

## LISTE DES ABBREVIATIONS

Acb : *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

ADN ou DNA : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ASB : Aspiration Bronchique

ASC : Advanced Spectra Classifier

AST : Aspiration Trachéale

ATCC : American Type Culture Collection

CE : Communauté Européenne

CHCA : Acide  $\alpha$ -Cyano-4-HydroxyCinnamique

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIP : Collection Institut Pasteur

DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

HGE : Hépatogastro-Entérologie

IVD : In Vitro Diagnosis

JCM : Japan Collection of Microorganismes

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

LMG : Laboratory of Microbiology Ghent

LPSN : List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature

LUH : Leibniz Universität Hannover

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

MCO : Médecine, Chirurgie, Obstétrique

MPU : Médecine Post-Urgences

NIPH : Norwegian Institute of Public Health

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie

PCR : Polymerase Chain Reaction

RUO : Research Use Only

SARAMIS : Spectral Archive and Microbial Identification System

SSR : Soins de Suite et de Réadaptation

# SOMMAIRE

Travail de thèse rédigé en français.....	11-26
Travail de thèse rédigé en anglais sous forme d'article.....	27-39
Bibliographie.....	40-46
Table des matières.....	49-50
Annexe 1.....	51-53
Annexe 2.....	54-58

# TRAVAIL DE THESE REDIGE EN FRANCAIS

## 1 Introduction

*Acinetobacter baumannii* est un coccobacille à Gram négatif, dont l'implication en pathologie humaine n'a cessé d'augmenter ces vingt dernières années (1). Cette bactérie est aujourd'hui reconnue comme l'un des principaux agents d'infections nosocomiales en réanimation, où elle représente environ 10 % des infections, alors qu'elle ne représente que 1% des infections hospitalières tous services confondus [Enquête nationale de prévalence Française de 2006]. *A. baumannii* est principalement à l'origine de pneumopathies sous ventilation, mais cette bactérie peut également être responsable d'infections urinaires, et de façon plus sporadique, de méningites, d'endocardites et de surinfections des plaies d'origine traumatique ou chirurgicale (2,3). Elle sévit plus particulièrement en soins intensifs du fait de l'utilisation prépondérante des cathéters, sondes d'intubation et d'appareils de ventilation mécanique (4). Ces infections peuvent survenir sur un mode épidémique, grâce au pouvoir épidémiogène important de la bactérie (2). Enfin, l'une des principales raisons de l'intérêt porté à *A. baumannii* est sa remarquable capacité à acquérir et accumuler des gènes de résistance aux antibiotiques, dont les carbapénèmes qui étaient jusqu'à récemment considérés comme le traitement de choix des souches résistantes aux céphalosporines de troisième génération, ce qui peut conduire à de véritables impasses thérapeutiques (3).

*A. baumannii* est également isolé chez des victimes de conflits armés ou de catastrophes naturelles. Dans ces contextes, la bactérie est principalement responsable d'infections des tissus mous et de la peau ainsi que d'infections ostéoarticulaires (5,6). En zone tropicale, cette bactérie est responsable de pneumopathies communautaires. Ces pneumopathies sont plus fréquemment observées chez l'homme de moins de 60 ans présentant des co-morbidités à type de diabète, de broncho-pneumopathie chronique obstructive ou d'éthylisme chronique. Le taux de mortalité de ces infections est élevé, de l'ordre de 40 à 60% (7).

Le genre *Acinetobacter* a été décrit pour la première fois en 1954 par Brisou et Prévot, son caractère immobile le différenciant alors des *Achromobacter*, mobiles. La taxonomie des *Acinetobacter* est en constante évolution, et à ce jour, 30 espèces ont un nom officiel selon LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) (**Tableau I**)

**Tableau I** Liste des espèces du genre *Acinetobacter* en date de décembre 2013

Nom	Souche type	Décrit chez l'homme	Référence
<i>A. baumannii</i>	CIP <sup>1</sup> 7034	Oui	Bouvet et Grimont 1986 (8)
<i>A. baylyi</i>	CIP 107474	Non	Carr et al. 2003 (9)
<i>A. beijerinckii</i>	NIPH <sup>2</sup> 838	Oui	Nemec et al. 2009 (10)
<i>A. bereziniae</i>	CIP 70.12	Oui	Nemec et al. 2010 (11)
<i>A. boissieri</i>	LMG <sup>3</sup> 26959	Non	Alvarez-Pérez et al. 2013 (12)
<i>A. bouvetii</i>	CIP 107468	Non	Carr et al. 2003 (9)
<i>A. brisouii</i>	DSM <sup>4</sup> 18516	Non	Anandham et al. 2011 (13)
<i>A. calcoaceticus</i>	CIP 81.8	Non	Baumann et al. 1968
<i>A. gerneri</i>	CIP 107464	Non	Carr et al. 2003 (9)
<i>A. grimontii</i>	CIP 107470	Non	Carr et al. 2003 (9)
<i>A. guillouiae</i>	CIP 63.46	Oui	Nemec et al. 2010 (11)
<i>A. gyllenbergii</i>	NIPH 2150	Oui	Nemec et al. 2009 (10)
<i>A. haemolyticus</i>	CIP 64.3	Oui	Bouvet et Grimont 1986 (8)
<i>A. indicus</i>	DSM 25388	Non	Malhotra et al. 2012 (14)
<i>A. johnsonii</i>	CIP 64.6	Oui	Bouvet et Grimont 1986 (8)
<i>A. junii</i>	CIP 64.5	Oui	Bouvet et Grimont 1986 (8)
<i>A. lwoffii</i>	CIP 64.10	Oui	Brisou et Prévot 1954
<i>A. nectaris</i>	LMG 26958	Non	Alvarez-Pérez et al. 2013 (12)
<i>A. nosocomialis</i>	ATCC <sup>5</sup> 17903	Oui	Nemec et al. 2011 (15)
<i>A. parvus</i>	CIP 108168	Oui	Nemec et al. 2003 (16)
<i>A. pittii</i>	CIP 70.29	Oui	Nemec et al. 2011 (15)
<i>A. radioresistens</i>	CIP 103788	Oui	Nishimura et al. 1988 (17)
<i>A. rudis</i>	LMG 26107	Non	Vaz-Moreira et al. 2011 (18)
<i>A. schindleri</i>	CIP 107287	Oui	Nemec et al. 2001 (19)
<i>A. soli</i>	JCM <sup>6</sup> 15062	Oui	Kim et al. 2009 (20)
<i>A. tandoii</i>	CIP 107469	Non	Carr et al. 2003 (9)
<i>A. tjernbergiae</i>	CIP 107465	Non	Carr et al. 2003 (9)
<i>A. towneri</i>	CIP 107472	Non	Carr et al. 2003 (9)
<i>A. ursingii</i>	NIPH 137	Oui	Nemec et al. 2001 (19)
<i>A. venetianus</i>	ATCC 31012	Non	Vanechoutte et al. 2009 (21)
DNA group 6	ATCC 17979	Oui	Bouvet et Grimont 1986 (8)
DNA group 13BJ/14TU	ATCC 17905	Oui	Bouvet et Jeanjean 1989 (22), Tjernberg et Using 1989 (23)
DNA group 14BJ	LUH <sup>7</sup> 1726	Oui	Bouvet et Jeanjean 1989 (22)
DNA group 15BJ	LUH 1729	Oui	Bouvet et Jeanjean 1989 (22)
DNA group 15TU	LUH 1090	Oui	Tjernberg et Using 1989 (23)
DNA group 16	ATCC 17988	Oui	Bouvet et Jeanjean 1989 (22)
DNA group 17	LUH 1736	Oui	Bouvet et Jeanjean 1989 (22)
DNA group « between 1 and 3 »	LUH 1469	Oui	Gerner-Smidt et Tjernberg 1993 (24)
DNA group « close to 13TU »	LUH 1472	Oui	Gerner-Smidt et Tjernberg 1993 (24)

<sup>1</sup>CIP : Collection Institut Pasteur ; <sup>2</sup>NIPH : Norwegian Institute of Public Health ; <sup>3</sup>LMG : Laboratory of Microbiology Ghent ; <sup>4</sup>DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen ; <sup>5</sup>ATCC : American Type Culture Collection ; <sup>6</sup>JCM : Japan Colelection of Microorganismes ; <sup>7</sup>LUH : Leibniz Universitat Hannover.

Les *Acinetobacter* sont des bactéries aérobies stricts, immobiles, parfois capsulées, non fermentaires, catalase positive, oxydase négative et avec un contenu en G+C (guanine + cytosine) compris entre 39 et 47%.

L'identification phénotypique au rang d'espèce du genre *Acinetobacter* est difficile. Les galeries et les systèmes automatisés (Vitek2, Phoenix) ne permettent pas d'identifier l'espèce *A. baumannii*, mais identifient le complexe *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (*Acb*). Ce complexe regroupe 3 espèces pathogènes pour l'homme : *A. baumannii*, *A. nosocomialis* (anciennement *A. genomospecies 13 TU*) et *A. pittii* (anciennement *A. genomospecies 3*) ainsi que l'espèce environnementale *A. calcoaceticus*. Ces difficultés d'identification sont à l'origine d'une sous-estimation de l'implication d'espèces autres qu'*A. baumannii* en pathologie humaine (25).

L'utilisation d'outils de biologie moléculaire a été jusqu'à présent le meilleur moyen pour pallier à la mauvaise identification phénotypique des espèces d'*Acinetobacter*. Ainsi, pour l'identification de l'espèce *A. baumannii*, la méthode la plus utilisée est la détection du gène *bla<sub>oxa51-like</sub>* par PCR en temps réel (26). Ce gène code pour une oxacillinase intrinsèque chromosomique spécifique de l'espèce. Pour identifier les autres espèces du genre *Acinetobacter*, la technique la plus efficace est le séquençage partiel du gène *rpoB* (27,28). Ce gène code pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase et présente des zones conservées et hypervariables qui permettent la discrimination de la plupart des espèces du genre *Acinetobacter*.

Depuis quelques années, une nouvelle technique d'identification est apparue dans le domaine de la microbiologie. Il s'agit de la spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par matrice et un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF pour Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-Of-Flight). Elle permet une identification rapide basée sur la détermination des masses moléculaires des protéines bactériennes, pour la plupart ribosomales, par la détection du rapport masse sur charge de la protéine. Les résultats sont présentés sous forme d'un spectre de masse. Celui-ci est caractéristique de chaque espèce et est comparé aux spectres d'une base de données (**Annexe 1**). Au laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers, le spectromètre de masse utilisé est le VITEK<sup>®</sup>MS plus de bioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Il existe 2 modes d'utilisation du VITEK<sup>®</sup>MS plus i) un mode IVD (In Vitro Diagnosis) utilisé en routine, dont la version 2.0 actuelle permet l'identification de 645 espèces bactériennes et 110 espèces fongiques différentes. Ce mode comprend une base de données fermée c'est-à-dire non modifiable, mais qui est marquée CE. ii) un mode RUO (Research Use Only), utilisant la base de données SARAMIS<sup>™</sup> (spectral

archive and microbial identification system) version 4.12. Cette base de données contient 1202 espèces bactériennes et fongiques, elle est modifiable, mais elle n'est pas validée dans le cadre du diagnostic médical. Actuellement, aucune des deux méthodes d'utilisation du VITEK<sup>®</sup>MS plus (IVD ou RUO) proposées ne permet une identification correcte des différentes espèces appartenant au complexe *Acb*.

Le but de ce travail est d'implémenter la base de données RUO avec des spectres spécifiques pour permettre une identification fiable et rapide des trois espèces du complexe *Acb* décrites comme étant pathogènes pour l'homme.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Souches bactériennes

Les souches d'*Acinetobacter* utilisées pour la création des super spectres sont des souches cliniques et environnementales. Parmi les souches cliniques, certaines sont des souches de référence, comme les souches CIP 5377, CIP 107292, et CIP 7034 pour *A. baumannii*, et CIP 7029T pour *A. pittii*. Les autres souches cliniques proviennent du laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers. Les souches environnementales ont été isolées lors d'études réalisées à La Réunion et au Liban. Les souches d'*Acinetobacter* utilisées pour valider les spectres de référence et les super spectres sont des souches cliniques isolées au laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers. Toutes les souches utilisées ont été conservées en cryobilles à - 80°C ou en gélose viande-foie à température ambiante.

La souche d'*Escherichia coli* ATCC8739 a été utilisée pour la calibration manuelle du laser et comme contrôle interne.

### 2.2 Séquençage *rpoB*

L'identification au rang d'espèce de toutes les souches utilisées dans cette étude a été confirmée par séquençage partiel du gène *rpoB*, selon le schéma proposé par Gundi *et al.* (23). Brièvement, un fragment de 350 pb qui permet de discriminer aisément les différentes espèces d'*Acinetobacter* est amplifié à l'aide des amorces Ac696F et Ac1093R (séquences respectives 5'-TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG-3' et 5'-CMACACCYTTGTTCMCCRTGA-3'), selon les conditions de PCR suivantes : après une

activation de l'enzyme (GoTaq DNA polymerase – Promega Madison, USA) à 94 °C pendant 15 min, une étape d'amplification de l'ADN cible est réalisée sur 40 cycles. Chaque cycle comprend une phase de dénaturation de 30 sec à 94 °C, une phase d'hybridation de 30 sec à 55 °C et une phase d'élongation de 1 min à 72 °C. Enfin, une étape d'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 min. L'ADN amplifié est ensuite quantifié avec le spectrophotomètre NanoDrop 1000 (ThermoScientific, Wilmington, USA), et les amplicons sont purifiés à l'aide du kit Nucleofast<sup>R</sup> (Macherey Nagel, Düren, Germany), selon les recommandations du fournisseur. Puis, la réaction de séquence est réalisée à l'aide du kit BigDye Terminator (v3.1. - Applied Biosystems, Foster City, USA), selon les conditions de PCR recommandées par le fournisseur : activation de l'enzyme à 96 °C pendant 1 min, étape d'amplification réalisée sur 25 cycles, chaque cycle comprenant une phase de dénaturation de 10 sec à 96 °C, une phase d'hybridation de 5 sec à 50 °C et une phase d'élongation de 4 min à 60 °C. Enfin, après purification des produits de séquence à l'isopropanol, une électrophorèse est réalisée avec le séquenceur 3130XL Genetic Analyzer® (Applied Biosystems, Foster City, USA). Les séquences nucléotidiques obtenues sont ensuite analysées sur le serveur NCBI avec le logiciel BlastN (BLAST Basic Local Alignment Search Tool.htm). Un isolat est considéré comme correctement identifié lorsque la séquence obtenue présente une similarité ≥ 98% avec la séquence la plus proche de l'espèce bactérienne donnée par BlastN.

## 2.3 Spectromètre de masse

Le spectromètre de masse de notre étude est le VITEK<sup>®</sup> MS plus de bioMérieux, il est utilisé en mode RUO. La souche d'*E. coli* ATCC8739 servant à la fois de calibration manuelle du laser et de contrôle interne est déposée en triplicat sur une cible Vitek MS<sup>®</sup> (DS ref. 410893). Les souches d'*Acinetobacter* étudiées dans ce travail sont déposées en duplicat. Une matrice acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) est ensuite ajoutée. Les paramètres du laser sont ceux recommandés par le fournisseur (paramètres par défaut). Les masses protéiques analysées sont comprises entre 2000 et 20000 Daltons avec une tolérance de 0.08%.

Dans un premier temps, une calibration manuelle du laser est effectuée. Pour cela, un total de 100 tirs est réalisé sur un dépôt comportant la souche d'*E. coli* ATCC8739. Les résultats sont représentés sous forme de spectre de masse. La calibration est validée si l'intensité des pics correspondant aux masses protéiques est comprise entre 20 et 100 mV, si la

somme des intensités des pics est de plus de 3000 mV et si la résolution des pics principaux est à au moins 600.

Lorsque la calibration manuelle est validée, le laser tire à nouveau sur la souche d'*E. coli*, celle-ci servant alors de contrôle interne. Ensuite, les différentes souches d'*Acinetobacter* sont analysées, à raison de 100 tirs par spot. Enfin, le laser tire une dernière fois sur le contrôle interne. Lorsque les résultats de ce dernier sont conformes à ceux préconisés par le fournisseur (identification d'*E. coli* avec un degré de confiance >90%), les données concernant les masses protéiques des souches d'*Acinetobacter* sont transférées dans le logiciel Launchpad<sup>®</sup> puis interprétées à l'aide de la base de données SARAMIS<sup>™</sup>.

## 2.4 Principe de la base de données SARAMIS<sup>™</sup>

La base de données SARAMIS<sup>™</sup> comprend **i)** des "super spectres" qui sont des spectres obtenus à partir des 40 masses protéiques les plus spécifiques et représentées d'une espèce bactérienne. Brièvement, un super spectre est réalisé à partir des spectres protéiques d'au moins huit souches d'une même espèce, chaque souche étant analysée elle-même dans différentes conditions. Parmi tous les spectres obtenus, ceux retenus pour la réalisation du super spectre doivent avoir un nombre de masses protéiques compris entre 70 et 160 et plus de 65% de masses communes entre eux. Par ailleurs, pour une même souche analysée sous différentes conditions de culture, les spectres doivent avoir une homologie de plus de 70%. La bonne homologie est visualisée à l'aide d'un dendrogramme; **ii)** des spectres de référence, ce sont des spectres de souches bactériennes qui ont servis à compléter la base de données spectrale. Ces spectres de référence ont servis ou non à la réalisation de super-spectres.

Lorsqu'une souche bactérienne est analysée par spectrométrie de masse, le spectre obtenu est dans un premier temps comparé aux super spectres présents dans la base de données. Si aucune identification n'est retrouvée, le spectre obtenu est comparé aux spectres de référence.

Cette base de données RUO "non figée" a pour avantage principal de permettre à l'expérimentateur d'incrémenter de nouveaux spectres bactériens.



## 2.5 Création des super spectres

Dix souches d'*A. baumannii* et d'*A. pittii* (dont les souches de référence) ainsi que 8 souches d'*A. nosocomialis* ont été utilisées pour la création des super spectres. Chaque souche a étéensemencée sur 6 milieux différents : 2 géloses au sang Oxoid (Thermo Fisher Scientific, United Kingdom) 2 géloses Chromogènes de type UTI® Oxoid et 2 géloses Mueller-Hinton (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Une gélose de chaque type a été incubée à 29°C et une autre à 37°C, pendant 48 heures au total. Pour chaque milieu, des dépôts ont été réalisés après 24 et 48 heures d'incubation, en duplicat. Pour chaque duplicat, un seul spectre a été sélectionné, il devait présenter un nombre de masses compris entre 70 et 160 et un bon pourcentage d'homologie avec les autres souches de son espèce dans le dendrogramme. Après avoir été incrémentés dans la base de données SARAMIS™ comme spectres de référence dans leur espèce respective, ces spectres ont servi à la création de super spectres.

Plusieurs étapes ont été nécessaires à la création des super spectres. Tout d'abord, les masses protéiques communes à au moins 2 des 3 espèces d'intérêt ont été exclues. Ensuite, pour chaque espèce, les 40 masses les plus représentées dans les spectres de référence ont été sélectionnées. Un poids plus ou moins important a été attribué à chacune de ces masses, en fonction de leur fréquence au sein des différents spectres. Enfin, les super spectres obtenus ont été validés après comparaison avec les spectres de toutes les espèces bactériennes présentes dans la base de données SARAMIS™ afin de s'assurer de leur spécificité d'espèce. Pour ne pas interférer avec notre étude, les super spectres d'*Acinetobacter* déjà présents dans la base de données SARAMIS™ ont été inactivés.

## 2.6 Validation des super spectres et des spectres de référence

Pour valider les super spectres ainsi que les spectres de référence incrémentés dans la base de données SARAMIS™, 100 souches du complexe *Acb* dont l'identification a été confirmée par séquençage du gène *rpoB* ont été analysées par spectrométrie de masse. Quarante-neuf de ces souches étaient d'origine clinique et provenaient du CHU d'Angers (**Annexe 2**) et 9 étaient gracieusement données par le laboratoire bioMérieux.

Pour identifier une souche, le logiciel SARAMIS™ compare d'abord son spectre avec les super spectres présents dans la base de données. Les résultats de cette comparaison sont

présentés avec un code couleur qui correspond aux différents indices de confiance : vert foncé si le degré de confiance est > 99.9%, vert clair si le degré de confiance est compris entre 90% et 99.9%, jaune s'il est compris entre 80% et 90% et blanc s'il est compris entre 75% et 80% (**Figure 1**). Si aucune correspondance avec un super spectre n'est obtenue avec un degré de confiance d'au moins 75%, la souche est comparée avec les spectres de référence de la base de données. Le résultat apparaît alors en blanc avec un lien « Show details » pour les identifications proposées et leur indice de confiance.

The screenshot shows the SARAMIS Premium software interface. The main window displays a table of identified files with columns for acquisition time, name, sample, %, family, genus, species, typ, strain, datacount, matrix, and comparison options. A comparison details window is open, showing a table with columns for name, Sample, Num, masses, matches, matches (%), referencemas, strain, typ, species, genus, and family.

acquisition time	name	sample	%	family	genus	species	typ	strain	datacount	matrix	Import Spe	delete	compare	compare result
11 Mar 2014 16:07	BMX_000_0091_1B3[c]	Souche test 4-1	0.00						52	CHCA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Show Details
14 Mar 2014 16:14	BMX_000_0097_2J4[c]	Souche test 95-2	99.90	Family II Mo	Acinetobacte	nosocomialis	Angers		105	CHCA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
13 Mar 2014 15:54	BMX_000_0095_1L2[c]	Souche test 73-2	79.70	Family II Mor	Acinetobacter	pittii	Angers		64	CHCA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
11 Mar 2014 16:07	BMX_000_0091_1C4[c]	Souche test 6-2	99.90	Family II Mo	Acinetobacte	pittii	Angers		105	CHCA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
12 Mar 2014 16:02	BMX_000_0093_1B3[c]	Souche test29-1	83.40	Family II Mo	Acinetobacte	baumannii	Angers		63	CHCA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

name	Sample	Num	masses	matches	matches (%)	referencemas	strain	typ	species	genus	family
BMX_000_009	Souche test 4-1	2834	52	38	100.00	38					
BMX_000_00	CHA-1_10	8899	131	35	92.10	108	Angers		pittii	Acinetobacter	Family II
BMX_000_00	Mad Eva-1_03	8901	108	35	92.10	88	Angers		pittii	Acinetobacter	Family II
BMX_000_00	CIP 7029T-1_08	8900	145	35	92.10	122	Angers		pittii	Acinetobacter	Family II

**Figure 1** Exemple de résultat obtenu par le logiciel SARAMIS<sup>TM</sup> après analyse de souches par spectrométrie de masse.

### 3 Résultats

#### 3.1 Caractéristiques des spectres de référence et des super spectres de notre étude

Un total de 120 spectres sur 240 a été retenu pour *A. baumannii* et *A. pittii*, et 96 spectres sur 192 pour *A. nosocomialis*, soit un spectre par souche, milieu de culture, température d'incubation et durée d'incubation. Ces spectres ont été incrémentés dans la base de données SARAMIS<sup>TM</sup>, sous forme de spectres de référence. Ils avaient un nombre médian de masses de 109 (entre 74 et 158) pour *A. baumannii*, 111,5 (entre 73 et 160) pour *A. pittii* et 107,5 (entre 73 et 158) pour *A. nosocomialis*.

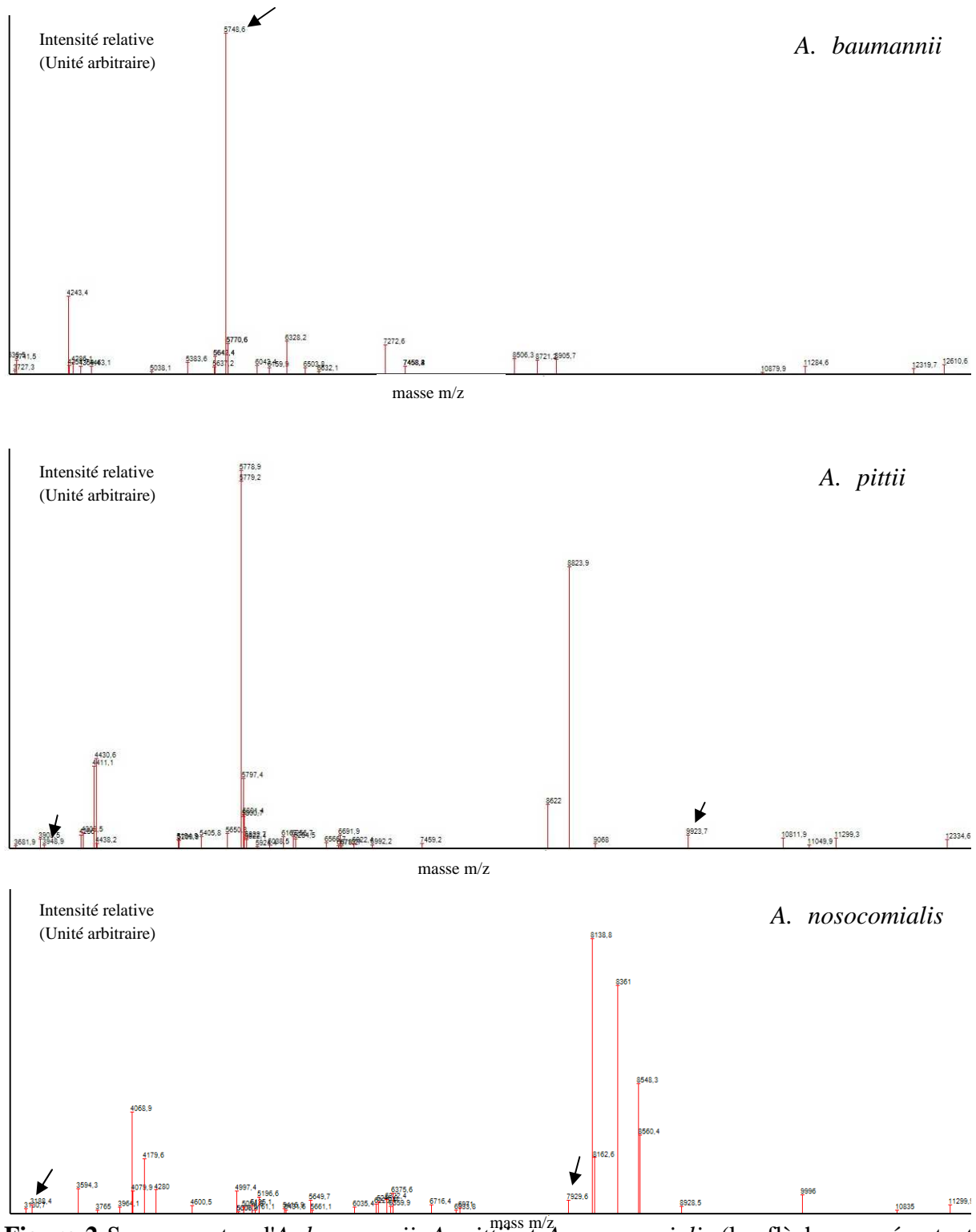
Les super spectres des 3 espèces ont été créés à partir des spectres de référence qui avaient un pourcentage d'homologie > 70%. Ainsi, 115 spectres de référence ont été

sélectionnés pour *A. baumannii* et *A. pittii*, et 96 spectres pour *A. nosocomialis*. A partir de ces spectres choisis, les 40 masses protéiques spécifiques d'espèce les plus représentées ont été sélectionnées. Ces masses ont été sélectionnées sur la base de leur représentativité au sein des spectres de référence, et de leur spécificité d'espèce. Ainsi, 79 masses protéiques ont été exclues du choix car elles étaient présentes dans au moins 2 des 3 espèces d'intérêt. La liste des 40 masses retenues par espèce pour la création des super spectres est présentée dans le **tableau II**. La majorité des 40 masses protéiques retenues pour chaque espèce n'était pas présente dans tous les spectres de référence de l'espèce considérée. Seule une masse protéique de 5748,6 Da spécifique d' *A. baumannii* était retrouvée dans tous les spectres de référence de cette espèce. Concernant *A. pittii*, deux masses protéiques de 3948,9 et de 9923,7 Da étaient présentes dans tous les spectres de référence de cette espèce. Enfin pour *A. nosocomialis*, deux masses de 3188,4 et 7929,6 Da étaient retrouvées dans tous les spectres de référence de cette espèce.

**Tableau II** Masses retenues pour la création des super spectres. Les masses en gras sont celles présentes dans tous les spectres de référence ayant servi à la création du super spectre.

Espèce du complexe <i>Acb</i>	Masses (Da) retenues pour la création des super spectres
<i>A. baumannii</i>	3055,6 ; 3106,3 ; 3122,3 ; 3162,8 ; 3177,5 ; 3251,1 ; 3330,2 ; 3350,4 ; 3635,5 ; 3727,3 ; 3741,5 ; 4243,4 ; 4251,7 ; 4286,1 ; 4359,4 ; 4463,1 ; 5038,1 ; 5383,6 ; 5637,2 ; 5642,4 ; <b>5748,6</b> ; 5770,6 ; 6043,4 ; 6159,9 ; 6328,2 ; 6503,8 ; 6632,1 ; 7272,6 ; 7458,2 ; 7458,4 ; 7458,8 ; 8506,3 ; 8721,2 ; 8905,7 ; 10879,9 ; 11284,6 ; 12319,7
<i>A. pittii</i>	3179,9 ; 3681,9 ; 3908,5 ; <b>3948,9</b> ; 4286,0 ; 4309,5 ; 4411,1 ; 4430,6 ; 4438,2 ; 5194,9 ; 5200,9 ; 5405,8 ; 5650,3 ; 5778,9 ; 5779,2 ; 5797,4 ; 5800,7 ; 5801,4 ; 5822,4 ; 5822,7 ; 5924,4 ; 6038,5 ; 6167,5 ; 6256,7 ; 6284,5 ; 6566,7 ; 6678,2 ; 6691,9 ; 6710,7 ; 6822,4 ; 6992,2 ; 7459,2 ; 8622,0 ; 8823,9 ; 9068,0 ; <b>9923,7</b> ; 10811,9 ; 11049,9 ; 11299,3
<i>A. nosocomialis</i>	3130,7 ; <b>3188,4</b> ; 3594,3 ; 3765,0 ; 3964,1 ; 4068,9 ; 4079,9 ; 4179,6 ; 4280,0 ; 4600,5 ; 4997,4 ; 5006,9 ; 5007,0 ; 5054,9 ; 5135,1 ; 5161,1 ; 5196,6 ; 5416,9 ; 5431,6 ; 5649,7 ; 5661,1 ; 6035,4 ; 6225,4 ; 6246,9 ; 6322,4 ; 6359,9 ; 6375,6 ; 6716,4 ; 6933,8 ; 6971,0 ; 7929,6 ; 8138,8 ; 8162,6 ; 8261,0 ; 8548,3 ; 8560,4 ; 8928,5 ; 9996,0 ; 10835,0

La **figure 2** présente l'allure du super spectre obtenu pour les espèces *A. baumannii*, *A. pittii* et *A. nosocomialis*.



**Figure 2** Super spectre d'*A. baumannii*, *A. pittii* et *A. nosocomialis* (les flèches représentent les pics retrouvés dans tous les spectres de référence de l'espèce considérée).

### 3.2 Validation des super spectres et des spectres de référence

Un total de 100 souches appartenant au complexe *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* dont 91 étaient d'origine clinique et provenant du CHU d'Angers, a été étudié par MALDI-TOF MS. Les 9 autres souches avaient été gracieusement données par bioMérieux. Les caractéristiques de ces 91 souches clinique originaires du CHU d'Angers sont présentées en dans le **tableau III** et en **annexe 2**.

**Tableau III** Répartition des souches d'*Acb* étudiées en fonction de la localisation du patient et du type de prélèvement

<b>Service</b>	<b>MCO<sup>1</sup></b>	<b>Réanimation</b>	<b>SSR<sup>2</sup></b>	<b>Urgences</b>	<b>Total</b>
<b>Origine</b>					
Respiratoire	4	5	0	0	<b>9</b>
Urine	13	1	6	1	<b>21</b>
Cathéter et sang	9	0	4	1	<b>14</b>
Peau et tissus mous	6	2	0	2	<b>10</b>
Ostéoarticulaire	1	0	0	0	<b>1</b>
Digestive et génitale	4	0	0	0	<b>4</b>
Dépistage	1	31	0	0	<b>32</b>
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>91</b>

<sup>1</sup> MCO : médecine, chirurgie, obstétrique ; <sup>2</sup>SSR : soins de suite et de réadaptation

La majorité des souches était isolée lors de dépistage dans les services de réanimation (31 souches). Les autres services pourvoyeurs de souches étaient les services de médecine, de chirurgie et d'obstétrique. Enfin, très peu de souches ont été isolées de patients hospitalisés en soins de suite et de réadaptation ou encore aux urgences. Les souches d'*Acb* responsables d'infections sur cathéter ou de bactériémies représentaient 15% des souches cliniques et celles retrouvées dans les urines, 23%.

Soixante treize des 100 souches ont pu être identifiées après comparaison avec les super spectres créés lors de cette étude. Il s'agissait de 36 souches d' *A. baumannii*, 31 souches d' *A. pittii* et 6 souches d' *A. nosocomialis*. Parmi ces identifications, 44% avaient un indice de confiance supérieur à 99.9%.

Les 27 souches non identifiées par un super spectre ont été comparées aux spectres de référence de la base de données qui ont permis d'identifier 4 *A. baumannii*, 18 *A. pittii* et 4 *A. nosocomialis*.

Concernant les souches isolées du laboratoire de bactériologie, sur les 91, 67 ont été identifiées à l'aide d'un super spectre, et parmi elles, 47 l'ont été avec un degré de confiance de plus de 90%. Neuf souches ont été identifiées avec un degré de confiance compris entre 80% et 90% et 11 autres souches avec un degré de confiance entre 75% et 80% (**annexe 2**). Concernant les autres souches du laboratoire, 24 ont été identifiées à l'aide d'un spectre de référence dont 9 avec un degré de confiance de plus de 90%, 9 avec un degré de confiance compris entre 80% et 90%, 3 avec un degré de confiance entre 70% et 80%, et 2 avec un degré de confiance entre 65% et 70%. Une seule souche avait un indice de confiance de moins de 65%. Il s'agissait d'une souche d' *A. pittii* dont l'indice de confiance obtenu n'était que de 57%. Cette souche avait été identifiée comme un *A. pittii* par biologie moléculaire.

Globalement, 90% (36 sur 40) des souches d' *A. baumannii* ont été identifiées grâce au super spectre, alors que pour *A. pittii*, seules 62% (31 sur 50) ont pu être identifiées à l'aide du super spectre. Une seule souche isolée au laboratoire a été identifiée comme *A. nosocomialis*, elle l'a été avec le super spectre. Cette souche était isolée d'un dépistage pharyngé chez un patient hospitalisé en réanimation médicale.

### **3.3 Résultats du séquençage du gène *rpoB* et comparaison avec les résultats obtenus par spectrométrie de masse**

Le séquençage du gène *rpoB* a été réalisé sur les 100 souches de cette étude. Les résultats étaient les suivants : 50 souches ont été identifiées comme étant *A. pittii*, 40 comme *A. baumannii* et 10 comme *A. nosocomialis*.

Les identifications obtenues par biologie moléculaire étaient toutes concordantes avec celles obtenues par spectrométrie de masse (**Tableau IV**). Au total, 99% des souches ont été correctement identifiées par spectrométrie de masse. La souche considérée comme non

identifiée par MALDI-TOF car son indice de confiance était < 65%, a été identifiée comme un *A. pittii* par biologie moléculaire. Ce résultat concorde avec celui obtenu par MALDI-TOF pour lequel l'homologie était de 57% avec cette même espèce.

**Tableau IV** Comparaison des identifications bactériennes obtenues par séquençage du gène *rpoB* et par spectrométrie de masse.

	Nombre de souches identifiées par séquençage <i>rpoB</i>	Nombre de souches identifiées par MALDI-TOF	Nombre de souches identifiées à l'aide du super spectre
<i>A. baumannii</i>	40	40	36
<i>A. pittii</i>	50	49	31
<i>A. nosocomialis</i> *	10	10	6

\* Neuf des 10 souches d'*A. nosocomialis* ont été fournies par bioMérieux et une souche provient du laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers.

## 4 Discussion

*A. baumannii* est une bactérie appartenant au complexe *Acb* responsable d'infections nosocomiales évoluant sous forme de bouffées épidémiques et sa prévalence n'a cessé d'augmenter ces dernières années, notamment en réanimation, où elle est aujourd'hui reconnue comme l'un des principaux agents d'infections nosocomiales (3,29,30). L'identification au rang d'espèce des bactéries du complexe *Acb* est difficile du fait de leur proximité génétique, ce qui conduirait, d'après Higgins *et al.* à une mauvaise identification de près de 25% des souches (25). Il est cependant essentiel, à la fois d'un point de vue clinique et épidémiologique, de pouvoir différencier ces espèces correctement. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, acquise récemment dans de nombreux laboratoires de microbiologie, peut répondre à cette problématique. En effet, cette technique est valide pour l'identification des principales espèces bactériennes trouvées en routine dans un laboratoire de microbiologie (31,32), avec une très bonne reproductibilité inter laboratoire (33). La spectrométrie de masse permet également de mieux identifier des bactéries exigeantes comme les bactéries anaérobies (34) ou de mieux différencier des sous-espèces comme cela a été

décrit par exemple par Fangous *et al.* pour les sous-espèces du complexe *Mycobacterium abscessus* (35). De nombreuses études ont par ailleurs montré l'intérêt de cette technique dans l'identification de bactéries directement à partir de prélèvements comme les hémocultures (36–38). Enfin, des auteurs ont démontré l'intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans la détection de bactéries résistantes aux carbapénèmes (39–41). Toutefois, la base de données du VITEK<sup>®</sup>MS plus (IVD ou RUO) est pauvre en ce qui concerne les espèces du complexe *Acb*, ce qui en fait un outil peu performant pour l'identification de ces espèces. Notre travail a consisté à améliorer cette base de données, en mode RUO, dans la base de données SARAMIS<sup>™</sup>. Pour cela, nous avons dans un premier temps incrémenté des spectres de référence obtenus à partir de souches bien caractérisées. Dans un second temps, nous avons utilisé ces spectres pour la réalisation des super spectres. Ces derniers ont été définis à partir de masses protéiques sélectionnées et spécifiques de chacune des espèces. Cette étape a été rendue délicate car les masses protéiques n'étaient pas systématiquement présentes dans tous les spectres de référence pour une espèce considérée, bien au contraire. Ainsi, pour *A. baumannii* par exemple, seule une masse (à 5748,6 Da) avait été retrouvée dans les 120 spectres de référence. Cette masse, que nous avons sélectionnée pour la constitution du super spectre d'*A. baumannii*, a déjà été décrite comme étant spécifique de cette espèce par Sedo *et al.* (42), dont le travail reposait sur l'identification des espèces du complexe *Acb* par spectrométrie de masse MALDI TOF Bruker Daltonik (Leipzig, Germany).

Dans la littérature, d'autres études ont porté sur la différenciation des espèces du complexe *Acb* par MALDI-TOF, mais l'appareil utilisé était le Bruker Daltonik et les techniques utilisées étaient différentes de la notre: une étude a changé la préparation des échantillons avant dépôt sur la matrice (42) et une autre a analysé les spectres par chimométrie (43) qui est une technique d'analyse multi variée des données. Ces études montraient de très bons résultats, entre 90 et 99% d'identification correcte. Mais à notre connaissance, aucune étude portant sur l'amélioration de la base de données des *Acb* sur SARAMIS<sup>™</sup> n'a été publiée à ce jour.

Préalablement à notre travail, nous avons réalisé une calibration manuelle qui est une étape préliminaire primordiale avant identification de souches bactériennes en mode RUO. Cette étape permet de calibrer le laser, qui peut être légèrement dérégulé lors du passage du spectromètre de masse du mode IVD vers le mode RUO. Si la calibration n'est pas conforme aux résultats attendus, les spectres obtenus par l'automate peuvent être de moins bonne qualité, faussant ainsi l'interprétation des résultats.



Nous avons validé notre base de données sur un panel de 91 souches cliniques isolées lors d'infections ou dans un contexte de colonisation chez des patients hospitalisés au CHU d'Angers. Les résultats ont été concluants puisque la base de données nous a permis d'identifier correctement 99% de ces souches au rang d'espèces et parmi elles, 73% à partir des super spectres. Ces résultats montrent que les masses retenues pour la réalisation des super spectres étaient bien choisies car spécifiques des espèces considérées.

L'utilisation en routine du spectromètre de masse a de nombreux avantages, en particulier par rapport à la biologie moléculaire. Cette technique est en effet plus rapide, l'identification étant obtenue en moins d'une minute, moins chère, et nécessite une formation moins importante que celle nécessaire pour la biologie moléculaire (32). En effet, pour pouvoir identifier correctement au rang d'espèce les *Acinetobacter*, le séquençage partiel du gène *rpoB* est nécessaire, ce qui est consommateur de temps et impose l'acquisition d'un séquenceur.

*A. baumannii*, qui appartient au complexe *Acb*, est décrite par de nombreux auteurs comme étant la bactérie la plus pathogène du complexe du fait notamment de son pouvoir épidémiogène et de sa facilité à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques (44,45). Toutefois, un certain nombre de publications rapportent un rôle non négligeable des autres espèces en pathologie humaine, c'est le cas notamment d'*A. pittii* (46). En effet, *A. pittii* a été décrit dans des épidémies dans des services de réanimation (47,48), mais également dans des infections de plaies (49). Certaines de ces infections peuvent être dues à des souches résistantes aux carbapénèmes comme cela a été décrit en Irlande (46). *A. calcoaceticus* étant une bactérie environnementale et non décrite dans les infections chez l'homme, nous n'avons pas mis au point de spectre pour cette espèce (3).

Sur les 91 souches cliniques de notre étude, seules 40 ont été identifiées comme étant des *A. baumannii*. Ces résultats, concordants avec les résultats d'autres études (25,46,50–52), montrent que les infections dues aux autres espèces du complexe *Acb* sont sous-estimées. Ainsi, une étude publiée en 2012 aux États-Unis (50) et portant sur les bactériémies nosocomiales à *Acinetobacter*, montrait que près d'un tiers des souches isolées étaient représentées par *A. nosocomialis* et *A. pittii*. Les auteurs ont rappelé l'importance de la distinction des espèces car *A. baumannii* est un facteur de mauvais pronostic (50) par rapport aux autres espèces du complexe *Acb*. Une étude publiée en Norvège en 2011 portant sur l'identification des bactéries de complexe *Acb* responsables de septicémies (47) a montré que

l'espèce la plus fréquemment retrouvée était *A. nosocomialis* (49,6%) suivie d'*A. pittii* (19,5%), et qu'*A. baumannii* ne représentait que 8,8% des isolats. En Allemagne, Schleicher *et al.* ont étudié toutes les souches du complexe *Acb* isolées sur une période de 5 ans de patients hospitalisés dans différents hôpitaux du pays et les résultats ont montré que l'espèce prédominante était *A. pittii*, devant *A. baumannii* (52).

La base de données que nous avons développée dans cette étude s'applique uniquement en mode recherche (SARAMIS™) et ne pourra pas être transposée à terme dans la base de données IVD. En effet, les 2 bases de données fonctionnent sur des algorithmes différents : la base SARAMIS™ identifie les souches à partir des super spectres créés sur la base de spectres de référence insérés, alors que la base IVD identifie les souches en leur attribuant des scores selon le nombre de pics dans un segment du diagramme (explication plus détaillée en **annexe 1**). Ce travail nécessite donc d'être approfondi pour que les spectres soient intégrés à la base de données en IVD.

## 5 Conclusion

*A. baumannii*, qui appartient au complexe *Acb*, est une bactérie dont le rôle dans les infections nosocomiales est important. Toutefois, le rôle en pathologie humaine des autres espèces de ce complexe, en particulier *A. pittii* et *A. nosocomialis*, n'est pas à négliger. Ces 3 espèces bactériennes doivent pouvoir être correctement identifiées, or, actuellement, les outils dont disposent les microbiologistes ne permettent pas tous une identification précise. Le MALDI-TOF VITEK®MS plus ne permet pas de discriminer ces espèces car la base de données SARAMIS™ ne comporte pas les spectres nécessaires. Notre travail a permis d'optimiser cette base de données permettant une identification fiable et rapide des trois espèces. Cette base de données pourra être une bonne alternative de la biologie moléculaire dont les coûts et la technicité sont plus importants. Il serait intéressant à présent de développer la base IVD pour permettre l'identification correcte des *Acb* car cette base est la seule validée dans le cadre du diagnostic médical.

# TRAVAIL DE THESE REDIGE EN ANGLAIS, SOUS FORME D'ARTICLE

## Identification of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species by MALDI-TOF mass spectrometry

Sophie Daure<sup>1</sup>, Hélène Pailhoriès<sup>1,2</sup>, Rayane Rafei<sup>3</sup>, Olivier Belmonte<sup>4</sup>, Matthieu  
Eveillard<sup>1,2</sup>, Marie-Laure Joly-Guillou<sup>1,2</sup>, Marie Kempf<sup>1,2\*</sup>,

*Article en préparation pour soumission dans Systematic and Applied Journal*

<sup>1</sup> Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en Santé - PBH, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex, France.

<sup>2</sup> L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA3142, Institut de Biologie en Santé – IRIS, CHU, 4, rue Larrey, 49933 Angers cedex, France.

<sup>3</sup> Université Libanaise, Ecole doctorale des sciences et de technologie, Centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Laboratoire de microbiologie, rue El- Mitein, Tripoli, Liban.

<sup>4</sup> Laboratoire de Bactériologie, CHU Saint-Denis, La Réunion, Saint-Denis, France

### \* *Corresponding author*

Laboratoire de Bactériologie  
Institut de Biologie en Santé  
Centre Hospitalier Universitaire Angers  
4 rue Larrey  
49933 Angers cedex, France.

Phone: (33) 2 41 35 50 13. Fax: (33) 2 41 35 41 64

Email: [makempf@chu-angers.fr](mailto:makempf@chu-angers.fr)

## Abstract

*Acinetobacter baumannii* belongs to the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex containing 2 other human pathogenic species: *A. pittii* and *A. nosocomialis*. Identification of species of the *Acb* complex remains problematic despite the use of MALDI-TOF mass spectrometry. In this work, we enriched the SARAMIS<sup>TM</sup> database of the VITEK<sup>®</sup>MS plus (bioMérieux) to improve the identification of species of the *Acb* complex. For this, we incremented in the database 120 reference spectra of *A. baumannii*, and *A. pittii* as well as 96 reference spectra of *A. nosocomialis*. Then, for each species, we selected 40 specific masses from reference spectra to create SuperSpectra. In a second step, we validated reference spectra and SuperSpectra with 100 strains whose identification was confirmed by *rpoB* gene sequencing. A total of 99% of strains were correctly identified by the MALDI-TOF MS and among them, 73 were identified by a SuperSpectrum. Only 1 strain was not identified, it was an *A. pittii*. Our database is promising and may be used for the rapid identification of species of the *Acb* complex in alternative of molecular biology.

## Key words

*Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex, MALDI-TOF identification, VITEK<sup>®</sup>MS plus, SARAMIS<sup>TM</sup>, SuperSpectrum

# 1 Introduction

The genus *Acinetobacter* has undergone significant taxonomic modification over the last ten years and it currently comprises more than 30 genomic species (LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.htm). The most important representative is *Acinetobacter baumannii*, an opportunistic pathogen involved in a wide number of nosocomial infections such as ventilator-associated pneumonia, bloodstream, and urinary tract infections (2,3). This bacterium belongs to the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (*Acb*) complex which includes 2 other human pathogenic species, *Acinetobacter nosocomialis* (formerly *Acinetobacter genomospecies 13 TU*) and *Acinetobacter pittii* (formerly *Acinetobacter genomospecies 3*), as well as *Acinetobacter calcoaceticus* which is considered as an environmental species. Unfortunately, phenotypic tests used in diagnostic laboratories are unable to differentiate species of the *Acb* complex leading to an underestimation of non-*baumannii* *Acb* in human infections (24).

Molecular biology tools have so far been the best way to overcome poor phenotypic identification of *Acinetobacter* species. Thus, for identification of *A. baumannii*, one of the reference methods is detection of the *bla*<sub>oxa51-like</sub> gene by real-time PCR (25). This gene codes for a species specific chromosomal intrinsic oxacillinase. To identify other species of the genus *Acinetobacter*, the most effective technique is partial sequencing of the *rpoB* gene, as developed by La Scola *et al.*(27, 28).

In recent years, the new identification technique matrix assisted laser ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) appeared in the field of microbiology, allowing rapid identification of bacteria. This technique is based on the determination of the exact molecular masses of small proteins, by measuring the mass/charge ratio of the analytes. The results are displayed as a protein mass spectrum, which is characteristic for each species. The VITEK<sup>®</sup>MS plus (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) is one of the spectrometers currently available. There are 2 ways of using VITEK<sup>®</sup>MS plus for bacterial identification i) an In Vitro Diagnosis (IVD) mode, routinely used in microbiological laboratories, and allowing identification of 645 bacterial and 110 yeast species. This mode comprises a non-modifiable database ii) a Research Use Only (RUO) mode using the SARAMIS<sup>™</sup> (spectral archive and microbial identification system) version 4.12 database. This database contains 1202 species,

can be modified, but is not validated in medical diagnosis. Currently, none of the two modes allow correct identification of the species belonging to the *Acb* complex.

The aim of this work was to complete the RUO database to enable rapid and reliable identification of the three human pathogenic species belonging to the *Acb* complex, *A. baumannii*, *A. pittii* and *A. nosocomialis*.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Bacterial strains

A first set of strains isolated from human and environmental samples as well as reference strains were used to define the reference spectra and the SuperSpectra: 10 *A. baumannii* strains (CIP 5377, CIP 107292, CIP 7034 and 7 well identified clinical strains), 10 *A. pittii* strains (CIP 7029T and 9 well identified clinical strains clinical strains), 8 *A. nosocomialis* strains (well identified environmental strains). A second set of strains was used for validation of the SuperSpectra. One hundred additional strains of *A. baumannii*, *A. pittii* and *A. nosocomialis* were used. Ninety one of them were isolated from human clinical cases from the laboratory of bacteriology of the Hospital University of Angers (France) and 9 were graciously given from bioMérieux.

*Escherichia coli* ATCC8739 strain was used for manual calibration of the MALDI-TOF MS as well as for internal control.

### 2.2 Culture conditions

The strains used to define the reference spectra and the SuperSpectra were seeded on sheep blood agar (Thermo Fisher Scientific, United Kingdom), Oxoid Chromogenic agar UTI<sup>®</sup> type and Mueller Hinton agar (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) and incubated at 29°C or 37°C for 24 or 48h. The *Acinetobacter* strains used to validate the SuperSpectra and *E. coli* ATCC8739 were streaked onto sheep blood agar and incubated at 37°C for 24h.

## 2.3 *rpoB* gene sequencing

Identification of all of the *Acinetobacter* spp. strains used in this study was confirmed at a species level by *rpoB* gene sequencing by using the Ac696F (5'-TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG-3') and Ac1093R (5'-CMACACCYTTGTTMCCRTGA-3') primers, as described by Gundi *et al.* (28). The 350 bp sequencing product obtained was compared with sequences deposited in the GenBank database, by using the Basic Local Alignment Tool (BLAST) program through the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) server (BLAST Basic Local Alignment Search Tool.htm). An isolate was considered as correctly identified when its partial *rpoB* gene sequence yielded  $\geq 98\%$  similarity with the closest bacterial species sequence in GenBank.

## 2.4 MALDI TOF MS parameters

Bacterial cells were spotted onto Vitek MS<sup>®</sup> target (bioMérieux) followed by the addition of 1  $\mu$ l of the chemical matrix ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix). For *E. coli*, 3 spots were done while for the *Acinetobacter*, strains were spotted on duplicate. Protein mass fingerprints were obtained using the MALDI-TOF VITEK<sup>®</sup>MS plus mass spectrometer (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), within a mass range from 2,000 to 20,000 Da and a tolerance of 0.08%.

At first, a manual calibration of the laser was performed. For this, a minimum of 100 shots were done on the spot containing *E. coli* ATCC8739. Results were represented as mass spectra. Calibration was validated when the intensity of the peaks was comprised between 20 and 100 mV, the amount of the peak intensity was higher than 3,000 mV and if the resolution of the main peaks was at least 600. After validation of the manual calibration, the laser shot 100 times on another *E. coli* spot, serving then as an internal control, then on the *Acinetobacter* spots, and finally also on an *E. coli* spot. When the internal control was satisfying (identification of *E. coli* with a confidence level  $>90\%$ ), protein masses data from all the *Acinetobacter* were acquired by Launchpad<sup>®</sup> and processed, then transferred to SARAMIS<sup>™</sup> server and analysed.

## 2.5 Selection of reference spectra

One spectrum per strain and per culture condition was selected as reference spectrum. To be selected, reference spectra must have a mass number comprised between 70 and 160 and more than 65% of common masses. Moreover, to be chosen spectra for a same considered species must have more than 70% of homology.

## 2.6 Creation of SuperSpectra

Before creating our own SuperSpectra, those present in the SARAMIS<sup>TM</sup> database were inactivated to avoid interferences. Then, for each species (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*), a SuperSpectrum was created on the basis of selection of 40 proteic masses specific of the species considered. Thus, all the non species-specific proteic masses were excluded. These 40 masses were chosen as to be present in the highest number of reference spectra. A greater or lesser weigh was assigned for each of the 40 selected masses, depending on the number of reference spectra where the mass was present. Finally, each SuperSpectrum, created was compared to all the bacterial spectra present in the SARAMIS<sup>TM</sup> database. SuperSpectrum was kept in the database if it did not cross with other species.

## 2.7 Validation of reference spectra and SuperSpectra

Reference spectra and SuperSpectra were validated by testing 100 strains belonging to the *Acb* complex and well identified by *rpoB* sequencing.

Each spectrum of each of the 100 strains obtained by MALDI-TOF MS was first compared with the SuperSpectra belonging to the SARAMIS<sup>TM</sup> database. When a spectrum matched with a SuperSpectrum, the confidence level for the best matching was given. When there was no matching with a SuperSpectrum at a level of confidence of at least 75%, the spectrum of the tested strain was compared with reference spectra of the database. Identification was valid when the level of confidence was higher than 75% when comparison with a SuperSpectrum, and higher than 65 % when comparison with a reference spectrum.



## 3 Results

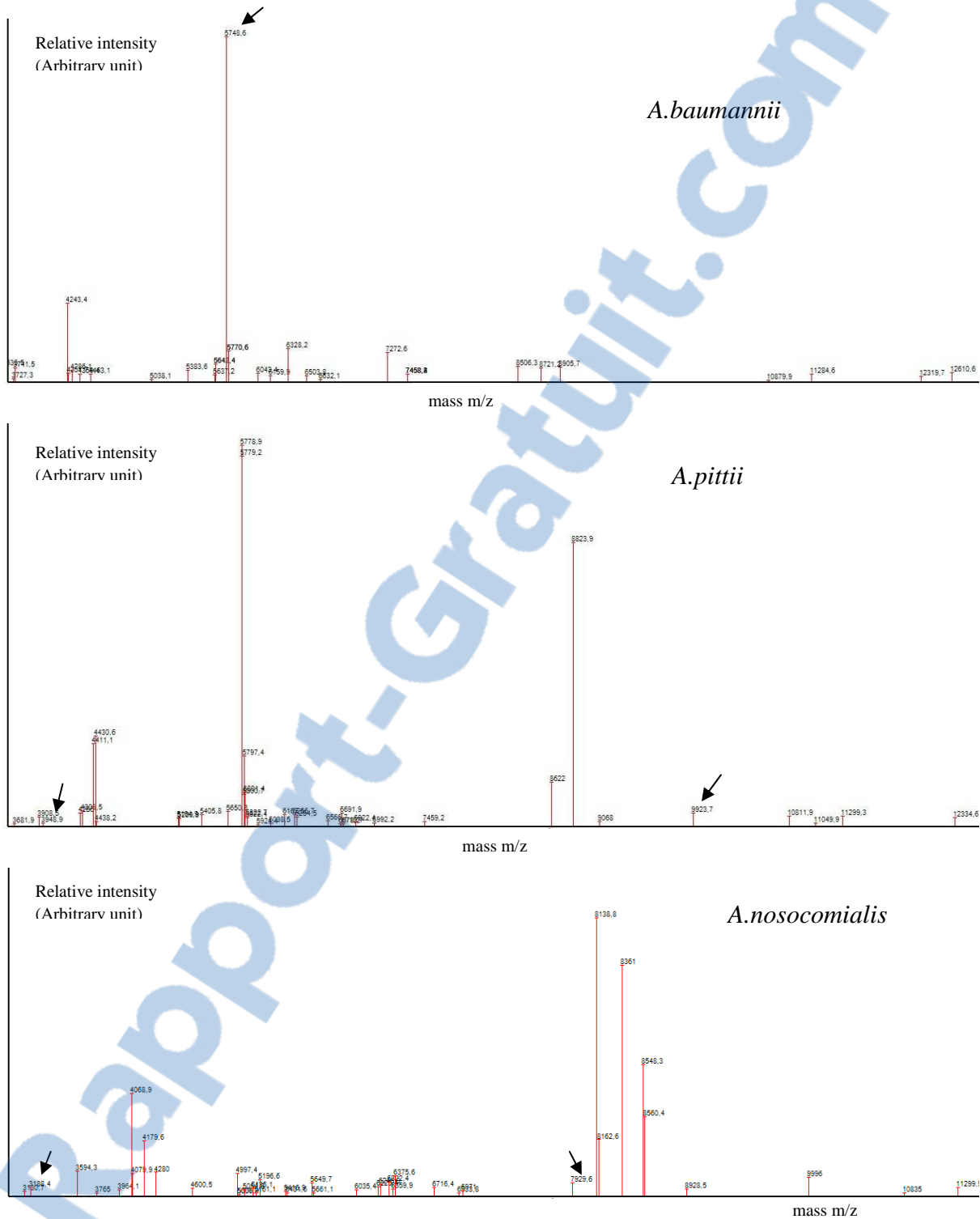
### 3.1 Characteristics of reference spectra and SuperSpectra

One spectrum per medium culture, temperature condition and time of incubation was selected for each strain, giving a total of 120 spectra for *A. baumannii* and *A. pittii*, and 96 spectra for *A. nosocomialis*. All the chosen spectra had a median mass of 109 (min 74-max 158) for *A. baumannii*, 111.5 (73-160) for *A. pittii* and 107.5 (73-158) for *A. nosocomialis*. These spectra were incremented in the SARAMIS<sup>TM</sup> database, as reference spectra.

SuperSpectra of the 3 species were created from reference spectra with a high percentage of homology. Thus, 115 reference spectra were selected for *baumannii* and *A. pittii*, and 96 for *A. nosocomialis*. For each species, the 40 most common and specific proteic masses present in the reference spectra were then selected. Before realization of the Super Spectra, 79 masses common to at least two of the species were excluded. The 40 selected masses used for creation of SuperSpectra are presented in **table I**. Most of them were not present in all the reference spectra. Thus, for *A. baumannii*, only the proteic mass of 5,748.6 Da was present in all the *A. baumannii* reference spectra. Concerning *A. pittii*, two proteic masses at 3,948.9 and 9,923.7 Da were found in all the *A. pittii* reference spectra. Finally, for *A. nosocomialis*, only the masses at 3,188.4 and 7,929.6 Da were present in all the reference spectra. **Figure 1** presents the profile of the SuperSpectrum of *A. baumannii*, *A. pittii* and *A. nosocomialis*.

**Table I** Proteic masses used for the SuperSpectra creation. In bold, the masses present in all the reference spectra of the considered species.

species	Masses (Da) selected for the SuperSpectra creation
<i>A. baumannii</i>	3,055.6; 3,106.3; 3,122.3; 3,162.8; 3,177.5; 3,251.1; 3,330.2; 3,350.4; 3,635.5; 3,727.3; 3,741.5; 4,243.4; 4,251.7; 4,286.1; 4,359.4; 4,463.1; 5,038.1; 5,383.6; 5,637.2; 5,642.4; <b>5,748.6</b> ; 5,770.6; 6,043.4; 6,159.9; 6,328.2; 6,503.8; 6,632.1; 7,272.6; 7,458.2; 7,458.4; 7,458.8; 8,506.3; 8,721.2; 8,905.7; 10,879.9; 11,284.6; 12,319.7
<i>A. pittii</i>	3,179.9; 3,681.9; 3,908.5; <b>3,948.9</b> ; 4,286.0; 4,309.5; 4,411.1; 4,430.6; 4,438.2; 5,194.9; 5,200.9; 5,405.8; 5,650.3; 5,778.9; 5,779.2; 5,797.4; 5,800.7; 5,801.4; 5,822.4; 5,822.7; 5,924.4; 6,038.5; 6,167.5; 6,256.7; 6,284.5; 6,566.7; 6,678.2; 6,691.9; 6,710.7; 6,822.4; 6,992.2; 7,459.2; 8,622.0; 8,823.9; 9,068.0; <b>9,923.7</b> ; 10,811.9; 11,049.9; 11,299.3
<i>A. nosocomialis</i>	3,130.7; <b>3,188.4</b> ; 3,594.3; 3,765.0; 3,964.1; 4,068.9; 4,079.9; 4,179.6; 4,280.0; 4,600.5; 4,997.4; 5,006.9; 5,007.0; 5,054.9; 5,135.1; 5,161.1; 5,196.6; 5,416.9; 5,431.6; 5,649.7; 5,661.1; 6,035.4; 6,225.4; 6,246.9; 6,322.4; 6,359.9; 6,375.6; 6,716.4; 6,933.8; 6,971.0; <b>7,929.6</b> ; 8,138.8; 8,162.6; 8,261.0; 8,548.3; 8,560.4; 8,928.5; 9,996.0; 10,835.0



**Fig 1** Peak profiles of the SuperSpectra from *A. baumannii*, *A. pittii* and *A. nosocomialis*  
 Arrows indicate masses present in all the reference spectra

### 3.2 Validation of the reference spectra and SuperSpectra

A total of 100 strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex were studied to test the new SuperSpectra and reference spectra implemented in SARAMIS™ database. Among them, 91 were isolated in our hospital. Characteristics of these 91 strains are presented in supplementary data 1. Seventy-three strains were identified after comparison with SuperSpectra (at least 75% of common masses) and the identification results were 36 *A. baumannii*, 31 *A. pittii* and 6 *A. nosocomialis*. Among them, 47 had confidence level higher than 90%, 90 a confidence level comprised between 80% and 90% and 11 strains with a confidence level between 75% and 80%. The 27 strains not identified with SuperSpectra were compared to the reference spectra of the database. The identification results were 4 *A. baumannii*, 18 *A. pittii* and 4 *A. nosocomialis*. Only one strain could not be identified with sufficient confidence level. It was a strain that had 55% of the common masses with *A. pittii*.

In parallel, *rpoB* gene sequencing was performed on each of the strains used here, identifying 50 strains as *A. pittii*, 40 as *A. baumannii* and 10 as *A. nosocomialis*. Identifications obtained by *rpoB* sequencing were all consistent with those obtained by mass spectrometry (Table II). Altogether, 99% of the strains were correctly identified by mass spectrometry. The strain having 55% of the common masses with *A. pittii* was identified as *A. pittii* by molecular biology.

**Table II** Comparison of bacterial identifications obtained by *rpoB* gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry.

	Number of strains identified by <i>rpoB</i> sequencing	Number of strains identified by MALDI-TOF MS	Number of strains identified with SuperSpectrum
<i>A. baumannii</i>	40	40	36
<i>A. pittii</i>	50	49	31
<i>A. nosocomialis</i> *	10	10	6

\* Nine of the 10 strains of *A. nosocomialis* were provided by bioMérieux and one strain comes from the bacteriology laboratory of the Hospital University of Angers.

Overall, 90% (36 of 40) of the *A. baumannii* strains were identified through the SuperSpectrum, while for *A. pittii*, only 62% (31 of 50) were identified using the SuperSpectrum. One strain isolated in the laboratory was identified as *A. nosocomialis*, it was

with SuperSpectrum. This strain was isolated from a pharyngeal screening in intensive care unit.

## 4 Discussion

*A. baumannii* is an opportunistic pathogen involved in a wide number of nosocomial infections and belonging to the *Acb* complex, as well as 2 other human pathogenic species *A. pittii* and *A. nosocomialis*, and the environmental bacterium *A. calcoaceticus*. Correct identification of these bacteria at the species level is difficult with current phenotypic methods available and this would result in misidentification of approximately 25% of the strains according to Higgins *et al.* (25). The MALDI-TOF mass spectrometry has been developed in the past 10 years for routine identification allowing easier and faster diagnosis of human pathogens than conventional phenotypic and molecular identification methods (53). Thus, in many cases identification could be possible at the species, subspecies, strain and lineage levels (32). This technique can also be used for identification of fastidious bacteria such as anaerobic (34). More recently, this technology has been used for rapid identification of carbapenem resistance in Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* (39–41).

Concerning identification by MALDI-TOF MS at a species level of bacteria belonging to the *Acb* complex, contradictory results have been observed with the Bruker mass spectrometer. For example, a study performed by Alverrez-Buylla *et al.* showed a misidentification at the species level of 48% of the *Acinetobacter* tested (55), whereas Espinal *et al.* showed in their study a reliable identification of 98.3% of the *Acinetobacter* tested by this mass spectrometry. It is however to notice that in the latter case, bacteria were identified after extraction (56). Concerning identification with the bioMérieux mass spectrometer, to our knowledge, no study has been carried out. Thus, in this study, we developed the SARAMIS™ database of the VITEK® MS plus mass spectrometer to improve identification of *A. baumannii*, *A. pittii* and *A. nosocomialis*. To do this, we first incremented mass spectra, designated as reference spectra, and obtained from well-characterized strains cultivated on different media, temperatures and after different incubation times. It is important to consider spectra obtained from strains cultivated in different culture conditions because in clinical laboratories, *Acinetobacter* strains can be found from various pathogenic samples seeded on different culture media and at different temperatures.

In the next step, we used these reference spectra to create SuperSpectra that were obtained from selected protein masses, specific and representative for each species. To do this, a list of protein masses common in at least 2 of the 3 species was created; these masses were not taken into account for the SuperSpectra creation. The difficulty was then to choose the 40 best protein masses specific to each of these 3 species. Indeed, considering a species, not all masses were retrieved in all reference spectra. To overcome this, a different weight was assigned to each selected protein mass, according to the frequency of presence in the reference spectra. For *A. baumannii*, among the 40 masses selected, we have found a mass at 5,748 Da, the only proteic mass present in all the *A. baumannii* reference spectra, and that has been previously described by Sedo et al. (42) who worked on the identification of the *Acb* complex species of by using the Bruker Daltonik mass spectrometer.

Differentiation of the species of *Acb* complex was performed in previous studies but the techniques to achieve it were different from ours: a study changed the sample preparation before deposition on the matrix (42) and another study analyzed the spectra with chemometrics (43) which is a technique of multivariate data analysis. These studies showed very good results: between 90 and 99% of correct identification. But to our knowledge, no study has so far been performed on the VITEK<sup>®</sup>MS plus to improve identification at a species level of the *Acb* complex.

Manual calibration is a fundamental step before using RUO application for bacterial identification. This step allows good calibration of the laser that can be slightly disturbed when switching from IVD to RUO application. If the calibration is not congruent, the spectra obtained by the MALDI-TOF can be of lower quality, resulting to a wrong interpretation.

We validated our database with a panel of 100 strains, among them 91 were clinical strains isolated during infections or in a context of colonization, in our hospital. Our database allowed correct identification of 99% of these strains at a species level, and among them, 73% with the SuperSpectra we created. These good results were confirmed by comparison with the reference technique *rpoB* sequencing. They showed that the masses used to realize our SuperSpectra were specific and representative of each considered species.

The database that we have developed in this study applies only in research mode (SARAMIS<sup>™</sup>) and may not be transposed to the IVD database. Indeed, the two databases use different algorithms: the SARAMIS<sup>™</sup> base identifies strains from Super Spectra created with inserted reference spectra, while the IVD database identifies strains after assignation of scores according to the number of peaks in a segment of the diagram. Thus, our work requires to be improved so that the spectra are integrated into the IVD database.

## 5 Conclusion

In conclusion, our work has optimized SARAMIS<sup>TM</sup> database to enable rapid and reliable identification of the three species of the *Acb* complex described as pathogenic for humans, *A. baumannii*, *A. pittii* and *A. nosocomialis*. This database may be a good alternative to molecular biology whose cost and technicity are more important. It would be interesting now to develop IVD database to allow correct identification of the species of the *Acb* complex because this database is the only validated in the context of medical diagnosis.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Joly-Guillou M-L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect.* nov 2005;11(11):868-873.
2. Cisneros JM, Rodriguez-Bano J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(11):687-93.
3. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 14 juill 2008;21(3):538-582.
4. Gootz TD, Marra A. *Acinetobacter baumannii*: an emerging multidrug-resistant threat. *Expert Rev Anti Infect Ther.* juin 2008;6(3):309-325.
5. Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. *Acinetobacter baumannii* Skin and Soft-Tissue Infection Associated with War Trauma. *Clin Infect Dis.* 15 août 2008;47(4):444-449.
6. Wang Y, Hao P, Lu B, Yu H, Huang W, Hou H, et al. Causes of Infection after Earthquake, China, 2008. *Emerg Infect Dis.* juin 2010;16(6):974-975.
7. Leung W-S, Chu C-M, Tsang K-Y, Lo F-H, Lo K-F, Ho P-L. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. *CHEST J.* 2006;129(1):102-9.
8. Bouvet PJM, Grimont PAD. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol.* 4 janv 1986;36(2):228-240.
9. Carr EL, Kämpfer P, Patel BKC, Gürtler V, Seviour RJ. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol.* 7 janv 2003;53(4):953-963.



10. Nemeč A, Musílek M, Maixnerová M, Baere TD, Reijden TJK van der, Vaneechoutte M, et al. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 janv 2009;59(1):118-124.
11. Nemeč A, Musílek M, Šedo O, Baere TD, Maixnerová M, Reijden TJK van der, et al. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol.* 4 janv 2010;60(4):896-903.
12. Alvarez-Perez S, Lievens B, Jacquemyn H, Herrera CM. *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. *Int J Syst Evol Microbiol.* 17 août 2012;63(Pt 4):1532-1539.
13. Anandham R, Weon H-Y, Kim S-J, Kim Y-S, Kim B-Y, Kwon S-W. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *J Microbiol Seoul Korea.* févr 2010;48(1):36-39.
14. Malhotra J, Anand S, Jindal S, Rajagopal R, Lal R. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *Int J Syst Evol Microbiol.* déc 2012;62(Pt 12):2883-2890.
15. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol.* mai 2011;162(4):393-404.
16. Nemeč A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I, De Baere T, Janssens D, Van Der Reijden TJK, et al. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* sept 2003;53(Pt 5):1563-1567.
17. Nishimura Y, Ino T, Iizuka H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil. *Int J Syst Bacteriol.* 4 janv 1988;38(2):209-211.

18. Vaz-Moreira I, Novo A, Hantsis-Zacharov E, Lopes AR, Gomila M, Nunes OC, et al. *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol.* 12 janv 2011;61(12):2837-2843.
19. Nemec A, De Baere T, Tjernberg I, Vaneechoutte M, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* sept 2001;51(Pt 5):1891-1899.
20. Kim D, Baik KS, Kim MS, Park SC, Kim SS, Rhee MS, et al. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *J Microbiol.* 1 août 2008;46(4):396-401.
21. Vaneechoutte M, Nemec A, Musílek M, Reijden TJK van der, Barselaar M van den, Tjernberg I, et al. Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 6 janv 2009;59(6):1376-1381.
22. Bouvet PJ, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res Microbiol.* juin 1989;140(4-5):291-299.
23. Tjernberg I, Ursing J. Clinical studies of acinetobacter classified By DNA-DNA hybridization. 1989. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* mai 2007;115(5):646-656; discussion 657-658.
24. Gerner-Smidt P, Tjernberg I. *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* nov 1993;101(11):826-832.
25. Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. *gyrB* Multiplex PCR To Differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* Genomic Species 3. *J Clin Microbiol.* 29 sept 2010;48(12):4592-4594.
26. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the *blaOXA-51*-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *J Clin Microbiol.* 4 août 2006;44(8):2974-2976.

27. La Scola B, Gundi VAKB, Khamis A, Raoult D. Sequencing of the rpoB Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of Acinetobacter Species. *J Clin Microbiol.* 3 mars 2006;44(3):827-832.
28. Gundi VAKB, Dijkshoorn L, Burignat S, Raoult D, La Scola B. Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging Acinetobacter species. *Microbiology.* 23 avr 2009;155(7):2333-2341.
29. Towner KJ. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect.* déc 2009;73(4):355-363.
30. Dettori M, Piana A, Deriu MG, Lo Curto P, Cossu A, Musumeci R, et al. Outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii in an intensive care unit. *New Microbiol.* avr 2014;37(2):185-191.
31. Carbonnelle É, Nassif X. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *médecine/sciences.* 21 oct 2011;27(10):882-888.
32. Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, La Scola B, Drancourt M, Raoult D. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* 1 nov 2010;5(11):1733-1754.
33. Mellmann A, Bimet F, Bizet C, Borovskaya AD, Drake RR, Eigner U, et al. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol.* nov 2009;47(11):3732-3734.
34. Nagy E. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new possibility for the identification and typing of anaerobic bacteria. *Future Microbiol.* 1 févr 2014;9(2):217-233.
35. Fangous M-S, Mougari F, Gouriou S, Calvez E, Raskine L, Cambau E, et al. A classification algorithm for subspecies identification within the Mycobacterium abscessus species, based on Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 9 juill 2014;

36. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol.* mai 2010;48(5):1584-1591.
37. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 1 févr 2010;48(2):444-447.
38. Szabados F, Michels M, Kaase M, Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT<sup>TM</sup> (bioMérieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* févr 2011;17(2):192-195.
39. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel J-M, Drissi M, et al. Rapid Detection of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Bereswill S, éditeur. *PLoS ONE.* 16 févr 2012;7(2):e31676.
40. Hrabak J, Chudackova E, Walkova R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *Clin Microbiol Rev.* 1 janv 2013;26(1):103-114.
41. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *J Clin Microbiol.* 1 mars 2012;50(3):927-937.
42. Šedo O, Nemeč A, Křížová L, Kačalová M, Zdráhal Z. Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus*—*Acinetobacter baumannii* complex. *Syst Appl Microbiol.* déc 2013;36(8):572-578.
43. Sousa C, Botelho J, Silva L, Grosso F, Nemeč A, Lopes J, et al. MALDI-TOF MS and chemometric based identification of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter*

- baumannii complex species. *Int J Med Microbiol* [Internet]. mai 2014 [cité 2 juill 2014]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422114000502>
44. Lee Y-C, Huang Y-T, Tan C-K, Kuo Y-W, Liao C-H, Lee P-I, et al. *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. *J Antimicrob Chemother.* août 2011;66(8):1839-1846.
  45. Park K-H, Shin J-H, Lee SY, Kim SH, Jang MO, Kang S-J, et al. The clinical characteristics, carbapenem resistance, and outcome of *Acinetobacter* bacteremia according to genospecies. *PloS One.* 2013;8(6):e65026.
  46. Boo TW, Walsh F, Crowley B. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in an Irish university hospital: predominance of *Acinetobacter* genomic species 3. *J Med Microbiol.* févr 2009;58(Pt 2):209-216.
  47. Yang J, Chen Y, Jia X, Luo Y, Song Q, Zhao W, et al. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* déc 2012;18(12):E506-513.
  48. Idzenga D, Schouten MA, van Zanten ARH. Outbreak of *Acinetobacter* genomic species 3 in a Dutch intensive care unit. *J Hosp Infect.* août 2006;63(4):485-487.
  49. Molina J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Baño J, Ribera A, Beceiro A, et al. Clinical Features of Infections and Colonization by *Acinetobacter* Genospecies 3. *J Clin Microbiol.* 12 janv 2010;48(12):4623-4626.
  50. Wisplinghoff H, Paulus T, Lugenheim M, Stefanik D, Higgins PG, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *J Infect.* mars 2012;64(3):282-290.
  51. Karah N, Haldorsen B, Hegstad K, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *J Antimicrob Chemother.* 4 janv 2011;66(4):738-744.
  52. Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H, Körber-Irrgang B, Kresken M, Seifert H. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in

Germany over a 5-year period (2005-2009). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* août 2013;19(8):737-742.

53. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J Clin Microbiol.* 17 févr 2010;48(4):1169-1175.
54. Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, et al. 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. *J Clin Microbiol.* juin 2008;46(6):1946-1954.
55. Álvarez-Buylla A, Culebras E, Picazo JJ. Identification of *Acinetobacter* species: Is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect Genet Evol.* mars 2012;12(2):345-349.
56. Espinal P, Seifert H, Dijkshoorn L, Vila J, Roca I. Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (Ab) group by MALDI-TOF MS: MALDI-TOF MS identification of *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect.* nov 2012;18(11):1097-1103.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 Exemple de résultat obtenu par le logiciel SARAMIS™ après analyse de souches par spectrométrie de masse.....	18
Figure 2 Super spectre d' <i>A. baumannii</i> , <i>A. pittii</i> et <i>A. nosocomialis</i> (les flèches représentent les pics retrouvés dans tous les spectres de référence de l'espèce considérée).....	20
Figure 3 Structure schématisée d'un spectromètre de masse de type MALDI TOF (référence bioMérieux).....	51
Figure 4 Protocole de dépôt (référence bioMérieux) .....	52

Fig 1 Peak profiles of the SuperSpectra from <i>A. baumannii</i> , <i>A. pittii</i> and <i>A. nosocomialis</i> .....	35
--	----

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I Liste des espèces du genre <i>Acinetobacter</i> en date de décembre 2013 .....	12
Tableau II Masses retenues pour la création des super spectres. Les masses en gras sont celles présentes dans tous les spectres de référence ayant servi à la création du super spectre. ....	19
Tableau III Répartition des souches d' <i>Acb</i> étudiées en fonction de la localisation du patient et du type de prélèvement .....	21
Tableau IV Comparaison des identifications bactériennes obtenues par séquençage du gène <i>rpoB</i> et par spectrométrie de masse.....	23
Table I Proteic masses used for the SuperSpectra creation. In bold, the masses present in all the reference spectra of the considered species.....	34
Table II Comparison of bacterial identifications obtained by <i>rpoB</i> gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry. ....	36



# TABLE DES MATIERES

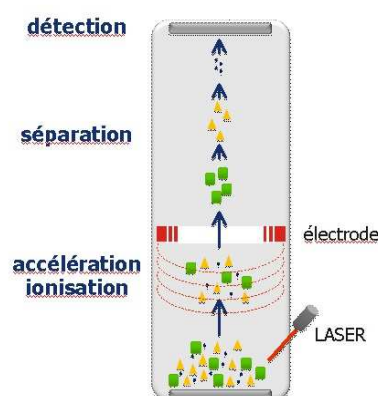
TRAVAIL DE THESE REDIGE EN FRANCAIS.....	11
1 Introduction.....	11
2 Matériels et méthodes .....	14
2.1 Souches bactériennes .....	14
2.2 Séquençage <i>rpoB</i> .....	14
2.3 Spectromètre de masse .....	15
2.4 Principe de la base de données SARAMIS <sup>TM</sup> .....	16
2.5 Création des super spectres.....	17
2.6 Validation des super spectres et des spectres de référence.....	17
3 Résultats.....	18
3.1 Caractéristiques des spectres de référence et des super spectres de notre étude .....	18
3.2 Validation des super spectres et des spectres de référence.....	21
3.3 Résultats du séquençage du gène <i>rpoB</i> et comparaison avec les résultats obtenus par spectrométrie de masse.....	22
4 Discussion .....	23
5 Conclusion .....	26
TRAVAIL DE THESE REDIGE EN ANGLAIS, SOUS FORME D'ARTICLE.....	27
1 Introduction.....	29
2 Materials and methods .....	30
2.1 Bacterial strains .....	30
2.2 Culture conditions.....	30
2.3 <i>rpoB</i> gene sequencing .....	31
2.4 MALDI TOF MS parameters .....	31
2.5 Selection of reference spectra.....	32
2.6 Creation of SuperSpectra.....	32
2.7 Validation of reference spectra and SuperSpectra.....	32
3 Results.....	33
3.1 Characteristics of reference spectra and SuperSpectra.....	33
3.2 Validation of the reference spectra and SuperSpectra.....	36

4	Discussion .....	37
5	Conclusion .....	39
	BIBLIOGRAPHIE .....	40
	LISTE DES FIGURES .....	47
	LISTE DES TABLEAUX .....	48
	TABLE DES MATIERES .....	49
	ANNEXE 1 .....	51
	ANNEXE 2 .....	54

# ANNEXE 1

L'identification bactérienne est en pleine évolution. Jusqu'à récemment, les bactéries étaient identifiées à partir de leurs caractères biochimiques, mais depuis quelques années s'est développée une nouvelle technique d'identification basée sur l'analyse des protéines par spectrométrie de masse.

En bactériologie, le spectromètre de masse utilisé est un MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionisation- time of flight) qui comprend 2 composants : une source d'ionisation (MALDI) et un analyseur (TOF) (**Figure 3**).



**Figure 3** Structure schématisée d'un spectromètre de masse de type MALDI TOF (référence bioMérieux)

Ce spectromètre de masse permet l'analyse des protéines ribosomales qui sont produites en grande quantité par les bactéries et peu influencées par les conditions de culture. L'échantillon à analyser est placé sur une cible avec une matrice acide de type CHCA (acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique) (**Figure 4**). L'ensemble échantillon/matrice cristallise puis est ionisé à l'aide d'un faisceau laser. Les ions ainsi formés sont soumis à un champ électrique et entrent dans un tube sous vide au bout duquel est placé un détecteur. Les ions sont séparés selon leur rapport masse/charge par la durée de leur « temps de vol » jusqu'au détecteur. Ces rapports permettent d'obtenir des spectres qui sont ensuite comparés à une base de données fournie avec l'automate.



**Figure 4** Protocole de dépôt (référence bioMérieux)

Au laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers, le spectromètre utilisé est le VITEK<sup>®</sup>MS plus de bioMérieux. Ce spectromètre de masse peut être utilisé pour l'identification bactérienne en routine grâce à une base de données non modifiable appelée IVD (in vitro diagnosis) qui contient les spectres d'environ 800 espèces bactériennes et fongiques. Pour l'identification est utilisé l'algorithme Advanced Spectra Classifier (ASC) : les spectres sont séparés en différents « bins » ou segments, selon le nombre de pics contenus dans un bin et selon son poids pour l'identification (spécificité ou non), on obtient un score qui est ensuite comparé aux scores des spectres de la base de données.

Il existe une autre base de données fournie avec l'automate qui est utilisable en recherche seulement et qui peut être modifiée. Cette base se nomme SARAMIS<sup>™</sup> (spectral archive and microbial identification system). L'identification à partir de cette base de données n'est pas autorisée en routine. Le principe d'identification est différent : à partir de différents spectres d'une espèce dit « spectres de référence », on crée un « super spectre » qui contient les masses les plus fréquemment retrouvés dans une espèce. L'échantillon à analyser est d'abord comparé masse à masse à ces « super spectres » et si aucun résultat n'est obtenu, il est comparé aux différents spectres de référence présents dans la base de données.

La base de données SARAMIS est une base de données ouverte c'est-à-dire qu'elle peut être modifiée. De nouveaux spectres de référence ou super spectres peuvent être ajoutés, des super spectres peuvent être inactivés et des spectres de référence ôtés de la base de données. De plus cette base permettrait de comparer des souches entre elles et donc de réaliser des dendrogrammes.

L'utilisation en routine du spectromètre de masse pour l'identification bactérienne présente de nombreux avantages.

Il s'agit d'une technique fiable : l'identification est correcte dans plus de 95 % des cas, rapide : moins d'une minute par germe, peu chère et facile d'utilisation. Les erreurs d'identification sont peu nombreuses, elles sont dues le plus souvent à un dépôt de mauvaise qualité ou à une absence de référence correspondante dans la base de données.

## ANNEXE 2

Détail des souches cliniques utilisées dans cette étude.

Numéro de souche	Date d'isolement	Localisation du patient	Site d'isolement	Espèces d' <i>Acinetobacter</i>	Identification par	Indice de confiance
2	31/08/2013	Bloc opératoire	Liquide articulaire	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	88,7
4	04/10/2013	Chirurgie	cathéter	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	80,4
5	14/10/2013	Oncologie	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	79,8
6	23/10/2013	SSR <sup>1</sup>	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	99,9
7	08/11/2013	Gériatrie	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
8	13/11/2013	Maladies infectieuses	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	97,2
9	14/01/2013	Hématologie	ORL <sup>7</sup> (langue)	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	90
10	04/01/2013	SSR	urines	<i>A. baumannii</i>	super spectre	86,6
11	08/01/2013	Maternité	vaginal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	>99,9
12	08/01/2013	Néphrologie	urines	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	71,4
13	09/01/2013	Réanimation médicale	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
14	28/01/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	96,9
15	30/01/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	spectre de référence	91,2
16	09/02/2013	Néphrologie	cathéter	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	82,3
17	11/02/2013	Médecine	vaginal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	90,1
18	19/02/2013	Chirurgie	bile	<i>A. pittii</i>	spectre de	96,4

19	19/02/2013	HGE <sup>2</sup>	ascite	<i>A. pittii</i>	référence spectre de référence	91,3
20	06/03/2013	Urologie	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	96,6
21	12/03/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	93,6
22	14/03/2013	Réanimation médicale	respiratoire ASB <sup>4</sup>	<i>A. baumannii</i>	super spectre	99,9
23	18/03/2013	Pédiatrie	respiratoire AST <sup>5</sup>	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	87,8
24	07/04/2013	Médecine	urines	<i>A. baumannii</i>	super spectre	>99,9
25	09/04/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. baumannii</i>	spectre de référence	86,7
26	19/04/2013	SSR	hémocultures	<i>A. pittii</i>	super spectre	93,2
27	23/04/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	80,7
28	29/04/2013	SSR	hémocultures	<i>A. baumannii</i>	super spectre	76
29	17/05/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	83,4
30	28/05/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	99,9
31	18/06/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. baumannii</i>	super spectre	96,7
32	18/06/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	92,8
33	01/07/2013	SSR	hémocultures	<i>A. pittii</i>	super spectre	93,2
34	02/07/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	>99,9
35	02/07/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. pittii</i>	super spectre	83,2
36	12/07/2013	SSR	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	76,5
37	16/07/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. baumannii</i>	super spectre	93,2
38	24/07/2013	Urgences	pus	<i>A. pittii</i>	spectre de	93,2

					référence	
39	25/07/2013	Urgences	pus	<i>A. baumannii</i>	super spectre	> 99,9
40	26/07/2013	SSR	urines	<i>A. baumannii</i>	super spectre	> 99,9
41	27/07/2013	Urologie	cicatrice	<i>A. baumannii</i>	super spectre	> 99,9
42	07/01/2014	Réanimation chirurgicale	respiratoire LBA <sup>6</sup>	<i>A. baumannii</i>	super spectre	96,8
43	29/07/2013	MPU <sup>3</sup>	pus	<i>A. baumannii</i>	super spectre	>99,9
44	04/08/2013	Cardiologie	hémocultures	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
45	04/08/2013	Pédiatrie	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
46	05/08/2013	Réanimation chirurgicale	respiratoire LBA	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	84,2
47	08/08/2013	Néphrologie	urines	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	56,7
48	11/08/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. pittii</i>	super spectre	80
49	18/08/2013	SSR	hémocultures	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
50	22/08/2013	Obstétrique	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
51	27/08/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. baumannii</i>	super spectre	83,4
52	30/08/2013	SSR	urines	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	77,6
53	03/09/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
54	03/09/2013	Pneumologie	respiratoire ASB	<i>A. pittii</i>	super spectre	76,7
55	15/09/2013	HGE	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	96,6
56	28/09/2013	Dermatologie	urines	<i>A. baumannii</i>	super spectre	86,7
57	28/09/2013	Oncologie	hémocultures	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	84,4



58	01/10/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. baumannii</i>	super spectre	76,1
59	01/10/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
60	07/10/2013	Hématologie	hémocultures	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
61	08/10/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	97
62	08/10/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. baumannii</i>	super spectre	90,3
63	10/10/2013	Hématologie	cathéter	<i>A. pittii</i>	super spectre	79,9
64	14/10/2013	SSR	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	83,3
65	15/10/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. pittii</i>	super spectre	99,9
66	18/10/2013	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. baumannii</i>	super spectre	90
67	21/10/2013	Médecine	urines	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	66,7
68	22/10/2013	Urgences	urines	<i>A. baumannii</i>	spectre de référence	90
69	03/11/2013	Urgences	hémocultures	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	92,7
70	04/11/2013	Hématologie	hémocultures	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	75,9
71	06/11/2013	Pneumologie	urines	<i>A. baumannii</i>	super spectre	99,9
72	30/12/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	83,4
73	05/12/2013	Chirurgie	plaie	<i>A. pittii</i>	super spectre	79,3
74	10/12/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
75	10/12/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. pittii</i>	spectre de référence	95,6
76	10/12/2013	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	90,2
77	17/12/2013	Réanimation médicale	respiratoire	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9

			ASB			
78	17/12/2013	Réanimation chirurgicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	>99,9
79	21/01/2014	Dialyse	pus	<i>A. pittii</i>	super spectre	76,5
80	11/02/2014	Hématologie	hémocultures	<i>A. baumannii</i>	super spectre	93,7
81	03/03/2014	Oncologie	hémocultures	<i>A. baumannii</i>	super spectre	>99,9
82	02/01/2014	Réanimation médicale	respiratoire AST	<i>A. baumannii</i>	super spectre	>99,9
83	16/01/2014	Hématologie	urines	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
84	20/01/2014	Pneumologie	respiratoire ASB	<i>A. pittii</i>	super spectre	83,4
85	28/01/2014	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. baumannii</i>	super spectre	75,8
86	02/02/2014	Réanimation médicale	abcès	<i>A. pittii</i>	super spectre	>99,9
87	08/02/2014	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	96,9
88	09/02/2014	Réanimation médicale	dépistage rectal	<i>A. baumannii</i>	super spectre	96,7
89	10/02/2014	Réanimation médicale	abcès	<i>A. pittii</i>	super spectre	79,8
90	11/02/2014	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. nosocomialis</i>	spectre de référence	84,6
101	08/03/2014	Pédiatrie	respiratoire AST	<i>A. pittii</i>	super spectre	79,5
103	23/02/2014	Réanimation médicale	dépistage pharyngé	<i>A. baumannii</i>	spectre de référence	65,5
105	16/03/2014	Chirurgie	plaie	<i>A. baumannii</i>	super spectre	>99,9

<sup>1</sup>SSR : soins de suite et de réadaptation ; <sup>2</sup>HGE : hépato-gastro-entérologie ; <sup>3</sup>MPU : médecine post-urgences ; <sup>4</sup>ASB : aspiration bronchique ; <sup>5</sup>AST : aspiration trachéale ; <sup>6</sup>LBA : lavage broncho-alvéolaire ; <sup>7</sup>ORL : oto-rhino-laryngologie