



**Abbildung 1: Arbeitsablauf der Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization – Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) Identifikation.** Kulturell angereicherte Bakterien oder Pilze werden auf ein Target aufgebracht, zusammen mit einer Matrix-Lösung fixiert, und anschliessend wird die Fluggeschwindigkeit der ionisierten Proteinbestandteile gemessen. Die Flugzeit korreliert mit der Masse, und diese wird mit den Einträgen in einer Datenbank abgeglichen. Die Identifikation erfolgt innert Kürze.

### Typisierung

Die Ähnlichkeitsanalyse mittels klassischer Methoden wie Puls-Feld-Gelelektrophorese und auch neuer Methoden wie des «whole genome sequencing» sind zeitaufwendig und teuer. Ein Vergleich der Massenspektren bei Isolaten gleicher Spezies erlaubt eine rasche Zuordnung von möglichen klonalen und nicht-klonalen Isolaten. Insbesondere bei unterschiedlichen Spektren kann eine Zugehörigkeit unter gleichen Kulturbedingungen praktisch ausgeschlossen werden [23, 24]. Neue Methoden sind auch hier in Entwicklung, z.B. der Phyloproteomics-Ansatz [25].

Zusammenfassend zeigt sich eine grosse Vielzahl an möglichen Anwendungen und Erweiterungen der MALDI-TOF-MS-Technologie, welche über die klassische Identifikation hinaus reicht. Die Harmonisierung der verschiedenen Protokolle wird in Zukunft wichtig sein, um den Qualitätsansprüchen gerecht zu werden. Die Detektion direkt aus Patientenmaterial wird entweder via Anreicherungsprotokolle oder sensitivere Geräte technisch bald zuverlässig möglich sein. Ebenfalls scheint die direkte Identifikation von Resistenzen mit neuen bioinformatischen Algorithmen greifbar.

Korrespondenz: PD Dr. med. Dr. phil. Adrian Egli  
Adrian.Egli@usb.ch

## Poursuite du développement de la spectrométrie de masse MALDI-TOF en microbiologie clinique

En cas de maladie infectieuse, l'identification rapide des bactéries et champignons permet une adaptation précoce de l'antibiothérapie. Les méthodes d'identification biochimiques sont coûteuses, chronophages et retardent ainsi l'identification.

Les méthodes d'identification relevant du diagnostic moléculaire sont certes plus rapides, mais elles possèdent un spectre diagnostique relativement limité. Il y a quelques années, l'identification au moyen de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization – Time-of-Flight*) a comblé ces importantes lacunes en matière de diagnostic microbiologique. Depuis lors, l'identification au moyen de la spectrométrie de masse MALDI-TOF est devenue la méthode standard en microbiologie moderne. De manière générale, cette technologie se trouve toutefois encore au début de son développement, et son potentiel est loin d'être épuisé: la mise en évidence de germes à partir d'hémocultures positives ou directement à partir d'échantillons urinaires, la détermination des résistances et le typage en cas de flambées sont d'autres applications en développement permanent. Cet article de revue a pour objectif de résumer et discuter les principales tendances en matière de spectrométrie de masse MALDI-TOF.

### Referenzen

Online unter: [www.sulm.ch/d/pipette](http://www.sulm.ch/d/pipette) → Aktuelle Ausgabe (Nr. 5-2016).

Gilbert Greub et Katia Jaton<sup>1</sup>

## Diagnostic moléculaire: avantages des tests «home-made»

**Le développement «home-made» des tests de diagnostic moléculaire permet d'accroître considérablement la flexibilité de ce type de diagnostic et ainsi de s'adapter rapidement aux nouvelles connaissances, aux pathogènes émergents, aux nouvelles souches (tel que le mutant suédois) et à d'éventuelles épidémies.**

Les applications des tests de diagnostic moléculaire, pour la détection des bactéries à croissance fastidieuse, des bactéries intracellulaires, des virus, des levures, des champignons filamenteux et de divers parasites, ont

augmenté de manière drastique ces dernières années. Ces tests moléculaires, particulièrement la PCR, sont également utiles pour (i) la détection de toxines ou d'autres facteurs de virulence, ainsi que pour la détection rapide de gènes codant (ii) pour la résistance aux antibiotiques et/ou de mutations conférant une résistance aux

antimicrobiens (iii), pour le diagnostic lors de cultures négatives en raison d'antibiothérapies préalables par exemple et enfin (iv) pour le typage. Actuellement, malgré le développement de nombreux tests moléculaires commerciaux, et selon une étude effectuée par le groupe européen du diagnostic moléculaire (ESGM),

<sup>1</sup> Prof. Gilbert Greub et Dr Katia Jaton, Institut de microbiologie, Centre Hospitalier Vaudois (CHUV), Lausanne

47% des laboratoires interviewés utilisent des tests «home-made». Ces tests moléculaires sont généralement développés par des approches standardisées [1,2,3], incluant une série d'étapes de validation (tableau 1).

Au vue des pressions économiques actuelles et des besoins cliniques importants en terme de diversité de tests diagnostiques moléculaires, il paraît essentiel d'avoir la possibilité de développer des tests « faits maison » puisque ceux-ci présentent de nombreux avantages par rapport aux tests commerciaux, avantages listés dans le tableau 2.

#### Avantage des PCRs «home-made»

Comme en témoigne notre plateforme de diagnostic moléculaire développée à Lausanne, grâce à la capacité de développer des **tests similaires** en terme de cycles de température pour une grande variété de pathogènes, nous avons pu automatiser en plaque de 384 puits l'analyse par PCR de plus de **90 paramètres différents, incluant des bactéries, virus, parasites et champignons** [2]. Ainsi avec ce portfolio de tests PCR «home-made» et grâce au développement de l'automatisation en parallèle, nous pouvons avec les mêmes automates et sur une même et unique plaque de PCR détecter plusieurs fois par jour divers pathogènes [2]. Au contraire, il est actuellement impossible d'avoir toutes les PCRs nécessaires à nos cliniciens avec une seule ligne de tests commerciaux puisque ceux-ci proposent en général un nombre de cibles limité soit,

quelques agents causant un syndrome particulier (pneumonie, urétrite, ...) ou différents types de pathogènes d'un même groupe (par exemple uniquement des virus). Ces choix sont souvent dictés plus par des patentes et par des décisions du producteur, et/ou de son «medical advisor» que par les besoins réels des médecins cliniciens.

Un avantage majeur est la **flexibilité** qu'apportent ces tests «maison». En effet, pouvoir être réactif et flexible est particulièrement important lors d'épidémies comme par exemple celle du syndrome hémolytique et urémique en Allemagne. Une PCR «maison» spécifique de la souche O104:H4 d'*Escherichia coli* a pu être mise à disposition 6 jours après l'obtention des séquences de son génome [4]. De même, cette flexibilité, liée à la possibilité d'automatiser ces tests, a permis d'augmenter le débit d'analyse lors d'un problème local soudain. Ainsi dans le contexte d'une épidémie locale de fièvre Q dans la région du Lavaux [5], nous avons dû tester sur une période de 5 semaines en plein été près de 2400 dons de sang de manière prospective et réactive [6]. Seul un haut niveau d'automatisation de nos tests PCRs «home-made» a permis de faire face à cette augmentation majeure du nombre de tests en cette période de vacances. De même, lors de découverte de nouveaux pathogènes émergents tels que *Waddlia chondrophila*, probablement impliqué comme agent de fausses couches [7, 8], nous avons pu développer rapidement un test fiable selon nos procédures R&D [9].

Un autre avantage majeur est le **coût réduit pour le laboratoire** [10] des PCRs «home-made». En effet, actuellement le coût des réactifs de base c'est-à-dire les amorces, les sondes, le mélange réactionnel et l'enzyme, a largement diminué. Ceci a permis d'augmenter le nombre de cibles pour certains pathogènes importants pour lesquels des polymorphismes peuvent être observés au niveau des gènes de certains pathogènes, tel le méningocoque, avec des conséquences dramatiques sur la spécificité du test [11]. Ainsi, à Lausanne, nous avons – sur la base de l'analyse de plusieurs génomes de souches de *Neisseria meningitidis* – développé plusieurs cibles moléculaires afin d'accroître par redondance la qualité du diagnostic en terme de sensibilité et de spécificité [12].

Un autre avantage des tests «maison» est le **multiplexage que l'on peut adapter à une situation clinique donnée**. Ainsi, certains tests commerciaux imposent le multiplexage *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* ce qui peut, dans certaines situations, s'avérer problématique. En effet, lorsqu'il s'agit par exemple d'un nouveau-né pour lequel une analyse PCR *Chlamydia trachomatis* a été prescrite dans un contexte de suspicion de pneumonie à *Chlamydia trachomatis* et pour lequel une PCR pour *Neisseria gonorrhoeae* se positive dans les sécrétions nasopharyngées de cet enfant: ce résultat pose la question de (i) la signification clinique (possible faux positif dû à la présence d'une *Neisseria* commensale de l'oropharynx)

Paramètres généralement inclus dans la validation d'un test moléculaire «home-made»
Efficiencia de la PCR
Linéarité de la PCR
Range quantitatif
Sensibilité et spécificité analytique
Répétabilité intra- et intersérie (précision)
Détection des cibles avec des quantités inégales de différents pathogènes
Fiabilité clinique (sensibilité et spécificité, valeurs prédictives positives et valeurs prédictives négatives)

Tableau 1

Avantages des tests «home-made»	Désavantages des tests commerciaux
Meilleure définition du 99 <sup>e</sup> percentile de la population de référence, utilisé comme valeur limite	Dosage non standardisé, impliquant des valeurs limites différentes d'une méthode à l'autre
Flexibilité accrue	Absence de flexibilité
Multiplexage possible	Multiplexage contrôlé par le fabricant
Niveau de qualité précisément connu, dépendant du niveau d'exigence lors du développement du test	Qualité inconstante, nécessitant une validation interne avant la mise en routine
Coût réduit	Coût élevé
Cible connue	Pas de connaissance précise de la zone ciblée d'ADN
Une seule ligne d'appareils pour l'ensemble des tests PCR	Nécessité de plusieurs automates différents (plusieurs flux d'analyses différents)
Haut débit d'analyse sur une plateforme unique	Débit parfois limité (variable selon les caractéristiques du système commercial)

Tableau 2



mais également pose des questions (ii) d'ordre éthique par le fait d'avoir testé la présence d'un pathogène non recherché par le clinicien. Par contre, une approche syndromique réfléchie, par multiplexage ciblant différents microorganismes fréquemment retrouvés dans une situation clinique donnée, est possible lorsque l'on a un large portfolio de PCR «home-made»: tout peut être adapté en fonction de la situation clinique (enfant, adulte, immunosupprimés, greffés...) et, en discutant avec le microbiologiste, le clinicien peut orienter les tests à effectuer. Certes, un résultat fortuit peut être indicatif mais ses conséquences restent très aléatoires.

Dans ce contexte, la **quantification** est également un élément important pour l'interprétation des résultats surtout dans l'approche syndromique car sans quantification comment interpréter des résultats de sécrétions nasopharyngées révélant la présence d'acides nucléiques de plusieurs virus pouvant être impliqués dans des bronchites chez un hôte immunocompromis?

Mais cette quantification nécessite de créer pour chaque pathogène une droite de régression, dont le coût est significatif. Ce coût reste acceptable avec les PCRs «home-made» mais rarement avec les systèmes commerciaux proposés actuellement.

### Désavantages des tests commerciaux

Un des grands désavantages des tests commerciaux consiste en l'absence de connaissances précises de la qualité intrinsèque du test puisque l'ensemble du développement et des contrôles permettant d'apporter un label C.E. n'est généralement pas dévoilé au public et qu'il faut accepter cette «boîte noire» de validation, estampillée par les autorités compé-

tentes délivrant ce label. L'exemple de l'épidémie d'une souche mutante suédoise de *Chlamydia trachomatis* survenue en 2006 montre l'importance du choix de la cible. Cette souche présentait une délétion d'environ 400 paires de base dans le plasmide cryptique de *Chlamydia* et n'était donc pas détecté par la plupart des tests commerciaux disponibles alors [13, 14]. A cette époque, en Suisse, la seule PCR capable de détecter cette souche mutante était notre PCR «maison» qui ciblait d'autres zones du même plasmide [10].

Notons que deux fabricants différents ciblaient alors la même zone du plasmide cryptique. Ainsi, lorsqu'un résultat négatif était remis en cause sur la base d'une suspicion clinique, l'analyse à l'aide de l'autre test commercial infirmait à tort la réalité d'une infection *Chlamydia*. Même si cette problématique est actuellement résolue pour *Chlamydia*, elle montre l'utilité d'avoir une connaissance précise des cibles utilisées, même pour des tests commerciaux. De même, une PCR commerciale ciblant une cassette portant le gène de résistance plutôt que le gène lui-même a présenté une spécificité basse [15].

Par ailleurs, avec les tests multiplexés commerciaux, on a souvent ce que l'on a besoin, mais également ce que l'on ne veut pas. A titre d'exemple, le test commercial Unyvero, qui propose toute une série de possibles pathogènes respiratoires, n'est d'une part pas exhaustif et d'autre part nous contraint de tester certains agents non impliqués dans le syndrome dont souffre le patient (par exemple: agents de pneumonies communautaires lors de pneumonies nosocomiales et réciproquement). Dans ces cas là, il est vraiment paradoxal que nous fassions plus confiance à nos partenaires commerciaux qui nous proposent

## Molekulardiagnostik: Vorteile «selbstgemachter» Tests

Die Verwendung molekularbiologischer Diagnosetests hat in den letzten Jahren drastisch zugenommen, etwa zum Nachweis von Bakterien mit langsamem Wachstum, intrazellulären Bakterien, Viren, Hefen, filamentösen Pilzen und verschiedenen Parasiten. Diese molekularbiologischen Tests, vor allem das PCR-Verfahren, können zudem eingesetzt werden, um (i) Toxine und andere Virulenzfaktoren nachzuweisen, ausserdem zur raschen Detektion von (ii) Antibiotikaresistenzgenen oder Mutationen, die zur Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen führen (iii), zur Diagnosestellung im Falle negativer Kulturen (etwa aufgrund vorangegangener Antibiotikatherapie) und schliesslich (iv) zur Typisierung. Obwohl zahlreiche kommerzielle Molekulartests entwickelt wurden und im Handel erhältlich sind, verwenden laut einer Untersuchung der Europäischen Studiengruppe für Molekulardiagnostik (ESGMD) derzeit 47% der befragten Laboratorien «selbstgemachte» Tests.

des «boîtes noires» qu'à nos collègues qui proposent des tests ouverts et flexibles.

### Conclusions

En conclusion, les tests moléculaires sont utiles et indispensables. Cependant, malgré l'augmentation de la diversité des tests disponibles commercialement, il ne sera pas possible de proposer l'ensemble des outils moléculaires nécessaires en clinique uniquement sur la base de tests commerciaux. Il est donc indispensable d'éviter une escalade régulatrice telle qu'elle s'est développée aux Etats-Unis, vu l'impact négatif d'une régulation trop stricte sur le développement de nouveaux tests ou technologies et leur implémentation dans les laboratoires de diagnostic moderne.

Correspondance:  
Gilbert.Greub@chuv.ch

### Références

Vous trouverez la liste des références sur le site:  
[www.sulm.ch/f/pipette](http://www.sulm.ch/f/pipette) → Numéro actuel  
(n° 5-2016).