

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES
Ecole Doctorale "Environnements – Santé"

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 18 novembre 2016 par

Marlène SAUGET

pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Franche-Comté
en Sciences de la Vie et de la Santé

**Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie
de masse de type MALDI-TOF : application aux principales
espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales**

Membres du jury :

Pr Christophe DE CHAMPS, Université de Reims Champagne-Ardenne

Pr Matthieu EVEILLARD, Université d'Angers

Dr Stéphane CORVEC, Université de Nantes

Pr Xavier BERTRAND, Université de Franche-Comté

Pr Didier HOCQUET, Université de Franche-Comté

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement le Professeur Didier Hocquet et le Professeur Xavier Bertrand.

Didier, en tant que directeur de cette thèse, merci d'avoir accepté d'encadrer ce travail, merci pour tes conseils et ta rigueur scientifique. Un grand merci aussi pour ta disponibilité, pour nos collaborations passées et, j'espère, à venir. Merci également pour ta bonne humeur et tes astuces informatiques.

Xavier, plus qu'un examinateur, tu as co-encadré cette thèse. Je te remercie toi aussi pour tes conseils et ta disponibilité. En tant que chef de service, merci de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je profite aussi de l'occasion pour te remercier de m'avoir donnée ma chance, il y a déjà quelques années, avec Mr Talon. Aujourd'hui c'est pour moi un plaisir de travailler dans ton service.

Je remercie vivement le Docteur Stéphane Corvec et le Professeur Matthieu Eveillard d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et de faire le déplacement à Besançon malgré les kilomètres depuis l'ouest de la France.

Je remercie sincèrement le Professeur Christophe de Champs d'avoir accepté d'examiner mon travail et pour ses conseils lors des comités de suivi de thèse des 3 années passées.

Merci à tous les membres de l'équipe d'épidémiologie-hygiène hospitalière du CHRU de Besançon et de l'équipe de recherche UMR Chrono-environnement qui m'ont aidée pendant toute la durée de ce travail, en particulier Pascal, Marion, Michelle, Houssein, Juliette, Benoît sans oublier Nadège et Jérémie et les nombreux stagiaires.

Un grand merci également aux techniciens et techniciennes du laboratoire en particulier Aurélie, Caro, Cédric, Christelle, Marie-Laure, Nadine, Christine que ce soit pour un coup de mains, un soutien, des éclats de rire, pour les moments passés et à venir.

Mes pensées vont également à Jade, Luce, Thomas, mes parents, ma famille.

SOMMAIRE

Liste des travaux réalisés	1
Liste des abréviations	5
Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
1. Introduction	11
2. Les marqueurs épidémiologiques	12
2.1. Définition, principe et intérêts du typage bactérien	12
2.2. Les marqueurs épidémiologiques	13
2.2.1. Les marqueurs phénotypiques	14
2.2.2. Les marqueurs génotypiques de première génération	16
2.2.3. Les marqueurs génotypiques de seconde génération	21
2.2.4. Les techniques de spectrométrie	22
3. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF	23
3.1. Historique	23
3.2. Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF	25
3.3. Applications de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie clinique	26
3.3.1. Identification des microorganismes	26
3.3.2. Détection de la résistance bactérienne	29
3.3.2.1. Détection de mécanismes enzymatiques de résistance	29
3.3.2.2. Détection de la résistance à un antibiotique en suivant la croissance bactérienne.	30
3.3.3. Typage bactérien	31
3.3.3.1. Intérêt du typage rapide par MALDI-TOF MS pour les principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales	33
3.3.3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	33
3.3.3.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	37
3.3.3.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41

3.3.3.2.	Intérêt du typage rapide par MALDI-TOF MS pour d'autres espèces bactériennes.....	42
3.3.3.3.	Préparation des échantillons pour le typage par MALDI-TOF MS	45
3.3.3.4.	L'acquisition des spectres de masse	45
3.3.3.5.	Analyses des données et identification de pics biomarqueurs.....	46
4.	Matériel et Méthodes	48
4.1.	Plan de travail	48
4.2.	Méthodologie.....	48
4.2.1.	Souches bactériennes utilisées.....	48
4.2.2.	Préparation et dépôt des échantillons	48
4.2.3.	Acquisition des spectres	49
4.2.4.	Analyse des spectres de masse et identification de pics biomarqueurs.....	50
4.2.4.1.	Flexanalysis® (Bruker Daltonik)	50
4.2.4.2.	MALDI Biotyper® (Bruker Daltonik)	50
4.2.4.3.	ClinProTools® 3.0 (Bruker Daltonik).....	51
4.2.5.	Validation de la stratégie de typage	53
4.2.6.	Application des stratégies de typage validées	53
5.	Résultats.....	54
5.1.	Typage de <i>Escherichia coli</i> par MALDI-TOF MS	54
5.1.1.	Etude 1 – Evaluation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour identifier les phylogroupes A, B1, B2 et D de <i>E. coli</i>	54
5.1.1.1.	Présentation de l'article	54
5.1.1.2.	Texte de l'article.....	55
5.1.2.	Etude 2 – Détection de <i>E. coli</i> ST131 par MALDI-TOF MS : quelles applications en hygiène hospitalière?	63
5.1.2.1.	Présentation de l'article	63
5.1.2.2.	Texte de l'article.....	64
5.1.3.	Etude 3 – Epidémiologie de <i>E. coli</i> ST131 producteur de BLSE et de son sous-clone H30 dans un hôpital français sur une période de 15 ans	70
5.1.3.1.	Présentation de l'article	70
5.1.3.2.	Texte de l'article.....	71
5.2.	Typage de <i>Staphylococcus aureus</i> par MALDI-TOF MS.....	76

5.2.1.	Etude 4 – Identification de <i>S. aureus</i> CC398 par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	76
5.2.1.1.	Présentation de l'article	76
5.2.1.2.	Texte de l'article.....	77
5.2.2.	Etude 5 – Détection du clone de <i>S. aureus</i> ST398 parmi la population de <i>S. aureus</i> isolés de dépistage.....	82
5.3.	Typage de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par MALDI-TOF MS	88
5.3.1.	Etude 6 – Identification de clones de <i>P. aeruginosa</i> à haut risque par MALDI-TOF MS.	88
5.3.1.1.	Présentation de l'article	88
5.3.1.2.	Texte de l'article.....	89
6.	Discussion.....	94
6.1.	Typage de <i>E. coli</i> par MALDI-TOF MS	94
6.2.	Typage de <i>S. aureus</i> par MALDI-TOF MS.....	97
6.3.	Typage de <i>P. aeruginosa</i> par MALDI-TOF MS	99
6.4.	Discussion générale	100
6.4.1.	Impact des paramètres techniques sur le typage par MALDI-TOF MS.....	100
6.4.2.	Analyse des données et identification des pics biomarqueurs	101
6.4.3.	Echantillonnage des souches et critères de performance	103
6.4.4.	Temps et coût d'analyse.....	103
6.4.5.	Texte de la revue	104
7.	Perspectives.....	114
8.	Conclusion	115
	Références bibliographiques.....	117

Liste des travaux réalisés

1. Travaux portant sur le sujet de thèse

Publications

- **Sauget M**, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? Trends Microbiol. 2017 Jan 13. Doi : 10.1016/j.tim.2016.12.006. (IF 2015 : 9,50)
- **Sauget M**, Cholley P, Vannier A, Thouverez M, Nicolas-Chanoine M.H, Hocquet D, Bertrand X. Trends of ESBL-producing *Escherichia coli* Sequence Type 131 and its *H30* subclone in a French hospital over a 15-year period. Int J Antimicrob Agents 2016 ; 48 : 744-747. (IF 2015 : 4,10)
- **Sauget M**, van der Mee-Marquet N, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can detect *Staphylococcus aureus* clonal complex 398. J Microbiol Methods 2016 ; 127 : 20-23. (IF 2015 : 1,86)
- Lafolie J, **Sauget M**, Cabrolier N, Hocquet D, Bertrand X. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies? J Hosp Infect 2015 ; 90 : 208-212. (IF 2015 : 2,65)
- Cabrolier N, **Sauget M**, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. J Clin Microbiol 2015 ; 53 : 1395-1398. (IF 2015 : 3,63)
- **Sauget M**, Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. Int J Med Microbiol 2014 ; 304 : 977-983. (IF 2014 : 3,61)

Communications orales

- **Sauget M**, Bertrand X, Hocquet D. Typage de *Escherichia coli* par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. RICAI 2013 Paris.
- **Sauget M**, Hocquet D. MALDI-TOF et typage bactérien : Application à *E. coli* et *P. aeruginosa*. Symposium clinique Bruker 2014.

Posters

- **Sauget M**, Bertrand X, Hocquet D. Identification de *S. aureus* CC398 par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. RICAI 2015 Paris.
- **Sauget M**, Bertrand X, Hocquet D. Phylotyping of *Escherichia coli* using MALDI-TOF MS. ECCMID 2014 Barcelone.

2. Autres travaux

Publications

- **Sauget M**, Cabrol N, Manzoni M, Bertrand X, Hocquet D. Rapid, sensitive and specific detection of carbapenemase activity by MALDI-TOF MS among OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae*. J Microbiol Methods 2014 ; 105 : 88-91. (IF 2014 : 2,03)
- Bréchet C, Plantin J, **Sauget M**, Thouverez M, Talon D, Cholley P, Guyeux C, Hocquet D, Bertrand X. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. Clin Infect Dis 2014 ; 58 : 1658-1665. (IF 2014 : 8,89)
- Hocquet D, **Sauget M**, Roussel S, Malugani C, Pouthier F, Morel P, Gbaguidi-Haore H, Bertrand X, Grenouillet F. Validation of an automated blood culture system for sterility testing of cell therapy products. Cytotherapy 2014 ; 16 : 692-698. (IF 2014 : 3,29)
- Cholley P, Thouverez M, Gbaguidi-Haore H, **Sauget M**, Slekovec C, Bertrand X, Talon D, Hocquet D. Hospital cross-transmission of extended-spectrum -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Med Mal Infect 2013 ; 43 : 331-336. (IF 2013 : 0,91)
- Bertrand X, Amara M, **Sauget M**, Clément MC, Talon D, Domelier-Valentin AS, Quentin R, van der Mee-Marquet N; Réseau des Hygiénistes du Centre. Extended-spectrum -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: unexpected low prevalence of carriage in elderly French residents. Age Ageing 2012 ; 41 : 233-237. (IF 2012 : 3,82)
- **Sauget M**, Verdy S, Slekovec C, Bertrand X, Talon D. Bacterial contamination of organ graft preservation solution and infection after transplantation. Transpl Infect Dis 2011 ; 13 : 331-334. (IF 2011 : 2,21)

Communication orale

- **Sauget M**, Bertrand X, Hocquet D. Une nouvelle approche quantitative des résistances aux antibiotiques via le prototype MS-ASTRA. Symposium Clinique Bruker 2015. Paris

Posters

- Cox C.R, Saichek N.R, Jensen K, Harrington P.B, **Sauget M**, Hocquet D, and Voorhees K.J. Trends in bacterial fatty acid composition allow for rapid antibiotic resistance Determination. BAARN 2016 Boston.
- **Sauget M**, Bertrand X, Hocquet D. Détection de la résistance d'*Escherichia coli* au céfotaxime par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. RICAI 2015 Paris.
- **Sauget M**, Verdy S, Slekovec C, Bertrand X, Talon D. Bacterial contamination of organ graft preservation solution and infection after transplantation. RICAI 2010 Paris.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFLP : *Amplified fragment-length polymorphism*

ARN : Acide ribonucléique

BLSE : β -lactamase à spectre étendu

BTS : *Bacterial Test Standard*

CC : Complexe Clonal

CCI : *Composite Correlation Index*, matrice de corrélation

cgMLST : Core genome MLST

CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire

CRB-FMB : Centre de Ressources Biologiques–Filière microbiologie du CHRU de Besançon

C3G : Céphalosporines de 3^{ème} génération

Da : Dalton

EAEC : *E. coli* entéroaggrégatif

EHEC : *E. coli* entérohémorragique

EIEC : *E. coli* entéroinvasif

EPEC : *E. coli* entéropathogène

ETEC : *E. coli* entérotoxinogène

FT-IR : *Fourier Transform InfraRed spectroscopy*

GA : Genetic Algorithm

HCCA : α -cyno-4-hydroxycinnamic

IOA : Infection Ostéo-Articulaire

LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en tandem

MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight*

MALDI-TOF MS : Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

MALDI-TOF MS/MS : Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en tandem

MBL : Métallo- β -lactamases

MDR : *Multidrug resistant*

MH : Mueller Hinton

MLST : *Multilocus Sequence Typing*

MLVA : *Multi locus VNTR Analysis*

MOLI-MS : Spectrométrie de masse de type *metal oxide laser ionization*

MS-ASTRA : *MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay*

MSP : *Main spectra*, spectre de référence

MS-RESIST : *MALDI-TOF MS-based resistance test with stable isotopes*

MT : MALDI Type

m/z : Masse/charge

PCA : *Principal Component Analysis*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PFGE : *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, électrophorèse en champ pulsé

POT : Phage open-reading frame typing

PVL : Toxine de Panton et Valentine

QC : *Quick Classifier*

RAPD : *Random amplified polymorphic DNA*

REP-PCR : *Repetitive extragenic palindrome PCR*

RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RICAI : Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

rpm : Rotations par minute

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

SASM : *Staphylococcus aureus* Sensible à la Méthicilline

SNN : *Supervised Neural Network*

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

ST : *Sequence Type*

SVM : *Support Vector Machine*

VNTR : *Variable number of tandem repeats*

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

XDR : *Extensively drug resistant*

WGS : *Whole genome sequencing*

Liste des figures

Figure 1. Interprétation des profils de macrorestriction selon le nombre d'évènements génétiques survenus selon Tenover <i>et al.</i> (11).	19
Figure 2. Schéma récapitulatif de la technique de <i>Multi Locus Sequence Typing</i>	21
Figure 3. Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.....	25
Figure 4. Principe de l'identification bactérienne par MALDI-TOF MS.....	27
Figure 5. Diversités génomique et clonale des 3 principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales : <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>P. aeruginosa</i>	32
Figure 6. Arbre de détermination du groupe phylogénétique d'une souche de <i>E. coli</i> par amplification par PCR des gènes <i>chuA</i> et <i>yjaA</i> et du fragment d'ADN TSPE4. C2, d'après Clermont <i>et al.</i> (74).....	34
Figure 7. Répartition en complexes clonaux de souches de <i>S. aureus</i> sensibles (MSSA) et résistantes à la méthicilline (MRSA) provenant de 6 continents différents, d'après Chambers <i>et al.</i> (101).	38
Figure 8. Préparation et dépôt des échantillons sur une cible MALDI-TOF.	49
Figure 9. Vue d'ensemble des quatre algorithmes de classification intégrés au logiciel ClinProTools® (Bruker Daltonik).....	52
Figure 10. Prévalence du clone de <i>S. aureus</i> CC398 parmi les SAMS isolés de prélèvements de dépistage au cours du premier semestre des années 2010 à 2013 au CHRU de Besançon... ..	84
Figure 11. Prévalence du clone de <i>S. aureus</i> CC398 parmi les SAMS isolés de prélèvements d'infection au cours du premier semestre des années 2010 à 2013 au CHRU de Besançon....	85
Figure 12. Comparaison de la prévalence du clone de <i>S. aureus</i> CC398 parmi les SAMS isolés de prélèvements de dépistage et d'infection au cours des années 2010 à 2013 au CHRU de Besançon.....	86
Figure 13. Test de survie en milieu acide (2 h d'incubation à pH 2, à 37°C, sous agitation, dans du LB) de 14 souches de <i>E. coli</i> en fonction de leur appartenance au phylogroupe B2..	96

Liste des tableaux

Tableau 1. Performances des différents marqueurs phénotypiques.	15
Tableau 2. Performances des différents marqueurs génotypiques.	17
Tableau 3. Performances de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF <i>versus</i> identification conventionnelle pour l'identification bactérienne.	24
Tableau 4. Typage de <i>E. coli</i> par MALDI-TOF MS.	35
Tableau 5. Les différentes études ayant évaluées la technique MALDI-TOF MS pour différencier les souches SASM et SARM, d'après Szabados <i>et al.</i> (109).	39
Tableau 6. Typage de <i>S. aureus</i> par MALDI-TOF MS.	40
Tableau 7. Typage de différentes espèces bactériennes par MALDI-TOF MS.	43

1. Introduction

Les pathologies infectieuses sont fréquentes dans les établissements de santé quel que soit le type de service. L'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales réalisée en 2012 montrait que 15 180 patients présentaient une infection nosocomiale le jour de l'enquête pour une prévalence de 5,1% (1). Ces données reflètent l'étendue des maladies infectieuses dans nos hôpitaux, une situation encore aggravée par l'ajout des infections acquises dans la collectivité. De plus, depuis quelques années, la résistance aux antibiotiques est une préoccupation majeure (2). La proportion de bactéries résistantes aux antibiotiques est particulièrement élevée en milieu hospitalier. La production d'enzymes inhibant ou dégradant les antibiotiques, la réduction de la perméabilité de la membrane bactérienne et la modification de la cible antibiotique sont les mécanismes de résistance les plus fréquents. En France, dans les établissements de santé, nous avons observé la propagation de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline depuis la fin des années 1970 (3). Plus récemment, nous avons observé l'émergence et la diffusion d'entérobactéries (principalement *Escherichia coli*) qui produisent des β -lactamases à spectre étendu ou des carbapénémases (4, 5). *Pseudomonas aeruginosa* peut résister à presque tous les antibiotiques disponibles en accumulant de multiples mécanismes de résistance et ainsi conduire à une impasse thérapeutique et à une mortalité plus élevée des patients infectés (6).

L'utilisation d'antibiotiques crée une pression de sélection qui favorise la diffusion de ces souches résistantes aux antibiotiques. Pendant de nombreuses années, les progrès pharmaceutiques ont offert de nouvelles molécules qui échappaient aux mécanismes de résistance. Mais actuellement, les nouvelles molécules sont rares. Par conséquent, la diffusion des bactéries multirésistantes est un problème majeur de santé publique dans le monde entier. Leur émergence et leur diffusion sont favorisées par l'utilisation d'antibiotiques à large spectre. Pour limiter la diffusion de ces pathogènes, il est non seulement indispensable de prescrire les antibiotiques ayant les spectres les plus étroits mais aussi de mettre en place des mesures d'hygiène limitant leur transmission. Cela nécessite à la fois l'identification bactérienne rapide, permise par la technique de spectrométrie de masse de type *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight* (MALDI-TOF MS), mais également la détermination rapide des profils de résistance bactérienne et l'identification et le suivi des clones épidémiques.

2. Les marqueurs épidémiologiques

L'étude de l'épidémiologie des infections permet d'identifier le mode d'acquisition du micro-organisme responsable, les modes de transmission, la dynamique de la colonisation et les facteurs de risque d'infection. Lorsqu'il s'agit d'une bactérie multirésistante aux antibiotiques, il faut également tenter d'identifier les facteurs de risque d'émergence et d'implantation de cette multirésistance. Ces études supposent que la comparaison des souches isolées des malades et de leur environnement permette d'établir leur degré de similitude. En cas d'épidémie, la réponse doit être apportée le plus rapidement possible de manière à mettre en place rapidement les mesures d'hygiène nécessaires au contrôle de la diffusion du pathogène.

2.1.Définition, principe et intérêts du typage bactérien

Il existe différents niveaux d'identification d'une bactérie : genre, espèce, sous-espèce, clone, sous-clone... Le niveau d'identification à atteindre dépend de l'objectif fixé : clinique ou épidémiologique. Le typage permet de différencier des souches au sein d'une même espèce : l'objectif est alors de rechercher la clonalité entre des souches susceptibles d'être liées épidémiologiquement, c'est-à-dire isolées dans un même contexte spatio-temporel.

Le typage bactérien présente trois champs d'application : l'usage à visée épidémiologique, l'usage à des fins de diagnostic individuel, et l'usage à visée phylogénétique. (i) L'enquête épidémique représente l'application la plus évidente. Plusieurs questions sont posées par une augmentation de l'incidence d'infections ou de colonisations par une bactérie pathogène : cette augmentation de l'incidence est-elle liée à la dissémination d'un ou de plusieurs clones ? Quels sont les réservoirs, vecteurs et modes de transmission du ou des clones impliqués ? Les mesures de contrôle mises en place ont-elles permis la maîtrise du phénomène épidémique ? Sur le plan épidémiologique, le typage permet de suivre la diffusion des bactéries à l'échelle locale. Le mode de diffusion peut être identifié : accumulation de cas indépendants ou diffusion épidémique, ainsi que les vecteurs de la diffusion clonale : personnel de la structure de soin (maîtrise insuffisante des précautions d'hygiène), objet ou environnement contaminés. Il permet également de suivre la diffusion de souches étendue à une région, un pays, un ou plusieurs continents. Le typage présente ici un intérêt majeur puisqu'il permet alors la surveillance épidémiologique de souches bactériennes présentant souvent des caractères communs de résistance aux antibiotiques, ou de pathogénicité, causes majeures de morbidité et de mortalité. (ii) Sur le plan du diagnostic individuel et notamment lors d'infection

chronique, il permet de différencier une récurrence d'une réinfection. Il permet également d'établir le foyer initial d'une infection disséminée ou encore de confirmer ou infirmer l'origine endogène d'une infection acquise à l'hôpital. (iii) Sur le plan phylogénétique, le typage explore l'hétérogénéité d'une espèce bactérienne. Il permet de connaître la répartition géographique et la diversité génomique des souches au sein d'une espèce. Il permet de définir le niveau de similarité entre les clones (pourcentage de similitude) et de déterminer, dans certaines conditions, la vitesse de l'horloge moléculaire d'un clone ou d'une espèce.

2.2. Les marqueurs épidémiologiques

Les marqueurs épidémiologiques sont des caractères discriminants permettant d'étudier la structure de population d'une espèce donnée. Un marqueur épidémiologique est évalué suivant plusieurs critères : les critères de performance et les critères pratiques (7, 8). On définit 4 critères de performance :

- Typabilité ou sensibilité : le marqueur épidémiologique est présent chez tous les individus de l'espèce pour permettre de typer chacune de ces souches,
- Stabilité : il est stable dans un espace-temps défini,
- Pouvoir discriminant ou spécificité : il différencie deux souches sans aucun lien épidémiologique,
- Reproductibilité : la méthode d'observation de ce caractère doit permettre de donner un résultat identique lorsqu'elle est appliquée à plusieurs reprises sur la même souche

Les critères pratiques évaluent :

- La flexibilité de la technique de typage,
- Sa rapidité,
- Sa facilité d'emploi (coûts, équipements, simplicité de la technique, nombre d'échantillons exploitables),
- Sa facilité d'interprétation,
- Sa standardisation.

Différents marqueurs épidémiologiques notamment phénotypiques et génotypiques, sont déjà bien connus et exploités dans des stratégies de typage adaptées à de multiples micro-organismes. D'autres marqueurs sont plus innovants et proviennent des données de séquençage génomique ou des techniques de spectrométrie.

2.2.1. Les marqueurs phénotypiques

Les marqueurs ‘historiques’ étaient des caractères bactériens aisément observables. Leurs performances sont résumées dans le Tableau 1. Ces marqueurs phénotypiques ont peu à peu été abandonnés en raison d’un manque de reproductibilité, mais aussi de leur faible pouvoir discriminant et quelquefois de leur faible typabilité. Ils sont nombreux : biotypes (caractères morphologiques et physiologiques), sérotypes (antigènes de surface), lysotypes (profil de sensibilité à une série de bactériophages), bactériocinotypes (profil de sensibilité d’une collection de souches aux bactériocines produites par la souche à typer ou profil de sensibilité de la souche à typer à un panel de bactériocines connues) ou encore profil protéique (extraction des protéines bactériennes puis séparation par électrophorèse) (9). Néanmoins, malgré ses nombreuses limites, l’antibiotype (profils de résistance aux antibiotiques) reste un moyen rapide d’alerte d’épidémie dans les laboratoires de microbiologie clinique.

Tableau 1. Performances des différents marqueurs phénotypiques.

MARQUEUR	PRINCIPE	AVANTAGES	INCONVENIENTS
Biotype	Détection du profil morphologique, biochimique (auxanogramme...)	- facile - automatisé et couplé au système d'identification (API ...)	- peu discriminant - peu reproductible car pouvant être influencé par des facteurs techniques ou environnementaux
Antibiotype	Détermination du profil de sensibilité aux antibiotiques	- facile - automatisé - signal d'alerte dans l'apparition d'un phénotype multirésistant	- peu discriminant - variabilité génétique de la résistance aux antibiotiques, acquisition ou perte de plasmides - pression de sélection - système souvent expertisé conduisant à une homogénéisation des phénotypes de résistance
Sérotype	Détection de la présence de déterminants antigéniques bactériens	- facile - rapide - standardisé pour certaines bactéries (<i>Salmonella</i> , <i>E.coli</i> , méningocoque...)	- antisérums coûteux ou non commercialisés - toutes les souches ne sont pas sérotypables - faible pouvoir discriminant - instabilité des déterminants antigéniques : recombinaison
Lysotype	Détermination de la sensibilité d'une souche à un panel de phages	- utilisable pour subdiviser les sérotypes ou typer les souches non sérotypables	- technique lourde - approvisionnement difficile en phages actifs et souches témoins - manque de standardisation - faible reproductibilité
Bactériocinotype	Méthode basée sur la sensibilité de certaines souches (pousse inhibée) vis-à-vis de substances (bactériocines) élaborées par d'autres souches bactériennes	- peu coûteuse - technique standardisée pour certaines bactéries	- technique lourde - faible pouvoir discriminant
Electrophorèse des protéines	Variations dans la structure des protéines bactériennes détectées par électrophorèse	- applicable à toutes les bactéries	- peu discriminant - interprétation difficile en raison du grand nombre de bandes

2.2.2. Les marqueurs génotypiques de première génération

Face aux performances limitées des marqueurs phénotypiques, de multiples marqueurs génotypiques ont été développés reposant soit sur des techniques de restriction de l'ADN, soit sur l'amplification de gènes. Les méthodes d'amplification génique de première génération sont très nombreuses. Elles reposent sur l'identification de séquences connues ou sur le polymorphisme génomique de séquences déterminées. Le Tableau 2 compare les performances de différents marqueurs génotypiques de première génération. Même si de nombreuses techniques de typage moléculaire sont actuellement disponibles, en pratique, uniquement 2 techniques sont considérées comme des méthodes de référence : l'électrophorèse en champ pulsé PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) et la technique de MLST (*Multilocus Sequence Typing*).

Tableau 2. Performances des différents marqueurs génotypiques.

MARQUEUR	PRINCIPE	AVANTAGES	INCONVENIENTS
Méthodes de typage par restriction de l'ADN			
Electrophorèse en champ pulsé	Comparaison du profil de restriction des génomes bactériens	- grande résolution - pouvoir discriminant important supérieur à celui des autres marqueurs - bonne reproductibilité intra-laboratoire - applicable à un grand nombre d'espèces bactériennes	- technique longue : 4 à 5 jours en moyenne (5 j en moyenne/12 souches) - technique coûteuse: appareillage, logiciel, réactifs et temps - technique délicate, manuelle, nécessitant du personnel très qualifié - résultats obtenus non standardisés
Ribotypage	Polymorphisme des fragments de restriction de l'ADN codant pour les ARN ribosomaux	- technique automatisable donc plus rapide (32 ribotypes/j) - technique reproductible et standardisée (résultats comparables entre laboratoires) - marqueur taxonomique et épidémiologique	- procédure complexe et longue si manuelle - pouvoir discriminant plus faible que PFGE, ribotype caractéristique d'espèce uniquement pour certaines espèces bactériennes - recombinaisons possibles entre opérons (problème pour le diagnostic d'espèces mais pas pour l'épidémiologie : vitesse d'horloge moléculaire faible) - problème de standardisation de la technique
Méthodes de typage par amplification de gènes			
RAPD (<i>random amplified polymorphic DNA</i>)	PCR en conditions de faible stringence (amorce courte et unique, température d'hybridation basse)	- technique rapide - pouvoir de discrimination moyen améliorée par l'utilisation simultanée de 3 amorces - méthode flexible (possible pour plusieurs espèces bactériennes)	- manque de standardisation de la technique (pas de critères d'interprétation véritablement définis) - mauvaise reproductibilité inter-série et inter-laboratoire (amorçage au hasard des sondes) - difficulté de lecture et d'interprétation (bandes d'intensité faible par mauvaise hybridation de l'amorce)
REP-PCR (<i>repetitive extragenic palindrome PCR</i>)	Hybridation dans des conditions de forte stringence d'amorces ciblées sur des séquences courtes, répétées, spécifiques d'un genre bactérien, non codantes, conservées et dispersées sur le génome	- technique rapide, simple et peu chère par rapport au champ pulsé - bon pouvoir de discrimination mais inférieur au champ pulsé, car moins de bandes - technique flexible (possible pour plusieurs genres bactériens)	- reproductibilité inter-laboratoire médiocre (manque de standardisation technique et d'interprétation), mais meilleure que la RAPD

		- meilleure reproductibilité inter-série que la RAPD - lecture de profils plus simple que la RAPD	
Méthodes de typage par amplification de gènes : polymorphisme de séquences ou locus déterminés			
MLVA (<i>Multi locus VNTR Analysis</i>)	PCR puis analyse de la taille et de la quantité de fragments de régions polymorphiques de l'ADN contenant des VNTR (<i>Variable number of tandem repeats</i>)	- bonne capacité discriminante (quasiment aussi discriminante que l'électrophorèse en champ pulsé) - haute résolution - facilement reproductible - technique peu coûteuse - rapide	- une optimisation doit être effectuée pour chaque espèce - le développement des amorces implique que la séquence du génome de la bactérie à typer soit connue - les VNTRs évoluent souvent trop rapidement pour fournir une relation phylogénétique fiable parmi les souches étroitement liées : technique plutôt adaptée aux études sur une période courte par exemple à l'échelle d'un épisode épidémique
Méthodes d'analyse des séquences nucléotidiques			
MLST (Polymorphisme de séquences ou locus déterminés)	Séquençage de gènes de ménage, « <i>house keeping genes</i> », qui sont des gènes importants pour le métabolisme d'une bactérie. Utilisation de gènes stables dans le temps (taux de mutation faible) dont les allèles sont caractéristiques de clones d'espèce	- bonne reproductibilité intra-laboratoire, inter-laboratoire - données précises (séquençage de gènes) - applicables à de nombreux pathogènes - absence de problème de lecture et d'interprétation - résultats définitifs et interchangeables	- coût - problème du choix des gènes à séquencer en fonction du pouvoir discriminant désiré - mutations en dehors des séquences étudiées non mises en évidence
cgMLST (<i>core genome MLST</i>)	Séquençage du génome bactérien complet. Les données générées permettent de comparer le <i>core genome</i> d'une population, c'est-à-dire l'ensemble des séquences nucléotidiques communes à tous les individus	- plus résolutive que la technique MLST classique - extrêmement sensible car distingue chaque variation nucléotidique au sein du <i>core genome</i> - parfaitement adaptée à l'étude de la phylogénie bactérienne - informe sur la présence de gènes de résistance aux antibiotiques ou de virulence	- technique longue - coûteuse - demande des compétences en bioinformatique et une puissance de calcul importante

La technique de PFGE permet d'obtenir un profil de restriction de l'ensemble du génome d'un microorganisme par digestion de l'ADN grâce à des enzymes de restriction (8). Le choix des enzymes à utiliser est fonction du microorganisme étudié : les enzymes doivent couper le génome en un nombre de fragments suffisamment grand pour être discriminant et suffisamment réduit pour que le profil soit lisible. La séparation de ces fragments nécessite l'emploi d'une technique d'électrophorèse particulière dite 'en champ pulsé' pendant laquelle l'orientation du champ électrique est alternée au cours du temps. Sous l'effet de ces champs alternatifs, les molécules d'ADN progressent dans le gel et sont séparées selon leur taille. Le profil de macro-restriction obtenu définit alors un pulsotype parfois abusivement qualifié de clone. L'interprétation repose sur le nombre et la taille des fragments (Figure 1). Cette technique a un pouvoir discriminant important et a très souvent prouvé son efficacité dans l'investigation d'épidémies locales (10). Elle permet de discriminer des souches génétiquement très proches. Toutefois, il s'agit d'une technique longue (4 à 5 jours en moyenne), coûteuse (appareillage, logiciel, réactifs et temps) et délicate nécessitant du personnel très qualifié. Les résultats obtenus ne sont pas standardisés (comparaison de profils limitée à des souches isolées dans le même temps et au sein d'un même laboratoire).

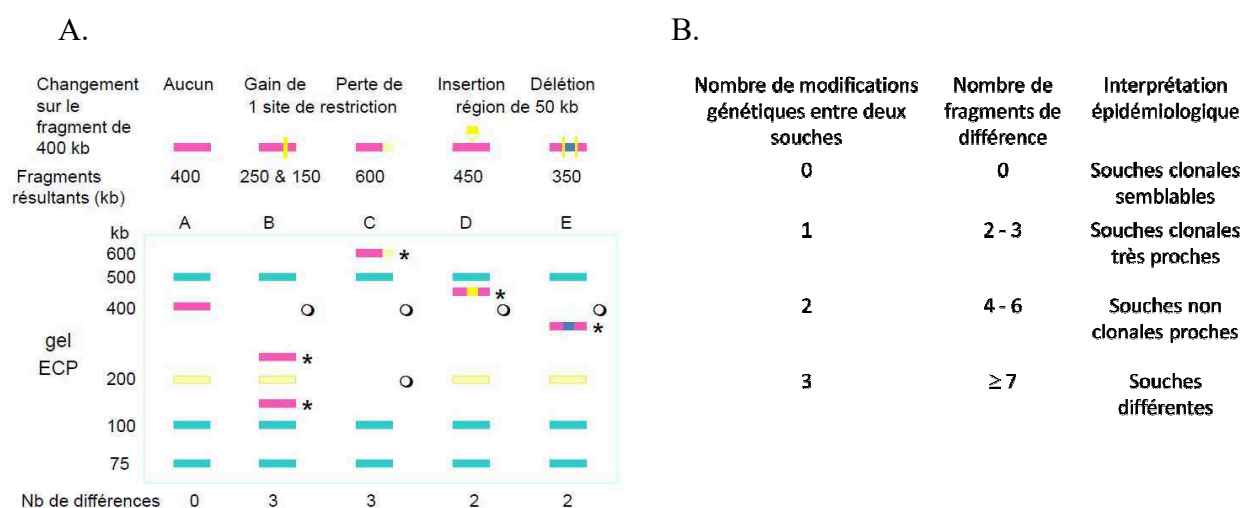


Figure 1. Interprétation des profils de macrorestriction selon le nombre d'évènements génétiques survenus selon Tenover *et al.* (11). A. Diagramme des changements théoriques qui peuvent se produire sur un profil d'ADN après électrophorèse en champ pulsé suite à des évènements génétiques variés comme des insertions, des délétions ou des réarrangements. Le cercle indique les fragments présents dans le profil épidémique et manquant dans l'isolat après l'évènement génétique. L'étoile indique les fragments présents après l'évènement génétique mais absents dans le profil épidémique. B. Critères d'interprétation des variations du profil de macrorestriction.

La technique de MLST repose sur la séquence nucléotidique de portions de 7 gènes chromosomiques dits ‘de ménage’ faisant partie du *core genome* de l’espèce (12). Ces gènes interviennent dans le métabolisme de base de la bactérie et sont, par conséquent, très conservés au cours de l’évolution. L’analyse des séquences est réalisée via une interface web spécifique. Les séquences des 7 gènes étudiés sont comparées aux séquences de la base de données. Un numéro d’allèle est alors attribué à chaque séquence. La combinaison des 7 numéros obtenus détermine un *Sequence Type* (ST). Le schéma récapitulatif de cette technique est présenté Figure 2. Cette méthode est excellente pour des études macro-épidémiologiques (nationales, continentales et intercontinentales) et phylogénétiques. La MLST n’est pas une technique interprétative : elle repose sur des données précises (séquençage de gènes). Les résultats sont définitifs et interchangeables. Elle présente donc une bonne reproductibilité intra-laboratoire et surtout inter-laboratoire. Cette technique présente néanmoins des inconvénients : coût, problème d’adéquation du choix des gènes à séquencer en fonction du pouvoir discriminant désiré et les mutations en dehors des séquences étudiées ne sont pas mises en évidence.

Au final une méthode de typage doit être choisie en fonction des objectifs et des performances des différents systèmes de typage disponibles. Elle doit être suffisamment discriminante mais aussi suffisamment agrégative. Les techniques très spécialisées manquent souvent de standardisation : procédures, matériel, assurance qualité, critères d’interprétation (sauf pour la technique MLST). Les évolutions techniques ont conduit au développement d’autres marqueurs dit de seconde génération, comme le séquençage de génome complet, ou basés sur l’utilisation d’autres technologies, comme la spectrométrie, venant encore enrichir le panel des techniques disponibles.

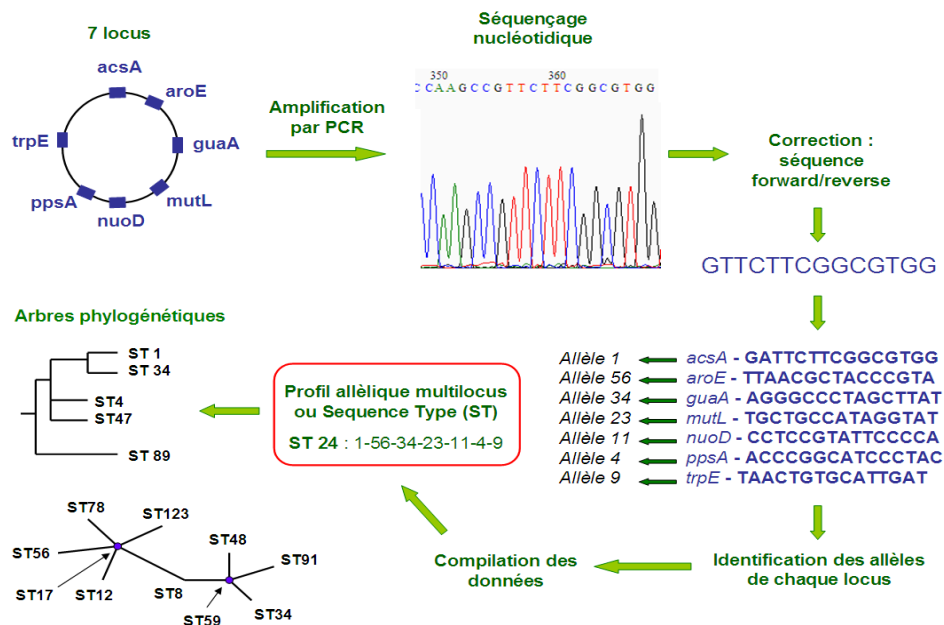


Figure 2. Schéma récapitulatif de la technique de *Multi Locus Sequence Typing*, d'après C. Bouvier-Slekovec.

2.2.3. Les marqueurs génotypiques de seconde génération

Les techniques de séquençage haut débit de la totalité du génome bactérien (*whole genome sequencing*, WGS) se sont considérablement développées ces dernières années en parallèle à une réduction importante des coûts les rendant utilisables comme outil de génotypage bactérien (13-15). Les données générées permettent de comparer le *core genome* d'une population (*core genome* MLST, cgMLST), c'est-à-dire l'ensemble des séquences nucléotidiques communes à tous les individus. Cette technique cgMLST est basée sur la séquence d'un grand nombre de gènes (~2000 en moyenne, très variable selon les espèces). Elle est par conséquent beaucoup plus résolutive que la technique MLST classique. Cette technique est extrêmement sensible car distingue chaque variation nucléotidique au sein du *core genome*. Elle est parfaitement adaptée à l'étude de la phylogénie bactérienne. Moyennant un traitement informatique approprié, elle permet d'établir avec la plus grande fiabilité le degré de parenté entre différentes bactéries. De plus, l'analyse du génome complet informe sur la présence de gènes de résistance aux antibiotiques ou de gènes de virulence (16). L'utilisation des techniques de WGS en routine n'est cependant pas encore à l'ordre du jour, même s'il fait peu de doute que ces techniques supplanteront tôt ou tard toutes les autres.

2.2.4. Les techniques de spectrométrie

Différentes techniques de spectrométrie ont été appliquées au typage des bactéries et notamment la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (ou encore FT-IR, pour *Fourier Transform InfraRed spectroscopy*), la spectrométrie Raman et la spectrométrie de masse de type *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight* (MALDI-TOF MS). La spectrométrie FT-IR et la spectrométrie Raman sont des méthodes physico-chimiques qui fournissent des spectres de la composition moléculaire globale des bactéries (17). La spectrométrie FT-IR permet d'obtenir un spectre d'absorption dans l'infrarouge d'un échantillon. Le traitement des données acquises nécessite un algorithme - la transformée de Fourier - qui donne son nom à la technique. La spectrométrie Raman est basée sur la diffusion d'une lumière monochromatique par l'échantillon. L'effet Raman est un phénomène physique selon lequel un milieu modifie légèrement la fréquence de la lumière y circulant. Ce décalage en fréquence correspond à un échange d'énergie entre le rayon lumineux et l'échantillon et donne des informations sur l'échantillon lui-même. La lumière incidente est transférée à une molécule, excitant ainsi l'un de ces modes de vibration. Les techniques de spectrométrie FT-IR et Raman sont des techniques non destructives et requièrent une préparation minimale de l'échantillon. Les spectres obtenus sont hautement spécifiques, et pourraient contenir des biomarqueurs très discriminants. Les performances de ces techniques pour le typage bactérien ont été évaluées dans plusieurs études (18, 19, 20, 21). La méthode SpectraCell RA® (River Diagnostics BV, Pays-Bas), utilisant la spectrométrie Raman, est aussi discriminante, dans certains cas, que les techniques de MLST ou PFGE (22-24). Mais en dépit de leurs caractéristiques intéressantes, les techniques de spectrométrie FT-IR et Raman ne sont mises en œuvre que dans quelques laboratoires de microbiologie très spécialisés, sans doute parce que l'épidémiologie reste en marge des activités des laboratoires cliniques.

En revanche, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS a été intégrée cette dernière décennie dans les laboratoires de routine de microbiologie clinique pour l'identification des microorganismes (25). Cet outil innovant, facile à utiliser, rapide, précis et rentable a révolutionné l'identification bactérienne. Idéalement, une méthode de typage applicable en routine nécessite une préparation minimale de l'échantillon, permet une analyse directe des données, et doit être rapide, automatisée et peu coûteuse. Ces exigences pourraient être remplies par la technologie MALDI-TOF MS qui représenterait alors une alternative aux techniques de phénotypage et de génotypage actuellement disponibles.

3. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

3.1. Historique

La caractérisation de microorganismes par spectrométrie de masse a été décrite dès 1975 (26). Au cours des années 1980, le développement de l'ionisation douce par MALDI-TOF a permis l'analyse de diverses molécules (27, 28). Par la suite, la technologie de type MALDI-TOF a été appliquée à l'identification rapide de bactéries (29-33). Une première base de données, permettant l'identification de bactéries par analyses des protéines de surfaces, a été référencée en 2004 (34). La fiabilité de l'identification au niveau de l'espèce a été ensuite améliorée par l'ionisation des protéines ribosomales, molécules plus stables que les protéines de surface (35). Diverses études ont comparé les performances de l'identification bactérienne par MALDI-TOF MS avec celles des méthodes conventionnelles, et résolu les discordances par séquençage de l'ADN codant l'ARN 16S ou du gène *rpoB* (36-40). Nous avons réalisé un rapide bilan des données de la littérature sur le sujet fin 2011 avant l'installation de 2 MALDI-TOF MS dans notre laboratoire (Tableau 3).

Les bonnes performances de la technique MALDI-TOF MS *versus* techniques conventionnelles en termes de pourcentage d'identification, de délais de rendu de résultats et de coûts par identification ont donc suscité l'engouement des microbiologistes. Ces résultats, ainsi que la relative simplicité d'utilisation des appareils de type MALDI-TOF MS ont permis leur utilisation dans la routine des laboratoires de microbiologie médicale depuis le début des années 2010 (25, 41, 42).

Tableau 3. Performances de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF *versus* identification conventionnelle pour l'identification bactérienne.

Auteur, année (référence)	Spectromètre	Méthode conventionnelle	Performances MALDI-TOF MS <i>versus</i> méthode conventionnelle		
			% d' identification	Délai d'obtention des résultats	Coût
Seng <i>et al.</i> , 2009 (43)	Autoflex (Bruker)	Galeries biochimiques (Vitek)	95,5 % vs. 97,7%	6 min / 24-48 h	2,44 € / 4,60 € à 13,85 €
Bessède <i>et al.</i> , 2011 (37)	Ultraflex (Bruker)	Galeries biochimiques (Phoenix, bioMérieux)	97,3 % vs. 93,2%	NE	NE
van Veen <i>et al.</i> , 2010 (38)	Microflex (Bruker)	Galeries biochimiques (Phoenix, bioMérieux)	92,2 % vs. 83,1%	NE	NE
Cherkaoui <i>et al.</i> , 2010 (39)	Microflex (Bruker)	Agglutination, coagulase, galeries biochimiques (bioMérieux et Vitek)	99,1 % vs. NE ¹	< 5 min / 24 h (Diminution du délai moyen de 8 h)	0,5 \$ / 0,20 à 10 \$ (économie moyenne par analyse de 5 \$)
Cherkaoui <i>et al.</i> , 2010 (39)	Fleximass (Shimadzu)		99,4 % vs. NE ¹		

NE : Non évalué

3.2.Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant d'identifier différents types de molécules ionisées par mesure de leur rapport masse/charge (m/z). La technologie de type MALDI-TOF requiert au préalable une étape de cristallisation, sur support inerte, de l'échantillon dans une matrice. Le complexe ainsi formé est bombardé par un faisceau laser émettant dans la zone d'absorption de la matrice. L'irradiation du mélange cristallin conduit à la désorption d'ions caractéristiques de l'échantillon (MALDI). Les molécules ionisées sont alors accélérées dans un champ électrique et dirigées vers un analyseur séparant les ions selon leur temps de vol (TOF). Ainsi, en fonction de leur rapport m/z , les ions atteignent plus ou moins rapidement le détecteur où ils sont alors transformés en un signal électrique qui sera amplifié puis analysé (Figure 3).

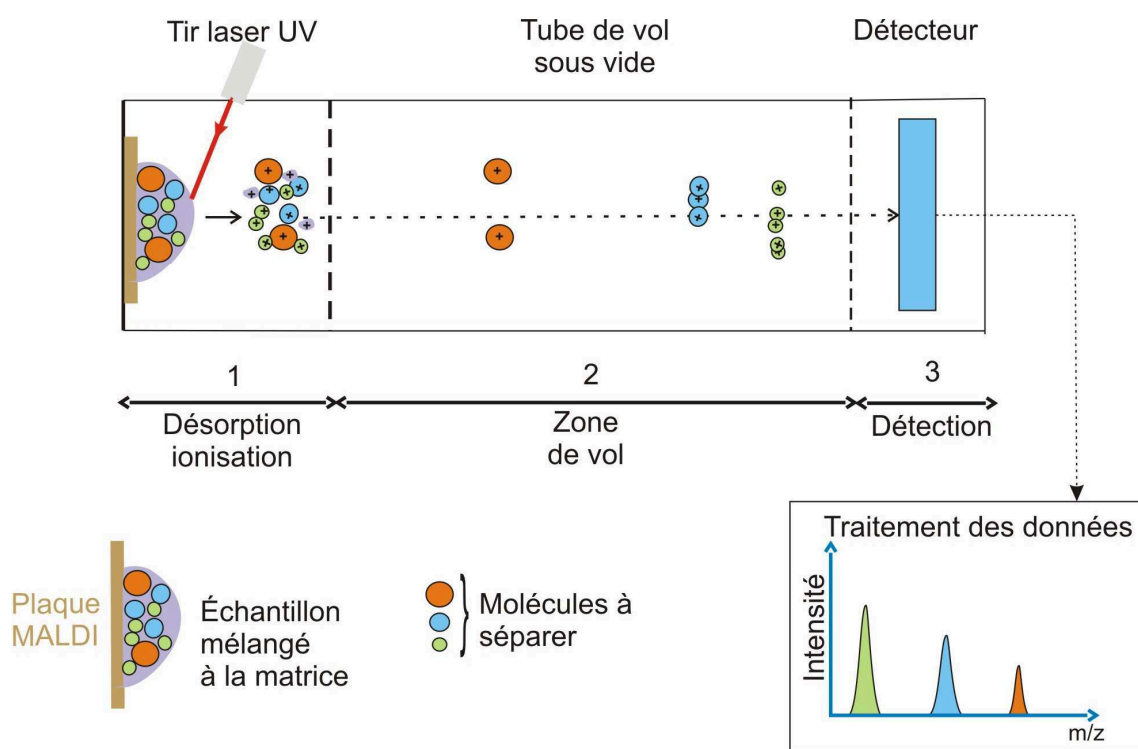


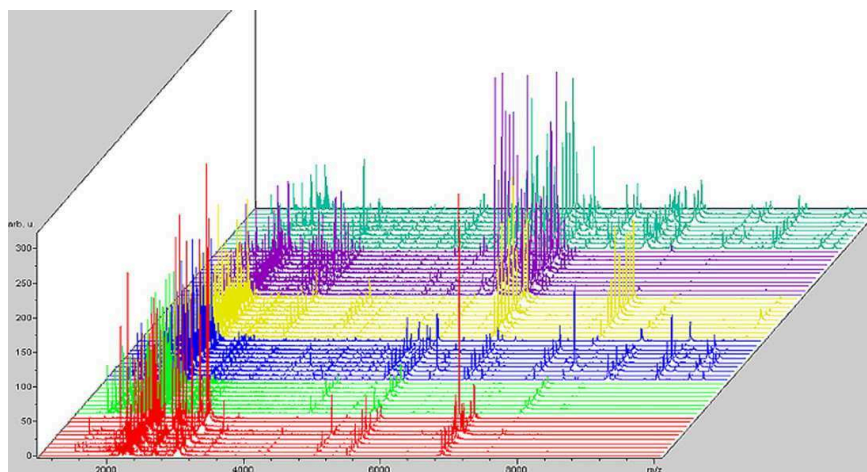
Figure 3. Principe de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (sur http://biotechnologie.ac-montpellier.fr/IMG/jpg/doc_eleve_identification_bacterienne_maldi-tof.jpg consulté le 4 juillet 2016).

3.3.Applications de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en microbiologie clinique

3.3.1. Identification des microorganismes

En microbiologie, la technique de type MALDI-TOF MS permet l'identification des microorganismes au niveau de l'espèce par analyse de leurs protéines totales (25). L'identification peut être réalisée à partir de microorganismes entiers (30). Pour les bactéries, cette technique est basée sur la génération de spectres de masse à partir de colonies entières (44). Leur spectre de masse est très majoritairement constitué de protéines ribosomales et membranaires. Un logiciel associé au spectromètre compare le spectre obtenu à des spectres référencés dans une base de données (Figure 4). Indépendamment de la méthode de préparation des échantillons, l'identification des espèces bactériennes est possible en quelques minutes (30, 44). Récemment, certains auteurs ont montré que la technique de type MALDI-TOF MS permettait également l'identification de sous-espèces bactériennes (45, 46). Par exemple, il est possible d'identifier les sérotypes de *Listeria monocytogenes*, de *Salmonella enterica* et les biotypes de *Yersinia enterocolitica* (47-49).

A.



B.

Valeur	Description	Symboles	Couleur
2.00 - 3.00	Identification avec une haute confiance	(+++)	vert
1.70 - 1.99	Identification avec une faible confiance	(+)	jaune
0.00 - 1.69	Aucune identification possible	(-)	rouge

Classement (Qualité)	Profil de référence	Score Valeur	Identifiant NCBI
1 (+++)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 THL	2.14	287
2 (+++)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8147_2 CHB	2.12	287
3 (+++)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071T_QC DSM	2.10	287
4 (+++)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 1117 DSM	2.09	287
5 (+++)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071T HAM	2.04	287
6 (+)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19955_1 CHB	1.89	287
7 (+)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 1128 DSM	1.85	287
8 (+)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LMG 8029 LMG	1.71	287
9 (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A07_08_Pudu FLR	1.62	287
10 (-)	<i>Pseudomonas jinjuensis</i> LMG 21316T HAM	1.48	198616

Figure 4. Principe de l'identification bactérienne par MALDI-TOF MS. A. Spectres de masse de 57 souches réparties en 6 espèces : *S. aureus* en rouge, *Streptococcus* groupe B en vert, *E. coli* en bleu, *K. pneumoniae* en jaune, *Salmonella enterica* serotype B en violet et *P. aeruginosa* en indigo (50). L'empreinte spectrale est variable entre les bactéries mais les spectres sont reproductibles et il existe des pics spécifiques d'espèce. B. Résultats d'identification obtenus avec le système MALDI-Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Les spectres sont comparés de manière automatique avec les spectres présents dans la banque de données puis une liste d'identifications plausibles associées à des scores d'appariement est obtenue pour chaque souche.

Jusqu'il y a une dizaine d'année, l'identification des microorganismes dans les laboratoires de microbiologie médicale reposait principalement sur les caractères phénotypiques : aspect des colonies, coloration de Gram, caractéristiques de croissance et caractères biochimiques (42). Ces derniers étaient déterminés manuellement à l'aide de galeries miniaturisées type Api (BioMérieux) ou grâce à des systèmes automatisés, par exemple les systèmes Vitek (BioMérieux) et WalkAway (MicroScan). Ces techniques identifient la plupart des microorganismes d'intérêt clinique. La biologie moléculaire (séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S, séquençage de gènes *rpoB*, *etc.*) identifie les espèces non reconnues par les techniques phénotypiques. Toutefois, les techniques conventionnelles nécessitent beaucoup de personnel et de réactifs et conduisent donc à un coût d'analyse important. Les techniques de biologie moléculaire ne peuvent, de par leur coût, être utilisées en première intention pour identifier les bactéries. En raison de ces bonnes performances, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a donc peu à peu remplacé les techniques conventionnelles dans les laboratoires de microbiologie médicale. En référence au Tableau 3 présenté plus haut, nous soulignerons que, selon les études, les résultats d'identification obtenus avec la spectrométrie de masse (92,2 % - 99,4 % d'identifications correctes) sont meilleurs que ceux des systèmes automatisés utilisant des méthodes conventionnelles (83,1 % - 97,7 %).

Bien que s'agissant d'appareils de haute technologie, l'utilisation des spectromètres de masse de type MALDI-TOF a été simplifiée par les constructeurs. Prélevées à partir des boîtes de culture, les colonies de microorganismes sont déposées sur une cible MALDI et recouvertes d'une solution de matrice HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic). L'identification peut également être réalisée directement à partir de certains types de prélèvements et notamment à partir des hémocultures positives ou d'urines (51-53). Les cibles MALDI sont ensuite chargées dans l'appareil et l'analyse est programmée. Les logiciels associés permettent le traitement informatique, comparant les spectres obtenus à ceux référencés dans des bases de données. Pour certains types de microorganismes non identifiables par dépôt direct, une étape préalable d'extraction des protéines augmente les performances d'identification. L'absence ou l'erreur d'identification sont attribuées le plus souvent à l'insuffisance des bases de données. Celles-ci s'étoffent chaque année de nouvelles espèces. Comme pour l'identification phénotypique traditionnelle, les techniques de biologie moléculaire résolvent les quelques échecs d'identification par MALDI-TOF MS.

3.3.2. Détection de la résistance bactérienne

En cas de syndrome infectieux, le clinicien propose un diagnostic étiologique après les examens de diagnostic microbiologique. Selon l'état clinique du patient, le clinicien peut soit attendre la documentation microbiologique avant de prescrire le traitement anti-infectieux, soit initier un traitement anti-infectieux probabiliste. La communication des résultats à chaque étape de l'analyse (identification puis sensibilité aux anti-infectieux) permet au clinicien d'affiner ses options thérapeutiques en les adaptant à l'agent responsable du syndrome infectieux. On part ainsi d'un traitement empirique probabiliste (prenant en compte les données épidémiologiques disponibles) mis en place aussitôt après la réalisation des prélèvements vers un traitement adapté à l'agent infectieux ou l'arrêt de traitement. Mais ce passage se fait aujourd'hui le plus souvent en 72 heures, délai au-delà duquel les sociétés savantes recommandent la réévaluation systématique du traitement anti-infectieux. Un diagnostic étiologique plus rapide peut permettre d'une part de préserver le pronostic vital dans des situations infectieuses graves et d'autre part d'épargner les antibiotiques à large spectre. L'analyse microbiologique de l'échantillon prélevé chez le patient repose donc sur l'identification de l'agent pathogène et la détermination de sa résistance aux agents anti-infectieux. La durée de ces étapes dépend des techniques microbiologiques disponibles dans le laboratoire. Si l'identification bactérienne est maintenant très rapide grâce à la technique MALDI-TOF MS (1 h après une hémoculture positive, (51, 52), la détermination des profils de sensibilité bactérienne demande souvent au moins 11 h, avec un rendu au clinicien le lendemain, retardant ainsi l'adaptation du traitement antibiotique ciblé (54).

La technique MALDI-TOF MS a récemment été utilisée pour détecter la résistance bactérienne aux antibiotiques. Deux approches ont été testées : soit la détection de mécanismes enzymatiques de résistance par production d'enzymes inactivatrices d'antibiotiques, soit la détection de la résistance à un antibiotique en suivant la croissance bactérienne.

3.3.2.1. Détection de mécanismes enzymatiques de résistance

Ainsi, plusieurs études ont récemment montré que la résistance aux β -lactamines et aux carbapénèmes par production de β -lactamases et de carbapénémases, respectivement, pouvait être détectée par MALDI-TOF MS en moins de 3 h en suivant l'intensité des pics de l'antibiotique et de son/ses métabolite(s) (55, 56, 57, 58). Nous avons proposé un protocole permettant de détecter rapidement les entérobactéries productrices de la carbapénémase OXA-

48. La présence de cette enzyme est détectée en 1 h en suivant l'intensité des pics de l'imipénème et de son métabolite (59). La société Bruker a récemment mis à disposition le nouveau module *MALDI Biotyper STAR-BL®* au laboratoire d'Hygiène du CHRU de Besançon. Ce module permet de détecter les résistances bactériennes liées aux activités β -lactamasiques en mesurant le taux d'hydrolyse des antibiotiques de la famille des β -lactamines, de façon automatisée, standardisée et rapide. Ainsi, en suivant le protocole proposé par le fournisseur, il est possible de détecter la présence de carbapénémases chez les entérobactéries après 30 min d'incubation en présence d'imipénème. Cependant, cette technique n'est applicable qu'à la détection de certaines enzymes dégradant les antibiotiques. Or, la plupart des résistances bactériennes reposent sur des mécanismes enzymatiques dont la recherche par MALDI-TOF MS n'est pas validée ou ne reposent pas sur l'hydrolyse des antibiotiques (impermeabilité, mutations des cibles, modification de l'antibiotique, efflux actifs).

3.3.2.2. Détection de la résistance à un antibiotique en suivant la croissance bactérienne.

Il est possible de suivre la croissance bactérienne grâce à des acides aminés radiomarqués présents dans le milieu de culture. En présence d'un antibiotique, seule la souche résistante incorpore les acides aminés radiomarqués (60). Cependant, cette technique appelée MS-RESIST (*MALDI-TOF MS-based resistance test with stable isotopes*) est difficilement applicable en routine, l'incorporation des acides aminés radiomarqués dans le milieu de culture compliquant la mise en œuvre.

Une étude préliminaire réalisée par Lange *et al.* a montré que la sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* au mérépénème pouvait être déterminée en 1 heure avec la nouvelle technologie MS-ASTRA (*MALDI Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay*) (61). Le principe de cette méthode est simple : les croissances bactériennes avec et sans l'antibiotique à tester dans le milieu de culture sont comparées en présence d'un témoin de calibration. Nous avons mis au point, en partenariat avec la société Bruker, la détection de la résistance de *E. coli* au céfotaxime et à l'amoxicilline par MALDI-TOF MS directement à partir d'hémocultures positives. Dans ces conditions, la technique MALDI-TOF MS associée au protocole MS-ASTRA permet d'obtenir des résultats de résistance directement à partir des flacons d'hémoculture positifs dans un délai de 3,5 h. Notre but est de pouvoir informer le clinicien,

dès que l'hémoculture est positive, simultanément de l'espèce bactérienne responsable de la bactériémie et des options thérapeutiques.

La technique MS-ASTRA de détection rapide de la résistance présente un intérêt important puisqu'elle permet de s'affranchir du mécanisme de résistance en cause. Elle est donc potentiellement applicable à tous les pathogènes et à tous les antibiotiques.

3.3.3. Typage bactérien

Comme indiqué précédemment, la diffusion des bactéries multirésistantes représente un problème majeur de santé publique et nécessite la mise en place de mesures de contrôle. Le typage est un élément essentiel de ces mesures, permettant d'identifier le début des épidémies mais aussi d'apporter des indications sur les modalités de transmission des pathogènes et sur les clones circulants. Diverses techniques de typage, notamment la technique de PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) et la technique de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) sont largement reconnues mais restent longues et coûteuses. Les techniques de séquençage haut débit sont prometteuses mais restent elles aussi, pour l'instant, longues et coûteuses. Hors, de manière à pouvoir réagir rapidement lors de la suspicion d'une épidémie, il est intéressant de pouvoir disposer en routine d'une technique de typage permettant une analyse rapide et à moindre coût, avant une analyse plus discriminante mais souvent plus longue. Afin d'évaluer la faisabilité du typage par MALDI-TOF MS, nous avons d'abord évalué la diversité génomique des 3 principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales (*E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*). Cette diversité génomique est plus ou moins importante, laissant envisager des variations plus ou moins importantes dans les spectres de masse pouvant être exploitées pour le typage rapide de ces espèces par MALDI-TOF MS (Figure 5).

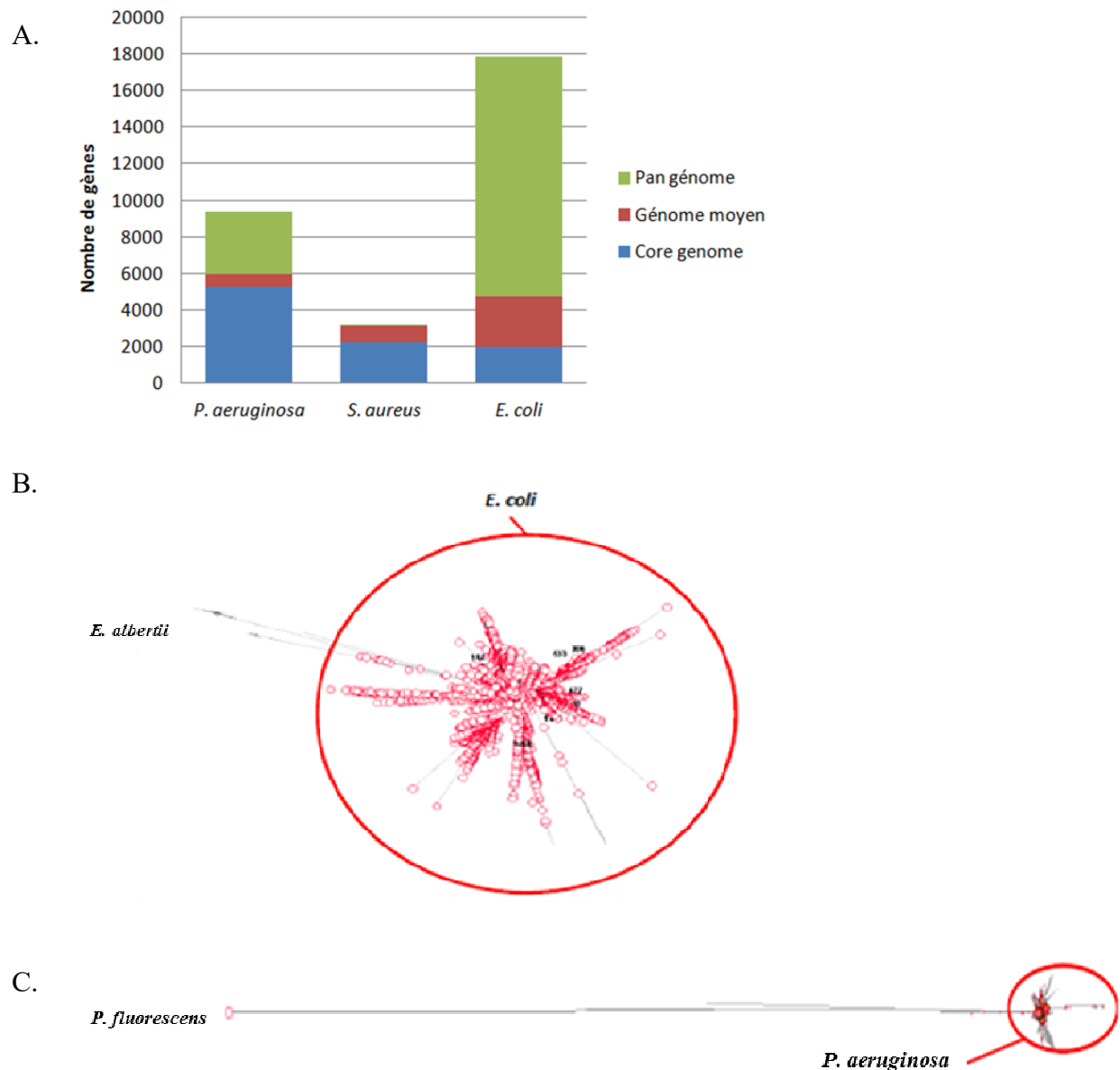


Figure 5. Diversités génomique et clonale des 3 principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales : *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. A. La variabilité d'une espèce est liée à la proportion de son core génome par rapport à son génome moyen : l'espèce *E. coli* présente une plus grande diversité génomique que les espèces *P. aeruginosa* et *S. aureus* (62-64). B. Arbre de maximum de vraisemblance de tous les ST connues (n=4192) de *E. coli*. L'arbre est basé sur l'alignement des séquences concaténées des 7 gènes utilisés en MLST (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) formant une séquence artificielle de 3 423 paires de bases (D. Hocquet, données personnelles). *E. coli* est une espèce avec une grande diversité clonale. C. Arbre de maximum de vraisemblance de tous les ST connues (n=1595) de *P. aeruginosa*. L'arbre est basé sur l'alignement des séquences concaténées des 7 gènes utilisés en MLST (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* et *trpE*) formant une séquence artificielle de 2 882 paires de bases (65). *P. aeruginosa* est une espèce avec une faible diversité clonale : même si des clones peuvent être définis, ils sont tous très proches.

3.3.3.1. Intérêt du typage rapide par MALDI-TOF MS pour les principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales

3.3.3.1.1. *Escherichia coli*

E. coli, bacille à Gram négatif aéro-anaérobie appartenant à la famille des Entérobactéries, est une bactérie commensale du tube digestif de l'homme. Il s'agit de l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie (10^6 à 10^8 bactéries par gramme de selles). *E. coli* est également l'espèce commensale dominante de la flore intestinale aérobie des mammifères et est largement présente dans les plantes ou l'environnement aquatique (66). La colonisation intestinale est constamment renouvelée, notamment par la consommation d'eau et d'aliments (viandes, poissons, légumes). Bien que la plupart des souches ne soient pas pathogènes, *E. coli* est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections bactériennes humaines, principalement dans les infections urinaires, les bactériémies et les infections intestinales, qu'elles soient d'origine communautaire ou hospitalière. Lors de la dernière enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, cette espèce, à l'origine de 26% des infections nosocomiales documentées, était la plus fréquente (43).

Cette espèce peut être classée en différents pathotypes responsables de différentes manifestations cliniques chez l'homme. Cinq pathotypes principaux sont à l'origine des infections digestives : (i) *E. coli* entéropathogène (EPEC), (ii) *E. coli* entérohémorragique (EHEC), (iii) *E. coli* entérotoxigène (ETEC), (iv) *E. coli* entéroinvasif (EIEC) et (v) *E. coli* entéroaggrégatif (EAEC) (67). Trois autres pathotypes sont à l'origine des infections extraintestinales : (i) *E. coli* uropathogène (UPEC) responsable d'infections de l'arbre urinaire, (ii) les souches de *E. coli* responsables de méningite néonatale (MENEC) et (iii) les souches de *E. coli* responsables de sepsis. L'arbre phylogénétique, construit à partir des séquences nucléotidiques des gènes MLST, distingue 4 phylogroupes principaux appelés A, B1, B2 et D. Très majoritairement, les souches commensales appartiennent aux phylogroupes A et B1. Les souches responsables d'infections extra-intestinales appartiennent au phylogroupe B2 (le plus virulent parmi les souches extra-intestinales) et, dans une moindre mesure, au phylogroupe D (68, 69, 70, 71). Le nombre croissant de données fournies par la MLST et le séquençage du génome de *E. coli* a permis d'affiner notre compréhension de la structure de cette espèce en définissant les phylogroupes mineurs C, E et F. Les souches appartenant aux phylogroupes C et F sont proches des souches appartenant aux phylogroupes B1 et B2, respectivement. Les souches du phylogroupe E représentent un groupe à part (72, 73). Le classement rapide des souches dans l'un des 4 phylogroupes principaux (A, B1, B2 et

D) repose sur la détection par PCR des gènes cibles *chuA*, *yjaA* et d'un fragment d'ADN du gène d'une estérase lipase (74, 75) (Figure 6). Cette technique est largement utilisée dans les laboratoires de recherche mais reste difficilement applicable en routine dans les laboratoires cliniques.

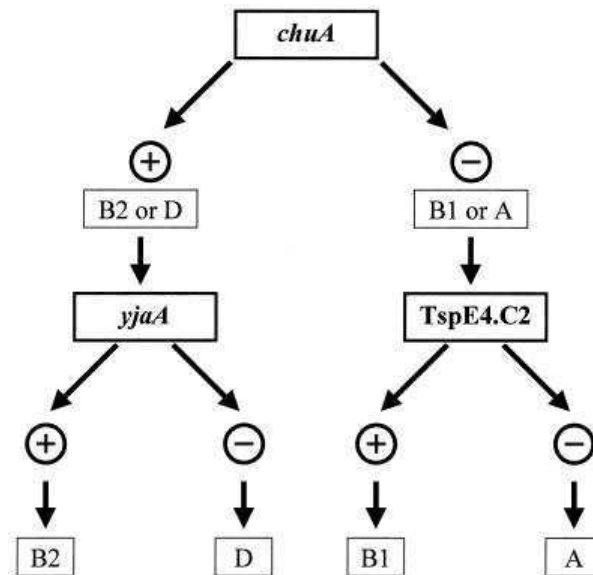


Figure 6. Arbre de détermination du groupe phylogénétique d'une souche de *E. coli* par amplification par PCR des gènes *chuA* et *yjaA* et du fragment d'ADN TSPE4. C2, d'après Clermont *et al.*(74)

Le typage de *E. coli* par MLST est basé sur l'étude des séquences nucléotidiques de sept gènes de ménage et permet l'identification de séquences types (ST) (76). La structure hétérogène de l'espèce est confirmée par le séquençage du génome entier : *E. coli* contient en moyenne 4 700 gènes, mais seulement 2 000 d'entre eux sont partagés par toutes les souches (ils définissent le *core genome*) (Figure 5A) (62, 77). Ceci reflète le niveau élevé de plasticité du génome (78). Cette grande diversité génomique laisse envisager de possibles variations dans les spectres de masse des souches de *E. coli* et ainsi permettre le typage rapide de cette espèce par MALDI-TOF MS. De nombreuses études ont été menées dans ce sens et sont détaillées dans le Tableau 4.

Tableau 4. Typage de *E. coli* par MALDI-TOF MS.

Auteur (Année) (Référence)	Nombre de souches testées	Technique de typage de référence	Préparation des échantillons (milieu de culture solide ²)	Matrice ¹	Spectromètre de masse de type MALDI-TOF ³	<i>m/z</i> (x1 000)	Logiciel utilisé pour l'analyse des données ⁴	Lignée identifiée ou résultat principal
Mazzeo <i>et al.</i> (2006) (79)	25	Sérotypage	Extraction spécifique (NP ⁵)	HCCA	Voyager DE PRO	2,5-15	Data Explorer	O157:H7
Siegrist <i>et al.</i> (2007) (80)	15	Rep-PCR	Transfert direct (NA)	SA	Reflex IV	NP ⁵	Diversity Database, FlexAnalysis	Souches aviaires
Karger <i>et al.</i> (2011) (81)	94	Sérotypage, RFLP	Extraction éthanol- acide formique (NP ⁵)	HCCA	Ultraflex I	2,5-15	MALDI BioTyper, R	O165:H25, O26:H11/H32, O156:H25
Clark <i>et al.</i> (2013) (82)	136	<i>Pathotyping</i>	Extraction éthanol- acide formique (MacConkey)	HCCA	Autoflex III Smartbeam	2-20	MALDI BioTyper, Bionumerics, Programme “maison”	Principaux pathotypes (EHEC, STEC, EPEC, ETEC, EAEC, UPEC)
Christner <i>et al.</i> (2014) (83)	294	PCR spécifique O104 :H4 (84)	Extraction éthanol- acide formique (CB)	HCCA	Microflex LT	2-20	FlexAnalysis, MALDIquant package for R, MALDI BioTyper	Souches épidémiques O104H4
Novais <i>et al.</i> (2014) (85)	73	MLST, PFGE	Extraction éthanol- acide formique (LB)	HCCA	Microflex LT	2-20	FlexAnalysis, MALDI BioTyper, PLS Toolbox for Matlab	ST131, ST69, ST393, ST405 ST131 et non-ST131 dans le phylogroupe B2
Sauget <i>et al.</i> (2014) (86)	656	PCR Multiplex phylogroupes (75)	Extraction éthanol- acide formique, transfert direct (MH)	HCCA	Microflex LT	2-20	FlexAnalysis, MALDI BioTyper, ClinProTools	Phylogroupe B2
Matsumura <i>et al.</i> (2014) (87)	149	MLST	Extraction éthanol- acide formique (SB)	HCCA	Microflex LT	2-20	MALDI BioTyper, ClinProTools, FlexAnalysis, Stata	ST131
Nakamura <i>et al.</i> (2015) (88)	125	PCR Triplex phylogroupes (74), MLST	Extraction éthanol- acide formique (CB)	NP ⁵	NP ⁵	2-20	MALDI BioTyper, ClinProTools FlexAnalysis	ST131
Lafolie <i>et al.</i> (2015) (89)	109	MLST	Extraction éthanol- acide formique, transfert direct (MH)	HCCA	Microflex LT	2-20	FlexAnalysis, ClinProTools	ST131
Matsumura <i>et al.</i> (2015) (90)	149	MLST	Extraction éthanol- acide formique (SB)	HCCA	VITEK MS Plus	2-20	SARAMIS, Stata	ST131
Egli <i>et al.</i>	8	PFGE	Extraction éthanol-	NP ⁵	Microflex LT	2-20	MALDI BioTyper ,	Epidémie locale de souches

(2015) (91)			acide formique (B)				FlexAnalysis	de <i>E. coli</i> BLSE
Chui <i>et al.</i> (2015) (92)	146	Sérotypage	Préparation flagellaire	HCCA DHB	Autoflex III Smartbeam	0.7-4	BioTools	Typage rapide de l'antigène H
Veenemans <i>et al.</i> (2016) (93)	52	AFLP(94), PCR multiplex phylogroupes(75), PCR temps réel ST131(95)	Transfert direct (C)	HCCA	VITEK MS	2-20	SARAMIS database, PAST3	Phylogroupe B2, ST131 et non-ST131 dans le phylogroupe B2

¹ **SA** : *sinapinic acid*, **HCCA** : *alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid*, **DHB** : *2,5-dihydroxybenzoic acid*

² **MH** : Mueller-Hinton, **SB** : *Sheep Blood*, **C** : Columbia, **CB** : *Columbia Blood*, **NA** : *Nutrient Agar*, **LB** : *Luria-Bertani Agar*, **B** : *Blood*

³ Gammas Microflex, Autoflex, Ultraflex, Reflex (Bruker Daltonik), VITEK MS[®] Mass Spectrometer (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), Voyager DE PRO[®] Mass Spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.)

⁴ ClinProTools (Bruker Daltonik), FlexAnalysis (Bruker Daltonik); MALDI BioTyper (Bruker Daltonik), SARAMIS (AnagnosTec, Potsdam-Golm, Germany); Diversity (Bio-Rad, Hercules, CA), R (<http://www.r-project.org>), Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), Data Explorer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), PLS Toolbox for Matlab (Eigenvector Research, Manson, WA, USA), Stata (StataCorp, College Station, TX, USA), BioTools (Bruker Daltonics), MALDIquant package for R (<http://strimmerlab.org/software/malDIquant/>), PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/doc1.html>)

⁵ **NP** : Non Précisé

3.3.3.1.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus, cocci à Gram positif aérobie-anaérobie appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*, est une bactérie ubiquitaire de la flore commensale de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud. Chez l'homme, *S. aureus* est notamment retrouvé sur la peau, sur les muqueuses et dans l'intestin. Cette bactérie est présente dans le tractus respiratoire supérieur et en particulier dans les fosses nasales : chez l'adulte 30% des individus hébergent *S. aureus* de façon permanente, 50% de façon intermittente et 20% ne sont jamais porteurs (96). Ce portage joue un rôle clef dans l'épidémiologie et la pathogénie des infections à *S. aureus* (97). Il est associé à un risque accru d'infections (98-100). Les infections chez l'homme sont très variées en termes de diversité et de gravité. D'un point de vue physiopathologique, elles peuvent être classées en : infections suppuratives (cutanéomuqueuses ou viscérales) ou en syndromes toxiques. Les infections peuvent se généraliser lors d'une bactériémie ou se compliquer par des localisations secondaires pouvant alors engager le pronostic vital. La transmission humaine se fait principalement par contact direct (manuportage) et plus rarement à partir d'une source environnementale (vêtements, draps, matériel médical...).

La structure génétique de la population de *S. aureus* est hautement clonale. Au niveau mondial, chez *S. aureus* sensible à la méthicilline (SASM) 11 clones prédominent : CC1, CC5, CC8, CC9, CC12, CC15, CC22, CC25, CC30, CC45, et CC51, alors que chez *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) seulement 5 clones prédominent : CC5, CC8, CC22, CC30, CC45 (101) (Figure 7). En Europe, les mêmes clones sont globalement retrouvés (96). Les souches CC8 et CC30 sont particulièrement épidémiogènes (101). Les souches de SARM USA300, épidémiques en Amérique du Nord et productrices d'une toxine de Panton et Valentine (PVL), appartiennent au CC8 (101, 102). Nous noterons également l'existence d'un clone émergent, CC398, (à la fois SARM et SASM) associé à une mortalité élevée des patients fragilisés (103).

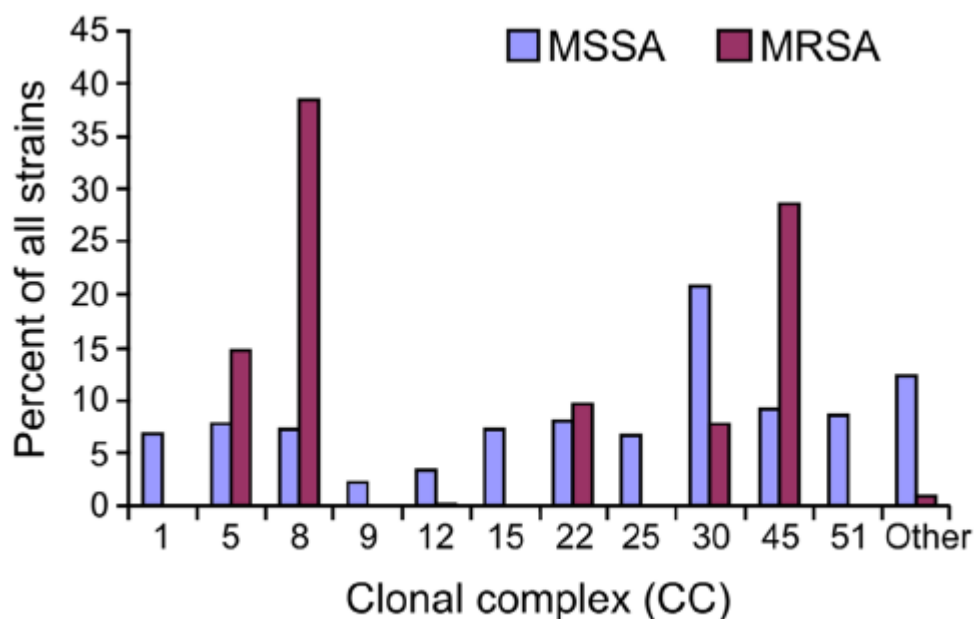


Figure 7. Répartition en complexes clonaux de souches de *S. aureus* sensibles (MSSA) et résistantes à la méthicilline (MRSA) provenant de 6 continents différents, d'après Chambers *et al.* (101).

Les infections causées par des souches résistantes aux antibiotiques se produisent souvent lors de vagues épidémiques initiées par un ou quelques clones « à succès ». Des épidémies communautaires à SARM ont été rapportées dans le monde entier et les souches de SARM sont maintenant épidémiques dans la communauté aux États-Unis (104). En France, lors de la dernière enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, cette espèce, à l'origine de 15,9 % des infections nosocomiales documentées, était la deuxième plus fréquente (43). L'identification rapide des clones dominants de *S. aureus* impliqués dans des infections est donc un enjeu majeur pour comprendre la dynamique des populations mais aussi pour mettre en place rapidement les mesures d'hygiène lors d'épidémies. Plusieurs techniques de typage ont été développées et appliquées à l'espèce *S. aureus*. Elles ont d'abord été basées sur des méthodes phénotypiques. L'antibiogramme reste très utilisé et permet une première approche, notamment pour l'identification des *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM). Aujourd'hui les techniques génotypiques sont largement utilisées : MLST, PFGE et typage de la protéine Staphylococcique A ou *spa typing* (105). Mais comme déjà indiqué précédemment ces techniques largement reconnues restent longues et coûteuses.

La technique de type MALDI-TOF MS a été évaluée pour le typage rapide de *S. aureus*. D'une part, différentes équipes ont cherché à identifier des pics permettant de différencier

rapidement les souches SASM des souches SARM (32, 106-110). Une liste de pics associés aux souches SASM ou SARM a été établie par Szabados *et al.* (109), sans que des pics biomarqueurs spécifiques d'un groupe ne soit clairement mis en évidence (Tableau 5).

Tableau 5. Les différentes études ayant évaluées la technique MALDI-TOF MS pour différencier les souches SASM et SARM, d'après Szabados *et al.* (109).

Study	Sample number	Sample preparation	Technology	Instrument	Protein treatment	Data acquisition	Statistical method/ model	Peak evaluation	MRSA falsely identified	Peaks associated with MRSA (Da)	Peaks associated with MSSA (Da)
Edward-Jones et al	14	Formic acid	Matrix-assisted	Kratos analytical	CMBT (matrix)	500 Da–10,000 Da	Dice coefficient >70 similarity, manually	Presence of peaks	NA	511, 563, 640, 743, 767, 773, 854, 891, 999, 1026, 1140, 1165, 1229, 2127	2548.2647
Du et al	76	None	Matrix-assisted	Micromass Ltd	CMBT and CHCA (matrix)	500 Da–10,000 Da	Cluster analysis	Presence of peaks	7 out of 43	1834, 1874, 2413, 2453, 2490	2093, 2308, 2345, 2547, 2585, 2686, 2723
Shah et al	99	Lysis by urea, Lysostaphin, mechanical disruption	Surface-enhanced	Ciphergen Biosystems	Weak cation exchange array (CM10)	3000 Da–30,000 Da	Artificial network analysis	Peak intensity	26 out of 50	5709, 7694, 15,308, 18,896	3081, 5893, 9580
Majcherczyk et al	4	None	Matrix-assisted	Micromass Ltd	CMBT (matrix)	NA	Manually	Presence of peaks	NA	peaks around 2450	NA
Sun et al	34	NA	NA	NA	NA	NA	Cluster analysis	NA	None	NA	NA

CMBT: 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole, CHCA: α -cyano-4-hydrocinnamic acid, MRSA: methicillin-resistant *S. aureus*, MSSA: methicillin-susceptible *S. aureus*.

Josten *et al.* ont démontré qu'une protéine codée par un gène situé sur une cassette chromosomique staphylococcique (SCCmec, portant le gène pour la résistance à la méthicilline) pouvait être utilisée comme biomarqueur des SARM (111). Même si ces résultats sont encourageants, ils doivent être confirmés par des études complémentaires. D'autre part, plusieurs études récentes ont évalué la technique de type MALDI-TOF MS pour le typage rapide de clones particuliers de *S. aureus* en utilisant différentes approches (Tableau 6).

Tableau 6. Typage de *S. aureus* par MALDI-TOF MS.

Auteur (Année) (Référence)	Nombre de souches testées	Technique de typage de référence	Préparation des échantillons (milieu de culture solide ¹)	Matrice ²	Spectromètre de masse de type MALDI-TOF ³	<i>m/z</i> (x1 000)	Logiciel utilisé pour l'analyse des données ⁴	Lignée identifiée ou résultat principal
Schlebusch <i>et al.</i> (2010) (112)	6	SNP, présence ou absence des gènes <i>pvl</i> , <i>cna</i> , <i>sdrE</i>	NP ⁵	NP ⁵	Ultraflex III	NP ⁵	MALDI BioTyper	Epidémie locale MRSA CC30
Wolters <i>et al.</i> (2011) (113)	85	<i>spa typing</i> , MLST	Extraction éthanol-acide formique (CB)	HCCA	Microflex LT	2-20	MALDI BioTyper	CC5, CC8, CC22, CC30, CC45
Boggs <i>et al.</i> (2012) (114)	348	PFGE	Extraction éthanol-acide formique (TS)	HCCA	UltraFlex III	2-13	ClinProTools	USA300 (ST8)
Josten <i>et al.</i> (2013) (115)	401	Séquençage de mutants, PFGE	Ethanol-formic acid extraction (CB)	HCCA	Biflex III	NP ⁵	FlexAnalysis, AureusDB database, Swiss-Prot database	CC1, CC5, CC8, CC22, CC30, CC45
Ueda <i>et al.</i> (2014) (116)	82	PFGE, séquençage des séquences phagiques (POT)	Extraction éthanol-acide formique (SB)	NP ⁵	Microflex LT	2-20	FlexAnalysis, MALDI BioTyper, ClinProTools	Typage de clones avec une précision équivalente à PFGE/POT
Lasch <i>et al.</i> (2014) (117)	59	<i>spa typing</i> , MLST, PFGE	Extraction spécifique (CaA)	HCCA	Autoflex I	2-20	Matlab based-software MicrobeMS	Pas d'identification claire de pics biomarkers
Zhang <i>et al.</i> (2015) (118)	290	MLST	Extraction éthanol-acide formique (CB)	HCCA	Microflex LT	1.960- 20.137	ClinProTools, MALDI BioTyper, FlexAnalysis	ST45, ST239
Ostergaard <i>et al.</i> (2015) (119)	600	<i>spa typing</i> , MLST	Transfert direct , extraction éthanol-acide formique (DB)	HCCA	Microflex LT	2-20	FlexAnalysis	26 groupes MALDI-TOF pour 89 <i>spa</i> types associés avec 16 CC
Camoez <i>et al.</i> (2016) (120)	95	MLST	Extraction éthanol-acide formique (CSB)	HCCA	Microflex LT	2-20	MALDI BioTyper, ClinProTools	CC5, CC8, CC22, CC398
Sauget <i>et al.</i> (2016) (121)	626	MLST, PCR spécifique CC398	Extraction éthanol-acide formique (MH)	HCCA	Microflex LT	2-20	ClinProTools	CC398

¹ **MH** : Mueller-Hinton, **SB** : Sheep Blood, **CB** : Columbia Blood, **TS** : Trypticase soja, **CaA** : Caso Agar, **DB** : Danish blood, **CSB** Columbia Sheep Blood

² **HCCA** : *alpha*-cyano-4-hydroxycinnamic acid

³ Gammas Microflex, Autoflex, Ultraflex, Biflex (Bruker Daltonik)

⁴ ClinProTools (Bruker Daltonik), FlexAnalysis (Bruker Daltonik), MALDI BioTyper (Bruker Daltonik), AureusDB database (<http://aureusdb.biologie.uni-greifswald.de/>), Swiss-Prot database using the TagIdent tool (<http://web.expasy.org/tagident/>), Matlab-based software MicrobeMS (<http://www.mara-ms.com>)

⁵ **NP** : Non Précisé

3.3.3.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif, non fermentant aérobie strict. Il s'agit d'une espèce ubiquitaire capable de s'adapter à de nombreux environnements, notamment retrouvée à l'état saprophyte dans les sols humides, sur les végétaux et surtout dans les eaux douces, usées et marines (122). Le bacille pyocyanique est considéré comme un pathogène opportuniste impliqué fréquemment dans les infections nosocomiales en particulier chez les patients immunodéprimés et chez les patients atteints de mucoviscidose. Lors de la dernière enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales, cette espèce était à l'origine de 8,4 % des infections nosocomiales documentées, la plaçant ainsi au 3^{ème} rang des espèces isolées derrière *E. coli* et *S. aureus*. (43). Plusieurs études ont identifié l'environnement, notamment les points d'eau (siphons, lavabos) et le matériel hospitalier (endoscopes, nébulisateurs), comme source d'épidémie. Le personnel hospitalier ainsi que les patients peuvent également être vecteur potentiel de *P. aeruginosa* (123-125). Cette bactérie joue un rôle majeur dans les infections broncho-pulmonaires et à un degré moindre dans les infections urinaires, les infections du site opératoire et les bactériémies. La résistance naturelle de *P. aeruginosa* aux β -lactamines est importante, liée à la présence d'une céphalosporinase inductible par les amino-pénicillines et les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération, couplée à une imperméabilité plus ou moins marquée et d'un système d'efflux actif constitutif (126). *P. aeruginosa* possède également une grande capacité à développer des mécanismes de résistances à de nombreux antibiotiques, ce qui fait de ce germe un pathogène difficile à traiter. L'acquisition des mécanismes de résistance peut se faire à partir de son matériel génétique propre : surproduction de la céphalosporinase constitutive AmpC, mécanismes d'imperméabilité membranaire, surexpression des systèmes d'efflux ou par acquisition de gènes transférables (127). La préoccupation actuelle repose sur l'émergence et la diffusion de souches multi-résistantes (MDR) voire toto-résistantes (XDR). Par exemple, les souches porteuses de β -lactamases à spectre élargi (BLSE), d'oxacillinases à spectre élargi (ES-OXA) ou de carbapénémases, dont les plus répandues sont les métallo- β -lactamases (MBL), représentent une menace.

Les techniques de typage moléculaire reconnues ont été appliquées à l'espèce *P. aeruginosa*, notamment les techniques de MLST (128) et de PFGE (8) afin de mieux connaître l'épidémiologie de ce pathogène, de mettre en évidence les foyers épidémiques et de tenter de les contrôler. De nombreuses études concordantes montrent que, globalement, l'épidémiologie de *P. aeruginosa* est non clonale. Cependant, les souches hospitalières multi-

et toto-résistantes appartiennent majoritairement à quelques clones. Une étude sur des souches MDR isolées de différents hôpitaux de l'Est de la France a montré que plus de 60% de ces souches appartenaient à un ST à distribution internationale (ST111, ST175, ST235) (129). Une étude réalisée sur des souches provenant de cinq pays du bassin méditerranéen a montré que les souches appartenant au complexe clonal CC235 sont très souvent associées à la production de β -lactamases (130). Une étude similaire a été réalisée dans un hôpital public en Espagne montrant que les ST les plus fréquemment retrouvés sont les ST175, ST235 et ST253 (131). La majorité des souches XDR et MDR sont des souches ST175 et ST235. Les souches ST175, retrouvées dans des épidémies en Europe, Asie et Amérique du Sud, sont très souvent associées à des mécanismes de résistances type BLSE ou MBL, particulièrement à VIM-2 (132). Les souches ST235 ont été très décrites partout dans le monde, associées aux enzymes de types VIM mais également à d'autres β -lactamases (IMP, OXA, PER...) (133). En Asie, plus particulièrement en Malaisie, au Sri-Lanka et en Corée, toutes les souches porteuses de métallob- β -lactamases (MBL) sont des ST235 (134). Des souches productrices de métallob- β -lactamases ont également été identifiées chez un autre clone à diffusion intercontinentale : le clone ST395, indiquant que sa surveillance est nécessaire (135). Il existe donc une diffusion internationale de certains clones, très souvent multi-résistants, à caractère épidémique. Finalement, la structure de la population de *P. aeruginosa* peut être qualifiée de « non clonale-épidémique ». La reconnaissance précoce de ces ST 'à haut risque' isolés de patients par la technique de type MALDI-TOF permettrait de réagir rapidement lors de suspicion d'épidémies et de mettre en place rapidement les mesures d'hygiène nécessaires à la prévention de leur diffusion. Suivant les données de la littérature, aucune étude d'application de la technique de type MALDI-TOF MS pour le typage de *P. aeruginosa* n'a encore été réalisée.

3.3.3.2. Intérêt du typage rapide par MALDI-TOF MS pour d'autres espèces bactériennes

Le tableau 7 référence les études de typage par MALDI-TOF MS appliquées à d'autres espèces bactériennes. Ces données ne seront pas détaillées ici.

Tableau 7. Typage de différentes espèces bactériennes par MALDI-TOF MS.

Auteur (Année) (Référence)	Espèce	Nombre de souches testées	Technique de typage de référence	Préparation des échantillons (milieu de culture solide ¹)	Matrice ²	Spectromètre de masse de type MALDI-TOF ³	<i>m/z</i> (x1 000)	Logiciel utilisé pour l'analyse des données ⁴	Lignée identifiée ou résultat principal
Scotta <i>et al.</i> (2013) (136)	<i>P. stutzeri</i>	172	Séquençage du gène <i>rpoD</i>	Protocole spécifique (LB)	HCCA	AXIMA Confidence	3-20	PermutMatrix	Génomovars
Mencacci <i>et al.</i> (2013) (137)	<i>A. baumannii</i>	35	Rep-PCR	Extraction éthanol-acide formique (MacConkey)	HCCA	Microflex LT	2-20	MALDI BioTyper	Souches d'une épidémie nosocomiale
Sousa <i>et al.</i> (2015) (138)	<i>A. baumannii</i>	96	AFLP, MLST, PFGE	Extraction éthanol-acide formique (MH)	HCCA	Microflex III	2-20	Matlab-based software MicrobeMS	Pas de résultat par MALDI-TOF MS
Sachse <i>et al.</i> (2014) (139)	<i>K. pneumoniae</i>	17	MLST, RAPD	Transfert direct (CSB)	HCCA	AXIMA Confidence	3-20	SARAMIS, Shimadzu Biotech Launchpad	ST101
Berrazeg <i>et al.</i> (2013) (140)	<i>K. pneumoniae</i>	535	MLST	NP ⁵	HCCA	Autoflex	NP ⁵	MALDI BioTyper	Clusters associés à des zones géographiques
Lartigue <i>et al.</i> (2011) (141)	<i>S. agalactiae</i>	197	PCR, sérotypage, MLST	Extraction éthanol-acide formique (SB)	HCCA	Ultraflex TOF/TOF III	2-20	FlexAnalysis, MALDI Biotyper, ClinProTools	ST1, ST17
Moura <i>et al.</i> (2008) (142)	<i>S. pyogenes</i>	9	Séquençage du gène <i>emm</i>	Lavage des cellules bactériennes (B)	HCCA DHB SA	AB 4700 Proteomics Analyzer	1-6 2-14	PAST, Random Forest	Souches de fasciite nécrosante
Wang <i>et al.</i> (2012) (143)	<i>S. pyogenes</i>	65	Séquençage du gène <i>emm</i>	Extraction éthanol-acide formique (THB)	HCCA	Ultraflex III MALDI TOF/TOF	2-20	MALDI BioTyper	M type prévalent en Chine
Williamson <i>et al.</i> (2008) (144)	<i>S. pneumoniae</i>	26	PCR temps réel	Préparation spécifique (TS)	SA	AB 4700 Proteomics Analyzer	2-14	PAST , Random Forest	Souches cPnc (conjunctival <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>)
Nakano <i>et al.</i> (2015) (145)	<i>S. pneumoniae</i>	574	Sérotypage	Extraction éthanol-acide formique (SB)	NP ⁵	Microflex LT	2-20	MALDI BioTyper, ClinProTools	Résultats prometteurs
Suarez <i>et al.</i> (2013) (146)	<i>N. meningitidis</i>	102	MLST	Transfert direct (GCB)	HCCA	LT2-Andromas	3.640-12	Andromas, Bionumerics	6 sous-groupes correspondants à 50 STs et 21CCs
Carannante <i>et al.</i> (2015) (147)	<i>N. gonorrhoeae</i>	93	Multi-antigène séquence typing	Extraction éthanol-acide formique (non précisé)	HCCA	Microflex LT	3-10	FlexAnalysis, MALDI BioTyper	Pas de résultat par MALDI-TOF MS
Dieckmann <i>et al.</i> (2011) (148)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	913	Sérotypage	Transfert direct (MH)	SA	Ultraflex II (TOF/TOF)	2-25	FlexAnalysis, ClinProTools, SARAMIS	5 sérovars : Enteritidis, Typhimurium,

									Virchow, Infantis et Hadar
Kuhns <i>et al.</i> (2012) (149)	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	160	Sérotypage	Transfert direct (SB)	HCCA	NP ⁵	2-20	FlexAnalysis, MALDI BioTyper	Sérovar Typhi et <i>non</i> -Typhi
Barbuddhe <i>et al.</i> (2008) (47)	<i>L. monocytogenes</i>	48	PFGE	Extraction éthanol-acide formique (CC)	HCCA	Microflex LT	2-20	FlexAnalysis, MALDI BioTyper	Lignées I, II, III
Stephan <i>et al.</i> (2011) (49)	<i>Y. enterocolitica</i>	117	Sérotypage	Transfert direct (CSB)	SA	Axima Confidence	2-30	SARAMIS, Shimadzu Biotech Launchpad	Biotypes pathogènes et non-pathogènes
Fujinami <i>et al.</i> (2011) (150)	<i>L. pneumophila</i>	23	PFGE	Extraction spécifique (milieu spécifique)	HCCA	Autoflex II	1-10	FlexAnalysis	Discrimination similaire
Nagy <i>et al.</i> (2011) (151)	<i>B. fragilis</i>	40	PCR du gène <i>cfiA</i>	Extraction éthanol-acide formique (milieu anaérobie)	HCCA	Microflex LT	2-20	MALDI BioTyper, ClinProTools	Souches <i>cfiA</i> -négatives et <i>cfiA</i> -positives
Nagy <i>et al.</i> (2013) (152)	<i>P. acnes</i>	48	Phylotypage, MLST	Extraction éthanol-acide formique (milieu anaérobie)	HCCA	Microflex LT	2-20	MALDI BioTyper, ClinProTools	Phylotypes I, II, III
Zautner <i>et al.</i> (2013) (153)	<i>C. jejuni</i>	104	MLST, marqueurs génétiques spécifiques	Transfert direct (C)	HCCA	Bruker system	2-20	FlexAnalysis, MALDI BioTyper	Clusters non cohérents
Xiao <i>et al.</i> (2014) (154)	<i>M. pneumoniae</i>	63	Génotypage du gène <i>p1</i>	Extraction éthanol-acide formique (non précisé)	HCCA	Microflex LT	2-20	Clin-ProTools	Type 1 et type 2
Fangous <i>et al.</i> (2014) (155)	<i>M. abscessus</i>	89	MLST	Extraction spécifique (SB)	HCCA	Microflex LT	2-20	ClinProTools, FlexAnalysis	Différentiation de 3 sous-espèces
Niyompanich <i>et al.</i> (2015) (156)	<i>B. pseudomallei</i>	4	Méthodes moléculaires	Extraction éthanol-acide formique (A)	SA	Ultraflex III TOF/TOF	2-20	ClinProTools	Souches sauvages et mutants
Rizzardi <i>et al.</i> (2015) (157)	<i>C. difficile</i>	500	PCR, ribotypage	Transfert direct, extraction éthanol-acide formique (B)	FerA HCCA	Microflex LT	6-50 2-20	FlexAnalysis, MALDI Biotyper	35 groupes pour 59 ribotypes
Månsson <i>et al.</i> (2015) (158)	<i>H. influenzae</i>	127	Typage capsulaire par PCR	Extraction éthanol-acide formique (Ch)	NP ⁵	Microflex	2-20	ClinProTools, MALDI Biotyper	Type b différencié des autres

¹ **CC** : Cœur cervelle, **MH** : Mueller-Hinton, **SB** : Sheep Blood, **C** : Columbia, **CB** : Columbia Blood, **CSB** : Columbia Sheep Blood, **GCB** : Gonococcal Medium Base, **A** : Ashdown, **NA** : Nutrient Agar, **LB** : Luria-Bertani, **B** : Blood, **THB** : Todd Hewitt Broth, **TS** : Trypticase soja, **Ch** : Chocolat

² **SA** : sinapinic acid, **HCCA** : alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid, **DHB** : 2,5-dihydroxybenzoic acid, **FerA** : transferulic acid

³ Gammes Microflex, Autoflex, Ultraflex (Bruker Daltonik), AXIMA Confidence instrument (Shimadzu/Kratos, UK), LT2-Andromas (Andromas SAS, France), AB 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA)

⁴ PermutMatrix (<http://www.atgc-montpellier.fr/permutmatrix/>), ClinProTools (Bruker Daltonik), FlexAnalysis (Bruker Daltonik); MALDI BioTyper (Bruker Daltonik), SARAMIS database (AnagnosTec, Potsdam-Golm, Germany), Shimadzu Biotech Launchpad software (Shimadzu Europe), Matlab-based software MicrobeMS (<http://www.mara-ms.com>), Andromas (Andromas SAS, France), Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium), PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/doc1.html>), Random Forest (http://www.stat.berkeley.edu/users/breiman/RandomForests/cc_home.htm), iSEQ (Sequenom, San Diego, CA)

⁵ **NP** : Non Précis

3.3.3.3. Préparation des échantillons pour le typage par MALDI-TOF MS

Les premiers essais de typage à l'aide des appareils MALDI-TOF MS installés dans les laboratoires de microbiologie pour l'identification rapide des bactéries, sont encourageants (Tableaux 4, 6 et 7). Suivant les données de la littérature, la technique de type MALDI-TOF MS est basée sur une préparation très simple des échantillons. Pour une analyse à partir de bactéries entières il existe deux méthodes possibles : (i) soit les colonies isolées sont directement déposées sur une cible MALDI-TOF puis recouvertes d'une solution de matrice («méthode de transfert direct», couramment utilisée pour l'identification des bactéries), (ii) soit les colonies entières sont mises en suspension dans une solution de matrice avant d'être déposées sur la cible MALDI-TOF. Mais pour obtenir des spectres de haute qualité permettant une analyse plus fine, il est recommandé de travailler à partir d'extraits protéiques afin de se débarrasser des débris cellulaires (méthode de « préparation par extraction »). Dans ce cas, c'est l'extrait protéique qui est déposé sur une cible MALDI-TOF puis recouvert d'une matrice (Tableaux 4, 6 et 7). Trois types de matrices sont principalement utilisées: (i) l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et plus rarement (ii) l'acide sinapinique (SA), ou (iii) l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (Tableaux 4, 6 et 7). Les matrices HCCA et SA sont particulièrement adaptées à l'étude des protéines. La matrice DHB est plus efficace que les autres matrices pour les composants de bas poids moléculaire et peut être utilisées pour l'étude des oligosaccharides, glycopeptides et glycoprotéines (44).

3.3.3.4. L'acquisition des spectres de masse

Différentes sociétés commercialisent des spectromètres de masse de type MALDI-TOF. Bruker Daltonik GmbH propose différentes gamme d'appareil : Microflex®, Autoflex® et Ultraflex® (Biotyper database; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). BioMérieux et Shimadzu ont développé les gammes VITEK MS® (base de données Saramis; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et AXIMA® (base de données Saramis, Shimadzu-Biotech, Corp., Kyoto, Japon), respectivement. D'autres systèmes sont également disponibles tels les spectromètres de masse Voyager DE PRO® (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) et Andromas® (Andromas SAS, France). L'acquisition des spectres est principalement réalisée sur la zone de masse comprise entre 2 000 à 20 000 Da (Tableaux 4, 6 et 7).

3.3.3.5. Analyses des données et identification de pics biomarqueurs

Le suivi de « bonnes pratiques » pour l'identification de biomarqueurs est essentiel quel que soit le domaine d'application pratique (biologie, microbiologie, oncologie ou autres). Notamment, il est fondamental d'utiliser 2 groupes d'échantillons indépendants pour l'identification et pour la validation des biomarqueurs (159).

Les spectres de masses obtenus par technique MALDI-TOF MS peuvent être analysés avec différents logiciels, au moins 22 sont référencés dans la littérature (Tableaux 4, 6 et 7). Une simple analyse visuelle des pics est possible avec le logiciel Flexanalysis[®] (Bruker Daltonik). De plus, ce logiciel permet d'obtenir rapidement des informations sur un pic donné : m/z , intensité, aire sous la courbe... Une liste de pics peut être extraite puis analysée manuellement ou automatiquement par exemple avec les logiciels MicrobeMS[®] (<http://www.mara-ms.com>), R[®] (<http://www.r-project.org>) ou Stata[®] (StataCorp, College Station, TX, USA). Des logiciels plus complexes permettent d'analyser les spectres dans leur ensemble à l'aide de différents outils de calcul intégrés, par exemple :

- analyse en composante principale et matrice de corrélation : MALDI Biotyper[®] (Bruker Daltonik), ClinProTools[®] (Bruker Daltonik),
- algorithmes mathématiques : ClinProTools[®] (Bruker Daltonik), PAST[®] (Natural History Museum, University of Oslo, Norvège)
- coefficients de similarité : MALDI Biotyper[®] (Bruker Daltonik), Bionumerics[®] (Applied Maths, Kortrijk, Belgique).

Comme pour la validation et l'application des méthodes de typage phénotypiques et génotypiques, les résultats de typage par MALDI-TOF MS doivent être interprétés dans le contexte épidémiologique et clinique de l'étude (160).

L'objectif de ce travail était donc d'évaluer la capacité de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à typer les 3 principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Nous voulions ici comparer le typage par MALDI-TOF MS aux techniques de typage généralement utilisées pour ces pathogènes afin de le proposer en méthode de première ligne, à moindre coût, avant une analyse plus discriminante mais souvent plus longue.

Les données de la littérature sur le typage bactérien par MALDI-TOF MS seront présentées dans le chapitre « Discussion », et comparées à nos propres résultats.

4. Matériel et Méthodes

4.1. Plan de travail

Pour chaque espèce bactérienne étudiée, il s'agira dans un premier temps de définir une stratégie de typage MALDI-TOF MS en utilisant une collection de souches caractérisées par une méthode de référence. Dans un deuxième temps, une étude épidémiologique utilisant la stratégie de typage précédemment définie pourra être proposée.

4.2. Méthodologie

4.2.1. Souches bactériennes utilisées

Les études réalisées au cours de cette thèse s'appuieront sur différentes collections de bactéries conservées au sein du Centre de Ressources Biologiques–Filière microbiologie du CHRU de Besançon (CRB-FMB, Biobanque BB-0033-00090). Les souches utilisées devront avoir été caractérisées par une technique de typage de référence (PFGE, MLST, PCR), présenter une diversité génétique importante et être en nombre suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Pour chaque étude, elles seront réparties en 2 groupes indépendants, l'un utilisé pour définir la stratégie de typage et l'autre pour la valider. L'identité de chaque souche utilisée a été vérifiée par MALDI-TOF MS en utilisant le logiciel d'identification In Vitro Diagnostic Maldi Biotyper[®] 2.2 (Bruker Daltonik) et les critères recommandés par le fabricant (score $\geq 2,0$).

4.2.2. Préparation et dépôt des échantillons

Après décongélation, dans la grande majorité des cas, les souches testées ont été mises en culture pendant 18-24 h à 37°C sur gélose Mueller Hinton (MH).

Pour la plupart des études et dans le but d'obtenir des spectres de haute qualité, les souches utilisées pour définir les stratégies de typage ont été traitées suivant la méthode de « préparation par extraction ». Pour chaque souche, une à plusieurs colonies ont été transférées dans un tube d'extraction de 2 ml contenant 300 µl d'eau déminéralisée de manière à obtenir une suspension trouble. Le mélange a été homogénéisé puis 900 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés et également homogénéisés. La solution obtenue a été centrifugée à 13 000 rpm pendant 2 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot obtenu séché à température ambiante. En fonction de la taille du culot, de 10 à 50 µl d'acide formique à 70 % ont été ajoutés ainsi qu'un volume équivalent d'acétonitrile. Le mélange a été homogénéisé vigoureusement à la pipette par aspiration-refoulement puis centrifugé à 13 000 rpm pendant

2 min. Le surnageant obtenu a été déposé sur la cible MALDI-TOF : suivant les études, un ou plusieurs spots (1 μ l d'extrait) ont été déposés pour chaque souche à analyser. Après séchage à température ambiante, les dépôts ont été recouverts de 1 μ l de matrice HCCA.

Pour les souches destinées à la validation des stratégies de typage, 2 méthodes de préparation ont été utilisées : (i) la méthode de « préparation par extraction », décrite précédemment ou (ii) la méthode de « transfert direct ». Pour la méthode de « transfert direct » une colonie isolée a été prélevée sur la gélose MH puis déposée en un film très mince sur la cible MALDI-TOF. Un spot par souche a été réalisé, recouvert de 1 μ l de matrice HCCA. Une représentation schématique des différentes étapes de préparation et dépôt des échantillons est présentée Figure 8.

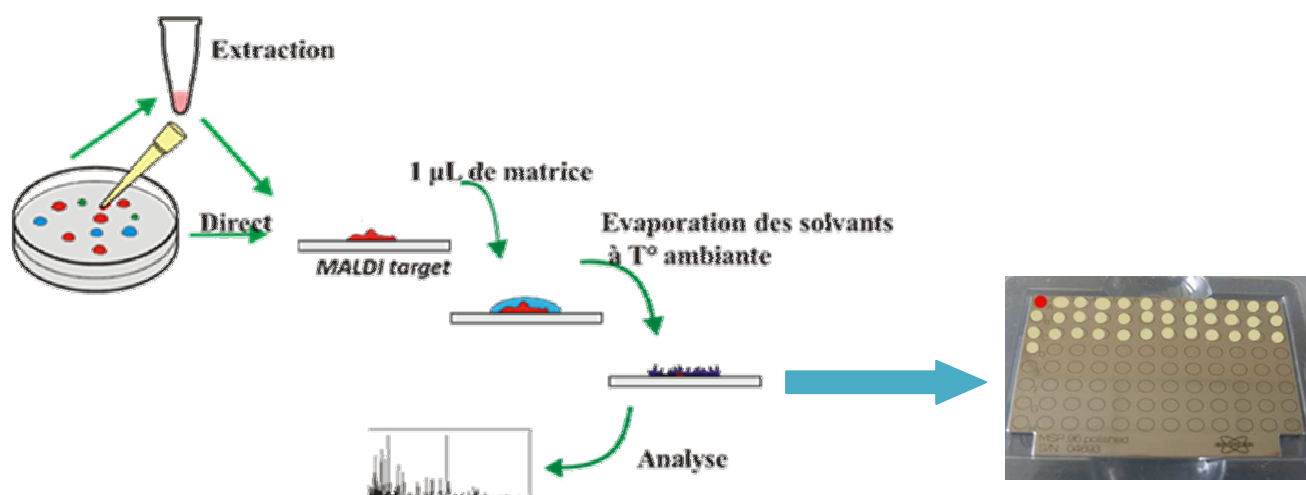


Figure 8. Préparation et dépôt des échantillons sur une cible MALDI-TOF.

4.2.3. Acquisition des spectres

L'acquisition des spectres par MALDI-TOF MS a été réalisée sur le spectromètre Microflex LT[®] (Bruker Daltonik) grâce au logiciel Flex Control[®] (Bruker Daltonik) suivant la méthode générale recommandée pour Biotyper[®] (Bruker Daltonik) : mode linéaire positif, fréquence laser de 60 Hz, tension d'accélération de 20 kV et dans la zone de masse de 2 000 à 20 000 Da. Un spectre brut est obtenu par 6 séries de 40 tirs laser, soit un total de 240 tirs. Dans la majorité des cas, un spot par souche a été réalisé, lu une fois pour générer un spectre brut unique. Dans certains cas, 8 spots par souche ont été réalisés et lus 3 fois chacun pour

générer 24 spectres bruts par souche. Ces spectres seront utilisés notamment pour créer des spectres de référence.

Avant chaque série d'acquisition de spectres, l'appareil a été calibré avec une suspension de BTS (*Bacterial Test Standard*) contenant une souche de référence de *E. coli* et deux protéines additionnelles de haut poids moléculaire. Un μl de cette suspension a été déposé sur la cible MALDI puis recouvert après séchage de 1 μl de matrice HCCA.

4.2.4. Analyse des spectres de masse et identification de pics biomarqueurs

Les spectres de masse obtenus ont été analysés à l'aide de différents logiciels avec pour objectif d'identifier les pics biomarqueurs (présence ou absence de pics, position et intensités des pics). Au final, les pics biomarqueurs doivent permettre de définir des « MALDI types » pouvant être associés ou non à des CCs, STs, phylogroupes ou autres sous-types.

4.2.4.1. Flexanalysis[®] (Bruker Daltonik)

Une simple analyse visuelle des spectres a été réalisée avec le logiciel Flexanalysis[®] à la recherche de la présence ou de l'absence de certains pics.

Des logiciels plus complexes ont été utilisés pour analyser les spectres de manière automatique.

4.2.4.2. MALDI Biotyper[®] (Bruker Daltonik)

Le logiciel MALDI Biotyper[®] a permis d'analyser les spectres dans leur ensemble à l'aide de différents outils de calcul comme l'analyse en composante principale (PCA : *Principal Component Analysis*) ou la matrice de corrélation (CCI : *Composite Correlation Index*). Une analyse PCA est une analyse statistique permettant de fournir des informations sur l'homogénéité d'un ensemble. Le principe de la PCA est de réduire la dimension d'un jeu de données dans lequel il existe un grand nombre de variables interdépendantes, tout en conservant la variation. Dans l'analyse en MALDI-TOF MS, l'ensemble de données consiste en des spectres de masse, les intensités des rapports m/z représentant les variables individuelles. Cela permet d'identifier les grandes tendances entre les spectres. La PCA est aussi utilisée comme outil de visualisation. Ainsi, le traçage des données dans le système de coordonnées basé sur les composantes principales permet de mettre en évidence des groupes ou clusters qui ne seraient pas évidents si les données avaient été utilisées telles quelles. Une

analyse CCI permet de diviser les spectres en intervalles et de comparer ces intervalles à travers un ensemble de données (161). La corrélation de ces ensembles traduit une distance entre les spectres. Une valeur de CCI de 1 représente une corrélation complète, tandis qu'une valeur de 0 représente une absence de corrélation.

Le logiciel MALDI Biotyper[®] a également permis de créer des spectres de référence venant alimenter des bibliothèques de spectres de référence. Les spectres de référence appelés MSP (*Mean Spectrum*) ont été créés à partir des spectres bruts après 5 étapes de prétraitement : ajustement de masse, lissage, normalisation, soustraction de ligne de base et choix des pics les plus significatifs du spectre. Des coefficients de similarité ont été appliqués entre les différents MSP d'une même espèce permettant de tracer des dendrogrammes. Il s'agit de représentations graphiques mettant en évidence de façon « hiérarchique », les liens entre différents groupes. Selon le coefficient choisi, différents dendrogrammes ont été générés.

4.2.4.3. ClinProTools[®] 3.0 (Bruker Daltonik)

Le logiciel ClinProTools[®] a également été utilisé pour analyser automatiquement les spectres dans leur ensemble. Il s'agit d'un logiciel d'analyse de spectres de masse obtenus notamment par MALDI-TOF MS et permettant l'exploration de données et la construction de modèles prédictifs. Pour cela, ClinProTools[®] combine des fonctionnalités de visualisation intuitive et des algorithmes mathématiques utilisés pour l'identification de pics biomarqueurs. Avant chaque analyse, les spectres ont été chargés dans le logiciel par groupes prédéfinis appelés « classes » en fonction de la stratégie de typage à définir.

Dans un premier temps, le logiciel ClinProTools[®] a permis une visualisation des spectres de chaque souche sous forme de 'pseudogels' ou des spectres moyens de chaque classe. D'autres fonctions du logiciel ont également été testées comme la distribution en 2D des intensités de 2 pics potentiellement discriminants identifiés automatiquement après différents calculs statistiques.

Dans un second temps, ClinProTools[®] a été utilisé pour définir des modèles de typage. Les 4 algorithmes mathématiques intégrés au logiciel (Quick Classifier - QC, Support Vector Machine - SVM, Supervised Neural Network - SNN et Genetic Algorithm - GA) ont été testés. La Figure 9 illustre leur mode de fonctionnement. Après calcul, une liste de pics discriminants entre les classes a été obtenue et associée à un score de « capacité de reconnaissance » et de « validation croisée », donnant une indication sur la performance et la fiabilité du modèle généré, respectivement. Cependant, une capacité de reconnaissance élevée

ne signifie pas nécessairement que les données sont séparables ou que le modèle est bon. Le modèle doit être validé à l'aide d'une fonction spécifique du logiciel sur des groupes de souches indépendantes de celles utilisées pour calculer le modèle.

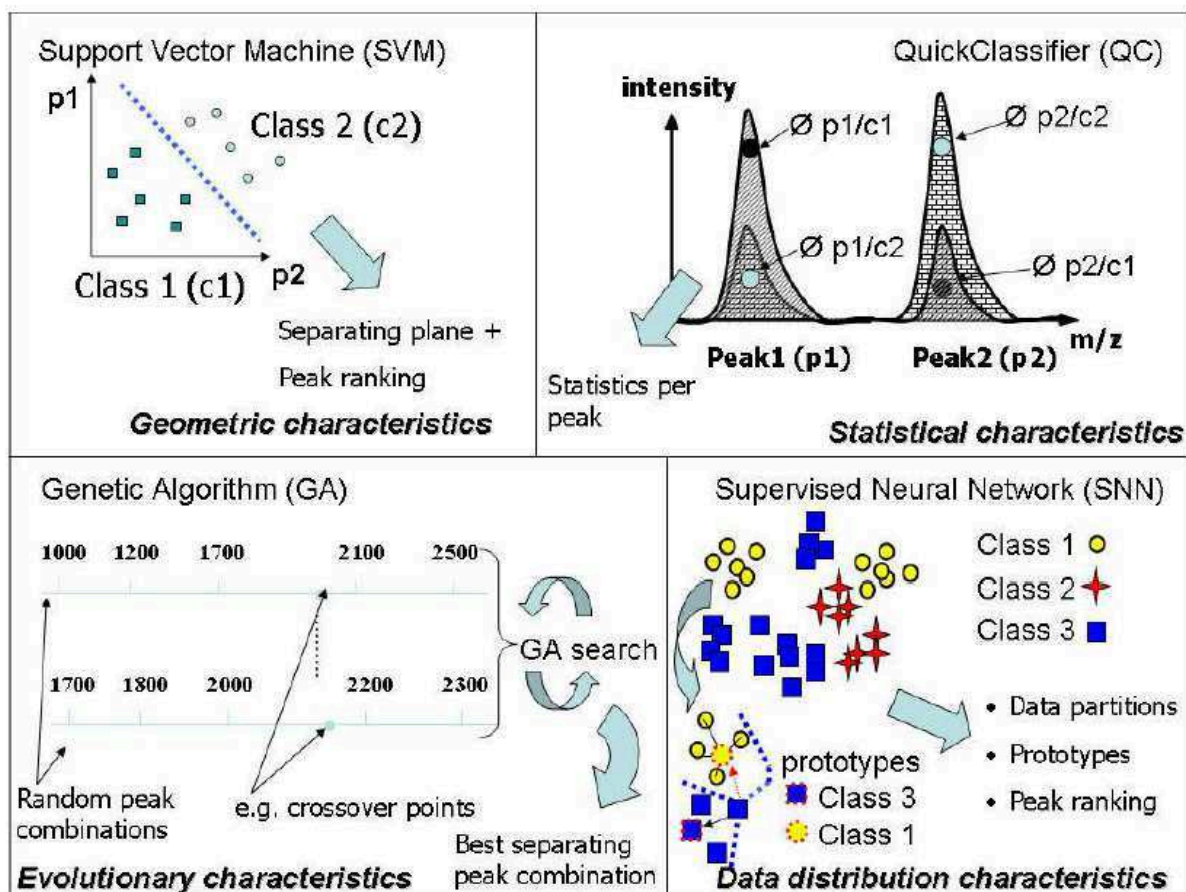


Figure 9. Vue d'ensemble des quatre algorithmes de classification intégrés au logiciel ClinProTools® (Bruker Daltonik), d'après le manuel du logiciel (ClinProTools 3.0 *User Manual*, revision 1). Tous ces algorithmes ont des méthodologies différentes. L'algorithme génétique (GA) reproduit l'évolution de la nature et est utilisée pour sélectionner les combinaisons de pics les plus pertinentes. L'algorithme Support Vector Machine (SVM) est utilisé pour déterminer des plans de séparation entre les différentes classes. L'algorithme Neural Network Supervisé (SNN) identifie des spectres caractéristiques pour chaque classe, nommés prototypes, et qui pourraient être considérés comme échantillons prototypes de chaque classe. L'algorithme QuickClassifier (QC) utilise les moyennes des pics des spectres de chaque classe ainsi que certaines données statistiques pour obtenir une classification des spectres mais aussi une probabilité pour chaque classe.

4.2.5. Validation de la stratégie de typage

Lors de cette étape, les spectres de masse obtenus ont été traités avec les différents outils venant d'être décrits. Le classement des souches obtenu par MALDI-TOF MS a été comparé au classement des souches obtenu par des techniques de références. Les performances des stratégies de typage MALDI-TOF ont été évaluées par leur sensibilité, spécificité, Valeur Prédictive Positive (VPP) et Valeur Prédictive Négative (VPN). Les résultats obtenus ont alors permis d'évaluer le potentiel de la technique MALDI-TOF MS comme outil de typage pour les différentes espèces étudiées.

4.2.6. Application des stratégies de typage validées

En fonction de l'étude proposée, un certain nombre de souches à typer seront incluses. Elles pourront être d'origine clinique ou non, issues de prélèvement divers (IOA, hémocultures, urines ou autres). Le protocole de typage validé définira la méthode de préparation des souches ainsi que la méthode d'acquisition et d'analyse des spectres. Pour chaque souche, 2 dépôts sur la cible MALDI seront réalisés de manière à obtenir 2 spectres de masses. Pour rendre un résultat de typage, les classements de ces 2 spectres devront être concordants. Le résultat de typage sera interprété à la lumière du contexte épidémiologique de l'étude.

5. Résultats

5.1. Typage de *Escherichia coli* par MALDI-TOF MS

5.1.1. Etude 1 – Evaluation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour identifier les phylogroupes A, B1, B2 et D de *E. coli*

5.1.1.1. Présentation de l'article

Objectif. La classification des souches de *E. coli* en phylogroupes reflète la diversité de leur niche écologique et de leur pathogénicité, les souches appartenant au phylogroupe B2 étant des souches particulièrement virulentes responsables d'infections extra-intestinales. Les techniques de phylogroupage de *E. coli* restent longues et coûteuses. Cette étude visait à évaluer la capacité de la technique MALDI-TOF MS à identifier certains groupes phylogénétiques de *E. coli*.

Matériels et méthodes. Nous avons utilisé 656 souches de *E. coli*, précédemment attribuées aux 4 principaux phylogroupes (A, B1, B2 ou D) par PCR multiplex (74). Ces souches ont été réparties en 2 groupes indépendants, l'un utilisé pour définir la stratégie de typage et l'autre pour la valider. Nous avons défini 2 stratégies de typage validées à partir de spectres obtenus par la «méthode de transfert direct». La première stratégie utilisait le logiciel MALDI Biotyper® (Bruker Daltonik) et la seconde le logiciel ClinProTools® (Bruker Daltonik).

Résultats.

Première stratégie utilisant le logiciel MALDI Biotyper® (Bruker Daltonik). La visualisation des spectres a permis d'identifier un décalage de pics entre les souches B2 (m/z 9 716) et les souches A, B1 et D (m/z 9 741) correspondant très probablement à 2 formes de la protéine HdeA, une protéine chaperone impliquée dans la réponse au stress acide. L'analyse en composantes principales et la réalisation d'une matrice de corrélation ont confirmés la répartition des souches en 2 clusters dans une zone de masse comprise entre 9 700 et 10 000 Da. Pour chaque souche un spectre de référence a été créé puis utilisé pour construire un dendrogramme. Le dendrogramme réalisé lors de l'étape de validation a permis de différencier correctement les souches B2 des souches A, B1 et D (groupe MALDI-Type MT I *versus* MT II) dans 89% des cas avec une sensibilité de 96% et une spécificité de 84%, respectivement.

Seconde stratégie utilisant le logiciel ClinProTools® (Bruker Daltonik). Différents modèles de typage ont été construits permettant de différencier successivement les 4 groupes phylogénétiques. Lors de l'étape de validation, le modèle 1 (B2 *versus* A+B1+D) a permis d'identifier 92% des souches avec une sensibilité de 91% de et une spécificité de 93%, respectivement. Le modèle 2 (D *versus* A+B1) et le modèle 3 (A *versus* B1) ont permis d'identifier correctement 87% et 69% des souches restantes, respectivement.

Conclusion. Les 2 stratégies de typage proposées permettent de différencier les souches les plus virulentes (groupe B2) des autres, rapidement et sans surcoût. Dans les laboratoires de microbiologie clinique, la technique MALDI-TOF MS a donc le potentiel (*i*) pour permettre d'accélérer la détection des souches de *E. coli* les plus virulentes appartenant au phylogroupe B2 et (*ii*) pour être un outil de première ligne de surveillance de l'épidémiologie de ce pathogène extra-intestinal.

5.1.1.2. Texte de l'article

Sauget M, Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. Int J Med Microbiol 2014 ; 304 : 977-983. (IF 2014 : 3,61)



Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D



Marlène Sauget^{a,b}, Marie-Hélène Nicolas-Chanoine^c, Nadège Cabrolier^a,
Xavier Bertrand^a, Didier Hocquet^{a,b,*}

^a Service d'Hygiène Hospitalière, UMR 6249 Chrono-environnement, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Université de Franche-Comté, Besançon, France

^b CRB Ferdinand Cabanne—Filière microbiologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France

^c Service de Microbiologie, Hôpital Beaujon AP-HP, Clichy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2014

Received in revised form 4 June 2014

Accepted 11 June 2014

Keywords:

Typing

MALDI-TOF MS

Escherichia coli

Bruker

Mass spectrometry

ABSTRACT

Escherichia coli classification into phylogroups reflects the diversity of their pathogenicity and their ecological niche, B2 isolates being the most virulent among extra-intestinal strains. MALDI-TOF MS allows a quick, automated, simple and inexpensive bacterial identification. We evaluated the MALDI-TOF MS as a tool for *E. coli* phylogroup differentiation.

We used 656 *E. coli* isolates, previously assigned to phylogroup A, B1, B2, and D by multiplex PCR, to constitute independent training and validation sets. We then defined two phylogrouping strategies, both validated on spectra obtained by the 'direct transfer method'.

The first strategy used the MALDI Biotyper software (Bruker Daltonik) that identified a single peak shift between isolates of phylogroup B2 and those of groups A, B1 and D. It accurately classified 89% of the isolates. The second strategy used the ClinProTools software (Bruker Daltonik) and was based on three successive models. The model 1 adequately differentiated 92% of phylogroup B2-isolates from those belonging to phylogroups A, B1, D. The model 2 adequately discriminated 87% of phylogroup D-isolates from those of phylogroups A and B1. The model 3 correctly sorted 69% of A and B1-isolates.

We concluded that clinical laboratories could routinely and very quickly assign *E. coli* isolates to phylogroups with MALDI-TOF MS. These methods could (i) expedite the detection of the most virulent strains belonging to phylogroup B2 and (ii) be a first-line tool to monitor the epidemiology of extra-intestinal pathogenic *E. coli*.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Escherichia coli is the dominant aerobic commensal species of the mammal intestinal flora and is also widely present in plants or aquatic environment. Although most strains are not pathogenic, *E. coli* is the first etiology of urinary tract infections, bacteremia and intestinal infections both in hospital and community (Croten and Finlay, 2010).

E. coli genotyping by multi-locus sequence typing (MLST) is based on the study of the nucleotide sequence of seven or eight housekeeping genes and allows for the identification of sequences types (ST) (Wirth et al., 2006). The phylogenetic tree built from the comparison of these nucleotide sequences clearly showed four major phylogroups named A, B1, B2 and D (Jauregui et al., 2008). Recently, Clermont et al. (2013) refined the classification by defining four minor phylogroups C, E, F, and *Escherichia* cryptic clade I.

The heterogeneous structure of the species is confirmed by whole genome sequencing data. This analysis found that the average *E. coli* genome contains 4721 genes, but only 2000 genes with high homology are conserved among all strains. These conserved genes form the core genome (Hendrickson, 2009; Lukjancenko et al., 2010). This provides a high level of plasticity in the genome,

* Corresponding author at: Infection Control Unit University Hospital of Besançon, 3, Boulevard Fleming, 25030 Besançon Cedex, France. Tel.: +33 3 81 66 81 91; fax: +33 3 81 66 89 14.

E-mail address: dhocquet@chu-besancon.fr (D. Hocquet).

which results in a large diversity of adaptive paths (Tenaillon et al., 2010). Hence, commensal *E. coli* mostly belong to phylogroups A and B1 whereas strains responsible for extra-intestinal infections belong to phylogroup B2 and, to a lesser extent to phylogroup D (Johnson et al., 2001a, 2001b, 2002; Boyd and Hartl, 1998). The phylogroups A and B1 are considered sister groups and phylogroup B2 as the representative of the ancestral lineage (Lecointre et al., 1998).

The assignment of the strains to phylogroups lies on the detection of target genes *chuA*, *yjaA* and DNA fragment of a putative lipase esterase gene (Clermont et al., 2000; Doumith et al., 2012). This rapid, simple and reliable PCR technique is widely used in research laboratories but not routinely used in the clinical laboratories.

Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) allows for the identification of microorganisms at the species level by analysis of total protein (Bizzini and Greub, 2010). For bacteria, this technique is based on the generation of mass spectra from whole cells and their comparison to reference spectra (Fenselau and Demirev, 2001). Compared to traditional biochemical or molecular techniques, MALDI-TOF MS allows for a quick, automated, simple and relatively cheap bacterial identification. Additionally, some authors have shown that MALDI-TOF MS can reach sub-species identification level. Indeed, it is possible to identify *Listeria monocytogenes* serotypes, *Yersinia enterocolitica* biotypes and *Salmonella enterica* subspecies (Barbuddhe et al., 2008; Stephan et al., 2011; Dieckmann et al., 2008). MALDI-TOF MS also differentiates some M types of *Streptococcus pyogenes* (Wang et al., 2012) and clonal complexes of *Staphylococcus aureus* (Wolters et al., 2011; Boggs et al., 2012). Recently MALDI-TOF MS has been successfully used for the identification of some pathovars of *E. coli* (Clark et al., 2013).

The high genomic diversity of the *E. coli* species led us to envisage variations in the mass spectra between phylogroups and their potential detection by MALDI-TOF MS. We sought here to provide a simple, rapid method that can be used in the routine clinical laboratories for the assignment of *E. coli* isolates to major phylogroups.

Materials and methods

Bacterial isolates and culture conditions

We used a panel of 656 well-characterized clinical (*n* = 481) and environmental (*n* = 175) isolates of *E. coli* collected between 2006 and 2014 and stored at the Centre de Ressources Biologiques Ferdinand Cabanne at the University Hospital of Besançon (Table 1). All the isolates were identified as *E. coli* by MALDI-TOF MS with a log value ≥2.3 according to the manufacturer's recommendations. For all the isolates, we determined the phylogroup (A, B1, B2, or D) by the triplex PCR method initially described by Clermont et al. (2000) and improved by Doumith et al. (2012) and sought for the production of extended-spectrum-β-lactamase (ESBL) by synergy test (EUCAST, 2013). The ST of 352 isolates had previously been determined in other studies (Nicolas-Chanoine et al., 2013; Bréchet et al., 2014). We deliberately included as much as possible different STs in each phylogroup in order to encompass the genetic diversity of the tested panel.

Samples preparation for MALDI-TOF MS

For initial experiments with high-quality spectra, we used the ethanol-formic acid extraction method recommended by Bruker Daltonik (method thereafter called 'Bruker method'). After overnight culture on Mueller-Hinton agar, about half a loopful of fresh culture was suspended in 300 µl of demineralized water. Then 900 µl of absolute ethanol was added and the suspension

Table 1
Phylogenetic characteristics, origin and ESBL content of the 656 isolates of *E. coli* used in the study.

Phylogroup	Total	Nb of isolates			Sequence Type	
		Clinical	Environment	ESBL producers	Non-ESBL producers	
A	194	110	84	106	88	10, 34, 44, 46, 88, 93, 117, 156, 167, 210, 216, 361, 617, 744, 746, 752, 1294, 1296, 1148, 1640, 1675, 1712, 2436, 2512, 2821, 2822, 3221, 3224
B1	58	29	29	29	29	23, 45, 58, 155, 162, 224, 361, 616, 940, 1148
B2	274	262	12	144	130	73, 88, 95, 131, 135, 141, 372, 1675, 2821, 3222
D	130	80	50	64	66	38, 57, 68, 69, 117, 120, 354, 362, 405, 648, 1117, 1158, 1163, 1640, 2439, 2511, 2828

was mixed for 15 s on a vortexer. The suspension was centrifuged at $18,000 \times g$ for 2 min. The supernatant was removed and the ethanol-killed bacterial pellet was used for protein extraction. Fifty μl of 70% formic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was added before vortexing for 30 s for cell wall disruption. Then 50 μl of pure acetonitrile (Sigma-Aldrich) was added. The suspension was vortexed for 30 s and centrifuged at $18,000 \times g$ for 2 min. One μl of the supernatant was spotted on the target plate for MALDI-TOF MS experiments. We also used the 'direct transfer method' which is routinely used in clinical laboratories. A small amount of a single colony was smeared directly on the target plate in a thin film using an inoculation needle. The spots (from 'Bruker method') and the smears (from 'direct transfer method') were overlaid with 1 μl of matrix solution (saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix in 50% acetonitrile with 2.5% trifluoroacetic acid, Bruker Daltonik) and air dried for 15 min.

MALDI-TOF MS measurements

Spectra were obtained with a Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) in the linear positive ion mode, with a laser frequency of 60 Hz. The mass range was m/z 2000 to 20,000. Parameter settings for Microflex LT were: ion source 1: 20 kV, ion source 2: 18.5 kV, lens: 6 kV, pulsed ion extraction: 100 ns. Each series of measurements was preceded by a calibration with a Bacterial Test Standard (Bruker Daltonik) that contains an *E. coli* reference strain along with RNase A and myoglobin. For each sample, the sum spectra of 240 single spectra were acquired, in portions of 40 single spectra from 6 different positions on a spot. Depending on the sample group and the tested approaches (Biotyper or ClinProTools strategies, as defined below), we collected 1 or 24 raw spectra.

Establishment of a phylogroup database

Eight spots of each isolate extracted with the 'Bruker method' were measured 3 times. Twenty of the 24 raw spectra generated per isolate were kept and downloaded in the MALDI BioTyper 3.0 software (Bruker Daltonik). They were preprocessed according to five steps: (i) mass adjustment with Spectra Compressing by a factor of 1 for m/z between 9700 and 10,000, (ii) smoothing using Savitsky–Golay algorithm with a 5-Da frame size, (iii) baseline subtraction, (iv) normalization using Maximum Norm algorithm, and (v) peak picking using Local Maximum algorithm. To generate the mean spectrum (MSP), we set the desired peak frequency minimum at 100% and the maximum desired peak number at 70.

Identification of biomarker peaks for the four main *E. coli* phylogroups

Visual examination of the mass spectra was performed using FlexAnalysis 3.3 software (Bruker Daltonik). The automated analysis of the data was performed with methods that involve two different software products. For each method, we used (i) a training set of representing isolates and (ii) a 5 to 10 times larger validation set, with isolates independent from those of the training set.

First, we analyzed a set of raw spectra (20 per isolate) generated after a 'Bruker method' extraction with the Principal Component Analysis module of the MALDI BioTyper 3.0 software. This statistical method allows for getting information on the distribution of the data set with a reduction of its dimensionality. Second, we analyzed a set of raw spectra (1 per isolate) generated after a 'direct transfer method' with the software ClinProTools 3.0 (Bruker Daltonik) to calculate pattern recognition models for classification. Three predictive models able to distinguish between two classes have been tested: (i) model 1, phylogroup B2 vs. phylogroups A,

B1 and D; (ii) model 2, phylogroup D vs. phylogroups A and B1; (iii) model 3, phylogroup A vs. phylogroup B1. The first two models used peaks ranging from m/z 2000 to 20,000, and model 3 used peaks ranging from m/z 4000 to 10,000. The most discriminating peaks were identified and an average spectrum was calculated for each class. The models were generated using 4 algorithms (*i.e.* genetic algorithm, support vector machine, supervised neural network, and quick classifier) and compared. For the three models, the recognition capability and the cross validation were calculated to demonstrate reliability and accuracy. We predicted the capability of each model with large validation sets of isolates whose phylogroups were known.

Results

First typing strategy with a dendrogram created with MALDI Biotyper software

We first used a training set of 45 *E. coli* isolates (9 of B2, 15 of A, 7 of B1, and 14 of D phylogroups). All the isolates were extracted with the 'Bruker method' and analyzed with the MALDI-TOF MS to generate a main spectrum (MSP). In preliminary experiments, we visually sought an area of the mass spectra that varies between the four major *E. coli* phylogroups and found a clear peak shift between isolates of phylogroup B2 (m/z 9716) and those of groups A, B1 and D (m/z 9741) (Fig. 1A). As a confirmation, the principal component analysis of the m/z 9700–10,000 area of the training set of isolates clearly showed two clusters (Fig. 1B), one with all the isolates of phylogroup B2 and another one with the isolates of phylogroups A, B1, and D. Additionally, a MSP dendrogram was generated for this training set with the MALDI Biotyper software (Bruker Daltonik), focusing on the same mass area (m/z 9700–10,000). When using an arbitrary distance level of 1000 as a cutoff, the 9 phylogroup B2 isolates were unequivocally assigned to the MALDI-Type 1 and the 36 isolates belonging to phylogroups A, B1 and D were assigned to the MALDI-Type 2 (Fig. 1C).

We then tested this model against a large validation set of isolates ($n = 611$) independent from those used in the training set and analyzed after 'direct transfer method'. Hence, 311 isolates fell into the MALDI-Type 1 and 300 isolates fell into the MALDI-Type 2. Among isolates of phylogroup B2, 96% and 4% were assigned to the MALDI-Type 1 and MALDI-Type 2, respectively. Among isolates of phylogroups A, B1, D, 84% and 16% were assigned to the MALDI-Type 2 and MALDI-Type 1, respectively (Table 2). Among the 56 isolates from phylogroups A, B1, and D classified into the MALDI-Type 1, 32 belonged to phylogroup A, 4 to phylogroup B1 and 20 to phylogroup D. Overall, considering that MALDI-type 1 corresponds to phylogroup B2 and MALDI-Type 2 to the phylogroups A, B1, and D, this first typing strategy accurately classified 89% of the isolates into the right MALDI-Type. Sensitivity and specificity of this first strategy were 96% and 84%, respectively. Unfortunately, phylogroups A, B1 and D did not differ from each other with this typing strategy.

Second typing strategy with an algorithm model using ClinProTools software

With a training set of 100 isolates (25 B2, 25 A, 25 B1, and 25 D) analyzed after 'direct transfer method', we selected three models using Support Vector Machine algorithms to define a new *E. coli* phylogrouping strategy with the MALDI-TOF MS (Table 2). Table 3 lists the peaks taken into account and their weight in the calculation of the 3 models. We only detail here the peaks with a weight >1.0 . Model 1 was based on three peaks (m/z 4858; m/z 9716; and m/z 9741), all with a weight >1.0 . It could differentiate isolates of

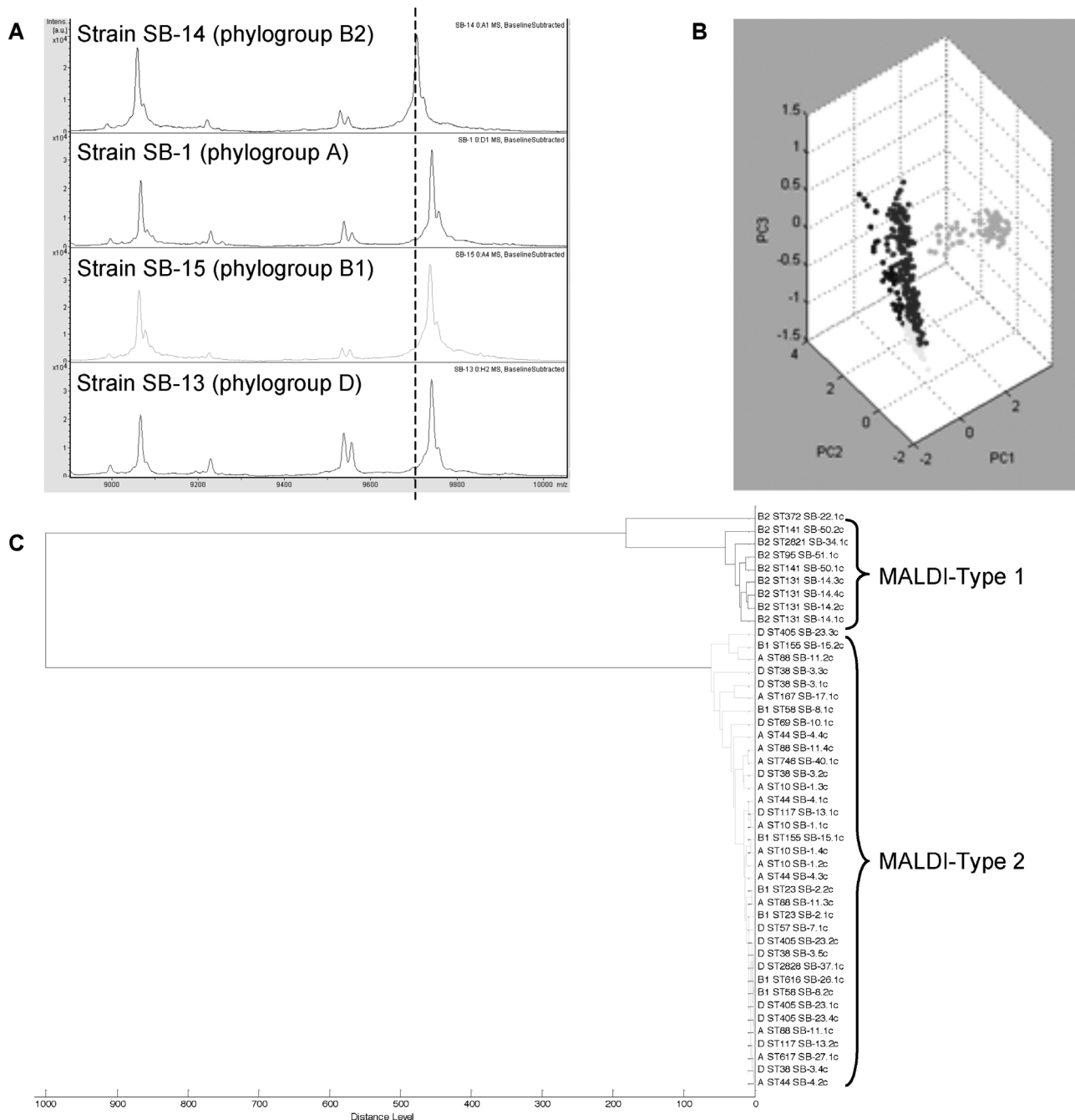


Fig. 1. Identifying a mass area to assign the *E. coli* isolates to the phylogroup B2. (A) Comparison of raw spectra of *E. coli* isolates belonging to the four major phylogroups (Flex Analysis 3.3, Bruker Daltonik). A peak shift from m/z 9716 to 9741 is observed between the isolates of phylogroup B2 (SB-14) and those of phylogroups A, B1 and D (SB-1, SB-15, and SB-13, respectively). (B) The Principal Component Analysis of 20 raw spectra (m/z 9700–10,000) of 45 *E. coli* isolates of the training set were clustered into two distinct groups: isolates of the phylogroup B2 (grey dots) and isolates of the other phylogroups A, B1 and D (black dots). (C) Dendrogram of the Main Spectra (MALDI Biotyper 3.0, Bruker Daltonik) of 45 representative isolates of *E. coli* (m/z 9700–10,000). The isolates are classified into 2 groups: MALDI-Type 1 in black and MALDI-Type 2.

phylogroup B2 from those of phylogroups A, B1, or D with a recognition capability of 98%. The latter cluster containing 75 isolates of phylogroups A, B1 and D, was used to calculate model 2 that discriminated isolates belonging to the phylogroup D from isolates of phylogroups A and B1 with a recognition capability of 98%. Here, 5 of the 17 discriminatory peaks had a weight >1.0 (m/z 8353; m/z 11,710; m/z 11,793; m/z 11,819; and m/z 14,371). Using the remaining isolates of A and B1 phylogroups ($n = 50$), ClinProTools software (Bruker Daltonik) calculated model 3 that differentiated group A isolates from group B1 isolates with a recognition

capability of 88%. Five of the 7 discriminatory peaks had a weight >1.0 (m/z 4351; m/z 5421; m/z 7709; m/z 8432; and m/z 8447).

We then tested these models with the remaining isolates ($n = 556$) that constituted the validation set. Model 1 identified 92% of the isolates of phylogroup B2 (228 out of 246) and 93% of the isolates of phylogroups A, B1, and D (285 out of 307). Overall, 92% of the isolates were correctly classified with a sensitivity value of 91% and a specificity value of 93% (Table 2). Model 2, tested against the 307 remaining isolates of phylogroups A, B1 and D, adequately differentiated 87% of the isolates belonging to phylogroup D from

Table 2Validation of two typing strategies by MALDI-TOF MS for assignment of *E. coli* into the 4 main phylogroups A, B1, B2, and D.

Phylogroup ^a	Biotyper strategy MALDI-Type, n (%)			ClinProTools strategy phylogroup, n (%)						
	n	1	2	n	B2	A, B1, D	D	A, B1	A	B1
B2 vs. A, B1, D										
B2	265	255 (96)	10 (4)	249	228 (92)	21 (8)	–	–	–	–
A, B1, D	346	56 (16)	290 (84)	307	22 (7)	285 (93)	–	–	–	–
D vs. A, B1										
D	–	–	–	105	–	–	79 (75)	26 (25)	–	–
A, B1	–	–	–	202	–	–	14 (7)	188 (93)	–	–
A vs. B1										
A	–	–	–	169	–	–	–	–	115 (68)	54 (32)
B1	–	–	–	33	–	–	–	–	8 (24)	25 (76)

^a As defined by the triplex PCR (13, 14).

those belonging to phylogroups A, B1 with a sensitivity value and a specificity value of 75% and 93%, respectively. At last, model 3 tested against the 202 isolates of phylogroups A and B1, correctly classified 69% of isolates with a sensitivity value of 68% and a specificity value of 76%.

Discussion

In the present study, we defined two methods for the assignment of extra-intestinal pathogenic *E. coli* into phylogroups by the analysis of MALDI-TOF MS spectra generated after the routinely-used 'direct transfer method'. First, we used the Bruker Biotyper software (Bruker Daltonik) and a specific biomarker peak to distinguish between isolates of the phylogroup B2 and those belonging to the three other main phylogroups. Second, we used the ClinProTools software (Bruker Daltonik) for the analysis of the total spectrum to differentiate from each other the four main extra-intestinal pathogenic *E. coli* phylogroups.

There appeared to be conservation of the great majority of the *m/z* peaks produced by all the phylogroups, in which are constantly expressed highly abundant proteins such as ribosomal and periplasmic proteins (Holland et al., 1999). However, we also

observed a degree of heterogeneity between phylogroups. The heterogeneity did not rely on a specific extraction method and was observed with the use of the simple and fast 'direct transfer method'.

The classification obtained with Biotyper is the simplest method that discriminates isolates of phylogroup B2 from those belonging to the three other main phylogroups with very high values of sensitivity (96%) and specificity (84%). It can be performed simultaneously with the routine identification of species since (i) it uses the 'direct transfer method' and (ii) does not require additional equipment other than the standard package of MALDI-TOF MS system. This accurate discrimination relied on a single peak shift from *m/z* 9741 for non-B2 phylogroup isolates to *m/z* 9716 for phylogroup B2 isolates. Matsumura et al. (2014) identified this peak for differentiating ST131 *E. coli* (belonging to phylogroup B2) from non-ST131 *E. coli*. However, since *E. coli* ST131 was the only representative of phylogroup B2 in this study, it was not specified whether the *m/z* 9716 peak was specific to ST131 or to the whole phylogroup B2. We found here that all the 10 different STs that belong to phylogroup B2 showed a peak at *m/z* 9716 and not at *m/z* 9741 (Table 1). It has been shown elsewhere that all the intestinal *E. coli* pathotypes shared the peak at *m/z* 9741 (Clark et al., 2013; Fagerquist

Table 3Integration regions used for classification of *E. coli* into the four main phylogroups A, B1, B2, and D and their weight in the calculation of 3 models using ClinProTools 3.0 (Bruker Daltonik).

Models	Mass	Start mass	End mass	Weight
Model 1 (B2 vs. A, B1, D)	4858.73	4844.1	4863.67	1.420505591536227
	9715.68	9674.1	9727.68	1.730403177655355
	9740.86	9727.68	9773.99	1.471240295618544
Model 2 (D vs. A, B1)	2668.62	2661.35	2672.94	0.7886090782045596
	2834.25	2828.95	2841.9	0.6224052909025223
	5351.38	5345.95	5354.86	0.7108436001984582
	5421.21	5416.72	5435.35	0.940528102614009
	5922.63	5906.45	5950.45	0.6520439450034836
	8083.81	8070.8	8094.4	0.7096886288711917
	8353.33	8342.57	8358.85	1.01791099376438
	8432.23	8422.41	8439.63	0.7352907814474902
	8447.83	8439.63	8464.63	0.7630661639609501
	10,695.88	10,682.71	10,712.79	0.9244824536445929
	11,710.98	11,657.38	11,725.37	1.172496492096333
	11,793.65	11,769.11	11,812.93	1.136874901814603
	11,819.29	11,812.93	11,840.49	1.534498837414925
	13,429.61	13,394.04	13,445.16	0.8378874810891424
	14,324.52	14,292.17	14,334.86	0.7829185137892948
	14,371.35	14,334.86	14,411.43	1.415900883039144
	15,851.34	15,762.15	15,921.79	0.8930466298520681
Model 3 (A vs. B1)	4351.32	4336.89	4357.88	1.060208286536181
	5421.62	5416.83	5438.22	1.449893025383412
	6539.25	6529.16	6547.35	0.8983135289065014
	7223.77	7210.14	7229.25	0.8766033551120409
	7709.42	7684.9	7722.75	1.013953873871925
	8432.97	8421.7	8441.5	1.229079950758382
	8447.23	8441.5	8464.78	1.227394581943671

et al., 2010). It corresponds to the mature form of HdeA, an acid stress chaperone-like protein, after the cleavage of the peptide signal by the peptidase Lep (Holland et al., 1999). The expected mass, calculated from the protein sequence of residues 22–110 of HdeA (Genbank accession number 1789926) of *E. coli* K-12 strain MG1655 (ST10, phylogroup A) is 9740.9 Da, in agreement with the observed peak at m/z 9740.86 Da (Fig. 1A, Table 3). In our study, the m/z 9741 peak was almost always absent from phylogroup B2 isolates. Instead, we noticed a B2-specific m/z peak 9716 (Fig. 1A). The mass of the mature HdeA protein of the B2, ST131 *E. coli* isolates which was estimated from the sequenced genome of two *E. coli* ST131 strains (JJ1886 and O25b:H4-ST131 strain EC958) was 9713.4 Da, which fit with that observed in our experiments (m/z 9715.68, Fig. 1A, Table 3). The precision of the linear MALDI-TOF MS measurement is limited (500 ppm) but largely below the shift ($\sim m/z$ 25) of HdeA. Thus, it was possible to distinguish with a good confidence B2 isolates from non-B2 isolates with MALDI-TOF MS using the polymorphism of this protein. This method can be performed with the standard package of MALDI-TOF MS system in 30 s from the spectra generated for routine bacterial identification after 'direct transfer method'. Although this method is robust and simple, it cannot differentiate non-B2 phylogroups (A, B1, and D) from each other. We then performed a more extensive analysis of the MALDI-TOF MS peak data with the ClinProTools software (Bruker Daltonik).

The first model of our ClinProTools strategy discriminated isolates of B2 phylogroup from those of other phylogroups with a slightly lower sensitivity (92 vs. 96%) but a higher specificity (93 vs. 84%) than the Biotyper strategy did. This is presumably due to the addition in model 1 of the third m/z peak of 4858 which corresponds to an unassigned protein. This strategy can further distinguish between A, B1 and D phylogroups, using models 2 and 3 sequentially. Unfortunately, we could not assign to specific proteins the m/z peak markers retained by these models (17 in model 2, and 7 in model 3). The limitation in the broad use of this strategy is that ClinProTools software (Bruker Daltonik) is not included in the standard package and has to be purchased separately. However, equipped laboratories can freely download the method-containing files from our laboratory website (<http://projet.chu-besancon.fr/rfclin/ClinProTools/>) to skip the time-consuming steps of strategy definition and validation, and directly perform phylogrouping of *E. coli* analyzed by 'direct transfer method' in less than 1 min.

Among the 31 B2 isolates that were misclassified by our strategies, 10 were ST131, one was ST372, 1 was ST88 and 19 were of unknown STs. The vast majority of the ST131 isolates were well classified by both strategies and other isolates belonging to ST372 and ST88 were also well classified. Thus, the misclassification concerned some isolates of several STs and was not specific to a given ST.

Good practice guidelines for biomarker discovery require that the predictive biomarkers are first developed with a training set of data and then validated on an independent set of data (Simon, 2005). The two MALDI-TOF MS methods for *E. coli* sub-grouping published recently either developed and validated their biomarkers on the same data set or did not validate their biomarkers (Matsumura et al., 2014; Novais et al., 2014). In addition, these studies were based on a maximum of 11 well-defined STs and 149 isolates, to be compared with the 65 STs and the 656 isolates that we tested here. The above-mentioned methods were based on ethanol-formic acid extraction which is time-consuming and not performed in the clinical laboratory for identification. This could hamper their use in routine. Here, we showed that both Biotyper and ClinProTools strategies have good performances with spectra generated from 'direct transfer method' and can assign an *E. coli* isolate to one of the phylogroups A, B1, B2 or D in less than 1 min. Unfortunately,

none of the MALDI-TOF MS methods described here was able to distinguish *E. coli* population according to the sequence types defined by MLST (data not shown).

Despite good performances, none of our strategies gave a full sensitivity or specificity. We qualified our collection with the triplex PCR method originally described by Clermont et al. (2000) and that sorted isolates into phylogroups A, B1, B2 or D. Recently, Clermont et al. (2013) refined the method to distinguish isolates from the new phylogroups C, E, F, and *Escherichia* cryptic clade I. The confrontation of the MALDI-typing with this distribution in 8 phylogroups could further improve the efficiency of the proposed protocols.

MLST remains the gold standard for accurate and objective data in clonal epidemiology. However, the rapid, inexpensive and easy phylogrouping with MALDI-TOF MS should be considered as an alternative method to monitor the epidemiology of extra-intestinal pathogenic *E. coli* and to quickly detect the most virulent strains (i.e. from phylogroup B2) among extra-intestinal pathogenic isolates. Beyond the species identification, these results confirm the power of this approach for identifying protein biomarkers for the pathogen sub-grouping.

Funding

This work was supported by a European Grant "Fonds européen de développement régional" (FEDER 34534). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgments

We thank Fabrice Poncet from the sequencing facility of the SFR FED 4234 (University of Franche-Comté, Besançon).

References

- Crohen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H., Achtman, M., 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136–1151.
- Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbone, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X., Brisse, S., 2008. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 9, 560.
- Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 58–65.
- Hendrickson, H., 2009. Order and disorder during *Escherichia coli* divergence. *PLoS Genet.* 5, e1000335.
- Lukjancenko, O., Wassenaar, T.M., Ussery, D.W., 2010. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb. Ecol.* 60, 708–720.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E., 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 207–217.
- Johnson, J.R., Delavari, P., Kuskowski, M., Stell, A.L., 2001a. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 183, 78–88.
- Boyd, E.F., Hartl, D.L., 1998. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J. Bacteriol.* 180, 1159–1165.
- Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., O'Bryan, T.T., Maslow, J.N., 2002. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J. Infect. Dis.* 185, 1439–1447.
- Johnson, J.R., O'Bryan, T.T., Delavari, P., Kuskowski, M., Stapleton, A., Carlino, U., Russo, T.A., 2001b. Clonal relationships and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* isolates from women with a first or recurrent episode of cystitis. *J. Infect. Dis.* 183, 1508–1517.
- Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P., Denamur, E., 1998. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1685–1695.

- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555–4558.
- Doumith, M., Day, M.J., Hope, R., Wain, J., Woodford, N., 2012. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3108–3110.
- Bizzini, A., Greub, G., 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1614–1619.
- Fenselau, C., Demirev, P.A., 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass. Spectrom. Rev.* 20, 157–171.
- Barbuddhe, S.B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T., 2008. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5402–5407.
- Stephan, R., Cernela, N., Ziegler, D., Pflüger, V., Tonolla, M., Ravasi, D., Fredriksson-Ahomaa, M., Hachler, H., 2011. Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* 87, 150–153.
- Dieckmann, R., Helmuth, R., Erhard, M., Malorny, B., 2008. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7767–7778.
- Wang, J., Zhou, N., Xu, B., Hao, H., Kang, L., Zheng, Y., Jiang, Y., Jiang, H., 2012. Identification and cluster analysis of *Streptococcus pyogenes* by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One* 7, e47152.
- Wolters, M., Rohde, H., Maier, T., Belmar-Campos, C., Franke, G., Scherpe, S., Aepfelbacher, M., Christner, M., 2011. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 64–68.
- Boggs, S.R., Cazares, L.H., Drake, R., 2012. Characterization of a *Staphylococcus aureus* USA300 protein signature using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.* 61, 640–644.
- Clark, C.G., Kruczkiewicz, P., Guan, C., McCorrister, S.J., Chong, P., Wylie, J., van Cae-seele, P., Tabor, H.A., Snarr, P., Gilmour, M.W., Taboada, E.N., Westmacott, G.R., 2013. Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *J. Microbiol. Methods* 94, 180–191.
- EUCAST, 2013. EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. Version 1.0. December. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Available at: (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms.v1.0_20131211.pdf) (accessed 17 December, 2013).
- Nicolas-Chanoine, M.H., Gruson, C., Bialek-Davenet, S., Bertrand, X., Thomas-Jean, F., Bert, F., Moyat, M., Meiller, E., Marcon, E., Danchin, N., Noussair, L., Moreau, R., Leflon-Guibout, V., 2013. 10-Fold increase (2006–11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 562–568.
- Bréchet, C., Plantin, J., Sauget, M., Thouverez, M., Talon, D., Cholley, P., Guyeux, C., Hocquet, D., Bertrand, X., 2014. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin. Infect. Dis.* 58, 1658–1665.
- Holland, R.D., Duffy, C.R., Rafii, F., Sutherland, J.B., Heinze, T.M., Holder, C.L., Voorhees, K.J., Lay Jr., J.O., 1999. Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells. *Anal. Chem.* 71, 3226–3230.
- Matsumura, Y., Yamamoto, M., Nagao, M., Tanaka, M., Machida, K., Ito, Y., Takakura, S., Ichiyama, S., 2014. Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1034–1040.
- Fagerquist, C.K., Garbus, B.R., Miller, W.G., Williams, K.E., Yee, E., Bates, A.H., Boyle, S., Harden, L.A., Cooley, M.B., Mandrell, R.E., 2010. Rapid identification of protein biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight-time-of-flight mass spectrometry and top-down proteomics. *Anal. Chem.* 82, 2717–2725.
- Simon, R., 2005. Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. *J. Clin. Oncol.* 23, 7332–7341.
- Novais, A., Sousa, C., de Dios Caballero, J., Fernandez-Olmos, A., Lopes, J., Ramos, H., Coque, T.M., Canton, R., Peixe, L., 2014. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, in press.

5.1.2. Etude 2 – Détection de *E. coli* ST131 par MALDI-TOF MS : quelles applications en hygiène hospitalière?

5.1.2.1. Présentation de l'article

Objectif. Le clone *E. coli* ST131, appartenant au phylogroupe B2, est un clone prédominant chez les souches de *E. coli* extra-intestinales pathogènes. Il joue un rôle majeur dans la diffusion mondiale des souches de *E. coli* productrices de BLSE. La pandémie de ST131 est principalement liée à l'expansion du sous-clone H30-Rx, acquis dans les hôpitaux plus fréquemment que les autres clones de *E. coli* producteurs de BLSE. Cette étude avait pour objectif de développer une méthode rapide de détection de *E. coli* ST131 par MALDI-TOF MS.

Matériels et méthodes. Nous avons utilisé 109 souches de *E. coli*, caractérisées lors d'études précédentes, réparties en 2 groupes : l'un utilisé pour définir la stratégie de typage (n=20) et l'autre pour la valider (n=89). Le logiciel ClinProTools® (Bruker Daltonik) a été utilisé pour analyser de manière automatique les spectres de masses et identifier des pics biomarqueurs du clone ST131.

Résultats. Deux modèles de typage ont été construits, incluant 3 et 4 pics biomarqueurs, respectivement : (i) le modèle A reposait sur les pics m/z 6612, 9713, 10474 (ii) le modèle B sur les pics m/z 8496, 9713, 9738, 10474. Ces modèles ont été validés avec des spectres de masse obtenus après dépôt direct et après extraction protéique. Les valeurs de sensibilité et de spécificité obtenues étaient comprises entre 82,5% et 97,5% et entre 94% et 100%, respectivement.

Conclusion. L'identification rapide de *E. coli* ST131 par MALDI-TOF MS peut être facilement mise en œuvre dans un laboratoire de microbiologie clinique, et pourrait aider à cibler les mesures d'hygiène hospitalière sur les patients porteurs de *E. coli* producteurs de BLSE les plus épidémiques.

5.1.2.2. Texte de l'article

Lafolie J, **Sauget M**, Cabrolier N, Hocquet D, Bertrand X. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies? J Hosp Infect 2015 ; 90 : 208-212. (IF 2015 : 2,65)



Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies?

J. Lafolie, M. Sauget, N. Cabrol, D. Hocquet, X. Bertrand*

CHU Besançon, Service d'Hygiène Hospitalière, Boulevard Fleming, Besançon, 25030 France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2014

Accepted 16 December 2014

Available online 28 February 2015

Keywords:

Multi-drug resistance

ESBL

Infection control

Isolation



SUMMARY

Background: Sequence type 131 (ST131) is a predominant lineage among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. It plays a major role in the worldwide dissemination of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *E. coli*. The ST131 pandemic is mainly the result of clonal expansion of the single well-adapted subclone H30-Rx, which is acquired in hospitals more frequently than other ESBL-producing *E. coli* clones.

Aim: To develop a rapid method using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) to identify ST131 for infection control purposes.

Methods: Peak biomarkers of ST131 were identified from the mass spectrum profiles of 109 *E. coli* isolates (including 50 ST131 isolates).

Findings: The models accurately identified ST131 isolates from mass spectrum profiles obtained with and without protein extraction.

Conclusions: The rapid identification of ST131 isolates with MALDI-TOF MS can be easily implemented in the laboratory, and could help to target infection control measures in patients carrying multi-drug-resistant *E. coli* that are more likely to spread.

© 2015 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The increasing prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* worldwide is a source of particular concern. In France, 10% of *E. coli* isolated in the bloodstream in 2012 were resistant to third-generation cephalosporins, mainly through the production of ESBL (www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net).¹ In 2013, the incidence of ESBL-producing *E. coli* in French hospitals became higher than the incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (0.32 vs 0.30 per 1000 patient-days).² French and

international guidelines for the control of multi-drug-resistant bacteria recommend contact precautions for carriers of ESBL-producing *E. coli*.³ However, the extent to which in-hospital transmission contributes to the overall incidence of this resistant bacterium remains uncertain.^{4,5} Among the highly diverse population of *E. coli*, the ST131 clone, which belongs to phylogroup B2, deserves special attention as it has accounted for the worldwide dissemination of ESBL-producing *E. coli* since its identification in 2008.⁶ Recently, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been integrated into the routine workflow of medical microbiology laboratories for identification of microorganisms.⁷ MALDI-TOF MS data (i.e. mass spectrum profiles) generated for species identification have been used with no

* Corresponding author. Tel.: +33363082240; fax: +33381668286.

E-mail address: xavier.bertrand@univ-fcomte.fr (X. Bertrand).

additional costs for subspecies characterization of *E. coli*.^{8,9} This study aimed to develop a rapid and sensitive method using MALDI-TOF MS to identify ST131 routinely among ESBL-producing *E. coli* in clinical microbiological laboratories.

Materials and methods

Bacterial isolates

This study used a panel of 109 well-characterized clinical ($N = 94$) and environmental ($N = 15$) isolates of *E. coli* collected between 2006 and 2013, and stored at the Centre de Ressources Biologiques Ferdinand Cabanne at the University Hospital of Besançon (Table I). All the isolates were identified as *E. coli* by MALDI-TOF MS with a log value ≥ 2 according to the manufacturer's recommendations, and genotyped by multi-locus sequence typing.¹⁰

Sample preparation for MALDI-TOF MS

The samples were prepared using two different protocols. First, the ethanol-formic acid extraction method, recommended by Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany, was used (hereafter called 'Bruker method'); this allows the acquisition of high-quality spectra. Briefly, after an overnight culture on Mueller-Hinton agar, approximately half a loop of fresh culture was suspended in 300 μL of demineralized water. Subsequently, 900 μL of absolute ethanol was added and the suspension was mixed for 15 s using a vortexer. The suspension was centrifuged at $18,000 \times g$ for 2 min. The supernatant was removed and the ethanol-killed bacterial pellet was used for protein extraction. Fifty microlitres of 70% formic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was added before vortexing for 30 s for cell wall disruption. Next, 50 μL of pure acetonitrile (Sigma-Aldrich) was added. The suspension was vortexed for 30 s and centrifuged at $18,000 \times g$ for 2 min. One microlitre of the supernatant was spotted on the target plate for MALDI-TOF MS experiments. The second protocol was based

on the 'direct transfer method' which is used routinely in clinical laboratories. A small amount of a single colony was smeared directly on the target plate in a thin film using a pipette tip. The spots (from the Bruker method) and the smears (from the direct transfer method) were overlaid with 1 μL of matrix solution (saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix in 50% acetonitrile with 2.5% tri-fluoroacetic acid; Bruker Daltonik) and air dried for 15 min.

MALDI-TOF MS measurements

Spectra were obtained with a Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonik) in the linear positive ion mode, with a laser frequency of 60 Hz. The mass range was m/z 2000–20,000. Parameter settings for the Microflex LT were: ion source 1, 20 kV; ion source 2, 18.5 kV; lens, 6 kV; pulsed ion extraction, 100 ns. Each series of measurements was preceded by calibration with a bacterial test standard (Bruker Daltonik) that contained an *E. coli* reference strain along with RNase A and myoglobin. For each sample, the sum spectra of 240 single spectra was acquired in portions of 40 single spectra from six different positions on a spot. Depending on the sample group (validation set or training set), one or 24 raw spectra were collected, respectively, per isolate.

Identification of biomarker peaks for *E. coli* ST131

Automated analysis of the data was performed using Clin-ProTools 3.0 (Bruker Daltonik) from peaks ranging from m/z 5500 to 11,000. This software uses a standard data preparation workflow that includes spectra pretreatment, peak picking and peak calculation operation. In order to calculate models that were able to distinguish ST131 isolates from non-ST131 isolates, a training set of 20 isolates (including 10 ST131 isolates), extracted using the Bruker method, was used. The reliability and the accuracy of the models were assessed through recognition capability and cross-validation values. The pertinence of the generated models was verified with an independent

Table I

Phylogenetic characteristics, origin and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) content of the 109 isolates of *Escherichia coli* used in the study

		Phylogroup	Total	Origin		ESBL production		Sequence type
				Clinical	Environmental	Yes	No	
Training set ($N = 20$)	ST131	B2	10	7	3	10	0	131
	Non-ST131 ($N = 10$)	A	3	2	1	3	0	88, 617, 752
		B1	1	1	0	1	0	23
		B2	3	2	1	2	1	135, 3222, 4508
		D	2	1	1	2	0	354, 405
		ND	2	2	0	1	1	2904
Validation set ($N = 89$)	ST131	B2	40	38	2	35	5	131
	Non-ST131 ($N = 49$)	A	17	16	1	14	3	10, 48, 88, 93, 361, 399, 617, 744, 1148, 3221, 3224
		B1	7	7	0	4	3	23, 29, 58, 101, 410
		B2	6	5	1	1	5	12, 95, 141, 404, 538, 2619
		D	15	10	5	12	3	38, 45, 69, 106, 108, 117, 354, 405, 648, 1148, 1163, 1640, 1642, 3049
		ND	4	4	0	1	3	949, 1312, 1480

ND, not determined.

Table II
Characteristics of the two models for the detection of ST131 isolates among *Escherichia coli*

Models	Peaks (<i>m/z</i>)	Algorithm	Recognition capability	Cross-validation	Bruker method				Direct transfer method			
					Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
A	6612 9713 10,474	QC	99.75%	99.88%	97.5%	100%	100%	98%	82.5%	100%	100%	87.5%
B	8496 9713 9738 10,474	SVM	100%	99.5%	97.5%	94%	93%	98%	90%	96%	95%	92%

QC, Quick classifier; SVM, System Vector Machine; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

validation set of 89 isolates (including 40 ST131) (Table I). Visual examination of the mass spectra was performed using FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonik).

Results

Creation and validation of algorithm models

Two models were able to distinguish ST131 isolates from non-ST131 isolates in the training set (Table II) with excellent (>99.5%) recognition capability and cross-validation values. These two models were tested blindly with the isolates of the validation set extracted using the Bruker method or the direct transfer method.

The first model ('Model A') was based on a Quick Classifier algorithm and relied on three peak markers (Table II). When tested with the validation set of isolates extracted with the Bruker method, it was able to assign 39 of the 40 ST131 isolates and 49 of the 49 non-ST131 isolates correctly. The sensitivity and specificity of Method A were 97.5% and 100%, respectively (Table II). As the purpose of this work was to provide clinical

laboratories with a convenient method for routine use, this model was tested over the validation set of isolates after the direct transfer method. Although the specificity was 100%, the sensitivity dropped to 82.5%. The second model ('Model B') was based on a Support Vector Machine algorithm and relied on four peak biomarkers. When tested on the validation set of isolates after the direct transfer method, the sensitivity and specificity were 90% and 96%, respectively. The specificity of Model B was lower than that of Model A when tested with isolates extracted with the Bruker method (94% vs 100%) (Table II).

Visual analysis of the spectra

The spectra of the 20 isolates of the training set were examined in order to visualize the peak biomarkers. In *m/z* area 10,400–10,600, all the ST131 isolates tested (*N* = 10) displayed a specific peak at *m/z* 10,474, while isolates of other STs displayed a shifted peak or no peak (Figure 1a). In *m/z* area 9700–9800, all the ST131 isolates tested displayed the peak specific to phylogroup B2 at *m/z* 9713, which was shifted to *m/z* 9740 for isolates of other phylogroups (i.e. A, B1 and D)

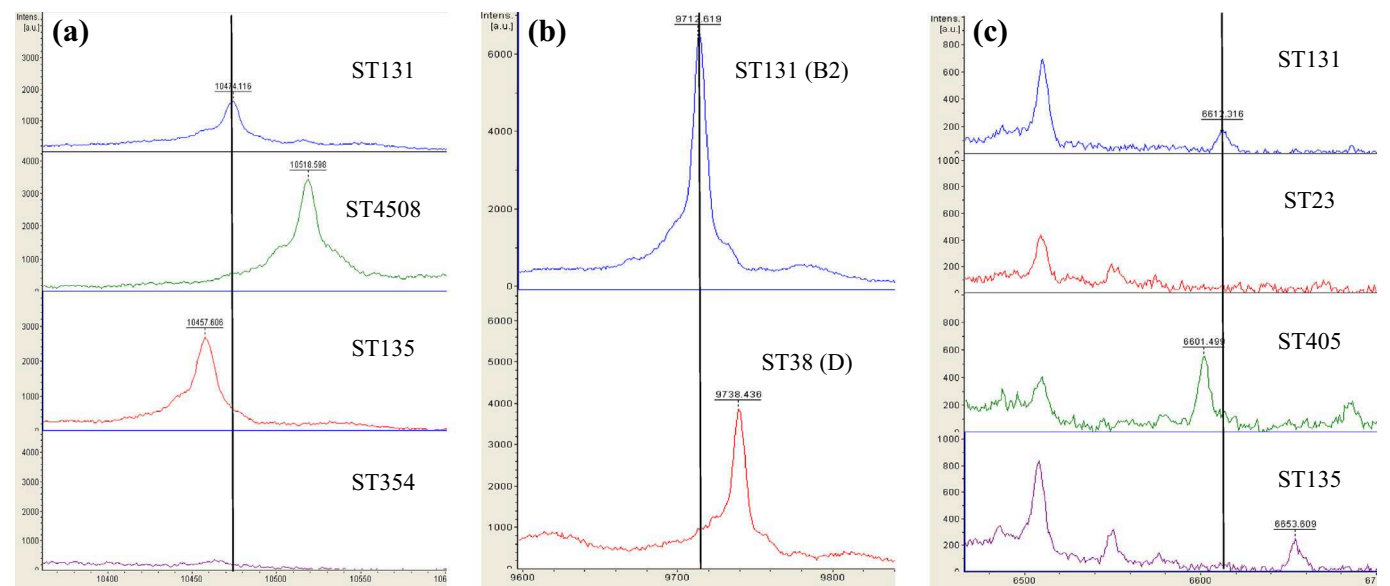


Figure 1. Visual examination of three peak biomarkers of *Escherichia coli* ST131 with FlexAnalysis 3.3 software. (a) Specific peak at *m/z* 10,474 for ST131 isolates. (b) Specific peaks at *m/z* 9713 for phylogroup B2 isolates and *m/z* 9738 for isolates of other phylogroups. (c) Specific peak at *m/z* 6612 for ST131 isolates.

(Figure 1b). In m/z area 6600–6700, all the ST131 isolates tested, except two, displayed a specific peak at m/z 6612, while isolates of other STs displayed a shifted peak or no peak (Figure 1c).

Discussion

Two sensitive and specific methods are proposed for the assignment of clinical *E. coli* to the ST131 clonal group based on the analysis of MALDI-TOF MS spectra. The identification of ST131 isolates using Models A and B partly relied on a peak biomarker at m/z 9713. Sauget *et al.* reported that this peak is specific to phylogroup B2, of which ST131 is a member.⁹ The slight difference between the peak biomarker in the study by Sauget *et al.* (m/z 9716) and the present study (m/z 9713) could be attributed to calibration variations. Model B also considers the peak at m/z 9738 that is absent from B2 isolates.⁹ In the present study, a peak at m/z 10,474 was displayed by all ST131 isolates ($N = 50$), and this peak was absent from the spectra of all but one of the non-ST131 isolates ($N = 59$).

A limitation to the broad use of this strategy is that ClinProTools software (Bruker Daltonik) is not included in the standard package and has to be purchased separately. However, equipped laboratories can freely download the method-containing files from the authors' laboratory website (<http://projet.chu-besancon.fr/rfclin/ClinProTools/>) in order to avoid the time-consuming steps of strategy definition and validation, enabling direct analysis. The identification of ST131 using MALDI-TOF MS can be easily implemented in the laboratory, and is much faster than polymerase-chain-reaction-based methods.¹¹ The methods used for isolate screening in clinical practice must be very sensitive with few false negatives. When using the direct transfer method, Model B was found to be more sensitive and had a higher negative predictive value than Model A (Table II). Following analysis of *Neisseria meningitidis* spectra, Suarez *et al.* showed that high-molecular-weight proteins are more difficult to detect because of their weak intensity.¹² Moreover, spectra resulting from the Bruker method are of better quality than those resulting from the direct transfer method.¹³ Thus, protein extraction with the Bruker method improves the performance of Models A and B. For instance, the sensitivity of both models was <90% for isolates extracted using the direct transfer method, and 97.4% for isolates extracted using the Bruker method (Table II).

To date, two studies have focused on the detection of ST131 using MALDI-TOF MS. The first study identified *E. coli* ST131 isolates with a peak at m/z 9720, which was later found to be shared by all isolates of phylogroup B2.^{9,14} Another study identified ST131 isolates from a collection of *E. coli* using the Biotyper module of the standard package of the MALDI-TOF MS system.¹⁵ Unfortunately, the present authors were unable to reproduce this result in this study (data not shown). This discrepancy is presumably due to the higher clonal diversity of the isolates in the present study compared with the isolates used by Novais *et al.* (45 vs 11 well-defined STs). In addition, these two recent studies developed and validated their biomarkers on the same data set, or did not validate their biomarkers; good practice guidelines require that predictive biomarkers are first developed with a training set of data, and subsequently validated using an independent set of data.¹⁶

Since 2008, the worldwide dissemination of ESBL-producing *E. coli* has mainly been due to the spread of ST131; this pandemic is mainly the result of clonal expansion of the single well-adapted subclone H30-Rx.⁶ Its spread mainly relies on human-to-human transmission between household members and within hospital settings.¹⁷ Considering the global epidemiology of ESBL-producing *E. coli* and the particular epidemiology of ESBL-producing ST131, it is likely that the targeted isolation of patients carrying ST131 isolates should be more cost-efficient than isolation of all patients harbouring ESBL-producing *E. coli*. The immediate identification of ST131 with MALDI-TOF MS makes it possible to evaluate the impact of targeted infection control measures.

MALDI-TOF MS is becoming the reference technique for species identification of pathogenic micro-organisms in clinical laboratories in developed countries. It also offers opportunities for bacterial subtyping. The rapid identification of ST131 isolates with MALDI-TOF MS can be easily implemented in the laboratory, and could help to focus the healthcare team's efforts on patients carrying multi-drug-resistant *E. coli* that are more likely to spread.

Conflict of interest statement

None declared.

Funding source

This work was partially supported by a European Grant 'Fonds européen de développement régional' (FEDER 34534).

References

1. European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Stockholm: ECDC; 2014. Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>. Last accessed 17th October 2014.
2. Carbonne A, Arnaud I, Maugat S, *et al.* National multidrug-resistant bacteria (MDRB) surveillance in France through the RAISIN network: a 9 year experience. *J Antimicrob Chemother* 2013;**68**:954–959.
3. Hajjar J. Healthcare associated infection control in France: 2005–2008 national program. *J Hosp Infect* 2008;**70**(Suppl. 1): 17–21.
4. Hilty M, Betsch BY, Bogli-Stubler K, *et al.* Transmission dynamics of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the tertiary care hospital and the household setting. *Clin Infect Dis* 2012;**55**:967–975.
5. Lowe C, Katz K, McGeer A, Muller MP. Disparity in infection control practices for multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control* 2012;**40**:836–839.
6. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* 2014;**27**: 543–574.
7. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 2010;**16**:1614–1619.
8. Clark CG, Kruczkiewicz P, Guan C, *et al.* Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *J Microbiol Methods* 2013;**94**:180–191.
9. Sauget M, Nicolas-Chanoine MH, Cabrolier N, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of

- flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. *Int J Med Microbiol* 2014;**304**:977–983.
10. Wirth T, Falush D, Lan R, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 2006;**60**:1136–1151.
 11. Dhanji H, Doumith M, Clermont O, et al. Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrum beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 2010;**36**:355–358.
 12. Suarez S, Ferroni A, Lotz A, et al. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J Microbiol Methods* 2013;**94**:390–396.
 13. Spinali S, van Belkum A, Goering RV, et al. Microbial typing by Maldi-TOF MS: do we need guidance for data interpretation? *J Clin Microbiol* 2014;**53**:760–765.
 14. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, et al. Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2014;**52**:1034–1040.
 15. Novais A, Sousa C, de Dios Caballero J, et al. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;**33**:1391–1399.
 16. Simon R. Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. *J Clin Oncol* 2005;**23**:7332–7341.
 17. Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, et al. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 2013;**207**:919–928.

5.1.3. Etude 3 – Epidémiologie de *E. coli* ST131 producteur de BLSE et de son sous-clone H30 dans un hôpital français sur une période de 15 ans

5.1.3.1. Présentation de l'article

Objectif. Parmi les souches de *E. coli* extra-intestinales pathogènes, ST131 est une lignée prédominante. *E. coli* ST131 joue un rôle majeur dans la diffusion mondiale des souches de *E. coli* productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE). Sa prévalence est très variable, comprise entre 10 et 70% (162). Des études phylogéniques basées sur l'analyse du génome de la population ST131 ont démontré qu'un seul sous-clone, nommé H30 (allèle 30 du gène *FimH*), est à l'origine de la majeure partie de la transmission verticale de la co-résistance aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération (C3G) par production de CTX-M-15 (163). La proportion du sous-clone H30 parmi les souches ST131 est concordante dans les études disponibles, H30 représentant plus de 90% des souches ST131 productrices de BLSE (163-167). Cette étude avait pour objectif de connaître l'épidémiologie du clone *E. coli* ST131 producteur de BLSE au CHRU de Besançon entre 2000 et 2014.

Matériels et méthodes. Toutes les souches de *E. coli* non sensibles aux C3G issues de prélèvements cliniques de patients hospitalisés au CHRU de Besançon sont systématiquement testées pour la présence de BLSE. Ces données ont donc été recueillies rétrospectivement de janvier 2000 à décembre 2014. L'incidence des *E. coli* BLSE a été calculée et exprimée en nombre de nouveaux cas pour 1000 patients-jours. Chaque souche de *E. coli* productrice de BLSE a ensuite été testée pour identifier le clone ST131 par une méthode de détection rapide par MALDI-TOF MS. Le type de BLSE a été identifié par PCR et séquençage. Le génotypage du gène *FimH* a été réalisé pour toutes les souches ST131. La sensibilité à 16 antibiotiques a été testée et les souches non-sensibles à la ciprofloxacine ont été classées comme H30-R. Une PCR spécifique a été réalisée pour identifier le sous clone H30-Rx. La clonalité de toutes les souches de *E. coli* ST131 productrices de BLSE a été étudiée par PFGE.

Résultats. Dans notre hôpital, l'incidence des souches de *E. coli* productrices de BLSE a augmenté de 0,018 cas pour 1000 patients-jours en 2000 à 0,50 en 2014. Les premières souches ST131 ont été identifiées en 2006. Sur l'ensemble de la période étudiée, le clone ST131 représente 18,1% du total des souches de *E. coli* productrices de BLSE. Le typage a montré que 75,9% des isolats ST131 étaient H30 et parmi ceux-ci, 81,3% étaient H30-Rx. Les

BLSE produites étaient majoritairement du groupe CTX-M avec 94 CTX-M-15, 19 CTX-M-1, 10 CTX-M-27, 8 CTX-M-14, et 4 d'autres types de CTX-M. L'analyse PFGE a montré une grande diversité clonale augmentant au cours de l'étude : les 141 souches de *E. coli* ST131 appartiennent à 53 pulsotypes dont 2 dominants regroupant 36 et 17 isolats.

Conclusion. Au CHRU de Besançon, les souches de *E. coli* ST131 constituent un clone prédominant parmi les souches de *E. coli* productrices de BLSE même si elles ne représentent que 20% des cas. De plus, le clone ST131 ne devrait pas être considéré comme une entité unique, mais plutôt comme un ensemble de sous-clones distincts. Toutefois la diffusion du clone ST131 reste principalement clonale, attribuable à la propagation de 2 clades, C1/H30-R et C2/H30-Rx (168, 169).

5.1.3.2. Texte de l'article

Sauget M, Cholley P, Vannier A, Thouverez M, Nicolas-Chanoine M.H, Hocquet D, Bertrand X. Trends of ESBL-producing *Escherichia coli* Sequence Type 131 and its H30 subclone in a French hospital over a 15-year period. Int J Antimicrob Agents 2016 ; 48 : 744-747. (IF 2015 : 4.10)



Short Communication

Trends of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 subclone in a French hospital over a 15-year period

Marlène Sauget^{a,b,c}, Pascal Cholley^{a,b}, Andréa Vannier^a, Michelle Thouverez^{a,b}, Marie-Hélène Nicolas-Chanoine^{d,e}, Didier Hocquet^{a,b,c}, Xavier Bertrand^{a,b,*}

^a Service d'hygiène hospitalière, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France

^b UMR 6249 Laboratoire Chrono-environnement, Université de Bourgogne-Franche-Comté, Besançon, France

^c Centre de ressources biologiques Ferdinand Cabanne, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France

^d Service de microbiologie, Hôpital Beaujon AP-HP, Clichy, France

^e Faculté de médecine D. Diderot, INSERM UMR 1149, Université Paris 7, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2016

Accepted 15 September 2016

Keywords:

Multidrug resistance

Extended-spectrum β -lactamase

ESBL

PFGE

ABSTRACT

Sequence type 131 (ST131) is a predominant lineage among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. It plays a major role in the worldwide dissemination of *E. coli* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). Here we describe the long-term epidemiology of this clonal group in a French university hospital, where the incidence of ESBL-producing *E. coli* has increased from 0.018 case per 1000 patient-days in the year 2000 to 0.50 case per 1000 patient-days in 2014. The first of the 141 ST131 isolates was recovered in 2006, and the ST131 clonal group accounted for 18.1% of total ESBL-producing *E. coli* over the whole period (2000–2014). Subclonal typing showed that 75.9% (107/141) of ST131 isolates were H30, of which 81.3% (87/107) were H30-Rx. The large majority (137/141) of ESBLs produced were of the CTX-M group, with 94 CTX-M-15, 19 CTX-M-1, 10 CTX-M-27, 8 CTX-M-14 and four other CTX-M types ($n = 6$). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis showed high diversity, which increased during the course of the study. The 141 ST131 isolates clustered in 53 pulsotypes (PTs), with 2 dominant PTs (PT14 and PT13) with 36 and 17 isolates, respectively. These findings showed that ST131 was a predominant clone among ESBL-producing *E. coli* in our hospital, even though it only accounted for <20%. Moreover, ST131 should be regarded not as a unified entity but as a cluster of distinct clonal subsets even if the increase in resistance within ST131 has a strong clonal basis, being attributable mainly to the spread of C1/H30-R and C2/H30-Rx clades.

© 2016 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

The worldwide spread of sequence type 131 (ST131) *Escherichia coli* has significantly contributed to the dissemination of *E. coli* resistant to fluoroquinolones and producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) [1]. Phylogeny studies based on whole-genome analysis of the ST131 population demonstrated that a single subclone, named H30 after its allele 30 of *fimH*, accounted for most of the vertical transmission of the co-resistance to fluoroquinolones and third-generation cephalosporins by production of CTX-M-15 [2]. In contrast to the ST131 frequency among ESBL-producing *E. coli*, the proportion of H30 subclone among ST131 is highly congruent

between studies, with H30 representing >90% of ESBL-producing ST131 isolates [2–6]. Only two studies, one in a Japanese region and another in a Canadian region, have described the long-term (>10 years) epidemiology of ST131 isolates [7,8]. The objective of this study was to characterise the epidemiology of ESBL-producing ST131 in a French hospital in France during the last decade.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial isolates

Besançon Hospital is a French university-affiliated hospital with 1200 acute-care beds. All *E. coli* isolates obtained from clinical specimens of inpatients were routinely tested for ESBL production using the synergy test [9]. Data were collected retrospectively from January 2000 to December 2014 and duplicate isolates were removed over the whole time period. The incidence of ESBL-producing *E. coli* was expressed as the number of new cases per 1000 patient-days.

* Corresponding author. Service d'hygiène hospitalière, Centre Hospitalier Universitaire, 3 Boulevard Fleming, Besançon Cedex 25030, France. Fax: +33 3 81 66 89 14.

E-mail address: xbertrand@chu-besancon.fr (X. Bertrand).

2.2. Detection of ST131 and its subclones

ESBL-producing *E. coli* isolates collected during this period were tested by a previously described rapid method that identifies ST131 using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) [10]. ST131 isolates were assessed for subclonal *fimH* status by PCR and sequencing [11]. Ciprofloxacin-non-susceptible H30 isolates were classified as H30R. In addition, H30-Rx isolates were identified using a subclone-specific PCR [3].

2.3. Extended-spectrum β -lactamase identification

ESBLs were identified by PCR and sequencing as previously described [12].

2.4. Antibiotic susceptibility testing

The activity of 16 antibiotics was assessed against the ESBL-producing ST131 isolates [9]. The drugs tested included nalidixic acid, ofloxacin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid, ticarcillin/clavulanic acid, piperacillin/tazobactam (TZP), cefotaxime, ceftazidime, cefepime, cefoxitin, imipenem, ertapenem, fosfomycin, nitrofurantoin, tobramycin and amikacin.

2.5. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

The clonality of all ESBL-producing ST131 isolates was investigated by PFGE following *Xba*I digestion. GelCompar software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) was used for cluster analysis. Dice

correlation coefficients were grouped and the UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) clustering algorithm was used to depict the groups as a dendrogram. Pulsotypes (PTs) were defined according to international recommendations [13].

3. Results

Between 2000 and 2014, a total of 1028 non-duplicate ESBL-producing *E. coli* were isolated from inpatients of Besançon Hospital (ranging from 6 cases in 2000 to 173 cases in 2014). The incidence of ESBL-producing *E. coli* increased from 0.018 case per 1000 patient-days in the year 2000 to 0.50 case per 1000 patient-days in 2014 (Fig. 1). During this time period, 777 non-duplicate ESBL-producing *E. coli* isolates had been stored and were available for further analysis. Unfortunately, only 17 of 86 isolates had been stored between 2000 and 2005. During the whole period, the ST131 clonal group accounted for 18.1% ($n = 141$) of all ESBL-producing *E. coli* (Table 1). The 141 ST131 isolates were predominantly isolated from urine ($n = 98$; 69.5%); other clinical sites were deep infections ($n = 12$), blood ($n = 8$), genital tract ($n = 7$), pulmonary ($n = 7$), wounds ($n = 5$) and gastric fluid from neonates ($n = 4$). The first ST131 isolate (H30-Rx) was recovered in 2006. The ST131 proportion among ESBL-producing *E. coli* was globally stable, ranging from 16.7% to 20.4% between 2006 and 2014 (Table 1). Subclonal typing showed that 107 (75.9%) of the 141 ST131 isolates were H30, of which 87 were H30-Rx (81.3% of total H30). A peak in the proportion of H30-Rx among total ESBL-producing *E. coli* was observed in 2013 (17.9%) followed by a sharp decrease in 2014 to 6.0% (Table 1). Among non-H30 isolates, the *fimH* alleles detected included H41 ($n = 7$; 5.0%), H58 ($n = 5$; 3.5%), H22 ($n = 5$; 3.5%) and 14 other *fimH* types.

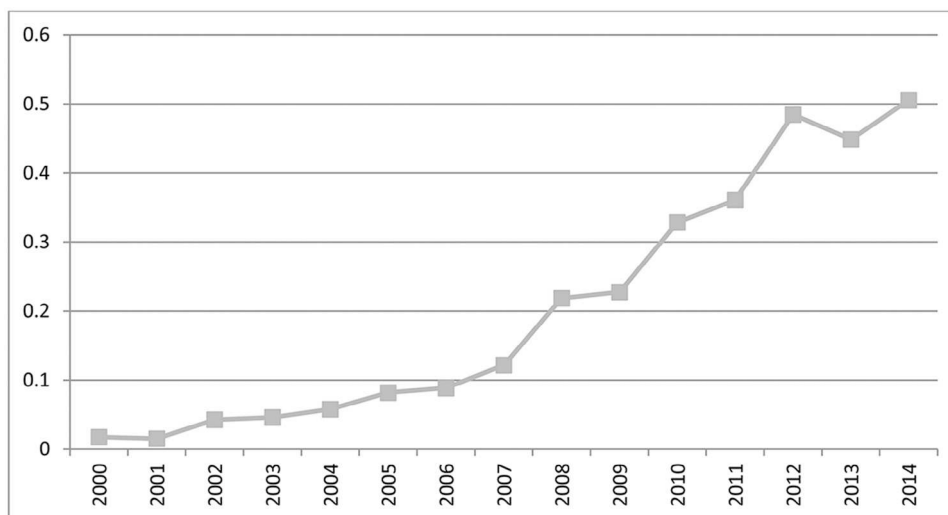


Fig. 1. Incidence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* per 1000 patient-days in Besançon Hospital, 2000–2014.

Table 1

Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Besançon Hospital, 2000–2014.

Period	No. of ESBL-producing <i>E. coli</i> isolated	No. of ESBL-producing <i>E. coli</i> tested	No. of ST131 (% among ESBL-producing <i>E. coli</i> tested)	No. of H30 ST131 isolates	No. of H30-Rx ST131 isolates (% among ESBL-producing <i>E. coli</i> tested)
2000–2005	86	17	0	0	0
2006–2007	69	48	8 (16.7)	7	6 (12.5)
2008–2009	147	70	13 (18.6)	8	8 (11.4)
2010	112	103	18 (17.5)	11	9 (8.7)
2011	124	114	20 (17.5)	14	9 (7.9)
2012	167	157	32 (20.4)	27	23 (14.6)
2013	150	134	26 (19.4)	25	24 (17.9)
2014	173	134	24 (17.9)	15	8 (6.0)
2000–2014	1028	777	141 (18.1)	107	87 (11.2)

Table 2
Characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing ST131 *Escherichia coli* isolates in Besançon Hospital, 2006–2014 ($n = 141$ non-duplicate isolates).

<i>fimH</i> type	No.	Period of isolation	PFGE type (no. of isolates)	ESBL type	Main antibiotic susceptibility traits
<i>H30</i> -Rx	87	2006–2014	PT6 (7) PT13 (17) PT14 (34) PT15 (4) PT17 (8) 14 other PTs (17)	CTX-M-15 CTX-M-15 CTX-M-15 CTX-M-15 CTX-M-15 CTX-M-15	100% FQ ^R , 42.8% FOX ^R , 42.8% TZP ^R 100% FQ ^R , 11.8% NIT ^R 100% FQ ^R , 79.4% TOB ^R 100% FQ ^R , 100% TOB ^R 100% FQ ^R , 100% TOB ^R 100% FQ ^R
Non-Rx <i>H30</i>	20	2007–2014	PT14 (2) PT19 (3) PT22 (9) 6 other PTs (6)	CTX-M-14 (1) and CTX-M-27 (1) CTX-M-3 CTX-M-27 CTX-M-1 (3), CTX-M-14 (2) and CTX-M-15 (1)	100% FQ ^R 100% FQ ^R 100% FQ ^R 66.7% FQ ^R
<i>H41</i>	7	2008–2014	PT1 (1) PT28 (4) PT30 (1) PT33 (1)	SHV-2a CTX-M-14 (3) and CTX-M-15 (1) CTX-M-1 CTX-M-15	28.6% CIP ^R , 85.7% OFX ^R
<i>H58</i>	5	2009–2012	PT40 (1) PT44 (3) PT46 (1)	CTX-M-14 CTX-M-1 CTX-M-15	
<i>H22</i>	5	2010–2012	PT34 (3) PT37 (1) PT50 (1)	CTX-M-1 CTX-M-1 CTX-M-1	100% FQ ^S , 100% AMC ^S , 100% CAZ ^S
Other	17	2006–2014	17 PTs (17)	CTX-M-1 (7), CTX-M-9 (1), CTX-M-14 (1), CTX-M-15 (3), CTX-M-44 (1), CTX-M-55 (1), TEM-52 (2), SHV-12 (1)	23.5% FQ ^R

PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; FQ^R, fluoroquinolone (ciprofloxacin and ofloxacin)-resistant; FOX^R, ceftoxitin-resistant; TZP^R, piperacillin/tazobactam-resistant; NIT^R, nitrofurantoin-resistant; TOB^R, tobramycin-resistant; CIP^R, ciprofloxacin-resistant; OFX^R, ofloxacin-resistant; FQ^S, fluoroquinolone (ciprofloxacin and ofloxacin)-susceptible; AMC^S, amoxicillin/clavulanic acid-susceptible; CAZ^S, ceftazidime-susceptible.

PFGE analysis showed that the 141 isolates clustered in 53 PTs (PT1–PT53). PT14 and PT13 were the two most prevalent and included 36 and 17 isolates, respectively. Isolates of these two major PTs were *H30*-Rx and produced CTX-M-15, with the exception of two isolates from PT14 that were non-Rx *H30* and produced CTX-M-14 and CTX-M-27 (Table 2). PT14 isolates were recovered from 2006–2013 with a peak of prevalence in 2012–2013. PT13 isolates were recovered from 2010–2014 with a peak in 2012. There were eight instances of paired or tripled isolates with indistinguishable PTs. Six of these patterns involved *H30*-Rx isolates, one *H30* non-Rx and one *H22*. In four cases, opportunities for hospital cross-transmission were clearly identified (isolates from patients in the same unit with overlapping stays, or in one case a mother and her two twins). Interestingly, the diversity of PTs increased during the study period. Hence, only 4 PTs were retrieved from 2006–2008, whereas 18 PTs were retrieved in 2014.

A large majority (137/141) of the ESBLs produced were of the CTX-M group, with 94 CTX-M-15, 19 CTX-M-1, 10 CTX-M-27, 8 CTX-M-14, 3 CTX-M-3, 1 CTX-M-9, 1 CTX-M-44 and 1 CTX-M-55. Table 2 shows associations between *fimH* groups, ESBL types, PFGE profiles and main resistance traits.

Resistance rates were high for fluoroquinolones (>82%) and extended-spectrum cephalosporins (>84%), were higher for tobramycin than for amikacin (55.3% vs. 3.5%), were relatively low for TZP (19.1%), and were <10% for ceftazidime (5.7%), nitrofurantoin (3.5%) and fosfomycin (1.4%). No isolates were resistant to carbapenems. All *H30*-Rx isolates were resistant to fluoroquinolones, whereas *H22* isolates remained susceptible to this antibiotic class. Resistance to specific antimicrobials such as ceftazidime, tobramycin and nitrofurantoin was partially linked to specific PTs (Table 2).

4. Discussion

Two recent analyses of the whole-genome sequences of large collections of ST131 established that clades C1/*H30*-R and C2/*H30*-Rx emerged in the 1980s, most likely in North America [14,15]. The evolutionary history suggests that the *fimH30* allele was acquired by a single fluoroquinolone-susceptible ancestor, which became

resistant to these antibiotics (*H30*R). Further acquisition of *bla*_{CTX-M-15} created another distinct subclone (*H30*-Rx) which derived from a single ancestor within *H30*R. *H30* subclones have disseminated globally as a result of clonal expansion [1]. Few studies have traced the occurrence of ST131 multidrug-resistant clades in a specific healthcare facility. In Besançon Hospital, ESBL-producing *E. coli* were rare in the early 2000s, with only six and five isolates in 2000 and 2001, respectively. The incidence of infections with ESBL-producing *E. coli* began to rise in 2002. This trend occurred before the detection of ST131 *H30*-Rx isolates in 2006. Interestingly, Matsumura et al [7] and Blanco et al [16] also documented the occurrence of *H30*-Rx in their hospitals in the same year, in Japan and Spain, respectively, whereas Peirano and Pitout reported this emergence in Canada in 2003 [8]. From 2006 to 2014, the proportion of ST131 among ESBL-producing *E. coli* was stable in Besançon Hospital, varying from 16.7% to 20.4%. This proportion is in the lower range of those reported by numerous studies (ranging from 10 to 70% among ESBL-producers) [1]. This confirms the lower prevalence of ST131 in France compared with that reported in other countries (UK, USA and New Zealand) [5]. *fimH* typing revealed that 107 of the 141 ST131 isolates were of *H30* subclone (75.9%). This proportion is a bit lower than that observed in other North American studies [1]. Matsumura et al reported a proportion of 86% over a decade in Japanese patients [7]. Among 107 *H30* isolates in the current collection, 87 (81.3%) were *H30*-Rx. This proportion is close to that observed by Can et al in a 2010–2014 Turkish survey (75%) in which there was a decrease in the *H30*-Rx ratio over time [17]. We also observed important variations in the *H30*-Rx ratio in Besançon Hospital. For instance, the *H30*-Rx ratio among ESBL-producing *E. coli* was 17.9% in 2013 and only 6.0% in 2014. All *H30*-Rx isolates and 90% (18/20) of *H30*-non-Rx isolates were resistant to ciprofloxacin. Conversely, *H41* isolates, very likely belonging to O16 serotype clade A, were mostly susceptible to ciprofloxacin (Table 2). Susceptibility to ciprofloxacin of *H41* isolates was also observed in Asia where this subclone is frequent and is mainly associated with the production of CTX-M-14 [7,18]. Until recently, this subclone was rarely reported in Europe [19].

H22 clade B is thought to be the predecessor of H30, which evolved in H30R. Most H22 isolates are susceptible to fluoroquinolones and cephalosporins and rarely produce ESBLs [14]. Here we identified five H22 isolates that produced CTX-M-1 and remained susceptible to fluoroquinolones. These isolates probably resulted from the recent acquisition of CTX-M-1 by the ancestral wholly susceptible H22 ST131.

We also witnessed the emergence of C1/H30R clade producing CTX-M-27 in 2010 and that spread mainly via a unique PT (PT22). This clade has successfully disseminated in Japan from 2008 [7].

PFGE typing revealed a high diversity of PTs among ST131 subclones, with a small number of high-frequency PTs predominating. PT14 accounted for 25.5% of the population. PTs differ in prevalence over time, and resistance traits (i.e. fluoroquinolone resistance profile, type of ESBL produced) are frequently PT-specific. The distribution and diversity of the PTs in our local collection reflected that observed in a much larger international collection [20]. PFGE typing also suggests that ST131 acquisition in this tertiary acute-care hospital is infrequent as only four cases of hospital cross-transmission were clearly identified.

Limitations of this study are that it only included ESBL-producing *E. coli* from a single hospital with few isolates available from 2000–2005. The collection did not include non-ESBL-producing ST131 isolates. We did not search the virulence factors associated with ST131 subclones and did not perform whole-genome analysis. However, this study explored an unbiased and longitudinal collection of ESBL-producing *E. coli* collected over 15 years. We defined here for the first time the temporal prevalence trends for ST131 and its subclonal groups in Europe. ST131 was a predominant clone among ESBL-producing *E. coli*, but it only accounts for <20% of total ESBL-producing *E. coli*. The current findings also confirm that ST131 should be regarded not as a unified entity but as a cluster of distinct clonal subsets even if the increase in resistance within ST131 has a strong clonal basis, being mainly attributable to the emergence C1/H30-R and C2/H30-Rx clades.

Funding: This work was supported by the University Hospital of Besançon (Besançon, France).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

- [1] Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. Clin Microbiol Rev 2014;27:543–74.
- [2] Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, et al. The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. MBio 2013;4:e00377–13.
- [3] Banerjee R, Robicsek A, Kuskowski MA, Porter S, Johnston BD, Sokurenko E, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 and H30-Rx subclones among extended-spectrum- β -lactamase-positive and -negative *E. coli* clinical isolates from the Chicago region, 2007 to 2010. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:6385–8.
- [4] Colpan A, Johnston B, Porter S, Clabots C, Anway R, Thao L, et al. *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. Clin Infect Dis 2013;57:1256–65.
- [5] Lafolie J, Nicolas-Chanoine MH, Grenouillet F, Hocquet D, Bertrand X. Prevalence of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 subclone among *E. coli* isolates in a French hospital. Int J Antimicrob Agents 2014;44:466–8.
- [6] Peirano G, van der Bij AK, Freeman JL, Poirel L, Nordmann P, Costello M, et al. The characteristics of *Escherichia coli* ST131 that produce extended-spectrum β -lactamases: global distribution of the H30-Rx sublineage. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:3762–7.
- [7] Matsumura Y, Johnson JR, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, et al. CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. J Antimicrob Chemother 2015;70:1639–49.
- [8] Peirano G, Pitout JD. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* sequence type 131 isolates causing bloodstream infections in a Canadian region with a centralized laboratory system: rapid emergence of the H30-Rx sublineage. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:2699–703.
- [9] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1; 2013. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf. [Accessed 2 November 2016].
- [10] Lafolie J, Sauget M, Cabrolier N, Hocquet D, Bertrand X. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies? J Hosp Infect 2015;90:208–12.
- [11] Paul S, Linardopoulou EV, Billig M, Tchesnokova V, Price LB, Johnson JR, et al. Role of homologous recombination in adaptive diversification of extraintestinal *Escherichia coli*. J Bacteriol 2013;195:231–42.
- [12] Bréchet C, Plantin J, Sauget M, Thouverez M, Talon D, Cholley P, et al. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. Clin Infect Dis 2014;58:1658–65.
- [13] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233–9.
- [14] Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, De Maio N, Moore CE, Sebra R, et al. Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. MBio 2016;7:e02162.
- [15] Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, et al. Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. MBio 2016;7:e00347–16. Erratum in: mBio 2016;7:pii: e00958–16.
- [16] Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, et al. Four main virotypes among extended-spectrum- β -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. J Clin Microbiol 2013;51:3358–67.
- [17] Can F, Kurt-Azap O, Nurtop E, Ispir P, Seref C, Ergonul O. Molecular epidemiology of bloodstream-associated *Escherichia coli* ST131 H30-Rx subclone infection in a region with high quinolone resistance. J Med Microbiol 2016;doi:10.1099/jmm.0.000224. [Epub ahead of print].
- [18] Zhong YM, Liu WE, Liang XH, Li YM, Jian ZJ, Hawkey PM. Emergence and spread of O16-ST131 and O25b-ST131 clones among faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* in healthy individuals in Hunan Province, China. J Antimicrob Chemother 2015;70:2223–7.
- [19] Blanc V, Leflon-Guibout V, Blanco J, Haenni M, Madec JY, Rafignon G, et al. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. J Antimicrob Chemother 2014;69:1231–7.
- [20] Johnson JR, Nicolas-Chanoine MH, DeRoy C, Castanheira M, Robicsek A, Hansen G, et al. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967–2009. Emerg Infect Dis 2012;18:598–607.

5.2. Typage de *Staphylococcus aureus* par MALDI-TOF MS

5.2.1. Etude 4 – Identification de *S. aureus* CC398 par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

5.2.1.1. Présentation de l'article

Objectif. Le clone de *Staphylococcus aureus* ST398 a émergé au cours de la dernière décennie via deux sous-populations distinctes, l'une résistante à la méticilline (SARM) chez les animaux d'élevage et l'autre sensible à la méticilline (SASM) chez l'homme. Nous emploierons de manière indifférenciée les termes CC398 et ST398 compte tenu du fait que l'immense majorité des souches CC398 sont des ST398. A titre d'exemple, dans notre collection une seule souche de CC398 n'était pas ST398. Au CHRU de Besançon, ST398 (version SASM) est impliqué dans une proportion importante d'infections graves chez des personnes fragiles et est associé à une augmentation de la mortalité à 30 jours. Sa diffusion est inquiétante et sa détection rapide permettrait un meilleur suivi épidémiologique. La technique MALDI-TOF MS, maintenant bien implantée dans les laboratoires de microbiologie, pourrait être utilisée à ces fins. Cette étude visait à mettre au point une méthode de détection rapide de *S. aureus* CC398 par MALDI-TOF MS.

Matériels et méthodes. Pour définir la stratégie de typage, nous avons utilisé 300 souches de *S. aureus* caractérisées par une PCR spécifique du clone CC398. Elles se répartissaient en 2 groupes : 60 souches CC398 et 240 souches non CC398. Pour valider notre stratégie, nous avons utilisé 326 autres souches. Un extrait protéique de chaque souche cultivée sur gélose MH a été déposé sur une cible MALDI-TOF puis recouvert de matrice HCCA. Les spectres ont été acquis sur la zone de masse 2-20 kDa puis analysés avec le logiciel ClinProTools® 3.0 (Bruker Daltonik) pour construire les modèles de typage.

Résultats. Un modèle de typage différenciait les souches CC398 des souches non CC398 avec une capacité de reconnaissance de 96% et une validation intrinsèque de 89%. Lors de l'étape de validation de ce modèle, 94% des souches (307 sur 326) ont été bien classées avec une sensibilité de 93 % et une spécificité de 95%. Six souches CC398 et 13 souches non CC398 ont été mal classées.

Conclusion. La technologie MALDI-TOF MS permet d'identifier les souches CC398 rapidement et sans surcoût. Elle a donc le potentiel pour devenir un outil épidémiologique de première ligne qui identifie rapidement un groupe clonal responsable d'une mortalité importante chez les patients hospitalisés.

5.2.1.2. Texte de l'article

Sauget M, van der Mee-Marquet N, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can detect *Staphylococcus aureus* clonal complex 398. J Microbiol Methods 2016 ; 127 : 20-23. (IF 2015 : 1,86)



Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Mass spectrometry can detect *Staphylococcus aureus* clonal complex 398



Marlène Sauget^{a,b,*}, Nathalie van der Mee-Marquet^c, Xavier Bertrand^a, Didier Hocquet^{a,b}

^a Service d'Hygiène Hospitalière, UMR 6249 Chrono-Environnement, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Université de Franche-Comté, Besançon, France

^b Centre de Ressources Biologiques – Filière microbiologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France

^c Service de Bactériologie et Hygiène, UMR1282 ISP, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Tours, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2016

Received in revised form 13 May 2016

Accepted 14 May 2016

Available online 15 May 2016

Keywords:

Typing

MALDI-TOF MS

S. aureus

Bruker

Mass spectrometry

ABSTRACT

Within the last decade methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to CC398 has become a worldwide threat associated with livestock. More recently, methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) belonging to CC398 have been increasingly reported as a cause of invasive infections in patients without livestock contact. It appears therefore necessary to implement a convenient tool for the surveillance this emerging pathogen. We evaluated the MALDI-TOF MS as a tool for rapid detection of *S. aureus* CC398.

We used 626 *S. aureus* isolates characterized by a CC398-specific PCR, to constitute independent training (300 isolates including 60 isolates CC398) and validation sets (326 isolates including 82 isolates CC398). Fifteen peak biomarkers of CC398 were identified from the mass spectra of the training set. Ninety four % (307 of 326) of strains of the validation set were well assigned with an overall sensitivity of 93% and a specificity of 95%. Six CC398 and 13 non-CC398 isolates were misclassified.

With MALDI-TOF MS, clinical laboratories could rapidly detect *S. aureus* CC398 associated with a higher mortality in hospitalized patients.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. INTRODUCTION

During the past decade, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of sequence type 398 (ST398), which belongs to clonal complex (CC) 398, has gained much attention because it has been found in livestock, food products and causes infections in humans worldwide (Smith and Pearson, 2011; Witte et al., 2007). More recently, methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) CC398 has been increasingly reported in Europe, the USA and China as a cause of invasive infections in patients without contact with livestock (Fan et al., 2009; Uhlemann et al., 2012; Valentin-Domelier et al., 2011; Verkade et al., 2012). Most notably, the incidence of CC398 MSSA bloodstream infections has been increasing since 2007 in France (Valentin-Domelier et al., 2011) and our group recently found that bloodstream infections due to CC398 MSSA were associated with higher 30-day mortality than those due to non-CC398 MSSA (Bouiller et al., 2016). It appears therefore necessary to

implement a convenient tool for the surveillance this emerging pathogen. CC398 strains are identified by multilocus sequence typing (MLST) or *spa* typing (Enright et al., 2000). Since these typing methods are time-consuming, CC398-specific PCR that targets the sequence of the gene *sau1hds* was implemented (Stegger et al., 2011). This simple and reliable PCR technique is used in research laboratories but remains inappropriate for clinical laboratories.

Mass Spectrometry Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF MS) identifies microbial species by analysis of total protein (Bizzini and Greub, 2010). For bacteria, this technique is based on the generation of mass spectra from whole cells and their comparison to reference spectra (Fenselau and Demirev, 2001). Compared to traditional biochemical or molecular techniques, MALDI-TOF MS allows for a quick, automated, simple and relatively cheap bacterial identification. Additionally, sub-species groups such as *Listeria monocytogenes* serotypes, *Yersinia enterocolitica* biotypes, *Salmonella enterica* subspecies, *S. aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* sequence types can be further identified with MALDI-TOF MS (Barbuddhe et al., 2008; Boggs et al., 2012; Cabrolier et al., 2015; Dieckmann et al., 2008; Lafolie et al., 2015; Sauget et al., 2014; Stephan et al., 2011).

* Corresponding author at: Infection Control Unit, University Hospital of Besançon, 3, boulevard Fleming, 25030 Besançon Cedex, France.
E-mail address: msauget@chu-besancon.fr (M. Sauget).

We provided here a simple, rapid MALDI-TOF MS-based method that can be used in the routine clinical laboratories to identify *S. aureus* isolates of CC398.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

A panel of 626 well-characterized clinical isolates of *S. aureus* were collected between 2007 and 2014 and stored at -80°C until use at the Centre de Ressources Biologiques - Filière Microbiologie (Biobanque BB-0033-00090) at the University Hospital of Besançon (Table 1). All the isolates were identified as *S. aureus* by MALDI-TOF MS with a log value ≥ 2 according to the manufacturer's recommendations (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). PCR method described by Stegger et al. was used to classify all the isolates into two groups: CC398 or non-CC398 (Stegger et al., 2011). We deliberately included as much as possible different STs in each category to extend the genetic diversity of the tested panel (Table 1).

2.2. Samples preparation for MALDI-TOF MS

For experiments with high-quality spectra, we used the ethanol-formic acid extraction method recommended by Bruker Daltonics. After overnight culture on Mueller-Hinton agar (bioMérieux, Craponne, France), about half a loopful of fresh culture was suspended in 300 μl of demineralized water. Then 900 μl of absolute ethanol was added and the suspension was mixed for 15 s on a vortexer. The suspension was centrifuged at $18,000 \times g$ for 2 min. The supernatant was removed and the ethanol-killed bacterial pellet was used for protein extraction. Fifty μl of 70% formic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was added before vortexing for 30 s for cell wall disruption. Then 50 μl of pure acetonitrile (Sigma-Aldrich) was added. The suspension was vortexed for 30 s and centrifuged at $18,000 \times g$ for 2 min. One μl of the supernatant was spotted on the target plate for MALDI-TOF MS experiments. The spots were overlaid with 1 μl of matrix solution (saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix in 50% acetonitrile with 2.5% trifluoroacetic acid, Bruker Daltonik) and air dried for 15 min.

2.3. MALDI-TOF MS measurements

Spectra were obtained with a Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH) in the linear positive ion mode, with a laser frequency of 60 Hz. The mass range was m/z 2000 to 20,000. Parameter settings for Microflex LT were: ion source 1: 20 kV, ion source 2: 18.5 kV, lens: 6 kV, pulsed ion extraction: 100 ns. Each series of measurements was preceded by a calibration with a Bacterial Test Standard (Bruker Daltonik) that contains an *E. coli* reference strain along with RNase A and myoglobin. For each sample, the sum spectra of 240 single spectra were acquired, in portions of 40 single spectra from 6 different positions on a spot.

2.4. Identification of peak biomarkers for the *S. aureus* CC398

Automated analysis of the data was performed using Clin-ProTools 3.0 (Bruker Daltonik) for peaks ranging from m/z 2000 to 20,000. This software uses a standard data preparation workflow that includes spectra pretreatment and peak calculation operation. We used a training set of 300 isolates to calculate models that distinguish CC398 isolates. Two groups were defined, the CC398 isolates ($n = 60$) and the non-CC398 isolates ($n = 240$). The reliability and the accuracy of the models were assessed through recognition capability and cross-validation values. The pertinence of the generated models was verified with an independent validation set of 326 isolates (including 82 CC398 isolates and 244 non-CC398 isolates) (Table 1). The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the method were calculated with the Wilson score method using OpenEpi 3.03a software (www.OpenEpi.com).

3. Results and discussion

We defined here a method for the detection of *S. aureus* CC398 by the analysis of MALDI-TOF MS spectra with the ClinProTools 3.0 (Bruker Daltonik) software. The great majority of the m/z peaks were shared by all the CCs in which highly abundant proteins such as ribosomal and periplasmic proteins are constantly expressed (Holland et al., 1999). However, minimal differences in mass spectrum (i.e. mass, signal-to-noise, intensity, peak heights, and peak areas) were detected by the ClinProTools software and allowed us to create a model of detection of CC398 *S. aureus*.

3.1. Creation and validation of a *S. aureus* CC398 recognition model

In agreement with the good practice guidelines for biomarker discovery, the predictive biomarkers were first developed with a training set of data and then validated on an independent set of data (25). With a training set of spectra from 300 *S. aureus* isolates, we created a model that was able to distinguish CC398 isolates from non-CC398 isolates. This model was based on a Support Vector Machine algorithm that used 15 peak markers (Table 2). It has a recognition capability of 96% and a cross-validation of 89%. We further tested the model with spectra from 326 *S. aureus* isolates independent from those used in the training set (Table 1). The test has a good positive predictive value (85%) and high values of sensitivity (93%), specificity (95%), and negative predictive value (97%) (Table 4). Overall, 94% of strains (307 of 326) were well classified. The test assigned 76 of the 82 CC398 isolates and 231 of the 244 non-CC398 isolates correctly (Table 3). Six CC398 strains were misclassified. Thirteen non-CC398 strains were misclassified, 2 of which belonged to ST30, 2 other ST30 having been correctly classified.

3.2. Discussion of the model

All the isolates were classified into two groups (CC398 or non-CC398) using the PCR method described by Stegger et al. in 2011 (Stegger et al., 2011). PCR specifications were evaluated on a large collection ($n = 1307$) and showed high sensitivity (100%) and specificity (100%). Later, non-CC398 sequence types that had not been tested by

Table 1

Complex clonal and sequence type of the 626 strains of *S. aureus* used in the study.

Clonal complex ^a	Creation of the model		Validation of the model	
	<i>n</i>	Sequence type (<i>n</i>)	<i>n</i>	Sequence type (<i>n</i>)
CC398	60	ST398 (31)	82	ST398 (6), ST3151 (1), ST3152 (1)
Non-CC398	240	ST1 (2), ST5 (5), ST6 (2), ST8 (8), ST9 (1), ST15 (2), ST22 (3), ST25 (1), ST30 (3), ST45 (3), ST63 (1), ST78 (1), ST80 (2), ST81 (2), ST88 (2), ST121 (2), ST247 (1), ST1083 (1), ST3233 (1)	244	ST7 (1), ST10 (1), ST30 (4), ST34 (1), ST88 (1), ST199 (1), ST3231 (1), ST3232 (1)
Total	300		326	

^a As defined by the CC398-specific PCR described by Stegger et al. (Stegger et al., 2011).

Table 2

Peaks (start and end of the integrated regions, weight in the model) used for the classification of *S. aureus* into CC398 and non-CC398 (ClinProTools 3.0, Bruker Daltonik).

Mass (m/z)	Start mass (m/z)	End mass (m/z)	Weight
2175.82	2172.13	2179.55	0.5022
2717.46	2712.74	2722.99	0.6406
4192.80	4186.90	4199.63	0.5499
4512.41	4501.61	4523.63	0.8470
4539.93	4533.71	4547.59	0.4975
5033.94	5022.30	5043.57	0.5329
5071.58	5064.21	5082.89	0.5336
5292.66	5279.07	5296.78	0.7575
5439.82	5428.48	5449.90	1.3384
5727.33	5720.83	5748.49	0.5132
7420.73	7408.14	7438.03	0.8419
7663.83	7657.08	7688.28	0.8465
7696.26	7688.28	7708.02	0.6358
8228.44	8214.87	8242.08	0.4923
10,324.30	10,309.95	10,348.08	0.7298

Stegger et al. have been shown to give positive PCR reactions. This is the case for isolates of ST5, ST9, ST45, ST88, and ST105 (Wardyn and Smith, 2014; Sauget M., personal data). We included here 11 isolates of these ST in the group non-CC398 used in the construction of the model. Of note, our MALDI-TOF MS technique correctly classified the isolate of ST88 tested in the validation step (Table 1).

The most important difficulty in the definition of a typing strategy relies on the availability of a large and diverse collection of well-characterized isolates. The collection should include the largest number of isolates with the greatest genetic diversity. All typing methods are indeed limited to the bacterial collection which it has been tested against. It greatly complicate the comparison between methods. Hence, our typing method included 15 discriminatory peaks in its typing scheme (Table 2). Four of them (*m/z* 4512, 5033, 5071, 5439) have been previously described for sub-species discrimination of *S. aureus* (Bohme et al., 2012; Josten et al., 2013; Ostergaard et al., 2015; Wolters et al., 2011; Zhang et al., 2015). The peak at *m/z* 4512 has been retrieved by others in CC398 isolates but also in isolates of CC5, CC8, CC22, CC30, CC45, and CC88 (Josten et al., 2013; Wolters et al., 2011). The peak at *m/z* 5032–5034 and that at *m/z* 5437–5440 have been described in CC398 but also in other clonal complexes such as the five major MRSA clones CC5, CC8, CC22, CC30, and CC45 (Ostergaard et al., 2015; Wolters et al., 2011). At last, the peak at *m/z* 5071–5072, used in our model to detect CC398, was found by others in CC8, CC130, and CC239 (Ostergaard et al., 2015; Zhang et al., 2015).

3.3. Implementation in clinical laboratories

The MALDI-TOF MS method had satisfactory positive predictive values for the routine detection of CC398. Furthermore the CC398 identification using MALDI-TOF MS can be easily implemented in the laboratory and is much faster than PCR-based methods. While CC398 *S. aureus* is identified in 15 min by MALDI-TOF MS, it takes 2.5 h by PCR. The limitation in the broad use of this typing strategy is that ClinProTools software (Bruker Daltonik) is not included in the standard package and has

Table 3

Validation of a typing strategy by MALDI-TOF MS for assignment of *S. aureus* into the clonal complex CC398.

Clonal complex ^a	n	MALDI-TOF MS typing ^b	
		CC398 n (%)	Non-CC398 n (%)
CC398	82	76 (93)	6 (7)
Non-CC398	244	13 ^c (5)	231 (95)

^a As defined by the CC398-specific PCR described by Stegger et al. (Stegger et al., 2011).

^b Using software ClinProTools 3.0 (Bruker Daltonik).

^c Including 1 isolate of ST7, 2 isolates of ST30, 1 isolate of ST199.

Table 4

Indicators of the performance and utility of the typing strategy by MALDI-TOF MS for assignment of *S. aureus* into the clonal complex CC398.

Parameter	Estimate	Lower – Upper 95% CIs
Sensitivity	92.68%	84.94–96.60
Specificity	94.67%	91.10–96.86
Positive predictive value	85.39%	76.60–91.26
Negative predictive value	97.47%	94.59–98.83

to be purchased separately. However, equipped laboratories can freely download the method containing files from our laboratory website (<http://projet.chu-besancon.fr/rfclin/ClinProTools/>) to skip the time-consuming steps of strategy definition and validation, and directly detect *S. aureus* CC398 in <10 min. We showed here that MALDI-TOF MS can detect accurately, quickly and inexpensively *S. aureus* CC398 isolates. This typing strategy will ensure monitoring the spread of a pathogen associated with a high mortality of patients.

Funding

This work was supported by a European Grant “Fonds européen de développement régional” (FEDER 34534). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgments

We thank Thibaut Peterlini for his technical assistance.

References

- Barbuddhe, S.B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T., 2008. Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5402–5407.
- Bizzini, A., Greub, G., 2010. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1614–1619.
- Boggs, S.R., Cazares, L.H., Drake, R., 2012. Characterization of a *Staphylococcus aureus* USA300 protein signature using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.* 61, 640–644.
- Bohme, K., Morandi, S., Cremonesi, P., Fernandez No, I.C., Barros-Velazquez, J., Castiglioni, B., Brasca, M., Canas, B., Calo-Mata, P., 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis* 33, 2355–2364.
- Bouillier, K., Gbaguidi-Haore, H., Hocquet, D., Cholley, P., Bertrand, X., Chirouze, C., 2016. Clonal Complex 398 Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections are associated with high mortality. *Clin. Microbiol. Infect.* (In press).
- Cabrolier, N., Sauget, M., Bertrand, X., Hocquet, D., 2015. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1395–1398.
- Dieckmann, R., Helmuth, R., Erhard, M., Malorny, B., 2008. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7767–7778.
- Enright, M.C., Day, N.P., Davies, C.E., Peacock, S.J., Spratt, B.G., 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008–1015.
- Fan, J., Shu, M., Zhang, G., Zhou, W., Jiang, Y., Zhu, Y., Chen, G., Peacock, S.J., Wan, C., Pan, W., Feil, E.J., 2009. Biogeography and virulence of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 4, e6216.
- Fenselau, C., Demirev, P.A., 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 20, 157–171.
- Holland, R.D., Duffy, C.R., Rafii, F., Sutherland, J.B., Heinze, T.M., Holder, C.L., Voorhees, K.J., Lay Jr., J.O., 1999. Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells. *Anal. Chem.* 71, 3226–3230.
- Josten, M., Reif, M., Szekat, C., Al-Sabti, N., Roemer, T., Spärbier, K., Kostrzewa, M., Rohde, H., Sahl, H.G., Bierbaum, G., 2013. Analysis of the matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1809–1817.

- Lafolie, J., Sauget, M., Cabrolier, N., Hocquet, D., Bertrand, X., 2015. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies? *J. Hosp. Infect.* 90, 208–212.
- Ostergaard, C., Hansen, S.G., Moller, J.K., 2015. Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 838–847.
- Sauget, M., Nicolas-Chanoine, M.H., Cabrolier, N., Bertrand, X., Hocquet, D., 2014. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 977–983.
- Smith, T.C., Pearson, N., 2011. The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 327–339.
- Stegger, M., Lindsay, J.A., Moodley, A., Skov, R., Broens, E.M., Guardabassi, L., 2011. Rapid PCR detection of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 by targeting the restriction-modification system carrying *sauI-hsdS1*. *J. Clin. Microbiol.* 49, 732–734.
- Stephan, R., Cernela, N., Ziegler, D., Pfluger, V., Tonolla, M., Ravasi, D., Fredriksson-Ahomaa, M., Hachler, H., 2011. Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Meth.* 87, 150–153.
- Uhlemann, A.C., Porcella, S.F., Trivedi, S., Sullivan, S.B., Hafer, C., Kennedy, A.D., Barbican, K.D., McCarthy, A.J., Street, C., Hirschberg, D.L., Lipkin, W.I., Lindsay, J.A., DeLeo, F.R., Lowy, F.D., 2012. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties. *mBio* 3 (2), e00027-12.
- Valentin-Domelier, A.S., Girard, M., Bertrand, X., Violette, J., Francois, P., Donnio, P.Y., Talon, D., Quentin, R., Schrenzel, J., van der Mee-Marquet, N., Bloodstream Infection Study Group of the Réseau des Hygiénistes du Centre, 2011. Methicillin-susceptible ST398 *Staphylococcus aureus* responsible for bloodstream infections: an emerging human-adapted subclone? *PLoS One* 6, e28369.
- Verkade, E., Bergmans, A.M., Budding, A.E., van Belkum, A., Savelkoul, P., Buiting, A.G., Kluytmans, J., 2012. Recent emergence of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 in human blood cultures. *PLoS One* 7, e41855.
- Wardyn, S.E., Smith, T.C., 2014. False positives and negatives obtained with PCR-based identification of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398. *J. Clin. Microbiol.* 52, 701–702.
- Witte, W., Strommenger, B., Stanek, C., Cuny, C., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerg. Infect. Diseases.* 13, 255–258.
- Wolters, M., Rohde, H., Maier, T., Belmar-Campos, C., Franke, G., Scherpe, S., Aepfelbacher, M., Christner, M., 2011. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 64–68.
- Zhang, T., Ding, J., Rao, X., Yu, J., Chu, M., Ren, W., Wang, L., Xue, W., 2015. Analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* major clonal lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *J. Microbiol. Meth.* 117, 122–127.

5.2.2. Etude 5 – Détection du clone de *S. aureus* ST398 parmi la population de *S. aureus* isolés de dépistage

Introduction.

Le clone ST398 est un clone particulier qui a émergé via deux sous-populations distinctes, de façon presque concomitante, chez les animaux d'élevage et chez l'homme. Sous sa forme SARM, il est apparu au début des années 2000 et a entraîné une pandémie dans les élevages de porcs. Sous sa forme SASM, il a émergé, sans doute quelques années plus tard, comme agent majeur responsable d'infections humaines, majoritairement nosocomiales, sur différents continents (Europe, Amérique du Nord, Asie). L'analyse des données phylogénétiques suggère que ce clone existait sous forme ancestrale peu disséminée (170). Les transformations phagiques lui auraient conféré des propriétés d'épidémiogénicité lui permettant de devenir pandémique chez l'animal puis chez l'homme. Cette dissémination rapide est sans doute le résultat de la mondialisation qui entraîne une grande mobilité chez les hommes et chez les animaux, permettant une diffusion très rapide de clones bactériens. Les quelques études analysant les facteurs de risque de présenter une infection liée à ST398, comparativement aux infections liées à d'autres clones de *S. aureus* montrent que les patients infectés par ST398 sont plus souvent immunodéprimés, ont plus de co-morbidités et sont plus souvent hospitalisés en réanimation. Aucune étude robuste n'a comparé la virulence du clone ST398 à celle d'autres clones de *S. aureus*. L'infection étant la conséquence d'une colonisation, d'autres études sont nécessaires pour comprendre pourquoi ce clone diffuse plus facilement chez les personnes dont l'état de santé est précaire. Une étude récente réalisée au sein de notre hôpital a identifié des facteurs de risques propres à CC398 et a observé une augmentation de la mortalité à 30 jours chez les patients développant une infection à CC398 (103). Cette augmentation de mortalité n'était pas observée à 7 jours et ne permettait pas de conclure à une virulence particulière de CC398. Toutefois les données manquent sur la prévalence de CC398 parmi les souches de portage de *S. aureus* non responsables d'infections.

Objectif.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la prévalence du clone de *S. aureus* CC398 parmi l'ensemble des souches de SASM isolées de prélèvements de dépistage de patients hospitalisés au CHRU de Besançon entre 2010 et 2013. Dans un second temps cette

prévalence a été comparée à la proportion de *S. aureus* CC398 parmi les SASM isolés des prélèvements à visée diagnostique, bactériémies et infections ostéo-articulaires (IOA).

Matériel et méthodes.

Les échantillons bactériens. Au CHRU de Besançon, les souches de *S. aureus* isolées des prélèvements de dépistage des patients hospitalisés dans les services de réanimation, de cardiologie, gériatrie, dermatologie, chirurgie, traumatologie, hémodialyse et néphrologie sont conservées à des fins sanitaires ou de recherche. De même, tous les *S. aureus* isolés de bactériémies et d'IOA sont conservés par le CRB-FMB. Nous avons analysé les souches issues des prélèvements de dépistage du 1^{er} semestre des années 2010 à 2013. Les données concernant les souches isolées lors de bactériémie étaient déjà disponibles dans une étude réalisée par notre service sur les facteurs de risques associés au clone CC398 (103). Les souches isolées d'IOA ont été analysées sur les années complètes de 2010 à 2013.

Détection des souches de *S. aureus* CC398. Toutes les souches de SASM incluses dans cette étude ont donc été analysées rétrospectivement avec notre méthode de détection rapide de *S. aureus* CC398 par MALDI-TOF MS (121). Pour chaque souche, nous avons analysé les spectres de 2 dépôts d'extrait protéique. Les souches ayant au moins un spectre classé CC398 par MALDI-TOF MS étaient confirmées par la méthode de PCR décrite par Stegger *et al.* qui permet de détecter le clone CC398 par ciblage du gène *sauI-hsdSI* (171).

Résultats.

Nous avons analysé 1547 souches de SASM isolées entre 2010 et 2013.

Souches de SASM isolées de prélèvements de dépistage. Au total, 633 souches ont été analysées. Ces souches provenaient de prélèvement de patients hospitalisés dans des services de réanimation (71%, n=450) et dans 10 autres types de services (29%, n=183).

Par typage CC398 MALDI-TOF MS 102 souches ont obtenu au moins un spectre classé CC398 et 49 d'entre elles ont été confirmées par PCR. Ainsi, au final, 8% (n=49) des souches appartenaient au CC398 et 92% (n=584) appartenaient à d'autres CCs. Parmi les SASM isolés de prélèvements de dépistage, la prévalence totale du clone de *S. aureus* CC398 augmente de 4,4% en 2010 à 13,2% en 2013 (Figure 10). La proportion de ce clone est plus importante

dans les services de réanimation que dans les autres services dans lesquels la même tendance à l'augmentation est observée de 2010 à 2013 (Figure 10).

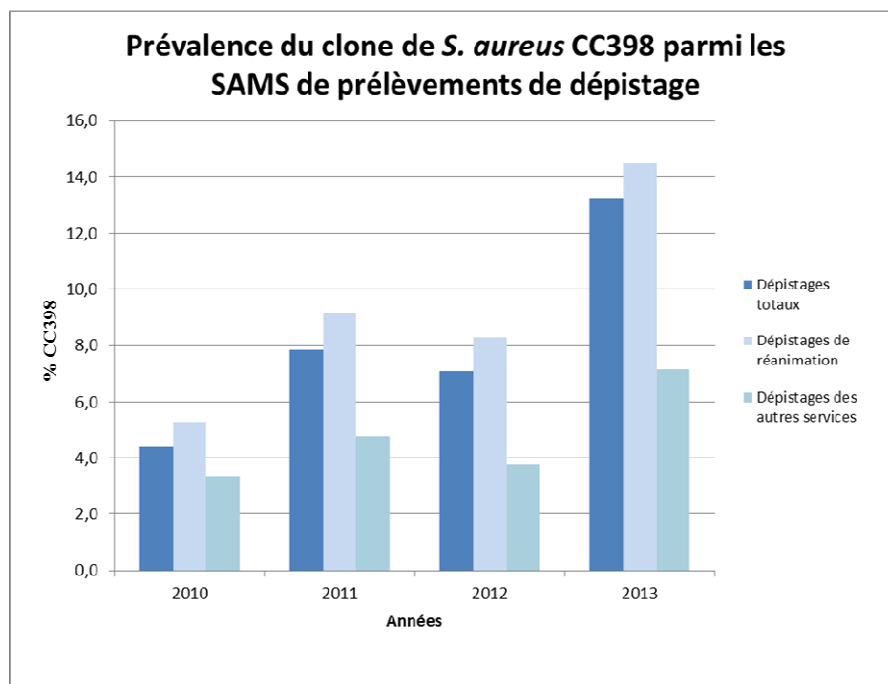


Figure 10. Prévalence du clone de *S. aureus* CC398 parmi les SAMS isolés de prélèvements de dépistage au cours du premier semestre des années 2010 à 2013 au CHRU de Besançon.

Souches de SASM isolées de prélèvements d'infections. Au total, 914 souches ont été analysées. Ces souches provenaient de prélèvements de patients ayant une bactériémie (61%, n=553) ou une IOA (39%, n=361). Parmi les SASM isolés de prélèvements d'infection, la prévalence totale du clone de *S. aureus* CC398 augmente de 5,0% en 2010 à 14,1% en 2013 (Figure 11) avec une évolution comparable dans les souches de bactériémies et d'IOA. La proportion de *S. aureus* CC398 est quasiment équivalente entre les hémocultures et les prélèvements d'IOA (Figure 11).

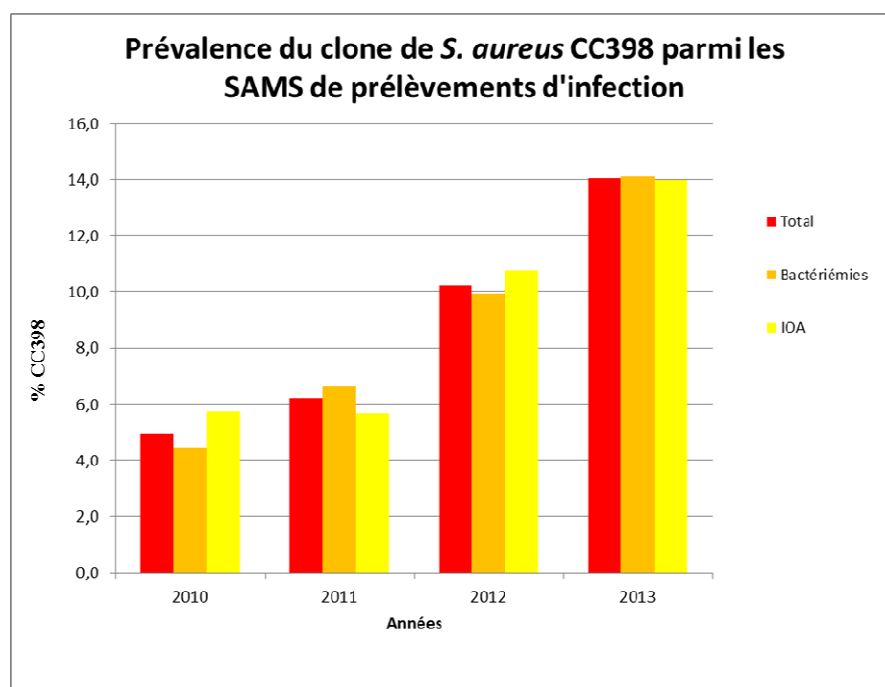


Figure 11. Prévalence du clone de *S. aureus* CC398 parmi les SAMS isolés de prélèvements d'infection au cours du premier semestre des années 2010 à 2013 au CHRU de Besançon.

Discussion.

Le typage de *S. aureus* CC398 par MALDI-TOF-MS permet de faire un premier criblage parmi les souches de SASM de manière rapide et peu onéreuse. La technique de PCR confirme les positifs. Cette stratégie a permis de limiter le nombre de PCR qui ont alors été réalisées pour seulement 16% des SASM (102 souches de dépistage sur 633).

Au CHRU de Besançon, sur la période de 2010 à 2013, nous observons une augmentation de la prévalence du clone de *S. aureus* CC398 parmi les SASM responsables d'infections (Figures 11 et 12). En 2013, environ une souche de SASM sur 7 appartient au clone CC398. Avant 2010, la collection de souches conservées au CRB-FMB n'est que partielle et ne permet pas de dater l'émergence de ces souches. Dans l'étude de Valentin-Domelier *et al.*, où les souches de bactériémies du CHRU de Besançon étaient incluses (uniquement du 4^{ème} trimestre de 2007 à 2010), seules 2 souches ST398 avaient été isolées à Besançon (1 en 2009 et 1 en 2010) (172). D'autres études montrent l'absence de ce clone dans des collections historiques datant du début des années 2000 (173). L'émergence de ce clone dans notre hôpital et plus largement en France, date donc probablement des années 2006-2007.

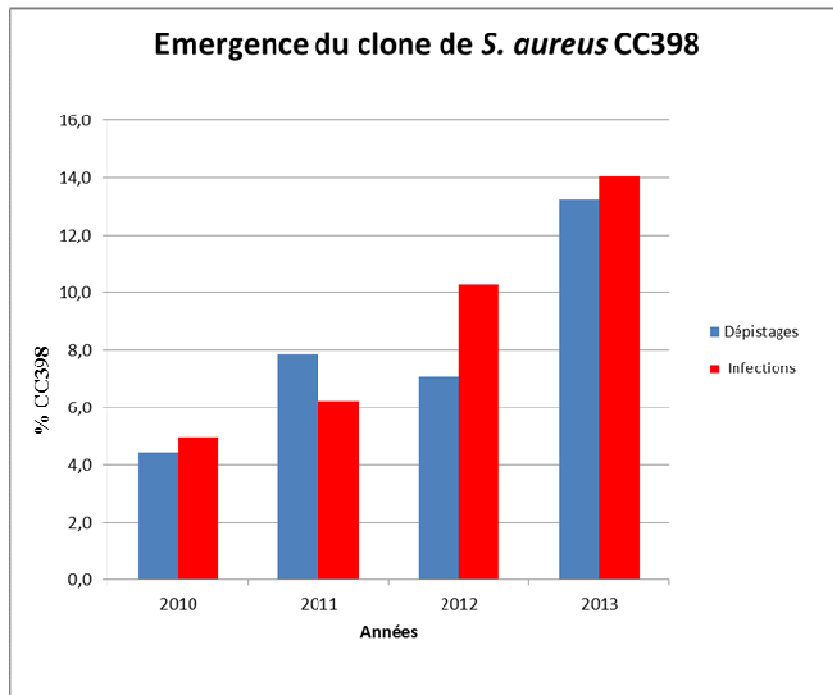


Figure 12. Comparaison de la prévalence du clone de *S. aureus* CC398 parmi les SAMS isolés de prélèvements de dépistage et d'infection au cours des années 2010 à 2013 au CHRU de Besançon.

L'évolution comparable des prévalences chez les patients infectés et chez les patients porteurs (Figure 12) montrent que ce clone diffuse dans la population hospitalière sans pour autant pouvoir identifier le lieu d'acquisition prédominant (communautaire ou hospitalière). Il est fréquemment responsable d'infections graves chez les patients de réanimation. Ces patients étant plus fragiles, ils présentent un terrain plus favorable à la colonisation puis à l'infection. La prévalence de CC398 dans les prélèvements de dépistage des patients hospitalisés dans d'autres services du CHRU donne une idée du portage dans la communauté. En effet, pour la plupart de ces patients, le dépistage est réalisé avant une chirurgie chez des patients sans antécédants d'hospitalisation. Ces résultats doivent être complétés par les données des années 2014, 2015 et 2016. Une étude portant sur la prévalence de ce clone dans la population communautaire doit également être réalisée. Diverses hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'épidémiogénicité particulière de ce clone : meilleure survie dans l'environnement, capacité d'adhésion accrue aux cellules humaines, fitness plus important, naïveté du système immunitaire de l'homme vis-à-vis de ce clone.

Conclusion.

Les données acquises au CHRU de Besançon sont conformes à la littérature et attestent de l'émergence et de la diffusion de souches de SASM CC398. D'autres études sont nécessaires pour élucider les déterminants de cette diffusion.

5.3. Typage de *Pseudomonas aeruginosa* par MALDI-TOF MS

5.3.1. Etude 6 – Identification de clones de *P. aeruginosa* à haut risque par MALDI-TOF MS.

5.3.1.1. Présentation de l'article

Objectif. L'épidémiologie globale de *P. aeruginosa* est non clonale, ponctuée d'épidémies de souches clonales hospitalières très souvent multi-résistantes, appelées clones à haut risque (ST111, ST175, ST235, ST253 et ST395). L'arbre phylogénétique regroupe les ST235 et ST253 dans le cluster 1. Le dépistage rapide des clones à haut risque est important pour maîtriser leur diffusion. Les techniques de typage de référence, telles que la MLST ou l'électrophorèse en champ pulsé, même si elles sont reconnues, restent longues et coûteuses. L'objectif de cette étude était d'évaluer la capacité de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à reconnaître rapidement ces clones à haut risque de *P. aeruginosa*.

Matériels et méthodes. Nous avons utilisé un panel de 341 souches de *P. aeruginosa* dont le ST avait été défini lors d'études précédentes, 46 souches pour définir la stratégie de typage et 295 pour la valider. Le logiciel ClinProTools® (Bruker Daltonik) a été utilisé pour identifier des pics biomarqueurs des clones à haut risque. Les souches ont été réparties en différents groupes en fonction des clones à identifier. Des spectres de masse obtenus après extraction protéique et après dépôt direct ont été utilisés pour construire les modèles de typage et pour les valider, respectivement.

Résultats. L'analyse visuelle des spectres de masse a révélé des pics caractéristiques de certains clones à haut risque ou de groupes de clones. Six modèles de typage ont été construits et validés : Cluster 1 *versus* autres STs, ST111 *vs.* autres STs, ST175 *vs.* autres STs, ST235 *vs.* autres STs du cluster 1, ST253 *vs.* autres STs et ST395 *vs.* autres STs. Les ST les plus épidémiques sont identifiés, avec une sensibilité allant de 81,8% à 100% et une spécificité allant de 82,5% à 99,3%, suivant les modèles.

Conclusion. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF permet donc un dépistage rapide des clones à haut risque de *P. aeruginosa* et constitue un outil permettant de cibler les mesures d'hygiène sur les patients porteurs afin de limiter la diffusion de bactéries multi-résistantes.

5.3.1.2. Texte de l'article

Cabrol N, **Sauget M**, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. J Clin Microbiol 2015 ; 53 : 1395-1398. (IF 2015 : 3,63)

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Identifies *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Clones

Nadège Cabrolrier,^a Marlène Sauget,^{a,b,c} Xavier Bertrand,^{a,b} Didier Hocquet^{a,b,c}

Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France^a; UMR 6249 Chrono-Environnement, Université de Franche-Comté, Besançon, France^b; CRB Ferdinand Cabanne-Filière Microbiologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France^c

We show here that matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) accurately and quickly identified the five high-risk clones of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 111 (ST111), ST175, ST235, ST253, and ST395. The use of this screening technique by clinical microbiology laboratories may tackle the spread of high-risk clones by the quick implementation of hygiene control procedures for relevant patients.

Pseudomonas aeruginosa has a nonclonal population structure with a few multidrug-resistant clusters, called “high-risk clones,” that frequently produce acquired β -lactamases with an extended spectrum and are responsible for outbreaks in hospitals worldwide (1–13). The quick implementation of infection control measures for relevant patients may tackle the spread of these epidemic clones, but current identification is long and complex since it is based on the analysis of nucleotidic sequences. A quick and easy method for identifying high-risk clones of *P. aeruginosa* is then needed. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) was recently integrated into the routine workflow of medical microbiology laboratories for microbial identification and has been further used for subspecies characterization (14). Here, we evaluated the ability of MALDI-TOF MS to identify high-risk clones of *P. aeruginosa*.

Identification of peak biomarkers for five major high-risk clones of *P. aeruginosa*. In order to identify five major high-risk clones of *P. aeruginosa* (sequence type 111 [ST111], ST175, ST235, ST253, and ST395), we first defined recognition models with a training set of 46 isolates with known STs distributed homogeneously in the phylogenetic tree (Table 1 and Fig. 1). Frozen bacteria were streaked onto Mueller-Hinton agar (Bio-Rad) and incubated for 18 h at 37°C. As previously reported (15), each isolate was extracted with the ethanol-formic acid method recommended by Bruker Daltonik and analyzed with a Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonik), which generated 24 raw spectra. We analyzed the spectra with the software ClinProTools 3.0 (Bruker Daltonik), which defined six models based on peak biomarkers (Table 1). The reliability and accuracy of each model were assessed through the recognition capabilities and the cross-validation values. The models identified all the tested high-risk clones of *P. aeruginosa* with high recognition capabilities (>96%) and cross-validation values ranging from 72.5% to 100% (Table 1). Four models directly identified ST111, ST175, ST253, and ST395, while the identification of ST235 required a preliminary stage to identify cluster 1, which encompasses ST235 (Fig. 1).

We then manually examined the spectra with ClinProTools 3.0 to assess the relevance of the peak biomarkers of each model (Table 1). Peaks were defined as biomarkers in a model because of their presence or absence or relative abundance between two tested classes. Figure 2 details only the peak biomarkers in which presence or absence was specific for a class.

We further assessed the performances of the six models with an

independent validation set of 295 isolates homogeneously distributed in the phylogenetic tree (Table 1 and Fig. 1). Isolates were prepared with the direct-transfer method, which is routinely used in clinical laboratories (15). One raw spectrum was collected per isolate and classified with the six models. We identified the high-risk clone ST111 with a sensitivity of 81.8% and ST175, ST235, ST253, and ST395 with higher sensitivities ($\geq 96.3\%$). The specificities of our typing method were high ($\geq 96.6\%$) for ST111, ST175, ST253, and ST395 and lower for ST235 (82.5%). The positive predictive values ranged from 41.2% to 89.5%, and the negative predictive values ranged from 97.0% to 100% (Table 1).

Strengths and limitations of the method. MALDI-TOF MS distinguished the five tested intercontinental high-risk clones, ST111, ST175, ST235, ST253, and ST395. We deliberately included as many different STs ($n = 157$) of *P. aeruginosa* as possible from various hosts (humans [$n = 128$]; animals [$n = 66$]) to take into account the genetic diversity of the species (Fig. 1). Although other high-risk clones (e.g., ST277, ST357) are good candidates for identification by MALDI-TOF MS, the low number of isolates of these STs in our collection made it impossible to calculate and validate dedicated models. Nonetheless, given that MALDI-TOF MS successfully identified all the tested high-risk clones, this technique can presumably detect other clones. Interestingly, the few isolates that were misclassified by the models were scattered across the phylogenetic tree of *P. aeruginosa* (data not shown). The MALDI-TOF MS method had satisfactory positive predictive values for the routine detection of ST111, ST235, and ST395. Although MALDI-TOF MS detected ST175 and ST253 with low positive predictive values (<60%), the two corresponding models

Received 26 January 2015 Accepted 27 January 2015

Accepted manuscript posted online 4 February 2015

Citation Cabrolrier N, Sauget M, Bertrand X, Hocquet D. 2015. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. J Clin Microbiol 53:1395–1398. doi:10.1128/JCM.00210-15.

Editor: R. Patel

Address correspondence to Didier Hocquet, dhocquet@chu-besancon.fr.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00210-15

TABLE 1 Characteristics and performances of the models for the detection of *P. aeruginosa* high-risk clones

Model	Training set				Validation set ^a				
	Total (no.)	Peak biomarkers (m/z)	Recognition capability (%)	Cross-validation (%)	Total (no.)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)
Cluster 1		6,734	100	99.86		92.5	95.9	87.3	97.6
Cluster 1	11	9,586			67				
Other STs	35	9,617 11,037			219				
ST235 ^b		5,813	96.75	94.08		96.3	82.5	78.8	97.0
ST235	5	11,611			27				
Other STs	6				40				
ST111		3,657	100	99.94		81.8	98.9	81.8	99.2
ST111	5	6,508			11				
Other STs	41	8,502 10,041 10,538 12,579			275				
ST175		5,211	96.86	84.26		100	92.6	41.2	100
ST175	3	5,738			14				
Other STs	43	7,203 7,329 7,359 7,580 7,613 12,154			272				
ST253		5,813	99.09	72.5		100	97.5	58.8	100
ST253	2				10				
Other STs	44				276				
ST395		7,718	100	100		100	99.3	89.5	100
ST395	8	8,550			17				
Other STs	38	11,582 16,799			269				

^a PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

^b Within the isolates belonging to cluster 1 (see Fig. 1).

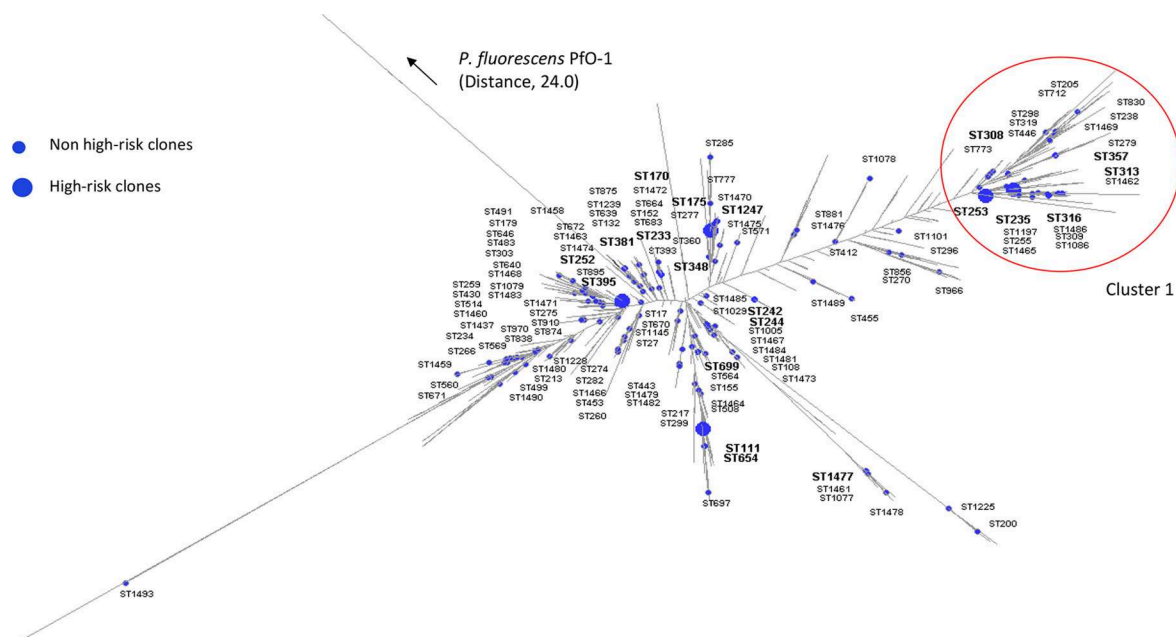


FIG 1 Distribution of the 157 STs of the isolates of *Pseudomonas aeruginosa* used for the typing strategy on a dendrogram built with the data of all known STs ($n = 1,595$). STs belonging to the training set are indicated by bold type. Isolates were genotyped by multilocus sequence typing as previously described (4). The maximum-likelihood tree was constructed with RAxML 7.2.8 and visualized with Dendroscope 3.2.10 (13). In every case, 1,000 bootstrap repetitions gave values higher than 900 for most branches. *Pseudomonas fluorescens* PfO-1 was used as the outgroup.

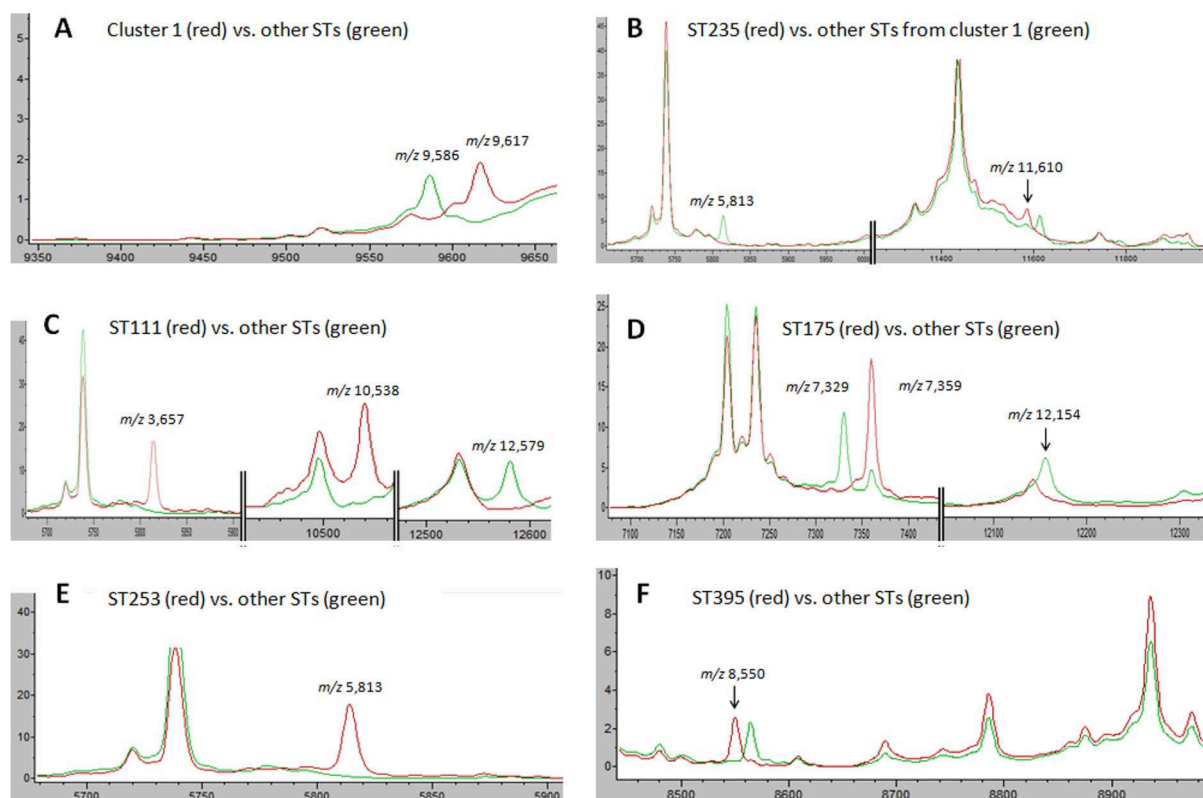


FIG 2 Peak biomarkers allowing MALDI-TOF MS to identify ST111, ST175, ST235, ST253, and ST395. The mass spectra were visualized with ClinProTools 3.0 (Bruker Daltonik). Units on the x axis represent the mass per charge (m/z), and those of the y axes represent the relative intensity in arbitrary units. (A) Peak at m/z 9,617 was specific to the STs of cluster 1, while that at m/z 9,586 was specific to the other STs. (B) Within cluster 1, isolates of ST235 specifically displayed a peak at m/z 11,610 and lacked a peak at m/z 5,813. (C) Isolates of ST111 were characterized by two specific peaks at m/z 3,657 and m/z 10,538 and the absence of a peak at m/z 12,579. (D) Absence of peaks at m/z 7,329 and m/z 12,154 combined with a peak at m/z 7,359 with a high intensity were specific to the ST175 isolates. (E) Isolates of ST253 lacked a specific peak at m/z 5,813. (F) Peak at m/z 8,550 was specific to isolates of ST395.

had a 100% negative predictive value, thereby excluding these high-risk clones with certitude.

Clinical laboratories use various culture media provided by various manufacturers. We tested the robustness of the method with a subset of representative isolates ($n = 51$) grown on various culture media. Briefly, we found that MALDI-TOF MS identified all tested high-risk clones grown on sheep blood agar (blood from Thermo Fisher Scientific, Columbia agar base from Mast) and that ST235, ST253, and ST395 were accurately identified from other manufacturers' Mueller-Hinton agar (bioMérieux) and MacConkey medium (Mast).

One limitation in the broad use of this typing strategy is that the ClinProTools 3.0 software has to be purchased separately from the MALDI-TOF MS apparatus. Equipped laboratories can freely download the method-containing files from our website (<http://projet.chu-besancon.fr/rfclin/ClinProTools/>) to skip the time-consuming steps of strategy design. However, each laboratory must validate the technique with its own instruments and culture media.

In conclusion, although multilocus sequence typing (MLST) remains the gold standard for the analysis of the genetic population of *P. aeruginosa*, the delay required for this sequence-based ST determination is not compatible with efficient management in an outbreak. Hence, the quick identification of high-risk clones that are more prone to disseminate would facilitate the management of a *P. aeruginosa* outbreak. We showed here that MALDI-TOF MS can detect high-risk clones of *P. aeruginosa* accurately, quickly (<1 min), and inexpensively. MALDI-TOF MS can type the isolates from the very spot used for species identification and prepared by a direct-transfer method. This may help limit the spread of high-risk clones by the quick implementation of hygiene control procedures for relevant patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The Biological Resource Center Ferdinand Cabanne (BB-0033-00044) is partially supported by European Grant "Fonds européen de développement régional" (FEDER 34534). The funders had no role in study design, data collection, or analysis, in the decision to publish, or in the preparation of the manuscript.

We declare no competing interests.

REFERENCES

- Maatallah M, Cheriaa J, Backhrouf A, Iversen A, Grundmann H, Do T, Lanotte P, Mastouri M, Elghmati MS, Rojo F, Mejdí S, Giske CG. 2011. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One* 6:e25617. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025617>.
- Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'Souza JW, Tapalski DV, Azizov IS, Sukhorukova MV, Pavlukov RA, Kozlov RS, Toleman MA, Walsh TR. 2013. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 13:867–876. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70168-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70168-3).
- Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. 2014. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009–11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother* 69:1804–1814. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku048>.
- Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, van der Mee-Marquet N, Talon D, Bertrand X. 2011. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol* 49:2578–2583. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00102-11>.
- García-Castillo M, Del Campo R, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, van Mansfeld R, Oliver A, Canton R. 2011. Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol* 49:2905–2910. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00753-11>.
- Wright LL, Turton JF, Livermore DM, Hopkins KL, Woodford N. 2015. Dominance of international "high-risk clones" among metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK. *J Antimicrob Chemother* 70:103–110. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dku339>.
- Seok Y, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Lee H, Lee K. 2011. Dissemination of IMP-6 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 in Korea. *J Antimicrob Chemother* 66:2791–2796. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr381>.
- Kim MJ, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Song JH, Choi JY, Yoon SS, Thamlikitkul V, Hsueh PR, Yasin RM, Lalitha MK, Lee K. 2013. Dissemination of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of sequence type 235 in Asian countries. *J Antimicrob Chemother* 68:2820–2824. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt269>.
- Van der Bij AK, Van der Zwan D, Peirano G, Severin JA, Pitout JD, Van Westreenen M, Goessens WH, MBL-PA Surveillance Study Group. 2012. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Netherlands: the nationwide emergence of a single sequence type. *Clin Microbiol Infect* 18:E369–E372. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03969.x>.
- Elias J, Schoen C, Heinze G, Valenza G, Gerharz E, Gerharz H, Vogel U. 2010. Nosocomial outbreak of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* associated with retrograde urography. *Clin Microbiol Infect* 16:1494–1500. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03146.x>.
- Gomila M, Del Carmen Gallegos M, Fernandez-Baca V, Pareja A, Pascual M, Díaz-Antolín P, García-Valdes E, Lalucat J. 2013. Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiol* 13:138. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-13-138>.
- Koutsogiannou M, Drougka E, Liakopoulos A, Jelastopulu E, Petinaki E, Anastassiou ED, Spiliopoulou I, Christofidou M. 2013. Spread of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital. *J Clin Microbiol* 51:665–668. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03071-12>.
- Cholley P, Ka R, Guyeux C, Thouverez M, Guesseend N, Ghebremedhin B, Frank T, Bertrand X, Hocquet D. 2014. Population structure of clinical *Pseudomonas aeruginosa* from west and central African countries. *PLoS One* 9:e107008. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107008>.
- Spinali S, van Belkum A, Goering RN, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, Pincus DH, Arsac M, Durand G. 23 July 2014. Microbial typing by MALDI-TOF MS: do we need guidance for data interpretation? *J Clin Microbiol*. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01635-14>.
- Sauget M, Nicolas-Chanoine MH, Cabroler N, Bertrand X, Hocquet D. 2014. Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. *Int J Med Microbiol* 304:977–983. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.06.004>.

6. Discussion

Nous avons été invités à soumettre en octobre 2016 une revue de la littérature pour publication dans Trends in Microbiology. Celle-ci présente une critique de la technique MALDI-TOF MS pour le typage bactérien basée sur les études qui identifiaient les mêmes clones chez *E. coli* et *S. aureus* (revue présentée pages 105 à 113) Les résultats les plus répétables y ont été comparés et seront présentés ci-après.

6.1. Typage de *E. coli* par MALDI-TOF MS

Le tableau 4 (pages 35-36) référence 14 études sur le typage de *E. coli* par MALDI-TOF MS. Quatre études se sont intéressées à des souches épidémiques locales ou des sous-groupes particuliers, sans qu'il soit possible d'en comparer les résultats (80, 83, 91, 174). Une étude en marge des autres, car se focalisant sur l'analyse d'un extrait flagellaire, a montré qu'il était possible d'identifier des antigènes flagellaires par MALDI-TOF MS (92).

Trois études avaient pour objectif d'identifier par MALDI-TOF MS le sérotype O157:H7 appartenant au pathotype EHEC responsable de diarrhées hémorragiques (Table 2 page 108) (79, 82, 175). Toutes ces études ont montré que le pic situé à m/z 9 060, correspondant à la protéine chaperone HdeB impliquée dans la réponse au stress acide (175), n'est pas retrouvé chez les souches EHEC O157:H7 et peut donc être utilisé comme pic biomarqueur. L'équipe de Clark *et al.* a identifié un autre pic spécifique du sérotype O157:H7 à $m/z \sim 6\ 040$ (82), sans que la protéine correspondante puisse être identifiée.

Dans l'une de mes études, je propose une méthode de détection rapide des souches de *E. coli* appartenant au phylogroupe B2, phylogroupe des souches les plus virulentes (86). La stratégie de typage repose sur l'existence d'un décalage de pic de $m/z \sim 9\ 740$ (pour les souches appartenant aux phylogroupes A, B1 et D) à $m/z \sim 9\ 716$ (pour les souches appartenant au phylogroupe B2) ainsi que sur la présence d'un pic à $m/z \sim 4\ 858$ pour les souches appartenant au phylogroupe B2 (Table 2 page 108). Une autre étude a ensuite confirmé ses résultats (93) (Table 2 page 108). Le pic situé à $m/z \sim 9\ 740$ correspond à une protéine chaperone impliquée dans la réponse au stress acide, la protéine HdeA ou *hns deletion-induced protein A* (175, 176). Le pic à $m/z \sim 4\ 858$ est très probablement l'ion doublement chargé de la protéine HdeA, et n'est donc pas un pic biomarqueur indépendant (86, 93).

Ces résultats sont encourageants, cependant, les équipes de recherche qui ont tenté d'identifier spécifiquement, au sein du phylogroupe B2, *E. coli* ST131 par MALDI-TOF MS ont trouvé

des résultats moins cohérents (85, 87-90). Toutes ces équipes sauf une ont trouvé un décalage de pic spécifique de ST131 de m/z 9 740 (non-ST131) à m/z 9 716 (ST131) (88). Le pic à m/z 4 858, correspondant à l'ion doublement chargé de HdeA, a été retrouvé par 2 équipes seulement (85, 90). Toutefois, nous avons précédemment démontré que ces pics étaient des biomarqueurs du phylogroupe B2. Un pic spécifique de *E. coli* ST131 situé à m/z 8 349 a été identifié par 2 équipes (85, 88). Selon Nakamura *et al.*, 2 pics biomarqueurs situés à m/z 7 650 (ST131) et à m/z 7 707 (non-ST131) possèderaient le meilleur pouvoir discriminant pour différencier les souches ST131 des souches non ST131 (88). Fagerquist *et al.* ont identifié la protéine correspondante au pic situé à $m/z \sim 7707$ comme Yaho (175). La méthode proposée par notre équipe pour détecter rapidement les souches de *E. coli* ST131 met en évidence 2 autres pics biomarqueurs : les spectres des souches ST131 possèdent 2 pics situés à m/z 10 474 et m/z 6 612 alors que les souches des autres STs présentent un décalage de ces pics ou une absence de pic (89) (Table 2 page 108).

Globalement, les spectres de masse des souches de l'espèce *E. coli* montrent une conservation de la grande majorité des pics. Cependant, nous avons observé un certain degré d'hétérogénéité entre les spectres de masse de souches appartenant à des phylogroupes ou des STs différents. Cette hétérogénéité s'observe pour des spectres obtenus après une méthode d'extraction mais aussi après la méthode de transfert direct (Tableau 4, pages 35-36). Nous soulignerons que 4 stratégies de typages ont été développées et validées en utilisant les mêmes groupes de souches ou alors n'ont pas été validées (85, 87, 90, 93). Les pics les plus discriminants correspondent au décalage de masse de m/z 9 740 pour les souches n'appartenant pas au phylogroupe B2 et à m/z 9 716 pour les souches du phylogroupe B2 (Table 2 page 108). La masse attendue, calculée à partir de la séquence protéique de la protéine mature HdeA (Genbank 1789926) de la souche *E. coli* K-12 MG1655 (ST10, phylogroupe A), est de 9 740,9 Da. Par contre, la masse attendue de la protéine HdeA des souches de *E. coli* appartenant au phylogroupe B2 est de 9 713,4 Da. Elle a été estimée à partir du génome de deux souches de *E. coli* ST131 (JJ1886 et O25b:H4-ST131 souche EC958). La précision des mesures obtenues avec les spectromètres de masse de type MALDI-TOF est limitée (500 ppm), mais largement en dessous du décalage observé pour la protéine HdeA ($\sim m/z$ 25). Toutefois un point critique peut être relevé ici : sans la connaissance de la masse théorique d'un pic biomarqueur, l'interprétation des résultats est limitée à l'erreur analytique intrinsèque des appareils de type MALDI-TOF MS. En effet pour les 2 formes de la protéine HdeA, les masses observées varient dans une fenêtre de plus ou moins 10 m/z (82, 86, 87,

176). D'autre part, nous avons fait l'hypothèse que les souches appartenant au phylogroupe B2, et donc produisant un variant de la protéine HdeA, avaient un comportement différent en milieu acide, typiquement retrouvé dans l'estomac des patients. Nous avons alors réalisé des tests de survie en milieu acide pour 14 souches de *E. coli* : 4 souches B2 ST131, 5 souches B2 non-ST131 (1 ST73, 1 ST648, 3 ST95) et 5 souches non B2 (1 D-ST141, 1 A-ST88, 1 A-ST362, 1 B1-ST23 et 1 B1-ST162), après 2 h d'incubation à pH 2 en milieu LB (*Luria-Bertani*) (177). De manière inattendue, les souches d'un même phylogroupe se sont comportées de manière différente à pH acide (Figure 13). Ainsi, les souches de *E. coli* B2 ST131 ne présentaient jamais un pourcentage de survie supérieur à 20% alors que certaines souches B2 non-ST131 étaient capables de survivre à plus de 50% après 2 h à pH 2. De plus, une variabilité a également été observée pour des isolats d'un même ST : les 3 isolats ST95 présentaient un pourcentage de survie variant de 0,33% à 42%. Concernant les souches non-B2, les taux de survie obtenus étaient également très variables, certaines étant incapables de survivre en milieu acide (A-ST88, B1-ST23 et B1-ST162). Nous n'avons pas pu établir un lien entre le polymorphisme de la protéine de résistance à l'acide HdeA et le comportement en milieu acide. La résistance des bactéries à l'acide est une fonction très conservée ne reposant probablement pas uniquement sur la protéine HdeA.

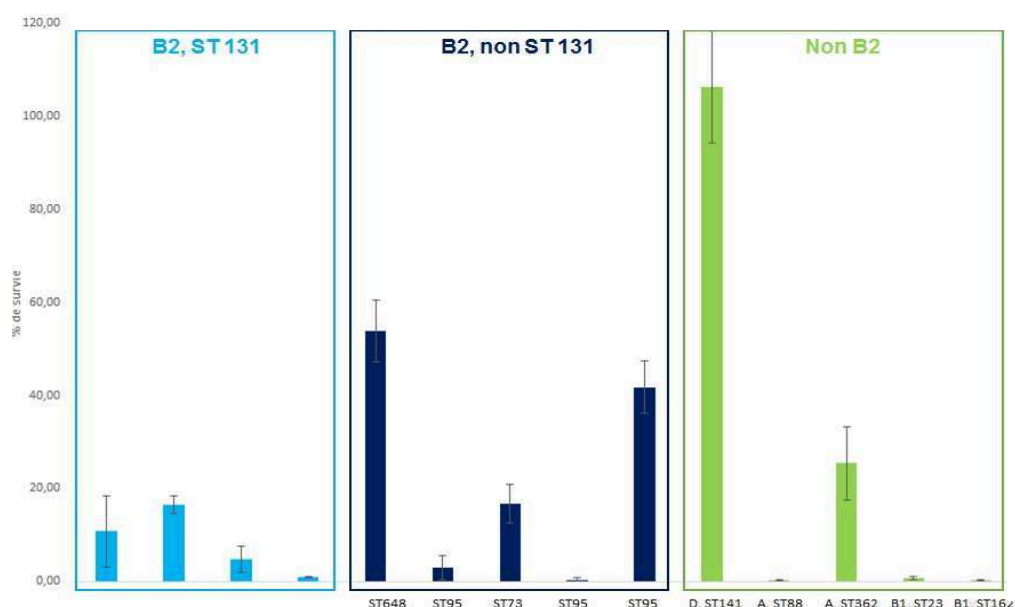


Figure 13. Test de survie en milieu acide (2 h d'incubation à pH 2, à 37°C, sous agitation, dans du LB) de 14 souches de *E. coli* en fonction de leur appartenance au phylogroupe B2.

Pour conclure sur l'espèce *E. coli*, son typage par MALDI-TOF MS est, pour l'instant, surtout axée sur la différenciation des principaux phylogroupes et l'identification de certains STs particulièrement épidémiogènes, virulents et multi-résistants. Les stratégies de typage proposées pour cette espèce peuvent trouver des applications comme outil de dépistage de première ligne ou dans des études épidémiologiques.

6.2. Typage de *S. aureus* par MALDI-TOF MS

Le Tableau 6 (page 40) référence 10 études sur le typage de *S. aureus* par MALDI-TOF MS. Parmi celles-ci, 2 études ont été réalisées sur des souches épidémiques locales de SARM (112, 116). Sept études ont été menées sur les 5 complexes clonaux de SARM prédominants (CC5, CC8, CC22, CC30, CC45) et sur un clone épidémique émergent, CC398 (113-115, 118-121). L'étude de Josten *et al.* est exemplaire puisqu'elle a évalué la technique MALDI-TOF MS pour différencier des CCs de *S. aureus* en corrélant des décalages de pics aux mutations des gènes codant les protéines correspondantes (115). La Table 3 page 109 compare les pics biomarqueurs utilisés pour détecter les 5 complexes clonaux de SARM prédominants (CC5, CC8, CC22, CC30, CC45) et le clone épidémique émergent, CC398. Pour SARM CC5, un décalage de masse de m/z 3 876 à m/z 3 891 a été identifié par 4 groupes de recherche (113, 118-120) et ce décalage est corrélé à la substitution Phe₁₆Tyr dans la protéine non annotée SA2420.1 (115). Pour SARM CC8, un décalage de masse de m/z 6 533 à m/z 6 591 a été constaté par également 4 équipes (113, 114, 119, 120) et correspond à un polymorphisme de la protéine SA1452 (115). Un décalage de masse de m/z 5 033 à m/z 5 004, liée à la substitution Glu₂₇Val dans la protéine GraF (115), caractérise SARM CC22 (113, 119, 120). Mais en réalité ce décalage est limité à certains *spa types* de CC22. Ainsi, le pic à $m/z \sim 5\ 004$ est spécifique de CC22 t022, t032, t2006 et le pic à $m/z \sim 5\ 033$ est un pic biomarqueur de CC22 t005, t223 mais aussi retrouvé chez CC5, CC8, CC30, CC45, CC398 (119). Pour SARM CC30, 2 décalages de masse ont été identifiés - de m/z 5 527 à m/z 5 508 et de m/z 5 439 à m/z 5 419 - en corrélation avec le polymorphisme de la protéine SAS049 et d'une protéine non identifiée, respectivement (113, 115, 119). Pour SARM CC45, un pic biomarqueur isolé a été identifié à $m/z \sim 6\ 030$ (119). Pour le CC398, les équipes de recherche n'ont pas identifié de pics spécifiques communs (119, 120), cependant notre stratégie de typage permettant de différencier ce CC398 des non-CC398 montre bien l'existence de régions d'intérêt probablement spécifiques des non-CC398 (121). Outre les décalages de pics

bien identifiés décrits précédemment, d'autres pics biomarqueurs isolés ont été identifiés pour tous les CCs étudiés (CC5, CC8, CC22, CC30, CC45 et CC398), mais ces pics ne sont pas retrouvés d'une étude à l'autre. L'étude de Lasch *et al.* nuance les résultats précédents : ils ont confirmé un certain nombre des pics décrits mais souvent ils n'ont pas réussi à identifier de réels pics biomarqueurs permettant une identification fiable de CCs ou de STs de *S. aureus* (117).

Globalement, même si les études déjà réalisées sont prometteuses, il reste encore de nombreuses limites à l'application de la technique MALDI-TOF MS pour le typage de *S. aureus* en routine. L'hétérogénéité des spectres des différents CCs étudiés semble être liée à un procédé spécifique de préparation des souches. En effet, la plupart des études utilisent l'extraction éthanol/acide formique. Les résultats discordants pourraient aussi être liés à d'autres facteurs : la matrice utilisée, le logiciel d'analyse, les paramètres du logiciel, le matériel et les consommables. Afin de limiter les variations, certaines équipes ont proposé l'utilisation d'un étalon interne pour calibrer les spectres. Par exemple, les spectres de masse de *S. aureus* pourraient être calibrés en utilisant un ensemble de pics hautement conservés situés à m/z 4 813, m/z 6 888 et m/z 9 626 (113, 119). Toutefois, 2 de ces pics sont considérés comme des pics biomarqueurs par Zhang *et al.* (118) (Table 3 page 109). D'autre part, la diversité des collections testées et des ST différenciés est nécessairement en lien avec l'épidémiologie locale. Par conséquent, les souches de chaque lignées clonales inclues dans les études ne sont pas en nombre égal, pas représentatives de la diversité mondiale et ne comprennent forcément pas tous les CCs existants chez *S. aureus*. D'autres études doivent donc être réalisées en incluant d'autres lignées clonales et d'autres souches pandémiques de *S. aureus* tout en proposant une méthodologie de typage par MALDI-TOF MS standardisée.

6.3. Typage de *P. aeruginosa* par MALDI-TOF MS

Notre équipe a proposé une technique de typage rapide par MALDI-TOF MS permettant d'identifier 5 clones «à haut risque» de *P. aeruginosa* (ST111, ST175, ST235, ST253 et ST395). Au total, 6 modèles ClinProTools ont été définis incluant 24 pics biomarqueurs.

Nous avons ensuite voulu savoir si la technique MALDI-TOF MS pouvait reconnaître des pulsotypes au sein d'un même ST. Cette étude n'a pour le moment pas montré de résultats concluants : les MALDI-types obtenus ne correspondent pas aux pulsotypes (données personnelles).

D'autres techniques de spectrométrie, notamment la technique plus discriminante de FT-IR, ont été testées. Fleurbaaij *et al.* ont notamment obtenu des résultats de typage comparables à ceux de la technique AFLP (*amplified fragment-length polymorphism*) (178). Récemment, une variante de la technique de type MALDI-TOF a permis de générer un spectre de masse du profil lipidique des bactéries : la technique MOLI-MS pour *metal oxide laser ionization* (179). Les lipides sont extraits par un mélange méthanol/chloroforme puis ionisés en présence de CeO₂ (oxyde de cérium). Nous souhaiterions évaluer l'intérêt des profils de spectres d'acides gras pour le typage bactérien. *P. aeruginosa* est un bacille à Gram négatif présentant donc une paroi riche en phospholipides. Il semble donc un candidat idéal pour ce projet. Nous travaillons actuellement en collaboration avec l'équipe de Christopher Cox (Colorado School of Mines, Golden, USA) sur l'application de la technique MOLI-MS pour le typage de *P. aeruginosa*.

6.4. Discussion générale

De très nombreux laboratoires de biologie clinique sont maintenant équipés de MALDI-TOF MS pour l'identification des microorganismes en routine. Il était ainsi tentant d'évaluer les performances de cette technique innovante pour le typage bactérien. Les exigences pour le typage par MALDI-TOF MS sont plus complexes que celles requises pour l'identification. Plusieurs études ont montré des résultats prometteurs alors que d'autres ont montré une résolution insuffisante de la technique de type MALDI-TOF MS notamment en comparaison à la technique PFGE. Pour certaines espèces bactériennes, en particulier pour *E. coli* et *S. aureus*, les données disponibles sont parfois contradictoires. Les discordances entre les résultats peuvent être expliquées en partie par des considérations d'ordre méthodologique.

6.4.1. Impact des paramètres techniques sur le typage par MALDI-TOF MS

Les empreintes spectrales varient selon les microorganismes et certains pics sont spécifiques de genre, d'espèce ou de sous-espèce. Pour le typage par MALDI-TOF MS, le challenge est donc d'obtenir un nombre suffisant de pics biomarqueurs reproductibles et spécifiques de sous-groupes. Cependant, le profil du spectre de masse est influencé par de très nombreux paramètres tels que le mode de préparation des échantillons (cellule entière ou extraction des protéines), la matrice utilisée (type de solvant, concentration, conditions de séchage) ou les conditions de culture bactérienne (température, durée, milieu de culture) (180). Alors qu'une préparation par extraction des protéines est généralement inutile pour l'identification des bactéries à l'espèce, l'optimisation de la préparation des échantillons est essentielle pour l'identification des sous-espèces et le typage bactérien (181). Les spectres de masse bactériens obtenus par technique MALDI-TOF MS contiennent une grande proportion de pics (~ 60 à 70%) issus de protéines ribosomales dont l'expression est indépendante des conditions de culture (146). Cette propriété, intéressante pour l'identification bactérienne, réduit la résolution pour le typage qui est basé sur de petites différences spectrales. Certaines équipes ont testé différentes conditions de culture (milieu de culture, temps d'incubation) et ont effectivement constaté que la modification de ces paramètres ne portent pas atteinte à l'identification microbienne par MALDI TOF MS (182, 183). Toutefois, les conditions de culture affectent profondément la physiologie des bactéries et donc l'expression des protéines bactériennes : un ensemble de pics de base reste constant, mais des différences dans les spectres pourraient être exploitées pour le typage. Par exemple, les cultures en bouillon

trypticase soja produisent un plus grand nombre de pics notamment dans les masses moléculaires plus élevées (79). Egalement, l'utilisation de l'acide sinapinique comme matrice produit des spectres plus informatifs, avec une intensité de signal plus élevée et un meilleur ratio signal sur bruit de fond (184). Mais les résultats obtenus en combinant ces conditions de culture et cette matrice ont montré une faible reproductibilité (82). Récemment, Veenemans *et al.* ont montré que le temps d'incubation et le milieu de culture affecte les résultats de typage de *E. coli* par MALDI-TOF MS : la proportion de souches correctement attribuées à un phylogroupe et ou à un ST était sensiblement plus faible pour les souches incubées sur géloses Sabouraud et géloses Drigalski pendant 24 h, que pour celles incubées pendant 48 h sur tous les types de milieux (93). D'autre part, les spectres de masse peuvent varier pour un même isolat, cultivé dans les mêmes conditions, suivant l'état du laser ou la qualité de l'étalement du dépôt sur la cible MALDI-TOF. Ces facteurs peuvent entraîner un décalage des valeurs m/z , une augmentation ou une diminution de l'intensité des pics. Ces variations peuvent facilement affecter les résultats du typage (116). Suivant notre expérience, la nature et la qualité des contenants joue également un rôle non négligeable (pointes pour pipette, flacon pour conserver les réactifs) ainsi que la qualité du lavage des cibles MALDI-TOF. Il est impératif de suivre scrupuleusement les recommandations des fournisseurs. Afin de pallier aux variations liées aux paramètres techniques, un étalon interne propre à chaque stratégie de typage doit être utilisé : il permettra de calibrer les spectres obtenus dans des séries d'acquisition différentes et de pondérer les intensités des pics.

6.4.2. Analyse des données et identification des pics biomarqueurs

Trois types de différences peuvent être identifiées entre les pics de plusieurs spectres de masse: (i) l'intensité du signal, (ii) la perte d'un signal, (iii) le décalage du signal. Les variations de l'intensité du signal sont provoquées par des variations dans l'expression de la protéine. Mais comme expliqué précédemment, les conditions de culture peuvent être responsables de ces variations. La perte d'un signal est provoquée par l'absence totale d'expression d'une protéine, indiquant soit une mutation entraînant un codon d'arrêt ou une modification du sens de lecture, soit une mutation d'un facteur de régulation de la protéine en question. Mais cette perte de signal pourrait également dépendre des conditions de culture ou de préparation des échantillons. Par conséquent, la variation de l'intensité du signal ou de la perte d'un signal ne fournit pas d'information fiable sur le génotype d'une souche. En revanche, les décalages de pics (c'est à dire la perte d'un signal couplée à l'apparition d'un

nouveau signal de masse proche, tous deux liés à deux variants d'une même protéine) sont dus à un polymorphisme des gènes codant la protéine en question. Ce type de mutation conduit à une substitution d'acides aminés qui modifie le poids moléculaire de la protéine codée et donne donc une information plus fiable (115). La technique de type MALDI-TOF MS est généralement utilisée pour générer rapidement des spectres de masse de protéines non identifiées. Il est possible de coupler les appareils de type MALDI-TOF MS avec d'autres technologies, par exemple les systèmes LC-MS/MS ou MALDI-TOF MS/MS, pour identifier les séquences peptidiques des protéiques correspondantes aux pics biomarqueurs (185, 186).

L'une des principales restrictions du typage bactérien par MALDI-TOF MS est liée aux méthodes d'identification des différences entre les spectres de masse. À l'heure actuelle, il existe deux grandes approches d'identification des pics biomarqueurs : (i) par comparaison visuelle des pics, ce qui est souvent fastidieux et non reproductible, ou (ii) en utilisant des outils de calcul mathématique inclus dans différents logiciels. Il existe des logiciels commerciaux paramétrés pour l'identification des bactéries en routine, mais pour le typage bactérien les logiciels disponibles sont plutôt utilisés en application recherche. Plusieurs de ces logiciels sont disponibles, incluant des algorithmes de calculs plus ou moins complexes et appliqués directement ou non à l'analyse des spectres de masse des bactéries. A titre d'exemple, plusieurs coefficients de similarité peuvent être utilisés pour fixer le niveau de similitude entre les souches. Certains ne s'intéressent qu'au caractère présence / absence d'un pic, comme le coefficient de similitude de Dice, tandis que d'autres prennent également en considération les intensités des pics, comme le coefficient de Pearson. Le coefficient de similitude choisi affecte la reproductibilité et le pouvoir discriminant de la stratégie de typage (180). Plusieurs études ont démontré que le coefficient de Pearson semble être le plus efficace (187-189). À ce jour, les résultats de recherche automatique de pics biomarqueurs de sous-groupes ne sont pas toujours en accord avec les résultats obtenus par les techniques de typage moléculaire de référence. Bien que les logiciels intègrent des algorithmes de calcul puissants, l'une des explications possibles aux difficultés rencontrées est l'intégration de tous les pics dans l'analyse. En effet, les pics qui ne sont pas directement impliqués dans l'identification d'un sous-groupe peuvent interférer sur les résultats. Par exemple, chez *S. aureus* l'identification de clones par MALDI-TOF MS en utilisant tous les pics d'un spectre conduit à un résultat de typage différent des résultats obtenus par PFGE/POT, alors qu'une analyse sur un nombre restreint de pics, choisis suivant des critères précis, permet d'obtenir des résultats cohérents entre les techniques. Les pics considérés comme ayant des effets négatifs (bruit de

fond, faible reproductibilité, pics non spécifiques de l'identification de clones) ont été exclus. L'analyse est alors réalisée uniquement sur des pics d'intérêts permettant une analyse plus fine. Mais ce procédé doit être utilisé avec précaution, l'exclusion de trop nombreux pics pouvant conduire à un mauvais résultat. Une validation de cette stratégie de typage est donc indispensable (116).

6.4.3. Echantillonnage des souches et critères de performance

L'échantillonnage des souches lors de la définition et de la validation d'une stratégie de typage doit être fait de manière cohérente avec son application potentielle. A l'inverse, l'étendue de l'application de la méthode est restreinte à l'échantillonnage. En d'autres termes, lorsque des souches peuvent être différenciées à partir d'un petit nombre de CCs, STs ou autres sous-groupes, cela ne signifie pas nécessairement que la stratégie de typage peut être extrapolée à un grand nombre de CCs, STs ou autres sous-groupes. Cela vaut également pour la représentativité géographique des souches (46). De plus, il faut un nombre suffisant d'isolats pour assurer la validité des critères de performance de la stratégie de typage mise en place. Les valeurs de sensibilité et de spécificité doivent être définies et interprétées dans le même temps que les valeurs prédictives positives et négatives. D'autres indicateurs peuvent également être calculés comme les rapports de vraisemblance (190). La robustesse, c'est-à-dire la capacité à supporter de petites variations des paramètres internes à la méthode, sans conséquence pour le résultat, doit être testée autant que possible, de même que la reproductibilité intra- et inter-laboratoire (46). Ainsi, les futures études d'application de la technique MALDI-TOF au typage bactérien devront inclure de plus grandes collections de souches bien caractérisées et représentatives de l'épidémiologie globale de chaque espèce.

6.4.4. Temps et coût d'analyse

Jusqu'à présent, les techniques de typage utilisées sont essentiellement des techniques génotypiques qui sont performantes mais restent longues et coûteuses. Techniquement complexes, elles demandent des procédures rigoureuses de préparation des échantillons et des techniciens expérimentés pour leur mise en œuvre. Plusieurs jours sont nécessaires pour la production de données notamment pour les techniques de PFGE et de MLST. Pour le typage par MALDI-TOF MS, la préparation des souches bactériennes est extrêmement simple et demande peu de réactif. Un résultat est obtenu en seulement quelques minutes. De plus, les

appareils de type MALDI-TOF MS sont déjà présents dans la plupart des laboratoires de biologie clinique, réduisant ainsi les coûts d'investissement.

6.4.5. Texte de la revue

Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? Trends Microbiol. 2017 Jan 13. Doi : 10.1016/j.tim.2016.12.006. (IF 2015 : 9,50)

Review

Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria?

Marlène Sauget,^{1,2,3,*} Benoît Valot,³ Xavier Bertrand,^{1,2,3} and Didier Hocquet^{1,2,3}

Bacterial typing is crucial to tackle the spread of bacterial pathogens but current methods are time-consuming and costly. Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been recently integrated into the microbiology laboratory workflow for a quick and low-cost microbial species identification. Independent research groups have successfully redirected the original function of this technology from their primary purpose to discriminate subgroups within pathogen species. However, identical bacterial subgroups could be identified by unrelated peaks by independent methods, thus limiting their robustness and exportability. We propose several guidelines that could improve the performance of MALDI-TOF MS-based typing methods for use as a first-line epidemiological tool.

The Rush of Clinical Laboratories towards MALDI-TOF Mass Spectrometry

MALDI-TOF MS is an innovative tool that is easy to use, rapid, accurate, and cost-effective, and that has revolutionized bacterial identification in clinical microbiology laboratories. MALDI-TOF MS allows the identification of microorganisms at the species level by analysis of total protein (Box 1) [1]. This technique is based on the generation of mass spectra from whole cells and their comparison to reference spectra [2]. Once the samples are ready, species determination takes only a few minutes [2,3]. Hence, MALDI-TOF MS has been integrated within the last decade into the routine workflow of medical microbiology laboratories for microbial identification, replacing the traditional biochemical or molecular techniques [1,4,5].

The Relevance of MALDI-TOF MS to Bacterial Typing

The population of individuals within a bacterial species is far from homogeneous. Hence, bacterial species of clinical importance are divided into groups with various pathogenicity or spreading capability. The purpose of bacterial **typing** (see Glossary) is to recognize epidemic clones, clones with higher or specific pathogenicity, and to compare clinical and environmental isolates to follow the spread of bacterial subgroups [6]. Bacterial typing is either used for retrospective epidemiological studies in research laboratories or in the routine of clinical laboratories where a quick result is necessary to tackle the spread of epidemic clones by implementing infection control measures [7]. Molecular-based typing methods mostly rely on DNA restriction or amplification (e.g., **PFGE** or **MLST**, respectively) [8]. Although these techniques are widely recognized, they remain time-consuming, costly, and labor-intensive. Keeping in mind that the ideal method for routine bacterial typing requires minimum sample preparation, analyzes data directly, is quick, automated, and inexpensive – all of which are qualities of MALDI-TOF MS – microbiologists were eager to use MALDI-TOF MS for this purpose.

Trends

MALDI-TOF MS quickly and accurately identifies most bacterial species of clinical importance by analyzing mass spectrum from whole bacterial cells.

Bacterial mass patterns are derived from ribosomal or other abundant bacterial proteins which could be used as biomarkers for subspecies discrimination (e.g., pathotypes, serotypes, sequences types, or pulsotypes).

However, inconsistencies between published studies could be due to differences in bacterial collections, extraction methods, mass spectrometers, and data analysis.

MALDI-TOF MS-based typing could become a first-line epidemiological tool. However, the robustness and inter-laboratory reproducibility of these typing methods would improve with stronger compliance to good practice guidelines for biomarker discovery.

¹Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France

²Centre de Ressources Biologiques – Filière Microbiologie de Besançon, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France

³UMR CNRS 6249 Chrono-environnement, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

*Correspondence: msauget@chu-besancon.fr (M. Sauget).

Box 1. The Principle of MALDI-TOF MS

Although used since the 1980s in biochemistry, MALDI-TOF MS only reached clinical microbiology laboratories in 2010. This technique quickly identifies bacterial species by determining the molecular masses of proteins, many of which are ribosomal proteins. The analysis is performed on whole cells or on crude bacterial extracts. MALDI-TOF MS requires a stage of sample crystallization in a matrix on an inert support. The irradiation of the crystalline mixture with a brief laser pulse desorbs and ionizes characteristic ions (MALDI). The ionized molecules are then accelerated in an electric field and separated, as a function of molecular weight, in a vacuum tube. The time-of-flight (TOF) of each ion is measured and corresponds to the time taken to reach the detector. The ions reach the detector, more or less rapidly, according to their m/z ratio. The electrical signal is processed by computer and converted into a mass spectrum. The mass range acquisition is mainly m/z 2000 to 20 000.

MALDI-TOF MS has been tested for the typing of many bacterial pathogens, such as *Escherichia coli* [9–23], *Staphylococcus aureus* [24–33], *Pseudomonas aeruginosa* [34], *Acinetobacter baumannii* [35], *Klebsiella pneumoniae* [36,37], *Neisseria meningitidis* [38], *Listeria monocytogenes* [39], *Haemophilus influenzae* [40], *Streptococcus pneumoniae* [41–43] and *Streptococcus pyogenes* [44,45]. Overall, intraspecific groups could be segregated by MALDI-TOF MS for some, but not for all, pathogens. Spinali *et al.* recently extensively reviewed these studies and pointed out discrepancies presumably attributed to methodological differences between studies (i.e., technological and biological mass spectrometry issues, strain sets, definition of specific peaks, statistical analysis) [46].

Here, we discuss in detail the influence of the methodology by comparing MALDI-TOF MS-based typing methods (thereafter called MALDI-typing methods) that aimed at identifying the same subgroups of the two major pathogens *E. coli* and *S. aureus*.

Workflow of MALDI-TOF MS for Bacterial Typing

The wide range of analysis workflow – from extraction method to bioinformatics tool – used for MALDI-typing makes it difficult to compare the methods (Table 1). However, most methods are subtle adaptations of the MALDI-TOF MS workflow used for bacterial identification. Typically, these methods (i) are based on a panel of isolates characterized by a reference typing method, (ii) use an ethanol–formic acid extraction method to generate high-quality spectra, (iii) use an α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix, and (iv) acquire spectra from m/z 2000 to m/z 20 000 with a Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

Peak biomarkers are identified either by simple visual analysis of the spectra or more complex analysis of the whole spectra with informatics and statistical analysis.

Data Analysis and Biomarker Identification

Three types of difference can be identified between peaks of two mass spectra: (i) signal intensity, (ii) loss of a signal, and (iii) shift of a signal (called ‘**peak shift**’). Variation in signal intensity reflects either modification of protein expression after genetic mutations in regulators or bacterial adaptation to growth conditions. Mutation introducing a premature stop codon or a frame-shift in a gene obviously leads to the loss of the signal corresponding to the encoded protein. However, this loss also depends on growth conditions or sample preparation, and the full extinction of protein expression can also be due to mutations in regulators. Therefore, variation in a signal intensity and loss of a signal do not give unambiguous information about the strain genotype. This contrasts with peak shift, which is the consequence of a slight protein weight modification due to an amino acid substitution after nonsynonymous mutations in the corresponding gene, and that can be used as a trustable biomarker [29].

One of the main complications of MALDI-TOF MS bacterial typing is the identification of reliable peak biomarkers. This can be achieved either by visual comparison of peaks, which is difficult, or by using a combination of biomathematical reasoning using one of the commercial software products available (Table 1). Most of the MALDI-typing methods use the whole spectrum of

Glossary

***Escherichia coli* phylogroups:**

phylogenetic clusters of extraintestinal strains of *E. coli* in four major phylogroups (A, B1, B2, and D) and four minor phylogroups (C, E, F, and *Escherichia* cryptic clade I).

Matrix: liquid mixture which allows a cocrystallizing with the analyte on an inert support. A short laser pulse is applied in the matrix and the molecules are then both desorbed and ionized by charge transfer.

MLST (multilocus sequence typing):

bacterial typing based on the nucleotide sequence of internal fragments of multiple housekeeping genes. For each housekeeping gene, the different sequences are assigned as distinct alleles and, for each isolate, the combination of alleles at each of the loci define the allelic profile or sequence type (ST).

 m/z ratio (mass-to-charge ratio):

dimensionless quantity formed by dividing the atomic mass of an ion by its charge number.

Negative predictive value (NPV):

proportion of negative results that are true negative.

Peak biomarker:

peak that differentiates two groups of bacteria.

Peak shift:

in mass spectrometry, a peak shift is the loss of a signal coupled with the onset of a new signal with a close m/z ratio.

PFGE (pulsed-field gel electrophoresis):

typing method based on the comparison of restriction profiles of the entire microbial genome. The electrophoretic migration of the large DNA fragments requires alternating electric fields. A pulsotype is defined by the number and size of DNA fragments.

Positive predictive value (PPV):

proportion of positive results that are true positive.

Sensitivity: proportion of positives that are correctly identified as such.

Specificity: proportion of negatives that are correctly identified as such.

Typing: allows differentiation of sublineages within a species, in particular to highlight the clonality between isolates in the same spatio-temporal context and therefore likely to be linked epidemiologically.

Table 1. Extraction Methods, Matrix, Mass Spectrometers, and Bioinformatics Tools Used in Bacterial Typing with MALDI-TOF MS

Bacterial growth (agar media)	Mueller–Hinton; blood; sheep blood; Columbia; Columbia blood; Columbia sheep blood; trypticase soy; Danish blood; nutrient agar; Luria–Bertani
Extraction or preparation method	Ethanol–formic acid (for high-quality spectra); whole cells suspended in a matrix solution before being spotted onto a MALDI target plate (for medium-quality spectra); colonies spotted directly onto a MALDI target plate (so-called ‘direct transfer method’ for low-quality spectra).
Matrix [2]	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA); sinapinic acid (SA); 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB).
Mass spectrometer (database; manufacturer)	Microflex [®] , Autoflex [®] , Ultraflex [®] , Reflex IV [®] , Biflex [®] (Biotyper; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany); VITEK MS [®] (Saramis; bioMérieux, Marcy l’Etoile, France); AXIMA [®] (Saramis; Shimadzu-Biotech, Corp., Kyoto, Japan); Voyager DE PRO [®] (Data Explorer; Applied Biosystems, Foster City, California, USA); ANDROMAS [®] (Andromas SAS, France).
Bioinformatics tool (provider)	Flexanalysis [®] (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany); Microbe MS [®] (Koch Institute, Germany); R [®] (http://www.R-project.org), with MALDIquant package; Stata [®] (StataCorp, College Station, TX, USA); MALDI Biotyper [®] (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany); ClinProTools [®] (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany); PAST [®] (University of Oslo, Norway); Bionumerics [®] (Applied Maths, Kortrijk, Belgium); Matlab.

peaks. However it has been shown that the extraction from the mass spectrum of peaks associated with a clone, before mathematical analysis, enhanced the performance of the typing method [25]. Thus, peaks with low reproducibility, nonspecific peaks, and peaks that are common in a specific strain could have negative effects on the test performances. None of the many types of software that have been used in bacterial MALDI-typing has prevailed for this use (Table 1). The level of similarities between two isolates is calculated with several similarity coefficients or algorithms which analyze various parameters of the peaks (peak presence or absence, peak intensities). The choice of one or other informatics and statistical tools clearly affects the reproducibility and the discriminatory power of the method [5].

MALDI-TOF MS for *E. coli* Typing

E. coli is the dominant aerobic commensal species of the mammalian intestinal flora and is also widely present on plants and in the aquatic environment. Although most strains are not pathogenic, *E. coli* is the primary cause of urinary tract infections, bacteremia, and intestinal infections both in the hospital and the community [47]. This species is classified into different pathotypes responsible for various human diseases. The phylogenetic tree built from the comparison of nucleotide sequences clearly showed four major *E. coli* **phylogroups** named A, B1, B2, and D, where commensal *E. coli* mostly belong to phylogroups A and B1; strains responsible for extraintestinal infections belong to phylogroup B2 (the most virulent among extraintestinal strains) and, to a lesser extent, to phylogroup D [48–51]. Among the highly diverse population of *E. coli*, the ST131 clone, which belongs to phylogroup B2, deserves special attention as it has accounted for the worldwide dissemination of extended-spectrum β -lactamases since its identification in 2008 [6].

Three studies have been developed for the detection of serotype O157:H7 by MALDI-TOF MS (Table 2) [14–16]. This serotype is a member of the diarrheagenic pathotypes called enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). All the studies identified the absence of a peak at m/z 9060 as a specific biomarker of EHEC O157:H7 isolates. This peak corresponds to the acid stress chaperone-like protein HdeB, [15]. In addition, Clark *et al.* spotted an unidentified O157:H7-specific peak at m/z ~6040 [16].

To date, two methods identified phylogroup B2 with MALDI-TOF MS with the same peak biomarkers: a peak shift from m/z ~9740 (for non-B2 phylogroup isolates) to m/z ~9716 (for

Table 2. Comparison of the Peak Biomarkers Used to Detect *Escherichia coli* sublineages by MALDI-TOF MS

		Peak biomarkers (<i>m/z</i>) ^a											Refs	
		4174	4858	6612	6040	7650	7707	8349	9060 (HdeB)	9716 (HdeA)	9740 (HdeA)	10 474		10 693
Serotype	O157:H7													[16]
	O157:H7													[14]
	O157:H7													[15]
Phylogroup	B2													[17]
	B2													[18]
Sequence Type	ST131													[19]
	ST131													[21]
	ST131													[23]
	ST131													[22]

^aRed, specific presence of the peak; green, specific absence of the peak; blue, peak included in the typing model.

phylogroup B2 isolates) along with the presence of a peak at $m/z \sim 4858$ in B2 isolates [17,18] (Table 2). The peak at $m/z \sim 9740$ has been identified as the mature form of HdeA, an acid-stress chaperone-like protein [15,52]. The peak at $m/z \sim 4858$ is most probably the doubly charged ion of HdeA, and is hence not an independent biomarker [17,18].

Those results were encouraging. However, the research groups which attempted to identify *E. coli* ST131 with MALDI-TOF MS found inconsistent results [19–23]. All but one group found an ST131-specific peak shift from m/z 9740 (non-ST131) to m/z 9716 (ST131), which is more of a phylogroup B2 marker (see above) [22]. Besides, only one other ST131-specific peak at m/z 8349 was found by more than one research group [19,22]. Furthermore, Nakamura *et al.* identified four other peak biomarkers but showed that a peak at m/z 7650 in the ST131 group and m/z 7707 (identified as the protein YahO) in the other ST clonal groups had the highest discrimination abilities [15,22]. In addition, Lafolie *et al.* identified two other ST131-specific peaks at m/z 10 474 and m/z 6612 (Table 2) [23].

Overall, mass spectra were slightly heterogenic between phylogroups, and to a lesser extent between some STs within the species *E. coli*. This heterogeneity was also retrieved by methods using the ‘direct transfer method’ [17,18,23]. Hence, MALDI-TOF MS offers opportunities for very quickly typing *E. coli* in clinical laboratories.

MALDI-TOF MS for *S. aureus* Typing

A fast and reliable identification of dominant clones of *S. aureus* is necessary to track and prevent the spread of epidemic clones. Molecular typing methods, such as protein A (*spa*) typing, MLST and PFGE are generally used for this purpose. Ten studies evaluated the use of MALDI-TOF MS to quickly discriminate *S. aureus* clonal lineages. Among these, three were carried out independently on local epidemic strains, outbreak management, or often failed to identify unambiguous biomarkers [24–26]. Seven studies focused on the five predominant clonal complexes (CC5, CC8, CC22, CC30, CC45) of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and on the emerging epidemic clone CC398 [27–33]. Table 3 compares the peak biomarkers of these CCs. A CC5-specific mass shift from m/z 3876 to m/z 3891 was identified by all research groups and correlated with the F16Y change in the unannotated protein SA2420.1 [27,29–32]. Again, a CC8-specific mass shift from m/z 6533 to m/z 6591 was also found by four research groups and corresponded to a polymorphism of the protein SA1452 [27–29,31,32]. Another mass shift from m/z 5033 to m/z 5004, related to an E27V exchange in the protein GraF, seemed specific to CC22 [27,29,31,32]. However, a close look at the data revealed that this

Table 3. Comparison of the Peak Biomarkers Used to Detect *Staphylococcus aureus* CC5, CC8, CC22, CC30, CC45, and CC398 by MALDI-TOF MS ($m/z \pm 10$)

[illegible]

^aRed, specific presence of the peak; green, specific absence of the peak; blue, peak included in the typing model

shift was restricted to some *spa* types. Hence, the peak $m/z \sim 5004$ was a marker of CC22 t022, t032, and t2006, and the peak $m/z \sim 5033$ was a marker of CC22 t005, t22, CC5, CC8, CC30, CC45, and CC398 [31]. For the CC30, the two peak shifts identified – from m/z 5527 to m/z 5508, and from m/z 5439 to m/z 5419 – correlated with the polymorphism of the protein SAS049 and an unidentified protein, respectively [27,29,31]. The data on CC5, CC8, CC22, and CC30 contrasted with those on CC45 and CC398. Hence, independent research groups identified correctly these latter CCs with numerous markers that were intra-laboratory reproducible but different from one study to another (Table 3) [31–33].

Even if the studies already conducted are promising, they are hardly exportable from one laboratory to another. Such heterogeneity was not due to a difference in sample preparation since all methods relied on spectra generated from ethanol/formic acid extraction. Instead, discrepancies reflected the heterogeneity of the bacterial collections tested by the different studies. The local epidemiology dictates the spreading clone that has to be detected and the background collection it is tested against. Consequently, the isolates of each clonal lineage included in the studies were not equal in number, not representative of the CCs that make the worldwide diversity. More clonal lineages and pandemic strains should be tested in order to enhance the robustness of the methods, allowing their use within different epidemiological environments.

Cell Culturing and Sample Preparation Can Impact MALDI-Typing (Table 1)

The use of MALDI-TOF MS for routine strain typing is challenging for clinical laboratories. Discrepancies between results may be partly explained by considerations related to the methodology. Indeed, the requirements for MALDI-TOF MS typing are far more complex than those required for routine microbial identification. Discrepancies from one study to another could rely on differences in bacterial growth conditions that do not impact MALDI-TOF MS-based identification but can profoundly affect the microbial physiology, the protein expression profile, and the subsequent assignment to a subspecific group [14,18,53,54]. For instance, a blood-containing medium can contaminate bacterial protein profiles with blood-related proteins [55]. The sample preparation (type of extraction, the nature of solvent, the concentration of

the matrix) also influences the mass spectrum and must be optimized for bacterial typing [5,56,57]. Moreover, identical clone isolates cultured in the same conditions can produce nonidentical mass spectra because of subtle measurement factors, such as the setting of the laser shot, wear level of the laser, or quality of spots on the MALDI target plate. These factors may shift m/z values or induce variation in the peak intensity and can affect the typing results [25]. The use of an internal standard to calibrate the spectra during MALDI-typing should circumvent these variations. Studies carried out for *E. coli* and *S. aureus* species showed that optimization of cell culturing and sample preparation are crucial for strain typing. For instance, *S. aureus* MALDI-TOF MS typing mass spectra have been internally calibrated using a set of highly conserved peaks at m/z 4813, m/z 6888 and m/z 9626 [27,31]. These data clearly showed that growth conditions, protein extraction, and spectra acquisition must be optimized for each method. However, even with additional steps adding ≤ 5 extra minutes per isolate when compared to identification, MALDI-typing remains interesting in the routine of the clinical laboratory for the detection of epidemic pathogens.

Recommendations for Bacterial Typing Strategies by MALDI-TOF MS

The next challenge in the development and implementation of MALDI-TOF MS for typing will be to standardize the procedures for cell culturing, sample preparation, and data analysis. Figure 1 proposes a flow chart for the development of a typing strategy by MALDI-TOF MS. We list

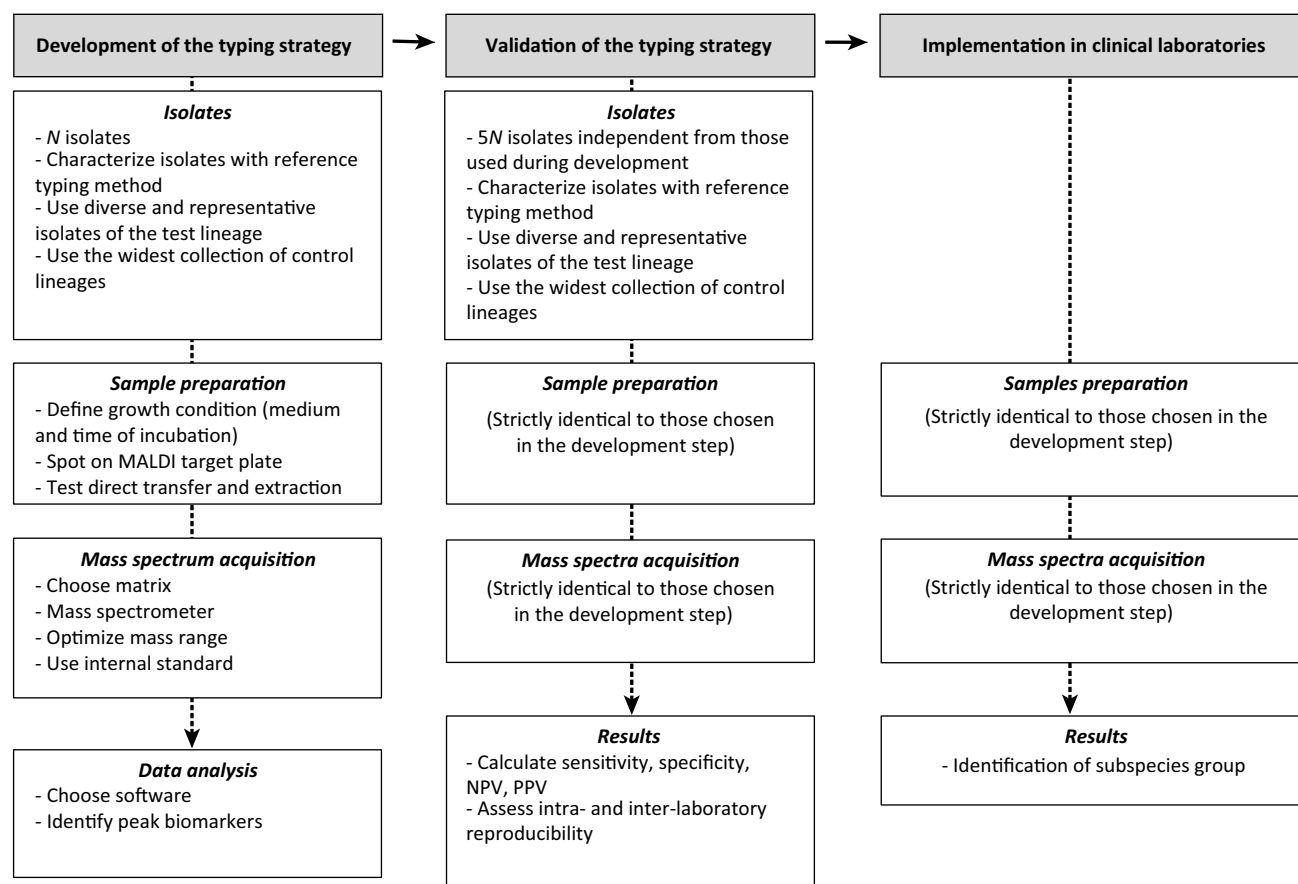


Figure 1. Recommendations for the Development of a Typing Strategy by MALDI-TOF MS.

Box 2. Good Practice Guidelines for MALDI-TOF MS Biomarker Discovery

Good practice guidelines for biomarker discovery are essential whatever the application area (e.g., biology, microbiology, and oncology). One of the most important requirements is that the predictive biomarkers are first identified with a training set of data and then validated on an independent set of data [60]. Van Belkum *et al.* proposed guidelines for the validation and application of phenotypic and genotypic typing methods for use in bacterial epidemiology. They emphasized that typing results need to be interpreted in the context of all available epidemiological, clinical, and demographical data relating to the infectious disease under investigation [61]. The diversity of the mass spectrum between the groups to be discriminated will dictate the size of the training and validation set. However, in practice, the validation set is at least five times bigger than the training set, with both sets including isolates with the widest geographic, temporal, and clonal diversity as possible.

Any typing scheme is *a priori* only valid for the set of strains tested. When isolates from a small number of CCs, STs, or serotypes can be distinguished, this cannot always be extrapolated to a larger number of CCs, STs, or serotypes. The same applies to strains from geographically close entities [46]. Consequently, typing schemes should be standardized as much as possible, and their robustness needs to be tested before the transfer to other systems. This includes analyzing a sufficient number of isolates to ensure the validity of specific peak biomarkers. The recording of a peak in a mass spectrum cannot be taken as representing unambiguous detection of a particular protein without further analysis [46]. Hence, the identification of the protein biomarker ions by additional methods is recommended.

below the recommendations to improve the quality, robustness, and portability of MALDI-TOF MS-typing methods, which should:

- include larger and well-characterized collections representative of epidemic strains, following the good practice guidelines for biomarker discovery (Box 2);
- test the influence of growth conditions: typing strategies should be optimized after testing different growth media (in particular those listed in the Table 1);
- acquire mass spectra aligned with highly conserved peaks within the species, or a molecular weight marker to calibrate both position and peak intensity;
- test inter-laboratory reproducibility to improve the robustness and portability.

MALDI-TOF MS Combined with Other Techniques for Bacterial Typing

MALDI-TOF MS typing revealed peak biomarkers mostly corresponding to unknown proteins – whose identification would enhance the robustness of the methods [15,29,55]. For this purpose, tandem mass spectrometry methods such as MALDI-TOF MS/MS or LC-MS/MS could be used [4,58]. MS/MS analysis consists in selecting an ion of interest that is further fragmented by collision and reanalyzed by MS. The protein biomarkers are back identified from their sequence-specific fragment ions by comparison with a database of bacterial protein sequences. MALDI-TOF MS/MS directly analyzes the entire protein. A more sensible approach, implying protein extraction and enzymatic digestion with separation of the resulting peptides by liquid chromatography, can also be used. The peptides could either be directly identified by LC-MS/MS or collected in microfractions onto a MALDI plate before MS analysis in an LC-MALDI-MS/MS system. The identification of the protein associated to a peak biomarker is a crucial step for the validation of MALDI-TOF-based typing methods. Genomic data can also confirm the polymorphism in amino acid sequence of peak biomarkers between species subgroups.

Specific Bacterial Extract for MALDI-Typing

MALDI-TOF MS has also been successfully used to discriminate bacterial groups by the analysis of mass spectra of specific bacterial extracts. For instance, fatty acid profiles obtained after lipid extraction have been successfully used for bacterial identification [59]. CeO₂-catalyzed metal oxide laser ionization (MOLI-MS) proposed an alternative to protein profiling that identifies bacterial species with higher accuracy than with conventional methods. MOLI-MS appears as a promising tool for subspecies discrimination. MALDI-TOF MS also identified *E. coli* flagellar antigens using a specific extraction method [13]. Dunne *et al.* developed the ‘MLST by mass spectrometry’ in which comparison of the cleavage fragment peak patterns of specific PCR amplicons with a reference sequence set accurately assigned isolates to sequence types [42]. Although most MALDI-TOF MS typing methods used whole-cell extracts, the analysis of specific extracts could increase the chances of identification of peak biomarkers specific of subgroups.

Concluding Remarks

MALDI-TOF MS is a promising, rapid, and quite inexpensive typing tool for the identification of bacterial subspecies. Although promising, the performance (robustness, resolution, and discriminatory power) of MALDI-typing methods needs to be improved. This could be achieved by the modification of the growth conditions, the use of the extraction method, the use of specific bacterial extracts, the use of various matrixes and of an internal standard, and/or a change in the mass range or the post-treatment of the mass spectra. Unfortunately, mass spectra possibly present an intrinsic variability in peak intensity and/or peak location associated with independent acquisitions in time and in different devices. This is possibly related to variation in individual instruments and/or wear over time (laser strength, laser life, detector sensibility), preventing the comparison of independent data sets. To circumvent these variations, technical steps such as growth, sample preparation, and device configuration must be performed by experimented persons using perfectly controlled consumables. The implementation of the MALDI-typing method in the routine workflow of clinical laboratories will require user-friendly software for data analysis. We will recall that the more robust methods rely on peak shifts, and stress the need for back and forth between MALDI-TOF MS and genomic/proteomic data. Although MALDI-TOF MS would not replace molecular biology, it is a first-line epidemiological tool which allows rapid prospective typing. Hence, identification of epidemic subspecies with MALDI-TOF MS will speed up the implementation of infection control measures that will prevent the spread of pathogens.

Supplemental Information

Supplemental information associated with this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.006>.

References

- Bizzini, A. and Greub, G. (2010) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1614–1619
- Fenselau, C. and Demirev, P.A. (2001) Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass. Spectrom. Rev.* 20, 157–171
- Holland, R.D. et al. (1996) Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 10, 1227–1232
- Nomura, F. (2015) Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): a revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1854, 528–537
- Croxatto, A. et al. (2012) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 380–407
- Nicolas-Chanoine, M.H. et al. (2014) *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 543–574
- Taconelli, E. et al. (2014) ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 20 (Suppl. 1), 1–55
- Sabat, A.J. et al. (2013) Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro. Surveill.* 18, 20380
- Siegrist, T.J. et al. (2007) Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J. Microbiol. Methods* 68, 554–562
- Egli, A. et al. (2015) Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based typing of extended-spectrum β -lactamase producing *E. coli* – a novel tool for real-time outbreak investigation. *PLoS One* 10, e0120624
- Karger, A. et al. (2011) Determination of serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 896–905
- Christner, M. et al. (2014) Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 9, e101924
- Chui, H. et al. (2015) Rapid, sensitive, and specific *Escherichia coli* H antigen typing by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-based peptide mass fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2480–2485
- Mazzeo, M.F. et al. (2006) Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1180–1189
- Fagerquist, C.K. et al. (2010) Rapid identification of protein biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-time-of-flight mass spectrometry and top-down proteomics. *Anal. Chem.* 82, 2717–2725
- Clark, C.G. et al. (2013) Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *J. Microbiol. Methods* 94, 180–191
- Sauget, M. et al. (2014) Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 977–983
- Veenemans, J. et al. (2016) Comparison of MALDI-TOF MS and AFLP for strain typing of ESBL-producing *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 829–838
- Novais, A. et al. (2014) MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 1391–1399
- Matsumura, Y. et al. (2014) Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1034–1040
- Matsumura, Y. et al. (2015) Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group among extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* using VITEK MS Plus matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* 119, 7–9

Outstanding Questions

What level of assignment to a sub-specific group will MALDI-TOF MS-based typing methods achieve: clone, sequence type, pulsotype?

Can MALDI-TOF mass spectrometers used in clinical laboratories for bacterial identification be used for bacterial typing? Should we implement MALDI-TOF mass spectrometers with higher resolution in clinical laboratories for typing?

Which technical settings (i.e., growth condition, mass spectrometer setting, internal standard) should we test to develop a typing strategy by MALDI-TOF MS?

Do biomarkers have to be systematically identified to enhance the robustness of the MALDI-TOF MS-based typing methods?

Can MALDI-TOF MS-based typing methods speed up the implementation of hygiene control procedures for relevant patients?

22. Nakamura, A. *et al.* (2015) Rapid detection of B2-ST131 clonal group of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry: discovery of a peculiar amino acid substitution in B2-ST131 clonal group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83, 237–244
23. Lafolie, J. *et al.* (2015) Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies? *J. Hosp. Infect.* 90, 208–212
24. Schlebusch, S. *et al.* (2010) First outbreak of PVL-positive non-multiresistant MRSA in a neonatal ICU in Australia: comparison of MALDI-TOF and SNP-plus-binary gene typing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 1311–1314
25. Ueda, O. *et al.* (2015) Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J. Hosp. Infect.* 90, 147–155
26. Lasch, P. *et al.* (2014) Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Microbiol. Methods* 100, 58–69
27. Wolters, M. *et al.* (2011) MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 64–68
28. Boggs, S.R. *et al.* (2012) Characterization of a *Staphylococcus aureus* USA300 protein signature using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Med. Microbiol.* 61, 640–644
29. Josten, M. *et al.* (2013) Analysis of the matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1809–1817
30. Zhang, T. *et al.* (2015) Analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* major clonal lineages by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *J. Microbiol. Methods* 117, 122–127
31. Ostergaard, C. *et al.* (2015) Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 838–847
32. Camoez, M. *et al.* (2016) Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, e161–e167
33. Sauget, M. *et al.* (2016) Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight Mass spectrometry can detect *Staphylococcus aureus* clonal complex 398. *J. Microbiol. Methods* 127, 20–23
34. Cabroler, N. *et al.* (2015) Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *J. Clin. Microbiol.* 53, 1395–1398
35. Sousa, C. *et al.* (2015) Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. *Front. Microbiol.* 6, 481
36. Berrazeg, M. *et al.* (2013) Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One* 8, e61428
37. Sachse, S. *et al.* (2014) Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 80, 267–271
38. Suarez, S. *et al.* (2013) Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J. Microbiol. Methods* 94, 390–396
39. Barbuddhe, S.B. *et al.* (2008) Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5402–5407
40. Mansson, V. *et al.* (2015) Identification of *Haemophilus influenzae* type b isolates by use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2215–2224
41. Williamson, Y.M. *et al.* (2008) Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* conjunctivitis outbreak isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5891–5897
42. Dunne, E.M. *et al.* (2011) Multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* by use of mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3756–3760
43. Nakano, S. *et al.* (2015) Development and evaluation of MALDI-TOF MS-based serotyping for *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 2191–2198
44. Moura, H. *et al.* (2008) MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* isolates. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53, 333–342
45. Wang, J. *et al.* (2012) Identification and cluster analysis of *Streptococcus pyogenes* by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One* 7, e47152
46. Spinali, S. *et al.* (2015) Microbial typing by MALDI-TOF MS: do we need guidance for data interpretation? *J. Clin. Microbiol.* 53, 760–765
47. Croxen, M.A. and Finlay, B.B. (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38
48. Johnson, J.R. *et al.* (2001) Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 183, 78–88
49. Johnson, J.R. *et al.* (2001) Clonal relationships and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* isolates from women with a first or recurrent episode of cystitis. *J. Infect. Dis.* 183, 1508–1517
50. Johnson, J.R. *et al.* (2002) Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J. Infect. Dis.* 185, 1439–1447
51. Boyd, E.F. and Hartl, D.L. (1998) Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J. Bacteriol.* 180, 1159–1165
52. Holland, R.D. *et al.* (1999) Identification of bacterial proteins observed in MALDI-TOF mass spectra from whole cells. *Anal. Chem.* 71, 3226–3230
53. Valentine, N. *et al.* (2005) Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 58–64
54. Singhal, N. *et al.* (2015) MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6, 791
55. Dieckmann, R. *et al.* (2008) Rapid classification and identification of *salmonellae* at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7767–7778
56. Ochoa, M.L. and Harrington, P.B. (2005) Immunomagnetic isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef and identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and database searches. *Anal. Chem.* 77, 5258–5267
57. Murray, P.R. (2010) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 1626–1630
58. Cheng, K. *et al.* (2016) Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics. Clin. Appl.* 10, 346–357
59. Cox, C.R. *et al.* (2015) Strain-level bacterial identification by CeO₂-catalyzed MALDI-TOF MS fatty acid analysis and comparison to commercial protein-based methods. *Sci. Rep.* 5, 10470
60. Simon, R. (2005) Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. *J. Clin. Oncol.* 23, 7332–7341
61. van Belkum, A. *et al.* (2007) Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13 (Suppl. 3), 1–46

7. Perspectives.

Nous proposons (*Figure 1* page 110) un organigramme des recommandations qui permettraient d'améliorer les performances d'une stratégie de typage par MALDI-TOF MS. En résumé, afin d'améliorer la qualité, la robustesse et la portabilité des méthodes de typage par MALDI-TOF MS, les études futures devraient :

- Inclure un plus grand nombre de collections bien caractérisées représentatives des souches épidémiques,
- Tester l'influence des conditions de culture des souches,
- Réaliser l'acquisition des spectres de masse en présence d'un étalon interne,
- Tester la reproductibilité inter-laboratoires.

Comme décrit précédemment, la technique de type MALDI-TOF MS peut être couplée avec d'autres technologies telles que les systèmes LC-MS/MS et MALDI-TOF MS/MS pour identifier les protéines biomarqueurs et ainsi améliorer la fiabilité des méthodes de typage (115, 175, 185, 186).

La technique MALDI-TOF MS peut également discriminer des groupes bactériens par l'analyse des spectres de masse d'extraits bactériens spécifiques. Par exemple, la technique MALDI-TOF MS a permis d'identifier des antigènes flagellaires de *E. coli* en utilisant une méthode spécifique d'extraction (92). Après extraction des lipides, la technique de type MOLI MS génère des profils d'acides gras et permet d'identifier avec une grande précision des bactéries au niveau des espèces (179). Elle pourrait aussi être un outil prometteur pour le typage bactérien. Dunne *et al.* ont développé la 'MLST par spectrométrie' qui compare les spectres MALDI-TOF des amplicons PCR et qui les assigne à des *Sequences Types* (191).

8. Conclusion

L'intérêt de la technique MALDI-TOF MS appliquée au typage bactérien fait encore débat. Même si elle a été utilisée avec succès pour identifier certains sous-groupes, elle a été moins convaincante dans d'autres cas, montrant les limites de son pouvoir discriminant. De plus, les spectres de masse semblent présenter une variabilité intrinsèque lors d'acquisitions indépendantes dans le temps et sur des appareils différents, peut-être liée à la variation propre aux instruments ou à leur usure (sensibilité du détecteur, force du laser, durée de vie du laser), ce qui complique pour le moment la comparaison de données indépendantes. Toutefois, en dépit de ces défauts, la technique MALDI-TOF MS pourrait se positionner comme un outil de typage de première ligne très intéressant. Même s'il faut utiliser une procédure d'extraction, une matrice particulière, ou changer la gamme de masse à étudier, le typage bactérien par MALDI-TOF MS reste un outil simple d'utilisation, rapide et relativement peu coûteux. Il convient de noter, cependant, que cette technique complète plus qu'elle ne remplace la biologie moléculaire. Afin de minimiser la variabilité associée aux paramètres techniques ou biologiques, et ainsi assurer une bonne répétabilité et reproductibilité, il est indispensable de standardiser les procédures et d'utiliser un contrôle interne à chaque analyse. En prenant en compte ces considérations, de nouvelles études doivent être réalisées. L'interprétation des données est relativement simple mais l'utilisation d'outils d'analyse appropriés et la formation du personnel pour leur utilisation est essentielle. L'automatisation de l'analyse des données pour une application en routine simplifiera encore la procédure.

En conclusion, le choix d'une méthode de typage doit être fait en fonction des objectifs mais aussi des performances des différents systèmes disponibles. Elle doit être suffisamment discriminante mais également suffisamment agrégative. Le résultat doit toujours être interprété dans un contexte spatio-temporel. La détermination de combinaison de différents marqueurs épidémiologiques ou l'association de techniques permettant d'optimiser les capacités de typage peuvent permettre d'atteindre l'objectif fixé. Une technique de typage applicable en routine doit être un compromis entre facilité technique et utilité clinique. Les résultats obtenus dans nos travaux indiquent que la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a le potentiel pour devenir un outil de typage bactérien de première ligne. Une meilleure connaissance des outils disponibles doit encore permettre d'améliorer la capacité de typage par MALDI-TOF MS. Ainsi, lors d'épidémie, le typage par MALDI-TOF MS, en apportant

une information rapide, contribuera à la mise en place précoce de mesures de contrôle afin de prévenir la diffusion des agents pathogènes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2012. Institut de veille sanitaire, Département des maladies infectieuses. <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2013/Enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-France-mai-juin-2012>.
2. Carlet J. The world alliance against antibiotic resistance: consensus for a declaration. Clin Infect Dis 2015;60:1837-1841.
3. Voss A, Milatovic D, Wallrauch-Schwarz C, Rosdahl VT, Braveny I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994;13:50-55.
4. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008;8:159-166.
5. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev. 2012;25:682-707.
6. Oliver A, Mulet X, Lopez-Causape C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updat. 2015;21-22:41-59.
7. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. J Clin Microbiol. 1990;28:1903-1905.
8. Talon D, Cailleaux V, Thouverez M, Michel-Briand Y. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. J Hosp Infect. 1996;32:135-145.
9. Joly-Guillou ML, Bergogne-Berezin E, Vieu JF. A study of the relationships between antibiotic resistance phenotypes, phage-typing and biotyping of 117 clinical isolates of *Acinetobacter spp.* J Hosp Infect. 1990;16:49-58.
10. Kayabas U, Bayraktar M, Otlu B, Ugras M, Ersoy Y, Bayindir Y, *et al.* An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* because of inadequate disinfection procedures in a urology unit: a pulsed-field gel electrophoresis-based epidemiologic study. Am J Infect Control. 2008;36:33-38.

11. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233-2239.
12. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:3140-3145.
13. Zankari E, Hasman H, Kaas RS, Seyfarth AM, Agerso Y, Lund O, *et al.* Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:771-777.
14. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Moller N, *et al.* Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2014;52:139-146.
15. Allard MW. The Future of Whole Genome Sequencing for public health and the clinic. *J Clin Microbiol.* 2016;54:1946-1948
16. Price JR, Didelot X, Crook DW, Llewelyn MJ, Paul J. Whole genome sequencing in the prevention and control of *Staphylococcus aureus* infection. *J Hosp Infect.* 2013;83:14-21.
17. Goodacre R, Timmins EM, Burton R, Kaderbhai N, Woodward AM, Kell DB, *et al.* Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology.* 1998;144 (Pt 5):1157-1170.
18. Davis R, Paoli G, Mauer LJ. Evaluation of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometrics as a rapid approach for sub-typing *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *Food Microbiol.* 2012;31:181-190.
19. Dawson SE, Gibreel T, Nicolaou N, Alrabiah H, Xu Y, Goodacre R, *et al.* Implementation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid typing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:983-988.
20. Johler S, Stephan R, Althaus D, Ehling-Schulz M, Grunert T. High-resolution subtyping of *Staphylococcus aureus* strains by means of Fourier-transform infrared spectroscopy. *Syst Appl Microbiol.* 2016;39:189-194.
21. Willemse-Erix DF, Scholtes-Timmerman MJ, Jachtenberg JW, van Leeuwen WB, Horst-Kreft D, Bakker Schut TC, *et al.* Optical fingerprinting in bacterial epidemiology: Raman spectroscopy as a real-time typing method. *J Clin Microbiol.* 2009;47:652-659.

22. Overdevest IT, Heck M, van der Zwaluw K, Huijsdens X, van Santen M, Rijnsburger M, *et al.* Extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella spp.* in chicken meat and humans: a comparison of typing methods. Clin Microbiol Infect. 2014;20:251-255.
23. Kusters JG, van Leeuwen WB, Maquelin K, Blok HE, Willemse HF, de Graaf-Miltenburg LA, *et al.* Raman spectroscopy-based identification of nosocomial outbreaks of the clonal bacterium *Escherichia coli*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016;35:83-87.
24. Voor in 't Holt AF, Severin JA, Goessens WH, Te Witt R, Vos MC. Instant typing is essential to detect transmission of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella* species. PLoS One. 2015;10:e0136135.
25. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin Microbiol Infect. 2010;16:1614-1619.
26. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass-spectrometry. Anal Chem. 1975;47:219-225.
27. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of flight mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry. 1988;2:151-153.
28. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules Anal Chem. 1985;57:2935-2939.
29. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nat Biotechnol. 1996;14:1584-1586.
30. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996;10:1227-1232.
31. Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. Anal Chem. 1999;71:2732-2738.
32. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. J Med Microbiol. 2000;49:295-300.

33. Hettick JM, Kashon ML, Simpson JP, Siegel PD, Mazurek GH, Weissman DN. Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 2004;76:5769-5776.
34. Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, *et al.* Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol.* 2004;4:221-242.
35. Suh MJ, Limbach PA. Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. *Eur J Mass Spectrom.* 2004;10:89-99.
36. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, *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.
37. Bessede E, Angla-Gre M, Delagarde Y, Sep Hieng S, Menard A, Megraud F. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:533-538.
38. 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.
39. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, *et al.* Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1169-1175.
40. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, Dauphin B, Bille E, Meyer J, *et al.* Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1542-1548.
41. Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1604-13.
42. Gravet A, Camdessouens-Miehe G, Gessier M, Peluso AR, Vogelsperger-Fuchs B, Lohmann C, *et al.* The use in routine of mass spectrometry in a hospital microbiology laboratory. *Pathol Biol.* 2011;59:19-25.
43. MLST Databases at the ERI, University College Cork. Available at: <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>. Accessed 19 December 2013.

44. Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2001;20:157-171.
45. Lartigue MF. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for bacterial strain characterization. *Infect Genet Evol.* 2013;13:230-235.
46. Spinali S, van Belkum A, Goering RV, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, *et al.* Microbial typing by MALDI-TOF MS: do we need guidance for data interpretation? *J Clin Microbiol.* 2014;53:760-765
47. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, *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.
48. Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B. Rapid classification and identification of *salmonellae* at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:7767-7778.
49. Stephan R, Cernela N, Ziegler D, Pfluger V, Tonolla M, Ravasi D, *et al.* Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* 2011;87:150-153.
50. Hsieh SY, Tseng CL, Lee YS, Kuo AJ, Sun CF, Lin YH, *et al.* Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7:448-456.
51. 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.
52. Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit. *Int J Microbiol.* 2015;2015:827416.
53. Inigo M, Coello A, Fernandez-Rivas G, Rivaya B, Hidalgo J, Quesada MD, *et al.* Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples, combining urine screening methods and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2016;54:988-993.
54. March GA, Garcia-Loygorri MC, Simarro M, Gutierrez MP, Orduna A, Bratos MA. A new approach to determine the susceptibility of bacteria to antibiotics directly from positive blood culture bottles in two hours. *J Microbiol Methods.* 2015;109:49-55.

55. Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3222-3227.
56. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3321-3324.
57. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012;50:927-937.
58. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, *et al.* Efficient detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2163-2171.
59. Sauget M, Cabrol N, Manzoni M, Bertrand X, Hocquet D. Rapid, sensitive and specific detection of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* 2014;105:88-91.
60. Sparbier K, Lange C, Jung J, Wieser A, Schubert S, Kostrzewa M. MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3741-3748.
61. Lange C, Schubert S, Jung J, Kostrzewa M, Sparbier K. Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol.* 2014;52:4155-4162.
62. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, *et al.* Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000344.
63. Boissy R, Ahmed A, Janto B, Earl J, Hall BG, Hogg JS, *et al.* Comparative supragenomic analyses among the pathogens *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae* using a modification of the finite supragenome model. *BMC Genomics.* 2011;12:187.
64. Valot B, Guyeux C, Rolland JY, Mazouzi K, Bertrand X, Hocquet D. What it takes to be a *Pseudomonas aeruginosa*? The core genome of the opportunistic pathogen updated. *PLoS One.* 2015;10:e0126468.

65. Cholley P, Ka R, Guyeux C, Thouverez M, Guessennd N, Ghebremedhin B, *et al.* Population structure of clinical *Pseudomonas aeruginosa* from West and Central African countries. PLoS One. 2014;9:e107008.
66. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010;8:26-38.
67. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998;11:142-201.
68. Johnson JR, Delavari P, Kuskowski M, Stell AL. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J Infect Dis. 2001;183:78-88.
69. Johnson JR, O'Bryan TT, Delavari P, Kuskowski M, Stapleton A, Carlino U, *et al.* Clonal relationships and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* isolates from women with a first or recurrent episode of cystitis. J Infect Dis. 2001;183:1508-1517.
70. Johnson JR, Kuskowski MA, O'Bryan TT, Maslow JN. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. J Infect Dis. 2002;185:1439-1447.
71. Boyd EF, Hartl DL. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. J Bacteriol. 1998;180:1159-1165.
72. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. 2013;5:58-65.
73. Turret J, Denamur E. Population Phylogenomics of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. 2016;4.
74. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol. 2000;66:4555-8.
75. Doumith M, Day MJ, Hope R, Wain J, Woodford N. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. J Clin Microbiol. 2012;50:3108-110.
76. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, *et al.* Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. Mol Microbiol. 2006;60:1136-51.
77. Hendrickson H. Order and disorder during *Escherichia coli* divergence. PLoS Genet. 2009;5:e1000335.

78. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:207-217.
79. Mazzeo MF, Sorrentino A, Gaita M, Cacace G, Di Stasio M, Facchiano A, *et al*. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:1180-1189.
80. Siegrist TJ, Anderson PD, Huen WH, Kleinheinz GT, McDermott CM, Sandrin TR. Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *J Microbiol Methods*. 2007;68:554-562.
81. Karger A, Ziller M, Bettin B, Mintel B, Schares S, Geue L. Determination of serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates by intact cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:896-905.
82. Clark CG, Kruczkiewicz P, Guan C, McCorrister SJ, Chong P, Wylie J, *et al*. Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. *J Microbiol Methods*. 2013;94:180-191.
83. Christner M, Trusch M, Rohde H, Kwiatkowski M, Schluter H, Wolters M, *et al*. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2014;9:e101924.
84. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, *et al*. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PloS one*. 2011;6:e22751.
85. Novais A, Sousa C, de Dios Caballero J, Fernandez-Olmos A, Lopes J, Ramos H, *et al*. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:1391-1399.
86. Sauget M, Nicolas-Chanoine MH, Cabrolier N, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. *Int J Med Microbiol*. 2014;304:977-983.

87. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Machida K, Ito Y, *et al.* Detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1034-1040.
88. Nakamura A, Komatsu M, Kondo A, Ohno Y, Kohno H, Nakamura F, *et al.* Rapid detection of B2-ST131 clonal group of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry: discovery of a peculiar amino acid substitution in B2-ST131 clonal group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;83:237-244.
89. Lafolie J, Sauget M, Cabrol N, Hocquet D, Bertrand X. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: implications for infection control policies? *J Hosp Infect.* 2015;90:208-212.
90. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, Ichiyama S. Detection of *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group among extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* using VITEK MS Plus matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* 2015;119:7-9.
91. Egli A, Tschudin-Sutter S, Oberle M, Goldenberger D, Frei R, Widmer AF. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based typing of extended-spectrum β -lactamase producing *E. coli* -a novel tool for real-time outbreak investigation. *PLoS One.* 2015;10:e0120624.
92. Chui H, Chan M, Hernandez D, Chong P, McCorrister S, Robinson A, *et al.* Rapid, sensitive, and specific *Escherichia coli* H antigen typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-based peptide mass fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2480-2485.
93. Veenemans J, Welker M, van Belkum A, Saccomani MC, Girard V, Pettersson A, *et al.* Comparison of MALDI-TOF MS and AFLP for strain typing of ESBL-producing *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35:829-838.
94. Mohammadi T, Reesink HW, Pietersz RN, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Amplified-fragment length polymorphism analysis of *Propionibacterium* isolates implicated in contamination of blood products. *British journal of haematology.* 2005;131:403-409.

95. Dhanji H, Doumith M, Clermont O, Denamur E, Hope R, Livermore DM, *et al.* Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* and its CTX-M-15-like extended-spectrum β -lactamases. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36:355-358.
96. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW, *et al.* Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med*. 2010;7:e1000215.
97. Lozano C, Gomez-Sanz E, Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M, Torres C. *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *Int J Med Microbiol*. 2011;301:500-505.
98. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:505-520.
99. Vandenberg MF, Verbrugh HA. Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance. *J Lab Clin Med*. 1999;133:525-534.
100. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:751-762.
101. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:629-641.
102. Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64:441-446.
103. Bouiller K, Gbaguidi-Haore H, Hocquet D, Cholley P, Bertrand X, Chirouze C. Clonal Complex 398 methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bloodstream infections are associated with high mortality. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22:451-455.
104. Diekema DJ, Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Tendolkar S, *et al.* Continued emergence of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: results from a nationwide surveillance study. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;35:285-292.
105. Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, *et al.* Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3556-3563.

106. Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002;74:5487-5491.
107. Majcherczyk PA, McKenna T, Moreillon P, Vaudaux P. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;255:233-239.
108. Shah HN, Rajakaruna L, Ball G, Misra R, Al-Shahib A, Fang M, *et al*. Tracing the transition of methicillin resistance in sub-populations of *Staphylococcus aureus*, using SELDI-TOF mass spectrometry and artificial neural network analysis. *Syst Appl Microbiol*. 2011;34:81-86.
109. Szabados F, Kaase M, Anders A, Gatermann SG. Identical MALDI TOF MS-derived peak profiles in a pair of isogenic SCCmec-harboring and SCCmec-lacking strains of *Staphylococcus aureus*. *J Infect*. 2012;65:400-405.
110. Wang YR, Chen Q, Cui SH, Li FQ. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biomed Environ Sci*. 2013;26:430-436.
111. Josten M, Dischinger J, Szekat C, Reif M, Al-Sabti N, Sahl HG, *et al*. Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol*. 2014;304:1018-1023.
112. Schlebusch S, Price GR, Hinds S, Nourse C, Schooneveldt JM, Tilse MH, *et al*. First outbreak of PVL-positive nonmultiresistant MRSA in a neonatal ICU in Australia: comparison of MALDI-TOF and SNP-plus-binary gene typing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29:1311-1314.
113. Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, *et al*. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol*. 2011;301:64-68.
114. Boggs SR, Cazares LH, Drake R. Characterization of a *Staphylococcus aureus* USA300 protein signature using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2012;61:640-644.
115. Josten M, Reif M, Szekat C, Al-Sabti N, Roemer T, Sparbier K, *et al*. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of

- Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. J Clin Microbiol. 2013;51:1809-1817.
116. Ueda O, Tanaka S, Nagasawa Z, Hanaki H, Shobuike T, Miyamoto H. Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrum (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. J Hosp Infect. 2015;90:147-155.
 117. Lasch P, Fleige C, Stammler M, Layer F, Nubel U, Witte W, *et al.* Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. J Microbiol Methods. 2014;100:58-69.
 118. Zhang T, Ding J, Rao X, Yu J, Chu M, Ren W, *et al.* Analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* major clonal lineages by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). J Microbiol Methods. 2015;117:122-127.
 119. Ostergaard C, Hansen SG, Moller JK. Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. Int J Med Microbiol. 2015;305:838-847.
 120. Camoez M, Sierra JM, Dominguez MA, Ferrer-Navarro M, Vila J, Roca I. Automated categorization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates into different clonal complexes by MALDI-TOF mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. 2016;22:161 e1-7.
 121. Sauget M, van der Mee-Marquet N, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can detect *Staphylococcus aureus* clonal complex 398. J. Microbiol. Methods. 2016;127, 20-23.
 122. Ruiz L, Dominguez MA, Ruiz N, Vinas M. Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. Arch Med Res. 2004;35:251-257.
 123. Lasheras A, Guisset O, Boulestreau H, Rogues AM, Fiore M, Szajner S, *et al.* Reservoirs and transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit. Med Mal Infect. 2006;36:99-104.
 124. Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. Am J Infect Control. 2005;33:S41-49.

125. Venier AG, Leroyer C, Slekovec C, Talon D, Bertrand X, Parer S, *et al.* Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in intensive care units: a prospective multicentre study. *J Hosp Infect.* 2014;88:103-108.
126. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* 2011;2:65.
127. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002;34:634-640.
128. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5644-5649.
129. Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, van der Mee-Marquet N, Talon D, Bertrand X. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2578-2583.
130. Maatallah M, Cheriaa J, Backhrouf A, Iversen A, Grundmann H, Do T, *et al.* Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One.* 2011;6:e25617.
131. Gomila M, Del Carmen Gallegos M, Fernandez-Baca V, Pareja A, Pascual M, Diaz-Antolin P, *et al.* Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiol.* 2013;13:138.
132. Elias J, Schoen C, Heinze G, Valenza G, Gerharz E, Gerharz H, *et al.* Nosocomial outbreak of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* associated with retrograde urography. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1494-1500.
133. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35:736-755.
134. Kim MJ, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Song JH, Choi JY, *et al.* Dissemination of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of sequence type 235 in Asian countries. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:2820-2824.
135. Liakopoulos A, Mavroidi A, Katsifas EA, Theodosiou A, Karagouni AD, Miriagou V, *et al.* Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infect Dis.* 2013;13:505.
136. Scotta C, Gomila M, Mulet M, Lalucat J, Garcia-Valdes E. Whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry and multilocus sequence analysis in the discrimination of

- Pseudomonas stutzeri* populations: three novel genomovars. Microb Ecol. 2013;66:522-532.
137. Mencacci A, Monari C, Leli C, Merlini L, De Carolis E, Vella A, *et al.* Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2013;51:603-606.
138. Sousa C, Botelho J, Grosso F, Silva L, Lopes J, Peixe L. Unsuitability of MALDI-TOF MS to discriminate *Acinetobacter baumannii* clones under routine experimental conditions. Front Microbiol. 2015;6:481.
139. Sachse S, Bresan S, Erhard M, Edel B, Pfister W, Saupe A, *et al.* Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of beta-lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;80:267-271.
140. Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, *et al.* Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PLoS One. 2013;8:e61428.
141. Lartigue MF, Kostrzewa M, Salloum M, Haguenoer E, Hery-Arnaud G, Domelier AS, *et al.* Rapid detection of "highly virulent" Group B *Streptococcus* ST-17 and emerging ST-1 clones by MALDI-TOF mass spectrometry. J Microbiol Methods. 2011;86:262-265.
142. Moura H, Woolfitt AR, Carvalho MG, Pavlopoulos A, Teixeira LM, Satten GA, *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* isolates. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;53:333-342.
143. Wang J, Zhou N, Xu B, Hao H, Kang L, Zheng Y, *et al.* Identification and cluster analysis of *Streptococcus pyogenes* by MALDI-TOF mass spectrometry. PLoS One. 2012;7:e47152.
144. Williamson YM, Moura H, Woolfitt AR, Pirkle JL, Barr JR, Carvalho Mda G, *et al.* Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* conjunctivitis outbreak isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl Environ Microbiol. 2008;74:5891-5897.
145. Nakano S, Matsumura Y, Ito Y, Fujisawa T, Chang B, Suga S, *et al.* Development and evaluation of MALDI-TOF MS-based serotyping for *Streptococcus pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2015;34:2191-2198.

146. Suarez S, Ferroni A, Lotz A, Jolley KA, Guerin P, Leto J, *et al.* Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J Microbiol Methods*. 2013;94:390-396.
147. Carannante A, De Carolis E, Vacca P, Vella A, Vocale C, De Francesco MA, *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification and clustering of *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiol*. 2015;15:142.
148. Dieckmann R, Malorny B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:4136-4146.
149. Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W, Zimmermann O, Weig M, Bader O, *et al.* Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* from other serovars by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*. 2012;7:e40004.
150. Fujinami Y, Kikkawa HS, Kurosaki Y, Sakurada K, Yoshino M, Yasuda J. Rapid discrimination of *Legionella* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol Res*. 2011;166:77-86.
151. Nagy E, Becker S, Soki J, Urban E, Kostrzewa M. Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol*. 2011;60:1584-1590.
152. Nagy E, Urban E, Becker S, Kostrzewa M, Voros A, Hunyadkurti J, *et al.* MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I, II and III of *Propionibacterium acnes*. *Anaerobe*. 2013;20:20-26.
153. Zautner AE, Masanta WO, Tareen AM, Weig M, Lugert R, Gross U, *et al.* Discrimination of multilocus sequence typing-based *Campylobacter jejuni* subgroups by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Microbiol*. 2013;13:247.
154. Xiao D, Zhao F, Zhang H, Meng F, Zhang J. Novel strategy for typing *Mycoplasma pneumoniae* isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry coupled with ClinProTools. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3038-3043.
155. Fangous MS, Mougari F, Gouriou S, Calvez E, Raskine L, Cambau E, *et al.* Classification algorithm for subspecies identification within the *Mycobacterium abscessus*

- species, based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2014;52:3362-3369.
156. Niyompanich S, Srisanga K, Jaresitthikunchai J, Roytrakul S, Tungpradabkul S. Utilization of whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate *Burkholderia pseudomallei* wild-type and constructed mutants. PLoS One. 2015;10:e0144128.
 157. Rizzardi K, Akerlund T. High molecular weight typing with MALDI-TOF MS - A novel method for rapid typing of *Clostridium difficile*. PLoS One. 2015;10:e0122457.
 158. Mansson V, Resman F, Kostrzewa M, Nilson B, Riesbeck K. Identification of *Haemophilus influenzae* type b isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2015;53:2215-2224.
 159. Simon R. Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers. J Clin Oncol. 2005;23:7332-7341.
 160. van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2007;13 Suppl 3:1-46.
 161. Arnold RJ, Reilly JP. Fingerprint matching of *E. coli* strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach. Rapid Commun Mass Spectrom. 1998;12:630-636.
 162. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. Clin Microbiol Rev. 2014;27:543-574.
 163. Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, *et al.* The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. MBio. 2013;4:e00377-13.
 164. Banerjee R, Robicsek A, Kuskowski MA, Porter S, Johnston BD, Sokurenko E, *et al.* Molecular epidemiology of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 and H30-Rx subclones among extended-spectrum- β -lactamase-positive and -negative *E. coli* clinical isolates from the Chicago Region, 2007 to 2010. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:6385-6388.
 165. Colpan A, Johnston B, Porter S, Clabots C, Anway R, Thao L, *et al.* *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. Clin Infect Dis 2013;57:1256-1265.

166. Lafolie J, Nicolas-Chanoine MH, Grenouillet F, Hocquet D, Bertrand X. Prevalence of *Escherichia coli* sequence type 131 and its H30 subclone among *E. coli* isolates in a French hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44:466-468.
167. Peirano G, van der Bij AK, Freeman JL, Poirel L, Nordmann P, Costello M, *et al*. Characteristics of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates that produce extended-spectrum β -lactamases: global distribution of the H30-Rx sublineage. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:3762-3767.
168. Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, De Maio N, Moore CE, Sebra R, *et al*. Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. *MBio*. 2016;7:e02162.
169. Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, *et al*. Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *mBio*. 2016;7.
170. Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, *et al*. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *MBio*. 2012;3.
171. Stegger M, Lindsay JA, Moodley A, Skov R, Broens EM, Guardabassi L. Rapid PCR detection of *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 by targeting the restriction-modification system carrying *sauI*-*hsdS1*. *J Clin Microbiol*. 2011;49:732-734.
172. Valentin-Domelier AS, Girard M, Bertrand X, Violette J, Francois P, Donnio PY, *et al*. Methicillin-susceptible ST398 *Staphylococcus aureus* responsible for bloodstream infections: an emerging human-adapted subclone? *PLoS One*. 2011;6:e28369.
173. Tristan A, Rasigade JP, Ruizendaal E, Laurent F, Bes M, Meugnier H, *et al*. Rise of CC398 lineage of *Staphylococcus aureus* among Infective endocarditis isolates revealed by two consecutive population-based studies in France. *PLoS One*. 2012;7:e51172.
174. Karger A, Ziller M, Bettin B, Mintel B, Schares S, Geue L. Determination of serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates by intact cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol*. 2011;77:896-905.
175. Fagerquist CK, Garbus BR, Miller WG, Williams KE, Yee E, Bates AH, *et al*. Rapid identification of protein biomarkers of *Escherichia coli* O157:H7 by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight-time-of-flight mass spectrometry and top-down proteomics. *Anal Chem*. 2010;82:2717-2725.

176. Holland RD, Duffy CR, Rafii F, Sutherland JB, Heinze TM, Holder CL, *et al.* Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells. *Anal Chem.* 1999;71:3226-3230.
177. Carter MQ, Louie JW, Fagerquist CK, Sultan O, Miller WG, Mandrell RE. Evolutionary silence of the acid chaperone protein HdeB in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:1004-1014.
178. Fleurbaaij F, Kraakman ME, Claas EC, Knetsch CW, van Leeuwen HC, van der Burgt YE, *et al.* Typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with ultrahigh resolution MALDI-FTICR mass spectrometry. *Anal Chem.* 2016;88:5996-6003.
179. Cox CR, Jensen KR, Saichek NR, Voorhees KJ. Strain-level bacterial identification by CeO₂-catalyzed MALDI-TOF MS fatty acid analysis and comparison to commercial protein-based methods. *Sci Rep.* 2015;5:10470.
180. Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36:380-407.
181. Murray PR. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1626-1630.
182. Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:58-64.
183. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015;6:791.
184. Ochoa ML, Harrington PB. Immunomagnetic isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef and identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and database searches. *Anal Chem.* 2005;77:5258-5267.
185. Cheng K, Chui H, Domish L, Hernandez D, Wang G. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics. Clin. Appl.* 2016;10:346-357
186. Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A

- revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854:528-537.
187. Giebel RA, Fredenberg W, Sandrin TR. Characterization of environmental isolates of *Enterococcus spp.* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Water Res*. 2008;42:931-40.
188. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol*. 2010;71:149-184.
189. Vargha M, Takats Z, Konopka A, Nakatsu CH. Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *J Microbiol Methods*. 2006;66:399-409.
190. Delacour H, Francois N, Servonneta A, Gentileb A, Roche B. Les rapports de vraisemblance : un outil de choix pour l'interprétation des tests biologiques. *Immuno Anal Biol Spe*. 2009;24:92-99.
191. Dunne EM, Ong EK, Moser RJ, Siba PM, Phuanukoonnon S, Greenhill AR, *et al*. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* by use of mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*. 2011;49:3756-3760.

RESUME

Le typage bactérien est une mesure de contrôle essentielle pour lutter contre la diffusion des bactéries multirésistantes, mais les techniques actuelles sont longues et coûteuses.

L'objectif de cette thèse était d'évaluer la capacité de la technique MALDI-TOF MS à typer les 3 principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'analyse par MALDI-TOF MS permet d'identifier les souches de *E. coli* appartenant au phylogroupe B2, souches les plus virulentes parmi les souches extra-intestinales, et au ST131, clone très impliqué dans la dissémination des β -lactamases à spectre étendu. Chez *S. aureus*, cette technique reconnaît les souches appartenant au CC398, impliquées dans une proportion importante d'infections graves chez des personnes fragiles. La technique MALDI-TOF MS identifie également cinq clones de *P. aeruginosa* à haut risque épidémique - ST111, ST175, ST235, ST253, ST395.

Si nous avons confirmé des pics caractéristiques du phylogroupe B2 décrit également par d'autres auteurs, les pics biomarqueurs identifiant *E. coli* ST131 ou des clones épidémiques de *S. aureus* varient suivant les études. Différents paramètres peuvent influencer les résultats de typage par MALDI-TOF MS et doivent donc être standardisés.

La technique MALDI-TOF MS permet d'identifier certains clones épidémiques. En gardant à l'esprit que le choix d'une méthode de typage doit être fait en fonction des objectifs mais aussi des performances des différents systèmes disponibles, la technique MALDI-TOF MS pourrait se positionner comme un outil de typage de première ligne.

ABSTRACT

Bacterial typing is crucial to tackle the spread of bacterial pathogens but current methods are time-consuming and costly.

The objective of this study was to evaluate the ability of MALDI-TOF MS to type the 3 main bacterial species responsible for nosocomial infections - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Analysis of MALDI-TOF mass spectra allow the identification (i) of *E. coli* isolates belonging to phylogroup B2, that fosters the most virulent extra-intestinal strains, and (ii) of *E. coli* ST131, a clone involved in the dissemination of extended-spectrum β -lactamases. MALDI-TOF MS also recognizes *S. aureus* isolates belonging to CC398, a pathogen responsible for invasive infections in fragile patients and associated with a higher 30-day mortality. Furthermore the MALDI-TOF MS based typing method identifies the major high risk epidemic clones of *P. aeruginosa* ST111, ST175, ST235, ST253, and ST395. We confirmed phylogroup B2 specific peaks also described by other authors. However the identification of *E. coli* ST131 or epidemic clones of *S. aureus* is based on biomarkers that differs between studies. Different parameters can influence the MALDI-TOF MS typing results and must therefore be standardized.

MALDI-TOF-based typing methods allow the detection of epidemic pathogens. Keeping in mind that the choice of a method for routine bacterial typing should be made according to the objectives but also the performance of the different systems available, the MALDI-TOF MS technique could become a first-line typing method.