



Identification des bactéries à cote de sécurité élevée, basée sur la spectrométrie de masse à temps de vol après désorption/ionisation laser assistée par matrice : considérations pour les utilisateurs canadiens de Bruker

Kym Antonation^{1*}, Dobryan Tracz¹, Ashley Dreger¹, Cindi Corbett^{1,2}

Résumé

Contexte : L'utilisation de systèmes de spectrométrie de masse à temps de vol après désorption/ionisation laser assistée par matrice (SM MALDI-TOF) pour identifier des bactéries est rapidement devenue un outil de première ligne dans les laboratoires de diagnostic, remplaçant les méthodes microbiologiques classiques qui déclenchaient auparavant l'identification des agents pathogènes à haut risque. Des isolats inconnus du groupe de risque 3 ont été mal identifiés comme des espèces moins pathogènes en raison de la disponibilité, du contenu et de la qualité de la bibliothèque spectrale. Par conséquent, l'exposition à des agents pathogènes à haut risque a été signalée au sein du personnel de laboratoire canadien à la suite de la mise en œuvre de la SM MALDI-TOF. Cet aperçu vise à communiquer au personnel de laboratoire le risque potentiel d'une identification inexacte des bactéries des agents biologiques à cote de sécurité élevée et à fournir des suggestions pour l'atténuer.

Méthodes : Les cultures ont été manipulées dans un laboratoire de niveau de biosécurité 3, préparées pour l'analyse SM MALDI-TOF par extraction chimique complète et analysées sur un instrument Bruker Microflex LT. Les données ont été analysées avec le logiciel Biotyper; en comparant les spectres bruts aux profils de spectrométrie de masse dans trois bibliothèques : les bibliothèques d'agents biologiques à cote de sécurité élevée Bruker Taxonomy, Bruker Security-Restricted et du Laboratoire national de microbiologie. Quatre années de données de SM MALDI-TOF de Bruker acquises à l'interne ont été passées en revue.

Résultats : En général, les bibliothèques de spectrométrie de masse Bruker ont moins bien réussi à identifier les agents biologiques bactériens à cote de sécurité élevée. La bibliothèque du Laboratoire national de microbiologie a connu un plus grand succès. Par exemple, en utilisant un seuil de score élevé (supérieur à 2,0), la bibliothèque Bruker Security-Restricted n'a pas pu identifier avec certitude 52,8 % de nos agents du groupe de risque 3 et de nos proches voisins au niveau des espèces, alors que la bibliothèque personnalisée du Laboratoire national de microbiologie n'a pu identifier que 20,3 % des échantillons.

Conclusion : Les quatre dernières années de données ont montré à la fois l'importance de la sélection des bibliothèques et les limites des différentes bibliothèques spectrales. Il est conseillé d'améliorer les procédures opérationnelles standard afin de réduire l'exposition des laboratoires aux agents biologiques à cote de sécurité élevée lors de l'utilisation de la SM MALDI-TOF comme outil d'identification de première ligne.

Cette oeuvre est mise à la disposition selon les termes de la licence internationale Creative Commons Attribution 4.0



Affiliations

¹ Laboratoire national de microbiologie, Agence de la santé publique du Canada, Winnipeg, MB

² Université du Manitoba, département de microbiologie médicale et des maladies infectieuses, Winnipeg, MB

*Correspondance :

kym.antonation@canada.ca



Citation proposée : Antonation KS, Tracz DM, Dreger AD, Corbett CR. Identification des bactéries à cote de sécurité élevée basée sur la spectrométrie de masse à temps de vol par désorption-ionisation laser assistée par matrice : considérations pour les utilisateurs canadiens de Bruker. *Relevé des maladies transmissibles au Canada* 2020;46(10):376–82. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v46i10a04f>

Mots-clés : spectrométrie de masse MALDI-TOF, pathogènes bactériens, diagnostics de laboratoire de microbiologie clinique, cote de sécurité élevée

Introduction

Au cours de la dernière décennie, les laboratoires de microbiologie clinique ont remplacé les techniques biochimiques traditionnelles par de nouveaux systèmes de spectrométrie de masse à temps de vol après désorption/ionisation laser assistée par matrice (SM MALDI-TOF) pour l'identification des bactéries (1,2). En tant que méthode rapide, peu coûteuse, simple et à haut débit, la SM MALDI-TOF est un outil puissant pour le diagnostic bactériologique et a permis de réaliser des économies importantes et d'améliorer l'efficacité des laboratoires (3,4). Toutefois, l'abandon des méthodes classiques de test bactérien au profit de l'utilisation unilatérale de la SM MALDI-TOF présente un risque très réel pour les laboratoires cliniques. Malgré les mises en garde que l'on peut trouver dans la littérature, de nombreux laboratoires cliniques préparent des plaques cibles de la SM MALDI-TOF avec des cultures bactériennes vivantes sur une table de travail ouverte dans une zone de laboratoire de niveau de biosécurité 2, ce qui entraîne une ou plusieurs expositions accidentelles à des agents du groupe de risque 3 qui ont pu parvenir jusqu'au laboratoire (5–7).

Au Canada, cinq expositions à des agents du groupe de risque 3 signalées au cours d'une seule période de neuf mois ont suscité une analyse des causes racines de la technologie et de son utilisation (8). Su et al. ont constaté qu'entre 2015 et 2017, huit incidents avec 39 expositions ont été signalés à la suite d'une mauvaise identification de bactérie du groupe de risque 3 par l'utilisation de systèmes commerciaux de SM MALDI-TOF et de bibliothèques associées (8). Les espèces de *Brucella*, la *Francisella tularensis* et la *Burkholderia pseudomallei* constituaient la majeure partie de ces expositions. Bien que les directives actuelles de l'Association des laboratoires de santé publique à l'intention des laboratoires sentinelles définissent clairement les attentes lorsqu'on travaille avec un agent possiblement du groupe de risque 3, il existe des situations où des isolats inconnus qui peuvent être de groupe de risque 3 tombent dans le flux de travail du laboratoire. Ces bactéries inconnues peuvent être mal identifiées comme des espèces voisines moins pathogènes en raison 1) du contenu de la bibliothèque spectrale fournie avec l'instrument de spectroscopie électronique ou 2) de la qualité de l'échantillon bactérien (9–11).

Il est certain que de nombreuses bactéries à cote de sécurité élevée n'ont pas de spectres de référence dans la bibliothèque fournie avec l'instrument de spectrométrie de masse, et en l'absence de spectres de référence pour ces espèces, l'outil soit ne produira aucune identification (comme dans le cas des

espèces de *Brucella*), soit fournira l'identité d'un organisme étroitement apparenté. Nous avons observé que les scores d'identification fournis pour un *B. anthracis* identifié à tort comme étant un *B. cereus* peuvent être assez élevés (i.e. supérieurs à 2,0; considérés comme une identification de confiance), ce qui n'amène pas le clinicien à soupçonner qu'une mauvaise identification s'est produite jusqu'à ce que d'autres tests soient effectués, prolongeant ainsi même la période d'exposition possible.

En outre, le *Relevé des maladies transmissibles au Canada* indiquait en 2018 que certains travailleurs en laboratoire ne savaient pas quelle bibliothèque de référence ils utilisaient pour l'identification (8). En supposant que cela impliquait un manque de compréhension du contenu et de confiance dans la bibliothèque d'identification, nous avons réexaminé les quatre dernières années de spectres SM MALDI-TOF dérivés de souches bien caractérisées ou de référence de bactéries pertinentes à la cote de sécurité ainsi que de proches voisins qui ont été obtenus en interne afin de faire prendre conscience de la sensibilité et de la spécificité des diagnostics provenant des bibliothèques de SM MALDI-TOF et des considérations relatives à leur utilisation. Le Laboratoire national de microbiologie de l'Agence de la santé publique du Canada se concentre sur les agents biologiques à cote de sécurité élevée et est le gardien du Réseau canadien de laboratoires d'intervention. À ce titre, nous avons déjà fait rapport sur la sécurité des méthodes de préparation de la SM MALDI-TOF et sur la sensibilité des bibliothèques pour l'identification des agents biologiques bactériens à cote de sécurité élevée (12–14). L'examen des données des quatre dernières années a montré à la fois l'importance de la sélection des bibliothèques et les limites des différentes bibliothèques.

Méthodes

Les cultures ont été manipulées dans un laboratoire de niveau de biosécurité 3, préparées pour l'analyse SM MALDI-TOF par des extractions chimiques complètes (70 % d'éthanol-70 % d'acide formique-acétonitrile) et amenées à un instrument Bruker Microflex LT (Bruker Daltronics) situé dans le laboratoire de niveau de biosécurité 2, comme décrit précédemment (13). Le logiciel FlexControl (version 3.4, build 135) a acquis des spectres basés sur 500 tirs laser individuels sur quatre points indépendants par échantillon.

Les données ont été analysées avec le logiciel Biotyper (version 3.1, build 66), en recherchant les spectres bruts par rapport aux profils spectraux de masse (PSM) bactérienne dans



les bibliothèques suivantes : 1) la bibliothèque Bruker Taxonomy (n = 5 989 PSM, ne contenant pas d'agent biologique à cote de sécurité élevée); 2) la bibliothèque Bruker Security-Restricted (n = 123 PSM, contenant des agents biologiques à cote de sécurité élevée); et 3) une bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie développée localement (n = 121 PSM, contenant à la fois des agents biologiques à cote de sécurité élevée et des profils spectraux de masse voisins). En outre, la bibliothèque du Laboratoire national de microbiologie contient des profils spectraux de masse de haute qualité qui dépassent le contenu de la bibliothèque Bruker Security-Restricted pour les agents *B. anthracis*, *Yersinia pestis*, *F. tularensis* et les espèces de *Brucella* (11).

Les quatre meilleures correspondances de profils spectraux de masse du logiciel Biotyper et leur score de correspondance associé ont été enregistrés pour chacun des quatre points par échantillon bactérien afin de constituer la population de l'échantillon. Cela a été plus représentatif de la distribution de l'échantillon que de choisir uniquement la meilleure correspondance par point. L'identification au niveau « identification sûre du genre, identification probable de l'espèce » (score de correspondance supérieur à 2,0) a été utilisée pour tous les calculs comparatifs tout au long du processus, sauf indication contraire. La sensibilité et la spécificité diagnostiques ont été calculées pour chaque agent biologique à cote de sécurité élevée par rapport à ses espèces voisines, sur la base du seuil de correspondance supérieur à 2,0 : *B. anthracis* (n = 240 points d'échantillonnage) vs d'autres espèces complexes de *B. cereus* (n = 256) ; *Y. pestis* (n = 272) vs *Y. pseudotuberculosis* (n = 160); *F. tularensis* (n = 528) vs d'autres *Francisella* (n = 48). Les espèces de *Brucella* (n = 816) n'ont pas de voisin proche.

Résultats et discussion

Comme la bibliothèque Bruker Taxonomy standard ne contient aucune entrée d'agent biologique à cote de sécurité élevée hautement pathogène, la sensibilité pour tous les échantillons d'agents biologiques à cote de sécurité élevée utilisant uniquement la bibliothèque Bruker standard propriétaire est de 0 %. Les laboratoires qui n'ont accès qu'à la bibliothèque Bruker devraient envisager d'obtenir des bibliothèques supplémentaires contenant des profils spectraux d'agents biologiques à cote de sécurité élevée et/ou d'utiliser des procédures opérationnelles standard améliorées pour reconnaître une menace d'exposition potentielle (comme décrit ci-dessous). Seuls les laboratoires cliniques ayant accès à la bibliothèque spécialisée Bruker Security-Restricted ou à la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie peuvent actuellement identifier des bactéries hautement pathogènes grâce à la technologie SM MALDI-TOF, avec des niveaux de confiance variables (comme décrit ci-dessous).

Yersinia pestis

L'analyse SM MALDI-TOF de 17 isolats de *Y. pestis* (n = 272 résultats d'identification au total) et de 10 isolats de *Y. pseudotuberculosis* (n = 160 résultats d'identification) a donné une sensibilité de 41,9 % et une spécificité de 93,1 % en utilisant à la fois la bibliothèque Bruker Taxonomy et la bibliothèque Bruker Security-Restricted (tableau 1). En comparaison, de meilleurs résultats pour l'identification du *Y. pestis* ont été obtenus en utilisant la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie, qui a donné une sensibilité de 70,6 %.

Tableau 1 : Valeurs de sensibilité et de spécificité dérivées du test de diagnostic SM MALDI-TOF d'identification des bactéries des agents biologiques à cote de sécurité élevée au Laboratoire national de microbiologie (2014 à 2018)

ABCSE bactériens	Taille de l'échantillon cible	Taille de l'échantillon non ciblé (voisin proche)	Sensibilité de la base de données		Spécificité de la base de données	
			Bruker	LNM	Bruker	LNM
<i>Yersinia pestis</i>	272	160	41,9 %	70,6 %	93,1 %	86,9 %
<i>Francisella tularensis</i>	528	48	32,2 %	77,5 %	100,0 %	100,0 %
<i>Bacillus anthracis</i>	240	256	86,3 %	90,4 %	80,5 %	98,8 %

Abréviations : ABCSE, agent biologique à cote de sécurité élevée; LNM, Laboratoire national de microbiologie; SM MALDI-TOF, spectrométrie de masse à temps de vol après désorption/ionisation laser assistée par matrice

Remarque : Les valeurs ont été calculées en utilisant les résultats d'identification des échantillons qui avaient un score de correspondance supérieur à 2,0, ce qui reflète une identification au niveau de l'espèce à haut degré de confiance. La taille de l'échantillon est composée des quatre premiers résultats d'identification obtenus à partir de quatre points par isolat

Même avec la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée améliorée, 80 des 272 résultats d'identification n'ont pas identifié *Y. pestis* correctement, mais ont plutôt produit une identification *Y. pseudotuberculosis* (n = 68) ou, alternativement, ont permis une identification uniquement au niveau du genre. En effet, ces deux espèces sont génétiquement similaires (15,16), ce qui a entraîné l'erreur de diagnostic qui a été signalée dans la littérature (17) et démontrée avec cet ensemble de données. Toutefois, malgré leur parenté, la différenciation de la SM MALDI-TOF peut être réalisée par un seul pic de biomarqueur à *m/z* 3 065, qui est associé à la protéine Pla codée par le plasmide, comme l'ont rapporté Lasch et al. (18). L'analyse d'échantillons représentatifs du Laboratoire national de microbiologie a permis de déterminer que 65 des 68 *Y. pestis* susmentionnés, identifiés à tort comme étant des *Y. pseudotuberculosis*, présentaient bien le pic à *m/z* 3 065, ce qui a entraîné une augmentation de la sensibilité de 95,6 %. Aucun profil spectral de *Y. pseudotuberculosis* n'a démontré ce pic, pour une spécificité de 100 %. L'utilisation de ce pic seul pour la différenciation de *Y. pestis* est supérieure aux résultats obtenus avec la bibliothèque Bruker et la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie.



Néanmoins, avec ou sans bibliothèque améliorée, le personnel du laboratoire doit être conscient qu'une correspondance supérieure de *Y. pseudotuberculosis* pourrait en fait indiquer la présence d'un isolat de *Y. pestis*. En outre, les petits isolats Gram-négatifs présentant une coloration caractéristique d'épingle à nourrice et une morphologie de colonie « d'œufs au plat » devraient immédiatement entraîner un retour aux pratiques de niveau de sécurité biologique 3 dans un environnement de niveau de sécurité biologique 2 et suivre les directives de l'Association des laboratoires de santé publique pour les laboratoires sentinelles afin d'exclure ou d'éliminer des identifications erronées.

Francisella tularensis

L'analyse de 33 isolats connus de *F. tularensis* (528 résultats d'identification au total) a permis de déterminer un taux de sensibilité de 32,2 % en utilisant la bibliothèque Bruker Taxonomy et la bibliothèque Bruker Security-Restricted (tableau 1). Là encore, en utilisant la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie, la sensibilité était plus élevée, à 77,5 %. Les deux ont donné une spécificité de 100 %; par conséquent, si un spécimen peut être faussement négatif pour la *F. tularensis*, une identification positive de la *F. tularensis* est certaine. Cela est corroboré par une étude antérieure de Seibold *et al.* (19), qui a trouvé qu'une bibliothèque Bruker complétée par des profils spectraux de masse des espèces de *Francisella* avait permis d'identifier correctement 100 % des isolats de *Francisella* (n = 45) au niveau de l'espèce. En outre, dans le cadre de cet examen, nous avons constaté qu'il était difficile de parvenir à une identification sûre du genre et de l'espèce probable (score de correspondance supérieur à 2,0) pour la *F. tularensis*. De nombreux isolats de la *F. tularensis* ont été identifiés comme tels dans la fourchette de score de correspondance de 1,7 à 2,0 (i.e. une identification probable du genre). Un pourcentage beaucoup plus élevé de résultats d'identification a atteint le score de niveau de confiance supérieur pour les espèces en utilisant la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie plutôt que la bibliothèque Bruker Security-Restricted (77,5 % contre 32,2 % ont obtenu des scores supérieurs à 2,0), et une proportion moindre était entièrement non identifiable (8 % contre 19 %), ce qui reflète la qualité et la quantité spectrale de référence de la bibliothèque.

Bien que la *F. tularensis* n'ait pas de voisin proche qui soit aussi proche que la relation *Y. pestis/Y. pseudotuberculosis*, toute identification du niveau de genre de la *Francisella* à l'aide de la SM MALDI-TOF devrait susciter des inquiétudes immédiates, surtout si l'on considère l'observation morphologique de minuscules bacilles Gram-négatifs à croissance lente qui montrent une préférence pour les milieux complétés par de la cystéine.

Bacillus anthracis

Lors de la comparaison des cultures de la bactérie complexe *Bacillus cereus*, la SM MALDI-TOF a montré une sensibilité élevée pour la détection de la *B. anthracis*, mais les bibliothèques Bruker ont fourni une spécificité plus faible que la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie (tableau 1). L'analyse de 15 isolats connus de la *B. anthracis* (n = 240 résultats) et de 16 espèces complexe de la *B. cereus non-B. anthracis* (n = 256 résultats) a révélé que la bibliothèque Bruker Security-Restricted et la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie présentaient toutes deux une sensibilité élevée (86,3 % et 90,4 %, respectivement), mais que la bibliothèque Bruker était nettement moins spécifique que celle du Laboratoire national de microbiologie (80,5 % et 98,8 %, respectivement). Les faux positifs et les faux négatifs sont tous deux possibles, même avec une bibliothèque améliorée, et l'identification de tout membre de la bactérie complexe *B. cereus* devrait stimuler la prise de conscience. Les laboratoires doivent également être conscients des caractéristiques distinctives de la *B. anthracis* : de grandes (10 µM) tiges Gram-positives, formant des spores, qui présentent des colonies de verre moulu non hémolytiques et positives à la catalase. Les isolats de *B. cereus biovar anthracis* ont montré une certaine motilité, éliminant ainsi cette caractéristique comme outil d'exclusion (20).

Espèces de *Brucella*

La bibliothèque standard Bruker Taxonomy ne contient pas d'espèces de *Brucella* et la bibliothèque Bruker Security-Restricted ne contient que la *B. melitensis*. Ainsi, la sensibilité était de 0 % pour les espèces de *Brucella* autres que la *B. melitensis* (*B. abortus*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. suis*). La sensibilité du test avec la bibliothèque Bruker Security-Restricted pour la *B. melitensis* (n = 560) était de 83,2 %, avec notamment aucune autre correspondance possible de *Brucella* dans cette bibliothèque. Plus précisément, les isolats des espèces de *Brucella* ont été correctement identifiés au niveau du genre dans 99,6 % des cas avec la bibliothèque Security-Restricted et 100 % avec la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie. La puissance de la bibliothèque améliorée du Laboratoire national de microbiologie se situe au niveau de l'identification des espèces. Grâce à celle-ci, des espèces individuelles de la *Brucella* ont été identifiées (tableau 2) avec des niveaux de sensibilité variés (de 48,8 % à 88,4 %), mais avec des niveaux de spécificité plus élevés (de 82,8 % à 99,3 %). Ferreira *et al.* ont testé des souches de *Brucella* (n = 131) par rapport à une bibliothèque de SM MALDI-TOF complétée avec des profils spectraux de masse de *Brucella*, et ont trouvé une corrélation de 100 % au niveau du genre, mais des degrés variables d'identification au niveau de l'espèce (e.g. 82,4 % pour la *B. abortus*, 10,7 % pour la *B. melitensis*) (21). En utilisant une bibliothèque MALDI-TOF faite sur mesure contenant 18 génotypes uniques de *Brucella*,



Lista *et al.* ont correctement identifié 98 % des isolats de *Brucella* (n = 152) au niveau de l'espèce (22). D'autres études font état d'une identification des isolats de *Brucella* au niveau de l'espèce avec la méthode SM MALDI-TOF avec une précision de 92 % (23) et 97 % (24).

Tableau 2 : Identification des espèces de *Brucella* par la méthode SM MALDI-TOF à l'aide de la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée développée par le Laboratoire national de microbiologie

Espèces de <i>Brucella</i>	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
<i>B. melitensis</i>	88,4	82,8
<i>B. abortus</i>	53,1	96,0
<i>B. canis</i>	56,3	90,5
<i>B. ovis</i>	56,3	99,3
<i>B. suis</i>	48,8	98,4

Abréviation : SM-MALDI-TOF, spectrométrie de masse à temps de vol après désorption/ionisation laser assistée par matrice

Remarque : La bibliothèque propriétaire de Bruker ne contient que des profils de *B. melitensis* et aucune autre espèce de *Brucella*

Le fait d'améliorer une bibliothèque de SM MALDI-TOF avec des spectres d'espèces de *Brucella* apporterait le gain le plus appréciable pour les laboratoires cliniques en raison de l'absence de voisins proches, et par conséquent, de l'absence d'identification ou de déclenchement de voisins proches fourni par l'appareil. Quoi qu'il en soit, les laboratoires doivent être conscients de la présence de minuscules coccobacilles Gram-négatifs qui se tachent faiblement, se développent lentement sur des milieux chocolatés et produisent de petites colonies scintillantes.

Conclusion

La compréhension des limites de la bibliothèque de l'appareil et l'application de procédures opérationnelles standard améliorées sont des exigences clés pour les laboratoires cliniques qui utilisent la méthode SM MALDI-TOF comme principale méthode d'identification bactérienne. Des études antérieures ont souligné l'importance de compléter les bibliothèques propriétaires avec des profils locaux développés à l'interne afin d'identifier des bactéries (9,11,25,26) et nos données le confirment pour la bibliothèque SM MALDI-TOF de Bruker. Les bibliothèques SM MALDI-TOF personnalisées améliorent les identifications, limitant ainsi les erreurs d'identification des agents biologiques à cote de sécurité élevée à fortes conséquences, les expositions ultérieures en laboratoire et les diagnostics erronés. En comparant la sensibilité globale de la SM MALDI-TOF de Bruker pour identifier les bactéries à cote de sécurité élevée (e.g. les bactéries *B. anthracis*, *Y. pestis* ou *F. tularensis*), et en utilisant les différentes bibliothèques, nous avons constaté une amélioration de 47,2 % (bibliothèques Bruker Taxonomy et Bruker Security-Restricted) à 79,7 % (bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie, comprenant l'analyse du pic du biomarqueur *Y. pestis*). Si l'on ne tient pas compte du seuil rigide (en utilisant

uniquement les scores de correspondance supérieurs à 2,0), ces valeurs passent à 75 % et 92,9 %, respectivement. Cette observation est en accord avec les résultats de Lasch *et al.* (10) qui ont constaté, grâce à un panel international de tests de compétence, que les résultats d'identification s'étaient améliorés, passant de 77 % avec une bibliothèque standard à 93,5 % avec la bibliothèque supplémentaire de l'Institut Robert Koch (10). Il est important de noter que des bibliothèques internes peuvent être créées si des souches sont disponibles, ce qui est assez difficile dans le cas des agents pathogènes biologiques à cote de sécurité élevée réglementés. Au Canada, le travail sur les agents biologiques à cote de sécurité élevée est limité, car seulement 0,2 % de tous les travaux réglementés impliquent des activités avec des agents biologiques à cote de sécurité élevée, y compris les travaux bactériens et viraux sur les groupes de risque 3 et 4 (27). Ainsi, la distribution de la bibliothèque d'agents biologiques à cote de sécurité élevée du Laboratoire national de microbiologie à nos laboratoires partenaires de la santé publique canadienne est un aspect important de la réduction des risques.

Dans l'ensemble, la SM MALDI-TOF est un outil puissant pour signaler la présence d'agents biologiques bactériens à cote de sécurité élevée hautement pathogènes, mais ce n'est pas une solution miracle. Les laboratoires de diagnostic doivent envisager d'augmenter les pratiques actuelles par des pratiques améliorées intégrant des outils plus anciens tels que la coloration de Gram et la reconnaissance de la morphologie des colonies, ou de déplacer la préparation des échantillons dans une armoire de sécurité biologique. Les recommandations de l'Association des laboratoires de santé publique stipulent que les laboratoires sentinelles doivent utiliser la méthode d'extraction par tube avec filtration dans le cas de bactéries suspectées hautement pathogènes et les pratiques du groupe de risque 3, y compris la préparation dans une enceinte de biosécurité. Des procédures écrites pour la reconnaissance des agents du bioterrorisme et de la formation devraient également être envisagées, conformément aux lignes directrices de l'American Society for Microbiology et de l'Association des laboratoires de santé publique sur les laboratoires sentinelles, et des fiches illustrant les caractéristiques des bactéries à haute conséquence peuvent être incorporées à la pratique. Il convient de noter que tous les laboratoires canadiens ayant signalé une exposition à un agent biologique à cote de sécurité élevée provenant de l'utilisation de la méthode SM MALDI-TOF entre 2015 et 2017 ont élaboré des procédures opérationnelles standard améliorées, avec des déclencheurs tels que la croissance lente et l'observation de petits coccobacilles Gram-négatifs (8). L'intégration d'avertissements de proche voisin, tels que détaillés dans le présent document, devrait permettre de limiter davantage les incidents d'exposition potentiels.

Déclaration des auteurs

D. T. — A effectué des travaux techniques de laboratoire, l'analyse et l'interprétation des données, a rédigé et révisé le document



A D. — A effectué des travaux techniques de laboratoire, l'analyse et l'interprétation des données, et a révisé le document
K. A. et C. C. — Ont fourni la conceptualisation de l'étude, l'analyse des données et ont révisé le document

Intérêts concurrents

Aucun.

Remerciements

Nous remercions le personnel du Laboratoire national de microbiologie, notamment le D^r A. D. Tyler et la section d'Élaboration d'épreuves et diagnostic — microbiologie médico-légale, le groupe spécial de bactériologie, le service central des médias du Laboratoire national de microbiologie et le service central de spectrométrie de masse et de protéomique du Laboratoire national de microbiologie.

Financement

Ce travail a été soutenu par l'Agence de santé publique du Canada, gouvernement du Canada.

Références

1. Doern CD, Butler-Wu SM. Emerging and Future Applications of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory: A Report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2016;18(6):789–802. [DOI PubMed](#)
2. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 2015 Jan;61(1):100–11. [DOI PubMed](#)
3. Ge MC, Kuo AJ, Liu KL, Wen YH, Chia JH, Chang PY, Lee MH, Wu TL, Chang SC, Lu JJ. Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: success rate, economic analysis, and clinical outcome. *J Microbiol Immunol Infect* 2017;50(5):662–8. [DOI PubMed](#)
4. Tran A, Alby K, Kerr A, Jones M, Gilligan PH. Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2015;53(8):2473–9. [DOI PubMed](#)
5. Keller PM, Bruderer V, Müller F. Restricted Identification of Clinical Pathogens Categorized as Biothreats by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2016;54(3):816. [DOI PubMed](#)
6. Dingle TC, Butler-Wu SM, Abbott AN. Accidental exposure to *Burkholderia pseudomallei* in the laboratory in the era of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2014;52(9):3490–1. [DOI PubMed](#)
7. New York City Department of Health and Mental Hygiene. 2015 Alert #15: Imported Brucellosis: Recent Laboratory Exposures Requiring Prophylaxis and Long-term follow up. New York (NY): NYCD of H and M; 2015. <https://www1.nyc.gov/assets/doh/downloads/pdf/han/alert/imported-brucellosis.pdf>
8. Pomerleau-Normandin D, Heisz M, Su M. Erreurs d'identification des agents biologiques à cote de sécurité élevée du groupe de risque 3 par SM MALDI-TOF au Canada : de novembre 2015 à octobre 2017. Relevé des maladies transmissibles au Canada 2018;44(5):123–9. [DOI](#)
9. Cunningham SA, Patel R. Importance of using Bruker's security-relevant library for Biotyper identification of *Burkholderia pseudomallei*, *Brucella* species, and *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol* 2013;51(5):1639–40. [DOI PubMed](#)
10. Lasch P, Wahab T, Weil S, Pályi B, Tomaso H, Zange S, Kiland Granerud B, Drevinek M, Kokotovic B, Wittwer M, Pflüger V, Di Caro A, Stämmeler M, Grunow R, Jacob D. Identification of Highly Pathogenic Microorganisms by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Results of an Interlaboratory Ring Trial. *J Clin Microbiol* 2015;53(8):2632–40. [DOI PubMed](#)
11. Tracz DM, Tyler AD, Cunningham I, Antonation KS, Corbett CR. Custom database development and biomarker discovery methods for MALDI-TOF mass spectrometry-based identification of high-consequence bacterial pathogens. *J Microbiol Methods* 2017;134:54–7. [DOI PubMed](#)
12. Tracz DM, Tober AD, Antonation KS, Corbett CR. MALDI-TOF mass spectrometry and high-consequence bacteria: safety and stability of biothreat bacterial sample testing in clinical diagnostic laboratories. *J Med Microbiol* 2018;67(3):341–6. [DOI PubMed](#)
13. Tracz DM, Antonation KS, Corbett CR. Verification of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method for Diagnostic Identification of High-Consequence Bacterial Pathogens. *J Clin Microbiol* 2016;54(3):764–7. [DOI PubMed](#)
14. Lasch P, Grunow R, Antonation KS, Weller SA, Jacob D. Inactivation techniques for MALDI-TOF MS analysis of highly pathogenic bacteria - A critical review. *TrAC Trends Anal Chem*. 2016;85:112–9. [DOI](#)
15. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(24):14043–8. [DOI PubMed](#)



16. Chain PS, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, Georgescu AM, Vergez LM, Land ML, Motin VL, Brubaker RR, Fowler J, Hinnebusch J, Marceau M, Medigue C, Simonet M, Chenal-Francisque V, Souza B, Dacheux D, Elliott JM, Derbise A, Hauser LJ, Garcia E. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(38):13826–31. [DOI PubMed](#)
17. Gérôme P, Le Flèche P, Blouin Y, Scholz HC, Thibault FM, Raynaud F, Vergnaud G, Pourcel C. *Yersinia pseudotuberculosis* ST42 (O:1) Strain Misidentified as *Yersinia pestis* by Mass Spectrometry Analysis. *Genome Announc* 2014;2(3):e00435–14. [DOI PubMed](#)
18. Lasch P, Drevinek M, Nattermann H, Grunow R, Stämmeler M, Dieckmann R, Schwecke T, Naumann D. Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Anal Chem* 2010;82(20):8464–75. [DOI PubMed](#)
19. Seibold E, Maier T, Kostrzewa M, Zeman E, Spletstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: fast, reliable, robust, and cost-effective differentiation on species and subspecies-levels. *J Clin Microbiol* 2010;48(4):1061–9. [DOI PubMed](#)
20. Antonation KS, Grützmacher K, Dupke S, Mabon P, Zimmermann F, Lankester F, Peller T, Feistner A, Todd A, Herbigler I, de Nys HM, Muyembe-Tamfun JJ, Karhemere S, Wittig RM, Couacy-Hymann E, Grunow R, Calvignac-Spencer S, Corbett CR, Klee SR, Leendertz FH. *Bacillus cereus* Biovar Anthracis Causing Anthrax in Sub-Saharan Africa-Chromosomal Monophyly and Broad Geographic Distribution. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10(9):e0004923. [DOI PubMed](#)
21. Ferreira L, Vega Castaño S, Sánchez-Juanes F, González-Cabrero S, Menegotto F, Orduña-Domingo A, González-Buitrago JM, Muñoz-Bellido JL. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry. Fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLoS One* 2010;5(12):e14235. [DOI PubMed](#)
22. Lista F, Reubsæet FA, De Santis R, Parchen RR, de Jong AL, Kieboom J, van der Laaken AL, Voskamp-Visser IA, Fillo S, Jansen HJ, Van der Plas J, Paauw A. Reliable identification at the species-level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiol* 2011;11:267. [DOI PubMed](#)
23. Karger A, Melzer F, Timke M, Bettin B, Kostrzewa M, Nöckler K, Hohmann A, Tomaso H, Neubauer H, A Dahouk S. Interlaboratory comparison of intact-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry results for identification and differentiation of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 2013;51(9):3123–6. [DOI PubMed](#)
24. Sali M, De Maio F, Tarantino M, Garofolo G, Tittarelli M, Sacchini L, Zilli K, Pasquali P, Petrucci P, Marianelli C, Francia M, Sanguinetti M, Adone R. Rapid and safe one-step extraction method for the identification of *Brucella* strains at genus and species-level by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One* 2018;13(6):e0197864. [DOI PubMed](#)
25. Sogawa K, Watanabe M, Sato K, Segawa S, Miyabe A, Murata S, Saito T, Nomura F. Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry: improved performance by incorporation of in-house spectral data into a commercial database. *Anal Bioanal Chem* 2012;403(7):1811–22. [DOI PubMed](#)
26. Christensen JJ, Dargis R, Hammer M, Justesen US, Nielsen XC, Kemp M; Danish MALDI-TOF MS Study Group. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis of Gram-positive, catalase-negative cocci not belonging to the *Streptococcus* or *Enterococcus* genus and benefits of database extension. *J Clin Microbiol* 2012 May;50(5):1787–91. [DOI PubMed](#)
27. Pomerleau-Normandin D, Heisz M, Tanguay F. Surveillance des expositions en laboratoire aux agents pathogènes humains et aux toxines au Canada en 2017. *Relevé des maladies transmissibles au Canada* 2018;44(11):337–44. [DOI](#)