ne peut en être autrement.

Il y a la base de données qui, certes, peut encore être élargie et ce serait bien si l'échange des spectres SM entre laboratoires pouvait être organisé.

Il y a ensuite l'aspect 'usage diagnostique in vitro': Bruker Daltonics peut livrer le microflex LT avec le logiciel MALDI Biotyper dans la configuration 'research use only' ou avec le label DIV-CE pour lequel un supplément de prix doit être payé. Tous les utilisateurs ne trouvent pas cette configuration nécessaire.

Au niveau de l'entretien également, un spectromètre de masse a des propriétés difficiles à gérer. L'appareil se com-

pose de deux unités imbriquées. Il y a la zone à échantillons où les plaques-cibles sont introduites et le tube de vol pour la mesure du 'temps de vol'. Les deux unités se trouvent sous un vide poussé. Si une intervention technique est nécessaire sur l'une de ces unités, celle-ci doit être aérée et, après l'intervention, à nouveau mise sous vide. Parce que la pression à atteindre est terriblement basse, cela prend rapidement une journée. Qu'il ne puisse plus y avoir une seule goutte d'air dans l'appareil est facile à comprendre: toute molécule flottant aux alentours pourrait entrer en collision avec les molécules à mesurer et perturber leur mesure. Bruker Daltonics est parfaitement conscient de ces problèmes et travaille à y remédier.

Pour terminer, il y a encore quelques petits problèmes en matière de traçabilité du dépôt des bactéries sur la plaque-cible. L'automatisation sera peut-être la seule solution.

### Une démonstration

Le MALDI-TOF microflex LT (Figure 8) est un appareil assez petit: il peut se mettre sur une table et s'adapte à presque tous les laboratoires microbiologiques. En plus du spectromètre de masse, il comporte un ordinateur avec un clavier et un écran.



Figure 8. Le Maldi-Tof microflex LT. A l'arrière-plan, l'appareil comme s'il était sur une table de laboratoire. A l'avant-plan, une représentation en coupe. La pompe turbomoléculaire assure le vide poussé, le laser à hydrogène se trouve à l'arrière et le système, qui est appelé x-y stage, présente au laser les différents dépôts les uns après les autres.

Les opérations à effectuer sont très limitées: avec une pique à cocktail ou une pointe de pipette, un petit peu de matériel est pris sur une plaque de Pétri et est déposé sur la plaque-cible (Figure 9). Cette opération se réalise devant le poste de travail et l'identité du patient est à chaque fois donnée. Après que les bactéries ont été déposées, une goutte de matrice est déposée sur chaque dépôt. Après quelques minutes de séchage à l'air, la plaque est prête. On ne doit pas poursuivre immédiatement le traitement, on peut ajouter des bactéries à un autre moment jusqu'à ce que la plaque soit pleine. Mais l'on peut également commencer l'analyse et, ensuite, ajouter de nouvelles colonies.

Le MALDI-TOF lui-même peut presque être comparé à une machine Senseo. Il n'y a presque rien d'autre qu'un seul bouton et un clapet. La plaque-cible est déposée, la porte se ferme et l'analyse commence très rapidement. Le volume qui arrive à l'air est absolument minime, de sorte que très peu d'air doit être aspiré pour atteindre le vide poussé souhaité au niveau de la source d'ionisation.



## Conclusion

Cela a pris des dizaines d'années avant que le laboratoire de microbiologie ne puisse faire un grand pas vers une technique d'identification complètement différente. Jusqu'il y a quelques années, il utilisait toujours des galeries 'colorées', éventuellement dans une forme légèrement automatisée. L'introduction de la technique SM MALDI-TOF donne à la microbiologie un nouvel instrument exceptionnel. Il donne en quelques minutes une identité et ce, sans qu'il y ait même eu une coloration de Gram. De plus, c'est une technique ne nécessitant presque pas de matériel de consommation, ce qui est important après un investissement initial important. Actuellement, il y a bien quelques problèmes à résoudre, mais cela va à une allure rapide. De plus, cette nouvelle technique sera bientôt offerte par plusieurs entreprises. Enfin, comme les spectres sont digitaux, les laboratoires peuvent les échanger entre eux, de sorte qu'un collègue avec une base de données spéciale peut apporter de l'aide pour une identification.

Figure 9\_ La plaque-cible avec, dessus, des dépôts déjà utilisés avec des bactéries fixées dans une matrice et l'application de la matrice liquide sur les nouvelles bactéries déposées.

L'opérateur peut suivre à l'écran ce qui se passe. Il voit quel dépôt est analysé, il voit même où le laser frappe (Figure 10). L'analyse par MALDI-TOF ne dure pas longtemps: moins d'une minute suffit à rassembler toutes les données. Ensuite, c'est au logiciel Maldy Biotyper de faire l'identification à partir de la base de données et du spectre obtenu. L'opérateur visualise les spectres et les identifications proposées (Figure 7). Plusieurs possibilités sont toujours proposées avec les plus vraisemblables (scores les plus élevés) en haut. Il est possible que l'identification s'arrête au niveau du genre, c'est parfois assez.

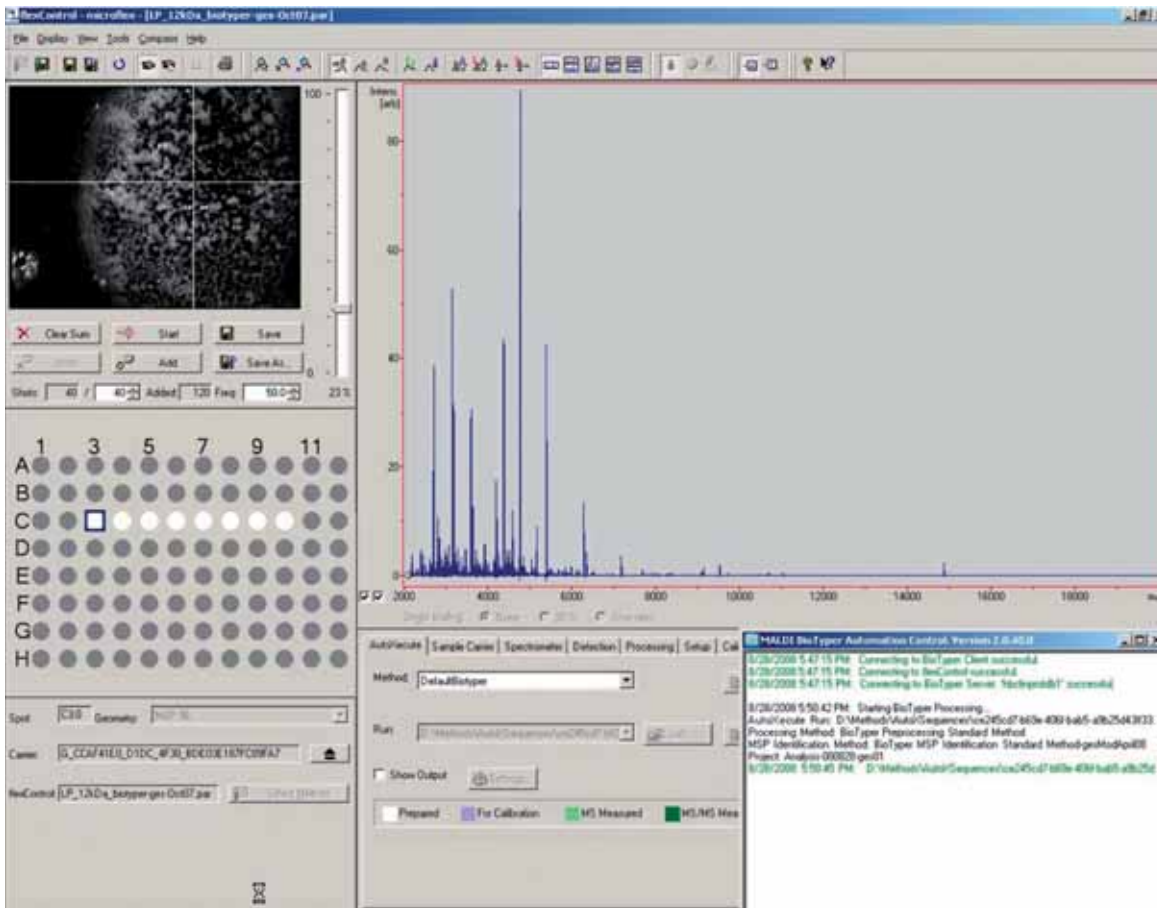


Figure 10\_ L'écran de contrôle pendant une analyse. La plaque-cible est représentée avec les nouvelles suspensions appliquées et avec le dépôt qui est analysé. En haut à gauche, ce dépôt est représenté et, ici, l'opérateur voit où le laser frappe. A droite, la représentation de la structure du spectre.