Microbiologie clinique et spectrométrie de masse

Stéphanie Buland Suarez

▶ **To cite this version:**

Stéphanie Buland Suarez. Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T047 . tel-00920410

HAL Id: tel-00920410
https://theses.hal.science/tel-00920410

Submitted on 18 Dec 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole Doctorale : GC2ID

Discipline : Infectiologie

Présentée par

Stéphanie SUAREZ

Microbiologie clinique et spectrométrie de masse

Soutenue publiquement le 25 Novembre 2013 devant le jury :

Pr Xavier Nassif	**Président du jury**
Pr Patrick Berche	**Directeur de thèse**
Pr Jean-Louis Herrmann	**Rapporteur**
Pr Guillaume Arlet	**Rapporteur**
Dr Laurent Raskine	**Examinateur**

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord Monsieur le Professeur Xavier Nassif d'avoir accepté d'être le président de ce jury et de m'avoir accueillie dans son équipe.

Je remercie également Monsieur le Professeur Patrick Berche de m'avoir confié l'élaboration de cette thèse au sein de son laboratoire.

Merci aux membres du jury, Monsieur le Professeur Guillaume Arlet, Monsieur le Professeur Jean-Louis Herrmann et Monsieur le Docteur Laurent Raskine, de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail et de participer à ce jury.

Tous mes remerciements vont au Docteur Agnès Ferroni pour avoir été présente tous les jours pendant ces 5 ans (et oui depuis le début de mon master…), pour son encadrement et son soutien. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité et son respect sans faille des délais serrés de relecture des documents que je lui ai adressés.

Je remercie toute l'équipe de microbiologie et plus particulièrement celle de bactériologie qui au fil du temps a réussi à me libérer de la routine pour que je puisse me consacrer à mon travail de thèse.

Merci à toute l'unité U1002, de m'avoir accueillie dans cette équipe, d'être présent pour répondre à mes questions quelles soient scientifiques, techniques ou logistiques : Terry et Florence qui m'ont soutenue dans les hauts et les bas qui ont toujours été là pour me remonter le moral, Emmanuelle toujours présente pour discuter d'une idée ou de perspectives, Hervé pour la petite initiation à la musique classique, Eric pour sa bioinformatique, Daniel m'accueillant tous les matins avec un petit mot gentil, Julie M. avec qui j'ai fait mes débuts lors de mon Master, Hélène qui partage les mêmes épreuves de la thèse que moi, Mathieu et toutes ses connaissances, et tous les autres : Carine, Christine, Anne, Marion, Elodie, Monique, Ihari, Gaël, Alain.

Je tiens à remercier l'équipe MALDI/ANDROMAS, Julie L., Brunhilde et Jean-Luc sans qui je ne soutiendrais pas cette thèse aujourd'hui…

Je ne dirais jamais assez MERCI à Christophe qui m'a donné mon envol vers cette nouvelle vie, qui a été là pour réparer les premières plumes cassées et qui continuera à veiller…

Merci à Julie L. et Imane, je sais que je peux toujours compter sur elles pour me remonter le moral et me changer les idées. A quand le prochain Afterwork…

Je remercie mes frères pour leur attention malgré la distance qui nous séparent.

Merci à mes parents de m'avoir soutenue pendant ces 5 années ou plutôt ces 30 dernières années dans mes décisions personnelles comme professionnelles. Je les remercie également d'être présents aujourd'hui avec mes grands parents.

Et enfin un grand grand merci à toi, mon amour, pour ton soutien quotidien, ton optimisme persistant dans la joie et parfois dans la mauvaise humeur.

Merci à tous ceux que j'ai oublié de citer (Anne Sophie, Aurélie, et bien d'autres…) mais pour qui j'ai une pensée.

Résumé

L'identification des micro-organismes reposait jusqu'à présent sur l'étude des caractères culturaux et biochimiques de chaque espèce. Depuis quelques années, la spectrométrie de masse de type Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight (MALDI-TOF) s'est développée dans les laboratoires de microbiologie clinique. Cette nouvelle technologie permet de réaliser très rapidement et à moindre coût un diagnostic d'espèce sur des colonies de bactéries ou de champignons isolées sur des milieux de culture solides.

Dans un premier temps, nous avons montré que cette technologie permet de réaliser une identification des germes isolés en milieu liquide, comme les flacons d'hémoculture au cours des bactériémies par exemple. Ce dépistage se fait directement à partir du flacon positif, sans attendre l'isolement des colonies sur milieu solide. Ce diagnostic disponible dès le premier jour permet d'adapter l'antibiothérapie au phénotype de résistance habituel de l'espèce.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à identifier la nature des biomarqueurs utilisés pour l'identification des espèces bactériennes, en prenant comme exemple la bactérie pathogène *Neisseria meningitidis*. La comparaison du génome et du protéome des souches entièrement séquencées a permis de mettre en évidence la nature exacte des protéines impliquées dans le diagnostic d'espèce.

Par ailleurs, les protéines ribosomales étant majoritaires et pouvant servir d'outil épidémiologique, nous avons constaté que la mise en évidence de leurs variations sur le spectre de masse rend la différenciation de souches au sein d'une même espèce possible, en adaptant la méthode d'analyse.

Enfin, nous avons présenté des résultats préliminaires encourageants sur l'exploitation du caractère constant de certaines protéines ribosomales visibles directement sur le spectre de masse, permettant de différencier des espèces très proches, comme *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus mitis*.

Mots clés : spectrométrie de masse, matrix assisted laser desorption ionization-time of flight, microbiologie, identification bactérienne, typage.

Sommaire

INTRODUCTION..... 1

A. L'identification bactérienne : du gram au MALDI-TOF……... 2

B. La spectrométrie de masse…… 6

1. Principe général d'un spectromètre de masse …….. 6

2. Spectrométrie de masse en tandem……... 7

3. Ionisation douce…… 8

4. Principe de la technique MALDI…….. 8

5. Principe de la technique ESI…… 10

6. Principe de la technologie TOF et description du MALDI-TOF…… 11

7. Types de matrices utilisées……... 12

C. Utilisation du MALDI-TOF en microbiologie clinique…….. 14

1. Historique…… 14

2. Standardisation…… 15

3. Utilisation des profils spectraux MALDI-TOF pour l'identification des micro-organismes……... 18

3.1 Comparaison des spectres à une bibliothèque (ou base de données) de spectres de référence…….. 19

3.2 Comparaison des spectres à une base de données protéique…… 19

4. Entrée de la technique MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie en routine……... 20

5. Systèmes commercialisés…… 21

5.1 Andromas®…… 21

5.2 Biotyper®…… 24

5.3 Vitek-MS…… 24

5.4 Performances des trois systèmes pour l'identification sur colonies……. 25

5.5 Identification des micro-organismes directement dans les prélèvements…… 26
5.5.1 Urines…… 27
5.5.2 Liquide Céphalorachidien…….. 28
5.5.3 Flacons d'hémoculture…… 28
5.6 Détection de la résistance aux antibiotiques…….. 31
D. Nature des biomarqueurs d'intérêt à partir d'un spectre de masse bactérien. 33
1. Composition en protéines de la bactérie…….. 33
2. Nature des pics du spectre…… 34
3. Méthodes utilisées pour l'identification des biomarqueurs…….. 35
3.1 Protéomique *Top Down*…… 35
3.2 Protéomique *Bottom Up*…… 35
E. Comparaison des souches au sein d'une espèce bactérienne : vers l'utilisation du MALDI-TOF…… 37
1. Principaux outils de comparaison de souches…….. 37
1.1 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)…….…… 37
1.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)…… 37
1.3 Amplification aléatoire…….……..…… 38
1.4 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)…… 38
1.5 Multi Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA) ou VTRN 39
1.6 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)…….…….…… 39
1.7 Séquençage nucléotidique…….…….…… 39
2. Comparaison de souches et MALDI-TOF…….…….. 40
2.1 Différenciation au niveau du sérotype, du biotype, de la sous-espèce…….. 40
2.2 Différenciation au niveau de la souche…….. 42
2.2.1 Comparaison de souches dans un contexte épidémique…… 42
2.2.2 Différenciation des souches en fonction de leur résistance aux antibiotiques 43

OBJECTIFS…… 45

RÉSULTATS..... 48

A. Real time identification of bacteria and *candida* species in positive blood culture broths by MALDI-TOF MS..... 49

B. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by MS in the clinical microbiology laboratory..... 58

C. Application de l'analyse des protéines ribosomales identifiées sur les spectres bactériens à l'épidémiologie bactérienne et à la différenciation d'espèces proches 83

1. Epidémiologie bactérienne : suite de l'étude sur la variation des protéines ribosomales de *N. meningitidis*..... 83

1.1 Elargissement et fractionnement de la fenêtre d'acquisition des ribosomes. 84

1.2 Extraction des ribosomes..... 84

1.3 Comparaison de souches..... 86

2. Différenciation d'espèces proches : exemple de *S. pneumoniae*..... 86

2.1 Approche bioinformatique..... 86

2.2 Application au MALDI-TOF..... 87

DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... 90

BIBLIOGRAPHIE..... 95

Introduction

A. L'identification bactérienne: du Gram au MALDI-TOF

L'identification des micro-organismes est une des fonctions principales des laboratoires de microbiologie. Elle est réalisée par des techniques en perpétuelle évolution. Historiquement, une identification dépendait uniquement de tests conventionnels : aspect macroscopique et examen microscopique à l'état frais et après coloration de Gram des colonies, conditions de culture en milieu solide ou liquide (tolérance à l'oxygène : bactéries aérobies, anaérobies, microaérophiles…), étude du métabolisme bactérien grâce à des techniques biochimiques d'identification (Carbonnelle et al., 1987). L'apparition de milieux chromogènes a permis de révéler des activités enzymatiques spécifiques de genre ou d'espèce, se traduisant par la coloration des colonies (Perry et al., 2003). Au début des années soixante-dix, les industries ont introduit des galeries miniaturisées comportant différents tests pour permettre la standardisation et la démocratisation de certains diagnostics d'espèces (Butler et al., 1975).

Puis, 20 ans plus tard, les industries ont développé des systèmes automatiques d'identification bactérienne, comme les appareils Vitek-2® (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), ou BD Phoenix® (Becton Dinckinson, Diagnostics Systèmes, France) équipés d'étuves intégrées permettant des incubations raccourcies (2 à 6 h) par rapport aux galeries traditionnelles. Ces systèmes comparent le profil obtenu de la souche inconnue avec ceux de leur banque de données. Certains des automates commercialisés réalisent dans le même temps l'antibiogramme. Ces appareils sont très performants pour l'identification des entérobactéries mais certains tests « traditionnels » restent nécessaires, principalement pour l'identification des cocci à Gram positif (Gavin et al., 2002). Le diagnostic phénotypique est conforté par l'analyse de la sensibilité aux antibiotiques car les bactéries possèdent des résistances naturelles à certaines molécules, permettant de les classer dans des groupes d'espèces.

Pour certaines espèces bactériennes, les industries proposent des réactifs reposant sur un diagnostic immuno-bactériologique qui consiste en la caractérisation d'espèce au moyen d'anticorps spécifiques reconnaissant des épitopes de corps bactériens entiers (groupage de Lancefield pour les streptocoques, diagnostic des salmonelles ou des shigelles, recherche de l'antigène de *Clostridium difficile* (glutamate déshydrogénase : GDH), de *Mycobacterium tuberculosis* (Antigène MPT 64) (Hopprich et al., 2012; Kawada et al., 2011; Marcos et al., 2003; Zheng et al., 2004)).

Les technologies d'identification de germes en culture reposant sur la biologie moléculaire sont apparues, telles que le séquençage de gènes, permettant de pallier aux erreurs ou aux échecs d'identification biochimiques (Clarridge, 2004; Petti et al., 2005). Ce séquençage a maintenant remplacé l'hybridation ADN-ADN comme gold standard pour l'identification universelle des bactéries. Les gènes utilisés pour faire le diagnostic d'espèce d'une souche inconnue doivent être universels, c'est à dire présents dans toutes les bactéries mais suffisamment variables pour pouvoir les différencier. La cible universelle la plus fréquemment utilisée en bactériologie pour le diagnostic de genre ou d'espèce est l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). Tous les micro-organismes possèdent en effet au moins une copie des gènes codant pour les ARN ribosomaux. La séquence nucléotidique de l'ADNr 16S présente des régions hautement conservées et communes à toutes les bactéries, alors que d'autres régions sont spécifiques d'espèce. L'amplification par PCR (Polymérase Chain Reaction) de l'ADNr 16S se fait à l'aide d'amorces situées sur ces régions conservées entourant une région variable. Elle peut être effectuée à partir d'une colonie sans extraction préalable. Les segments amplifiés sont séquencés et analysés par comparaison avec ceux déposés dans les banques de données. Trois banques sont consultables: European Molecular Biology Laboratory (EMBL) en Europe (Cambridge, European Bioinformatics institute), Gen Bank aux USA (National Center for Biotechnology Information) et Bio Informatic Bacteria Identification (BIBI) en France (Lyon). L'ADNr 16S ne permet pas l'identification précise de certains genres bactériens, comme les entérobactéries ou les streptocoques, dont les séquences de l'ADNr 16S sont très proches. Il est donc recommandé d'utiliser d'autres cibles plus spécifiques si le diagnostic classique s'oriente vers ce type de bactéries : par exemple la superoxide dismutase (SodA) pour les staphylocoques à coagulase négative (Poyart et al., 2001), une région spécifique du gène de l'RN polymerase beta-subunit (rpoB) pour les entérobactéries (Mollet et al., 1997) ou pour les streptocoques (Drancourt et al., 2004). Ces techniques basées sur la PCR suivies de séquençage sont cependant lourdes à mettre en œuvre et ne peuvent pas être implantées dans tous les laboratoires de microbiologie. Certains kits permettent d'éviter l'étape du séquençage. Par exemple, pour caractériser les espèces à l'intérieur du groupe des mycobactéries, il existe des kits permettant, sur produits amplifiés, de réaliser une hybridation inverse sur bandelette. Le principe repose sur l'hybridation spécifique de l'ADN biotinylé sur des sondes oligonucléotidiques immobilisées. Le kit Genotype Mycobacterium CM/AS® (Hain Lifescience GmbH, Allemagne) permet ainsi l'identification du genre *Mycobacterium* et de 16 espèces de mycobactéries, à partir de

cultures liquides ou solides. Elle est basée sur les différences nucléotidiques présentes sur l'ARN ribosomal 23S (Makinen et al., 2006).

L'apparition de kits miniaturisés de diagnostic par PCR en temps réel utilisés directement sur les prélèvements sans extraction d'ADN préalable ont permis de simplifier à l'extrême les différentes étapes de PCR, tout en gagnant 24 h par rapport à la culture, et rendant possible, pour certaines identifications ciblées et urgentes, leur utilisation dans les laboratoires de routine (Gaydos et al., 2013; Wassenberg et al., 2010). Néanmoins, ces techniques doivent partir d'un prélèvement pour lequel une bactérie particulière est recherchée ou a une probabilité élevée d'être présente. Elles ont aussi l'inconvénient d'être très onéreuses.

Il existe aussi des systèmes d'identification, utilisés directement sur les colonies, basés sur l'utilisation de sondes nucléiques marquées (fragment d'ADN connu) sans PCR préalable, permettant de détecter une hybridation par mesure d'une réaction chimique ou enzymatique. Les sondes Genprobe® (bioMérieux, France) permettent par exemple de faire le diagnostic d'espèce de *M. tuberculosis* dès que la culture en milieu solide ou liquide est positive. Cependant, là encore, une forte présomption du diagnostic de genre ou d'espèce basé sur l'analyse phénotypique de la souche est indispensable.

Le techniques type FISH (fluorescence in situ hybridization), rapides et sensibles, sont onéreuses et encore très peu utilisées dans les laboratoires de routine (Almeida et al., 2013; Forrest, 2007).

Au total, devant soit la lourdeur soit le coût des nouvelles techniques de diagnostic disponibles dans les laboratoires de microbiologie, l'identification phénotypique est demeurée la règle, malgré son délai de réponse et son manque de robustesse. Le développement d'une technique alternative plus rapide et plus fiable, utilisable par tous les laboratoires de routine et sur toutes les bactéries, était toujours attendu.

La spectrométrie de masse (MS : mass spectrometry), grâce à son pouvoir de résolution très élevé, a bientôt été considérée comme une technique pouvant être utile à l'identification microbienne, à la taxonomie, et à l'analyse de la composition de la cellule bactérienne. C'est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Historiquement, la MS était utilisée dans les laboratoires de biologie essentiellement en hématologie et en biochimie pour des analyses complexes de protéines dans différents prélèvements, à des fins de diagnostic de cancers (Diamandis, 2004), de recherches d'anomalies génétiques (Chace et al., 1993) ou de nouveaux biomarqueurs de pathologies (Ackermann et al., 2006). Les laboratoires de microbiologie sont actuellement en pleine mutation grâce à l'utilisation de la

spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization-time of flight). L'obtention d'un spectre caractéristique ou « signature spectrale » ou encore « empreinte spectrale » d'une espèce bactérienne donnée est à la base de l'utilisation de la spectrométrie de masse dans l'identification bactérienne, et constitue une véritable révolution au sein des laboratoires de microbiologie clinique. En quelques années, la spectrométrie de masse appliquée à la microbiologie s'est développée et améliorée dans le but d'obtenir des spectres de masses reproductibles, permettant d'identifier les bactéries au niveau de la famille, du genre, de l'espèce, et parfois de la sous-espèce.

B. La spectrométrie de masse

1. Principe général d'un spectromètre de masse

Comme son nom l'indique, la spectrométrie de masse s'intéresse à la mesure de la masse de molécules ou d'atomes présents dans un échantillon. Le principe de cette mesure repose sur la possibilité pour un flux d'ions d'être dévié par un champ électrique et/ou magnétique, les trajectoires étant proportionnelles à la masse et à la charge de chacun des ions. Ce principe impose aux molécules et atomes d'un échantillon d'être préalablement transformés en ions en phase gazeuse, avant d'être analysés par un spectromètre de masse.

Un spectromètre de masse comporte toujours (Figure 1) :

- une source d'ionisation : passage de l'échantillon en phase gazeuse et ionisation des molécules
- un analyseur : séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/*z*)
- un détecteur : il permet une détection des ions préalablement triés et fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés.
- un système de traitement informatique du signal pour visualiser les spectres

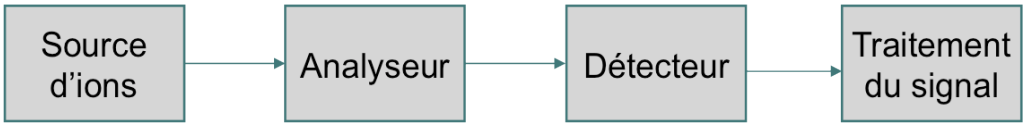


Figure 1 : étapes de la spectrométrie de masse

Elles se divisent en 4 : une source d'ionisation qui permet la production d'ion en phase gazeuse, un analyseur qui permet l'étude de ces ions en fonction de son m/*z*, un détecteur qui convertit le courant ionique en courant électrique et un logiciel permettant le traitement du signal pour obtenir un spectre de masse.

En voulant démontrer le caractère corpusculaire de la matière, Thomson a fait la découverte de l'électron. En mesurant la déviation des rayons cathodiques sous l'influence d'un champ magnétique ainsi que leur cinétique, il a déterminé le rapport de leur charge à la masse (e/m : rapport charge/masse d'un électron). Pour sa découverte et ses travaux, il reçut le prix Nobel de Physique en 1906 « en reconnaissance du grand mérite de ses recherches théoriques et expérimentales sur la conduction de l'électricité dans les gaz » (Thomson, 1897). Ainsi, il inventa la spectrométrie de masse et le premier instrument permettant ces mesures, le spectrographe à parabole.

Peu après, A. J. Demptser (1918), université de Chicago, mis au point le premier spectromètre de masse en imposant une tension d'accélération aux ions issus de la source et en soumettant ces ions à un champ magnétique dans lequel force centrifuge et centripète s'équilibrent.
Au début des années 1960, Biemann et al. (1966) ont compris l'intérêt que pouvait représenter la spectrométrie de masse pour l'analyse des peptides. Les composés étaient ionisés par impact électronique et interprétés pour la première fois par un ordinateur.

2. Spectrométrie de masse en tandem

En général, la spectrométrie de masse en tandem (en anglais, mass spectrometry/mass spectrometry ou MS/MS) combine deux analyseurs, de manière à obtenir une bonne résolution de masse ainsi que des informations structurales sur les échantillons, comme la détermination précise de séquences peptidiques par séquençage de novo (Yost and Enke, 1978). Elle peut être réalisée à l'aide de nombreux appareils (trappe ionique, analyseurs magnétiques, analyseurs de temps de vol…). Au cours de notre étude, l'utilisation de la MS/MS a été nécessaire pour identifier les biomarqueurs présents sur les spectres de masse. Nous avons utilisé une trappe ionique, le LTQ (linear trap quadripole) comme premier analyseur de masse, couplé à l'Orbitrap, comme second analyseur.
Le principe reste identique à la spectrométrie de masse « simple » (Figure 2).

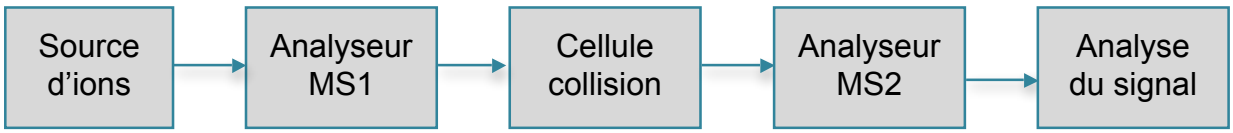


Figure 2 : étapes de la spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem comporte 5 étapes : une source d'ions qui permet l'ionisation de l'échantillon, un premier analyseur qui permet de sélectionner un ion en fonction de son m/*z*, une cellule de collision dans lequel l'ion sélectionné va subir des modifications physico-chimiques à l'aide d'un gaz inerte, un second analyseur qui l'étude des fragments de l'ion sélectionné et un analyseur de signal qui permet d'obtenir le spectre MS/MS de l'ion sélectionné dans le premier analyseur.

Les ions formés par la source vont passer dans un premier analyseur de masse. Parmi ces ions, un ion précurseur appelé ion « parent » va être sélectionné en fonction de son m/*z*. Il pénètre

dans une cellule de fragmentation ou de collision. La collision de l'ion « parent » avec un gaz inerte va produire des ions fragments ou ions « fils ». Les rapports m/*z* de ces fragments sont alors étudiés dans le second analyseur de masse.

3. Ionisation douce

Il y a une trentaine d'années, la capacité d'analyser des macromolécules par des techniques de « soft inonization » a été décrite. L'ionisation douce de protéines est l'étape clef de l'identification bactérienne puisqu'elle permet l'analyse de macromolécules telles que les protéines, dont les tailles peuvent aller jusqu'à 100 kiloDalton (kDa) (Albrethsen, 2007; Hillenkamp and Karas, 1990; Karas, 1987; Tanaka et al., 1988). Les principales techniques d'ionisation douce utilisées dans l'identification des micro-organismes sont l'électrospray ionization (ESI) et le MALDI, basées soit sur l'analyse des spectres protéiques, soit sur l'amplification de matériel génétique (Emonet et al., 2010; Kaleta et al., 2011). Nous n'aborderons ici que l'analyse des spectres protéiques. L'ESI et le MALDI sont tous deux intéressants à utiliser pour l'analyse des macromolécules biologiques. Peter Roepstorff écrivait ainsi en 1996 : « In fact, at present, I consider the two techniques to be highly complementary. They have both dramatically improved the perspectives for the application of mass spectrometry in protein chemistry to such an extend that protein chemistry laboratories without access to these two techniques or at least one of them cannot be considered up to date » (Andersen et al., 1996).

4. Principe de la technique MALDI

La méthode MALDI, introduite en 1987 par Karas, a fait l'objet d'un prix Nobel en 2002. La technique MALDI consiste à mélanger en excès une solution organique saturée de cristaux, appelée matrice, avec un échantillon, le mélange étant ensuite déposé sur une plaque de métal (Figure 3). En microbiologie, l'échantillon est le plus souvent une colonie bactérienne ou fongique, mais il est possible de déposer du matériel d'hémoculture, un échantillon d'urine ou de liquide céphalorachidien (LCR), ou encore un extrait protéique. Les cultures bactériennes ou fongiques sont prélevées et déposées directement sur la plaque en métal (une concentration est possible pour les milieux liquides). La matrice est ajoutée au dessus de l'échantillon et la plaque est ensuite insérée dans le spectromètre de masse pour réaliser l'analyse.

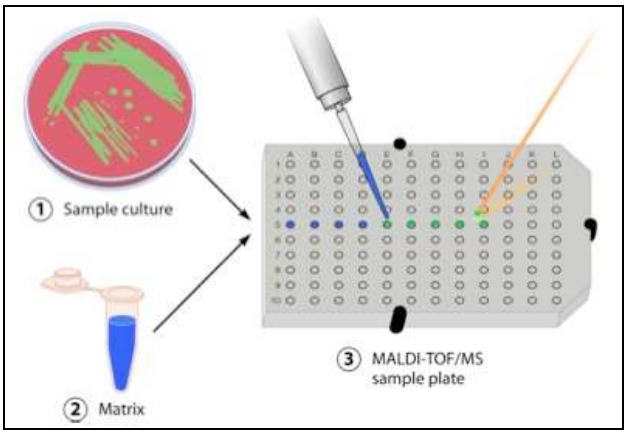


Figure 3 : étapes préalables à l'identification de micro-organismes par MALDI-TOF MS

Clark et al., 2013

La matrice et l'échantillon co-cristallisent sous l'effet du séchage. L'échantillon se présente alors sous la forme d'un dépôt solide pris dans la matrice. Le mélange matrice-échantillon cristallisé est alors irradié brièvement par un faisceau laser (en général un laser à azote (N_2) de longueur d'onde 337 nm dans les instruments MALDI-TOF commercialisés pour le diagnostic bactérien). Ce faisceau est dirigé sur un petit point de la surface du cristal (0,05 à 0,2 mm de diamètre). Pour obtenir un spectre correct, des centaines de tirs laser sont impulsés sur la cible pour maximiser le processus d'ionisation.

La matrice est essentielle au succès de l'ionisation de l'échantillon : en effet, l'absorption d'énergie du laser par les molécules de la matrice entraîne la désorption (passage en phase gazeuse) des ions du mélange matrice-échantillon. Lors de ce passage en phase gazeuse, un transfert d'ions se fait entre les molécules de la matrice et celles de l'échantillon pour former des ions mono ou multichargés (Figure 4). Les ions produits par la technique MALDI sont majoritairement monochargés. Les particules à l'origine de l'ionisation sont issues de groupements carboxyliques ou hydroxyliques de la matrice, du solvant ou des molécules de l'échantillon elles-mêmes. Ainsi, les différentes protéines vont se charger positivement ou négativement en fonction de leurs structures peptidiques.

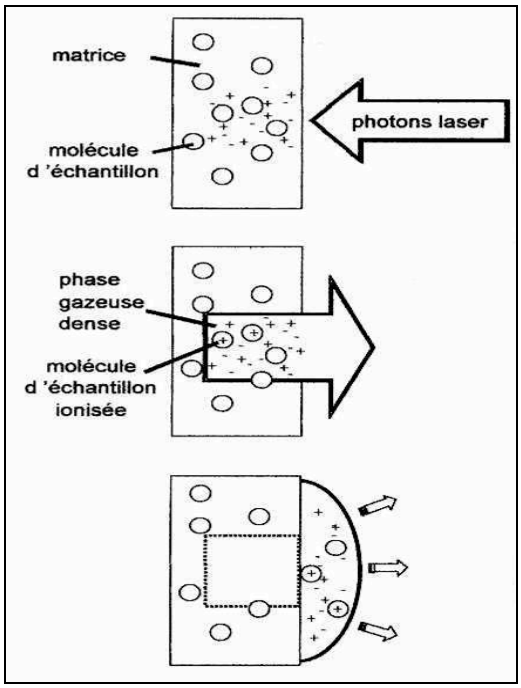


Figure 4 : désorption - ionisation par MALDI

Le mélange échantillon-matrice est ionisé à l'aide d'un laser. Les ions formés passent en phase gazeuse avant d'être accélérés par un champ électrique.

5. Principe de la technique ESI

La spectrométrie de type ESI ou ionisation par électronébulisation est la deuxième technique d'ionisation douce à côté de la technique MALDI. Nous avons utilisé cette technologie pour notre étude d'identification de protéines. Développée par J.B. Fenn (prix Nobel 2002), elle a révolutionné la spectrométrie de masse, notamment dans le domaine de l'analyse de protéines (Fenn et al., 1989). En effet, elle permet de transformer directement des molécules d'un échantillon liquide en ions en phase gazeuse (Figure 5).

L'échantillon est au départ infusé à débit constant à travers un fin capillaire enchâssé dans un tube au travers duquel circule constamment un gaz inerte, appelé gaz de nébulisation (N_2 la plupart du temps). Une différence de potentiel élevée est appliquée à ce capillaire. Le champ électrique ainsi créé est très élevé, ce qui confère aux gouttelettes une densité de charge importante (spray). La densité de charge au sein de chaque gouttelette augmente jusqu'à ce qu'elle devienne trop importante et qu'il se produise une explosion, provoquant une libération des ions en phase gazeuse. Les ions ainsi générés sont ensuite transférés vers l'analyseur. L'avantage de cette méthode d'ionisation douce est l'obtention majoritaire d'ions multichargés, favorisant l'analyse des macromolécules.

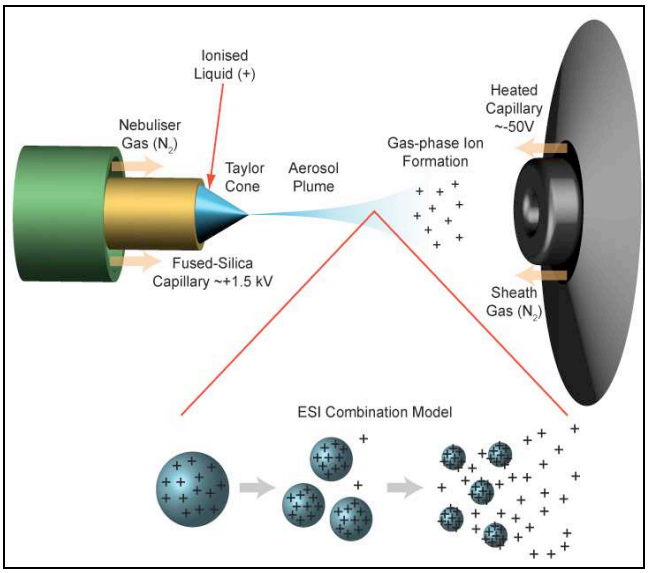


Figure 5 : ionisation par électronébulisation

Les gouttelettes sont formées à la sortie d'un fin capillaire porté à un potentiel élevé ce qui leurs confèrent une densité de charge importante. Le passage dans un courant d'air chauffé va provoquer l'évaporation de ces gouttelettes jusqu'à leur explosion en microgouttelettes constituées de molécules protonées ou déprotonées de l'analyte.

6. Principe de la technologie TOF et description du MALDI-TOF

Les deux techniques d'ionisation ESI et MALDI peuvent être associées à la technique TOF (Time Of Flight) ou « temps de vol ». La technique MALDI-TOF est actuellement la seule à être utilisée dans les laboratoires de microbiologie clinique pour l'identification bactérienne.

Dans les années 60, le premier instrument de TOF a été construit et commercialisé par W. C. Wiley : le « Bendix » TOF. Ce nouveau mode d'analyse permet d'obtenir une haute résolution pour des molécules de poids moléculaires (PM) élevés (Wiley and McLaren, 1955). Il existe deux modes de système TOF pour l'analyse des bactéries : le mode linéaire et le mode réflectron. La technique du TOF linéaire est la méthode la plus utilisée pour l'analyse en microbiologie, pour des raisons de coût et de dimension de l'appareillage.

Dans la technologie MALDI-TOF, les ions produits par le mélange matrice-échantillon sont introduits simultanément dans un tube de vol et retenus dans une région libre avant d'être accélérés par une impulsion électrique pouvant aller jusqu'à 20 kiloélectron Volt par application d'une différence de potentiel. Cette différence de potentiel est utilisée de manière à extraire les fragments positifs ou les fragments négatifs. En microbiologie, ce sont les ions positifs qui sont le plus souvent étudiés. Les protéines ionisées passent ensuite dans le tube de

vol maintenu sous vide et « volent » jusqu'à un détecteur situé à l'autre bout. Les ions sont séparés en fonction de leur vitesse et donc de leur masse, avant d'atteindre le détecteur. Le temps de vol des ions est inversement proportionnel à leur masse. Ainsi les ions ayant une masse élevée atteindront le détecteur plus lentement que les ions ayant une masse plus faible (Figure 6).

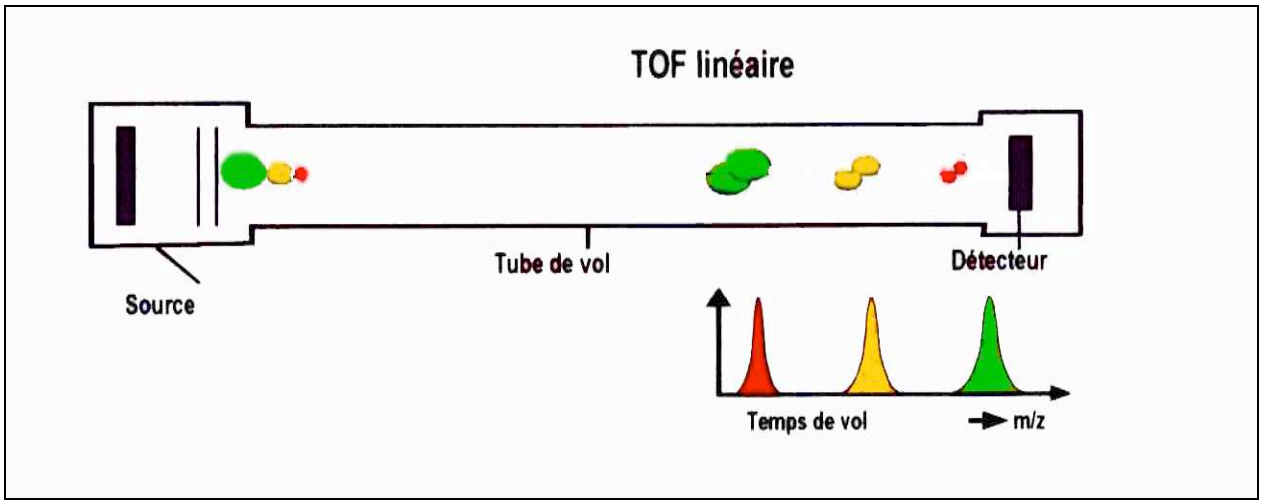


Figure 6 : schéma d'un tube de vol linéaire

Les ions se séparent dans le tube de vol placé sous vide en fonction de leur masse et de leur charge.

Leur arrivée au bout du tube de vol est détectée et enregistrée par un multiplicateur d'électrons, puis le signal obtenu est traité informatiquement. Les protéines de l'échantillon sont analysées par un analyseur de masse, donnant un ratio masse/charge (m/*z*). Cette mesure électrodynamique des ratios m/*z* permet de générer un spectre. Ce système de TOF linéaire peut détecter les molécules à des concentrations de l'ordre du fentomole (10^{15} mol/l) et de l'attomole (10^{18} mol/l), mais sa limitation est une mauvaise résolution, à l'origine de l'élargissement de certains pics dans les hauts poids moléculaires. Des ions de cinétique différente peuvent ainsi avoir le même m/*z*.

7. Types de matrices utilisées

Une liste des matrices les plus utilisées pour l'analyse des biomolécules est présentée sur le tableau 1. Une matrice est composée de petites molécules d'acide possédant un fort pouvoir d'absorption dans la gamme de longueur d'onde du laser. Les laboratoires de recherche utilisent souvent plusieurs matrices pour étudier différentes molécules. La matrice HCCA

(acide α-cyano-4-hydroxycinnamique) et l'acide sinapinique (SA) sont les plus performants pour la détection des composés protéiques. L'acide férulique permettrait une meilleure résolution de la masse protéique, notamment pour des poids moléculaires supérieur à 15 kDa (Madonna et al., 2000). La DHB (acide 2,5-hydroxybenzoïque) est utilisée pour l'analyse des composés de digestion protéique, des carbohydrates, oligosaccharides, glycopeptides, glycolipides (ions chargés négativement) et des protéines et peptides de masse inférieure à 10 kDa.

Une solution d'une de ces molécules est généralement préparée dans un mélange d'eau, de solvant organique (acétonitrile ou l'éthanol) et d'acide trifluoroacétique.

Chromophore matrix(es)[a]	Sample type(s) analyzed
PA, HPA, 3-aminopicolinic acid	Oligonucleotides, DNA, and biopolymers
DHB	Oligosaccharides
CCA	Peptides and triacylglycerol
SA	Proteins
HABA	Peptides, proteins, glycoproteins
MBT	Peptides, proteins, synthetic polymers
DHAP	Glycopeptides, phosphopeptides
THAP	Oligonucleotides

[a] PA, picolinic acid; HPA, 3-hydroxypicolinic acid; SA, 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid; HABA, 2-(−4-hydroxyphenylazo)benzoic acid; MBT, 2-mercaptobenzothiazole; DHAP, 2,6-dihyroxyacetophenone; THAP, 2,4,6-trihydroxyacetophenone.

Tableau 1 : principales matrices utilisées en MALDI

Clark et al., 2013

C. Utilisation du MALDI-TOF en microbiologie clinique

1. Historique

Cain et al. (1994) sont les premiers à avoir utilisé le MALDI-TOF pour l'identification de micro-organismes. L'analyse MALDI portait sur des extraits protéiques obtenus par sonication des bactéries, permettant une bonne différenciation des espèces, au prix d'une préparation lourde des échantillons. Par la suite, Holland et al. (1996) ont réalisé les premières analyses par MALDI-TOF MS à partir de bactéries intactes. Après une croissance de 18 h sur un milieu solide, les bactéries sans aucun traitement préalable étaient directement mélangées à la matrice avant d'être ionisées et analysées. Dans cette étude, les spectres de masse de cinq souches d'entérobactéries ont ainsi pu être obtenus, et comparés avec ceux des souches de référence. La présence de quelques ions caractéristiques du spectre a suffit pour obtenir l'identification d'une espèce. Depuis la fin des années 1990, de nombreuses études ont confirmé l'intérêt de cette technique (Fenselau and Demirev, 2001; Lay, 2001). On peut citer l'identification, en 1996, d'agents du bioterrorisme : *Bacillus anthracis*, *Brucella melitensis*, *Yersinia pestis* et *Francisella tularensis* (Krishnamurthy et al., 1996). La même année, Claydon et al. (1996) ont décrit l'identification bactérienne par MALDI-TOF de 10 micro-organismes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus epidermidis, Citrobacter freundii, Klebsiella aerogenes, Mycobacterium smegmatis*. Dans cette étude, la possibilité d'identification de genre et d'espèce a été mise en évidence. De plus, l'analyse des spectres de quatre souches d'*E. coli* a montré la présence d'un ou deux pics propres à chaque souche en plus des six pics constants du spectre, qui a été expliquée à l'époque par des profils de résistance différents aux antibiotiques dus à la présence de plasmides pour certaines souches (Claydon et al., 1996). En 2002, Bright et al. ont analysé 212 isolats appartenant à la famille des entérobactéries et aux genres *Bacillus, Pseudomonas, Streptococcus, Staphylococcus* et *Neisseria*, montrant une bonne identification d'espèce et de genre dans 84% et 89% des cas respectivement. D'autres études ont été décrites, portant sur des groupes bactériens particuliers tels que les *Haemophilus* (Haag et al., 1998) et les streptocoques β-hémolytiques (Kumar et al., 2004).

La possibilité d'identifier plusieurs bactéries sans ambiguïté au sein d'un mélange est un des autres avantages qu'offre potentiellement la technique MALDI-TOF dans l'identification bactérienne par rapport à l'identification biochimique. Elle a été mise en évidence par Wahl et

al. (2002), grâce à des algorithmes qui permettaient de différencier deux, trois ou quatre espèces dans un mélange d'entérobactéries, de *Bacillus* spp, et de *Pseudomonas* spp.
En 2003, les empreintes spectrales de 118 genres bactériens et 382 espèces étaient connus (Keys et al., 2004).

2. Standardisation

Bien qu'informatives, beaucoup d'études anciennes étaient limitées par l'absence de standardisation, de protocoles précis et de bases de données conséquentes. Elles montraient une grande variation des spectres en fonction des différents milieux de culture utilisés et une mauvaise reproductibilité inter-laboratoires (Wunschel et al., 2005).
Les premières bases de données utilisées ont été développées avec les bactéries propres à chaque laboratoire, rendant difficiles les comparaisons entre les différentes équipes. Des bases de données « maison » sont toujours utilisées actuellement pour apporter des informations supplémentaires en termes de sous espèces, sérotypes, ou analyse épidémiologiques, mais l'analyse de routine est actuellement réalisée avec des bases de données commerciales. Une standardisation des conditions de culture et des conditions expérimentales a permis d'améliorer la robustesse de la méthode (Bernardo et al., 2002; Valentine et al., 2005; Walker et al., 2002; Williams et al., 2003). L'utilisation quotidienne d'un contrôle de calibration permet d'obtenir une meilleure reproductibilité des spectres (Croxatto et al., 2012).

Milieux et délai de culture
Valentine et al., en 2005, ont comparé les empreintes spectrales de trois espèces (*Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica* et *E. coli*) après culture sur quatre milieux différents : certains pics étaient constamment retrouvés indépendamment du milieu de culture utilisé, d'autres étaient spécifiques à un milieu donné. Ces différences n'ont néanmoins pas affecté l'identification bactérienne. Deux études sur *S. aureus* n'ont également pas montré de différence en fonction du milieu (Walker et al., 2002). Williams et al. (2003) n'ont pas mis en évidence de différence de profil spectral après culture sur milieu gélosé ou liquide de *E. coli* et *Listeria innocua*.
Le temps de croissance peut être un facteur influençant la qualité du spectre de masse. Ainsi, il a été constaté une variabilité de certains pics du spectre d'*E. coli* en fonction du temps d'incubation (Arnold et al., 1999; Demirev et al., 1999). De même, les spectres de *Bacillus circulans* analysés à des temps de culture différents (24, 36, 42, 48 et 54 heures) montrant des

variations du fait de la sporulation de cette bactérie après 24 heures de culture, les auteurs recommandaient d'analyser les souches dans les premières 24 heures de culture pour éviter les incohérences de spectre dus à cette sporulation (Keys et al., 2004). Carbonnelle et al. (2007) ont montré que pour une souche donnée, certains pics étaient conservés indépendamment des conditions de culture, alors que d'autres pics disparaissaient ou apparaissaient en fonction de ces conditions. Néanmoins, ils ont remarqué que ces variations ne changeaient pas le résultat de l'identification, comme le montre la figure 7. Goyer et al. (2012) ont obtenu une identification correcte des levures de 96,2% après 72h de culture contre 95,1% après 48h.

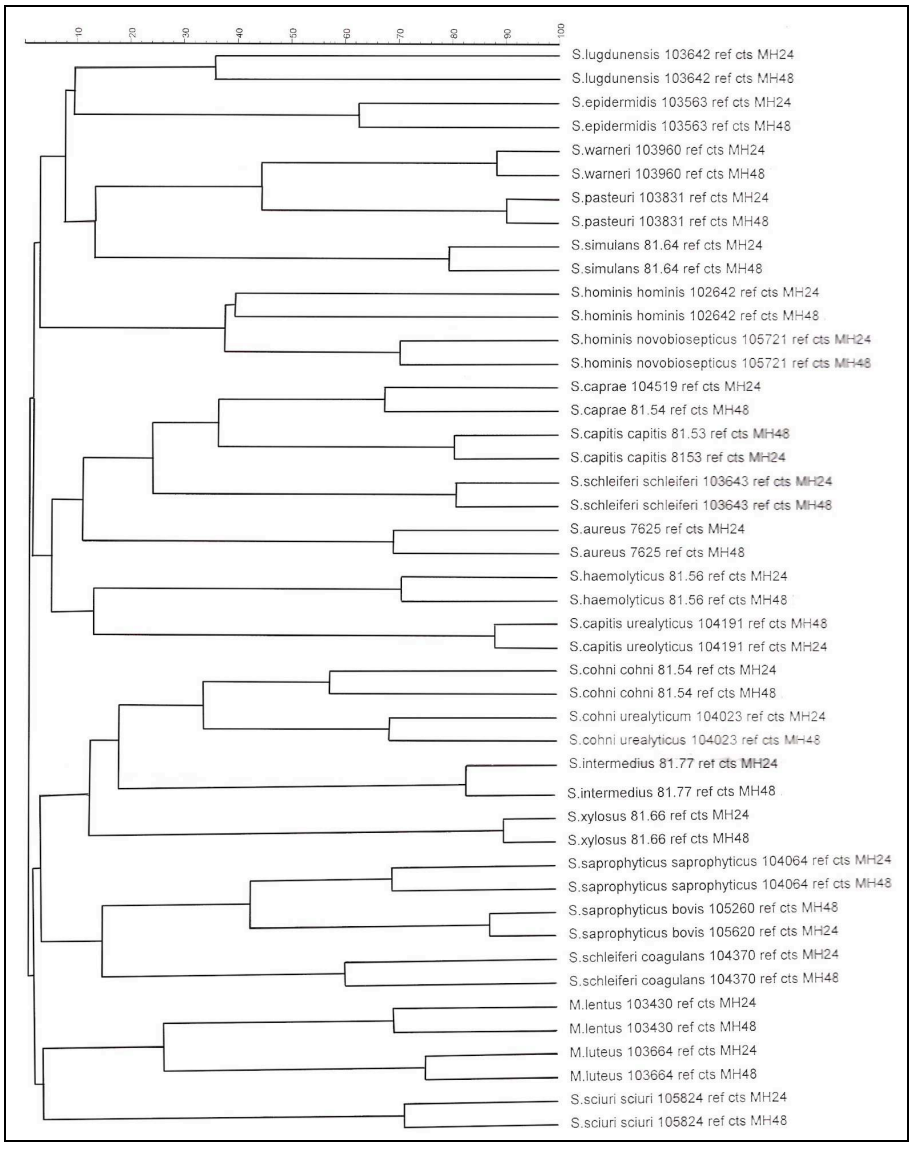


Figure 7 : dendrogramme de l'identification d'espèce de la famille des *Micrococcacae*, en fonction des bases de données édifiées à partir d'un milieu Muëller Hinton après 24 h et 48 h de culture. Le délai de culture n'interfère pas sur le diagnostic d'espèce.

Carbonnelle et al., 2007

Préparation des échantillons

Beaucoup d'études ont montré l'inutilité de l'extraction de protéines avant le dépôt sur la plaque, permettant une simplification extrême de la technique (Claydon et al., 1996; Holland et al., 1996) tout en gardant un bon pouvoir discriminant entre les espèces, même proches (Kumar et al., 2004; Rupf et al., 2005). Cependant, cette méthode sur « cellules intactes » n'est pas adaptée à tous les types de souches selon certains auteurs (Bizzini et al., 2011; Verroken et al., 2010), ou n'est pas recommandée pour des raisons de sécurité (Bille et al., 2012; Drevinek et al., 2012). Ces préparations préalables vont de l'ajout simple d'acide formique à l'extraction totale avec un mélange éthanol/acétonitrile (Clark et al., 2013).

D'autre part, le choix des matrices utilisées en MALDI-TOF sur bactéries intactes influe sur la qualité des spectres obtenus en termes de nombre et d'intensité relative des pics (Domin et al., 1999). Plusieurs d'entre elles ont été essayées avec plus ou moins de succès pour l'identification des micro-organismes (Albrethsen, 2007). La matrice HCCA est la plus utilisée pour l'identification bactérienne.

Mode de dépôt

Le mode de dépôt utilisé joue un rôle important dans la qualité des empreintes spectrales obtenues. Le dépôt doit être régulier et fin. Ainsi le dépôt en « couche mince » qui consiste à déposer en premier la bactérie puis la matrice sur la plaque permettrait de mieux caractériser les protéines de faible masse moléculaire. En revanche le dépôt dit en « goutte sèche » ou « dried droplet », qui consiste à déposer en une fois le mélange matrice-échantillon, permettrait de mieux distinguer les protéines de haute masse moléculaire (Vaidyanathan et al., 2002). Le mode de dépôt dit en « sandwich », où l'échantillon est placé entre deux couches de matrice, engendre un nombre de pics inférieur à celui retrouvé avec les autres dépôts (Keys et al., 2004). Le mode de dépôt en « couche mince » est simple et donne les résultats les plus reproductibles. Cette technique est la plus utilisée en microbiologie.

Appareillage

Pour l'identification bactérienne, la détection « en ions positifs » permet l'obtention d'un nombre de pics plus important par rapport à la détection « en ions négatifs » (Evason et al., 2000). En effet, les bactéries sont essentiellement composées de protéines basiques, qui ont une plus grande aptitude à former des ions positifs (Ryzhov and Fenselau, 2001).

D'autre part, la nature du laser peut influencer la qualité du spectre. Les lasers à N_2, utilisés par les systèmes MALDI-TOF commercialisés, permettent d'obtenir un grand nombre de pics et des protéines de haut poids moléculaire (Williams et al., 2003).

Il existe des variations de spectre en fonction des appareils utilisés. En effet, Walker et al. (2002) ont comparé les spectres obtenus pour une même souche de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) analysée dans deux laboratoires utilisant des appareils MALDI-TOF différents. Les souches, cultivées sur gélose columbia au sang, ont été analysées cinq fois dans les deux laboratoires en utilisant la même matrice (5-chloro-2-mercaptobenzothiazole). Sur les cinq pics d'intérêts, les positions des pics étaient identiques entre les deux appareils dans 60% des cas, contre 100% pour un même appareil (avec cependant des variations dans leurs intensités relatives).

Répétabilité de la technique

Pour des conditions de culture et de matrice données, la technique est très répétable si l'on utilise le même appareil. Selon Claydon et al. (1996), aucune différence de spectre n'a été observée sur des bactéries intactes obtenues en subculture à deux mois d'intervalle. De même, Saenz et al., (1999) ont mis en évidence la reproductibilité de la technique en montrant que les spectres d'*E. coli* et *Bacillus atrophaeus* analysés 10 fois sur un intervalle de temps de trois mois étaient identiques. Keys et al. (2004) ont obtenu également des spectres identiques en analysant trois fois la même souche d'*Acinetobacter calcoaceticus* sur une période de 12 mois.

Il semble donc que le MALDI-TOF MS soit une technique reproductible et robuste, applicable à la comparaison inter-laboratoires, à condition de respecter certaines conditions expérimentales. Mellmann et al. (2009) ont montré qu'en respectant les conditions de préparation des échantillons, huit laboratoires différents obtenaient plus de 98,75% de concordance dans l'identification de bacilles à Gram négatif non fermentants, en utilisant le même logiciel d'analyse (Biotyper®).

3. Utilisation des profils spectraux MALDI-TOF pour l'identification des micro-organismes

Il existe deux façons de caractériser les micro-organismes par la technique MALDI-TOF : d'une part la comparaison du spectre entier avec des bases de données d'empreintes spectrales

de référence, d'autre part la comparaison des masses (m/*z*) du spectre, ou biomarqueurs, à une base de données issue du protéome.

3.1 Comparaison des spectres à une bibliothèque (ou base de données) de spectres de référence

Dans cette approche, le spectre issu d'une bactérie est comparé à une bibliothèque spectrale de bactéries de référence, permettant l'identification microbienne, (Alanio et al., 2011; Barbuddhe et al., 2008; Bright et al., 2002; Carbonnelle et al., 2007; Degand et al., 2008; Dieckmann et al., 2008; Donohue et al., 2006; Farfour et al., 2012; Friedrichs et al., 2007; Fujinami et al., 2011; Haag et al., 1998; Ilina et al., 2009; Keys et al., 2004; Lotz et al., 2010; Mellmann et al., 2008; Stingu et al., 2008; Winkler et al., 1999). Ces spectres de référence sont créés à partir de pics communs et reproductibles retrouvés à plusieurs reprises lors du passage en MALDI-TOF des souches de référence. Le plus souvent, un algorithme statistique est nécessaire pour comparer le spectre de masse de la bactérie à identifier aux empreintes spectrales de référence ainsi que pour tenir compte de la variabilité entre les différents réplicats (Bright et al., 2002; Jarman et al., 2000). Comme la composition en protéines diffère entre les espèces (même parfois entre sous-espèces et souches), l'obtention de spectres différents permet une bonne identification. Cette méthode est rapide, simple, et adaptable à l'utilisation en routine dans les laboratoires de microbiologie clinique.

3.2 Comparaison des spectres à une base de données protéique

Dans cette approche, les masses (m/*z*) des biomarqueurs obtenus sur le spectre de la bactérie inconnue sont comparées aux masses moléculaires des protéines contenues dans des bases de données comme Swissprot (Demirev et al., 1999; Pineda et al., 2000). Cette méthode est basée sur la déduction que la majorité des macromolécules observées sur le spectre à des poids moléculaires supérieurs à 4 000 m/*z* sont des protéines (Arnold et al., 1999; Dai et al., 1999; Ryzhov and Fenselau, 2001). L'avantage de cette approche bio-informatique comparée à l'analyse des spectres est qu'elle tolère des variations de profil, et est donc moins sensible aux différents traitements de l'échantillon et à ses conditions de culture. Les protéines identifiées de cette manière peuvent avoir une spécificité d'espèce, permettant l'identification de l'espèce bactérienne à partir de son empreinte spectrale (Holland et al., 1999). Quelques

pics peuvent être suffisants pour une identification d'espèce à la condition que la (ou les) protéine(s) du spectre de masses identifiée(s) soi(en)t spécifique(s) de l'espèce (Lay, 2001). Cette approche bio-informatique nécessite cependant la connaissance de tous les protéomes des espèces bactériennes d'intérêt médical. C'est pour cela qu'actuellement la comparaison à une bibliothèque de spectres de référence est plutôt utilisée en microbiologie clinique.

4. Entrée de la technique MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie en routine

A partir de 2009, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est entrée dans les laboratoires de microbiologie clinique. Mis à part l'investissement de départ pour l'appareil, le coût très bas de l'analyse, sa fiabilité et le délai de réponse rapide ont incité les laboratoires à utiliser rapidement cette nouvelle technologie (Tableau 2).

Method	Delay, minutes	Cost, €*	Level of training
Manual			
Gram staining	6	0.6	Medium to high
API system identification (bioMérieux)	1080–2880	4.6–6.0	Medium
Antibiotic susceptibility test	1080–2880	6.6–7.4	Medium
Phoenix system identification and susceptibility test (BD Diagnostics)	300–1200	12.65	Medium
Vitek system (bioMérieux)			
Identification	300–480	5.9–8.23	Medium
Identification and susceptibility test	300–480	10.38–12.71	
MALDI-TOF	6–8.5	1.43	Low to medium

* Les coûts ont été calculés sur la base des prix fournisseurs en France au mois de Décembre 2008

Tableau 2 : délai, coûts et niveau de formation pour la réalisation des techniques d'identification bactérienne.

D'après Seng et al., 2009

Beaucoup d'études ont comparé les résultats d'identification obtenus par MALDI-TOF avec les techniques biochimiques, en faveur de la technique MALDI-TOF (Bessede et al., 2011; Bille et al., 2012; Bizzini et al., 2010; Cherkaoui et al., 2010; Clark et al., 2013, Eigner et al., 2009; Fernandez-Olmos et al., 2012; Gravet et al., 2011; Patel, 2013; Seng et al., 2013; Seng et al., 2009; van Veen et al., 2010) Par exemple, l'étude de Dupont et al. (2010) a montré la nette supériorité de cette technique par rapport à deux automates d'identification phénotypique (Tableau 3).

Identification	Correcte %	Faible %	Erronée %	Echec %
MALDI	97,4	/	1,3	1,3
Phoenix®	79	/	21	0
Vitek®	78,6	10,3	10,3	0,9

Tableau 3 : résultats de la comparaison de 3 systèmes d'identification bactérienne.

Le MALDI permet une meilleure identification que le Phoenix® ou le Vitek®. Cependant l'échec d'identification est plus fréquent avec le MALDI.

D'après Dupont et al., 2010

5. Systèmes commercialisés

Trois systèmes sont commercialisés en France, par les firmes Andromas, bioMérieux et Bruker daltonics. Chaque instrument est accompagné d'un logiciel de pilotage incluant une banque de données et un système expert permettant l'identification des micro-organismes. Les trois bases de données peuvent être incrémentées avec des spectres propres à l'aide d'entrées spéciales, dans un but de typage de souches. L'identification repose sur l'analyse du spectre généré par le spectromètre de masse, qui diffère en fonction des stratégies développées par les sociétés distributrices.

Comme chaque système utilise ses propres algorithmes, bases de données, logiciels et critères d'interprétation, les performances entre les systèmes sont difficilement comparables. La comparaison se situe donc au niveau de l'interprétation finale.

5.1 Andromas

Le système Andromas (Andromas SAS, Paris, France) est celui que nous avons utilisé au cours de ce travail. C'est un système complet (appareil, logiciel) pour l'identification des bactéries, mycobactéries, champignons, et échantillons d'hémocultures positives. Ce système utilise plusieurs profils spectraux spécifiques d'espèce pour chaque organisme, afin d'accroitre la robustesse de l'identification.

Création et validation de la base de données

Le principe d'édification de la base de données du logiciel Andromas® a consisté à sélectionner au sein des profils spectraux les pics qui sont caractéristiques d'une espèce donnée. Ainsi, la banque de données est constituée d'un nombre restreint de pics pour chaque

espèce bactérienne. La construction de la base de données s'est faite de la façon suivante : pour chaque espèce bactérienne d'intérêt clinique, 10 isolats d'une souche de référence (american type culture collection ou collection Institut Pasteur) ou d'une souche clinique parfaitement identifiée par biologie moléculaire, cultivés à des jours différents sur un même milieu de culture, ont été analysés par MALDI-TOF. Pour chaque spectre, une valeur correspondant à l'intensité relative a été donnée à chaque pic. La valeur 1 a été donnée arbitrairement au pic ayant l'intensité la plus élevée et pour tous les autres pics une valeur d'intensité relative calculée en fonction de ce pic a été attribuée. Les pics minoritaires d'intensité relative inférieur à 0,1, inconstants sur le spectre, n'ont pas été retenus comme candidats pour faire le diagnostic d'espèce. Les pics retrouvés sur les 10 isolats ont été considérés comme spécifiques d'espèce (Figure 8). Ainsi chaque espèce bactérienne est référencée dans la banque de donnée par un nombre de pics de m/*z* précis, restreints et spécifiques. La figure 8 montre les spectres de 10 isolats de la même souche de *Neisseria meningitidis* (Nm).

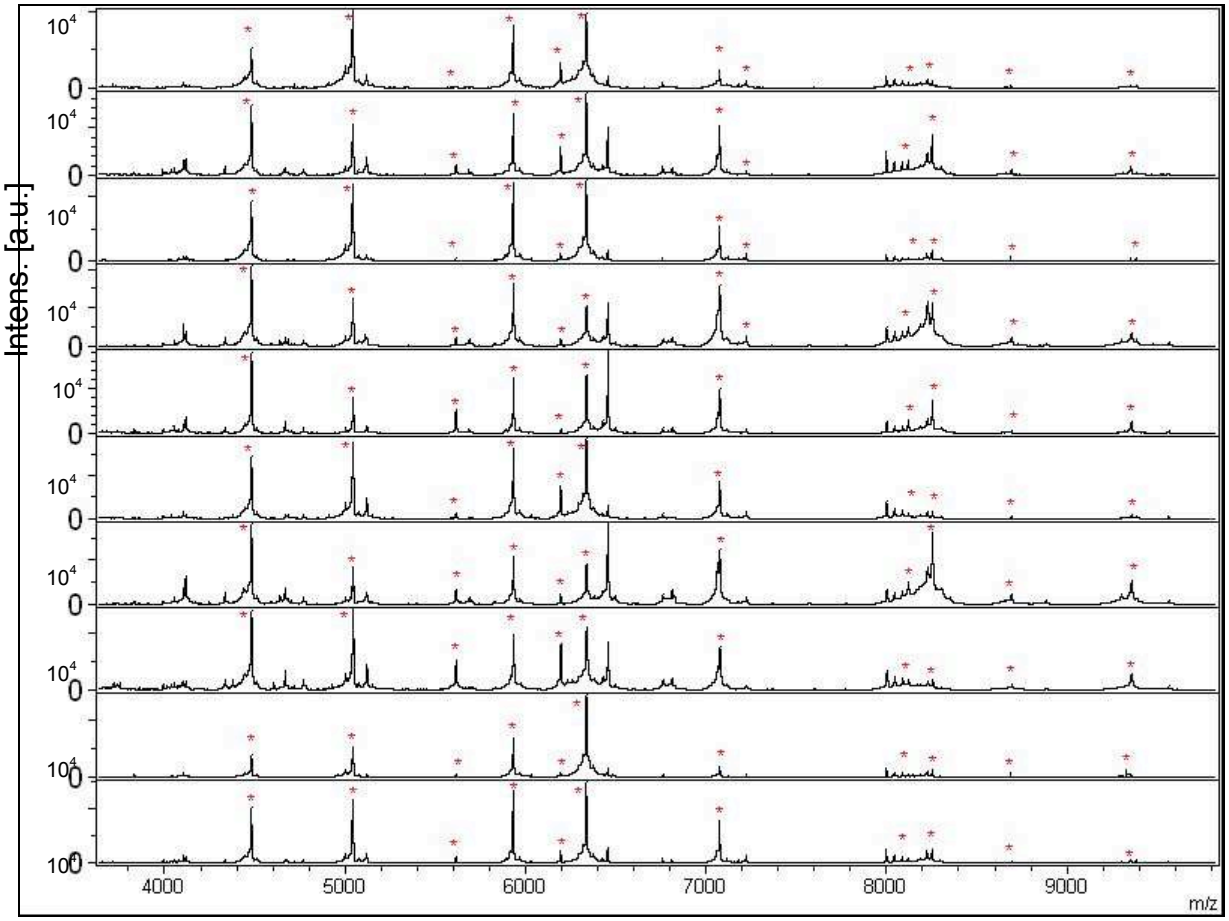


Figure 8 : **profil MALDI-TOF MS de 10 isolats de la même souche de *N. meningitidis*.**
Les pics marqués d'une étoile sont les pics constamment retrouvés. Ils constituent la base de donnée de référence de l'espèce *N. meningitidis*.

Pour valider cette base de données, la spécificité de chaque spectre a été évaluée par le passage de nombreuses souches cliniques isolées en routine et parfaitement identifiées, issues de différents hôpitaux, cultivées sur les milieux de culture habituellement utilisés au laboratoire. Pour chaque souche testée, les pics avec une intensité supérieure à 0,1 ont été retenus. Les profils obtenus ont été comparés à la base de donnée. Pour réaliser cette opération, un logiciel a été développé pour permettre un screening rapide de l'ensemble des valeurs de la souche testée afin de les relier aux valeurs les plus proches d'une des souches de référence incluse dans la base de données. L'algorithme détermine la meilleure correspondance entre la souche testée et les souches de référence sous la forme d'un pourcentage, tout en tenant compte d'une possible déviation de m/*z* (marge d'erreur).

L'identification de la souche testée correspond ainsi à l'espèce de la souche de référence qui a obtenu le meilleur match et qui possède au moins 70% de similitude. Plus la différence est grande entre la première identification et la seconde, meilleure est la discrimination entre espèces. Une différence d'au moins 10% entre ces deux premières propositions est requise pour obtenir une bonne identification.

Certains milieux chromogènes ou contenant des antibiotiques diminuent fortement le nombre de pics présents sur le spectre. Il a donc été nécessaire pour obtenir une identification correcte d'ajouter des entrées supplémentaires pour les entérobactéries et les entérocoques cultivant sur ces milieux.

Lorsque deux espèces sont très semblables au niveau génomique, l'expression de leur protéome l'est aussi. Ainsi, les spectres des espèces appartenant au groupe des streptocoques oraux (par exemple *Streptococcus pneumoniae*/*Streptococcus pseudopneumoniae*/ *Streptococcus mitis*) ou au complexe *Burkolderia cepacia* ont une similitude très élevée, rendant alors difficile un diagnostic au niveau de l'espèce. La création de « sous-bases de données » a donc été nécessaire pour permettre une bonne identification d'espèce (Degand et al., 2008). Toute la base de donnée du logiciel Andromas® a été construite sur des bactéries n'ayant pas subi d'extraction préalable.

Cette base est séparée en quatre bases de données distinctes, permettant l'identification des bactéries, des mycobactéries, des champignons et des dermatophytes. L'identification est rendue sous la forme de trois réponses possibles : « bonne identification », « identification à confirmer », « pas d'identification ». Les deux derniers items sont basés sur un cutoff en dessous duquel l'analyse doit être refaite. Plusieurs études ont été publiées sur ce système : bactéries, mycobactéries, levures, hémocultures (Alshawa et al., 2012; Alanio et al., 2011;

Carbonnelle et al., 2007; Farfour et al., 2012; Ferroni et al., 2011; Lotz et al., 2010), ou diagnostic de routine (Bille et al., 2012).

5.2 Biotyper®

Le système proposé par Bruker daltonics est composé d'un appareil et du logiciel Biotyper®, pour l'identification des bactéries, mycobactéries, champignons, et échantillons d'hémocultures positives (Jamal et al., 2013; Panda et al., 2013; Pinto et al., 2011; Seng et al., 2009). Les données des spectres sont analysées en prenant en compte la position, la fréquence des pics et leur intensité. Ils sont ensuite comparés à une base de données issue de répétitions spectrales de souches de référence. Un score de correspondance basé sur les masses identifiées et leur corrélation d'intensité est généré et utilisé pour le classement des résultats. Un score entre 2,33 et 3 est considéré comme une très probable identification d'espèce, entre 2 et 2,32 comme une bonne identification de genre et une probable identification d'espèce, entre 1,7 et 1,999 comme une probable identification de genre, requérant d'autres tests. Les scores inférieurs à 1,699 ne permettent pas d'identification et l'échantillon doit donc être repassé ou soumis à d'autres tests.

5.3 Vitek-MS

Le logiciel Saramis® a été créée par la société Anagnostec GmbH avant d'être rachetée par la société bioMérieux pour être incorporée dans une plateforme Vitek-MS (Patel, 2013). Cette base avait été auparavant commercialisée par la société Shimadzu avec le spectrophotomètre Axima®. Sa base de données utilise des superspectres, qui contiennent des conglomérats de biomarqueurs issus d'au moins 15 isolats de genres, d'espèces ou de souches provenant de localisations différentes, après culture dans différentes conditions. Si le match n'est pas satisfaisant, une base plus large de souches est alors sollicitée. Après l'acquisition de Saramis® par bioMérieux, ces derniers ont développé leur propre algorithme d'identification pour les bactéries et les levures à partir d'isolats ou de prélèvements (Chen et al., 2013; Garner et al., 2013; Moon et al., 2013; Westblade et al., 2013). Celui-ci est basé sur une matrice à classement vertical. Un score de probabilité obtenu entre 60 et 100% signifie que le niveau de confiance est élevé et donc que l'identification est fiable. Pour un score < 60% le niveau de confiance est faible, le logiciel proposant alors entre deux et quatre identifications.

5.4 Performances des trois systèmes pour l'identification sur colonies

La plupart des erreurs relevées dans la littérature ont été attribuées à des bases de données incomplètes associées à une acquisition imparfaite ou une impossibilité à différencier des espèces proches. Seng et al. (2009) ont été les premiers à montrer l'intérêt de la technique MALDI-TOF MS dans l'identification en routine des bactéries, directement à partir de colonies, sans extraction préalable (Biotyper®). Sur 1 660 souches testées, seulement 84,1% ont été correctement identifiées, en partie à cause d'une base de données incomplète.
Cherkaoui et al. (2010) ont comparé deux systèmes commerciaux, Biotyper® et Shimadzu-Saramis® avec une version ancienne de la base de données Saramis®, en utilisant le séquençage de l'ADNr 16S comme gold standard d'identification d'espèce. Parmi les 720 isolats cliniques identifiés au niveau de l'espèce, 99,1% l'ont été avec le système Biotyper® et 88,8% avec le système Shimadzu (cette base de donnée a été révisée depuis). Comme décrit dans d'autres études, l'identification des anaérobies était mauvaise, à cause d'une base de données incomplète. L'identification des streptocoques était également peu satisfaisante avec un score d'identification de 41% pour les deux systèmes. Blondiaux et al. (2010), en utilisant le logiciel Biotyper®, ont obtenu des taux de bonne identification pour 100, 95,7 et 83,2% des isolats, respectivement pour les staphylocoques, les entérocoques et les entérobactéries sans extraction préalable. Selon van Veen et al. (2010), une identification au niveau de l'espèce a été obtenue pour 97,7/92/94,3/84,8 et 85,2% des cas pour les entérobactéries, les bacilles à Gram négatif non fermentants, les staphylocoques, les streptocoques et les levures. Ces résultats ont été obtenus directement à partir des colonies; cependant, en cas d'absence d'identification au premier passage, une extraction était alors réalisée. Les problèmes d'identification ont été attribués à des absences de certaines espèces dans la base de données et à une mauvaise différenciation entre les streptocoques *viridans* dont 57,1% ont été faussement identifiés *S. pneumoniae*. Sur 1 371 isolats de routine, Bizzini et al. (2010) ont retrouvé une identification correcte à l'espèce dans 93,2% des cas. Ces résultats ont été obtenus en utilisant les recommandations de Bruker daltonics : un premier passage à partir de bactéries intactes puis une extraction réalisée en deuxième intention. Une étude récente a montré que le taux de bonne identification était meilleur si l'on procédait à une extraction (97,3% versus 82,6%) (Bessede et al., 2011). Concernant le logiciel Andromas®, comme avec les autres systèmes, il n'est pas aisé de différencier *E. coli* de *Shigella* spp et *S. pneumoniae* de *S. mitis*. Une amélioration des performances de l'identification de *S. pneumoniae* a fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse. *Listera monocytogenes* ne peut être différenciée

de *L. innocua* et de *Listeria ivanovii* (Bille et al., 2012; Farfour et al., 2012). Il est cependant possible que cette différenciation soit plus facile après extraction, comme l'ont montré Barbuddhle et al. (2008) sur le système Bruker daltonics. Une étude réalisée au sein du laboratoire de microbiologie de l'hôpital Necker-Enfants malades a montré les résultats d'identification sur deux mois d'utilisation quotidienne : 2 665 bactéries ont été analysées, pour lesquelles une bonne identification d'espèce a été possible dans 93,1% des cas au premier passage, atteignant 99,2% après une deuxième acquisition sans extraction. Concernant les levures et les *Aspergillus*, l'identification a été obtenue dans 94,3% des cas. Enfin les 22 mycobactéries isolées pendant cette période ont toutes été correctement identifiées (Bille et al., 2012).

Une étude récente a comparé trois systèmes différents: Vitek-MS avec le logiciel Saramis®, Vitek-MS avec la base bioMérieux et Microflex™ avec le logicel Biotyper®, sur un échantillon de 1 129 isolats, incluant 73 anaérobies. Les deux systèmes ont montré des performances équivalentes, avec une identification correcte pour 93% des souches isolées en routine (Martiny et al., 2012).

Il est cependant difficile de comparer de taux d'identification d'une étude à l'autre puisque toutes les espèces ne sont pas représentées de la même façon, notamment les espèces réputées plus difficiles à identifier que les autres.

5.5 Identification des micro-organismes directement dans les prélèvements

Alors que la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a été largement évaluée comme outil de diagnostic dans l'identification des micro-organismes obtenus à partir de milieux de culture solides, la technologie est maintenant exploitée pour analyser les milieux de culture liquides positifs (ex : hémocultures) ou même les échantillons liquides de patients contenant des bactéries avant la mise en culture. Avant l'avènement de l'analyse moléculaire, ce type d'analyse directe s'était jusqu'alors révélé impossible. En raison de sa haute sensibilité, le système MALDI-TOF propose une technologie attrayante pouvant être utilisée à la place des stratégies basées sur la PCR pour la détection directe des agents pathogènes issus de prélèvements cliniques, aucune amplification de la cible n'étant requise. L'identification des micro-organismes dans ces échantillons biologiques peut être améliorée par leur traitement préalable, consistant à enlever une partie des éléments qui peuvent inhiber l'analyse (protéines, acides nucléiques, débris cellulaires, etc).

5.5.1 Urines

L'une des premières études comparant directement la technologie MALDI-TOF aux méthodes classiques d'identification bactérienne dans les urines a conclu que la spectrométrie de masse après centrifugation différentielle était une méthode prometteuse. La centrifugation à faible vitesse qui sert à éliminer les leucocytes est suivie par une centrifugation à grande vitesse pour recueillir les micro-organismes de l'échantillon. Sur 269 échantillons détectés comme positifs à l'état frais, 20 ont été retrouvés négatifs à la fois en culture et en MALDI-TOF MS (Biotyper® 2.0). Dans le groupe des 220 échantillons qui possédaient des niveaux élevés de croissance bactérienne, > 10^5 unité formant colonie (UFC)/ml, l'identification par MALDI-TOF était conforme au niveau du genre dans 204 cas (92,7%) et au niveau de l'espèce dans 202 cas (91,8%), par comparaison aux techniques classiques à partir de la culture. Les auteurs ont conclu que la technique MALDI-TOF permettait une bonne identification dans les urines, en particulier si l'urine contient un grand nombre de bactéries à Gram négatif (Ferreira et al., 2010). Une deuxième étude réalisée par le même groupe a montré qu'après la centrifugation différentielle, une précipitation à l'éthanol des protéines suivie d'une remise en suspension du culot par de l'acide formique et de l'acétonitrile augmentait nettement la performance de la technique (Ferreira et al., 2010, Ferreira et al., 2011). Une autre équipe a précisé que l'identification par MALDI-TOF directement sur les urines était applicable aux échantillons ayant une densité bactérienne d'au moins 10^3 UFC/ml (Kohling et al., 2012).

Dans un travail plus récent, l'analyse de l'urine par cytométrie en flux a été utilisée comme une méthode de présélection pour éliminer les échantillons négatifs. Les échantillons jugés positifs pour la présence de bactéries à un taux supérieur à 10^5 UFC/ml par cytométrie de flux ont été testés en MALDI-TOF MS après une centrifugation différentielle suivie d'un traitement par acide formique et acétonitrile. Un résultat correct (absence de bactérie ou bonne identification de la bactérie retrouvée) a été obtenu dans 94,8% des cas (logiciel Biotyper®). Parmi les 430 échantillons positifs, 90% des identifications bactériennes ont été correctes en comparaison avec les méthodes phénotypiques. Huit résultats discordants entre le MALDI-TOF et les résultats du Vitek-2® ont bénéficié d'un séquençage du gène ADNr 16S de la souche, confirmant les résultats obtenus par spectrométrie de masse. Le MALDI-TOF semble donc être une technologie robuste et fiable pour l'identification des espèces bactériennes directement à partir des échantillons d'urine monomicrobiens. Cependant, les auteurs ont également montré les limites de la technologie pour les urines peu concentrées en bactéries (< 10^5 UFC/ml) (Wang et al., 2013). Par ailleurs, l'identification est difficile lorsque l'échantillon est plurimicrobien (Ferreira et al., 2011; Wang et al., 2013). De plus, aucune

méthodologie normalisée est actuellement disponible sur le traitement des urines avant l'analyse par MALDI-TOF MS.

5.5.2 Liquide Céphalorachidien

La technologie MALDI-TOF appliquée directement sur le LCR permettrait d'obtenir l'identification immédiate du pathogène responsable de méningite, et ainsi d'administrer un traitement plus ciblé. Peu d'études ont utilisé cette technique sur le LCR. On peut citer un essai sur un prélèvement effectué chez un homme atteint de méningite à pneumocoque (Nyvang Hartmeyer et al., 2010). L'échantillon a subi un procédé similaire aux échantillons d'urines : une centrifugation différentielle et une extraction protéique par acide formique-acétonitrile. L'identification générée par MALDI-TOF MS a été donnée au niveau du genre, puis de l'espèce après une manipulation manuelle des données.

Quel que soit le niveau de l'identification, genre ou espèce, l'utilisation de cette technique en complément de la coloration de Gram et de la culture bactérienne est intéressante une prise en charge adéquate du patient.

5.5.3 Flacons d'hémoculture

L'identification des bactéries et des levures par spectrométrie de masse directement dans un bouillon d'hémoculture signalé positif est une technique séduisante, qui a pour objectif d'accélérer le processus d'identification, permettant la mise en œuvre rapide d'une antibiothérapie ciblée sur l'espèce bactérienne identifiée. Après traitement du bouillon de culture pour d'une part limiter les interférences des cellules sanguines et de l'hémoglobine, et d'autre part pour concentrer les micro-organismes présents, la procédure est similaire à celle utilisée pour les colonies bactériennes. Différentes études ont montré que cette étape pré-analytique peut influencer de manière considérable la qualité des spectres. Des auteurs ont ainsi constaté que les protocoles faisant appel à une extraction étaient plus efficaces que les méthodes utilisant des cellules intactes (Ferreira et al., 2011).

Avant la disponibilité des kits commerciaux de traitement des échantillons d'hémocultures, la technologie a été évaluée par des méthodes en interne. Un certain nombre de protocoles ont ainsi été décrits, dont celui mis au point dans le travail présenté dans ce document. Le tableau 4 présente les résultats de différentes études menées sur les bouillons d'hémoculture.

Bruker daltonics et Andromas ont franchi des étapes importantes dans la normalisation de la méthode d'extraction de l'échantillon avec l'introduction du kit SepsiTyper® pour l'un et

A Must® (Andromas Maldi Universal Sepsis Test) pour l'autre, permettant l'analyse directe des bactéries à partir d'échantillons de bouillon d'hémoculture positifs.

	Christner et al.	Bille et al.	Fothergill et al.	Foster et al.	Jamal et al.	Kok et al.	La Scola et al.	Moussaoui et al.	Prod'hom et al.	Stevenson et al.
Flacons d'hémoculture	Bactec®	BacT/Alert®	BacT/Alert®	Bactec®	BacT/Alert® Bactec®	Bactec®	Bactec®	Bactec®	Bactec®	Bactec®
Quantité de bouillon	6 ml	200 µl	2 ml	7 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1,5 ml	5 ml	4 ml
Tube séparateur de sérum	non	non	non	non	non	non	non	oui	non	oui (X2)
Agent de lyse ou kit commercial	Eau distillée	Eau distillée + saponine	Brij 97® +filtration sur membrane	Spree®	Sepsityper®	Sepsityper®	Eau distillée	Eau distillée	Eau distillée + NH_4Cl	Eau distillée + NH_4Cl
Extraction protéique	oui	non	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Nombre de centrifugations	6	2	0	3	4	5	4	5	4	7
Nombre de réplicats	2	2	1	4	1	1	4	2	2	1
Spectromètre	Bruker microflex®	Bruker microflex®	Vitek MS®	Vitek MS®	Bruker microflex®	Bruker microflex®	Bruker autoflex®	Bruker biflex®	Bruker microflex®	Bruker ultraflex®
Base de données	Biotyper® 2.0	Andromas®	Vitek MS®	Vitek MS®	Biotyper® 3.0	Biotyper® 2.0	Biotyper® 2.0	Biotyper® 2.0	Biotyper® 2.0	Biotyper® 2.0
Critères d'acceptabilité	Score ≥ 1,3	Bonne identification 1/2 réplicats	Niveau de confiance élevée	Niveau de confiance élevée 2/4 réplicats	Score ≥ 1,7	Score ≥ 1,7	Score ≥ 1,9 : 2/4 réplicats ou Score ≥ 1,2 : 4/4 réplicats	Score ≥ 1,7	Score ≥ 1,7	Score ≥ 1,7
Micro-organismes	Identification au niveau de l'espèce* : nombre/total testé (%)									
S. aureus	54/60 (90)	15/17 (88,2)	53/55 (96,4)	45/45 (100)	12/ 12 (100)	49/54 (90,7)	15/21 (58)	47/49 (95,9)	25/25 (100)	9/14 (64,3)
SCN◆	74/77 (96,1)	71/76 (93,4)	49/63 (77,8)	81/82 (98,8)	41/60 (68,3)	96/150 (64)	67/95 (70,5)	136/142 (95,8)	22/28 (78,6)	22/39 (56,4)
E. coli	42/42 (100)	16/16 (100)	14/16 (87,5)	43/45 (95,6)	14/17 (82,4)	97/102 (95,1)	31/34 (91,2)	105/106 (99)	15/15 (100)	16/16 (100)
P. aeruginosa	5/5 (100)	4/4 (100)	1/1 (100)	3/3 (100)	4/6 (66,7)	11/12 (91,7)	3/3 (100)	7/7 (100)	4/4 (100)	10/12 (83,3)
Streptococcus spp	13/15 (86,7)	8/8 (100)	11/22 (50)	5/13 (38,5)	3/7 (42,9)	24/33 (72,7)	4/17 (23,5)	70/73 (96)	6/19 (31,6)	17/23 (73,9)
Levures	NT	NT	15/18 (83,3)	NT	4/8 (50)	NT	NT	NT	NT	NT

. * excepté les espèces *S. pneumoniae* et *S. mitis* pour lesquelles un test supplémentaire est recommandé pour les différencier ; ◆ SCN : staphyloque à coagulase négative, NT : non testé

Tableau 4 : comparaison des techniques d'identification par MALDI-TOF à partir de flacons d'hémocultures

D'après Ferroni et al., 2011

La performance des identifications varie en fonction des stratégies utilisées et des espèces testées, mais celles-ci atteignent généralement 80% de bonne identification au niveau de l'espèce.

Quelle que soit la méthode utilisée, une identification d'espèce ne permet cependant pas d'éliminer la présence d'une deuxième espèce dans le bouillon d'hémoculture (Buchan et al., 2012; La Scola and Raoult, 2009). C'est pour cela que la coloration de Gram garde toute son importance, car elle permet de détecter les hémocultures polymicrobiennes. Dans ce cas de figure, le plus souvent une seule espèce est détectée par MALDI-TOF MS, correspondant sans doute à l'espèce majoritaire (Buchan et al., 2012; Moussaoui et al., 2010; Stevenson et al., 2010). Une culture polymicrobienne peut toutefois être suspectée si deux espèces sont proposées et chacune avec un score acceptable (Moussaoui et al., 2010).

5.6 Détection de la résistance aux antibiotiques

Même si l'identification rapide des bactéries par la technique MALDI-TOF permet d'améliorer l'antibiothérapie probabiliste, la détermination de la sensibilité aux antibiotiques est l'analyse pour laquelle le délai de rendu du résultat conditionne la bonne prise en charge antibiotique du patient, grâce à une molécule ciblée sur le profil de résistance de la souche. En effet, l'identification des bactéries permet de cibler le traitement sur un profil de résistance d'espèce, mais ne permet pas de certitude sur le choix de ce traitement. A part quelques tests d'agglutination ou d'immunochromatographie visant par exemple à rechercher la résistance à la méticilline des staphylocoques, peu de bactéries sont concernées par les tests rapides de recherche de résistances. La spectrométrie MALDI-TOF étant une méthode sensible pour l'analyse des protéines bactériennes, il semblerait qu'elle puisse être utilisé pour caractériser les enzymes ou les produits de dégradation dus au mécanismes de résistance aux antibiotiques (Hrabak et al., 2013).

Détection spécifique de la résistance aux bêta-lactamines chez les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentants

En 2007, Camara and Hays ont utilisé la technique MALDI-TOF pour différencier des souches d'*E. coli* ampicilline-résistantes et -sensibles, par identification de la bêta-lactamase sur le spectre obtenu à partir de protéines extraites d'un bouillon de culture bactérien. Depuis, de nombreuses études ont mis en évidence la résistance aux bêta-lactamines à large spectre en se focalisant soit sur l'hydrolyse ou la dégradation d'un antibiotique mis en contact avec la

souche, qui seront détectées par la disparition du pic de cet antibiotique après ce contact (Sparbier et al., 2012), soit sur la présence d'un pic spécifique du mécanisme de résistance (enzyme) (Xu et al., 2006). Des études similaires ont permis de visualiser avec succès la présence de carbapénémases chez les entérobactéries et les *Pseudomonas* avec un délai de réponse compris entre 1 et 4 h (Burckhardt and Zimmermann, 2011; Hrabak et al., 2012; Hrabak et al., 2011).

La résistance acquise aux carbapénèmes de l'espèce *Acinetobacter baumannii* limite drastiquement les possibilités de traitements antibiotiques en cas d'infection par ce pathogène (Nordmann et al., 2011). Récemment, des isolats de cette espèce ont été inclus dans une étude de routine pour déterminer leur résistance aux carbapénèmes par spectrométrie de masse. La standardisation d'un protocole utilisant 1 mg/ml d'imipénème pour 2,5 10^{10} UFC/ml de bactéries et une heure d'incubation permettent d'observer sur le spectre différents types de carbapénèmases, grâce à l'observation de pics issus de l'hydrolyse des carbapénèmes (Alvarez-Buylla et al., 2013).

Dépistage des S. aureus résistants à la méticilline

Très rapidement, l'intérêt vis à vis du MALDI-TOF s'est porté sur la différenciation des souches de *S. aureus* sensibles à la méticiline (SASM) ou SARM. Dès les années 2000, des premiers travaux ont mis en évidence certains biomarqueurs spécifiques à l'une ou l'autre de ces souches (Du et al., 2002; Edwards-Jones et al., 2000), sans qu'il soit pour autant possible de mettre en évidence un profil spectral totalement spécifique des SARM. C'est surtout la comparaison de différents clusters qui a montré la possibilité de distinguer les SASM et les SARM (cf chapitre « comparaison de souches »).

Détection des entérocoques résistant à la vancomycine

Griffin et al. (2012) ont pu, grâce des pics spécifiques, différencier sur les spectres MALDI-TOF des souches d'*Enterococcus faecium* porteuses du gène VanB responsable de la résistance aux glycopeptides, en comparaison avec des souches ne possédant pas ce gène.

D. Nature des biomarqueurs d'intérêt à partir d'un spectre de masse bactérien

1. Composition en protéines de la bactérie

Les protéines représentent 55% des composés organiques de la masse sèche d'une bactérie. Elles sont principalement retrouvées dans la membrane cytoplasmique ainsi que dans le cytosol. La membrane cytoplasmique est constituée d'une double couche d'unités de phospholipides (35%) et de protéines qui lui sont associées (65%) (Figure 9).

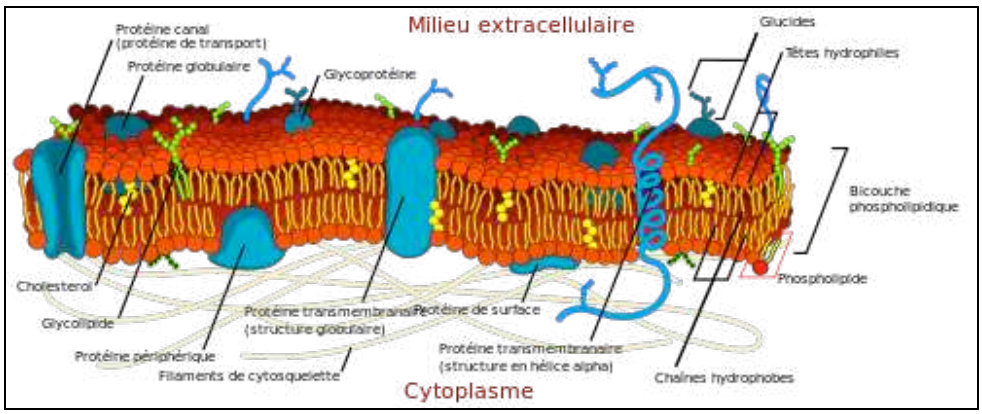


Figure 9 : **membrane cytoplasmique d'une bactérie**

Le cytoplasme bactérien est particulièrement riche en ribosomes (environ 15 000 par bactérie), constitués de protéines et d'ARN, représentant 40% du poids sec de la bactérie. Ils sont composés de deux sous unités : une petite et une grande. La grande sous-unité est caractérisée par un coefficient de sédimentation de 50S, composée d'ARN 23S (2 300 nucléotides), d'ARN 5S (120 nucléotides) et de 34 protéines dénommées protéines L pour « Large » numérotées de L1 à L36 (les L7 et L12 sont identiques; la L8 appartient à un complexe L7/L12 et L10 et n'est jamais isolée). La petite sous unité, de coefficient de sédimentation 30S, est constituée d'ARN 16S (1 540 nucléotides) et de 21 protéines notées protéines S comme « Small », numérotées de S1 à S21 (Figure 10).

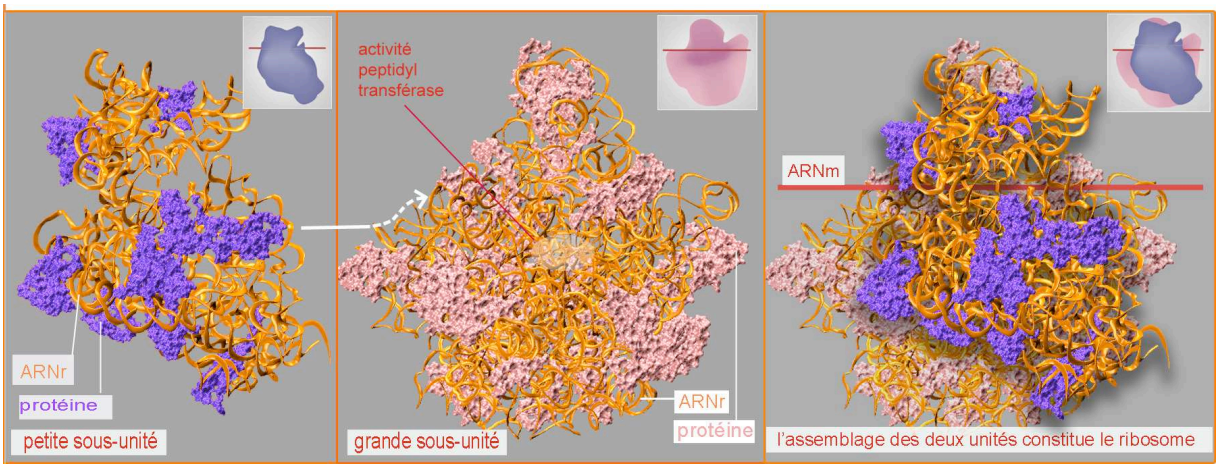


Figure 10 : **représentation des 2 sous unités ribosomales et d'une bactérie et d'un ribosome bactérien.**

Les protéines ribosomales sont en violet dans la petite sous unité et en rose dans la grande sous unité. Les ARNr sont en orange.

2. Nature des pics du spectre

De nombreuses équipes ont montré que les molécules détectées au delà de 4 kDa étaient des protéines (Arnold et al., 1999; Dai et al., 1999; Holland et al., 1999; Ryzhov and Fenselau, 2001). La plupart ont une masse inférieure à 15 kDa. Ryzhov et al. (2001), par une approche bio-informatique, ont remarqué que les molécules d'*E. coli* détectées par MALDI correspondaient à un grand nombre de protéines bactériennes cytosoliques, de nature basique. La moitié des pics des spectres bactériens correspondent à des protéines ribosomales basiques, donc pouvant s'ioniser efficacement, expliquant leur abondance sur le spectre (Krause et al., 1999). De plus, la lyse des cellules bactériennes dans des solvants organiques en atmosphère acide, associée au choix d'une matrice spécifique, favorise l'ionisation préférentielle des protéines ribosomales (Suh and Limbach, 2004). D'autres types de protéines ont été mises en évidence en abondance sur les spectres MALDI-TOF, comme les des « DNA-binding proteins », les protéines de choc thermique (cold shock-proteins) (Ryzhov and Fenselau, 2001; Holland et al., 1999; Fenselau et al., 2001). Au total, la plupart des spectres MALDI-TOF sont composés de protéines très conservées, peu affectées par les conditions environnementales, faisant de la technique MALDI-TOF un bon candidat à l'identification de routine des bactéries.

3. Méthodes utilisées pour l'identification des biomarqueurs

Cette identification peut être réalisée par deux méthodes de protéomique: « top down » et « bottom up » (Figure 11).

3.1 Protéomique *Top Down*

A partir d'une bactérie intacte, une séparation des protéines est réalisée puis chaque protéine est analysée par spectrométrie de masse grâce au système MS/MS. Grâce à la connaissance du protéome d'une espèce ou d'une souche bactérienne donnée, il est possible d'identifier cette protéine par concordance entre le m/*z* du pic et la masse moléculaire de la protéine. L'existence de banques de données protéiques accessibles par internet permet, en effet, de rechercher par leur masse moléculaire toutes les protéines connues d'une espèce bactérienne donnée (Pineda et al., 2000). De plus, cette approche pourrait permettre la mise en évidence de facteurs de virulence (Fagerquist et al., 2010) ou la détection de toxines (Lay, 2001). Cependant, cette stratégie a l'inconvénient de ne pas tenir compte des modifications post traductionnelles visibles en spectrométrie de masse. De plus, une variation de masse trop importante sur le spectre rend difficile une corrélation entre le génome et le biomarqueur (Demirev, 2004). Par ailleurs, les bases de données sont incomplètes car toutes les espèces bactériennes ne sont pas entièrement séquencées.

3.2 Protéomique *Bottom Up*

Cette technique a été utilisée dans mon travail pour l'identification des biomarqueurs.
A partir d'une bactérie intacte, une digestion enzymatique par la trypsine est réalisée, puis les peptides obtenus sont analysés par LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry). La résolution obtenue par cette technique permet de déterminer la masse exacte des peptides de nos protéines d'intérêt.
La cartographie peptidique ou Peptide Mass Fingerprint permet alors de comparer ces masses avec celles issues de la digestion virtuelle des protéines contenues dans les banques de données, aboutissant ainsi à l'identification des protéines. Cette approche requiert les mêmes exigences que l'approche Top Down concernant l'utilisation des bases de données.

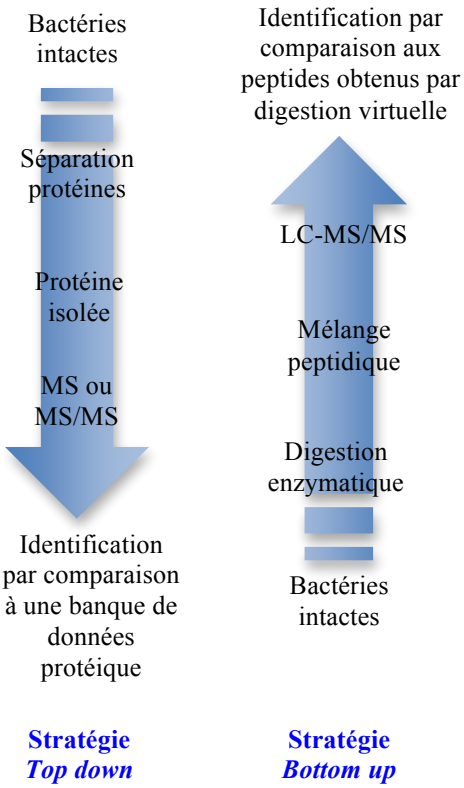


Figure 11 : principe des stratégies *Top down* et *Bottom up* utilisées pour l'identification de biomarqueurs

E. Comparaison des souches au sein d'une espèce bactérienne : vers l'utilisation du MALDI-TOF

La comparaison des souches au sein d'une même espèce est utilisée depuis longtemps soit à des fins épidémiologiques au niveau d'une population, soit pour faciliter la gestion des épidémies hospitalières, soit pour aider à la distinction de souches isolées chez un même patient (distinction entre réinfection et rechute par exemple). Les techniques de comparaison disponibles actuellement sont lourdes et longues à mettre en œuvre, incitant à réfléchir sur l'exploitation de la technologie MALDI-TOF pour les remplacer.

1. Principaux outils de comparaison de souches

Plusieurs outils basés sur l'étude de l'ADN sont utilisables dans les laboratoires de bactériologie.

1.1 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La macrorestriction génomique par électrophorèse en champ pulsé consiste en l'analyse complète du chromosome bactérien. L'ADN génomique extrait dans une matrice d'agarose est coupé par une ou plusieurs enzymes de restriction. Les fragments obtenus sont séparés par l'application de deux champs électriques orientés suivant des angles différents et activés alternativement. L'interprétation repose sur le nombre de fragments discordants, permettant de classer les souches selon une probabilité décroissante de lien épidémiologique (Struelens, 1996).
Cette technique a l'avantage d'avoir un fort pouvoir discriminant et d'être applicable à toutes les espèces bactériennes. Cependant, elle reste relativement lourde et délicate, nécessitant un équipement spécialisé et un personnel formé. La reproductibilité inter laboratoire est faisable, mais nécessite des conditions expérimentales très strictes.

1.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

L'ADN total de la bactérie est coupé par des endonucléases de restriction possédant des sites de coupures fréquents. Les fragments obtenus sont transférés sur une membrane par Southern-blot permettant ainsi d'obtenir un « profil de restriction ». Cependant le nombre de fragments

générés est souvent très élevé et l'interprétation est donc délicate.

1.3 Amplification aléatoire

Simultanément décrite par Williams et al. (1990) sous le terme AP-PCR (*Arbitrary-Primed Polymérase Chain Reaction*) et par Welsh et al. (1995) sous le nom de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), l'amplification aléatoire est une méthode d'étude du polymorphisme génétique après amplification d'une ou plusieurs séquences génomique par PCR, ne nécessitant pas la connaissance préalable du génome que l'on souhaite étudier. La production d'amplicons d'intensité et de longueur variables donne des profils de bandes caractéristiques de l'ADN cible. Le caractère aléatoire de l'amplification est dû au fait que les températures d'hybridation sont suffisamment basses pour permettre l'accrochage non stringent des amorces. Cette méthode est simple et rapide, utilisable dans les laboratoires hospitaliers de routine, mais a comme inconvénient d'être peu reproductible, non seulement d'un laboratoire à un autre mais aussi d'un jour à l'autre au sein du même laboratoire.

Il est possible de choisir des séquences plus spécifiques du génome bactérien. Par exemple, on peut utiliser les séquences REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) (Versalovic et al., 1991) ou ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) (Hulton et al., 1991) qui sont des séquences conservées présentes chez les entérobactéries ainsi que chez d'autres espèces bactériennes (*Pseudomonas*, *Legionella*…) et dont les fonctions sont inconnues. Ces PCR moins aléatoires présentent des profils plus simples à comparer et à interpréter.

Les inter-espaces séparant les gènes codant pour l'ARN ribosomal comprennent un nombre variable de gènes qui codent pour les ARN de transfert, et des ADN non codants. Ces régions sont composées de zones très conservées et d'autres hypervariables. La PCR ribotyping ou ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) utilise des amorces spécifiques des régions conservées des gènes codant pour l'ARN 16S et l'ARN 23S permettant d'amplifier l'inter-espace 16S/23S (Schumann and Pukall, 2013). L'interprétation est aisée et la technique reproductible.

1.4 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Cette technique consiste en l'amplification par PCR de fragments obtenus après digestion totale de l'ADN par deux enzymes de restriction. Cette double restriction ainsi que la PCR à forte stringence en font une méthode ayant un grand pouvoir de résolution et une bonne

reproductibilité. Elle a comme avantage de combiner le pouvoir discriminant des méthodes d'étude du polymorphisme de restriction (RFLP) à la flexibilité des méthodes basées sur la PCR.

1.5 Multi Locus Variable number tandem repeats Analysis (MLVA ou VTRN)

L'analyse MLVA examine le polymorphisme de plusieurs loci comprenant un nombre variable de régions répétées en tandem. La méthode consiste à amplifier avec une ou plusieurs PCR(s) multiplex ces régions répétées. L'analyse de la taille des différents VTRN permet l'assignation à un profil allélique ou à un code numérique MLVA. L'analyse est très discriminante pour les bactéries possédant un génome très conservé comme *M. tuberculosis* ou *B. anthracis* (Keim et al., 2004).

1.6 Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

L'accumulation récente de séquences de gènes ou de génomes bactériens ainsi que des données de variations intra-espèces pour différents gènes a permis le développement du typage bactérien basé sur la détection de mutations ponctuelles. Cette technique consiste à identifier des centaines voire des milliers de SNPs à l'intérieur d'une espèce bactérienne. Cette recherche peut être réalisée de deux façons : hybridation de sondes binaires (oligotypie) ou par hybridation sur puce à ADN. Les résultats de type binaire sont représentés par un signal d'hybridation positif ou négatif avec chaque sonde. Cette technique est très reproductible, aisément lisible et échangeable (van Leeuwen et al., 2002). Les puces à ADN possèdent plusieurs milliers de sondes nucléotidiques différentes synthétisées *in situ* permettant ainsi l'analyse instantanée d'autant de marqueurs. Elles permettent un typage définitif et reproductible, mais sont très onéreuses.

1.7 Séquençage nucléotidique

Le Multi Locus Sequence Typing (MLST) repose sur le séquençage direct de gènes « conservés » ou « gènes de ménage ». Ces gènes sont dits « conservés » car les seules variations possibles sont dues à des mutations ponctuelles ou des recombinaisons neutres. L'analyse du polymorphisme de six à dix gènes de ménage définit l'appartenance de chaque souche à un sequence type (ST). Le principe repose sur le fait que la combinaison des allèles des différents gènes analysés est unique pour une souche donnée (Maiden et al., 1998). Les

profils alléliques de souches ayant déjà été typées, ainsi que leurs caractéristiques (origine, nature du prélèvement, sérotype…) sont centralisés sur le site http://www.mlst.net. Le profil obtenu après séquençage des différents gènes d'intérêt pour une souche donnée peut être comparé à la banque de données pour obtenir son ST. Les différents ST peuvent être regroupés en complexes clonaux (CC). Un complexe clonal est défini comme un groupe de ST qui partagent au moins quatre allèles sur sept avec un ST central. Le ST central est le génotype ancestral supposé, dont les autres ST découlent (Brehony et al., 2007). Reposant sur des PCR et du séquençage, il n'y a aucune variabilité inter-laboratoires. Toutefois le MLST n'est pas applicable aux espèces génétiquement homogènes.

Avec l'arrivée des séquenceurs haut débit, il est possible de réaliser le séquençage complet de plusieurs bactéries en même temps. Il est aussi possible de détecter la présence de gène de résistance et de typer simultanément les bactéries avec les gènes de ménage utilisés en MLST (Reuter et al., 2013). Cette technique présente l'avantage de ne réaliser qu'une analyse au lieu de plusieurs (antibiogramme, recherche de résistance, typage…). Cependant le coût de cette nouvelle technologie reste très élevé.

2. Comparaison de souches et MALDI-TOF

A côté de l'identification d'espèce, la possibilité de différencier les bactéries au niveau de la sous-espèce, du sérotype, du biotype ou de la souche a été explorée par de nombreuses équipes. Un nombre assez limité de biomarqueurs (cinq à dix pics) sont requis pour aboutir à un diagnostic d'espèce, alors qu'il faut, pour obtenir un diagnostic au niveau de la sous-espèce ou de la souche, soit un nombre beaucoup plus important de pics reproductibles que ceux requis pour l'identification d'espèce, soit l'existence d'un ou de quelques pics spécifiques d'une sous-espèce ou d'un sérotype donné.

2.1 Différenciation au niveau du sérotype, du biotype, de la sous-espèce

Le logiciel Andromas® permet de différencier sur bactéries intactes les espèces phylogénétiquement très proches (anciennement genomovars) du groupe *B. cepacia* grâce à des pics discriminants (Degand et al., 2008). Basé sur une combinaison de biomarqueurs de genre, d'espèces, de sous-espèces et de sérotypes, Dieckmann and Malorny (2011) ont développé un algorithme pour l'identification rapide des cinq sérotypes de *Salmonella enterica* les plus fréquemment isolés : Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Infantis et Hadar.

Certains ions ont également été identifiés pour différencier d'autres sérotypes épidémiologiquement intéressants, tels que Choleraesuis, Heidelberg et Gallinarum. Les souches pathogènes de *Y. enterocolitica* sont habituellement distinguées des souches non pathogènes par biotypage et sérotypage. Stephan et al. (2011) ont inséré des spectres de référence de 19 *Y. enterocolitica* et 24 souches de *Yersinia* spp, appartenant à 11 espèces différentes dans la base de donnée Saramis®. Ils ont déterminé les biomarqueurs spécifiques d'espèces et de biotypes : 117 souches de différents biotypes de *Y. enterocolitica* ont été correctement identifiés par MALDI-TOF, sans extraction préalable. Barbuddhe et al. (2008) ont montré que la technique MALDI-TOF permettait non seulement d'identifier correctement 146 souches extraites de six espèces de *Listeria* différentes mais aussi de distinguer grâce à des pics discriminants tous les sérotypes de l'espèce *L. monocytogenes*. Pour Karger et al. (2011) la détermination des sérotypes d'*E. coli* producteurs de shiga-toxine est possible par la construction de spectres types représentant différents groupes de sérotypes. Le spectre type est créé en éliminant les masses peu discriminantes, selon la méthode de création des super-spectres de la base de données de Saramis®. Wang et al. (2012) ont montré la possibilité de différentier des souches extraites de *Streptococcus pyogenes* grâce à un algorithme proposé par le logiciel Biotyper®, en comparaison avec les protéines M de surface.

La connaissance des protéomes permet également de typer des souches, par exemple la présence de la protéine YahO permet de distinguer une souche *E. coli* O157:H7 d'une souche non O157:H7 (Fagerquist et al., 2010). Dernièrement, Clark et al. (2013) ont montré que la distinction du pathotype *E. coli* entérohémorragique (EHEC) était possible par MALDI-TOF MS. L'absence d'un biomarqueur spécifique dans les souches de *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* permet de les différencier des souches de *C. jejuni* subsp. *jejuni*. La réduction des nitrates habituellement utilisée pour différencier ces sous-espèces n'est donc plus utile (Fagerquist et al., 2006). Dans la même idée, la discrimination entre *Lactococcus lactis* subsp. *cremosis* et *L. lactis* subsp. *lactis*, difficilement distinguables phénotypiquement, est possible par MALDI-TOF MS par la mise en évidence d'une différence de poids moléculaire de trois protéines ribosomales (Tanigawa et al., 2010). Enfin, en observant trois sous espèces de *Bifidobacterium longum*, les auteurs ont pu mettre en évidence des biomarqueurs spécifiques à chacune d'entre elles (Sato et al., 2011). Il est important de noter que la grande majorité des identifications à un niveau plus fin que l'identification d'espèce sont obtenues à partir de cellules extraites.

2.2 Différenciation au niveau de la souche

2.2.1 Comparaison de souches dans un contexte épidémique

La comparaison de souches est utile en cas d'épidémie d'infections nosocomiales. En effet, la comparaison seule des antibiogrammes est souvent insuffisante. Le « gold standard » actuel pour la gestion des épidémies hospitalières reste l'électrophorèse en champs pulsé, qui est une méthode lourde (Goering, 2010).

En l'absence de biomarqueur spécifique, la différenciation des souches d'une même espèce par MALDI-TOF doit passer par des algorithmes utilisant la présence de plusieurs pics reproductibles. Ce typage requiert une préparation de l'échantillon et une analyse beaucoup plus standardisées que celles utilisées pour le diagnostic d'espèce (Murray, 2010). En effet, un spectre de bactérie intacte n'est jamais identique sur deux analyses successives en MALDI-TOF. Une optimisation et une standardisation de tous les paramètres s'avèrent indispensables, le but étant d'arriver à obtenir un nombre suffisant de pics reproductibles pouvant être comparés. Le choix de chaque paramètre analytique peut avoir une influence sur la distinction des isolats d'une même espèce : préparation de l'échantillon (intact ou après extraction), type de matrice, milieu de culture, etc. Une des limitations majeures de la technique de typage par MALDI-TOF est due aux algorithmes utilisés pour l'analyse des profils. Plusieurs coefficients de corrélation peuvent être utilisés pour distinguer le niveau de similarité de ces profils, qui ont un impact sur la reproductibilité et le pouvoir discriminant (Croxatto et al., 2012). Arnold and Reilly, (1998) ont été les premiers à avoir mis en place un algorithme mathématique pour comparer différentes souches, en utilisant l'espèce *E. coli* à partir de bactéries intactes. Ils ont montré ainsi des variations spécifiques à chaque souche. Récemment, des souches de pneumocoques, sans extraction préalable, ont pu être classés en fonction de leur appartenance ou non à une épidémie de conjonctivites grâce à des logiciels de traitement de données de spectres (Williamson et al., 2008). L'inconvénient de ces études de cluster est l'absence de gold standard.

Dans cette optique, certains auteurs ont voulu comparer les résultats de différenciation des souches par MALDI-TOF avec une méthode de génotypage utilisée comme gold standard. Arnold and Reilly ont utilisé leur algorithme décrit en 1998 pour analyser par spectrométrie de masse des souches de SARM, également comparés en PFGE. Les trois profils obtenus en PFGE ont été retrouvés sur les profils MALDI-TOF après analyse des spectres par cet algorithme, sans extraction préalable (Arnold et al., 2006). Cette bonne concordance PFGE/MALDI-TOF a également été retrouvée chez Jackson et al. (2005), sur extraits

bactériens. Fujinami et al. (2011) ont montré que les techniques MALDI-TOF MS et PFGE étaient équivalentes pour la différenciation des souches de légionelles extraites provenant de prélèvement d'eau. D'autres auteurs ont utilisé la MLST comme technique de référence. Certaines équipes ont réussi ainsi à classer par MALDI-TOF MS, sur des souches préparées avec le même protocole d'extraction que celui utilisé pour l'identification, les cinq grands complexes clonaux retrouvés dans les épidémies de SARM (Josten et al., 2013, Wolters et al., 2011). Lartigue et al. (2011) ont différencié par MALDI-TOF des souches extraites de *Streptococcus agalactiae* appartenant au séquence type « hyper virulent » ST-17 ou au nouveau clone émergent ST-1. Vasileuskaya-Schulz et al. (2011) ont montré une bonne corrélation entre leur méthode MLST pour la discrimination inter- et intra-espèces d'extraits de *Stenotrophomas* spp, et les résultats des analyses MALDI-TOF MS. Il en est de même pour la classification des phylotypes de *Propionibacterium acnes*, similaire par MLST ou par MALDI-TOF (Nagy et al., 2013).

En étudiant la source des épidémies à *E. coli* dues aux contaminations fécales de l'eau, Siegrist et al. (2007) ont recherché la provenance animale ou humaine de ces souches en les analysant par rep-PCR ainsi que par MALDI-TOF sur souches non extraites. Les résultats obtenus ont permis de les différencier de façon équivalente par l'une ou l'autre méthode. Les mêmes résultats de comparaison rep-PCR et MALDI-TOF ont été retrouvés dans deux épidémies concernant des souches d'*A. baumanii* multi-résistantes, et des souches de *Corynebacterium striatum* (Mencacci et al., 2013; Verroken et al., 2013). Verroken et al. (2013) précisent cependant que MALDI-TOF et rep-PCR sont des techniques moins discriminantes que le champ pulsé.

Ainsi, malgré le fait qu'elle soit plus complexe que l'identification d'espèce, il semble que la comparaison de souches par MALDI-TOF soit une alternative prometteuse aux méthodes de biologie moléculaire pour le sous-typage des bactéries, bien qu'une simplification accompagnée d'une standardisation soient nécessaires avant son utilisation en épidémiologie de routine.

2.2.2 Différenciation des souches en fonction de leur résistance aux antibiotiques

La technologie MALDI-TOF MS permet de déterminer dans certains cas la résistance des souches à certains antibiotiques grâce à des pics spécifiques (cf chapitre 5.6 « Détection de la résistance à certains antibiotiques »). En l'absence de marqueur spécifique, certaines équipes ont comparé les souches entre elles pour distinguer des clusters différents en fonction de leur résistance aux antibiotiques.

La possibilité de différencier des clones de SARM et de SASM a été montrée en comparant leurs profils PFGE à des profils MALDI-TOF sur protéines extraites par extraction chimique et sonication. Les spectres différaient d'un ion en fonction du clone identifié en PFGE (Bernardo et al., 2002). Cependant la notion de reproductibilité n'était pas évoquée. Dernièrement, l'analyse MALDI-TOF de 100 souches de *S. aureus* déposées sans extraction, (logiciel Biotyper®) a montré différents clusters pouvant correspondre à une distinction entre SASM et SARM respectivement dans 65,31% et 74,29% des cas (Wang et al., 2013).

D'autres auteurs ont réussi à distinguer des souches non extraites de *Bacteroides fragilis* exprimant le gène cfiA de résistance aux carbapénèmes des souches non porteuses de ce gène grâce à un algorithme (Nagy et al., 2011; Wybo et al., 2011).

Il semble cependant qu'à l'heure actuelle, le recul ne soit pas assez suffisant pour utiliser en routine la comparaison de clusters dans le but de dépister en temps réel une résistance aux antibiotiques.

Objectifs

L'identification bactérienne par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF est devenue incontournable dans les laboratoires de microbiologie clinique. Le délai de rendu du diagnostic d'espèce est en effet réduit en moyenne de 24 heures par comparaison aux méthodes phénotypiques, permettant la mise en place d'un traitement probabiliste plus adapté, puisque ciblé sur le profil de résistance de chaque espèce.

Dans la première partie de ma thèse, nous avons adapté la technique d'identification des bactéries et des levures par MALDI-TOF MS aux bouillons d'hémoculture. En effet, cette méthode, qui n'était pas encore utilisée à l'époque dans les laboratoires de microbiologie, nous paraissait séduisante puisqu'elle permettait potentiellement de pouvoir rendre un diagnostic d'espèce aux cliniciens de façon quasi immédiate afin de permettre une meilleure prise en charge de l'infection. Ce travail a permis de montrer qu'une simple lyse des hématies permettait d'obtenir très rapidement une identification d'espèce.

La deuxième partie de ma thèse a été consacrée à identifier la nature des biomarqueurs utilisés dans la base de données du logiciel Andromas® pour établir un diagnostic d'espèce. Contrairement aux méthodes phénotypiques, nous ne savions pas précisément sur quels biomarqueurs repose cette identification d'espèce. Pour cela, nous avons pris comme exemple la bactérie pathogène *N. meningitidis,* responsable essentiellement de méningite et de bactériémie, qui fait l'objet d'une des thématiques de l'unité Inserm à laquelle est rattaché notre laboratoire. La comparaison des résultats obtenus par la bioinformatique et la protéomique a permis de déterminer que la majorité des pics servant au diagnostic d'espèce sont des protéines ribosomales.

Ces travaux nous ont conduit à explorer dans un troisième temps **la possibilité de se servir de la technologie MALDI-TOF comme outil épidémiologique, en exploitant les variations des protéines ribosomales qui sont depuis longtemps utilisées dans les études d'épidémiologie moléculaire** (Matte-Tailliez et al., 2002; Roberts et al., 2008; Yutin et al., 2012). Sur 100 souches de *N. meningitidis*, Jolley et al. (2012) ont pu relier les ST et CC de ces souches aux variations des gènes codant pour les protéines ribosomales. Notre but a été de corréler ces résultats aux spectres MALDI observés pour ces souches. En effet, l'équipe de Hiroaki Sato avait déjà montré la bonne corrélation des profils de protéines ribosomales observés par MALDI-TOF avec les profils du gène de la sous unité du gène gyrase B (gyrB) sur l'espèce *Pseudomonas putida* ainsi que sur les espèces *B. longum* et *Rhodococcus erythropolis* (Sato et al., 2011; Teramoto et al., 2009; Teramoto et al., 2007). Nous avons d'abord tenté d'observer les variations de protéines ribosomales directement sur la fenêtre de lecture utilisée pour le diagnostic d'espèce et sans extraction préalable, puis nous avons étudié

les spectres obtenus après purification des ribosomes et adaptation de la technique d'analyse des profils. Enfin, la dernière partie de notre travail, qui est encore en cours, a été d'exploiter **le caractère invariable de certaines protéines ribosomales visibles directement sur le spectre de masse, en recherchant celles qui pourraient aider au diagnostic d'espèces très proches**, comme les streptocoques du groupe *mitis*, ce qui permettrait de disposer d'un diagnostic rapide et fiable de *S. pneumoniae*.

Résultats

A. Real-Time Identification of Bacteria and *Candida* Species in Positive Blood Culture Broths by MALDI-TOF MS

Agnès Ferroni, **Stéphanie Suarez**, Jean-Luc Beretti, Brunhilde Dauphin, Emmanuelle Bille, Julie Meyer, Marie-Elisabeth Bougnoux, Alexandre Alanio, Patrick Berche and Xavier Nassif

Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48 (5) : 1542-1548

Les hémocultures sont le diagnostic de référence des bactériémies ou des fongémies. La prise en charge des hémocultures positives a longtemps été basée sur l'examen direct (état frais et coloration de Gram) et sur l'identification biochimique à partir des colonies isolées du bouillon d'hémoculture. Le diagnostic d'espèce ne peut ainsi être disponible que 18 à 24 h après la positivité du prélèvement, entraînant un retard de prescription d'une antibiothérapie adéquate avant les résultats définitifs de l'antibiogramme, avec des répercussions négatives en termes de prise en charge du patient. Pour raccourcir le délai d'identification des micro-organismes, différentes méthodes ont été proposées. Les systèmes automatisés dans lesquels les bouillons positifs d'hémoculture sont inoculés ont des performances très moyennes et un délai de réponse qui reste long (minimum quatre heures). De nombreuses approches moléculaires ont été décrites pour identifier les bactéries dans les flacons d'hémoculture positifs (hybridation in situ, PCR multiplex avec révélation par sondes fluorescentes...), mais elles sont onéreuses, ne peuvent cibler qu'un panel de micro-organismes, et nécessitent plusieurs heures pour leur mise en œuvre.

L'utilisation récente de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification des germes à partir de colonies nous a fait supposer que cette technologie pourrait être applicable directement sur les bouillons d'hémoculture positifs, permettant de rendre un diagnostic d'espèce aux cliniciens de façon quasi immédiate afin de permettre une antibiothérapie plus ciblée.

Nous avons donc développé une stratégie permettant de raccourcir au maximum le délai de manipulation. Elle comporte l'utilisation d'un détergent membranaire qui perméabilise la paroi des hématies mais pas celle des bactéries, ce qui permet leur récupération après une courte centrifugation.

Dans un premier temps, des flacons ont été ensemencés avec des bactéries fréquemment isolées dans les septicémies. Par la suite, les bouillons d'hémocultures ainsi que d'autres fluides de patients enrichis dans ces mêmes bouillons (liquide articulaire, liquide de dialyse…), ont été testés en aveugle après leur signal de positivité, puis comparés aux résultats du diagnostic traditionnel.

Notre technique a permis de faire une identification au niveau de l'espèce dans 90% des cas dans les 20 minutes après le signal de positivité du flacon.

Ce diagnostic rapide et fiable permet d'améliorer la prise en charge des malades puisque l'antibiothérapie probabiliste repose maintenant sur un diagnostic d'espèce et non uniquement sur l'aspect au Gram. Celui-ci est cependant toujours indispensable car un diagnostic fiable des hémocultures polymicrobiennes n'est pas réalisable en spectrométrie de masse.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2010, p. 1542–1548 Vol. 48, No. 5
0095-1137/10/$12.00 doi:10.1128/JCM.02485-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Real-Time Identification of Bacteria and *Candida* Species in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry▽

Agnès Ferroni,[1]* Stéphanie Suarez,[1] Jean-Luc Beretti,[1] Brunhilde Dauphin,[2] Emmanuelle Bille,[1,3] Julie Meyer,[3] Marie-Elisabeth Bougnoux,[1,3] Alexandre Alanio,[1] Patrick Berche,[1,3] and Xavier Nassif[1,3]

Laboratoire de Microbiologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France[1]; Andromas SAS, 156 Rue de Vaugirard, Paris, France[2]; and Université René Descartes Paris 5, Faculté de Médecine, Site Necker, 156 Rue de Vaugirard, Paris, France[3]

Received 22 December 2009/Returned for modification 26 January 2010/Accepted 4 March 2010

Delays in the identification of microorganisms are a barrier to the establishment of adequate empirical antibiotic therapy of bacteremia. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF–MS) allows the identification of microorganisms directly from colonies within minutes. In this study, we have adapted and tested this technology for use with blood culture broths, thus allowing identification in less than 30 min once the blood culture is detected as positive. Our method is based on the selective recovery of bacteria by adding a detergent that solubilizes blood cells but not microbial membranes. Microorganisms are then extracted by centrifugation and analyzed by MALDI-TOF–MS. This strategy was first tested by inoculating various bacterial and fungal species into negative blood culture bottles. We then tested positive patient blood or fluid samples grown in blood culture bottles, and the results obtained by MALDI-TOF–MS were compared with those obtained using conventional strategies. Three hundred twelve spiked bottles and 434 positive cultures from patients were analyzed. Among monomicrobial fluids, MALDI-TOF–MS allowed a reliable identification at the species, group, and genus/family level in 91%, 5%, and 2% of cases, respectively, in 20 min. In only 2% of these samples, MALDI-TOF MS did not yield any result. When blood cultures were multibacterial, identification was improved by using specific databases based on the Gram staining results. MALDI-TOF–MS is currently the fastest technique to accurately identify microorganisms grown in positive blood culture broths.

Blood cultures in liquid medium are the gold standard for the diagnosis of bloodstream infections. Species identification of bacteria that have grown in this biological fluid first requires an overnight subculture on solid agar medium, thus delaying the precise identification of the bacteria by 24 to 48 h. For bacteremic patients, this requirement prevents the rapid prescription of an adequate empirical anti-infective therapy prior to obtaining the results of the antibiotic sensitivity testing. This empirical therapy may be roughly adjusted on the basis of the Gram staining. However, these microscopic results are not accurate enough to reduce the patient's exposure to ineffective antibiotic therapy. In order to reduce the time required for the identification of microorganisms in blood cultures, various methods have been proposed, including identification using automated systems into which fluids from positive blood cultures are directly inoculated, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), and PCR followed by sequencing, hybridization, pyrosequencing, or single-stranded conformation polymorphism. All these methods are expensive and require several hours (2, 4, 7–9, 12–15, 17–24, 26, 28, 29).

Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF–MS) allows rapid identification of bacteria grown on solid media by the identification of species-specific profiles obtained from isolated colonies (3, 5, 25). The adaptation of this technology to the identification of pathogenic microorganisms grown in biological fluids would provide immediate species identification. The advantages of this technique, in addition to its rapidity, are the moderate cost and the ease of implementation. Two recent studies have shown the advantages of MALDI-TOF mass spectrometry applied to positive blood cultures. Correct bacterial identification was obtained in less than 80% of the positive blood cultures and needed several centrifugations, making it difficult to perform the technique each time a blood culture is detected as positive (16, 27). We have developed a strategy where bacteria are released in one step by using a mild detergent that solubilizes blood cells but not bacterial membranes. In this work, we demonstrate the ability of this strategy to identify bacteria from positive blood culture broths in minutes with a good sensitivity.

MATERIALS AND METHODS

Blood and fluid cultures. The preliminary tests used negative blood culture flasks without charcoal (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). They were artificially contaminated with 10^4 cells of commonly isolated pathogens (Table 1) and then placed in the automated blood culture apparatus BacT/Alert (bioMerieux) until detection of positivity. In addition, different pathological fluids from patients were tested, including positive blood cultures (Tables 2 and 3) and different fluids spiked into blood culture flasks (Table 4).

Two aliquots were taken from the blood culture bottle. The first aliquot was taken for MALDI-TOF–MS processing. The second was used for Gram staining, antibiotic susceptibility testing, and appropriate subcultures for microbiological

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France. Phone: 33 1 44 49 49 62. Fax: 33 1 44 49 49 60. E-mail: agnes.ferroni@nck.aphp.fr.

▽ Published ahead of print on 17 March 2010.

TABLE 1. Microbiological identification by MALDI-TOF–MS in blood cultures spiked with different species

Identification obtained from subculture (biochemical or molecular techniques)	No. of samples:					
	Tested	With identification by MALDI-TOF–MS to:				With unacceptable MALDI-TOF–MS profile(s)
		Species	Group[a]	Genus	Family	
Staphylococcus species						
S. aureus	42	42				
S. epidermidis	7	7				
S. haemolyticus	7	6	1 (CNS group)			
S. hominis	3	3				
S. warneri	5	5				
S. lugdunensis	2	2				
Micrococcus luteus	5	3	1 (CNS group)		1	
Streptococcus species						
S. mitis	6		6 (*S. pneumoniae*/*S. mitis* group)			
S. pneumoniae	6		6 (*S. pneumoniae*/*S. mitis* group)			
S. gordonii	4		4 (oral *Streptococcus* group)			
Enterococcus faecalis	14	14				
Gram-negative nonfermenting bacilli						
Pseudomonas aeruginosa	39	38			1	
Stenotrophomonas maltophilia	20	18				2
Acinetobacter baumannii	15	15				
Enterobacteriaceae						
Escherichia coli	20	19				1
Enterobacter cloacae	18	13			5	
Citrobacter freundii	16	14			1	1
Klebsiella oxytoca	17	17				
Klebsiella pneumoniae	20	18	1 (KES group)			1
Proteus mirabilis	18	17		1		
Haemophilus influenzae	2	2				
Anaerobic bacteria						
Clostridium perfringens	2	2				
Fusobacterium necrophorum	3	3				
Bacteroides fragilis	1	1				
Candida albicans	10	10				
Other *Candida* species	10	10				
Total	312	279	19	1	8	5

[a] CNS group, coagulase-negative *Staphylococcus*; *S. pneumoniae*/*S. mitis* group, no differentiation between *S. pneumoniae* and *S. mitis*; oral *Streptococcus* group, includes all oral species of streptococci except the *S. milleri* group; KES group, no identification between the species *K. pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* (KES, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*).

identification using conventional microbiological techniques. It should be pointed out that a precise identification among the group of oral streptococci is difficult to achieve with MALDI-TOF–MS; a Slidex pneumo-kit test (bioMérieux) was therefore performed on blood culture supernatant of the centrifuged positive blood culture fluid for either blood culture flasks spiked with *Streptococcus mitis* or *Streptococcus pneumoniae* or positive blood cultures identified as *S. pneumoniae* or *S. mitis* by MALDI-TOF–MS.

MALDI-TOF–MS. Two hundred microliters of the positive blood culture broth (or 1 ml of enrichment liquids) was transferred into a plastic tube containing 40 μl (or 200 μl for enrichment liquids) of a solution of 5% saponin to release intracellular bacteria. After 5 min of incubation at room temperature, distilled water was added up to 1.5 ml and 2 consecutive washes in distilled water were performed at 16,600 × *g* for 1 min. The supernatant was discarded, and 5 μl (or 30 μl for enrichment liquids) of 10% trifluoroacetic acid was added to the pellet. One microliter of this mixture was spotted (2 wells/sample) onto a MALDI sample target (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and allowed to dry at room temperature. One microliter of absolute ethanol was then added to each well, and the mixture was allowed to dry. One μl of DHB matrix solution (80 mg/ml 2,5-dihydroxybenzoic acid, 30% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid) was then added and allowed to cocrystallize with the sample. Samples were processed in a MALDI-TOF–MS spectrometer (Microflex; Bruker Daltonics) with Flex Control software (Bruker Daltonics). Positive ions were extracted with an accelerating voltage of 20 kV in linear mode. Each spectrum was the sum of the ions obtained from 400 laser shots performed automatically on different regions of the same well. The spectra were analyzed in an *m*/*z* range of 3,640 to 20,000 and compared with those of a reference database (Andromas, Paris, France). This database has been engineered as previously described and encompasses the pathogens encountered in human pathology (3, 5). The identification of the tested strain corresponds to the species of the reference strain having the best match in the database. The analysis also takes into account the difference between the first two species having the best matches with the reference database. The species identification was considered to be valid if, for one of the two sample deposits, the percentage of matched peaks was at least 60% of that of the first species proposed in the database after analysis by the Andromas software and if the difference between the first two species having the best match in the database is at least 10%. If the latter condition was not fulfilled, the identification

TABLE 2. Direct bacterial identification by MALDI-TOF–MS in monobacterial blood cultures from patients

Identification obtained from subculture (biochemical or molecular techniques)	No. of samples:					
	Tested	With identification by MALDI-TOF–MS to:				With unacceptable MALDI-TOF–MS profiles
		Species	Group[a]	Genus	Family	
Staphylococcus species						
S. epidermidis	121	118	3 (CNS group)			
S. haemolyticus	3	3				
S. hominis	20	20				
S. pasteuri	1	1				
S. capitis	3	2	1 (CNS group)			
S. aureus	43	42				1
S. lugdunensis	1	1				
Micrococcus luteus	1	1				
Streptococcus species						
S. pyogenes	8	5	3 (*S. pyogenes*/*S. dysgalactiae*group)			
S. mitis	8		8 (*S. pneumoniae*/*S. mitis* group)			
S. pneumoniae	1		1 (*S. pneumoniae*/*S. mitis* group)			
S. gordonii	1		1 (oral *Streptococcus* group)			
S. pasteurianus	1					1
S. salivarius	1		1 (oral *Streptococcus* group)			
S. oralis	2	2				
Enterococcus faecalis	6	3		2	1	
Enterococcus faecium	2	1			1	
Gram-negative nonfermenting bacilli						
Pseudomonas aeruginosa	20	17				3
Stenotrophomonas maltophilia	4	4				
Achromobacter xylosoxydans	2	2				
Burkholderia cenocepacia	1		1 (*B. cepacia*/*B. cenocepacia* group)			
Pseudomonas oryzihabitans	1	1				
Enterobacteriaceae						
Escherichia coli	41	40				1
Enterobacter cloacae	24	24				
Citrobacter freundii	9	6			1	2
Enterobacter aerogenes	7	5	1 (KES group)		1	
Klebsiella oxytoca	6	6				
Klebsiella pneumoniae	10	10				
Proteus mirabilis	8	8				
Serratia marcescens	2	2				
Salmonella enterica	3	3				
Haemophilus influenzae	1	1				
Candida albicans	11	11				
Total	373	339	20	2	4	8

[a] CNS group, coagulase-negative *Staphylococcus*; *S. pyogenes*/*S. dysgalactiae* group, no differentiation between *S. pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae*; *S. pneumoniae*/*S. mitis* group, no differentiation between *S. pneumoniae* and *S. mitis*; oral *Streptococcus* group, includes all oral species of streptococci except the *S. milleri* group; *B. cepacia*/*B. cenocepacia*, no differentiation between *B. cepacia* and *B. cenocepacia*; KES group, no differentiation between the species *K. pneumoniae* and *E. aerogenes* (KES, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia*).

was considered to be correct at the level of the group/genus/family if the first two matches belonged to the same group/genus/family of bacteria. In all other cases, the results were considered irrelevant. It should be pointed out that most unreliable identifications were due to poor quality spectra. When the blood cultures contained several bacterial species as seen by Gram staining, databases specific for Gram-negative bacilli and/or Gram-positive cocci were used.

RESULTS

Identification of germs spiked into blood culture flasks. In order to determine whether an accurate identification of pathogens could be obtained from bacteria grown in liquid medium, pilot experiments were first performed using blood culture bottles spiked with commonly isolated pathogens. Figure 1 shows an example of a spectrum obtained with *Escherichia coli* grown in a blood culture bottle compared to the spectrum of the same strain obtained from an isolated colony. A total of 292 bacterial strains and 20 *Candida* species were spiked into blood culture bottles. The results are shown in Table 1. Of the 307 interpretable spectra (98%), MALDI-TOF–MS allowed a good identification at the species, group,

TABLE 3. Direct identification by MALDI-TOF–MS in blood cultures containing ≥2 germs

Bacterial type(s) found by Gram stain	Microorganism(s) isolated	No. of cultures	Identification[a] using:		
			General database	Gram-negative bacillus database	Gram-positive coccus database
Gram-positive cocci and Gram-negative bacilli	*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*	1	*E. coli*	*E. coli*	*Enterococcus faecalis*
	Acinetobacter baumannii, *S. mitis*	2	*A. baumannii*	*A. baumannii*	*Streptococcus pneumoniae*/*Streptococcus mitis* group
	E. faecalis, *E. coli*	1	*E. faecalis*	0	*E. faecalis*
	Staphylococcus aureus, *Proteus mirabilis*	4	*S. aureus* (4/4)	*P. mirabilis* (2/4)	*S. aureus* (4/4)
	Pseudomonas aeruginosa, *S. epidermidis*	1	*P. aeruginosa*/*S. epidermidis*	*P. aeruginosa*	*S. epidermidis*
Gram-negative bacilli	*E. coli*, *Morganella morganii*	1	*E. coli*	*E. coli*	NA
	E. coli, *Klebsiella pneumoniae*	1	*E. coli*	*E. coli*	NA
	E. coli, *Proteus mirabilis*	1	*E. coli*	*E. coli*	NA
	K. pneumoniae, *E. cloacae*	1	KES	KES	NA
Gram-positive cocci	*E. faecalis*, *S. aureus*	1	*E. faecalis*	NA	*E. faecalis*
	Staphylococcus haemolyticus, *Staphylococcus hominis*	1	*S. hominis*	NA	*S. hominis*

[a] KES, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group; NA, not applicable.

genus, and family level in 89%, 6%, 0.4% and 2.6% of cases, respectively. It should be pointed out that MALDI-TOF–MS allowed the differentiation of coagulase-negative staphylococci (CNS) from *Staphylococcus aureus* in 100% of cases. As already mentioned, precise identification among the group of oral streptococci by MALDI-TOF–MS remained difficult, and bacteria belonging to this group were subjected to a Slidex pneumo-kit test. Among the 12 *S. pneumoniae*/*S. mitis* strains spiked into blood culture bottles, only the *S. pneumoniae* strains were positive with the Slidex pneumo-kit test.

Identification of microbes in positive blood cultures from patients. Among the 388 positive blood cultures included in this study, 373 were monomicrobial (Table 2). Using MALDI-TOF–MS as described in Materials and Methods or a Slidex pneumo-kit test when the MALDI-TOF–MS identification was consistent with either *S. pneumoniae* or *S. mitis*, an interpretable identification was obtained in 98% of cases. These results were concordant with those obtained by classical methods at the species, group, and genus/family levels in 91%, 5%, and 2% of cases, respectively.

In addition, 15 patient blood cultures containing mixed bacteria were tested (Table 3). Using the database, either only one of the pathogens present in the mixture was detected or two pathogens were detected at the same score. When Gram-pos-

TABLE 4. Direct bacterial identification by MALDI-TOF–MS in enrichment cultures from patients

Source(s) of fluid sample(s) and identification obtained from subculture (biochemical or molecular techniques)	No. of samples:			
	Tested	Identified by MALDI-TOF–MS to:		
		Species	Group[a]	Genus
Graft conservation liquid				
E. coli	3	2	1 (*Shigella*/*E. coli*)	
Hafnia alvei	2	2		
Staphylococcus epidermidis	7	7		
Staphylococcus warneri	2	2		
Staphylococcus cohnii	1	1		
Articular fluid, bone puncture, deep abscess				
Staphylococcus aureus	16	16		
Staphylococcus epidermidis	5	5		
Staphylococcus capitis	1	1		
Staphylococcus lugdunensis	1	1		
E. coli	4	4		
Enterobacter cloacae	1	0		1
Pseudomonas aeruginosa	2	2		
Streptococcus pyogenes	1	1		
Total	46	44	1	1

[a] *Shigella*/*E. coli*, no differentiation between *Shigella* sp. and *E. coli.*

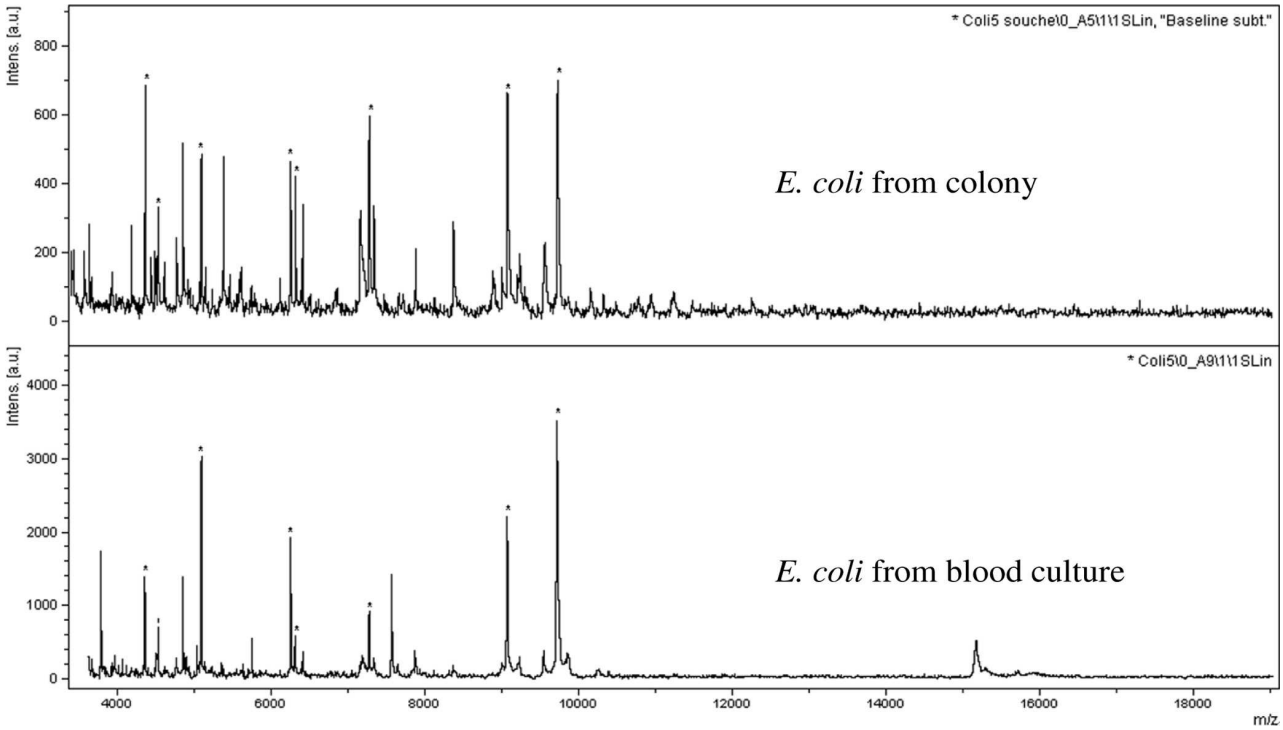


FIG. 1. Spectral profiles of the same strain of *Escherichia coli* obtained from blood culture (bottom) and from one isolated colony (top). Peaks in common between the two spectra are marked by asterisks. These peaks are specific to *E. coli*. Intens., intensity; a.u., arbitrary unit (absorption).

itive cocci and Gram-negative bacilli were detected by Gram staining, the identification was improved in 6 out of 9 cases by using a database containing species-specific spectra of Gram-positive cocci or Gram-negative bacilli.

Identification of microbes in positive enrichment fluids from blood culture flasks. We included 46 fluids grown in blood culture broths (Table 4). All spectra were interpretable, and we obtained an identification concordant with that obtained by classical methods at the species, group, and genus levels in 96%, 2%, and 2% of cases, respectively.

Time to diagnosis. It should be pointed out that each patient with a positive blood culture was treated as soon as it was detected as positive. The time required between the BacT/Alert alarm and the germ identification, including Gram staining performed during the incubation with detergent, was 20 min.

DISCUSSION

We evaluated the sensitivity and accuracy of pathogen detection by MALDI-TOF–MS applied directly from BacT/Alert bottles. This study enables a rapid (20 min) and reliable identification of the vast majority of microorganisms isolated in blood or fluid cultures. A rapid and accurate diagnosis diminishes the use of inadequate and broad-spectrum antibiotics, thereby improving outcome and reducing the potential development of resistance and possible side effects (1, 6, 10, 11). Identification of microorganisms in blood cultures by MALDI-TOF–MS dramatically extends the influence of the results of Gram staining on clinical management. In particular, among the Gram-negative bacilli, the differentiation of *Enterobacteriaceae* from members of the *Pseudomonas* or *Acinetobacter* genera only 20 min after the blood culture growth will allow a more appropriate treatment pending the results of susceptibility testing. Similarly, the possibility of obtaining an immediate diagnosis of *S. aureus* is of major clinical consequence. Fast differentiation of *S. aureus* from CNS should help the clinician to discriminate a serious infection from a possible contamination. The spectral profiles of *S. mitis* and *S. pneumoniae* are frequently indistinguishable. Nevertheless, we have shown with the results presented here and for 40 additional strains (20 *S. pneumoniae* and 20 *S. mitis* strains; data not shown) that the combination of a MALDI-TOF–MS identification result at the *S. mitis*/*S. pneumoniae* group level and a positive agglutination result with the Slidex pneumo-kit test allowed the two species to be discriminated with 95% specificity and 100% sensitivity (one test was uninterpretable because of an agglutination with the negative control). This differentiation has an important impact on the clinical management of patients.

Despite the good identification results, we noticed that the spectra from blood cultures were often of lower quality than those from colonies, occasionally making it difficult to differentiate among closely related species. For example, differentiation between *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia cenocepacia* was not possible because of the lower quality of the spectra compared to those obtained from the colonies the next day. When the infection was due to several bacterial species,

the most abundant germ detected by Gram staining was in most cases identified by MALDI-TOF–MS. The identification of bacteria distinguishable by Gram staining required the use of specific Gram stain-based databases. However, a better algorithm may be needed to differentiate all mixtures of germs. In our hospital, in 2009, 2,555 blood cultures were found to be positive, and among these, 4.8% were polymicrobial (90% with two germs and 10% with three germs). Only 2.3% of polymicrobial blood cultures were not identified as such by Gram staining. MALDI-TOF identification of germs grown directly in blood culture flasks will therefore be a valuable tool to help the clinician to institute the initial antibiotic treatment.

Several studies have described different techniques designed to shorten the delay of bacterial identification in blood culture bottles, but none of these reach the level of performance of MALDI-TOF–MS. Indeed, according to de Cueto et al., only 62% of Gram-negative bacilli and 0% of Gram-positive cocci were properly identified by using direct inoculation of fluid from a positive blood culture into an automated identification system (4). Using similar systems, Kerremans et al. showed that same-day identification results were available for only 55% of patients (15). In addition, automatic rapid systems require 3.5 h for bacterial identification, versus only 20 min for MALDI-TOF–MS. PCR-based techniques have been used for bacterial identification directly from blood culture broth. Some methods require the use of specific targets (8, 19, 20, 24). Despite the fact that these techniques are sensitive, they remain expensive and are specific for one or a few pathogens. Many molecular approaches directed against several targets or one universal target have been successfully used to identify bacteria directly from positive blood culture bottles, but these methods are expensive and time consuming (22, 28, 29). Pyrosequencing is promising in its ability to differentiate multiple organisms in a positive blood culture, but this strategy is still restricted to research laboratories (12, 13). The use of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with oligonucleotides or peptide nucleic acid probes applied to growth-positive blood cultures is less labor intensive than PCR (21, 23, 26). Although the sensitivity and specificity of individual probes are good, identification at the species level is accurate in less than 80% of cases in routine use. Indeed, the usefulness of FISH as a diagnostic test depends on the probes included in the assay and is related to the epidemiology of microorganisms in a specific setting. In routine practice, FISH requires more than 4 h after Gram staining.

In summary, MALDI-TOF–MS is the fastest of all techniques for bacterial identification directly from blood culture broth, thus allowing a real-time diagnosis of bacteremia.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grants no. BOS07001 and AOM08181 from the PHRC (Programme Hospitalier de Recherche Clinique).

REFERENCES

1. **Barenfanger, J., C. Drake, and G. Kacich.** 1999. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. **37:**1415–1418.
2. **Bruins, M. J., P. Bloembergen, G. J. Ruijs, and M. J. Wolfhagen.** 2004. Identification and susceptibility testing of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. J. Clin. Microbiol. **42:**7–11.
3. **Carbonnelle, E., J. L. Beretti, S. Cottyn, G. Quesne, P. Berche, X. Nassif, and A. Ferroni.** 2007. Rapid identification of staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. **45:**2156–2161.
4. **de Cueto, M., E. Ceballos, L. Martinez-Martinez, E. J. Perea, and A. Pascual.** 2004. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the Vitek 2 system. J. Clin. Microbiol. **42:**3734–3738.
5. **Degand, N., E. Carbonnelle, B. Dauphin, J. L. Beretti, M. Le Bourgeois, I. Sermet-Gaudelus, C. Segonds, P. Berche, X. Nassif, and A. Ferroni.** 2008. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. **46:**3361–3367.
6. **Doern, G. V., R. Vautour, M. Gaudet, and B. Levy.** 1994. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. J. Clin. Microbiol. **32:**1757–1762.
7. **Fontanals, D., F. Salceda, J. Hernandez, I. Sanfeliu, and M. Torra.** 2002. Evaluation of wider system for direct identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood culture bottles. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **21:**693–695.
8. **Grobner, S., M. Dion, M. Plante, and V. A. Kempf.** 2009. Evaluation of the BD GeneOhm StaphSR assay for detection of methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus isolates from spiked positive blood culture bottles. J. Clin. Microbiol. **47:**1689–1694.
9. **Hansen, D. S., A. G. Jensen, N. Norskov-Lauritsen, R. Skov, and B. Bruun.** 2002. Direct identification and susceptibility testing of enteric bacilli from positive blood cultures using VITEK (GNI+/GNS-GA). Clin. Microbiol. Infect. **8:**38–44.
10. **Harbarth, S., J. Garbino, J. Pugin, J. A. Romand, D. Lew, and D. Pittet.** 2003. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. Am. J. Med. **115:**529–535.
11. **Ibrahim, E. H., G. Sherman, S. Ward, V. J. Fraser, and M. H. Kollef.** 2000. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. Chest **118:**146–155.
12. **Jordan, J. A., A. R. Butchko, and M. B. Durso.** 2005. Use of pyrosequencing of 16S rRNA fragments to differentiate between bacteria responsible for neonatal sepsis. J. Mol. Diagn. **7:**105–110.
13. **Jordan, J. A., J. Jones-Laughner, and M. B. Durso.** 2009. Utility of pyrosequencing in identifying bacteria directly from positive blood culture bottles. J. Clin. Microbiol. **47:**368–372.
14. **Kempf, V. A., K. Trebesius, and I. B. Autenrieth.** 2000. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. J. Clin. Microbiol. **38:**830–838.
15. **Kerremans, J. J., P. Verboom, T. Stijnen, L. Hakkaart-van Roijen, W. Goessens, H. A. Verbrugh, and M. C. Vos.** 2008. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. J. Antimicrob. Chemother. **61:**428–435.
16. **La Scola, B., and D. Raoult.** 2009. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. PLoS One **4:**e8041.
17. **Ling, T. K., Z. K. Liu, and A. F. Cheng.** 2003. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. J. Clin. Microbiol. **41:**4705–4707.
18. **Marlowe, E. M., J. J. Hogan, J. F. Hindler, I. Andruszkiewicz, P. Gordon, and D. A. Bruckner.** 2003. Application of an rRNA probe matrix for rapid identification of bacteria and fungi from routine blood cultures. J. Clin. Microbiol. **41:**5127–5133.
19. **Mehta, M. S., S. M. Paule, R. B. Thomson, K. L. Kaul, and L. R. Peterson.** 2009. Identification of Staphylococcus species directly from positive blood culture broth by use of molecular and conventional methods. J. Clin. Microbiol. **47:**1082–1086.
20. **Parta, M., M. Goebel, M. Matloobi, C. Stager, and D. M. Musher.** 2009. Identification of methicillin-resistant or methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in blood cultures and wound swabs by GeneXpert. J. Clin. Microbiol. **47:**1609–1610.
21. **Peters, R. P., P. H. Savelkoul, A. M. Simoons-Smit, S. A. Danner, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and M. A. van Agtmael.** 2006. Faster identification of pathogens in positive blood cultures by fluorescence in situ hybridization in routine practice. J. Clin. Microbiol. **44:**119–123.
22. **Qian, Q., Y. W. Tang, C. P. Kolbert, C. A. Torgerson, J. G. Hughes, E. A. Vetter, W. S. Harmsen, S. O. Montgomery, F. R. Cockerill III, and D. H. Persing.** 2001. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. J. Clin. Microbiol. **39:**3578–3582.
23. **Rigby, S., G. W. Procop, G. Haase, D. Wilson, G. Hall, C. Kurtzman, K. Oliveira, S. Von Oy, J. J. Hyldig-Nielsen, J. Coull, and H. Stender.** 2002. Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of Candida albicans directly from blood culture bottles. J. Clin. Microbiol. **40:**2182–2186.
24. **Ruimy, R., M. Dos-Santos, L. Raskine, F. Bert, R. Masson, S. Elbaz, C. Bonnal, J. C. Lucet, A. Lefort, B. Fantin, M. Wolff, M. Hornstein, and A. Andremont.** 2008. Accuracy and potential usefulness of triplex real-time

PCR for improving antibiotic treatment of patients with blood cultures showing clustered gram-positive cocci on direct smears. J. Clin. Microbiol. **46:**2045–2051.

25. **Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. E. Fournier, J. M. Rolain, and D. Raoult.** 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin. Infect. Dis. **49:**543–551.
26. **Sogaard, M., H. Stender, and H. C. Schonheyder.** 2005. Direct identification of major blood culture pathogens, including Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli, by a panel of fluorescence in situ hybridization assays using peptide nucleic acid probes. J. Clin. Microbiol. **43:**1947–1949.
27. **Stevenson, L. G., S. K. Drake, and P. R. Murray.** 2010. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by MALDI-TOF mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. **48:**444–447.
28. **Turenne, C. Y., E. Witwicki, D. J. Hoban, J. A. Karlowsky, and A. M. Kabani.** 2000. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. **38:**513–520.
29. **Wellinghausen, N., B. Wirths, A. Essig, and L. Wassill.** 2004. Evaluation of the Hyplex BloodScreen multiplex PCR-enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. J. Clin. Microbiol. **42:**3147–3152.

B. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory

Stéphanie Suarez, Agnès Ferroni, Aurélie Lotz, Keith A. Jolley, Philippe Guérin, Julie Leto, Brunhilde Dauphin, Anne Jamet, Martin C.J. Maiden, Xavier Nassif, Jean Armengaud

Journal of Microbiological Methods, 2013, 94 : 390-396*

* L'éditeur ne permet pas la diffusion de l'article sous format pdf.

L'identification des bactéries cultivées à partir de prélèvements cliniques est réalisée de plus en plus grâce à la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, apparue récemment dans les laboratoires de microbiologie. Les spectres de masse obtenus à partir des micro-organismes entiers sont comparés à une base de données composée de spectres de référence. L'identification MALDI-TOF par le système Andromas (Paris, France) dans le laboratoire de microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants-Malades est basée sur l'utilisation d'un nombre restreint de pics, qui sont des biomarqueurs spécifiques d'espèce, essentiellement protéiques.

Nous avons voulu connaître la nature de ces biomarqueurs, en prenant comme exemple les pics permettant de faire le diagnostic d'infections à *N. meningitidis*. Deux approches complémentaires ont été utilisées pour connaître la nature des composants protéiques de Nm, par deux approches complémentaires. Nous avons dans un premier temps déduit le poids moléculaire théorique des protéines de Nm à partir de son génome et l'avons corrélé avec le PM des différents pics de son spectre de masse. Dans une deuxième étape, nous avons réalisé une analyse protéomique d'un lysat bactérien de Nm en utilisant la spectrométrie de masse en tandem. Celle-ci consiste en l'analyse précise de chaque protéine du spectre pour déterminer sa nature en fonction de sa composition biochimique.

Parmi les 13 pics permettant le diagnostic d'espèce de Nm, 10 ont ainsi été identifiées comme des protéines ribosomales. Ces protéines sont très conservées chez les procaryotes.

Cependant, les gènes codant pour les protéines ribosomales peuvent subir de rares mutations à l'origine d'un changement de poids moléculaire de quelques daltons (cinq à dix), pouvant être mises à profit pour faire des comparaisons de souches au sein d'une même espèce, sans altérer l'identification d'espèce. Certaines équipes ont montré que cette variation génomique permettait de réaliser des analyses phylogéniques à partir d'extraits protéiques. Ces variations de séquences pourraient être mises en évidence par la variation du poids moléculaire des protéines ribosomales détectée par spectrométrie MALDI-TOF. L'utilisation de tels marqueurs permettrait d'avoir à disposition une méthode très rapide et facile de comparaison de souches au sein d'une même espèce en milieu hospitalier.

Pour cela nous avons comparé le profil des protéines ribosomales de 100 souches de Nm classées en 29 complexes clonaux et 49 ST. Dans la fenêtre de travail MALDI-TOF permettant le diagnostic d'espèce, nous avons pu observer trois variations de pics protéiques permettant de distinguer quatre de ces 29 complexes et trois ST.

Ce travail a permis de montrer que la spectrométrie MALDI-TOF, grâce à la variation des protéines ribosomales de son spectre, peut potentiellement être utilisée comme un nouvel outil épidémiologique équivalent à la rMLST (ribosomal multilocus sequence typing) pour l'étude de la variabilité de souches au sein d'une même espèce.

Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory

Stéphanie Suarez[1,2], Agnès Ferroni[1], Aurélie Lotz[2], Keith A. Jolley[3], Philippe Guérin[4], Julie Leto[5], Brunhilde Dauphin[5], Anne Jamet[1,2], Martin C.J. Maiden[3], Xavier Nassif[1,2], Jean Armengaud[4]

[1]Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France

[2]INSERM U1002, Université Paris Descartes, Site Broussais, Paris France

[3]Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK

[4]CEA, DSV, IBEB, Laboratoire Biochimie Systèmes Perturbés, Bagnols-sur-Cèze, France

[5]Andromas SAS, pépinière Paris Santé Cochin, Paris, France

Corresponding author : Agnes Ferroni

Keywords : mass spectrometry, ribosomal proteins, biomarkers, *Neisseria meningitidis*

Abstract

Whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a rapid method for identification of microorganisms that is increasingly used in microbiology laboratories. This identification is based on the comparison of the tested isolate mass spectrum with reference databases. Using *Neisseria meningitidis* as a model organism, we showed that in one of the available databases, the Andromas database, 10 of the 13 species-specific biomarkers correspond to ribosomal proteins. Remarkably, one biomarker, ribosomal protein L32, was subject to inter-strain variability. The analysis of the ribosomal protein patterns of 100 isolates for which whole genome sequences were available, confirmed the presence of inter-strain variability in the molecular weight of 29 ribosomal proteins, thus establishing a correlation between the sequence type (ST) and/or clonal complex (CC) of each strain, and its ribosomal protein pattern. Since the molecular weight of three of the variable ribosomal proteins (L30, L31 and L32) was included in the spectral window observed by MALDI-TOF MS in clinical microbiology, i.e. 3640-12000m/*z*, we were able by analyzing the molecular weight of these three ribosomal proteins to classify each strain in one of six subgroups, each of these subgroups corresponding to specific STs and/or CCs. Their detection by MALDI-TOF allows therefore a quick typing of *N. meningitidis* isolates.

1. Introduction

Whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) generates a spectrum based on proteins detected directly from intact microorganisms (Holland et al., 1996, Williams et al., 2003) allowing the rapid identification of bacterial isolates. This identification relies on comparison of the spectra of the sample with those of reference databases. The Andromas database was engineered using an algorithm that identifies a limited number of species-specific peaks for each entry (Carbonnelle et al., 2007; Degand et al., 2008). Briefly, to engineer the database, a set of reference isolates was chosen and ten subcultures of each of these selected isolates, grown on different media, were analyzed. For each strain, only those peaks with a relative intensity above 0.07, and which that were constantly present in all 10 sets of data obtained for a given strain, were retained. With the Andromas database, accurate species identification is obtained if at least 68% of the species-specific peaks are present in the spectrum of the subject isolate. The failure to identify some specimens is explained by small protein variations among isolates of the same species, or by the fact that some peaks of the database cannot be observed because of the poor quality of spectra obtained from whole bacteria grown in primary culture.

In this work, we aimed at answering two questions regarding the implementation of mass spectrometry in clinical laboratories. (i) Although many studies have showed that peaks used for identification species of bacteria are ribosomal protein (Lay, 2001; Ryzhov and Fenselau, 2001; Teramoto et al., 2007), we wanted to identify the exact nature of the biomarkers empirically used to build the Andromas database for bacterial species identification. (ii) We next aimed at identifying markers specific of strain and/or groups of strains, and compare them to reliable epidemiological methods. Ribosomal proteins are good candidates for such an approach as they are universal amongst cellular life. Indeed, even though most ribosomal

proteins are highly conserved within a bacterial species, some of these proteins are subject to slight variations at the strain level. As the variations of the ribosomal protein genes have been proposed for classification and typing purposes (Bennett et al., 2012; Jolley et al., 2012; Kozo, 1989; Matte-Tailliez et al., 2002; Roberts et al., 2008; Yutin et al., 2012), analysis of the ribosomal protein masses in a MALDI-TOF spectrum directly from intact bacterial cells could provide an interesting epidemiological tool for the classification of bacterial isolates to the sub-species or strain level. The use of ribosomal markers detected by MALDI-TOF would then dramatically speed up epidemiological studies in the clinical laboratory and in environmental microbiology

For epidemiological studies, strains are routinely typed using multi locus sequence typing (MLST). They are subsequently compared by sequencing the internal fragment of seven house keeping genes. Strains having similar sequence belong to the same sequence type (ST). STs are groups into clonal complexes (CC) by their similarity to a central allelic profile (http://pubmlst.org/). In addition, using only ribosomal proteins, Jolley et al (2002) showed that ribosomal multi locus sequence typing (rMLST) of *Streptococcus pneumoniae* had strain level resolution. Here we examined isolates of the bacterial pathogen *Neisseria meningitidis* to determine the bacterial components corresponding to the species-specific peaks combining genomic and proteomic approaches (Demirev et al., 2005, Dworzanski et al., 2004, Ryzhov and Fenselau, 2001). Taking into account genomic sequence data of 100 isolates, we correlated the ribosomal protein profile of each isolates with its ST and CC. Use of these data allows classifying each isolate to a subgroup on the basis of spectra obtained in a routine clinical setting.

2. Material and methods

2.1 Strains

One hundred clinical isolates of *N. meningitidis* included in the 107 strains collection used to establish multilocus sequence typing (Maiden et al., 1998) was obtained from D. Caugant, WHO Collaborating Center for Reference and Research on Meningococci, Norwegian Institute of Public Health, Oslo. In addition, two previously described isolates, *N. meningitidis* NEM 8013 and *N. meningitidis* Z2491, were used. All isolates were grown on GCB (Gonococcal Medium Base) agar plates (Difco) containing Kellog's supplements at 37°C in 5% atmosphere for 18 h harvested and inactivated in 70% ethanol. Pellets were conserved at -80°C.

2.2 Proteolysis

Proteins of strains NEM 8013 and Z2491 were extracted from bacterial cells with 70% formic acid/acetonitrile (v/v) and the suspension centrifuged at 13000 g. The supernatant was then dried and 5-100 μg of protein was dissolved in an appropriate volume of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 0.1% (w/v) SDS and 0.15% (w/v) dithioerythiol (DTT), to give a protein concentration of 1 μg/μl. The solutions were incubated at 90°C for 60 s to reduce proteins and left to cool to room temperature. A volume of 5 μl of 0.5 M iodoacetamide (an excess) was added to the mixture, which was incubated at 37°C for 30 min in the dark to carboaminomethylate the cysteine residues. Excess reagent and low molecular weight products were removed by ultrafiltration (Amicon, Millipore, Ireland) and the protein was concentrated by centrifugal evaporation. Derivatised proteins were reconstituted in water to a final concentration of 1 μg/μl and 5 μl was added to 190 μl of the appropriate reaction buffer: for endoproteinase GluC (protease V8), 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8, five μl of the protease V8 (0.1μg/μl) (ThermoScientific, USA) were added to the reaction mixture. After incubation at 37°C for 16 h the reactions were stopped by heating at 90°C for 30 s. The

samples were concentrated and residual acetonitrile and TFA removed under vacuum before reconstitution in H20.

2.3 De-O-glycosylation and dialysis

Proteins of strains NEM 8013 and Z2491 were extracted from bacterial cells with 70% formic acid/acetonitrile (v/v). The suspension was centrifuged at 13000g. The resulting supernatant was dried out and the pellet resuspended in water. Twenty micrograms of extracted proteins were digested by endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase (Biolabs, Great Britain). A slide-A-Lyser Dialysis Cassette 3.5 MCWO (ThermoScientific, USA) was used to desalt the two resulting suspensions before MALDI-TOF mass spectrometry.

2.4 MALDI-TOF mass spectrometry analysis

The protein suspensions (1 µl), or a swab of whole bacteria obtained from colonies, was spotted onto a MALDI sample target and allowed to dry at room temperature. For each of the 102 strains, 10 MALDI-TOF MS spectra were recorded from different colonies. One microliter of matrix HCCA (saturated solution of cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetonitrile 50%, trifluoroacetic acid 2.5%) was then added and allowed to co-cristallize with the whole bacteria. Samples were processed in the MALDI-TOF MS spectrometer (LT2-Andromas, Andromas SAS, France) with the MALDI Control software (Andromas SAS, France). Positive ions were extracted with an accelerating voltage of 20 kV in linear mode. Each spectrum was the sum of the ions obtained from 400 laser shots performed automatically on different regions of the same well. The spectra were analyzed in the 3640 to 12000 *m/z* range using the Andromas software.

2.5 Protein sequence analysis:

The complete proteome of strains *N. meningitidis* NEM 8013 and Z2491 were extracted from the MicroScope Database (http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php) and the theoretical molecular weight (MW) of the protein corresponding to each open reading

frame was deduced from the sequence with an online tool (http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html). In addition, DNA of the isolates NEM 8013 and Z2491 was extracted using Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) according to manufacturer's instruction. The genes MNV_2186 and NMA0455 were amplified using the following primers: forward primer GGTTTGGCTTTCAGACGGTA ; reverse primer GTCTTGCCGTATGGTTTCGT. Amplification was performed using 2 µl of template, 5 µl of 1X Dream Taq buffer (Fermentas, USA), 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer and 5 U of DreamTaq polymerase (Fermentas), qs 50 µl. Target DNA was amplified with 30 cycles (94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min) with an initial denaturation step at 95°C for 5 min and a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR products were checked on a 1% agar gel and directly sequenced using an ABI Prism automated sequencer (GATC-biotech, http://www.gatc-biotech.fr).

2.6 nanoLC-MS/MS analysis

nanoLC-MS/MS (nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry) was performed according to the protocol described earlier (Christie-Oleza et al., 2013). Pelleted cells (two plates) of the two *N. meningitidis* strains were resuspended in 300 ml of lithium dodecyl sulfate-β-mercaptoethanol sample buffer for SDS-PAGE (Invitrogen, UK) and incubated at 99°C for 10 min prior to SDS-PAGE. The cell samples were directly loaded onto a 12% Tris-Bis NuPAGE gel (Invitrogen). SDS-PAGE was carried out using 1X 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid solution (Invitrogen) as the running buffer. Proteins were resolved over a 6 cm migration in order to separate those proteins with a low molecular weight. A single gel band containing low-molecular-weight proteins (< 20 kDa) was cut for an in-gel proteolysis with trypsin (Roche, France) following the ProteasMax protocol (Promega) as previously described (Clair et al., 2012). NanoLC-MS/MS experiments were

performed using the LTQ-Orbitrap XL hybrid mass spectrometer (ThermoFisher, USA) coupled to an UltiMate 3000 LC system (Dionex-LC Packings) using conditions previously described (de Groot et al., 2009). MS/MS spectra were searched against homemade protein sequence databases containing all the annotated CDS sequences of the *N. meningitidis* NEM 8013 or Z2491 genomes. Searches were carried out using the MASCOT 2.2.04 software (Matrix Science).

2.7 Ribosomal proteins

The molecular weights of ribosomal proteins were predicted from 100 genomes stored in the PubMLST *Neisseria* database using the BIGSdb export plugin (Jolley and Maiden, 2010). This uses standard BioPerl modules (Stajich et al., 2002) to translate the complete identified coding sequences and predict molecular weight based on amino acid composition.

2.8 Cluster analysis

Phylogenetic analysis based on the MALDI mass spectra was conducted by the Bionumerics software (version 5.1, Applied Maths, Kortrijk, Belgium) using a similarity coefficient curve based on Pearson correlation. The phylogenetic tree was built by the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

3. Results and discussion

3.1 Reproducibility of MALDI-TOF MS species-specific biomarkers

The Andromas database includes 13 species-specific peaks for *N. meningitidis*. A MALDI mass spectrum of the whole-cell suspensions of *N. meningitidis* Z2491 is shown in Fig. 1. Our first aim was to assess the reproducibility of the species-specific peaks identified in the database among colonies of a single strain and between strains of the same species. We performed 10 MALDI-TOF MS acquisition of each of the 102 isolates (Table 1). Most of the peaks were highly conserved, with 10 of 13 peaks present in over 97% of the MS acquisitions.

Only peaks 5, 11, and 13, as labeled in Fig. 1, were observed in less than 97% of the MS acquisitions (78%, 89% and 90%, respectively). It should be noted out that this variability never prevented accurate species identification, as in all acquisitions the diagnostic result obtained with the Andromas software was *N. meningitidis*.

3.2 Identification of the nature of the species-specific biomarkers

We next assessed whether the biomarkers were proteins. Using the endoproteinase GluC, we demonstrated that all species-specific peaks were proteins as they disappeared (10) or strongly decreased (3) after enzymatic proteolysis (data not shown). In addition, we performed an enzymatic digestion with an endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase that removes O-glycosylation and did not observe modification of the *m/z* ratio of the species-specific peaks, thus ruling out a possible O-glycosylation of these biomarkers; indeed, N-glycosylation has never been described in *N. meningitidis*.

The molecular weight of the biomarkers were compared to the putative proteomes of two isolates, NEM8013 and Z2491, using the MicroScope database, taking into account the possible loss of the first methionine of the protein (Gonzales and Robert-Baudouy, 1996). We observed that for 5 peaks, the theoretical masses were different from the observed masses due to the loss of the first methionine residue of the tentatively assigned proteins (Tables 2 and 3). In addition, a shotgun proteomic approach was performed using nanoLC-MS/MS in order to list the small molecular weight proteins abundantly present in cells in these physiological conditions and confirm the identities of these biomarkers (Tables 2 and 3). For isolate NEM8013 (Table 2), the bioinformatics approach allowed the identification of 11 out of the 13 biomarkers; however, in 3 cases (peaks 7, 8 and 13), the genomic approach gave two possibilities. On the other hand, the proteomic approach was contributive as most protein assignments were confirmed and only one protein was finally assigned for the peaks of isolate

NEM8013. Regarding strain Z2491 (Table 3), nine biomarkers were identified by the bioinformatics approach, and an additional peak (peak 12) was identified using shotgun proteomics. Comparative proteomics of both strains allows clarifying the identity of Peak 12 which corresponds to the DNA binding protein HU (NMV_1200 hup and NMA1397 for strains NEM 8013 and Z2491, respectively).

A discrepancy was observed between the two strains for peak 3 (5620) that was found to be present in the spectra of the two strains. In the case of NEM8013, this peak was identified as being a hypothetical membrane protein (NMV_2186); on the other hand, this peak could not be identified by both techniques in Z2491. In addition, this peak was systematically present in the MALDI-TOF mass spectra of the 100 other strains. The homolog of NMV_2186 in NEM8013 is NMA0455 in Z2491. The comparison of the available sequences of these genes revealed only one amino-acid difference between the two strains. Re-sequencing of these two open reading frames confirmed the initial sequence (data not shown). The molecular weight of this protein deduced from the genome of strain Z2491 is 5650 Da, which is significantly higher than the molecular weight of peak 3 (5620). Furthermore this peak 3 which disappeared after a protease treatment does correspond to a protein. The most likely explanation for this is that peak 3 does not correspond to NMV_2186 and remains unidentified. Peak 6 could not be identified by both techniques in both strains, while the enzymatic digestion confirmed the protein nature of this peak. In summary, the proteins corresponding to peak 3 and peak 6 could be the consequence of post-translational modifications, other than the loss of methionine or O-glycosylation (Suh et al., 2005).

Previous studies have already shown that the vast majority of MALDI-TOF peaks were proteins, after comparison with genomic (Holland et al., 1999), or protein sequence data (Ryzhov and Fenselau, 2001) for Gram negative bacilli cell extracts. To our knowledge, this study is the first time that nanoLC-MS/MS has been used for the precise identification of

species-specific peaks contained in the bacterial diagnosis databases of clinical laboratories. Altogether these data demonstrate that most of these biomarkers correspond to ribosomal proteins, as initially described by Ilina et al (Ilina et al., 2009).

3.3 Inter-strain variability

A total of 3 biomarkers corresponding to ribosomal proteins, peaks 5, 11 and 13 were present in only 78%, 89% and 90% of the 1020 acquisitions, respectively (Table 1). In order to determine whether these relatively low frequencies were due to an intra- or inter-strain variability, the spectra of isolates that did not show one of the 13 biomarkers among the 10 acquisitions were examined. Peaks 11 and 13 were detected in the spectra of all 102 strains but only in some acquisitions, thus demonstrating that the variation of these peaks corresponded to an intra-strain variability. This variation was likely to be due to difficulties in the detection of proteins of relatively high molecular weight using MALDI-TOF mass spectrometry. Indeed, peaks of higher molecular weight are more difficult to detect than peaks corresponding to protein in the low molecular weight range (Fig. 1).

On the other hand, the only peak which was missing in a large number of strains was peak 5 (ribosomal protein L32) which was never detected in the subculture of 22 strains out of the 102 strains under study, and if detected, was present in all the acquisitions of strains expressing this biomarker, showing an inter-strain variability of this protein.

The ability to differentiate strains by MALDI-TOF has already been suggested. Arnold and Reilly (1998) used mathematical algorithm to differentiate strains of *Escherichia coli* on profiles obtained from cell lysates. Teramoto et al. (2007b, 2009) described with the MALDI-TOF method a phylogenetic classification using the inter-strain variability of ribosomal proteins, compared to phylogenetic tree of DNA gyrase subunit B gene. We subsequently assessed whether variability in some ribosomal proteins of *N. meningitidis* detected by

MALDI-TOF could be used for strain grouping. We took advantage of the availability of the genome sequence of the 100 strains used in this study to analyze the molecular weight of the ribosomal proteins of these *Nm* strains. The ribosomal protein pattern of each strain was compared with that of the corresponding ST and CC (Fig. 2). This comparison clearly showed that there was a good correlation between the patterns of ribosomal proteins and the clonal complexes, except for ST-4 clonal complex (cc4) that includes strains having a ribosomal protein pattern identical to some strains belonging to the ST-5 clonal complex (cc5). These two clonal complexes are known to be closely related (Didelot et al., 2009).

The correlation between the pattern of expressed ribosomal proteins and the ST showed that several different STs corresponded to the same ribosomal protein pattern (Fig. 2).

We subsequently tested the hypothesis of differentiating strains using routine MALDI-TOF MS spectra. In the spectral window employed (3640-12000 m/z), 14 ribosomal proteins could be detected. Among these, only 3 were ribosomal proteins exhibiting sequence variations, including L30, L31, and L32. The latter corresponds to peak 5. As an example, Fig. 3 shows the 3 possible variants of the L32 ribosomal protein. Table 4 indicates the corresponding STs and CCs corresponding to the different molecular weight of these 3 ribosomal proteins, and the 6 resulting discriminating groups. The analysis of the molecular weights of the 3 proteins using the spectra obtained for the 102 strains allowed easily to classify each strain in one of the 6 groups, thus permitting on the basis of a routine spectrum to obtain epidemiological indications. It would be theoretically possible to determine precisely the clonal complex of each isolate, but this would require an adjustment of the spectral windows so that the molecular weight of other variable ribosomal proteins could be obtained. However in a routine setting such an adjustment may be challenging.

Taken together, these data show that species-specific peaks used in the *N. meningitidis*

database are very conserved within the species *N. meningitidis*, as evidenced by the very robust reproducibility of the peaks detected in the 102 strains studied in this work. We have shown, using both shotgun proteomics and genomic approaches, that the majority of these species-specific peaks correspond essentially to ribosomal proteins. The variability of some ribosomal proteins visible on the spectrum could differentiate isolates among the same species to the level of clonal complex, providing an easy and rapid epidemiological method for classifying bacterial pathogens in the clinical microbiology laboratory.

Acknowledgements :

The authors would like to thank Dr. Dominique Caugant and the WHO Collaborating Center for Reference and Research on Meningococci, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, for providing bacterial samples.

References

Arnold, R.J., Reilly, J.P., 1998. 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 communications in mass spectrometry : RCM. 12, 630-636.

Bennett, J.S., Jolley, K.A., Earle, S.G., Corton, C., Bentley, S.D., Parkhill, J., Maiden, M.C., 2012. A genomic approach to bacterial taxonomy: an examination and proposed reclassification of species within the genus Neisseria. Microbiology (Reading, England). 158, 1570-1580.

Carbonnelle, E., Beretti, J.L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A., 2007. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 45, 2156-2161.

Christie-Oleza, J.A., Pina-Villalonga, J.M., Guerin, P., Miotello, G., Bosch, R., Nogales, B., Armengaud, J., 2013. Shotgun nanoLC-MS/MS proteogenomics to document MALDI-TOF biomarkers for screening new members of the Ruegeria genus. Environmental microbiology. 15, 133-147.

Clair, G., Armengaud, J., Duport, C., 2012. Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in Bacillus cereus. Mol Cell Proteomics. 11, M111 013102.

de Groot, A., Dulermo, R., Ortet, P., Blanchard, L., Guerin, P., Fernandez, B., Vacherie, B., Dossat, C., Jolivet, E., Siguier, P., Chandler, M., Barakat, M., Dedieu, A., Barbe, V., Heulin, T., Sommer, S., Achouak, W., Armengaud, J., 2009. Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium Deinococcus deserti. PLoS genetics. 5, e1000434.

Degand, N., Carbonnelle, E., Dauphin, B., Beretti, J.L., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Segonds, C., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A., 2008. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. Journal of clinical microbiology. 46, 3361-3367.

Demirev, P.A., Feldman, A.B., Kowalski, P., Lin, J.S., 2005. Top-down proteomics for rapid identification of intact microorganisms. Analytical chemistry. 77, 7455-7461.

Didelot, X., Urwin, R., Maiden, M.C., Falush, D., 2009. Genealogical typing of Neisseria meningitidis. Microbiology (Reading, England). 155, 3176-3186.

Dworzanski, J.P., Snyder, A.P., Chen, R., Zhang, H., Wishart, D., Li, L., 2004. Identification of bacteria using tandem mass spectrometry combined with a proteome database and statistical scoring. Analytical chemistry. 76, 2355-2366.

Gonzales, T., Robert-Baudouy, J., 1996. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. FEMS microbiology reviews. 18, 319-344.
Holland, R.D., Duffy, C.R., Rafii, F., Sutherland, J.B., Heinze, T.M., Holder, C.L., Voorhees, K.J., Lay, J.O., Jr., 1999. Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells. Analytical chemistry. 71, 3226-3230.

Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay, J.O., Jr., 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 10, 1227-1232.

Ilina, E.N., Borovskaya, A.D., Malakhova, M.M., Vereshchagin, V.A., Kubanova, A.A., Kruglov, A.N., Svistunova, T.S., Gazarian, A.O., Maier, T., Kostrzewa, M., Govorun, V.M., 2009. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic Neisseria. J Mol Diagn. 11, 75-86.

Jolley, K.A., Bliss, C.M., Bennett, J.S., Bratcher, H.B., Brehony, C., Colles, F.M., Wimalarathna, H., Harrison, O.B., Sheppard, S.K., Cody, A.J., Maiden, M.C., 2012. Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. Microbiology (Reading, England). 158, 1005-1015.

Jolley, K.A., Maiden, M.C., 2010. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinformatics. 11, 595.

Kozo, O., 1989. Heterogeneity of ribosomal proteins among Streptomyces species and its application to identifcation. Journal General Microbiology. 135, 2635-2642.

Lay, J.O., Jr., 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. Mass spectrometry reviews. 20, 172-194.

Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95, 3140-3145.

Matte-Tailliez, O., Brochier, C., Forterre, P., Philippe, H., 2002. Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins. Molecular biology and evolution. 19, 631-639.

Pineda, F.J., Antoine, M.D., Demirev, P.A., Feldman, A.B., Jackman, J., Longenecker, M., Lin, J.S., 2003. Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. Analytical chemistry. 75, 3817-3822.

Roberts, E., Sethi, A., Montoya, J., Woese, C.R., Luthey-Schulten, Z., 2008. Molecular signatures of ribosomal evolution. Proc Natl Acad Sci U S A. 105, 13953-13958.

Ryzhov, V., Fenselau, C., 2001. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. Analytical chemistry. 73, 746-750.

Stajich, J.E., Block, D., Boulez, K., Brenner, S.E., Chervitz, S.A., Dagdigian, C., Fuellen, G., Gilbert, J.G., Korf, I., Lapp, H., Lehvaslaiho, H., Matsalla, C., Mungall, C.J., Osborne, B.I., Pocock, M.R., Schattner, P., Senger, M., Stein, L.D., Stupka, E., Wilkinson, M.D., Birney, E., 2002. The Bioperl toolkit: Perl modules for the life sciences. Genome Res. 12, 1611-1618.

Suh, M.J., Hamburg, D.M., Gregory, S.T., Dahlberg, A.E., Limbach, P.A., 2005. Extending ribosomal protein identifications to unsequenced bacterial strains using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Proteomics. 5, 4818-4831.

Teramoto, K., Kitagawa, W., Sato, H., Torimura, M., Tamura, T., Tao, H., 2009. Phylogenetic analysis of Rhodococcus erythropolis based on the variation of ribosomal proteins as observed by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry without using genome information. Journal of bioscience and bioengineering. 108, 348-353.

Teramoto, K., Sato, H., Sun, L., Torimura, M., Tao, H., 2007a. A simple intact protein analysis by MALDI-MS for characterization of ribosomal proteins of two genome-sequenced lactic acid bacteria and verification of their amino acid sequences. Journal of proteome research. 6, 3899-3907.

Teramoto, K., Sato, H., Sun, L., Torimura, M., Tao, H., Yoshikawa, H., Hotta, Y., Hosoda, A., Tamura, H., 2007b. Phylogenetic classification of Pseudomonas putida strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. Analytical chemistry. 79, 8712-8719.

Williams, T.L., Andrzejewski, D., Lay, J.O., Musser, S.M., 2003. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 14, 342-351.

Yutin, N., Puigbo, P., Koonin, E.V., Wolf, Y.I., 2012. Phylogenomics of prokaryotic ribosomal proteins. PLoS One. 7, e36972.

Table 1
Presence of the *N. meningitidis* biomarkers among the 102 tested strains.

Peaks number	*m/z* (database Andromas)	% Detection of each peak among the 10 acquisitions of the 102 strains (i.e 1020 acquisitions)	Numbers of strains which do not have the corresponding biomarker at least once, among the 10 acquisitions of each strain
1	4486	99	1
2	5049	100	0
3	5618	100	0
4	5936	100	0
5	6343	78	22
6	6434	97	2
7	7067	100	0
8	7230	99	0
9	8126	98	1
10	8230	100	0
11	8698	89	0
12	9360	100	0
13	9393	90	0

m/z: mass /charge.

Table 2
Biomarker assignments by means of proteogenomics for the NEM 8013 strain.

		MicroScope Database			
Peaks number	**Observed *m/z***	**Theoretical molecular weight including PTM**	**Protein assignment by sequence comparison**	**Protein assignment by shotgun MS/MS**	**PTM**
1	Not present in this strain	-	-	-	-
2	5051	5048	50S protein ribosomal L34	50S protein ribosomal L34	-
3	5620	5617	Hypothetical membrane associated protein (NMV_2186)	Hypothetical membrane associated protein	-
4	5938	5933	50S ribosomal protein L33	50S ribosomal protein L33	-
5	6342	6338	50S ribosomal protein L32	50S ribosomal protein L32	Methionine removed
6	6429	ND	ND	ND	ND
7	7079	7074	50S ribosomal protein L29 or putative heavy-metal scavenger protein (MNV_1128)	50S ribosomal protein L29	-
8	7227	7221	50S ribosomal protein L35 or truncated conserved hypothetical phage protein (NMV_1277)	50S ribosomal protein L35	Methionine removed
9	8112	8113	50S ribosomal protein L31	50S ribosomal protein L31	-
10	8251	8249	30S ribosomal protein S21	30S ribosomal protein S21	Methionine removed
11	8686	8682	50S ribosomal protein L28	50S ribosomal protein L28	Methionine removed
12	9348	9342	Truncated ISNme1 transposase (NMV_0585.1)	DNA-binding protein HU (NMV_1200 hup)	-
13	9377	9381	30S ribosomal protein S20 or Autotransported serine protease NA1P (pseudogene part 1) (NMV_2165.1)	30S ribosomal protein S20	Methionine removed

ND : Not determined, PTM : Post Translational Modification; *m/z* : mass/charge

Table 3
Biomarker assignments by means of proteogenomics for the Z2491 strain.

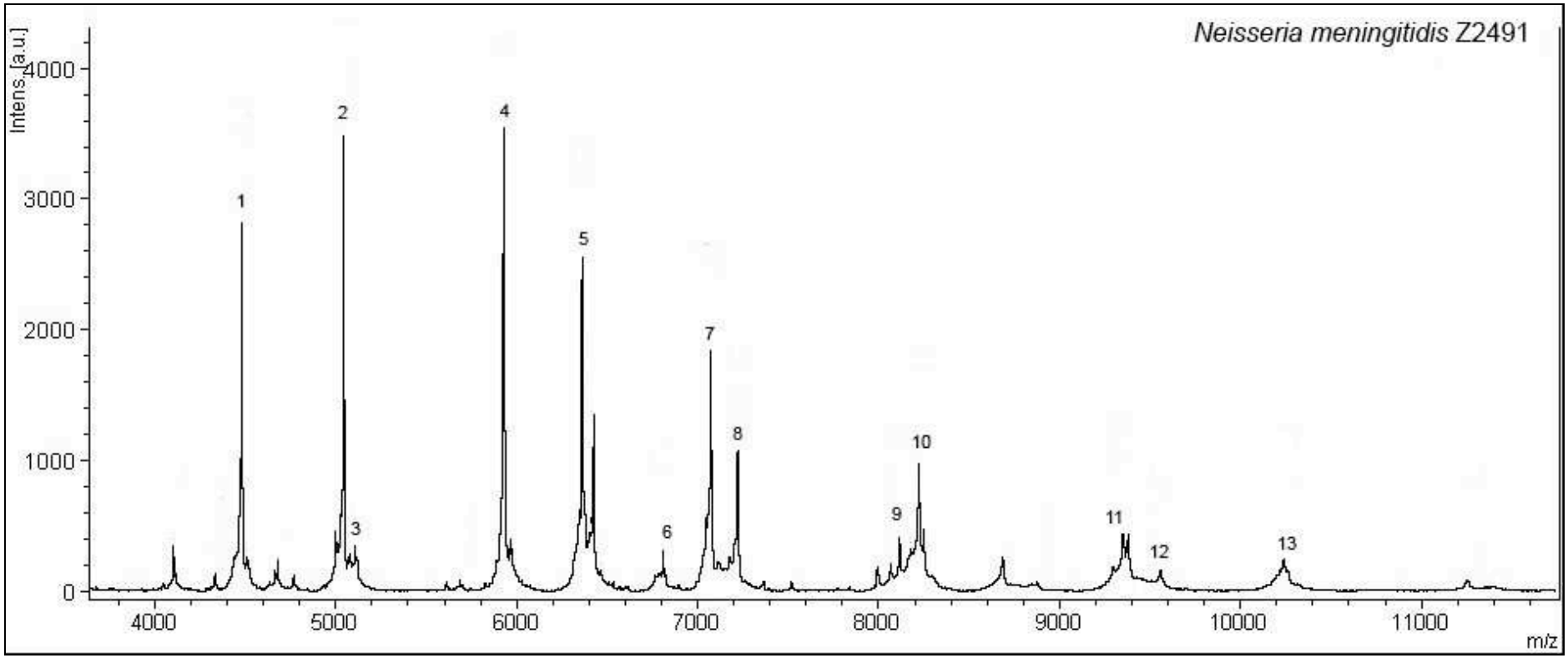
		MicroScope database			
Peaks number	**Observed *m/z***	**Theoretical molecular weight including PTM**	**Protein assignment by sequence comparison**	**Protein assignment by shotgun MS/MS**	**PTM**
1	4488	4486	50S ribosomal protein L36	50S ribosomal protein L36	-
2	5051	5048	50S protein ribosomal L34	50S protein ribosomal L34	-
3	5620	ND	ND	ND	ND
4	5938	5933	50S ribosomal protein L33	50S ribosomal protein L33	-
5	Not present in this strain				
6	6434	ND	ND	ND	ND
7	7079	7074	50S ribosomal protein L29	50S ribosomal protein L29	-
8	7227	7221	50S ribosomal protein L35	50S ribosomal protein L35	Methionine removed
9	8112	8113	50S ribosomal protein L31	50S ribosomal protein L31	-
10	8251	8249	30S ribosomal protein S21	30S ribosomal protein S21	Methionine removed
11	8686	8682	50S ribosomal protein L28	50S ribosomal protein L28	Methionine removed
12	9348	ND	ND	DNA-binding protein HU (NMA1397)	-
13	9377	9381	30S ribosomal protein S20	30S ribosomal protein S20	Methionine removed

ND : Not determined PTM : Post Translational Modification; *m/z* : mass/charge

Table 4
Molecular weight of the 3 variable ribosomal proteins detected in the MALDI TOF spectra (spectral window : 3640-12000 m/*z*), and corresponding sequence types and clonal complexes.

Group	L30	L31	L32 (peak 5)	Sequence types	Clonal complexes
1	6764	8125	6343	1,2,3	ST-1 complex/subgroup I/II
				8,9,10,66,153	ST-8 complex/Cluster A4
				11	ST-11 complex/ET-37 complex
				13	ST-269 complex
				15	ST-364 complex
				18,19,20	ST-18 complex
				22	ST-22 complex
				23	ST-23 complex/Cluster A3
				24	ST-750 complex
				28	ST-103 complex
				29	ST-167 complex
				32,33,34	ST-32 complex/ET-5 complex
				37,38	ST-37 complex
				8523	ST-254 complex
				12,16,17,21,25,26,27,30,36	Not determined
2	6764	8125	6330	39	ST-198 complex
3	6764	8125	6373	4	ST-4 complex/subgroup IV
				5,6,7	ST-5 complex/subgroup III
4	6817	8125	6343	40,41,42,43,44,45,46,47,48	ST-41/44 complex/Lineage 3
5	6764	8141	6343	35	ST-35 complex
6	6764	8153	6343	31	ST-334 complex

Figure 1
Mass spectra of whole cell of *Neisseria meningitidis* Z2491.

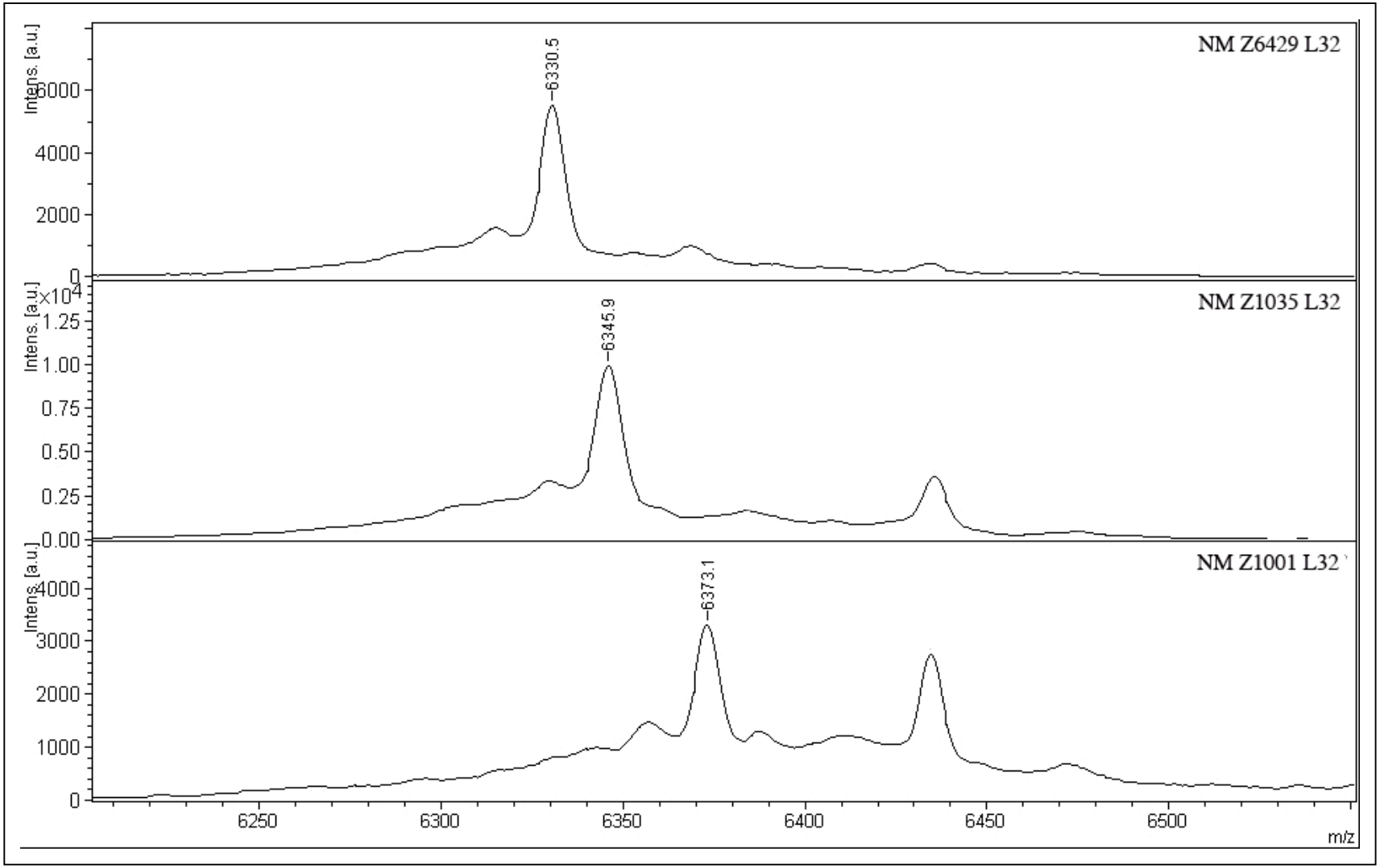


Intens, Intensity ; a.u., arbitary unit ; *m/z*, mass to charge

Figure 2

Phylogenetic tree of ribosomal proteins bases based on their molecular mass, compared to ST and clonal complexes.

Figure 3
Ribosomal protein L32 in 3 differents strains of *Neisseria meningitidis*.



Intens, Intensity ; a.u., arbitary unit ; *m/z*, mass to charge

C. Application de l'analyse des protéines ribosomales identifiées sur les spectres bactériens à l'épidémiologie bactérienne et à la différenciation d'espèces proches

Cette partie présente tous les résultats non publiés obtenus au cours de ma thèse.

1. Epidémiologie bactérienne : suite de l'étude sur la variation des protéines ribosomales de *N. meningitidis*

La récente utilisation de la rMLST pour la classification de souches de pneumocoques montre que l'analyse des gènes des protéines ribosomales permet de typer les souches au niveau du ST voire à l'intérieur d'un même ST (Jolley et al., 2012). Dans la publication précédente, nous avons analysé 100 souches de Nm appartenant à 29 complexes clonaux différents représentant 49 ST. Les séquences des protéines ribosomales ont été extraites de la base de données BIGSdb (http://pubmlst.org/). Le poids moléculaire des 53 protéines ribosomales de chacune de ces souches a été déduit de leurs séquences : il varie entre 4 471 Da et 30 109 Da. Ces protéines étant très stables, seulement 28 d'entre elles possèdent des mutations faisant varier leur poids moléculaire de quelques daltons. Ces variations permettent d'obtenir un profil de protéines ribosomales pour chaque souche étudiée. Lorsque l'on corrèle ces différents profils avec les résultats obtenus en MLST, il est possible d'identifier 25 des 29 CC et 30 des 49 ST (Suarez et al., 2013).

La correspondance entre les m/*z* et les poids moléculaires des protéines ribosomales sur les 100 souches a permis de mettre en évidence la présence de 14 d'entre elles sur le spectre MALDI-TOF d'une souche de Nm dans la fenêtre d'étude utilisée pour le diagnostic (3 640 - 12 000 m/*z*), dont trois sont variables, permettant de distinguer six complexes clonaux et quatre ST (Suarez et al., 2013). Cependant, pour classer de façon précise les différentes souches au niveau d'un ST ou d'un CC, un plus grand nombre de protéines variables visibles sur le spectre est requis. En effet, d'après les PM théoriques, 23 protéines ribosomales, dont sept variables, sont situées entre 3 640 Da et 12 000 Da.

Nous avons dès lors testé différentes techniques afin d'élargir la fenêtre d'analyse des spectres obtenus par MALDI-TOF MS.

1.1 Elargissement et fractionnement de la fenêtre d'acquisition des ribosomes

Pour permettre de visualiser la totalité des protéines ribosomales par MALDI-TOF et augmenter la lisibilité des spectres, un fractionnement de la fenêtre d'acquisition a semblé nécessaire (Arnold and Reilly, 1999). Pour 11 souches appartenant à huit ST, nous avons choisi quatre fenêtres de m/*z*, permettant théoriquement de visualiser 51 des 53 protéines ribosomales. Cependant, cette méthode ne nous a pas permis d'atteindre cet objectif. En effet, sur ces 11 souches, nous n'avons observé que 21 protéines ribosomales dont huit sont variables (Tableau 5), et sur seulement trois des quatre fenêtres d'acquisition.

Fenêtre d'acquisition (m/*z*)	Protéines ribosomales totales observées/théoriques	Protéines ribosomales variables observées/théoriques
3 640-9 000	10/11	3/3
9 000-12 000	7/12	2/4
12 000-18 000	4/19	3/12
18 000-27 000	0/9	0/8

Tableau 5 : nombre de protéines ribosomales observées par rapport à leur nombre théorique dans les différentes fenêtres d'acquisition utilisées.

1. 2 Extraction des ribosomes

Nous avons donc testé une deuxième approche pour augmenter la visibilité de ces protéines. Arnold et al. (1999) ont utilisé deux méthodes en parallèle sur *E. coli*, la purification des ribosomes ainsi qu'une modification de la fenêtre d'acquisition du spectromètre de masse. Nous avons reproduit cette approche en utilisant la technique décrite récemment par Trauner et al. (2011). Ces auteurs ont isolé des ribosomes bactériens à partir de cultures en milieu liquide en utilisant une chromatographie en phase liquide échangeuse d'ions. L'utilisation de colonne monolithique permet d'isoler rapidement les ribosomes de la bactérie. Ceux-ci étant très basiques, ils sont retenus dans la colonne par des cations d'ammonium quaternaire. Après passage d'un tampon hypersalé, les ribosomes se décrochent et peuvent alors être recueillis.
Après dialyse et concentration, les fractions obtenues par chromatographie ont été déposées sur une plaque pour analyse MALDI. Après séchage, 1 µl de matrice (acide sinapinique) a été ajouté sur chaque puits. En effet, l'acide sinapinique est capable d'ioniser de façon plus

performante les protéines de haut poids moléculaires, permettant ainsi théoriquement d'observer plus efficacement les protéines de PM > 12 000 daltons.

Cette technique est performante puisqu'elle a permis de visualiser 34 protéines ribosomales dont 16 variables sur trois fenêtres d'analyse (Figure 12). Le spectre présenté sur la figure 12 montre l'efficacité de la purification des protéines ribosomales, grâce à la colonne monolithique qui diminue fortement le bruit de fond ainsi que l'interférence des autres protéines présentes. La 4ème fenêtre (18 000 - 27 000 m/*z*) n'a toujours pas permis d'acquérir un spectre exploitable. La détection des protéines ayant un poids moléculaire supérieur à 18 kDa est difficilement réalisable malgré l'utilisation de la technologie MALDI-TOF qui permet l'analyse des macromolécules allant jusqu'à 100 000 Da (Karas, 1987). Les deux raisons évoquées sont le manque de résolution des instruments utilisés en microbiologie clinique et une purification insuffisante du mélange bactérien. Arnold et al. (1999), en utilisant la technique du gradient de sucrose, ont pu visualiser les protéines ribosomales d'*E. coli* jusqu'à des PM de 30 000 daltons, mais au prix de six jours de manipulation.

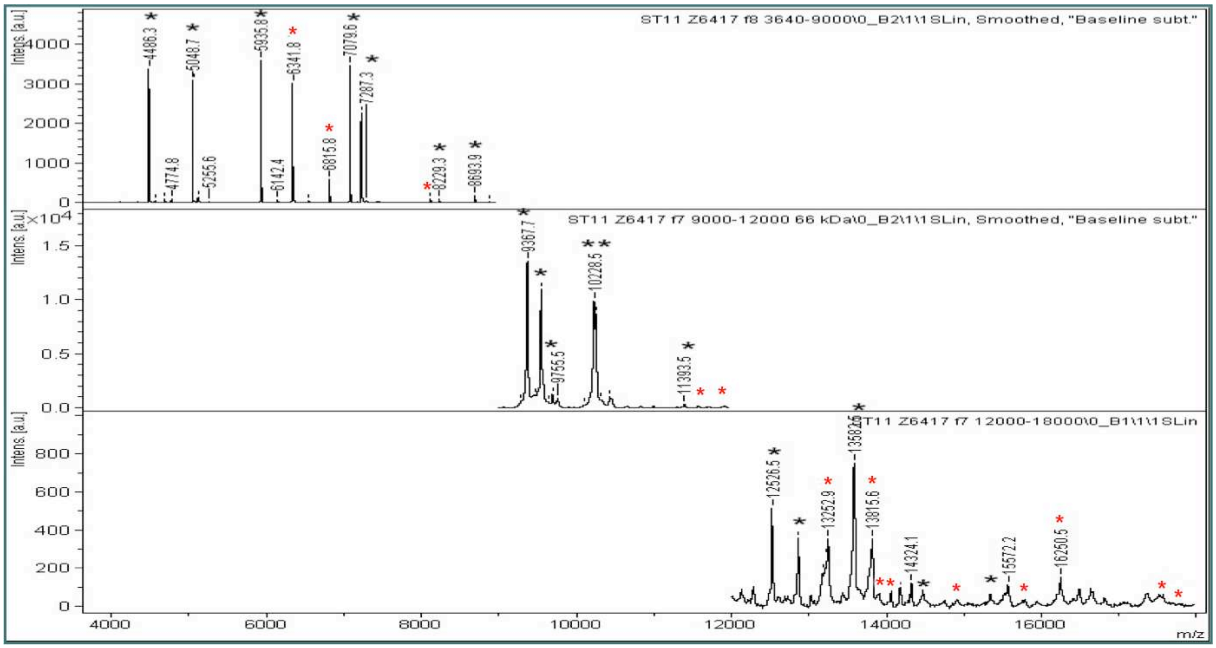


Figure 12 : spectre de *N. meningitidis* après purification des ribosomes dans trois fenêtres d'acquisition différentes.

Les protéines ribosomales sont annotées par un astérisque : noir pour les protéines stables, rouge pour les protéines variables.

Les fenêtres d'acquisition vont de 3 640 à 18 000 m/*z*, la première de 3 640 à 9 000 m/*z*, la seconde de 9 000 à 12 000 m/*z* et la troisième de 12 000 à 18 000 m/*z*.

1. 3 Comparaison des souches

Nous avons utilisé l'extraction des ribosomes couplée à l'élargissement de la fenêtre de lecture technique pour confirmer la nature variable des pics. Seules six souches de Nm ont été analysées en parallèle, appartenant à cinq ST et CC différents. En effet, en raison du coût très élevé des colonnes de chromatographie monolithique et leur usage restreint à deux souches, l'analyse n'a pu être réalisée sur la totalité des souches de l'étude. Malgré ce faible nombre, l'analyse a permis de distinguer deux ST et trois CC ainsi qu'une variation intra-ST, montrant l'efficacité de l'extraction des ribosomes.

2. Différenciation d'espèces proches : exemple de *S. pneumoniae*

Comme évoqué dans le chapitre « Performances des trois systèmes pour l'identification sur colonies », la différenciation au niveau de l'espèce entre *S. pneumoniae* et *S. mitis* est difficile par MALDI-TOF MS. Cette difficulté s'explique par une similarité très élevée de ces souches au niveau génomique (Whatmore et al., 2000). De nombreux auteurs ont montré l'efficacité du MALDI-TOF pour différencier les streptocoques *viridans* mais la plupart n'ont pas inclus le pneumocoque (Davies et al., 2012; Friedrichs et al., 2007; Schulthess et al., 2013). Ces mêmes auteurs ont rapporté des erreurs d'identification pour des streptocoques du groupe *mitis* rendant pour certaines souches l'identification erronée *S. pneumoniae*.

Nous avons constaté que les principaux biomarqueurs utilisés en MALDI-TOF pour permettre le diagnostic d'espèce sont des protéines ribosomales (Lay, 2001; Pineda et al., 2003; Ryzhov and Fenselau, 2001; Suarez et al., 2013). Par ailleurs, l'étude des variations des gènes des protéines ribosomales a permis de classer différentes souches de *S. pneumoniae* parfois jusqu'au ST (Jolley et al., 2012). Ces variations intra-espèces laissent supposer l'existence de variations de protéines ribosomales entre *S. pneumoniae* et *S. mitis*. Nous avons donc reherché ces variations d'abord par une approche bioinformatique, puis sur le spectre lui même.

2.1 Approche bioinformatique

Les séquences des protéines ribosomales de 20 souches appartenant aux espèces *S. pneumoniae* et *S. mitis* ont été analysées à partir de la base de données GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Nous avons déduit le poids moléculaire théorique de

ces protéines à partir de leurs séquences en utilisant un outil bioinformatique en ligne (http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html). Seules les protéines ribosomales dont le PM est compris entre 3 640 et 12 000 Da, correspondant à la fenêtre de lecture utilisée pour le diagnostic de routine, ont été étudiées.

S. pneumoniae et *S. mitis* possèdent 23 protéines ribosomales théoriquement présentes dans notre fenêtre d'intérêt. Une seule de ces protéines permet de faire la différence entre *S. pneumoniae et S. mitis* : c'est la protéine S14, qui a un PM de 7 085 Da chez *S. mitis* et 10 057 Da chez *S. pneumoniae*. Cependant, dans cette fenêtre, le pic spécifique de *S. pneumoniae* est difficilement répétable. Nous avons donc travaillé sur la présence (*S. mitis*) ou l'absence (*S. pneumoniae*) de la protéine ribosomale S14 pour différencier les deux espèces. L'approche bioinformatique ne tenant pas compte des modifications post traductionnelle, le PM calculé de cette protéine S14 après perte de la méthionine et retrouvé sur le spectre est de 6 955 Da au lieu de 7 085 Da.

2.2 Application au MALDI-TOF

Quarante six souches de streptocoques identifiés comme appartenant au groupe *S. pneumoniae*/*S. pseudopneumoniae*/*S. mitis* par le logiciel Andromas® ont été étudiées afin de rechercher la présence ou l'absence du pic de m/*z* 6 955. Après culture sur gélose au sang sous atmosphère enrichie en CO_2, une agglutination de l'antigène capsulaire (Slidex® pneumo-kit, bioMérieux, France), un test de sensibilité à l'optochine (diamètre d'inhibition ≥14 mm) avec et sans atmosphère enrichie en CO_2 et un test de lyse par la bile (Désoxycholate, Becton Dinckinson, Diagnostics Systèmes, France) ont été réalisés systématiquement. En cas de discordance entre les trois tests phénotypiques, ou des tests phénotypiques concordants entre eux mais discordants au regard de la présence ou de l'absence du m/*z* 6 955, des tests complémentaires de biologie moléculaire ont été effectués : la PCR autolysine (lytA) spécifique de *S. pneumoniae* (Carvalho Mda et al., 2007) et la PCR rpoB permettant de différencier les streptocoques non groupables entre eux (Drancourt et al., 2004). Pour la recherche du pic spécifique, les bactéries ont été déposées directement sur la plaque MALDI-TOF sans extraction selon le protocole d'identification habituellement utilisé dans notre laboratoire. Toutes les souches ont été analysées une deuxième fois après rajout d'un microlitre de matrice. Les résultats sont résumés dans le tableau 6.

46 souches

Antigène capsulaire	+ 22				- 23				NI 1
Optochine CO_2/O_2	S/S 20		R/R 2		S/S 2	R/S 1	R/R 20		R/R 1
Bile	+ 1	+ 19	- 1	NI 1	+ 2	+ 1	NI 19	- 1	-
Pic m/*z* 6 955	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Tests complémentaires BM	lytA – rpoB : NI	/	lytA – rpoB : *S. mitis*	lytA – rpoB : *S. mitis*	lytA +	lytA – rpoB : NI	/	lytA – rpoB : *S. mitis*	lytA – rpoB : *S. mitis*
Identification finale	NI	*S. pn*	*S. mitis*	*S. mitis*	*S. pn*	NI	*S. mitis*	*S. mitis*	*S. mitis*

S. pn : *S. pneumoniae* S : sensible ; R : résistant ; NI : non interprétable ; BM : biologie moléculaire

Tableau 6 : caractéristiques phénotypiques, génotypiques et spectrales des 46 souches identifiées par MALDI-TOF comme appartenant au groupe *S. pneumoniae*/*S. pseudopneumoniae*/*S. mitis*

La combinaison des tests phénotypiques et génotypiques a permis d'identifier 23 souches de *S. mitis*, dont 21 possédaient le pic de m/*z* 6 955 représentant la protéine ribosomale S14. Ce pic était également présent chez une souche possédant l'antigène capsulaire, sensible à l'optochine et lysée par la bile, mais dont la PCR lytA était négative, mettant en doute l'identification phénotypique du pneumocoque. La PCR rpoB n'ayant pas donné de résultat interprétable, l'utilisation d'autres gènes serait nécessaire pour identifier cette souche (par exemple la recombinase A : recA).

Le pic m/*z* 6 955 n'a pas été retrouvé sur le spectre des 21 souches identifiées comme *S. pneumoniae*. Ce pic était également absent chez une souche résistante à l'optochine sous CO_2 mais sensible en atmosphère aérobie, faisant évoquer l'espèce *S. pseudopneumoniae*. La PCR rpoB n'ayant pas donné de résultat, dans ce cas aussi d'autres amorces seront nécessaires pour identifier formellement la souche. Au total, si l'on ne tient pas compte des deux souches dont l'identification reste à compléter, le diagnostic de *S. pneumoniae* au sein des souches testées, sur la base d'un seul pic, a une sensibilité de 100% et une spécificité de 91,3%. Ces données sont préliminaires et doivent être affinées sur un panel plus important de souches.

Les résultats que nous avons obtenus sont issus d'un protocole sans extraction. Une extraction aurait peut-être permis de faire apparaître le pic absent chez deux souches de *S. mitis* de notre étude. Il semble en effet qu'une étape d'extraction protéique puisse augmenter les performances de l'identification des streptocoques dont *S. pneumoniae* (Alatoom et al., 2011). Cependant, tout récemment, Dubois et al. (2013) ont pu identifier correctement au niveau de l'espèce 331/334 souches de *S. pneumoniae*, pour la majorité sans extraction préalable. Dans cette étude réalisée avec le système Vitek/MS, le ou les pics permettant cette différenciation n'ont pas été précisés.

Les résultats de notre étude sont compatibles avec les données récentes des équipes de Werno et al. (2012) et Ikryannikova et al. (2012) : en utilisant le système Bruker après extraction des souches, ils ont mis en évidence visuellement ou à l'aide d'algorithmes spéciaux une combinaison de pics permettant de distinguer *S. pneumoniae*, *S. mitis* et une autre espèce du groupe *mitis* (*S. pseudopneumoniae* ou *Streptococcus oralis* selon les auteurs). Dans ces deux études, seulement un pic, de valeur m/*z* 6 955 (Werno et al., 2012) et 6 949 (Ikryannikova et al., 2012), est commun aux deux combinaisons proposées. Il est présent chez *S. mitis* et absent chez *S. pneumoniae et S. pseudopneumoniae* Nous avons constaté que ce pic correspond à la protéine S14 utilisée dans notre étude.

Discussion et perspectives

L'utilisation de la spectrométrie de masse en microbiologie a débuté il y a 25 ans. Une quinzaine d'années plus tard, la technologie MALDI-TOF MS s'est implantée dans les laboratoires de microbiologie clinique. Depuis, la rapidité et la fiabilité du diagnostic des micro-organismes en culture par spectrométrie de masse ne sont plus à démontrer. Le but de mon travail a été de mettre au point de nouvelles techniques basées sur cette spectrométrie afin d'enrichir les possibilités diagnostiques du MALDI-TOF. Les grands axes de ce projet ont été d'une part la mise au point d'un diagnostic d'espèce à partir de milieux de culture liquides (par exemple les hémocultures), d'autre part de caractériser les biomarqueurs spectraux à l'origine du diagnostic d'espèce des micro-organismes, et enfin d'étudier la possibilité de se servir des variations des protéines du spectre de masse pour comparer des souches au sein d'une même espèce ou appartenant à des espèces très proches.

La recherche d'un diagnostic d'espèce à partir des hémocultures a fait l'objet de nombreux essais, qui nous ont conduit à proposer un diagnostic basé sur une simple lyse des hématies avec de la saponine, permettant d'obtenir une identification au niveau de l'espèce dans 91% des cas en moins de 20 minutes après la positivité du flacon (Ferroni et al., 2010). Depuis, notre équipe a confirmé son efficacité au cours de son utilisation en routine, avec l'obtention d'un bon diagnostic d'espèce dans 91,4% des cas sur 162 hémocultures monomicrobiennes (Bille et al., 2012). La technique est maintenant commercialisée par la société Andromas (Paris, France) sous le nom de A Must® (Andromas Maldi Universal Sepsis Test).

Depuis la publication de ce travail, de nombreux auteurs ont décrit des études montrant des performances de diagnostic d'espèce allant de 62,5% à 97,5% en routine (Kroumova et al., 2011; Nonnemann et al., 2013). Les performances du diagnostic des hémocultures positives sont difficiles à comparer entre les différentes équipes compte tenu des nombreuses différences, que ce soit dans les procédés utilisés pour l'élimination des produits humains, les types de spectromètres de masse, la composition des bases de données, le système expert (Tableau 4). Cependant, les résultats obtenus avec l'autre kit commercialisé, Sepsityper® (Bruker daltonics), sont identiques à ceux obtenus par Andromas, excepté pour les staphylocoques à coagulase négative dont l'identification d'espèce atteint 75,4% avec Bruker (Juiz et al., 2012), versus 93,4% pour Andromas (Bille et al., 2012). L'utilisation du kit Sepsistyper® requiert en moyenne un délai plus long de 20 min par rapport au kit Andromas Maldi Universal Sepsis Test® et nécessite une extraction protéique (Buchan et al., 2012; Jamal et al., 2013; Kok et al., 2011; Lagace-Wiens et al., 2012). D'autres équipes ont cherché des procédés plus performants pour éliminer les composés sanguins, mais leurs techniques demandent le plus souvent du matériel spécifique (rampe de filtration) ou sont incompatibles

avec le flux d'un laboratoire de routine (Foster, 2013; Fothergill et al., 2013). Malgré l'existence de kits commercialisés, certains utilisent encore des méthodes maison, très peu coûteuses (Chen et al., 2013).
La spectrométrie sur les hémocultures positives permet donc, grâce à l'instauration d'un traitement initial ciblé sur l'espèce identifiée 18 à 24 h plus tôt, la diminution de l'usage d'antibiotiques à large spectre souvent inadéquats, favorisant ainsi la réduction du développement potentiel de résistances. L'idéal dans l'avenir serait d'utiliser en parallèle soit un kit de détection rapide des résistances à partir des hémocultures (Genexpert® MRSA (Clerc et al., 2013), betaLACTA™ test (Vrioni and Mamali, 2013)), soit la recherche sur le spectre de pics caractéristiques d'un mécanisme de résistance comme cela a été montré sur les colonies (cf chapitre « 5.6 Détection de la résistance à certains antibiotiques »).

La deuxième partie de mon travail a consisté à caractériser et à exploiter les pics présents sur le spectre bactérien. Nous nous sommes d'abord intéressés aux biomarqueurs du logiciel Andromas®, choisis comme potentiellement spécifiques d'espèce car reproductibles. En prenant comme exemple *N. meningitidis*, nous avons montré que la quasi totalité de ces biomarqueurs étaient des protéines ribosomales. Dès le début de la spectrométrie de masse appliquée à l'identification bactérienne, Pineda et al. (2003), par une approche génomique, avaient décrit la nature ribosomale des biomarqueurs servant au diagnostic d'espèce. Par la suite Sun et al. (2006) ont isolé les ribosomes de *Lactobacillus plantarum* pour confirmer la nature des biomarqueurs spécifiques de cette bactérie. L'originalité de notre démarche, outre le fait qu'elle a permis de déterminer les biomarqueurs d'une base de données à usage clinique, tient dans l'utilisation de deux approches en parallèle, génomique et protéomique, pour les caractériser. Notre approche protéomique grâce à la LC-MS/MS a eu l'avantage de donner une plus grande précision sur la nature des biomarqueurs.

Les protéines ribosomales que nous avons retrouvées en majorité sur le spectre de masse bactérien sont des protéines de « ménage » qui se trouvent à des stades différents de l'évolution bactérienne. Bien que la séquence génomique de ces protéines soit très conservée, ce qui nous permet de les utiliser comme marqueurs d'espèces, de petites variations intra-espèces ont été mise en évidence, permettant ainsi une classification phylogénétique comme cela a été montré pour l'espèce *S. pneumoniae* (Jolley et al. 2012). L'exploitation de cette variation, non plus au niveau génomique, mais sur un spectre de masse, nous a paru séduisante. En effet, le principal écueil à la comparaison de spectres bruts est la grande

variabilité des profils, due à une mauvaise reproductibilité des spectres inhérente à la technique, n'empêchant pas le diagnostic d'espèce mais rendant aléatoire le typage de souches au sein d'une même espèce. Même si les conditions expérimentales arrivent à être standardisées, permettant alors d'obtenir des spectres reproductibles, cette comparaison ne peut donner qu'une classification « chimio taxonomique », alors que la comparaison des protéines ribosomales est à l'origine d'une classification phylogénétique.

Les variations de certaines protéines ribosomales sont observables après extraction protéique sur le spectre de masse servant à l'identification du pathogène (Ilina et al., 2009). Ainsi, lors du passage d'une souche en MALDI-TOF MS, l'identification bactérienne peut permettre d'obtenir des indications épidémiologiques. Dans notre étude, nous avons montré la possibilité de déterminer six CC dont le complexe ST 41/44 qui est le plus fréquemment retrouvé dans les infections à méningocoques en France en 2011 (Parent du Chatelet et al., 2012).

Le concept proposé de comparaison de protéines ribosomales est ainsi identique à celui de la MLST. Il pourrait permettre théoriquement une exportation et une comparaison de données, indépendamment des conditions de culture.

Cependant, comme peu de protéines ribosomales variables étaient visibles directement sur la fenêtre utilisée pour le diagnostic à partir de bactéries entières, dans la dernière partie des travaux présentés, nous nous sommes orientés sur une adaptation de la méthode d'analyse sur le spectromètre de masse et une purification des ribosomes. Cette purification a en effet été utilisée par d'autres équipes pour typer ou différencier des bactéries au sein d'une même espèce par MALDI-TOF. Ainsi, Suh et al. (2005) ont montré par cette méthode des différences entre plusieurs souches de *Thermus thermophilus*. D'autres auteurs, en analysant par MALDI-TOF les variations de PM des protéines ribosomales de *P. putida* extraites par gradient de sucrose, ont mis en évidence deux clusters concordants avec ceux obtenus par le séquençage du gène gyrB (Teramoto et al., 2007). Toujours par comparaison avec la séquence gyrB, cette même équipe a réalisé une étude phyloprotéomique basée sur l'observation des variations des protéines ribosomales pour l'espèce *R. erythropolis* (Teramoto et al., 2009).

Cependant, les deux équipes ont utilisé des techniques d'extraction longues et fastidieuses. Nous avons utilisé dans notre étude une colonne monolithique efficace et plus simple à utiliser, mais cette technique est onéreuse et reste inapplicable en routine.

La difficulté de cette nouvelle approche de comparaison de souches réside donc dans la recherche d'une simplification de la préparation des protéines, de façon à pouvoir exploiter un grand nombre de souches au même moment, par exemple dans un contexte d'épidémie

hospitalière. L'idéal, pour un véritable apport à l'épidémiologie hospitalière et à la prévention des infections nosocomiales, serait en effet de pouvoir typer les souches responsables d'épidémies au moment même de leur identification. Une piste méthodologique à explorer serait l'utilisation d'une technique de lyse cellulaire mécanique à partir d'une culture en milieu liquide, comme le FastPrep® (MP Biomedicals, Illkirch, France) suivie d'une centrifugation lente, qui pourrait permettre de mettre suffisamment de protéines ribosomales en évidence pour typer les bactéries.
Si une simplification est possible, la méthode proposée sera potentiellement applicable à la classification phylogénétique de toutes les bactéries, puisque toutes les espèces contiennent de nombreuses protéines ribosomales. Par contre, il est indispensable au préalable de connaître pour chaque espèce étudiée le degré de variation de ses protéines ribosomales.

Suite à ce travail, nous avons voulu analyser l'apport de la connaissance des protéines ribosomales dans la différenciation par spectrométrie de masse, actuellement difficile, d'espèces très proches comme *S. pneumoniae* et *S. mitis*.
Après une étude bioinformatique préliminaire, nous avons pu mettre en évidence dans notre fenêtre habituelle d'analyse la protéine ribosomale S14 correspondant à un pic de valeur m/z 6 955, présente chez *S. mitis* dans 91% des cas, et absente chez *S. pneumoniae* dans 100% des cas. Ces premiers résultats sur le système Andromas sans extraction préalable montrent donc la possibilité, grâce à l'analyse d'un seul pic, de différencier *S. pneumoniae* des autres espèces du groupe *mitis* dès le premier jour de culture. Ces données très encourageantes nous incitent à travailler actuellement sur un panel beaucoup plus complet de souches pour vérifier la bonne spécificité de ce biomarqueur, et rechercher d'autres pics d'intérêts correspondant à des protéines ribosomales constantes, permettant de différencier les autres espèces de ce groupe, notamment *S. pseudopneumoniae*.

En conclusion, ce travail sur la spectrométrie MALDI-TOF m'a permis de constater que l'identification d'espèce utilisant des bases de données peut s'affiner par l'utilisation de biomarqueurs spécifiques choisis parmi les protéines ribosomales spécifiques d'espèce. La comparaison au niveau de la souche au sein d'une même espèce pourra tirer profit de la variabilité d'autres protéines ribosomales.

Bibliographie

Ackermann, B.L., Hale, J.E., Duffin, K.L., 2006. The role of mass spectrometry in biomarker discovery and measurement. Current drug metabolism. 7, 525-539.

Alanio, A., Beretti, J.L., Dauphin, B., Mellado, E., Quesne, G., Lacroix, C., Amara, A., Berche, P., Nassif, X., Bougnoux, M.E., 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant Aspergillus species. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 17, 750-755.

Alatoom, A.A., Cunningham, S.A., Ihde, S.M., Mandrekar, J., Patel, R., 2011. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 49, 2868-2873.

Albrethsen, J., 2007. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. Clinical chemistry. 53, 852-858.

Almeida, C., Sousa, J.M., Rocha, R., Cerqueira, L., Fanning, S., Azevedo, N.F., Vieira, M.J., 2013. Detection of Escherichia coli O157 using PNA-FISH: comparison to a standard culture method. Applied and environmental microbiology.

Alshawa, K., Beretti, J.L., Lacroix, C., Feuilhade, M., Dauphin, B., Quesne, G., Hassouni, N., Nassif, X., Bougnoux, M.E., 2012. Successful identification of clinical dermatophyte and Neoscytalidium species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 50, 2277-2281.

Alvarez-Buylla, A., Picazo, J.J., Culebras, E., 2013. Optimized method for Acinetobacter species carbapenemase detection and identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 51, 1589-1592.

Andersen, J.S., Svensson, B., Roepstorff, P., 1996. Electrospray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. Nature biotechnology. 14, 449-457.

Arnold, R.J., Karty, J.A., Ellington, A.D., Reilly, J.P., 1999. Monitoring the growth of a bacteria culture by MALDI-MS of whole cells. Analytical chemistry. 71, 1990-1996.

Arnold, R.J., Karty, J.A., Reilly, J.P., 2006. Bacterial strain differentiation by mass spectrometry. In: C. L. Wilkins, J. O. Lay (Eds.), Idenitification of microorganisms by mass spectrometry.

Arnold, R.J., Reilly, J.P., 1998. 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 communications in mass spectrometry : RCM. 12, 630-636.

Arnold, R.J., Reilly, J.P., 1999. Observation of Escherichia coli ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. Analytical biochemistry. 269, 105-112.
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. Applied and environmental microbiology. 74, 5402-5407.

Barbuddhle, 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. Applied and environmental microbiology. 74, 5402-5407.

Bernardo, K., Pakulat, N., Macht, M., Krut, O., Seifert, H., Fleer, S., Hunger, F., Kronke, M., 2002. Identification and discrimination of Staphylococcus aureus strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. Proteomics. 2, 747-753.

Bessede, E., Angla-Gre, M., Delagarde, Y., Sep Hieng, S., Menard, A., Megraud, F., 2011. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University hospital. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 17, 533-538.

Biemann, K., Cone, C., Webster, B.R., Arsenault, G.P., 1966. Determination of the amino acid sequence in oligopeptides by computer interpretation of their high-resolution mass spectra. Journal american chemistry society. 88, 5598-5606.

Bille, E., Dauphin, B., Leto, J., Bougnoux, M.E., Beretti, J.L., Lotz, A., Suarez, S., Meyer, J., Join-Lambert, O., Descamps, P., Grall, N., Mory, F., Dubreuil, L., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A., 2012. MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, Aspergillus spp. and positive blood cultures. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 18, 1117-1125.

Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., Prod'hom, G., 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. Journal of clinical microbiology. 48, 1549-1554.

Bizzini, A., Jaton, K., Romo, D., Bille, J., Prod'hom, G., Greub, G., 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. Journal of clinical microbiology. 49, 693-696.

Blondiaux, N., Gaillot, O., Courcol, R.J., 2010. [MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in a teaching hospital in Lille]. Pathologie-biologie. 58, 55-57.

Brehony, C., Jolley, K.A., Maiden, M.C., 2007. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. FEMS microbiology reviews. 31, 15-26.

Bright, J.J., Claydon, M.A., Soufian, M., Gordon, D.B., 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. Journal of microbiological methods. 48, 127-138.

Buchan, B.W., Riebe, K.M., Ledeboer, N.A., 2012. Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. Journal of clinical microbiology. 50, 346-352.

Burckhardt, I., Zimmermann, S., 2011. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. Journal of clinical microbiology. 49, 3321-3324.

Butler, D.A., Lobregat, C.M., Gavan, T.L., 1975. Reproducibility of the analytab (API 20E) system. Journal of clinical microbiology. 2, 322-326.

Cain, T.C., Lubman, D.M., Weber, W.J., Vertes, A., 1994. Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. Rapid comm mass spectrom. 12, 1026-1030.

Camara, J.E., Hays, F.A., 2007. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant Eschericha coli by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Analytical and bioanalytical chemistry. 389, 1633-1638.

Carbonnelle, B., Denis, F., Marmonier, A., Pinon, G., Vargues, R., 1987. Bactériologie médicale Techniques Usuelles, SIMEP-MASSON Paris.

Carbonnelle, E., Beretti, J.L., Cottyn, S., Quesne, G., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A., 2007. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 45, 2156-2161.

Carvalho Mda, G., Tondella, M.L., McCaustland, K., Weidlich, L., McGee, L., Mayer, L.W., Steigerwalt, A., Whaley, M., Facklam, R.R., Fields, B., Carlone, G., Ades, E.W., Dagan, R., Sampson, J.S., 2007. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting lytA, ply, and psaA genes for detection of pneumococcal DNA. Journal of clinical microbiology. 45, 2460-2466.

Chace, D.H., Millington, D.S., Terada, N., Kahler, S.G., Roe, C.R., Hofman, L.F., 1993. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. Clinical chemistry. 39, 66-71.

Chen, J.H., Ho, P.L., Kwan, G.S., She, K.K., Siu, G.K., Cheng, V.C., Yuen, K.Y., Yam, W.C., 2013. Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. Journal of clinical microbiology. 51, 1733-1739.

Chen, J.H., Yam, W.C., Ngan, A.H., Fung, A.M., Woo, W.L., Yan, M.K., Choi, G.K., Ho, P.L., Cheng, V.C., Yuen, K.Y., 2013. Advantages of using MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for yeast and mycobacteria identification in clinical microbiological laboratory. Journal of clinical microbiology.

Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P., Schrenzel, J., 2010. 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. Journal of clinical microbiology. 48, 1169-1175.

Christner, M., Rohde, H., Wolters, M., Sobottka, I., Wegscheider, K., Aepfelbacher, M., 2010. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assited laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. Journal of clinical microbiology. 48, 1584-1591.

Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, D.M., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clinical microbiology reviews. 26, 547-603.

Clark, C.G., Kruczkiewicz, P., Guan, C., McCorrister, S.J., Chong, P., Wylie, J., van Caeseele, 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. Journal of microbiological methods. 94, 180-191.

Clarridge, J.E., 3rd, 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clinical microbiology reviews. 17, 840-862, table of contents.

Claydon, M.A., Davey, S.N., Edwards-Jones, V., Gordon, D.B., 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nature biotechnology. 14, 1584-1586.

Clerc, O., Prod'hom, G., Senn, L., Jaton, K., Zanetti, G., Calandra, T., Greub, G., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR-based rapid diagnosis of Staphylococcus aureus bacteraemia. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS microbiology reviews. 36, 380-407.

Dai, Y., Li, L., Roser, D.C., Long, S.R., 1999. Detection and identification of low-mass peptides and proteins from solvent suspensions of Escherichia coli by high performance liquid chromatography fractionation and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 13, 73-78.

Davies, A.P., Reid, M., Hadfield, S.J., Johnston, S., Mikhail, J., Harris, L.G., Jenkinson, H.F., Berry, N., Lewis, A.M., El-Bouri, K., Mack, D., 2012. Identification of clinical isolates of alpha-hemolytic streptococci by 16S rRNA gene sequencing, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using MALDI Biotyper, and conventional phenotypic methods: a comparison. Journal of clinical microbiology. 50, 4087-4090.

Degand, N., Carbonnelle, E., Dauphin, B., Beretti, J.L., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Segonds, C., Berche, P., Nassif, X., Ferroni, A., 2008. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. Journal of clinical microbiology. 46, 3361-3367.

Demirev, P.A., 2004. Enhanced specificity of bacterial spore identification by oxidation and mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 18, 2719-2722.

Demirev, P.A., Feldman, A.B., Kowalski, P., Lin, J.S., 2005. Top-down proteomics for rapid identification of intact microorganisms. Analytical chemistry. 77, 7455-7461.

Demirev, P.A., Ho, Y.P., Ryzhov, V., Fenselau, C., 1999. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches. Analytical chemistry. 71, 2732-2738.

Demptser, A.J., 1918. A new method of positive ray analysos. Physical Revue. 11, 315-316.

Diamandis, E.P., 2004. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. Molecular & cellular proteomics : MCP. 3, 367-378.

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. Applied and environmental microbiology. 74, 7767-7778.

Dieckmann, R., Malorny, B., 2011. Rapid screening of epidemiologically important Salmonella enterica subsp. enterica serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Applied and environmental microbiology. 77, 4136-4146.

Domin, M.A., Welham, K.J., Ashton, D.S., 1999. The effect of solvent and matrix combinations on the analysis of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 13, 222-226.

Donohue, M.J., Smallwood, A.W., Pfaller, S., Rodgers, M., Shoemaker, J.A., 2006. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of Aeromonas species using whole cells. Journal of microbiological methods. 65, 380-389.

Drancourt, M., Roux, V., Fournier, P.E., Raoult, D., 2004. rpoB gene sequence-based identification of aerobic Gram-positive cocci of the genera Streptococcus, Enterococcus, Gemella, Abiotrophia, and Granulicatella. Journal of clinical microbiology. 42, 497-504.

Drevinek, M., Dresler, J., Klimentova, J., Pisa, L., Hubalek, M., 2012. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. Letters in applied microbiology. 55, 40-46.

Du, Z., Yang, R., Guo, Z., Song, Y., Wang, J., 2002. Identification of Staphylococcus aureus and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Analytical chemistry. 74, 5487-5491.

Dubois, D., Segonds, C., Prere, M.F., Marty, N., Oswald, E., 2013. Identification of clinical Streptococcus pneumoniae isolates among other alpha and nonhemolytic streptococci by use of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. Journal of clinical microbiology. 51, 1861-1867.

Dupont, C., Sivadon-Tardy, V., Bille, E., Dauphin, B., Beretti, J.L., Alvarez, A.S., Degand, N., Ferroni, A., Rottman, M., Herrmann, J.L., Nassif, X., Ronco, E., Carbonnelle, E., 2010. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16, 998-1004.

Edwards-Jones, V., Claydon, M.A., Evason, D.J., Walker, J., Fox, A.J., Gordon, D.B., 2000. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry. Journal of medical microbiology. 49, 295-300.

Eigner, U., Holfelder, M., Oberdorfer, K., Betz-Wild, U., Bertsch, D., Fahr, A.M., 2009. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. Clinical laboratory. 55, 289-296.

Emonet, S., Shah, H.N., Cherkaoui, A., Schrenzel, J., 2010. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16, 1604-1613.

Evason, D.J., Claydon, M.A., Gordon, D.B., 2000. Effects of ion mode and matrix additives in the identification of bacteria by intact cell mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 14, 669-672.

Fagerquist, C.K., Bates, A.H., Heath, S., King, B.C., Garbus, B.R., Harden, L.A., Miller, W.G., 2006. Sub-speciating Campylobacter jejuni by proteomic analysis of its protein biomarkers and their post-translational modifications. Journal of proteome research. 5, 2527-2538.

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. Analytical chemistry. 82, 2717-2725.

Farfour, E., Leto, J., Barritault, M., Barberis, C., Meyer, J., Dauphin, B., Le Guern, A.S., Lefleche, A., Badell, E., Guiso, N., Leclercq, A., Le Monnier, A., Lecuit, M., Rodriguez-Nava, V., Bergeron, E., Raymond, J., Vimont, S., Bille, E., Carbonnelle, E., Guet-Revillet, H., Lecuyer, H., Beretti, J.L., Vay, C., Berche, P., Ferroni, A., Nassif, X., Join-Lambert, O., 2012. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. Journal of clinical microbiology. 50, 2702-2707.

Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science (New York, N.Y.). 246, 64-71.

Fenselau, C., Demirev, P.A., 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. Mass spectrometry reviews. 20, 157-171.

Fernandez-Olmos, A., Morosini, M.I., Lamas, A., Garcia-Castillo, M., Garcia-Garcia, L., Canton, R., Maiz, L., 2012. Clinical and microbiological features of a cystic fibrosis patient chronically colonized with Pandoraea sputorum identified by combining 16S rRNA sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 50, 1096-1098.

Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Gonzalez-Avila, M., Cembrero-Fucinos, D., Herrero-Hernandez, A., Gonzalez-Buitrago, J.M., Munoz-Bellido, J.L., 2010. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 48, 2110-2115.

Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Munoz-Bellido, J.L., Gonzalez-Buitrago, J.M., 2011. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 17, 1007-1012.

Ferroni, A., Suarez, S., Bille, E., Dauphin, B., Beretti, J.L., Nassif, X., 2011. Spectrométrie de masse et hémocultures : un nouvel outil de diagnostic immédiat. Biotribune. 40, 31-36.

Ferroni, A., Suarez, S., Beretti, J.L., Dauphin, B., Bille, E., Meyer, J., Bougnoux, M.E., Alanio, A., Berche, P., Nassif, X., 2010. Real-time identification of bacteria and Candida species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 48, 1542-1548.

Forrest, G.N., 2007. PNA FISH: present and future impact on patient management. Expert review of molecular diagnostics. 7, 231-236.

Foster, A.W., 2013. Rapid identification of microbes in positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (Maldi-Tof) mass spectrometry- (Vitek MS --bioMerieux.). Journal of clinical microbiology.

Fothergill, A., Kasinathan, V., Hyman, J., Walsh, J., Drake, T., Wang, Y.F., 2013. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive-blood-culture bottles by using a lysis-filtration method and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum analysis with the SARAMIS database. Journal of clinical microbiology. 51, 805-809.

Friedrichs, C., Rodloff, A.C., Chhatwal, G.S., Schellenberger, W., Eschrich, K., 2007. Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. Journal of clinical microbiology. 45, 2392-2397.

Fujinami, Y., Kikkawa, H.S., Kurosaki, Y., Sakurada, K., Yoshino, M., Yasuda, J., 2011. Rapid discrimination of Legionella by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Microbiological research. 166, 77-86.

Garner, O., Mochon, A., Branda, J., Burnham, C.A., Bythrow, M., Ferraro, M., Ginocchio, C., Jennemann, R., Manji, R., Procop, G.W., Richter, S., Rychert, J., Sercia, L., Westblade, L., Lewinski, M., 2013. Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK MS system. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Gavin, P.J., Warren, J.R., Obias, A.A., Collins, S.M., Peterson, L.R., 2002. Evaluation of the Vitek 2 system for rapid identification of clinical isolates of gram-negative bacilli and members of the family Streptococcaceae. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 21, 869-874.

Gaydos, C.A., Van Der Pol, B., Jett-Goheen, M., Barnes, M., Quinn, N., Clark, C., Daniel, G.E., Dixon, P.B., Hook, E.W., 3rd, 2013. Performance of the Cepheid CT/NG Xpert Rapid PCR Test for Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Journal of clinical microbiology. 51, 1666-1672.

Goering, R.V., 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 10, 866-875.

Goyer, M., Lucchi, G., Ducoroy, P., Vagner, O., Bonnin, A., Dalle, F., 2012. Optimization of the preanalytical steps of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification provides a flexible and efficient tool for identification of clinical yeast isolates in medical laboratories. Journal of clinical microbiology. 50, 3066-3068.

Gravet, A., Camdessoucens-Miehe, G., Gessier, M., Peluso, A.R., Vogelsperger-Fuchs, B., Lohmann, C., Schmitt, F., Delarbre, J.M., 2011. [The use in routine of mass spectrometry in a hospital microbiology laboratory]. Pathologie-biologie. 59, 19-25.

Griffin, P.M., Price, G.R., Schooneveldt, J.M., Schlebusch, S., Tilse, M.H., Urbanski, T., Hamilton, B., Venter, D., 2012. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. Journal of clinical microbiology. 50, 2918-2931.

Haag, A.M., Taylor, S.N., Johnston, K.H., Cole, R.B., 1998. Rapid identification and speciation of Haemophilus bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Journal of mass spectrometry : JMS. 33, 750-756.

Hillenkamp, F., Karas, M., 1990. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. Methods in enzymology. 193, 280-295.

Holland, R.D., Duffy, C.R., Rafii, F., Sutherland, J.B., Heinze, T.M., Holder, C.L., Voorhees, K.J., Lay, J.O., Jr., 1999. Identification of bacterial proteins observed in MALDI TOF mass spectra from whole cells. Analytical chemistry. 71, 3226-3230.

Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J., Lay, J.O., Jr., 1996. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 10, 1227-1232.

Hopprich, R., Shephard, L., Taing, B., Kralj, S., Smith, A., Lumb, R., 2012. Evaluation of (SD) MPT64 antigen rapid test, for fast and accurate identification of Mycobacterium tuberculosis complex. Pathology. 44, 642-643.

Hrabak, J., Chudackova, E., Walkova, R., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. Clinical microbiology reviews. 26, 103-114.

Hrabak, J., Studentova, V., Walkova, R., Zemlickova, H., Jakubu, V., Chudackova, E., Gniadkowski, M., Pfeifer, Y., Perry, J.D., Wilkinson, K., Bergerova, T., 2012. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 50, 2441-2443.

Hrabak, J., Walkova, R., Studentova, V., Chudackova, E., Bergerova, T., 2011. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 49, 3222-3227.

Hulton, C.S., Higgins, C.F., Sharp, P.M., 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterobacteria. Molecular microbiology. 5, 825-834.

Ikryannikova, L.N., Filimonova, A.V., Malakhova, M.V., Savinova, T., Filimonova, O., Ilina, E.N., Dubovickaya, V.A., Sidorenko, S.V., Govorun, V.M., 2012. Discrimination between Streptococcus pneumoniae and Streptococcus mitis based on sorting of their MALDI mass spectra. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Ilina, E.N., Borovskaya, A.D., Malakhova, M.M., Vereshchagin, V.A., Kubanova, A.A., Kruglov, A.N., Svistunova, T.S., Gazarian, A.O., Maier, T., Kostrzewa, M., Govorun, V.M., 2009. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic Neisseria. The Journal of molecular diagnostics : JMD. 11, 75-86.

Jackson, K.A., Edwards-Jones, V., Sutton, C.W., Fox, A.J., 2005. Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of microbiological methods. 62, 273-284.

Jamal, W., Saleem, R., Rotimi, V.O., 2013. Rapid identification of pathogens directly from blood culture bottles by Bruker matrix-assisted laser desorption laser ionization-time of flight mass spectrometry versus routine methods. Diagnostic microbiology and infectious disease. 76, 404-408.

Jarman, K.H., Cebula, S.T., Saenz, A.J., Petersen, C.E., Valentine, N.B., Kingsley, M.T., Wahl, K.L., 2000. An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Analytical chemistry. 72, 1217-1223.

Jolley, K.A., Bliss, C.M., Bennett, J.S., Bratcher, H.B., Brehony, C., Colles, F.M., Wimalarathna, H., Harrison, O.B., Sheppard, S.K., Cody, A.J., Maiden, M.C., 2012. Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. Microbiology (Reading, England). 158, 1005-1015.

Josten, M., Reif, M., Szekat, C., Al-Sabti, N., Roemer, T., Sparbier, 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. Journal of clinical microbiology. 51, 1809-1817.

Juiz, P.M., Almela, M., Melcion, C., Campo, I., Esteban, C., Pitart, C., Marco, F., Vila, J., 2012. A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS. European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 31, 1353-1358.

Kaleta, E.J., Clark, A.E., Johnson, D.R., Gamage, D.C., Wysocki, V.H., Cherkaoui, A., Schrenzel, J., Wolk, D.M., 2011. Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. Journal of clinical microbiology. 49, 345-353.

Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F., 1987. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc. 78, 53-68.

Karger, A., Ziller, M., Bettin, B., Mintel, B., Schares, S., Geue, L., 2011. Determination of serotypes of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates by intact cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Applied and environmental microbiology. 77, 896-905.

Kawada, M., Annaka, M., Kato, H., Shibasaki, S., Hikosaka, K., Mizuno, H., Masuda, Y., Inamatsu, T., 2011. Evaluation of a simultaneous detection kit for the glutamate dehydrogenase antigen and toxin A/B in feces for diagnosis of Clostridium difficile infection. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy. 17, 807-811.

Keim, P., Van Ert, M.N., Pearson, T., Vogler, A.J., Huynh, L.Y., Wagner, D.M., 2004. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 4, 205-213.

Keys, C.J., Dare, D.J., Sutton, H., Wells, G., Lunt, M., McKenna, T., McDowall, M., Shah, H.N., 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 4, 221-242.

Kohling, H.L., Bittner, A., Muller, K.D., Buer, J., Becker, M., Rubben, H., Rettenmeier, A.W., Mosel, F., 2012. Direct identification of bacteria in urine samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and relevance of defensins as interfering factors. Journal of medical microbiology. 61, 339-344.

Kok, J., Thomas, L.C., Olma, T., Chen, S.C., Iredell, J.R., 2011. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry. PloS one. 6, e23285.

Krause, E., Wenschuh, H., Jungblut, P.R., 1999. The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. Analytical chemistry. 71, 4160-4165.

Krishnamurthy, T., Ross, P.L., Rajamani, U., 1996. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 10, 883-888.

Kroumova, V., Gobbato, E., Basso, E., Mucedola, L., Giani, T., Fortina, G., 2011. Direct identification of bacteria in blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new methodological approach. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 25, 2247-2249.

Kumar, M.P., Vairamani, M., Raju, R.P., Lobo, C., Anbumani, N., Kumar, C.P., Menon, T., Shanmugasundaram, S., 2004. Rapid discrimination between strains of beta haemolytic streptococci by intact cell mass spectrometry. The Indian journal of medical research. 119, 283-288.

La Scola, B., Raoult, D., 2009. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. PloS one. 4, e8041.

Lagace-Wiens, P.R., Adam, H.J., Karlowsky, J.A., Nichol, K.A., Pang, P.F., Guenther, J., Webb, A.A., Miller, C., Alfa, M.J., 2012. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. Journal of clinical microbiology. 50, 3324-3328.

Lartigue, M.F., Kostrzewa, M., Salloum, M., Haguenoer, E., Hery-Arnaud, G., Domelier, A.S., Stumpf, S., Quentin, R., 2011. Rapid detection of "highly virulent" Group B Streptococcus ST-17 and emerging ST-1 clones by MALDI-TOF mass spectrometry. Journal of microbiological methods. 86, 262-265.

Lay, J.O., Jr., 2001. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. Mass spectrometry reviews. 20, 172-194.

Lotz, A., Ferroni, A., Beretti, J.L., Dauphin, B., Carbonnelle, E., Guet-Revillet, H., Veziris, N., Heym, B., Jarlier, V., Gaillard, J.L., Pierre-Audigier, C., Frapy, E., Berche, P., Nassif, X., Bille, E., 2010. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 48, 4481-4486.

Madonna, A.J., Basile, F., Ferrer, I., Meetani, M.A., Rees, J.C., Voorhees, K.J., 2000. On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 KDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 14, 2220-2229.

Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95, 3140-3145.

Makinen, J., Marjamaki, M., Marttila, H., Soini, H., 2006. Evaluation of a novel strip test, GenoType Mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 12, 481-483.

Marcos, M.A., Jimenez de Anta, M.T., de la Bellacasa, J.P., Gonzalez, J., Martinez, E., Garcia, E., Mensa, J., de Roux, A., Torres, A., 2003. Rapid urinary antigen test for diagnosis of pneumococcal community-acquired pneumonia in adults. The European respiratory journal. 21, 209-214.

Martiny, D., Busson, L., Wybo, I., El Haj, R.A., Dediste, A., Vandenberg, O., 2012. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 50, 1313-1325.

Matte-Tailliez, O., Brochier, C., Forterre, P., Philippe, H., 2002. Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins. Molecular biology and evolution. 19, 631-639.

Mellmann, A., Bimet, F., Bizet, C., Borovskaya, A.D., Drake, R.R., Eigner, U., Fahr, A.M., He, Y., Ilina, E.N., Kostrzewa, M., Maier, T., Mancinelli, L., Moussaoui, W., Prevost, G., Putignani, L., Seachord, C.L., Tang, Y.W., Harmsen, D., 2009. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. Journal of clinical microbiology. 47, 3732-3734.

Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., Lasala, P., Kostrzewa, M., Harmsen, D., 2008. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. Journal of clinical microbiology. 46, 1946-1954.

Mencacci, A., Monari, C., Leli, C., Merlini, L., De Carolis, E., Vella, A., Cacioni, M., Buzi, S., Nardelli, E., Bistoni, F., Sanguinetti, M., Vecchiarelli, A., 2013. Typing of nosocomial outbreaks of Acinetobacter baumannii by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 51, 603-606.

Mollet, C., Drancourt, M., Raoult, D., 1997. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Molecular microbiology. 26, 1005-1011.

Moon, J.Y., Kim, S.J., Moon, M.H., Chung, B.C., Choi, M.H., 2013. Differential estimation of isomeric 2- and 4-methoxylated estrogens in serum by matrix-assisted laser desorption ionization-tandem mass spectrometry. Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry. 29, 345-351.

Moussaoui, W., Jaulhac, B., Hoffmann, A.M., Ludes, B., Kostrzewa, M., Riegel, P., Prevost, G., 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16, 1631-1638.

Murray, P.R., 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16, 1626-1630.

Nagy, E., Becker, S., Soki, J., Urban, E., Kostrzewa, M., 2011. 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. Journal of medical microbiology. 60, 1584-1590.

Nagy, E., Urban, E., Becker, S., Kostrzewa, M., Voros, A., Hunyadkurti, J., Nagy, I., 2013. MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I, II and III of Propionibacterium acnes. Anaerobe. 20, 20-26.

Nonnemann, B., Tvede, M., Bjarnsholt, T., 2013. Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 121, 871-877.

Nordmann, P., Naas, T., Poirel, L., 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerging infectious diseases. 17, 1791-1798.

Nyvang Hartmeyer, G., Kvistholm Jensen, A., Bocher, S., Damkjaer Bartels, M., Pedersen, M., Engell Clausen, M., Abdul-Redha, R., Dargis, R., Schouenborg, P., Hojlyng, N., Kemp, M., Christensen, J.J., 2010. Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and Brucella species identified in less than half an hour. Scandinavian journal of infectious diseases. 42, 716-718.

Panda, A., Kurapati, S., Samantaray, J.C., Myneedu, V.P., Verma, A., Srinivasan, A., Ahmad, H., Behera, D., Singh, U.B., 2013. Rapid identification of clinical mycobacterial isolates by protein profiling using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Indian journal of medical microbiology. 31, 117-122.

Parent du Chatelet, I., Taha, M.K., Lepoutre, A., Maine, C., Deghmane, A.E., Lévy-Bruhl, D., 2012. Les infections invasives à méningocoques en France en 2011 : principales caractéristiques épidémiologiques. BEH. 49-50, 569-573.

Patel, R., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 57, 564-572.

Perry, J.D., Rennison, C., Butterworth, L.A., Hopley, A.L., Gould, F.K., 2003. Evaluation of S. aureus ID, a new chromogenic agar medium for detection of Staphylococcus aureus. Journal of clinical microbiology. 41, 5695-5698.

Petti, C.A., Polage, C.R., Schreckenberger, P., 2005. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. Journal of clinical microbiology. 43, 6123-6125.

Pineda, F.J., Lin, J.S., Fenselau, C., Demirev, P.A., 2000. Testing the significance of microorganism identification by mass spectrometry and proteome database search. Analytical chemistry. 72, 3739-3744.

Pineda, F.J., Antoine, M.D., Demirev, P.A., Feldman, A.B., Jackman, J., Longenecker, M., Lin J.S., 2003. Microorganism identification by matrix-assited laser/desorption ionization mass spectromtry and model-derived ribosomal protein biomarkers. Analytical chemistry. 75, 3817-3822.

Pinto, A., Halliday, C., Zahra, M., van Hal, S., Olma, T., Maszewska, K., Iredell, J.R., Meyer, W., Chen, S.C., 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. PloS one. 6, e25712.

Poyart, C., Quesne, G., Boumaila, C., Trieu-Cuot, P., 2001. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the sodA gene as a target. Journal of clinical microbiology. 39, 4296-4301.

Prod'hom, G., Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G., 2010. Matrix-assited laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. Journal of clinical microbiology. 48, 1481-1483.

Reuter, S., Ellington, M.J., Cartwright, E.J., Koser, C.U., Torok, M.E., Gouliouris, T., Harris, S.R., Brown, N.M., Holden, M.T., Quail, M., Parkhill, J., Smith, G.P., Bentley, S.D., Peacock, S.J., 2013. Rapid Bacterial Whole-Genome Sequencing to Enhance Diagnostic and Public Health Microbiology. JAMA internal medicine.

Roberts, E., Sethi, A., Montoya, J., Woese, C.R., Luthey-Schulten, Z., 2008. Molecular signatures of ribosomal evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105, 13953-13958.

Rupf, S., Breitung, K., Schellenberger, W., Merte, K., Kneist, S., Eschrich, K., 2005. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Oral microbiology and immunology. 20, 267-273.

Ryzhov, V., Fenselau, C., 2001. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. Analytical chemistry. 73, 746-750.

Saenz, A.J., Petersen, C.E., Valentine, N.B., Gantt, S.L., Jarman, K.H., Kingsley, M.T., Wahl, K.L., 1999. Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 13, 1580-1585.

Sato, H., Teramoto, K., Ishii, Y., Watanabe, K., Benno, Y., 2011. Ribosomal protein profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for phylogenety-based subspecies resolution of Bifidobacterium longum. Systematic and applied microbiology. 34, 76-80.

Schulthess, B., Brodner, K., Bloemberg, G.V., Zbinden, R., Bottger, E.C., Hombach, M., 2013. Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. Journal of clinical microbiology. 51, 1834-1840.

Schumann, P., Pukall, R., 2013. The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. Systematic and applied microbiology. 36, 369-375.

Seng, P., Abat, C., Rolain, J.M., Colson, P., Lagier, J.C., Gouriet, F., Fournier, P.E., Drancourt, M., La Scola, B., Raoult, D., 2013. Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory: impact of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 51, 2182-2194.

Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, J.M., Raoult, D., 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 49, 543-551.

Siegrist, T.J., Anderson, P.D., Huen, W.H., Kleinheinz, G.T., McDermott, C.M., Sandrin, T.R., 2007. Discrimination and characterization of environmental strains of Escherichia coli by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Journal of microbiological methods. 68, 554-562.

Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., Kostrzewa, M., 2012. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against beta-lactam antibiotics. Journal of clinical microbiology. 50, 927-937.

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. Journal of microbiological methods. 87, 150-153.

Stevenson, L.G., Drake, S.K., Murray, P.R., 2010. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 48, 444-447.

Stingu, C.S., Rodloff, A.C., Jentsch, H., Schaumann, R., Eschrich, K., 2008. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. Oral microbiology and immunology. 23, 372-376.

Struelens, M.J., 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2, 2-11.

Suarez, S., Ferroni, A., Lotz, A., Jolley, K.A., Guerin, P., Leto, J., Dauphin, B., Jamet, A., Maiden, M.C., Nassif, X., Armengaud, J., 2013. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. Journal of microbiological methods. 94, 390-396.

Suh, M.J., Hamburg, D.M., Gregory, S.T., Dahlberg, A.E., Limbach, P.A., 2005. Extending ribosomal protein identifications to unsequenced bacterial strains using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Proteomics. 5, 4818-4831.

Suh, M.J., Limbach, P.A., 2004. Investigation of methods suitable for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. European journal of mass spectrometry (Chichester, England). 10, 89-99.

Sun, L., Teramoto, K., Sato, H., Torimura, M., Tao, H., Shintani, T., 2006. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of Lactobacillus plantarum. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 20, 3789-3798.

Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T., 1988. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid comm mass spectrom. 2, 151-153.

Tanigawa, K., Kawabata, H., Watanabe, K., 2010. Identification and typing of Lactococcus lactis by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Applied and environmental microbiology. 76, 4055-4062.

Teramoto, K., Kitagawa, W., Sato, H., Torimura, M., Tamura, T., Tao, H., 2009. Phylogenetic analysis of Rhodococcus erythropolis based on the variation of ribosomal proteins as observed by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry without using genome information. Journal of bioscience and bioengineering. 108, 348-353.

Teramoto, K., Sato, H., Sun, L., Torimura, M., Tao, H., Yoshikawa, H., Hotta, Y., Hosoda, A., Tamura, H., 2007. Phylogenetic classification of Pseudomonas putida strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. Analytical chemistry. 79, 8712-8719.

Thomson, J.J., 1897. Cathode rays. MPhilosophical magazine. 44, 293-316.

Trauner, A., Bennett, M.H., Williams, H.D., 2011. Isolation of bacterial ribosomes with monolith chromatography. PloS one. 6, e16273.

Vaidyanathan, S., Winder, C.L., Wade, S.C., Kell, D.B., Goodacre, R., 2002. Sample preparation in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of whole bacterial cells and the detection of high mass (>20 kDa) proteins. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 16, 1276-1286.

Valentine, N., Wunschel, S., Wunschel, D., Petersen, C., Wahl, K., 2005. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. Applied and environmental microbiology. 71, 58-64.

van Leeuwen, W.B., Snoeijers, S., van der Werken-Libregts, C., Tuip, A., van der Zee, A., Egberink, D., de Proost, M., Bik, E., Lunter, B., Kluytmans, J., Gits, E., van Duyn, I., Heck, M., van der Zwaluw, K., Wannet, W., Noordhoek, G.T., Mulder, S., Renders, N., Boers, M., Zaat, S., van der Riet, D., Kooistra, M., Talens, A., Dijkshoorn, L., van der Reyden, T., Veenendaal, D., Bakker, N., Cookson, B., Lynch, A., Witte, W., Cuny, C., Blanc, D., Vernez, I., Hryniewicz, W., Fiett, J., Struelens, M., Deplano, A., Landegent, J., Verbrugh, H.A., van Belkum, A., 2002. Intercenter reproducibility of binary typing for Staphylococcus aureus. Journal of microbiological methods. 51, 19-28.

van Veen, S.Q., Claas, E.C., Kuijper, E.J., 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. Journal of clinical microbiology. 48, 900-907.

Vasileuskaya-Schulz, Z., Kaiser, S., Maier, T., Kostrzewa, M., Jonas, D., 2011. Delineation of Stenotrophomonas spp. by multi-locus sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. Systematic and applied microbiology. 34, 35-39.

Verroken, A., Bauraing, C., Deplano, A., Bogaerts, P., Huang, D., Wauters, G., Glupczynski, Y., 2013. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant Corynebacterium striatum at one Belgian university hospital. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Verroken, A., Janssens, M., Berhin, C., Bogaerts, P., Huang, T.D., Wauters, G., Glupczynski, Y., 2010. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nocardia species. Journal of clinical microbiology. 48, 4015-4021.

Versalovic, J., Koeuth, T., McCabe, E.R., Lupski, J.R., 1991. Use of the polymerase chain reaction for physical mapping of Escherichia coli genes. Journal of bacteriology. 173, 5253-5255.

Vrioni, G., Mamali, V., Zarkotou, O., Ranellou, K., Voulgari, E., Dimitroulia, E., Themeli-Digalaki, K., Tsakris, A., 2013. Evaluation of a novel chromogenic test (betaLACTA test) for rapidly detecting extended-spectrum cephalosporin-nonsusceptible Enterobacteriaceae in the clinical laboratory, ECCMID.

Wahl, K.L., Wunschel, S.C., Jarman, K.H., Valentine, N.B., Petersen, C.E., Kingsley, M.T., Zartolas, K.A., Saenz, A.J., 2002. Analysis of microbial mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Analytical chemistry. 74, 6191-6199.

Walker, J., Fox, A.J., Edwards-Jones, V., Gordon, D.B., 2002. Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant Staphylococcus aureus: media effects and inter-laboratory reproducibility. Journal of microbiological methods. 48, 117-126.

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.

Wang, Y.R., Chen, Q., Cui, S.H., Li, F.Q., 2013. Characterization of Staphylococcus aureus isolated from clinical specimens by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Biomedical and environmental sciences : BES. 26, 430-436.

Wang, X.H., Zhang, G., Fan, Y.Y., Yang, X., Sui, W.J., Lu, X.X., 2013. Direct identification of bacteria caussing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry. Journal of microbiological methods. 92, 231-235.

Wassenberg, M.W., Kluytmans, J.A., Box, A.T., Bosboom, R.W., Buiting, A.G., van Elzakker, E.P., Melchers, W.J., van Rijen, M.M., Thijsen, S.F., Troelstra, A., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Visser, C.E., Voss, A., Wolffs, P.F., Wulf, M.W., van Zwet, A.A., de Wit, G.A., Bonten, M.J., 2010. Rapid screening of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using PCR and chromogenic agar: a prospective study to evaluate costs and effects. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16, 1754-1761.

Welsh, J., Rampino, N., McClelland, M., Perucho, M., 1995. Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis. Mutation research. 338, 215-229.

Werno, A.M., Christner, M., Anderson, T.P., Murdoch, D.R., 2012. Differentiation of Streptococcus pneumoniae from nonpneumococcal streptococci of the Streptococcus mitis group by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 50, 2863-2867.

Westblade, L.F., Jennemann, R., Branda, J.A., Bythrow, M., Ferraro, M.J., Garner, O.B., Ginocchio, C.C., Lewinski, M.A., Manji, R., Mochon, A.B., Procop, G.W., Richter, S.S., Rychert, J.A., Sercia, L., Burnham, C.A., 2013. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. Journal of clinical microbiology. 51, 2267-2272.

Whatmore, A.M., Efstratiou, A., Pickerill, A.P., Broughton, K., Woodard, G., Sturgeon, D., George, R., Dowson, C.G., 2000. Genetic relationships between clinical isolates of Streptococcus pneumoniae, Streptococcus oralis, and Streptococcus mitis: characterization of "Atypical" pneumococci and organisms allied to S. mitis harboring S. pneumoniae virulence factor-encoding genes. Infection and immunity. 68, 1374-1382.

Wiley, W.C., McLaren, I.H., 1955. Time-Of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution Rev. Scient. Instr. 26, 1150-1157.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids research. 18, 6531-6535.

Williams, T.L., Andrzejewski, D., Lay, J.O., Musser, S.M., 2003. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 14, 342-351.

Williamson, Y.M., Moura, H., Woolfitt, A.R., Pirkle, J.L., Barr, J.R., Carvalho Mda, G., Ades, E.P., Carlone, G.M., Sampson, J.S., 2008. Differentiation of Streptococcus pneumoniae conjunctivitis outbreak isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Applied and environmental microbiology. 74, 5891-5897.

Winkler, M.A., Uher, J., Cepa, S., 1999. Direct analysis and identification of Helicobacter and Campylobacter species by MALDI-TOF mass spectrometry. Analytical chemistry. 71, 3416-3419.

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. International journal of medical microbiology : IJMM. 301, 64-68.

Wunschel, S.C., Jarman, K.H., Petersen, C.E., Valentine, N.B., Wahl, K.L., Schauki, D., Jackman, J., Nelson, C.P., White, E.t., 2005. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 16, 456-462.

Wybo, I., De Bel, A., Soetens, O., Echahidi, F., Vandoorslaer, K., Van Cauwenbergh, M., Pierard, D., 2011. Differentiation of cfiA-negative and cfiA-positive Bacteroides fragilis isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 49, 1961-1964.

Xu, C., Lin, X., Ren, H., Zhang, Y., Wang, S., Peng, X., 2006. Analysis of outer membrane proteome of Escherichia coli related to resistance to ampicillin and tetracycline. Proteomics. 6, 462-473.

Yost, R.A., Enke, C.G., 1978. Selected Ion Fragmentation with a tadem quadrupole mass spectrometer. J. Am. Chem. Soc. 100:7, 2274-2275.

Yutin, N., Puigbo, P., Koonin, E.V., Wolf, Y.I., 2012. Phylogenomics of prokaryotic ribosomal proteins. PloS one. 7, e36972.

Zheng, L., Keller, S.F., Lyerly, D.M., Carman, R.J., Genheimer, C.W., Gleaves, C.A., Kohlhepp, S.J., Young, S., Perez, S., Ye, K., 2004. Multicenter evaluation of a new screening test that detects Clostridium difficile in fecal specimens. Journal of clinical microbiology. 42, 3837-3840.

Résumé

L'identification des micro-organismes reposait jusqu'à présent sur l'étude des caractères culturaux et biochimiques de chaque espèce. Depuis quelques années, la spectrométrie de masse de type Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight (MALDI-TOF) s'est développée dans les laboratoires de microbiologie clinique. Cette nouvelle technologie permet de réaliser très rapidement et à moindre coût un diagnostic d'espèce sur des colonies de bactéries ou de champignons isolées sur des milieux de culture solides.

Dans un premier temps, nous avons montré que cette technologie permet de réaliser une identification des germes isolés en milieu liquide, comme les flacons d'hémoculture au cours des bactériémies par exemple. Ce dépistage se fait directement à partir du flacon positif, sans attendre l'isolement des colonies sur milieu solide. Ce diagnostic disponible dès le premier jour permet d'adapter l'antibiothérapie au phénotype de résistance habituel de l'espèce.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à identifier la nature des biomarqueurs utilisés pour l'identification des espèces bactériennes, en prenant comme exemple la bactérie pathogène *Neisseria meningitidis*. La comparaison du génome et du protéome des souches entièrement séquencées a permis de mettre en évidence la nature exacte des protéines impliquées dans le diagnostic d'espèce.

Par ailleurs, les protéines ribosomales étant majoritaires et pouvant servir d'outil épidémiologique, nous avons constaté que la mise en évidence de leurs variations sur le spectre de masse rend la différenciation de souches au sein d'une même espèce possible, en adaptant la méthode d'analyse.

Enfin, nous avons présenté des résultats préliminaires encourageants sur l'exploitation du caractère constant de certaines protéines ribosomales visibles directement sur le spectre de masse, permettant de différencier des espèces très proches, comme *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus mitis*.

Mots clés : spectrométrie de masse, matrix assisted laser desorption ionization-time of flight, microbiologie, identification bactérienne, typage.