

Nouvelles stratégies de détection et de surveillance des bactéries multi-résistantes

J.-M. ROLAIN¹, M. BERRAZEG¹

RÉSUMÉ

L'augmentation et la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif représentent un problème majeur de santé publique et conduisent non seulement à l'augmentation de la mortalité, de la morbidité et du coût de traitement, mais aussi continuent à mettre en danger la vie des patients, surtout en cas d'immunodépression. Face à cette problématique touchant toutes les régions du monde et suite à de nombreuses recommandations, plusieurs études épidémiologiques et moléculaires ont été rapportées, afin de contrôler et surveiller la diffusion et la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Il est cependant indispensable de développer de nouveaux outils de détection et de surveillance de la résistance aux antibiotiques. Cet article a pour but de montrer comment de nouvelles technologies peuvent être appliquées à la microbiologie clinique pour la détection, la description et la surveillance de la résistance aux antibiotiques.

MOTS-CLÉS : bactéries multi-résistantes, mécanismes de résistance aux antibiotiques, outils de détection de la résistance, outils de surveillance de la résistance.

I. - INTRODUCTION

La résistance aux antibiotiques, bien que n'étant pas un phénomène nouveau, est actuellement un problème majeur de santé publique dans le monde (1). Depuis plusieurs dizaines d'années, les bactéries communément impliquées en pathologie humaine ont développé des mécanismes de résistance vis-à-vis de tout nouvel antibiotique, si bien qu'aujourd'hui, l'émergence de bactéries multi-résistantes associée au net ralentissement de la mise sur le marché de nouvelles molécules antibiotiques représente une véritable menace, d'autant que toutes les classes d'antibiotiques sont concernées par ce phénomène. Dans l'Union européenne, on estime que 25 000 patients décèdent chaque année d'infections causées par des germes multi-résistants, et le coût annuel que représentent les soins de santé supplémentaires liés à des bactéries résistantes est d'environ 0,9 milliard d'euros.

L'intérêt porté à ce sujet ne cesse d'augmenter afin d'évaluer la progression des résistances existantes, et de pouvoir détecter et surveiller l'émergence de nouvelles

souches bactériennes résistantes. Les priorités actuelles concernant la problématique de la résistance aux antibiotiques comprennent trois volets principaux : i) l'identification des réservoirs de gènes de résistance (homme, animaux, environnement) ; ii) l'utilisation de technologies innovantes pour étudier ces résistances (séquençage génomique, spectrométrie de masse, bioinformatique, etc.) ; et iii) la mise en place de systèmes de surveillance de la résistance aux antibiotiques au niveau local, national et international (1).

Cet article a pour but de décrire quelques exemples de nouvelles technologies appliquées à la microbiologie clinique pour la détection et la description des nouvelles résistances aux antibiotiques, ainsi que les nouveaux outils de surveillance de la résistance aux antibiotiques.

¹ URMITE, CNRS-IRD UMR 6236, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5.

II. - NOUVEAUX OUTILS DE DÉTECTION DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

A) Développement de techniques de PCR en temps réel

L'émergence et la diffusion rapide des nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques nécessitent, de la part des microbiologistes, une veille bibliographique permettant d'identifier les publications scientifiques majeures sur ce sujet, afin de pouvoir développer rapidement des tests de détection phénotypique et moléculaire.

L'exemple le plus marquant de ces dernières années est l'émergence des carbapénémases chez les bactéries à Gram négatif, des enzymes qui confèrent une résistance à quasiment toutes les bêta-lactamines, dont les carbapénèmes. Ainsi, le gène New Delhi metallo-beta-lactamase - 1 (NDM-1) a été rapporté chez une souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée d'un patient suédois souffrant d'une infection urinaire à New Delhi, en Inde, en décembre 2009 (3). Puis, en août 2010, ont été rapportés 180 cas de patients au Royaume-Uni, en Inde et au Pakistan infectés par différentes souches d'entérobactéries porteuses de cette carbapénémase (4), suggérant qu'une nouvelle pandémie liée à ce gène était en train de se propager dans le monde (5).

Nous avons immédiatement alerté la communauté scientifique de ce risque car nous avions isolé, en avril 2010, à Marseille, une souche de *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes chez un patient hospitalisé initialement à New Delhi après avoir été victime d'un accident de moto – souche qui s'était avérée être porteuse de ce gène NDM-1 – et alors que d'autres cas commençaient à être décrits dans le monde (5). Nous avons ensuite développé un test de PCR en temps réel, capable de détecter et d'identifier ce

gène à partir de prélèvements pour le dépistage et à partir de souches résistantes aux carbapénèmes (6). Les amorces et la sonde développées pour détecter ce gène ont été « désignées » à l'aide d'un logiciel disponible gratuitement en ligne (« Primer 3 »), puis commandées et testées sur une série d'environ 100 souches d'intérêt clinique avant d'être validées puis mises à disposition de la communauté scientifique (6). La **figure 1** représente le détail des amorces et de la sonde désignées pour la détection du gène NDM-1. Il est ainsi possible de désigner de nombreux jeux de PCR en temps réel qui permettent à des laboratoires référents d'identifier rapidement le support moléculaire de la résistance aux carbapénèmes chez les bactéries porteuses de carbapénémases, comme cela a également été rapporté chez *Acinetobacter baumannii* (7-9).

L'exemple du gène NDM-1 montre à quel point les nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent apparaître et se propager de manière très rapide. En effet, entre août 2010 et novembre 2013, plus de 400 publications en rapport avec la diffusion de ce gène NDM-1 ont été rapportées dans le monde. La mise à disposition rapide d'un nouveau test moléculaire permet ainsi, non seulement d'identifier le support de la résistance chez des bactéries isolées de patients, mais également de réaliser des dépistages du portage digestif de bactéries hébergeant ce gène chez les patients hospitalisés en France et de retour d'une zone d'endémie.

B) Séquençage génomique

Ces dernières années ont vu également le développement de techniques de séquençage à haut débit pour l'analyse complète de génomes bactériens comme nouveaux outils de détection et de description de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques (10). Il existe actuellement plus de 8 000 génomes bactériens disponibles dans

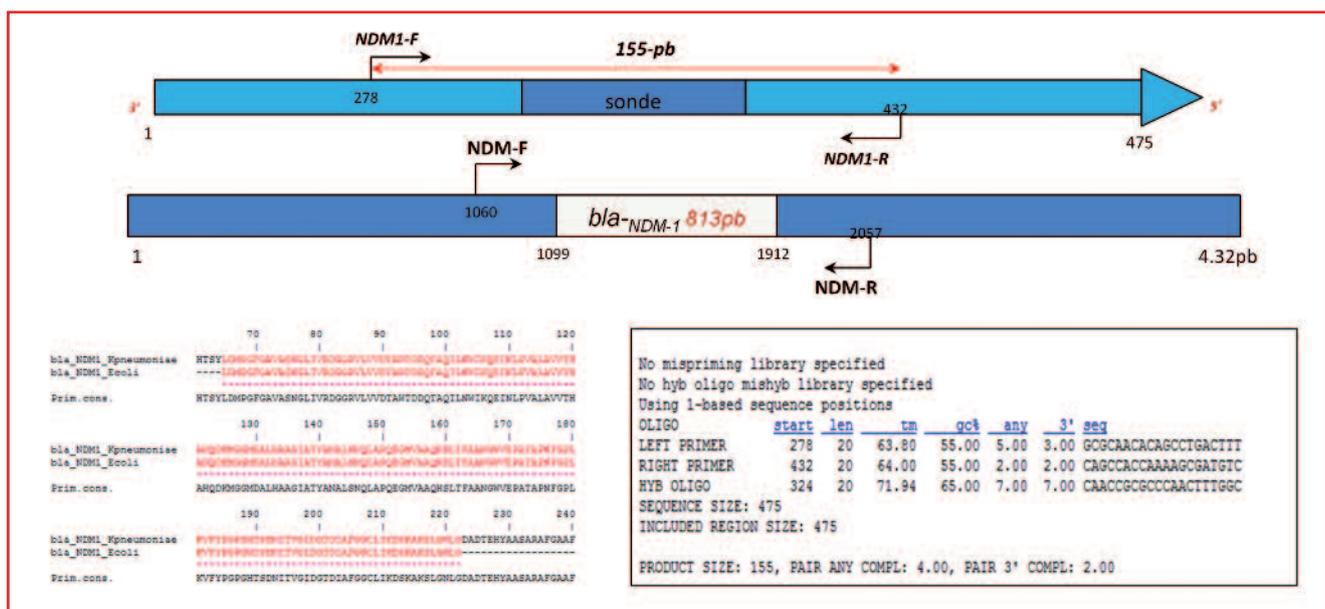


Fig. 1 - Stratégie de désignation des amorces et de la sonde pour la détection du gène bla_{NDM-1} .

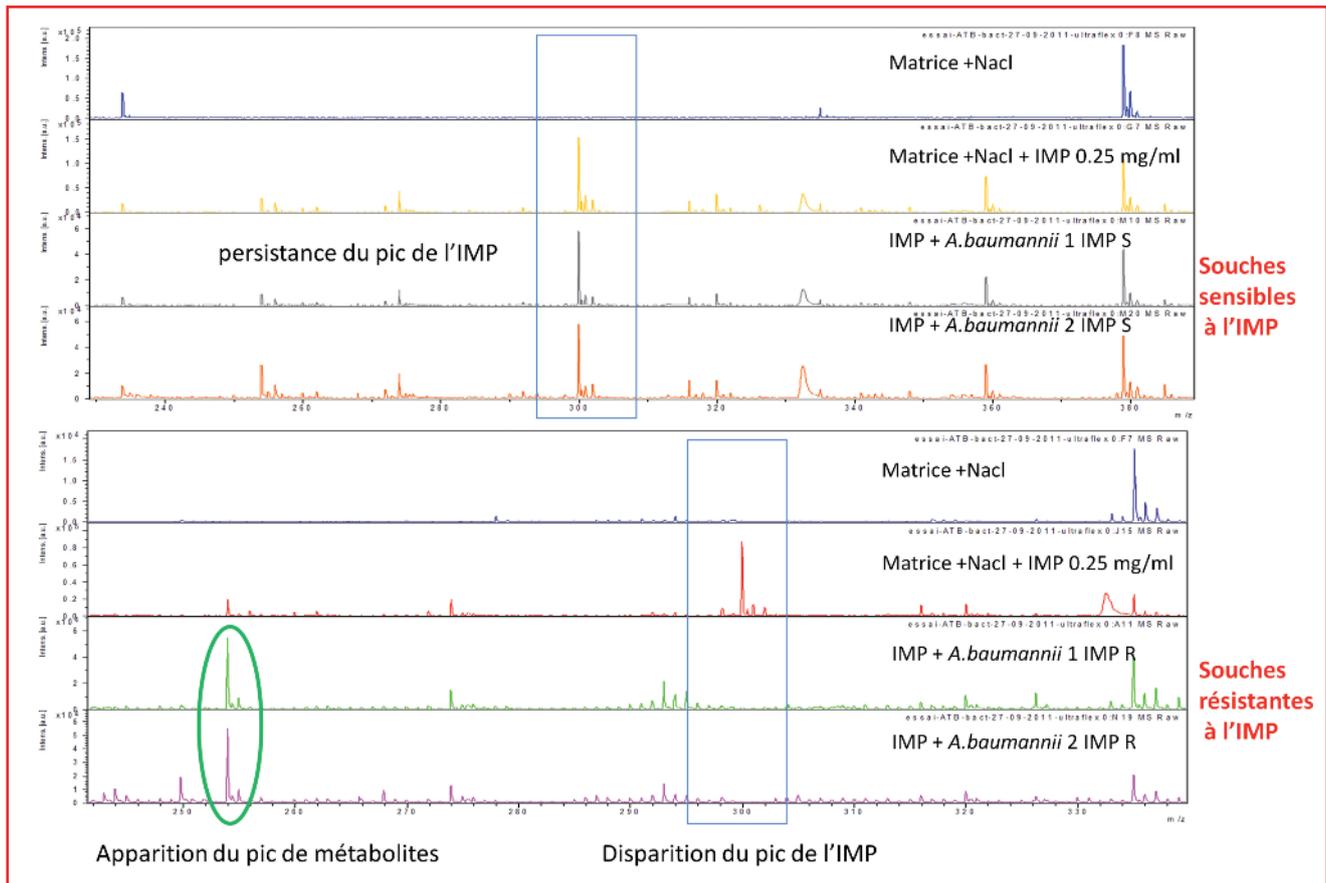


Fig. 2 - Spectres de masse du test d'hydrolyse de l'imipénème (IMP) avec des souches d'*A. baumannii* sensibles ou résistantes aux carbapénèmes. Conditions : incubation à 37° C pendant 4 heures ; NaCl 0,45 % ; 0,25 mg/ml d'IMP. Les unités de l'axe des x représentent le rapport de masse sur charge en dalton [m / z (Da)] et celles de l'axe des y représentent l'intensité relative (unités arbitraires).

les bases de données, qui peuvent être analysés à la recherche de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques. Cela a pour principal intérêt de pouvoir mieux comprendre les structures génétiques et les supports de la résistance aux antibiotiques, mais également de décrire de nouveaux mécanismes de résistance par des analyses comparatives. On peut citer comme exemple la découverte du gène *pmrA* et de son implication dans l'émergence de la résistance à la colistine dans une souche clinique d'*Enterobacter aerogenes* (11), mais également dans des souches cliniques d'*A. baumannii* (12, 13). Plus récemment, l'analyse comparative des génomes de souches cliniques de *K. pneumoniae* isolées chez un même patient et qui sont devenues résistantes à la colistine a permis de découvrir un nouveau support de la résistance à la colistine chez cette espèce bactérienne par l'inactivation d'un petit gène de régulation, *mgrB* (14, 15).

En dehors de l'utilisation des séquences génomiques pour décrire et comprendre de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques, il a été montré récemment que l'approche par séquençage complet d'un génome était une alternative réaliste pour évaluer la sensibilité aux antibiotiques d'une bactérie sur une série de 200 entérobactéries d'intérêt clinique (16). Nous avons récemment mis au point un logiciel d'annotation automatique des

génomés bactériens pour rechercher tous les gènes de résistance aux antibiotiques (logiciel ARG-ANNOT), qui permet d'analyser un génome entier en moins de 4 minutes (17). Compte tenu de la diminution du coût et de la taille des appareils de séquençage à haut débit, il semble donc réaliste de penser qu'il sera possible en routine de séquencer un génome bactérien, afin de déterminer son contenu en gènes de résistance de manière extrêmement rapide, tout au moins lorsqu'une bactérie atypique ou un nouveau phénotype est détecté au laboratoire. Il apparaît évident qu'un système de surveillance des phénotypes de résistance observés au laboratoire est crucial pour pouvoir détecter en temps réel les événements anormaux ; cette stratégie sera détaillée dans la seconde partie de cet article.

C) Détection des carbapénémases par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse MALDI-TOF a révolutionné la microbiologie clinique ces cinq dernières années, en permettant d'identifier en routine et en quelques minutes toutes les bactéries isolées à partir de prélèvements cliniques, y compris à partir des hémocultures (18, 19). Cet outil permet non seulement d'identifier les bactéries communes, mais permet également d'identifier des bactéries « fastidieuses » ou à croissance lente sous réserve

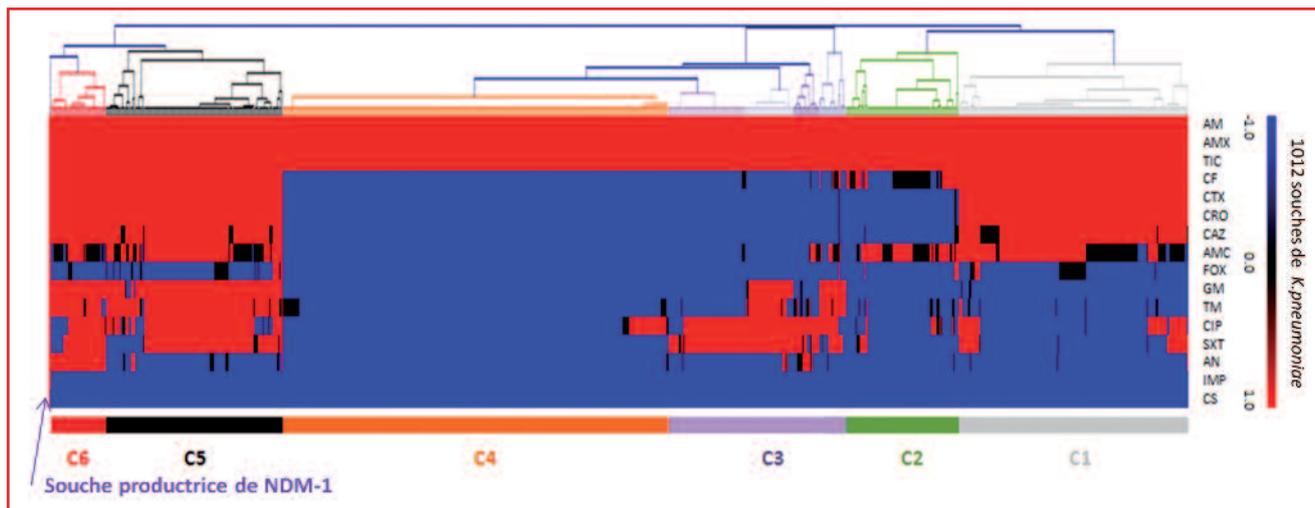


Fig. 3 - Arbre hiérarchique des résultats d'antibiogrammes obtenus pour 1 012 souches de *K. pneumoniae* isolées en Algérie et en France (Marseille).

L'arbre a été divisé en sept groupes (groupes C1 à C6 et souche NDM-1). C1 : souches de phénotype BLSE (bêta-lactamase à spectre étendu) significativement associées à des souches de Marseille ; C2 : souches de phénotype pénicillinase ; C3 et C4 : souches de phénotype sauvage avec (C3) ou sans (C4) résistance associée aux autres classes d'antibiotiques ; C5 et C6 : souches de phénotype BLSE avec différents niveaux de résistance à d'autres classes d'antibiotiques, associées de manière significative avec des souches d'Algérie ; souche NDM-1 : résistance à tous les antibiotiques, sauf à la colistine.

AM : ampicilline ; AMX : amoxicilline ; AMC : amoxicilline / acide clavulanique ; TIC : ticarcilline ; CF : céfalotine ; FOX : céfoxitine ; CAZ : céftazidime ; CTX : céfotaxime ; CRO : ceftriaxone ; IMP : imipénème ; GN : gentamicine ; TM : tobramycine ; AN : amikacine ; CIP : ciprofloxacine ; SXT : triméthoprime-sulfaméthoxazole.

d'avoir constitué au préalable une banque de données de spectres de références (20). Il peut même être utilisé pour identifier des arthropodes, comme les tiques par exemple (21). En modifiant la fenêtre d'analyse des spectres, en se concentrant en particulier sur les particules de petite masse (entre 100 et 1 000 daltons [Da]), il est possible de détecter des pics spécifiques des antibiotiques de manière simple et reproductible. Cela a été mis à profit pour développer des tests rapides de détection de bactéries productrices de carbapénémases après seulement 2 à 4 heures d'incubation (7, 22-25). Le principe est très simple et est schématisé sur la figure 2. Pour détecter la présence d'une bactérie productrice d'une carbapénémase, il suffit de mettre à incuber en bouillon liquide la bactérie suspecte avec de l'imipénème, dont la masse molaire est de 300 Da. Après 2 à 4 heures d'incubation, si la souche est productrice de carbapénémase, le pic spécifique de l'imipénème à 300 Da disparaît, alors qu'un pic à 254 Da apparaît et représente le métabolite de dégradation de l'imipénème par l'enzyme (Figure 2) (24). Ce test peut être utilisé en routine dans les laboratoires disposant d'un spectromètre de masse pour détecter rapidement les souches productrices de carbapénémases en cas d'épidémies locales ou nationales.

III. - NOUVEAUX OUTILS DE SURVEILLANCE DE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

La détection et la caractérisation des résistances aux antibiotiques ne peuvent se faire qu'avec la mise en place d'une surveillance quotidienne des phénotypes de résistance observés au laboratoire. Il est clair que l'expertise du biologiste reste primordiale pour détecter un phéno-

type de résistance atypique, mais compte tenu du nombre de plus en plus important de mécanismes décrits, il s'avère souvent difficile et fastidieux de connaître tous les mécanismes de résistance. De plus, certaines épidémies dans les hôpitaux sont dues à des bactéries sensibles aux antibiotiques, tant et si bien qu'il est impossible de détecter ce genre d'évènement anormal. Par conséquent, il s'avère crucial de mettre en place des systèmes de surveillance neutres, non plus basés sur l'expertise de tel ou tel biologiste, mais sur une surveillance active de tous les phénotypes par espèce bactérienne, basée sur une analyse en temps réel du nombre de phénotypes observés au laboratoire par rapport à des données rétrospectives au sein du même laboratoire. Cela permet, d'une part, de détecter tout évènement anormal (augmentation du nombre de bactéries ayant un phénotype donné ou apparition d'un phénotype nouveau ou atypique) et, d'autre part, de surveiller en temps réel ces évènements afin de pouvoir faire les investigations épidémiologiques et cliniques nécessaires. Plusieurs approches ont été utilisées récemment à l'aide d'outils informatiques nouveaux.

A) EPIMIC

EPIMIC est un logiciel développé au sein de l'IHU Méditerranée Infection à Marseille, qui permet de comptabiliser chaque semaine tous les évènements du laboratoire par syndrome grâce au suivi d'environ 300 items (nombre de prélèvements, nombre de positifs, nombre de sérologies, nombre de PCR, etc.). Chaque semaine, le chiffre pour chacun des items est rentré dans la base de données par les internes et ce chiffre est automatiquement comparé pour la semaine en cours à la moyenne historique de la base de données qui existe depuis 2002. Si le nombre

d'évènements entrés pour la semaine en cours est supérieur à la moyenne historique + 2 écarts types, le chiffre apparaît en rouge, déclenchant une alerte. Ce système nous a permis par exemple, dans le cadre de la surveillance des pathogènes critiques multirésistants, de détecter de manière précoce une petite épidémie d'infections à *A. baumannii* résistants à l'imipénème au sein d'un service de réanimation (26). Ce logiciel permet ainsi de suivre tous les évènements du laboratoire, y compris la surveillance de la résistance aux antibiotiques.

B) Utilisation de logiciels de « clustering » hiérarchique pour la surveillance des phénotypes de résistance

Les logiciels de « clustering » hiérarchique ont été développés il y a quelques années pour pouvoir étudier et comparer des milliers de données binaires obtenues à l'aide des puces à ADN. Ces logiciels permettent de coder, pour un individu donné, des centaines d'items (dans le cas des puces à ADN, il s'agit de la présence ou de l'absence

d'un gène par exemple) et de comparer tous les codes obtenus pour tous les individus étudiés. Cela permet de regrouper les individus les plus proches entre eux et de créer ainsi des groupes représentant des classes, des familles ou des espèces.

Nous avons appliqué ce type d'analyse aux phénotypes de résistance aux antibiotiques de manière simple et très rapide. Pour se faire, nous avons analysé plus de 1 000 souches cliniques de *K. pneumoniae* pour lesquelles nous avons les phénotypes de résistance aux antibiotiques catégorisés (S, I, R) selon les critères du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). L'analyse consiste à ranger ces antibiotiques, toujours dans le même ordre, pour toutes les souches dans un fichier Excel puis de changer les lettres S, I et R en codes binaires (-1, 0, +1) et d'utiliser ce nouveau jeu de données pour en faire une analyse par clustering hiérarchique. L'analyse des clusters obtenus à partir de 1 012 souches et de 16 antibiotiques par souche, soit 16 192 résultats, est réalisée en moins de 5 minutes à l'aide du

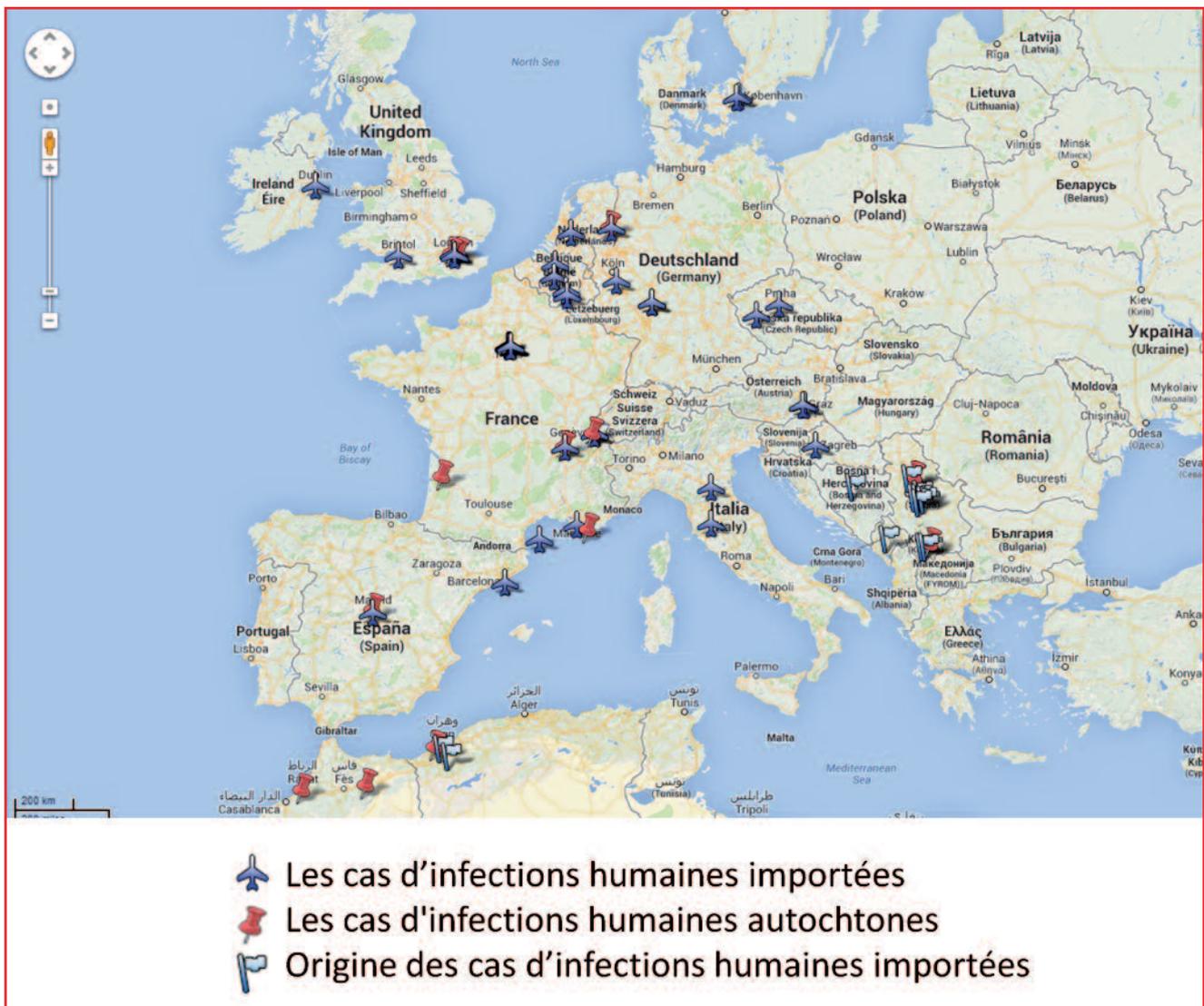


Fig. 4 - Capture d'écran de la carte Google rapportant les isolats porteurs du gène *bla*_{NDM-1}.

logiciel MeV et permet d'avoir un aperçu visuel de la répartition de ces groupes parfaitement identifiés selon leurs mécanismes de résistance (27) (Figure 3). L'ajout dans cette base d'une souche ayant un profil nouveau (par exemple, dans ce travail, une souche résistante à l'imipénème) engendre immédiatement la création d'un nouveau « cluster », montrant ainsi l'apparition d'un phénotype nouveau (27). L'avantage de ce système est qu'il peut être utilisable dans tous les laboratoires pour surveiller l'évolution des phénotypes de résistance pour une espèce donnée, puisqu'il suffit de retranscrire en code binaire les données S, I, R du laboratoire dans ce logiciel (gratuit) par le biais d'une petite manipulation dans un fichier Excel. De plus, l'analyse peut être cumulative dans le temps, ce qui permet d'identifier toute augmentation d'un phénotype au cours du temps (y compris l'augmentation de souches de phénotype sensible) et d'identifier ainsi d'éventuelles épidémies au sein d'un hôpital ou d'un service clinique.

C) MALDI-TOF et biotypage de bactéries multirésistantes

Comme nous l'avons vu précédemment, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a révolutionné la pratique de la microbiologie clinique dans les laboratoires, que ce soit pour identifier les bactéries mais également pour identifier des souches porteuses de carbapénémases. Une autre application de cette technologie est de l'utiliser pour réaliser un typage bactérien en comparant les spectres des bactéries isolées au laboratoire. La comparaison des spectres permet d'identifier des clusters de souches de spectres identiques ou très proches avec une sensibilité élevée pouvant même permettre d'identifier des clones bactériens identiques dans le cas d'épidémies d'infections nosocomiales.

Nous avons appliqué cette stratégie de comparaison des spectres pour le biotypage de plus de 500 souches de *K. pneumoniae* provenant d'hôpitaux différents en France (Angers, Nice et Marseille) et en Algérie (Tlemcen, Sidi Bel Abbès, Oran et Annaba) (28). L'analyse comparative des spectres de ces souches a permis de distinguer différents clusters de souches entre celles de France et d'Algérie. Ainsi, nous avons pu identifier un cluster de souches provenant d'Algérie significativement associées à des infections respiratoires et présentant un phénotype de résistance de type bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE). Inversement, nous avons identifié un cluster de souches en France associé à des infections urinaires et ayant un phénotype sauvage de résistance aux antibiotiques (28). Il apparaît donc que cette stratégie pourra permettre dans le futur de suivre l'évolution des clones bactériens pouvant

circuler dans les hôpitaux, mais également dans les services cliniques.

D) Surveillance de la résistance et Google Maps

L'avènement des nouvelles technologies en microbiologie clinique a révolutionné notre pratique quotidienne au même titre que les nouvelles technologies d'information et de communication. Celles-ci sont très nombreuses, que ce soit pour nos smartphones mais également pour les utilisateurs d'internet. Ces technologies peuvent également être utilisées pour faire de la surveillance de la résistance aux antibiotiques. En effet, nous avons récemment utilisé l'application Google Maps disponible sur le site Google pour établir une carte interactive mondiale de surveillance de tous les cas publiés de bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénémases de type NDM-1 avec des liens internet vers toutes les publications disponibles dans la base de données Pubmed (29) (Figure 4). Cette carte interactive est disponible avec le lien suivant : <https://maps.google.fr/maps/ms?msid=206742677418710394751.0004be1c6f8abeb430b0c&msa=0&ll=58.813742,57.304688&spn=130.606703,12.304687&source=gplus-ogsb>

Ce type d'application fonctionne également sur smartphone, permettant ainsi une surveillance interactive quel que soit l'endroit où l'on se trouve. Enfin, de nombreuses applications de surveillance peuvent être utilisées à l'aide de ce type de logiciels, que ce soit pour surveiller l'émergence de nouvelles résistances au niveau mondial mais également au niveau local, ou pour tracer en temps réel les souches et leur diffusion dans une région.

IV. - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'émergence et la diffusion rapide des gènes de résistance aux antibiotiques dans le monde est un phénomène complexe, qui est le fruit de l'utilisation massive des antibiotiques chez l'homme mais également dans l'agriculture, et qui a des interactions complexes au sein des écosystèmes microbiens. L'existence de gènes de résistance dans l'environnement et chez l'homme susceptibles d'être mobilisés à tout moment est imprévisible, ce qui nécessite pour l'avenir de mettre en place non seulement des systèmes de surveillance, mais aussi des outils pour la découverte de ces nouveaux supports de résistance. Les nouveaux outils technologiques sont de plus en plus utilisés en microbiologie clinique pour la détection et l'étude de mécanismes de résistance aux antibiotiques émergents, mais aussi pour la surveillance de phénotypes de résistance nouveaux ou émergents.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, *et al.* Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2011 ; **9** (12) : 894-6.
- (2) Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 2007 ; **5** (3) : 175-86.
- (3) Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ; **53** (12) : 5046-54.
- (4) Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010 ; **10** (9) : 597-602.
- (5) Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect* 2010 ; **16** (12) : 1699-701.
- (6) Diene SM, Bruder N, Raoult D, Rolain JM. Real-time PCR allows detection of the New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int J Antimicrob Agents* 2011 ; **37** (6) : 544-6.
- (7) Bakour S, Kempf M, Touati A, Ait Ameur A, Haouchine D, Sahli F, *et al.* Carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in two University Hospitals in Algeria. *J Med Microbiol* 2012 ; **61** (Pt 9) : 1341-3.
- (8) Touati M, Diene SM, Racherache A, Dekhil M, Djahoudi A, Rolain JM. Emergence of bla_{OXA-23} and bla_{OXA-58} carbapenemase encoding genes in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from University hospital of Annaba, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 2012 ; **40** (1) : 89-91.
- (9) Mesli E, Berrazeg M, Drissi M, Bekkhoucha SN, Rolain JM. Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect Dis* 2013 ; **17** (9) : e739-e743.
- (10) Diene SM, Rolain JM. Investigation of antibiotic resistance in the genomic era of multidrug-resistant Gram-negative bacilli, especially Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013 ; **11** (3) : 277-96.
- (11) Diene SM, Merhej V, Henry M, El FA, Roux V, Robert C, *et al.* The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new "killer bugs" are created because of a sympatric lifestyle. *Mol Biol Evol* 2013 ; **30** (2) : 369-83.
- (12) Rolain JM, Diene SM, Kempf M, Gimenez G, Robert C, Raoult D. Real-time sequencing to decipher the molecular mechanism of resistance of a clinical pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate from Marseille, France. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 ; **57** (1) : 592-6.
- (13) Lesho E, Yoon EJ, McGann P, Snesrud E, Kwak Y, Milillo M, *et al.* Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections. *J Infect Dis* 2013 ; **208** (7) : 1142-51.
- (14) Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di P, V, Arena F, Ambretti S, *et al.* In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemase mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 ; **57** (11) : 5521-6.
- (15) Lopez-Camacho E, Gomez-Gil R, Tobes R, Manrique M, Lorenzo M, Galvan B, *et al.* Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *J Antimicrob Chemother* 2013 ; doi:10.1093/jac/dkt99.
- (16) Zankari E, Hasman H, Kaas RS, Seyfarth AM, Agerso Y, Lund O, *et al.* Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2013 ; **68** (4) : 771-7.
- (17) Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, *et al.* ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2014 ; **58** (1) : 212-20.
- (18) Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, *et al.* On-going revolution in bacteriology: routine identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009 ; **49** (4) : 543-51.
- (19) La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 2009 ; **4** (11) : e8041.
- (20) Biswas S, Rolain JM. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *J Microbiol Methods* 2013 ; **92** (1) : 14-24.
- (21) Yssouf A, Flaudrops C, Drali R, Kernif T, Socolowski C, Berenger JM, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of tick vectors. *J Clin Microbiol* 2013 ; **51** (2) : 522-8.
- (22) Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011 ; **49** (9) : 3222-7.
- (23) Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V, Chudackova E, *et al.* Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012 ; **50** (7) : 2441-3.
- (24) Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, *et al.* Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLOS One* 2012 ; **7** (2) : e31676.
- (25) Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin Appl* 2013 ; (11-12) : 767-78.
- (26) Kempf M, Rolain JM, Azza S, Diene S, Joly-Guillou ML, Dubourg G, *et al.* Investigation of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems in Marseille hospitals, south of France: a transition from an epidemic to an endemic situation. *APMIS* 2013 ; **121**(1) : 64-71.
- (27) Berrazeg M, Drissi M, Medjahed L, Rolain JM. Hierarchical clustering as a rapid tool for surveillance of emerging antibiotic-resistance phenotypes in *Klebsiella pneumoniae* strains. *J Med Microbiol* 2013 ; **62** (Pt 6) : 864-74.
- (28) Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, *et al.* Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLOS One* 2013 ; **8** (4) : e61428.
- (29) Berrazeg M, Diene SM, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, *et al.* New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps. *Eurosurveillance* 2014 ; in press.