

SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF EN BACTÉRIOLOGIE CLINIQUE OU COMMENT IDENTIFIER UNE BACTÉRIE EN UNE MINUTE

J. DESCY (1), C. MEEUX (2), P. MELIN (3), M.P. HAYETTE (4), P. HUYNEN (5), P. DE MOL (6)

RÉSUMÉ : La principale application de la spectrométrie de masse MALDI-TOF en microbiologie clinique est l'identification des microorganismes par analyse de leurs protéines totales (protéines ribosomales et protéines associées aux membranes). Cette technique permet d'identifier la plupart des bactéries en quelques minutes seulement. La méthode est rapide, précise, fiable et coût-efficace par comparaison aux méthodes phénotypiques conventionnelles. D'autres applications de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sont en cours de développement, telles que la mise en évidence de toxines bactériennes ou de mécanismes de résistance aux antibiotiques.

MOTS-CLÉS : *Spectrométrie de masse - MALDI-TOF - Identification bactérienne - Echantillons cliniques*

MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY IN CLINICAL BACTERIOLOGY OR HOW TO IDENTIFY A BACTERIA WITHIN ONE MINUTE

SUMMARY : The major application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology is the bacterial identification based on the analysis of all their proteins (ribosomal and membrane-associated proteins). This technology allows the identification of most of bacteria within a few minutes. The method is fast, accurate, reliable and cost-effective by comparison to conventional phenotypic techniques. Other applications of MALDI-TOF mass spectrometry are still under development, as the detection of bacterial toxins or resistance mechanisms to antimicrobial agents.

KEYWORDS : *Mass spectrometry - MALDI-TOF - Bacterial identification - Clinical samples*

INTRODUCTION

La prise en charge d'un patient suspect d'infection bactérienne repose classiquement sur l'identification de l'agent pathogène au site d'infection et sur le choix du meilleur traitement antibiotique, basé sur l'antibiogramme. L'identification d'un agent pathogène est donc cruciale, à la fois pour diagnostiquer une infection bactérienne mais aussi pour guider l'antibiothérapie.

Les laboratoires développent et utilisent des méthodes fiables, toujours plus rapides pour l'identification bactérienne. La stratégie habituelle pour ces identifications est constituée de plusieurs étapes : après des tests rapides d'orientation simples tels que la coloration de Gram ou les tests de catalase et d'oxydase, des tests phénotypiques, basés sur les caractéristiques biochimiques des bactéries, complètent l'identification. Depuis des décennies, cette stratégie était la seule applicable dans un laboratoire de routine bactériologique. L'unique évolution notable de ces techniques au fil des années a été leur miniaturisation et leur automatisation. Ces techniques sont coûteuses et nécessitent toujours plusieurs heures d'incubation avant l'obtention d'une identification d'espèce. Les méthodes utilisées dans les laboratoires de routine ne garantissent une identification fiable que pour les espèces les plus fréquemment rencontrées en

clinique. Dans la plupart des cas, l'identification bactérienne a lieu 48 heures après la réception du prélèvement; ce délai peut encore s'allonger dans le cas de bactéries ou champignons à croissance lente et/ou difficile.

Depuis quelques années, les tests de biologie moléculaire permettent une identification bactérienne rapide, applicable à tous les microorganismes, y compris les agents infectieux non cultivables. Les tests de biologie moléculaires utilisant des techniques PCR (Polymerase Chain Reaction) ne permettent malheureusement d'identifier que l'agent infectieux que l'on suspecte et pour lequel on dispose d'une technique. De plus, ces tests ne permettent pas toujours d'obtenir une identification discriminante jusqu'à l'espèce. Par ailleurs, le coût élevé et le haut niveau d'expertise technique requise font de la biologie moléculaire une technique actuellement inappropriée à l'identification de routine. Seuls quelques tests sont commercialisés pour l'identification rapide de pathogènes spécifiques, isolément ou en panel et d'autres applications utilisant la technologie des microarrays ont amélioré les stratégies d'identification en biologie moléculaire. Mais, le coût de ces tests et, parfois, la charge de travail restent élevés et représentent des facteurs limitants pour leur utilisation dans les laboratoires de microbiologie clinique.

Une technique innovante est récemment apparue sur le marché de la bactériologie, permettant à un laboratoire de routine, non seulement d'identifier un grand nombre de bactéries et de

(1) Assistante en Biologie clinique, (2) Chef de Laboratoire adjoint, (3) Chef de Laboratoire, Chargé de cours adjoint, (4), (5) Chef de Laboratoire, (6) Chef de Service, Professeur, Service de Microbiologie Médicale, CHU de Liège.



Figure 1. Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics).

champignons, plus ou moins fréquemment rencontrés en clinique, mais aussi de réaliser cette identification de manière rapide, fiable et peu coûteuse : la spectrométrie de masse !

SPECTROMÉTRIE DE MASSE : MALDI-TOF

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse extrêmement sensible, existant depuis près d'un siècle, permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt. On peut schématiser un spectromètre de masse en 4 parties : le système d'introduction de l'échantillon, la chambre d'ionisation, produisant des ions en phase gazeuse, l'analyseur, séparant les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) et le détecteur, transformant le courant ionique en courant électrique. L'ionisation est l'étape la plus importante pour l'identification des molécules. La spectrométrie de masse MALDI-TOF repose sur une technique d'ionisation, mise au point dans les années 80, et conduisant à l'identification de biomarqueurs de poids moléculaires élevés : il s'agit d'une désorption-ionisation laser assistée par matrice (ou MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization). L'échantillon à analyser est déposé sur une cible et est traité par une matrice appropriée. Après introduction de la cible dans le système, elle est bombardée par un laser. Les ions ainsi générés dans la chambre d'ionisation sont

accélérés dans un champ électrique qui les dirige dans un tube de vol vers l'analyseur. Ce dernier permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol (TOF : Time-Of-Flight) et de produire un spectre de masse. Le spectre de masse obtenu est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysé, qui peut être comparé à une banque de données de spectres. Notons que ce n'est que récemment que la spectrométrie de masse MALDI-TOF a été adaptée comme technique rapide, précise et peu coûteuse pour la routine des laboratoires de microbiologie.

A l'heure actuelle, deux constructeurs proposent des systèmes permettant l'identification des microorganismes par spectrométrie de masse MALDI-TOF, avec un mode de fonctionnement et une qualité assez comparables : le Biotyper MALDI-TOF MS de Bruker (Fig. 1) et le système AXIMA de Shimadzu utilisant la base de données SARAMIS d'Anagnostec.

IMPORTANCE DE LA BASE DE DONNÉES

L'identification par MALDI-TOF est basée sur les découvertes suivantes : (i) l'empreinte spectrale varie entre les microorganismes, (ii) parmi les composés détectés dans le spectre de masse, certains pics sont spécifiques du genre, de l'espèce et même dans certains cas de la sous-espèce, (iii) les spectres obtenus sont reproductibles pour autant que la croissance des bactéries se fasse dans les mêmes conditions. Cependant, même si les conditions de culture varient, de nombreux pics sont conservés (1) : ce sont ceux-ci qui sont potentiellement les plus aptes à être utilisés comme biomarqueurs spécifiques, permettant l'identification bactérienne.

Cette identification est basée sur la comparaison de la position des pics du spectre de masse inconnu avec tous les spectres typiques enregistrés dans la banque de données de spectres. Un score d'appariement classe les spectres et précise la ou les identifications bactériennes les plus plausibles, dans l'ordre de probabilité. Les bibliothèques de spectres sont fournies, validées et mises à jour par les firmes commercialisant les systèmes MALDI-TOF. Actuellement, la banque de spectres de la firme Bruker permet l'identification de 3.476 organismes cellulaires: 3.216 bactéries (entérobactéries, bacilles Gram négatif non fermentants, staphylocoques, streptocoques, mycobactéries, bactéries anaérobies, ...) et 260 champignons (*Candida*, champignons filamenteux, ...). Cette banque de données, permettant l'identification de pathogènes d'intérêt clinique

et de microorganismes de l'environnement, peut être enrichie par l'utilisateur : il est possible d'y introduire de nouveaux spectres qui s'ajouteront à ceux déjà configurés par le constructeur. Il est important de savoir que les espèces bactériennes dont le profil protéique est comparable, voire identique, ne pourront être discriminées par la technique MALDI-TOF. Ainsi, la technique est peu performante pour l'identification correcte des streptocoques viridans et pour leur discrimination vis-à-vis de *Streptococcus pneumoniae* par exemple. L'identification de certaines espèces comme les streptocoques, les bactéries anaérobies ou les champignons pourrait être améliorée par une mise à jour et un enrichissement de la base de données les concernant. Il n'y a théoriquement aucune limite à la capacité d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF pour autant que la base de données contienne suffisamment de spectres de référence adéquats.

IDENTIFICATION PAR MALDI-TOF MS DANS UN LABORATOIRE DE ROUTINE DE MICROBIOLOGIE MÉDICALE

Les types d'échantillons pouvant être analysés par un système MALDI-TOF MS peuvent être classés en 2 catégories : les cultures bactériennes sur gélose, qui se déposent directement sur la cible, et les cultures de levures, de champignons filamenteux, de mycobactéries, les hémocultures positives et les prélèvements urinaires, qui nécessitent une extraction préalable.

ANALYSE DE CULTURE BACTÉRIENNE SUR GÉLOSE

La colonie bactérienne est directement déposée sous forme d'un fin frottis à la surface d'une plaque métallique, la cible, puis recouverte par une matrice appropriée. Jusqu'à 96 souches par série peuvent être étudiées pour le système Bruker et 384 pour le système Shimadzu. La cible est ensuite introduite dans le système MALDI-TOF et, en moins de 2 minutes, le premier spectre de masse est produit et analysé. Par comparaison avec la base de données, le logiciel informatique propose l'identification la plus probable. Plusieurs études ont été publiées sur les performances des systèmes MALDI-TOF MS pour l'identification des microorganismes dans les laboratoires de routine de microbiologie clinique (2, 3, 4). Seng et al. (2) ont notamment montré que, parmi les 1.660 isolats bactériens étudiés, représentant 109 espèces différentes, 84,1% ont été correctement identifiés jusqu'au niveau de l'espèce et 11,3% jusqu'au niveau du genre. Selon les auteurs, l'absence d'identification (46

souches soit 2,8%) ou une identification erronée (28 souches, soit 2,8%) sont dues à une utilisation incorrecte de la base de données. De plus, les auteurs n'ont pas noté de discordance entre la coloration de Gram et le MALDI-TOF, suggérant que ce dernier pourrait être utilisé en première ligne, avant même la coloration de Gram. L'ensemble des publications confirme le rôle des systèmes MALDI-TOF MS comme outil d'identification de première ligne dans un laboratoire de routine, mais insiste également sur l'importance des mises à jour de la base de données.

ANALYSE DE MICROORGANISMES APRÈS EXTRACTION

Pour l'identification de certains microorganismes (levures, champignons filamenteux, mycobactéries), une extraction préalable des protéines est recommandée afin de produire un spectre de masse exploitable. Il en est de même pour les échantillons primaires tels que les hémocultures positives et les urines. Cette étape d'extraction allonge le temps de manipulation de 10 à 15 minutes par extrait, par rapport à la technique de dépôt direct.

Dans les laboratoires de microbiologie clinique, les hémocultures représentent toujours le prélèvement le plus significatif pour le diagnostic des infections bactériennes aiguës sévères. Des automates, tels que le BactAlert® (bioMérieux), ou le Bactec® (Becton Dickinson), réalisent un monitoring en continu de la croissance bactérienne afin de détecter celle-ci précocement. Une fois l'hémoculture positivée, une identification présomptive rapide basée sur l'examen direct après coloration de Gram permet déjà d'adapter approximativement l'antibiothérapie. A ce stade, une identification complète, en routine, se réalise généralement en 1 à 2 jours mais peut être plus longue pour les microorganismes fastidieux ou atypiques.

Les techniques de biologie moléculaire (PCR en temps réel, microarrays, FISH) sont en cours d'évaluation pour la détection rapide des bactéries et de leur mécanisme de résistance directement dans les hémocultures positives (5). Actuellement, ces systèmes fermés ne permettent la détection que d'un nombre restreint de pathogènes, ils coûtent cher et requièrent souvent des compétences techniques particulières.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification des microorganismes présents dans des hémocultures, en routine, le jour même de leur positivité, soit un à deux jours plus tôt que par une technique phénotypique conventionnelle. Une étape importante d'extraction est nécessaire : elle consiste à séparer les bactéries

des autres composants cellulaires de l'échantillon. Plusieurs procédés d'extraction existent comme par exemple la centrifugation différentielle ou la lyse des membranes cellulaires par un détergent. D'après La Scola et Raoult (6), il y a cependant quelques limites : (i) pour les hémocultures polymicrobiennes (qui sont peu fréquentes), une seule des espèces présentes, dans le meilleur des cas, peut être identifiée, et (ii) le problème dû au manque de discrimination entre certaines espèces bactériennes.

Parallèlement, en utilisant une étape de concentration, l'identification directe dans les urines est réalisable (7), sans toutefois permettre une quantification des bactéries. Une identification fiable par MALDI-TOF MS dépendra du nombre de microorganismes présent dans l'échantillon urinaire ($>10^5$ CFU/ml au minimum) mais aussi de l'espèce bactérienne. Par ailleurs, cette technique ne semble pas être pratique dans un laboratoire de routine étant donné le nombre important d'échantillons urinaires et l'existence de techniques d'orientation diagnostique telles que la coloration de Gram ou la cytométrie en flux pour l'analyse des éléments figurés urinaires.

AUTRES APPLICATIONS ET DÉVELOPPEMENTS

ÉTUDES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

La technologie MALDI-TOF MS, par sa production de spectres spécifiques à chaque bactérie, permet également d'envisager l'étude épidémiologique des microorganismes. Loin d'égaliser les performances des techniques de typage génotypique, il est cependant possible, avec un système MALDI-TOF MS, de comparer les profils protéiques de différentes souches bactériennes et ainsi déjà tirer quelques conclusions quant à leur éventuelle homologie (8, 9). Il est imaginable, par exemple, de comparer des *Acinetobacter baumannii* multi-résistants isolés dans différentes unités hospitalières et, si leurs spectres présentent exactement les mêmes pics, de suspecter leur appartenance au même clone épidémique. Par ailleurs, à partir des scores de similarité des spectres, un dendrogramme peut être établi permettant de relier les espèces rapprochées au sein d'un genre bactérien déterminé, ou de visualiser parmi une même espèce les souches les plus comparables.

DÉTECTION DE MARQUEURS DE MÉCANISMES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Parallèlement à son utilisation en routine pour l'identification des microorganismes, la détection de mécanismes de résistance aux antibiotiques représente un intérêt particulier. Quelques études (10, 11) ont montré la capacité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à distinguer les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) qui arborent le gène *mecA* codant pour une protéine spécifique, la PBP_{2a}, des souches méthicilline-sensibles (MSSA). La détection de mécanisme de résistance impliquant des protéines caractéristiques (bêta-lactamase, méthylase, système d'efflux par exemple) est, dès lors, possible et en cours d'investigation.

DÉTECTION DE MARQUEURS DE VIRULENCE

La recherche et la détection de souches pathogènes produisant des facteurs de virulence particuliers associés à des protéines spécifiques, telles des toxines par exemple, pourraient également aider le clinicien dans la gestion des infections. Bittar et al. (12) ont trouvé un pic, marqueur de la présence de la leucocidine de Pantone et Valentine (toxine PVL), qui différencie les souches de *S. aureus* productrices de PVL de celles qui n'en produisent pas. Cette approche semble prometteuse mais, comme pour la détection de résistance aux antibiotiques, elle nécessite des développements pour permettre son application clinique.

INTRODUCTION D'UN SYSTÈME MALDI-TOF MS AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MÉDICALE DU CHU DE LIÈGE

En mai 2009, le spectromètre de masse MALDI-TOF Biotyper de Bruker a été mis en service au laboratoire de microbiologie médicale. Depuis juillet 2009 le système MALDI-TOF est utilisé comme le système d'identification de première ligne. Après 6 mois d'utilisation en routine, une évaluation des performances du MALDI par rapport aux méthodes classiques, réalisée sur 1.013 isolats, démontrait un taux d'identifications équivalentes de 96,7% (Tableau I). Le MALDI-TOF MS montre même des performances supérieures pour l'identification de certaines espèces bactériennes d'intérêt clinique (*Aerococcus urinae* par exemple), mais surtout pour les microorganismes isolés de l'environnement.

Les développements actuels se focalisent sur l'identification des bactéries anaérobies, des

TABLEAU I. POURCENTAGE D'IDENTIFICATIONS ÉQUIVALENTES ENTRE LES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION CONVENTIONNELLES ET LE MALDI-TOF MS (BRUCKER) POUR 1.013 ISOLATS (CHU DE LIÈGE- FÉVRIER 2010)

Groupe bactérien	Nombre de souches testées	Identifications équivalentes (%)
Entérobactéries	541	98,7
Bacilles Gram négatif non fermentants	207	95,6
Staphylocoques	83	97,5
Streptocoques	110	89
<i>Haemophilus /Moraxella</i>	42	97,6
<i>Neisseria sp.</i>	4	100
<i>Campylobacter sp.</i>	5	100
Bactéries anaérobies	21	95,2
TOTAL	1.013	96,7

champignons et des mycobactéries, et prioritairement sur l'identification directe des bactéries présentes dans les hémocultures positives. Une technique d'extraction sensible, efficace et facile à mettre en place en routine est en cours de mise au point. Comme le rapportent d'autres utilisateurs (6, 13, 14), la technique permet plus facilement l'identification des bactéries à Gram négatif par rapport aux Gram positifs.

DISCUSSION

La technique MALDI-TOF MS est capable d'identifier jusqu'à l'espèce plus de 80% des isolats (bactéries, champignons) d'un laboratoire de bactériologie clinique en moins de 5 minutes

par isolat, avec un coût d'utilisation nettement moindre que les méthodes conventionnelles, tout en montrant des performances égales, voire supérieures à celles-ci (Tableau II). La spectrométrie de masse MALDI-TOF change l'approche des laboratoires de routine pour l'identification des microorganismes et se positionne comme le test de première ligne, pour tous les isolats, réservant aux techniques phénotypiques conventionnelles l'identification des espèces non caractérisées par la spectrométrie.

Grâce au système MALDI-TOF MS, le délai d'identification a ainsi été réduit d'une journée (18-24h après l'ensemencement du prélèvement, au lieu de 36-48h précédemment). La connaissance de l'espèce bactérienne, même si son antibiogramme n'est pas encore disponible, permet au clinicien de sélectionner l'antibiotique le plus adéquat en se basant sur les données épidémiologiques locales et de l'hôpital. Au CHU, ces données sont publiées et régulièrement mises à jour sur l'Intranet du CHU par l'équipe d'Hygiène hospitalière; elles reprennent les profils de sensibilité aux antibiotiques de la plupart des bactéries isolées ces dernières années. Leur examen permet la mise en route d'un traitement antibiotique présomptif ajusté. Cet avantage sera encore renforcé lorsque l'identification directe à partir des flacons d'hémocultures sera instaurée en routine.

Le coût de l'appareil constitue un investissement, comparable à celui d'autres équipements d'un laboratoire de bactériologie, et celui-ci est rapidement rentabilisé par le faible coût des consommables (matrice, tips, solvant et eau pour spectrométrie de masse : 0,1 €/échantillon),

TABLEAU II. TABLEAU COMPARATIF SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF VS AUTRES MÉTHODES D'IDENTIFICATION.
* éch = échantillon; ** à condition de savoir ce que l'on cherche et de disposer des amorces adéquates (disponibilité d'un nombre très limité d'applications cliniques)

	MALDI-TOF MS		Identifications phénotypiques par caractères biochimiques	Biologie moléculaire
	Dépôt direct	Extraction		
Durée de préparation	5 minutes	20 minutes	1 à 20 minutes	60 minutes
Durée d'identification	2 minutes	2 minutes	5 à 48 heures	45 minutes à 48 heures
Coût (consommables)	0,1 € /éch.*	0,5 € /éch.	5 € / éch.	30-50 € /éch.
Identifications possibles	Bactéries aérobies/ anaérobies Levures Mycobactéries Champignons filamenteux		Espèces les plus fréquentes d'intérêt clinique	Toutes théoriquement**
Compétence requise	Basique		Modérée	Elevée

notamment par rapport à un système de type Vitek 2® (carte Vitek® : 4-5 €/échantillon). De plus, le MALDI-TOF nécessite très peu de maintenance et peu d'écologie pour son utilisation. L'appareil peut s'intégrer dans un système automatisé global de bactériologie (connexion avec le système informatique du laboratoire et possibilité de connexion avec les systèmes d'antibiogrammes automatisés) mais une réorganisation des flux de travail dans le laboratoire est nécessaire.

Il est important de rappeler que tous les isolats ne peuvent être différenciés par un système MALDI-TOF MS et notamment les microorganismes dont le profil protéique est semblable : *S. pneumoniae* vs *S. mitis/oralis*, *E. coli* vs *Shigella sp.*, *N. meningitidis* vs *N. flava/perflava*, pour lesquels des tests complémentaires ou méthodes alternatives doivent être appliqués. Une optimisation des bases de données pourrait éventuellement résoudre ces problèmes. A l'exception des hémocultures et des échantillons urinaires, l'identification par MALDI-TOF MS requiert une étape de croissance bactérienne sur milieu solide afin d'obtenir des colonies susceptibles de générer des spectres et n'est pas fiable si un mélange d'espèces microbiennes est présent dans l'échantillon.

A côté du processus d'identification, d'autres aspects de l'analyse des microorganismes sont en cours de développement tels que le typage des souches, la recherche de facteurs de virulence ou de mécanismes de résistance aux antibiotiques; ces développements sont étroitement liés à la construction de bases de données adéquates. Cette recherche de mécanismes de résistance aux antibiotiques est très importante car, à l'heure actuelle, l'étude de sensibilité aux antibiotiques requiert toujours une étape de croissance bactérienne et donc un délai de réalisation (minimum 48h après la réception d'un échantillon).

Enfin, le MALDI-TOF serait relativement peu intéressant sans une base de données précise, adaptée, et pouvant être régulièrement mise à jour. L'affinement et l'enrichissement des bases de données sont des éléments essentiels pour développer l'efficacité et la précision de la technique.

CONCLUSION

Encore méconnue il y a peu de temps, la spectrométrie de masse MALDI-TOF est en train de se faire une place de choix au sein des laboratoires de bactériologie clinique pour l'identification des microorganismes en routine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, et al.— Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**, 58-64.
2. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al.— Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 2009, **49**, 543-551.
3. van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ.— High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*, 2010, **48**, 900-907.
4. Blondiaux N, Gaillot O, Courcol RJ. MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates : evaluation in a teaching hospital in Lille. *Pathol Biol*, 2010, **58**, 55-57.
5. Westh H, Lisby G, Breyse F, et al.— Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect*, 2009, **15**, 544-551.
6. La Scola B, Raoult D.— Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*, 2009, **4**, e8041.
7. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, et al.— Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 2010, **48**, 2110-2115.
8. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, et al.— Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**, 5402-5407.
9. Fujinami Y, Kikkawa HS, Kurosaki Y, et al.— Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res*, 2010, Mar 25. [Epub ahead of print].
10. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, et al.— Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol*, 2000, **49**, 295-300.
11. Bernardo K, Pakulat N, Macht M, et al.— Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*, 2002, **2**, 747-753.
12. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, et al.— MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, **36**, 193-194.
13. Szabados F, Michels M, Kaase M, et al.— The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT (bioMérieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect*, 2010, Mar 29. [Epub ahead of print].
14. Drancourt M.— Detection of microorganisms in blood specimens using MALDI-TOF mass spectrometry : a review. *Clin Microbiol Infect*, 2010, Jun 8. [Epub ahead of print].

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr de Mol, Service de Microbiologie médicale, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.