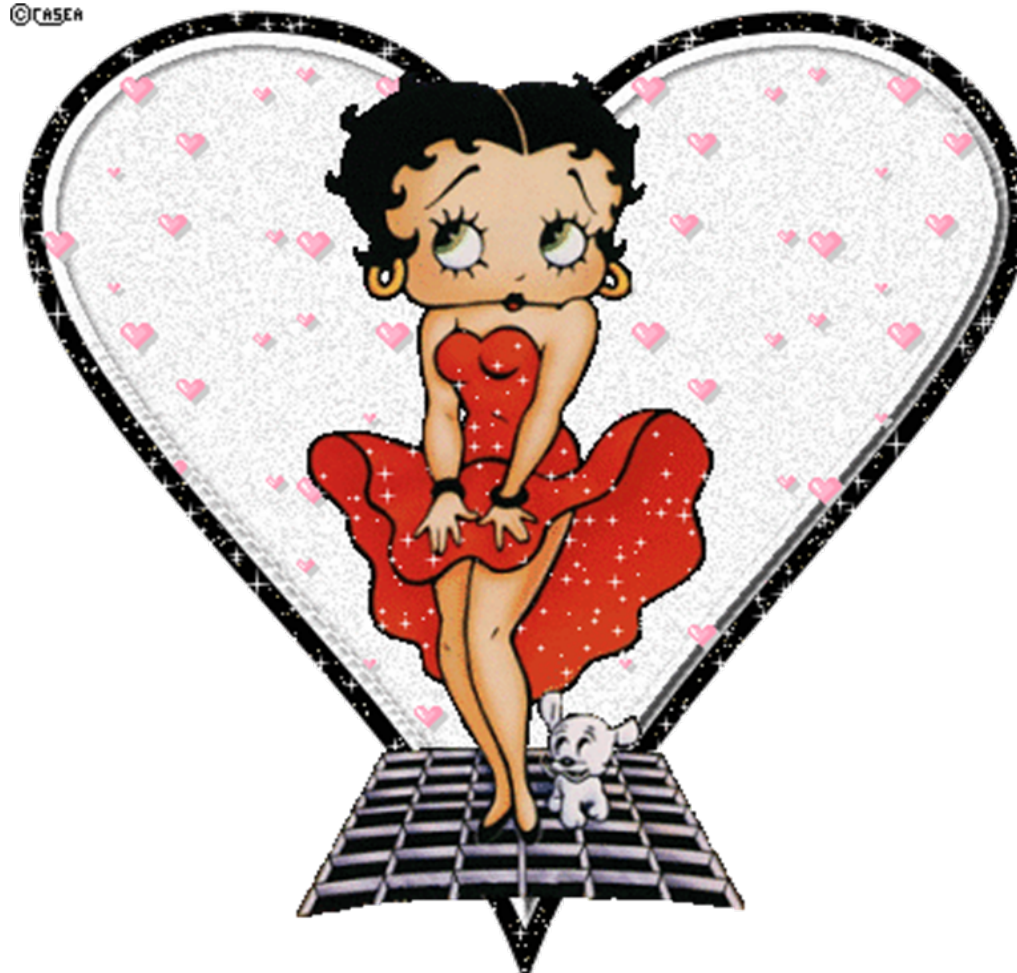


La Spectro de masse



l'amie des infectiologues ?

Que voudraient nos amis infectiologues ?

À TO :

- ➡ **Prélèvement**
- ➡ **Identification**
- ➡ **Sensibilités**



On peut se mettre d'accord sur les enjeux ?

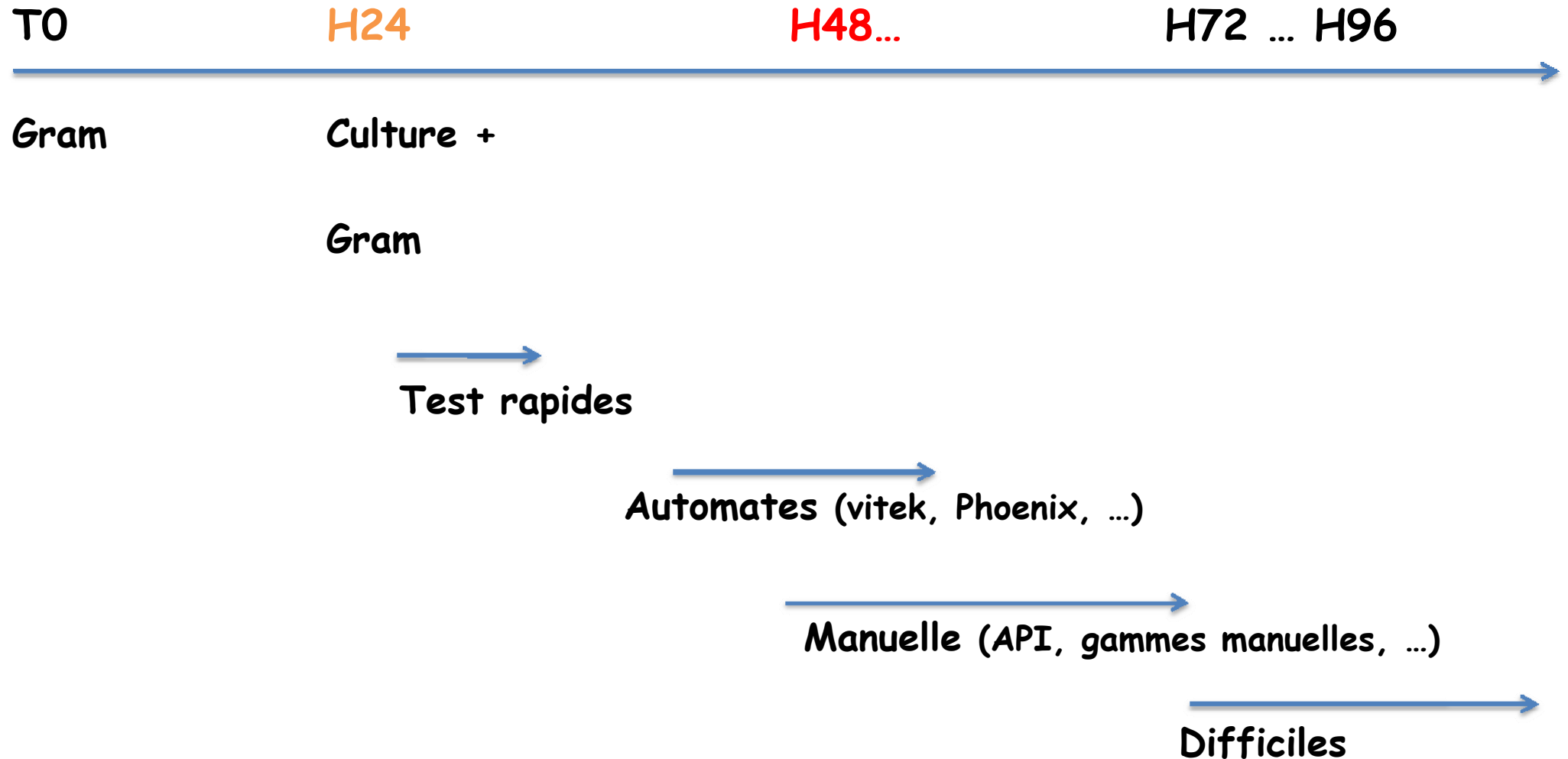
- **Un traitement approprié le plus précocement**
- **Moins de traitement antibiotique**
- **Utilisation des spectres les plus étroits possibles**
- **Ré-évaluation : désescalade, switch**
 - ❑ **Pression de sélection** ↘
 - ❑ **Mortalités** ↘
 - ❑ **Diminution des durées de séjour** ↘
 - ❑ **Diminution des coûts** ↘

Le rôle du laboratoire ...

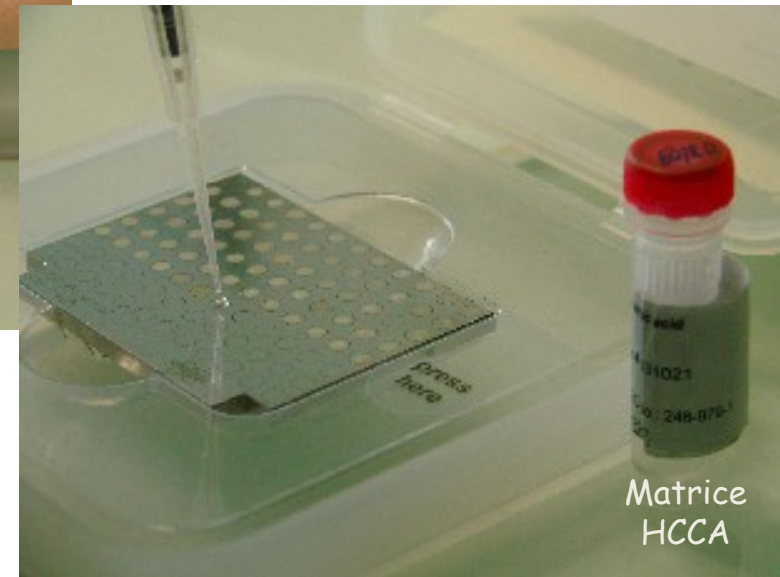
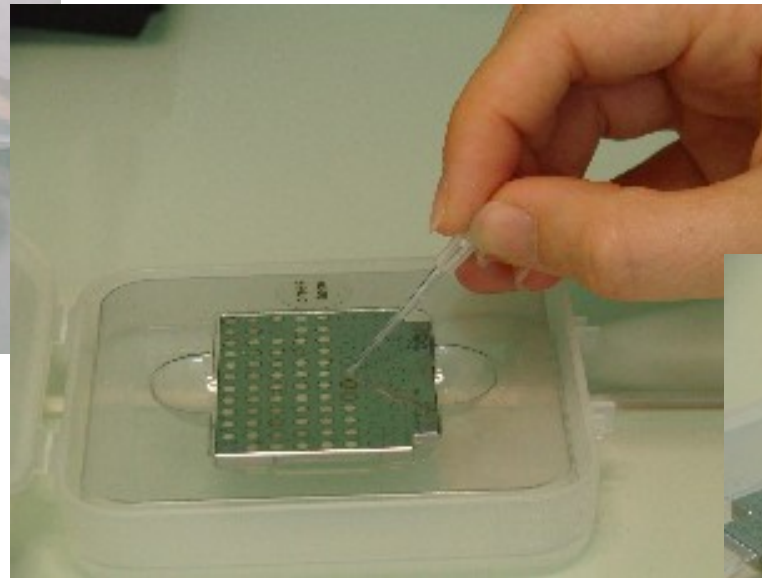
- **Une identification rapide :**
 - ➡ **Discussion de la porte d'entrée**
 - ➡ **Implication ou non des bactéries identifiées**
 - ➡ **Orientation ou changement des traitements**

- **Une étude rapide des sensibilités :**
 - ➡ **Adaptation**
 - ➡ **Désescalade**
 - ➡ **Switch**

Le timing de papa ...



Le Maldi dans tout ça ?



👉 **Dépôt de l'échantillon :**
avec ou sans extraction (acide formique et acétonitrile)

Le Maldi dans tout ça ?



sur le MALDI-TOF

Le Maldi dans tout ça ?

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Résultats d'identification - Microsoft Internet Explorer fourni par CHRU de BREST - DSIS

file:///C:/Documents%20and%20Settings/bacterio/Application%20Data/Bruker%20Daltonik/MALDI%20BiotyperAutomationControl/HttpResults/110918%20DT.html#ID0ETBA

File Edit View Favorites Tools Help

Favorites Bruker Daltonik MALDI Bioty... Web Slice Gallery

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Résultats d'identification

Analyte1



Nom de l'échantillon: D1-BTS-A1
Description de l'échantillon:
ID de l'échantillon: BRESBTS-A10
Date/Heure de création de l'échantillon: 2011-09-18 14:02:33.79
Bibliothèque de MSP utilisée: IVD
Arbre de taxonomie utilisé:

Classement (Qualité)	Profil de référence	Score	Identifiant NCBI
1 (++)	Escherichia coli DH5alpha BRL	2.085	562
2 (++)	Escherichia coli MB11464 1 CHB	2.056	562
3 (++)	Escherichia coli ATCC 25922 THL	2.022	562
4 (+)	Escherichia coli ESBL EA RSS 1528T CHB	1.953	562
5 (+)	Escherichia coli ATCC 25922 CHB	1.91	562
6 (+)	Escherichia coli DSM 30083T HAM	1.845	562
7 (+)	Escherichia fergusonii DSM 13698 HAM	1.838	564
8 (+)	Escherichia coli RV412 A1 2010 06a LBK	1.807	562
9 (+)	Escherichia coli ATCC 35218 CHB	1.755	562
10 (-)	Escherichia coli Nissl VML	1.697	562

BT/J

start 2 Identification IVD MA... Bruker Daltonik MALD...

My Computer 100% 2:18 PM

Le Maldi : un verre à moitié vide ?

- L'identification :
 - C'est une question de minutes : **identification à H24 + quelques minutes...**
 - Rapide
 - Pas cher
 - Facile
 - Adaptable et évolutif

- Mais encore :
 - Culture positive nécessaire \geq H 24
 - On ne travaille pas sur le prélèvement
 - Tout n'est pas dans les bases de données
 - Antibiogramme toujours nécessaire

Identifications en routine ...

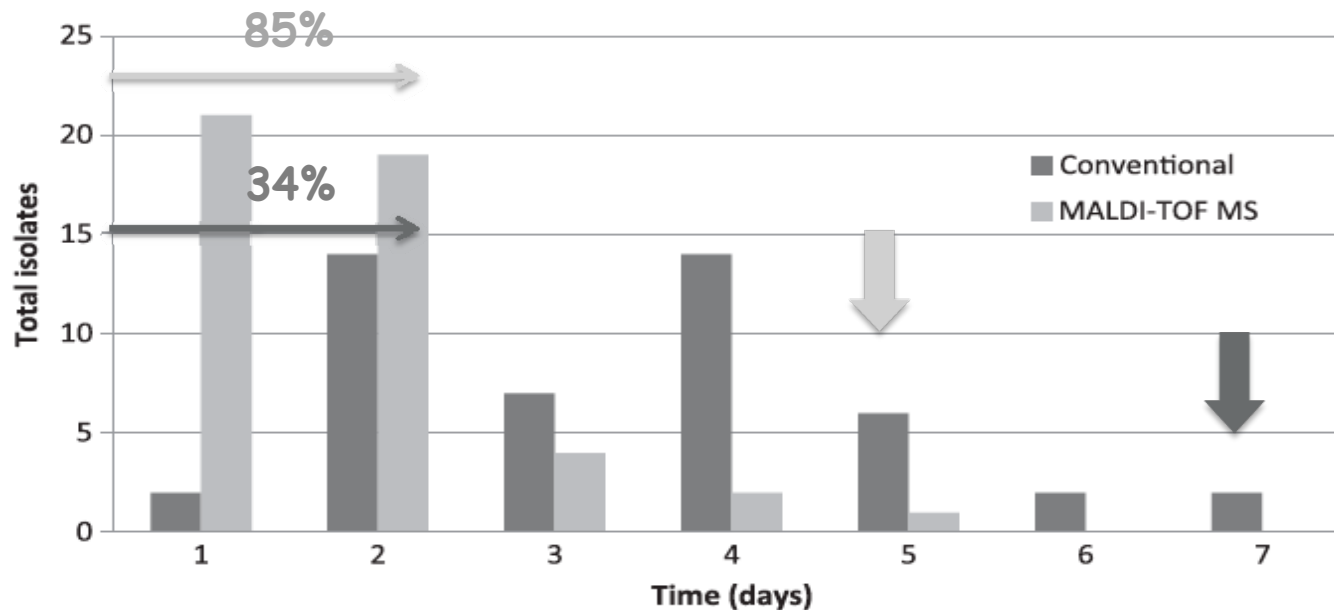
Auteurs	Échantillons		Id à l'espèce	Id au genre	Identifications difficiles	Commentaires
Seng <i>et al.</i> , 2009 [13]	Routine (n = 1 660)	Tous les prélèvements de routine	83,8 %	95,0 %	<i>Propionobacterium acnes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Shigella</i> sp.	Dans cette étude, le MALDI-TOF est utilisé d'emblée pour l'identification.
Blondiaux <i>et al.</i> , 2009 [15]	Routine (n = 362)	Tous les prélèvements de routine	72,9 %	87,0 %	<i>Streptococcus</i> du groupe viridans <i>Shigella</i> sp.	
van Veen <i>et al.</i> , 2010 [14]	Routine (n = 980)	Tous les prélèvements de routine	92,0 %	98,8 %	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Bactéries anaérobies	
Bizzini <i>et al.</i> , 2010 [16]	Routine (n = 1 371)	Tous les prélèvements de routine	93,2 %	98,5 %	<i>Shigella</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Une étape d'extraction permet d'augmenter le % de résultats valides de 22,9 % Erreurs de taxonomie essentiellement.
Gravet <i>et al.</i> , 2010 [17]	Routine (n = 10 000)	Tous les prélèvements de routine	nd	98,8 %	<i>Corynebacterium</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Dans cette étude, le MALDI-TOF est utilisé d'emblée pour l'identification.
Bessède <i>et al.</i> , 2010 [18]	Routine (n = 1 013)	Tous les prélèvements de routine	97,3 %	99,0 %	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Une étape d'extraction permet d'augmenter le % d'identification à l'espèce de 14,7 % Nombre insuffisant de souches dans la banque de données pour certaines espèces

Ce qui embête le bactério ...

- ❑ La mucoviscidose et ses BGN NF
- ❑ Les anaérobies
- ❑ Les staphylocoques à coagulase négative
- ❑ Les bacilles gram positif corynéformes
- ❑ L'environnement (hygiène)
 - ➡ Systèmes manuels peu performants
 - ➡ Automates : ID pas toujours possible et pas toujours meilleure
 - ➡ Recours à la bio mol fastidieux

Maldi et Mucoviscidose

- Maldi fait **mieux et plus vite** !
 - 464 souches de 17 espèces
 - Concordance par rapport à l'identification conventionnelle :
 - Genre : 98%
 - Espèce : 92%
- divergences : *Ralstonia* et *Stenotrophomonas*





Encore plus Sioux : les bases maisons !

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2008, p. 3361–3367
0095-1137/08/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.00569-08
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 46, No. 10

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients[▽]

Nicolas Degand,^{1,2} Etienne Carbonnelle,^{1,2} Brunhilde Dauphin,² Jean-Luc Beretti,¹
Muriel Le Bourgeois,³ Isabelle Sermet-Gaudelus,⁴ Christine Segonds,⁵
Patrick Berche,^{1,2} Xavier Nassif,^{1,2} and Agnès Ferroni^{1*}

The identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis (CF) patients is usually achieved by using phenotype-based techniques and eventually molecular tools. These techniques remain time-consuming, expensive, and technically demanding. We used a method based on matrix-

identification of these bacteria. A set of reference strains belonging to 58 species of clinically relevant nonfermenting gram-negative bacilli was used. To identify peaks discriminating between these various species, the profile of 10 isolated colonies obtained from 10 different passages was analyzed for each referenced strain. Conserved peaks with a relative intensity greater than 0.1 were retained. The spectra of 559 clinical

inquinus unösus, 1 *Cupriavicus rēspiracui*, and 1 *Burknoiaeria inaiandensis*. Using this database, 549 strains were correctly identified. Nine BCC strains and one *R. mannitolilytica* strain were identified as belonging to the appropriate genus but not the correct species. We subsequently engineered BCC- and *Ralstonia*-specific databases using additional reference strains. Using these databases, correct identification for these species increased from 83 to 98% and from 94 to 100% of cases, respectively. Altogether, these data demonstrate that, in CF patients, MALDI-TOF-MS is a powerful tool for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacilli.

Un autre domaine compliqué : les anaérobies

- Seng (*CID* 2009)
- Veloo (*Syst Appl Microbiol* 2011)
- Nagy (*CMI* 2009)
 - ⇒ Maldi était **aussi efficace que l'ARN 16s** pour identifier les anaérobies

- Fournier R (*Anaerobe* 2012) :
 - 238 souches testées en ARN 16 S

 - Maldi sans extraction : **: 207/238**
 - à l'espèce : 158
 - au genre : 49
 - non identifiées : 31 (cocci gram positif et Clostridies)

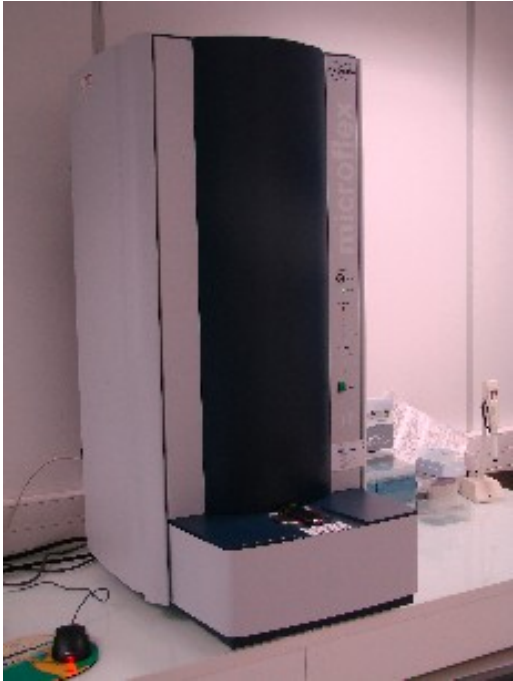
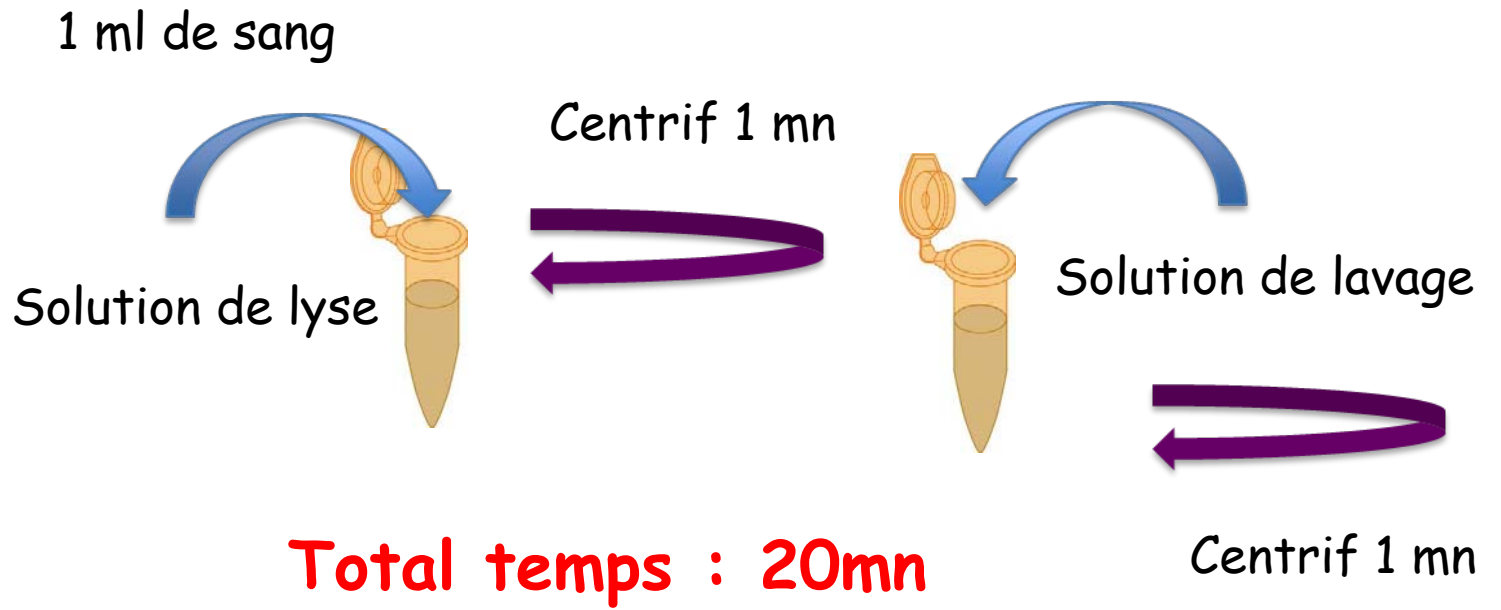
A Brest

On ne dit plus l'hémoculture pousse ...

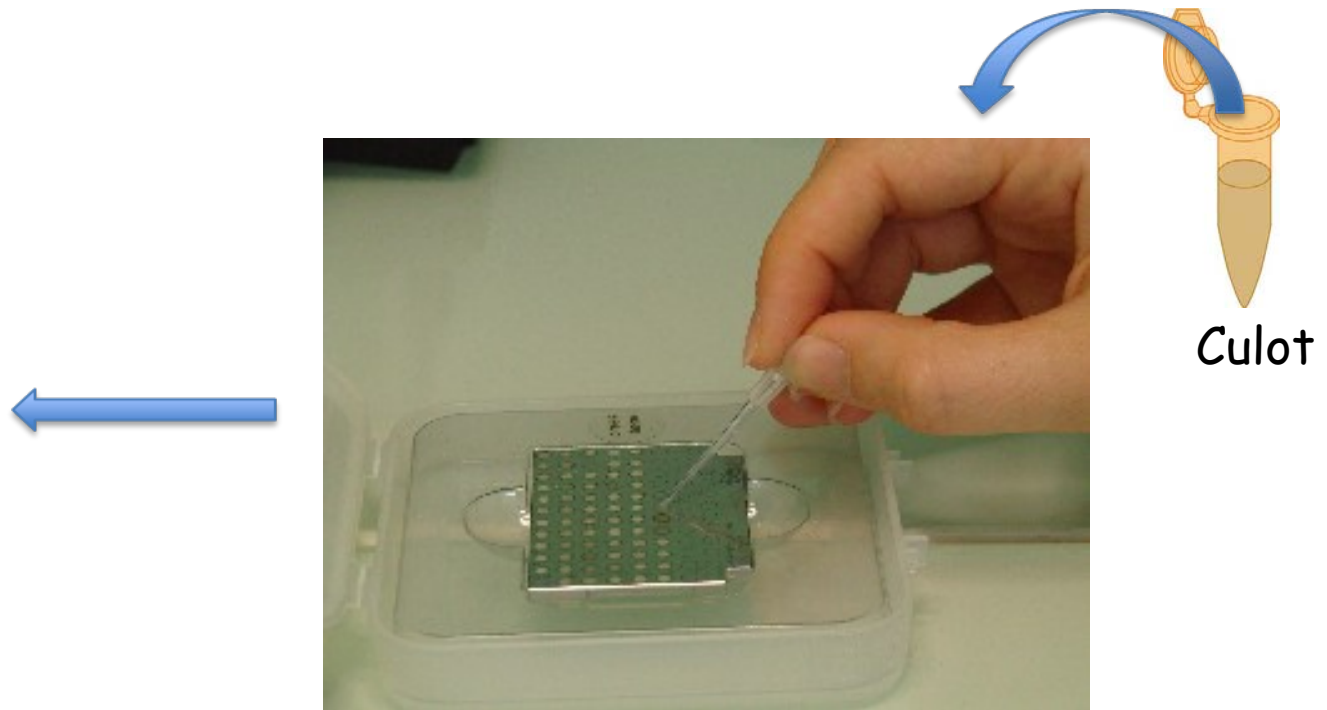
Mais l'hémoculture pousse à *Enterobacter cloacae*



Coloration de Gram



DT/JNI 2012



- La référence : identification conventionnelle (manuelle, API, Vitek)
 - Timing identification : culture positive + **24 à > 48 heures**
- Résultats corrects avec le Maldi en direct :

Genre

Espèce

68 à 89%

57 à 79%

avec des cut off restrictifs (Bruker)

> 90%

> 90%

avec des cut off plus bas et
certaines conditions sur les "match"

Et tout ça en quelques minutes et pour des clopinettes ...

Influence d'une ID précoce ?

Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Improves Appropriateness of Antibiotic Treatment of Bacteremia

Anne L. M. Vlek*, Marc J. M. Bonten, C. H. Edwin Boel

Plos One 2012

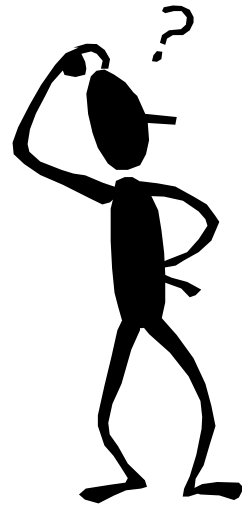
- Étude avant / après 253 épisodes de bactériémies
- Identifications Standard 164 / Identifications Maldi 89
- Patients comparables (âge, ICU, pédiatrique, contaminations, pathogènes)
- Délai pour l'identification : **45,2h vs 16,4h**
- ATBpie appropriée :
 - ☞ Au temps de la culture : 55% vs 51,8% (NS)
 - ☞ **24 h après la culture : 75,3% vs 64% (p<0,01)** ☞ en relation avec le seul changement : temps ID
 - ☞ Switch : pas de différence

Influence d'une ID précoce ?

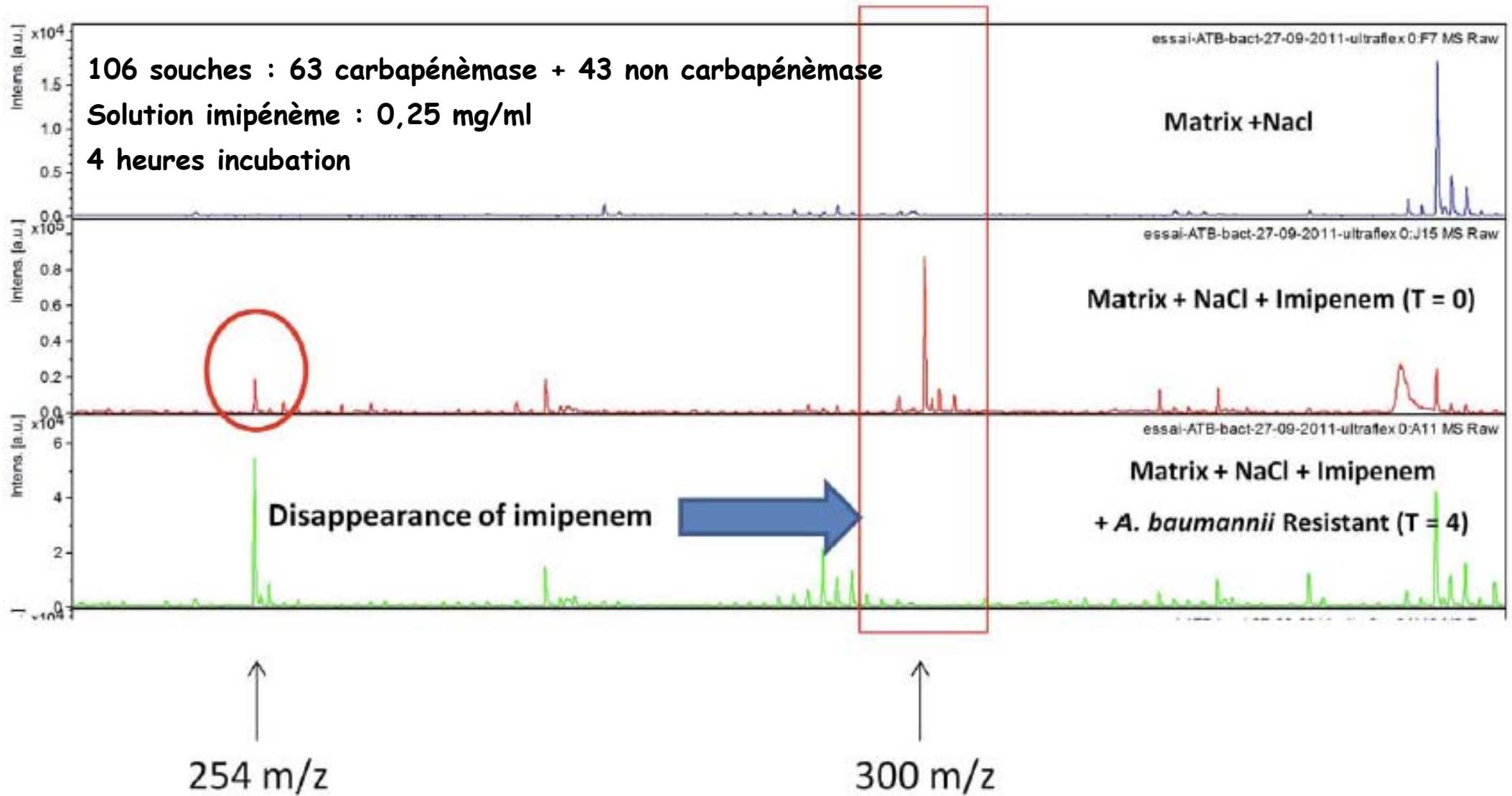
- **Contribution de la microbiologie au traitement :**
 - fonction de l'écologie locale
- **Zones de faible résistance acquise : (pays nordiques)**
 - identité de la bactérie très informative pour le ttt
 - Peu de risque de traitements inadaptées
- **Zones de fortes résistances acquises : (*Sensibilité BREST 2012*)**

– Intérêt car :	<i>E.coli</i>	≠	<i>K.pneumoniae</i>	≠	<i>E.aerogenes</i>
Céfotaxime	94%		61%		48%
Ciprofloxacine	88%		58%		70%
Gentamycine	95%		66%		100%

Comment vous convaincre encore un peu plus ?



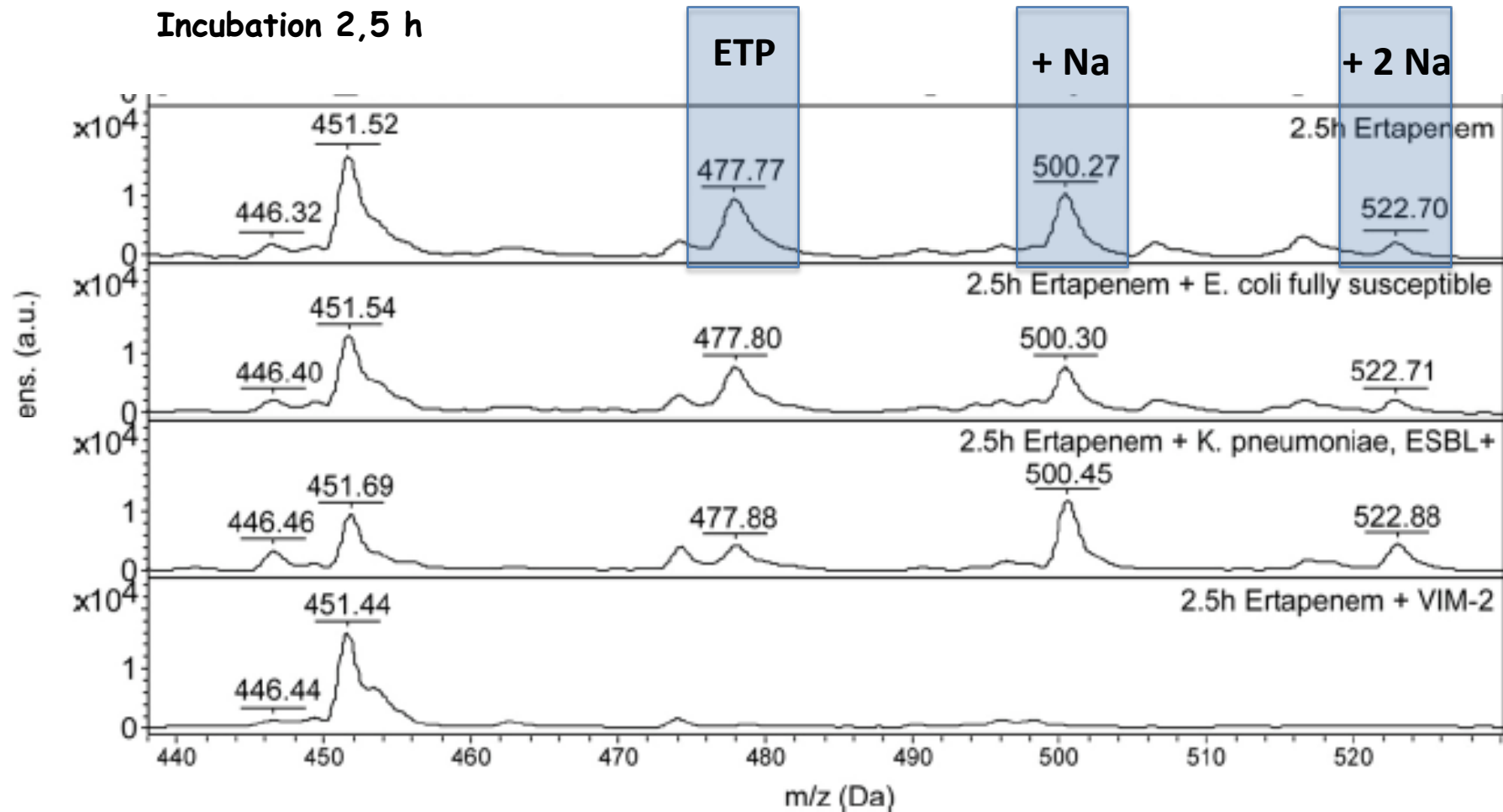
Acinetobacter sp. et carbapénèmase



Entérobactéries et carbapénèmases

Ertapénème : 0,5 mg/ml

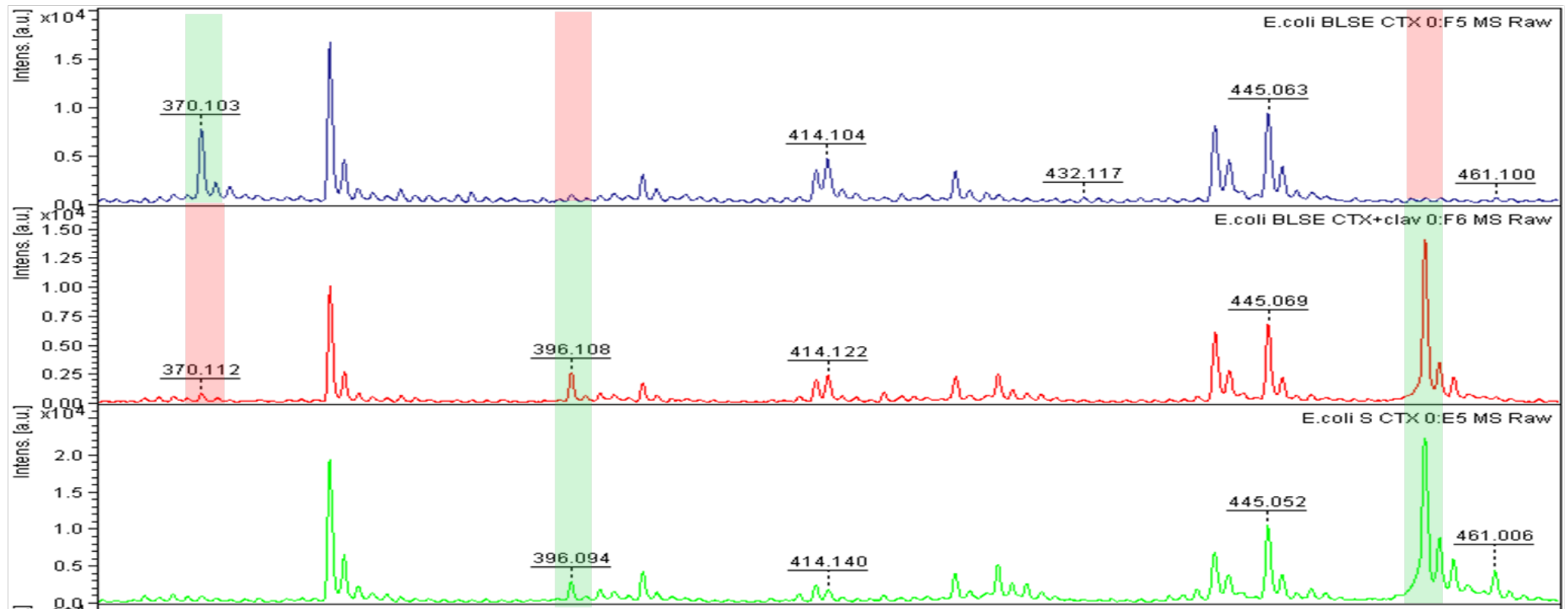
Incubation 2,5 h



Entérobactéries et BLSE

Céfotaxime : 0,5 mg/ml

Incubation avec et sans ac.clav : 3 h



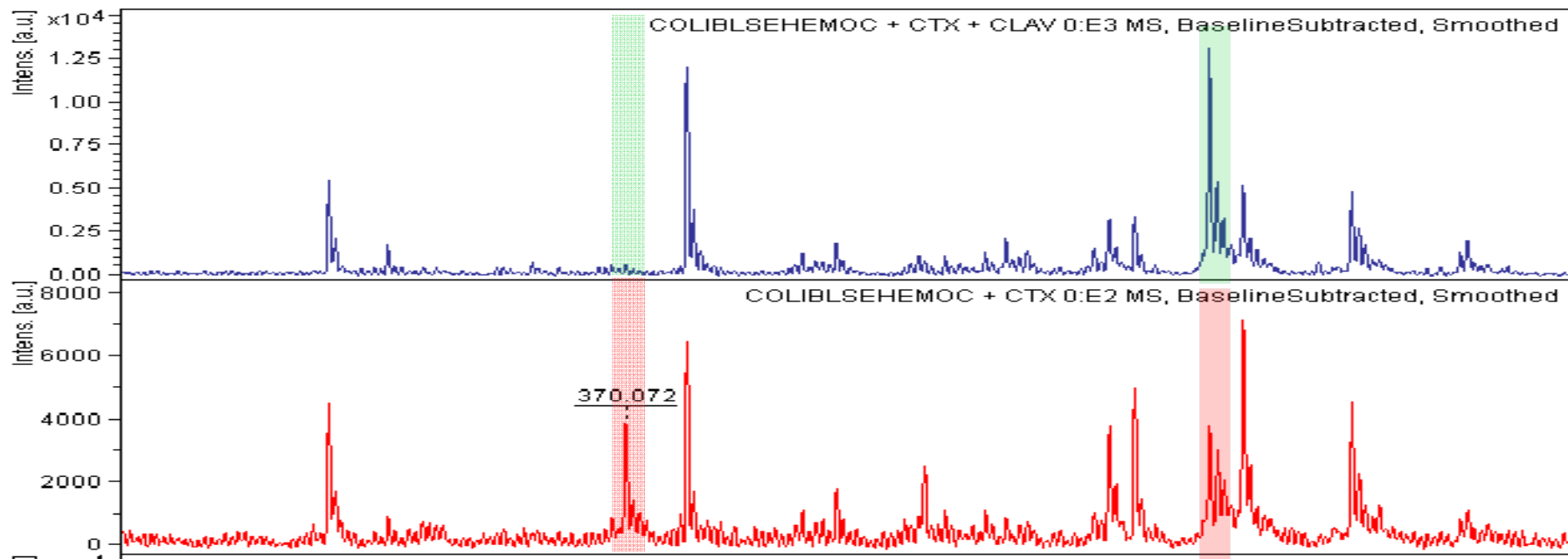
The last but not the least ...

- Directement sur le flacon d'hémoculture :

- ☞ Identification : 20 mn

- ☞ Résistance aux C3G \approx 3,5 heures

456



- Préparation de l'inoculum sur le culot de centrifugation
- Incubation : 3 h avec et sans ac. clav

Encore des domaines d'intérêt ...

☞ Recherche des caractères de virulence :

- ✓ Leucocidine Panton-Valentine : controverse sur les pics

☞ Typage épidémiologique :

- ✓ Difficile en routine car trop de variations de spectre
- ✓ Adaptation possible des algorithmes

☞ Marqueur de résistances :

- ✓ SARM (produit du gène mec) : pas encore au point ...

☞ Identification sur l'échantillon biologique :

- ✓ Hémoculture
- ✓ Urines : 92% d'identification à l'espèce quand monomicrobien et $> 10^5$