

Le Maldi-Tof

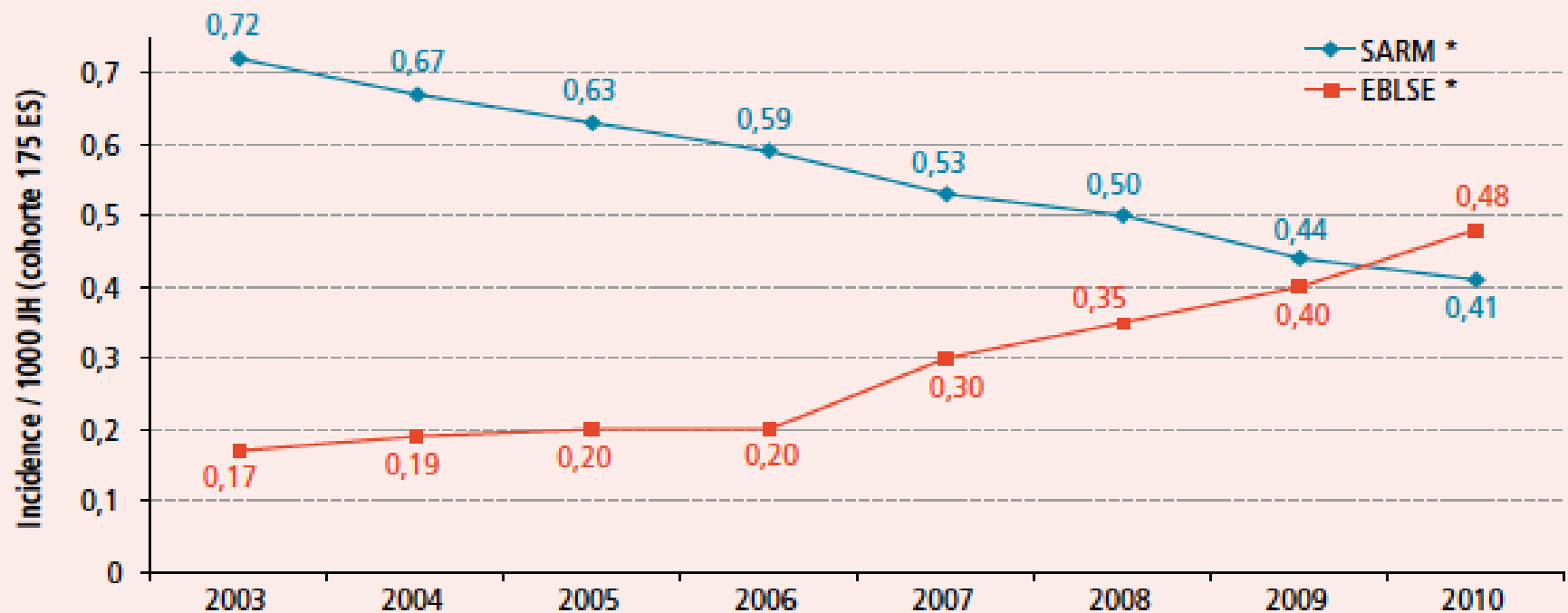
toujours plus...

M. Tof¹, D. Tandé¹, C. Lasserre¹, L. Quaesaet², E. Stindel³

*¹Laboratoire de Microbiologie, ²Maladies infectieuses, ³LaTIM
CHU La Cavale Blanche, Brest, France*

Le contexte

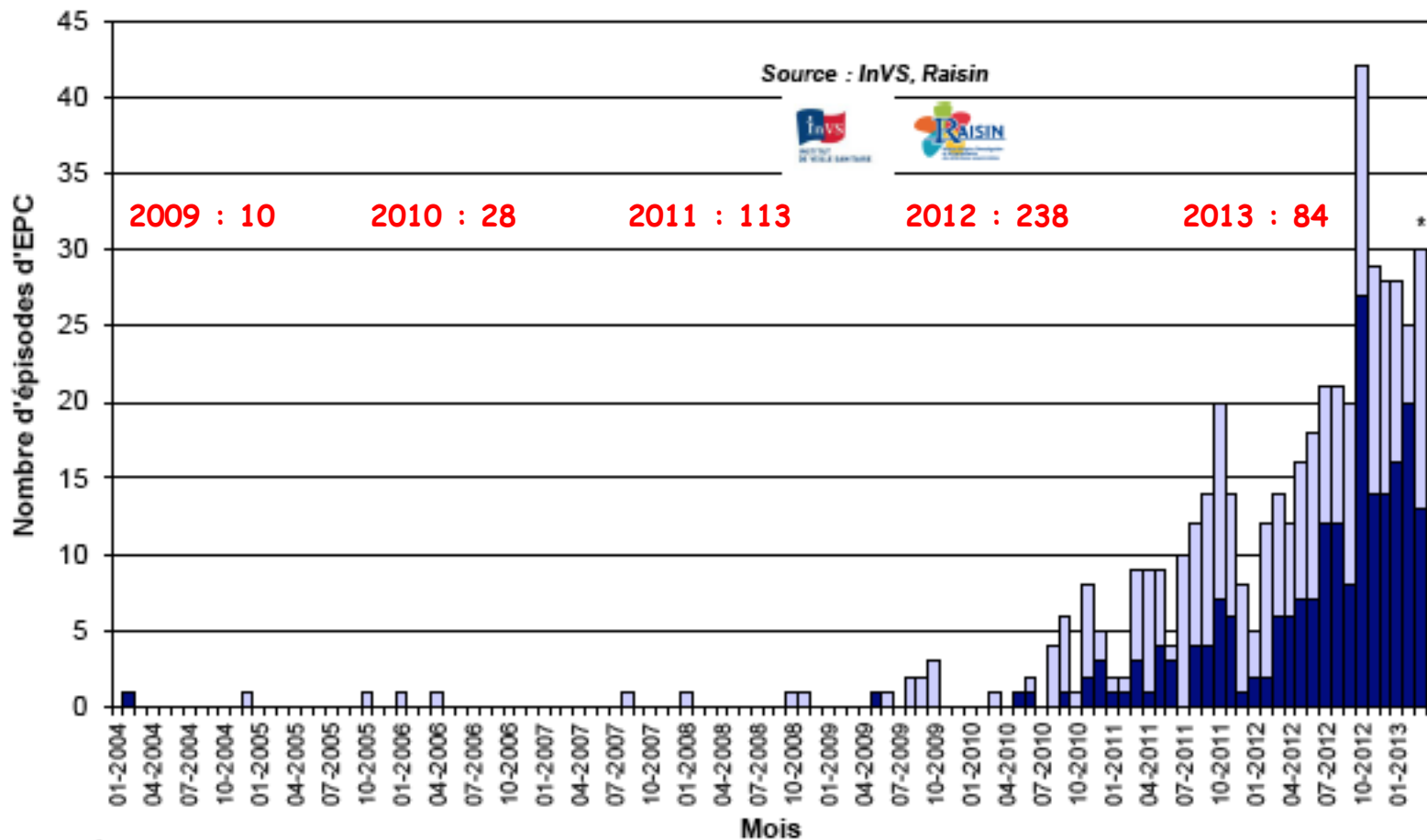
Figure 3 Densités d'incidence des SARM et des EBLSE pour 1 000 journées d'hospitalisation (cohorte de 175 établissements) entre 2003 et 2010, France / *Figure 3 Incidence density of MRSA and ESBLE per 1,000 patient-days (175 healthcare facilities cohort) between 2003 and 2010, France*



* $p < 10^{-3}$ (test de régression de Poisson).

ESKA 2010

Le contexte



* données au 1 avril 2013

■ Episodes sans lien rapporté avec l'étranger □ Episodes avec lien avec un pays étranger



- Épargner les Co
- Utiliser les Cép
- Traitement pré
- Identification r
- Identification r



nt

enzymes : BLSE/CARB

👉 Utilisation du Maldi-tof (BRUKER)

Le principe

- Souches incubées à 37° C sous agitation : une öese de 1µl / 30 µl
- ...
- Centrifugation
- Surnageant déposé sur la plaque
- Addition de la matrice HCCA
- Analyse des spectres : Détection des pics entre 100 et 1000 daltons
 - Pics des molécules et de leurs métabolites non dégradés
 - Pics des molécules après action des enzymes : BLSE ou carbapénèmases

Que mesure t-on ?

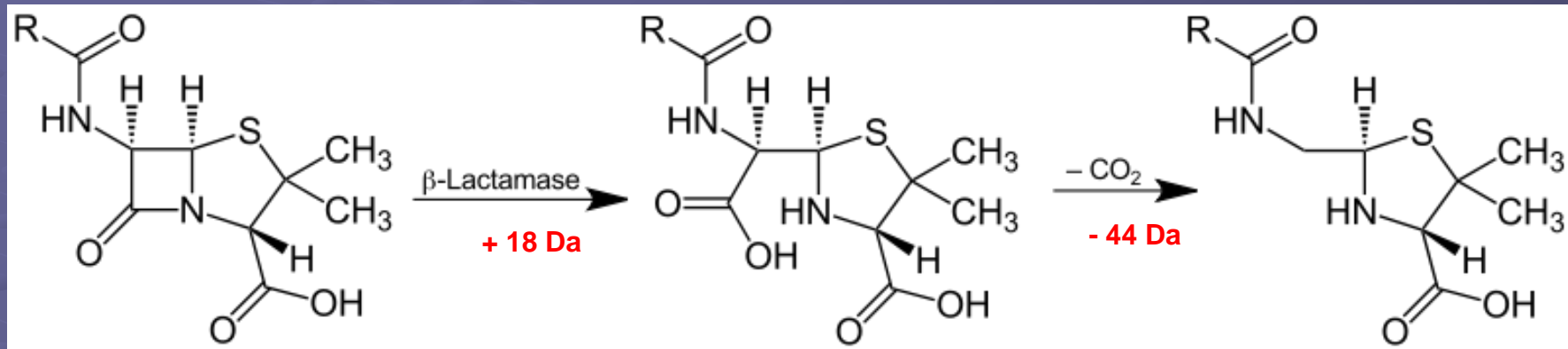
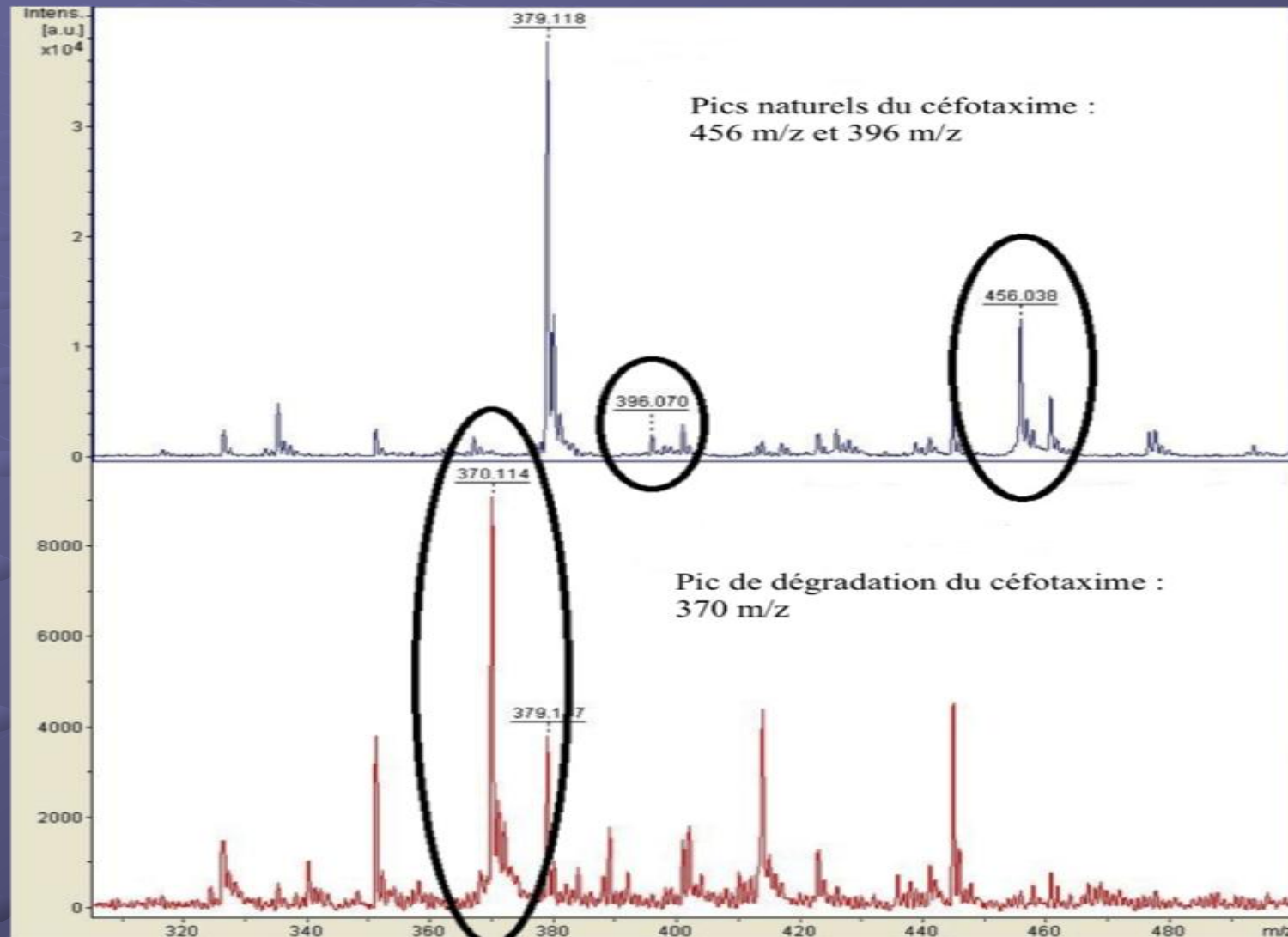


Table 1: Masses (Da) and the corresponding molecular forms defining the sensitivity pattern and the resistance pattern for different antibiotics, respectively (calculated masses).

	MW	Sensitivity pattern							Resistance pattern								
	[g/mol]	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+2Na] ⁺	[M+Na+K] ⁺	[M+3Na] ⁺	[M-X+H] ⁺	[M _{hydr.} +H] ⁺	[M _{hydr.} +Na] ⁺	[M _{hydr.} +2Na] ⁺	[M _{hydr.} +Na+K] ⁺	[M _{hydr./decarb.} +H] ⁺	[M _{hydr.} -X+H] ⁺	[M _{hydr./decarb.} -X+H] ⁺	[M _{hydr./decarb.} +Na] ⁺	[M _{hydr./decarb.} +K] ⁺
Cefotaxime	455.5	456.5	478.5					396.5						414.5	370.5		
Ceftazidime	546.6	547.6						468.6						486.6	442.6		

* X = acetyl for Cefotaxime, X = pyridine for Ceftazidime

Détection des BLSE : comment ?



Matériel et Méthode

- Maldi-Tof Microflex, Bruker
- 121 souches de *E. coli* dont 59 BLSE
- 82 souches de *K. pneumoniae* dont 41 BLSE
- Antibiotiques utilisés :
 - Le céfotaxime : 0,5 mg/ml
 - Le céfépime : 1 mg/ml
 - L'acide clavulanique : 0,05 mg/ml

Méthode : analyse statistique des données

- Valeur étudiée : **intensité relative des pics 370 (I_{370})** : $I_{370} / (I_{370} + I_{396} + I_{456})$
 $I_{370} / (I_{370} + I_{396} + I_{481})$
- Objectif : détermination de seuils différenciant souches S et R
- Analyse de la distribution des I_{370} : souches sensibles / souches résistantes
 - CTX + *E. coli* sensibles et CTX + *E. coli* résistants
 - CTX + *K. pneumoniae* sensibles et CTX + *K. pneumoniae* résistants
 - FEP + *E. coli* sensibles et FEP + *E. coli* résistants
 - FEP + *K. pneumoniae* sensibles et FEP + *K. pneumoniae* résistants

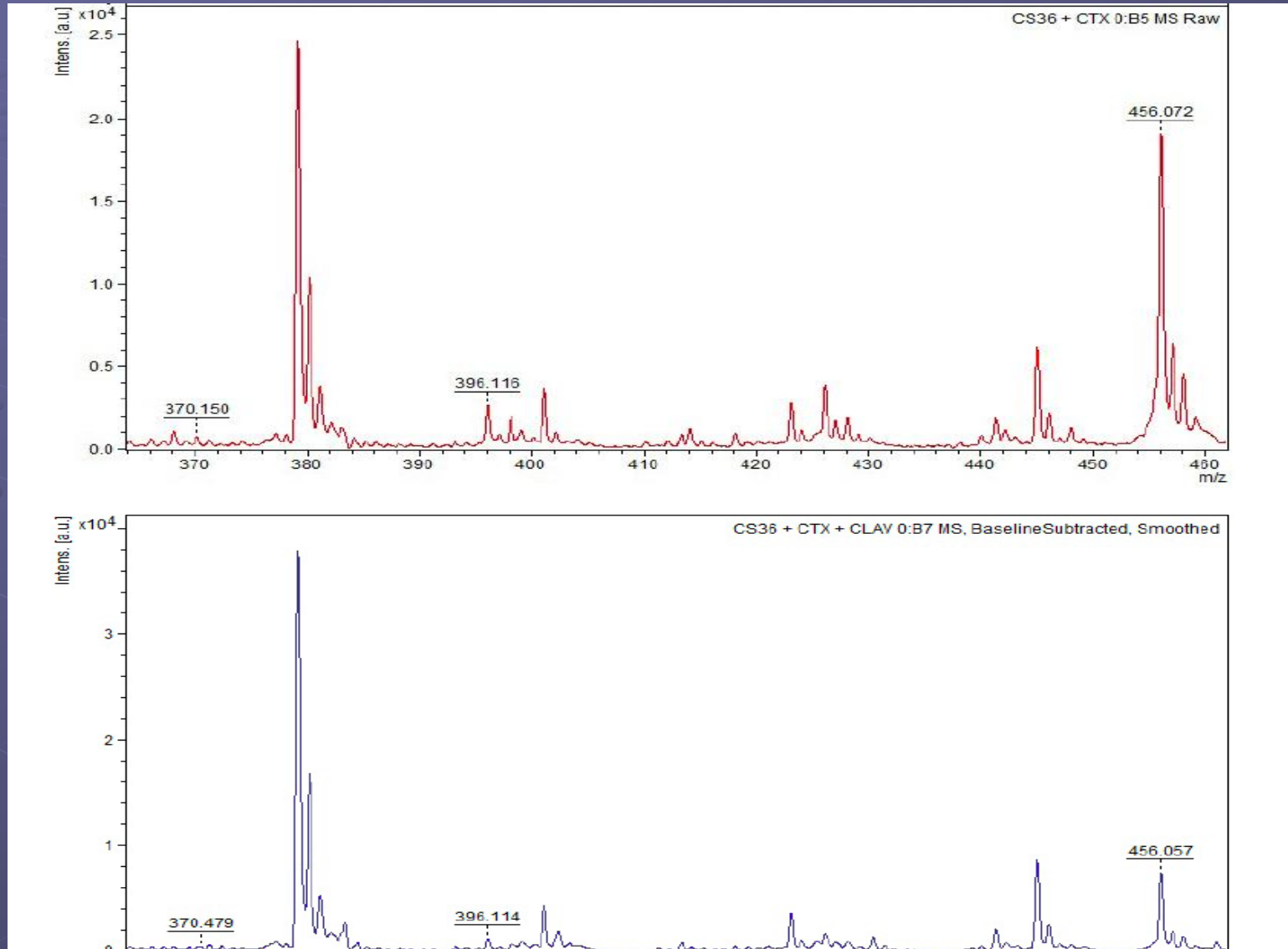
Méthode : analyse

- Elaboration des seuils (70 *E.coli*, 36 *K.pneumoniae*)
 - Substitution des valeurs extrêmes
 - Calcul de l'IC(95%) de la moyenne de l'intensité relative I_{370} des pic 370
 - Calcul des seuils

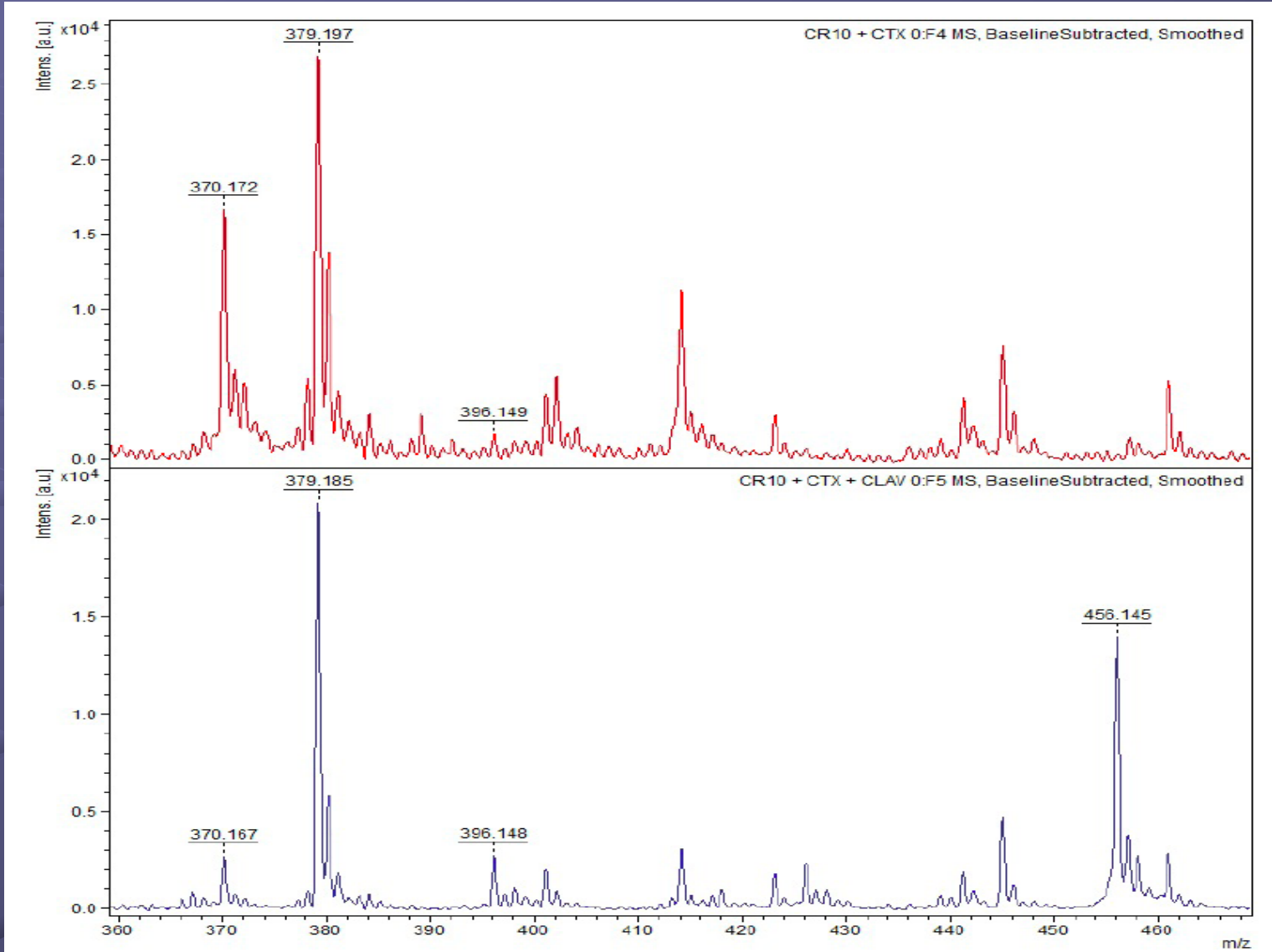


- Validation des seuils avec 51 *E.coli* et 46 *K.pneumoniae*

Souche sensible et CTX



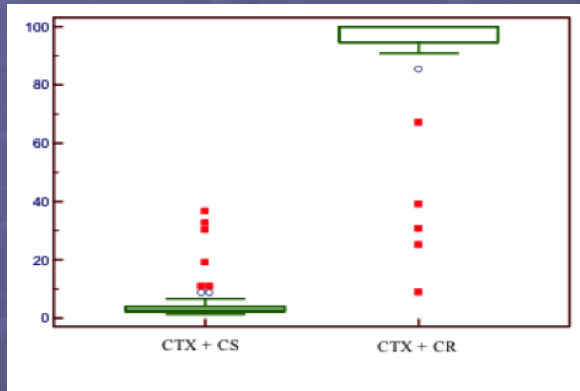
Souche BLSE et CTX



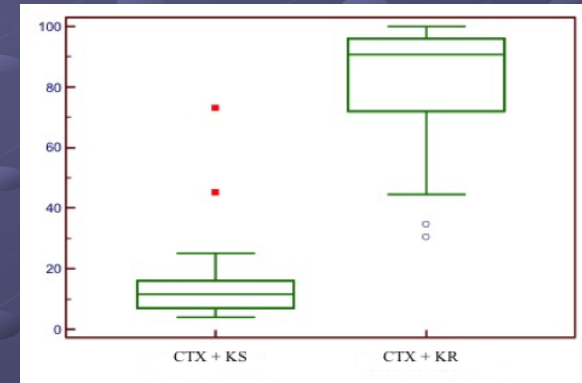
Résultats

- Existence d'une différence significative de la distribution des valeurs de l'intensité relative des pics 370 entre souches sensibles et résistantes

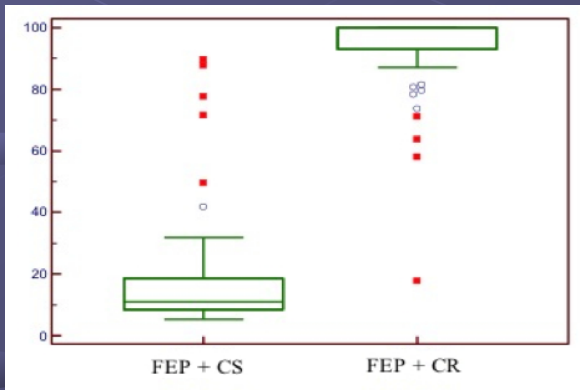
I_{370}



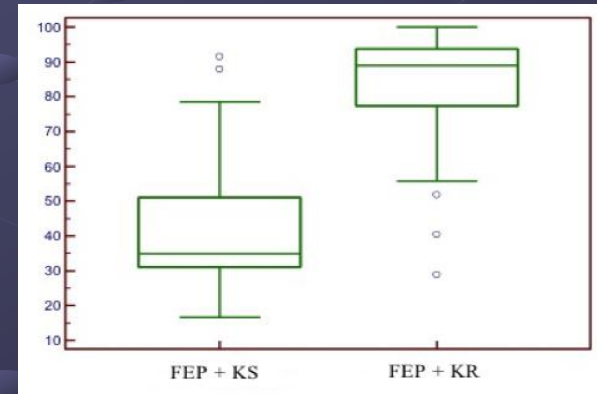
I_{370}



I_{370}



I_{370}



Résultats : calcul des seuils

- Calculs des seuils pour chaque couple antibiotique / bactérie

	IC(95%) _{moy370} Sensible	IC(95%) _{moy370} Résistant	Seuil
CTX + <i>E. coli</i>	[3,24 ; <u>5,46</u>]	[<u>99,48</u> ; 100,18]	52
CTX + <i>K. pneumoniae</i>	[8,95 ; <u>15,33</u>]	[<u>75,13</u> ; 94,48]	45
FEP + <i>E. coli</i>	[13,89 ; <u>27,71</u>]	[<u>91,90</u> ; 98,29]	60
FEP + <i>K. pneumoniae</i>	[34,67 ; <u>58,57</u>]	[<u>75,99</u> ; 91,49]	67

Résultats : validation du seuil pour *E.coli*

CTX	Coli S (n= 27)	Coli R (n= 24)
Test - (< 56)	26	1
Test + (> 56)	1	23

Se : 96%

Sp : 96%

1 Faux négatif : CR41

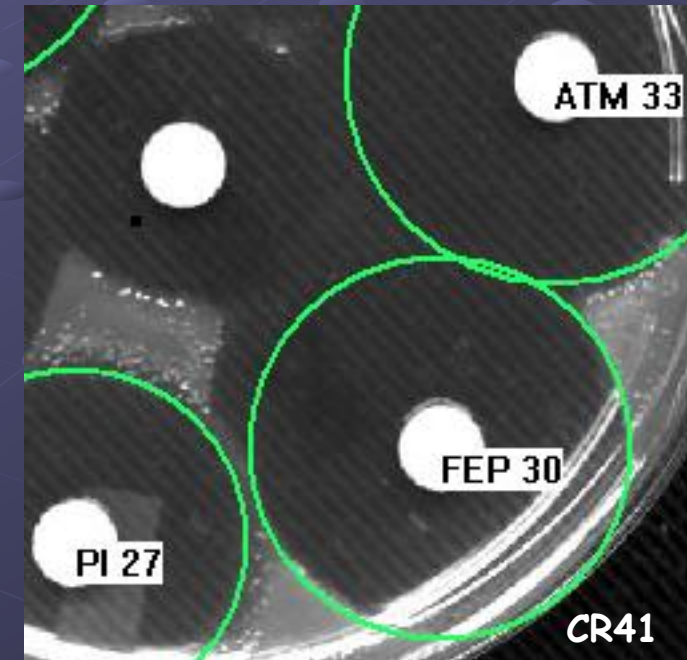
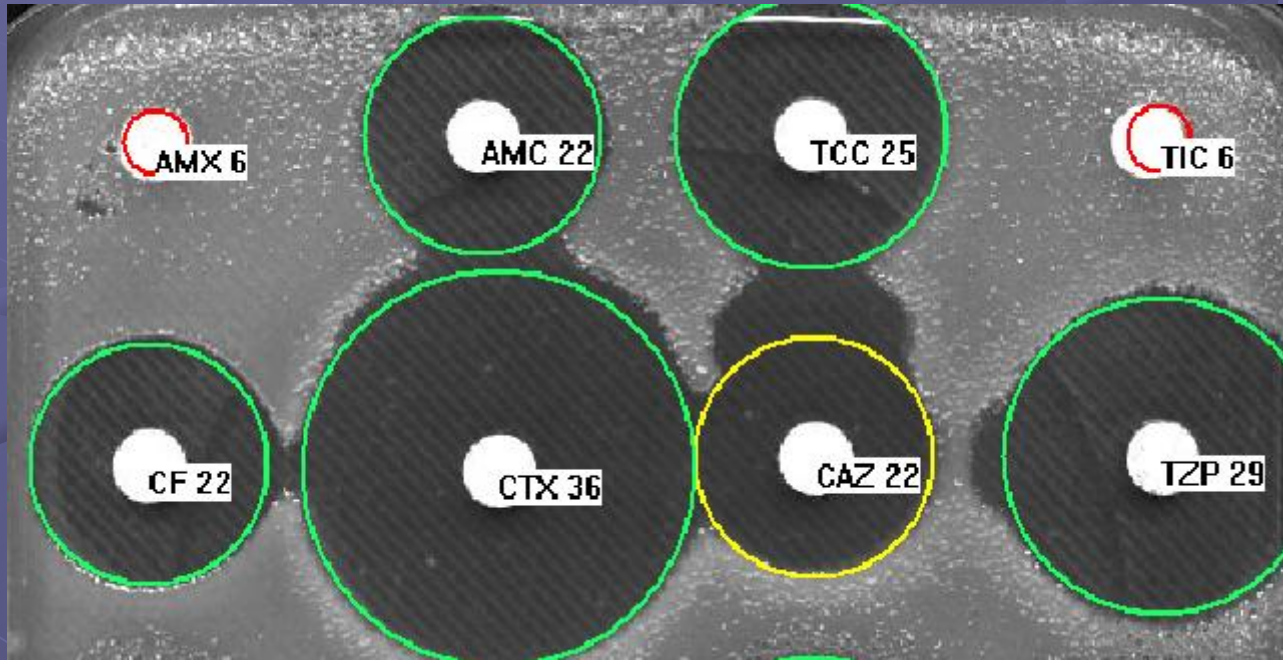
FEP	Coli S (n= 27)	Coli R (n= 24)
Test - (< 60)	23	0
Test + (> 60)	4	24

Se : 100%

Sp : 85%

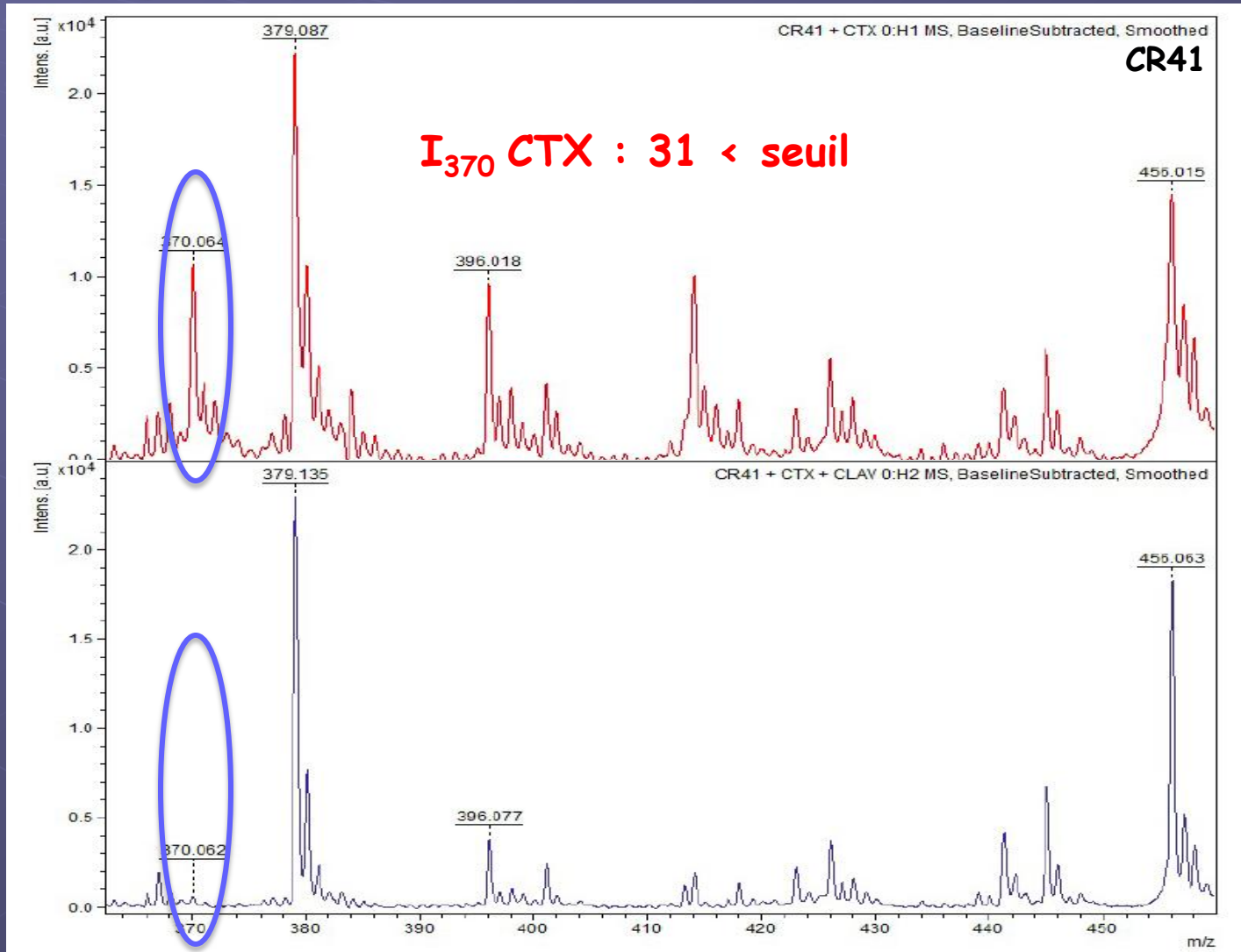
E. coli : faux négatifs

- Souche CR41 : I_{370} CTX : 31 < seuil
- Mais I_{370} FEP : 64 > seuil



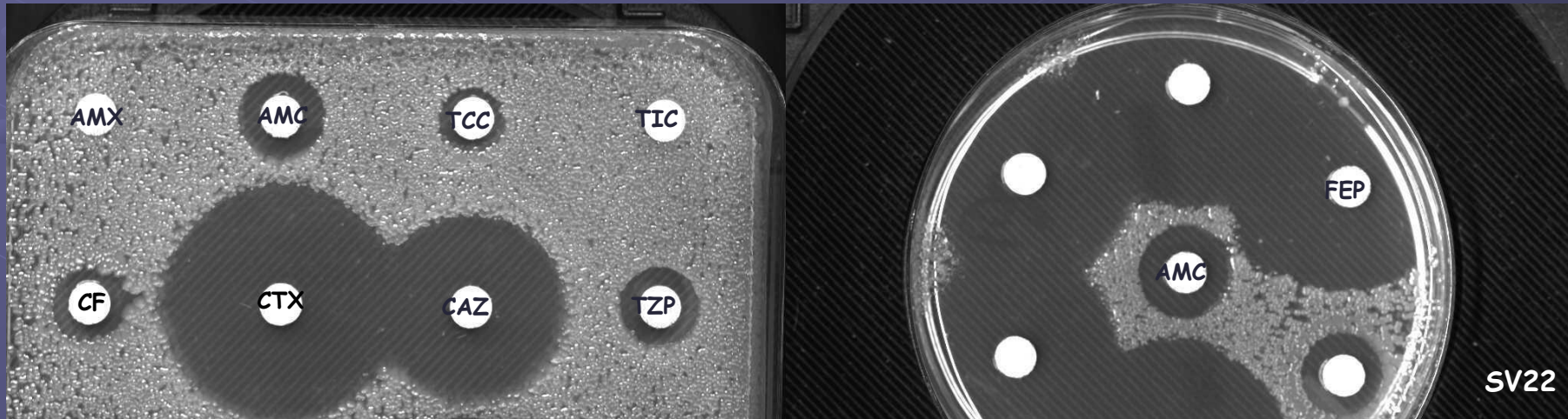
- De plus suivant le CA-SFM et EUCAST : CTX rendu Sensible !

E. coli : faux négatifs

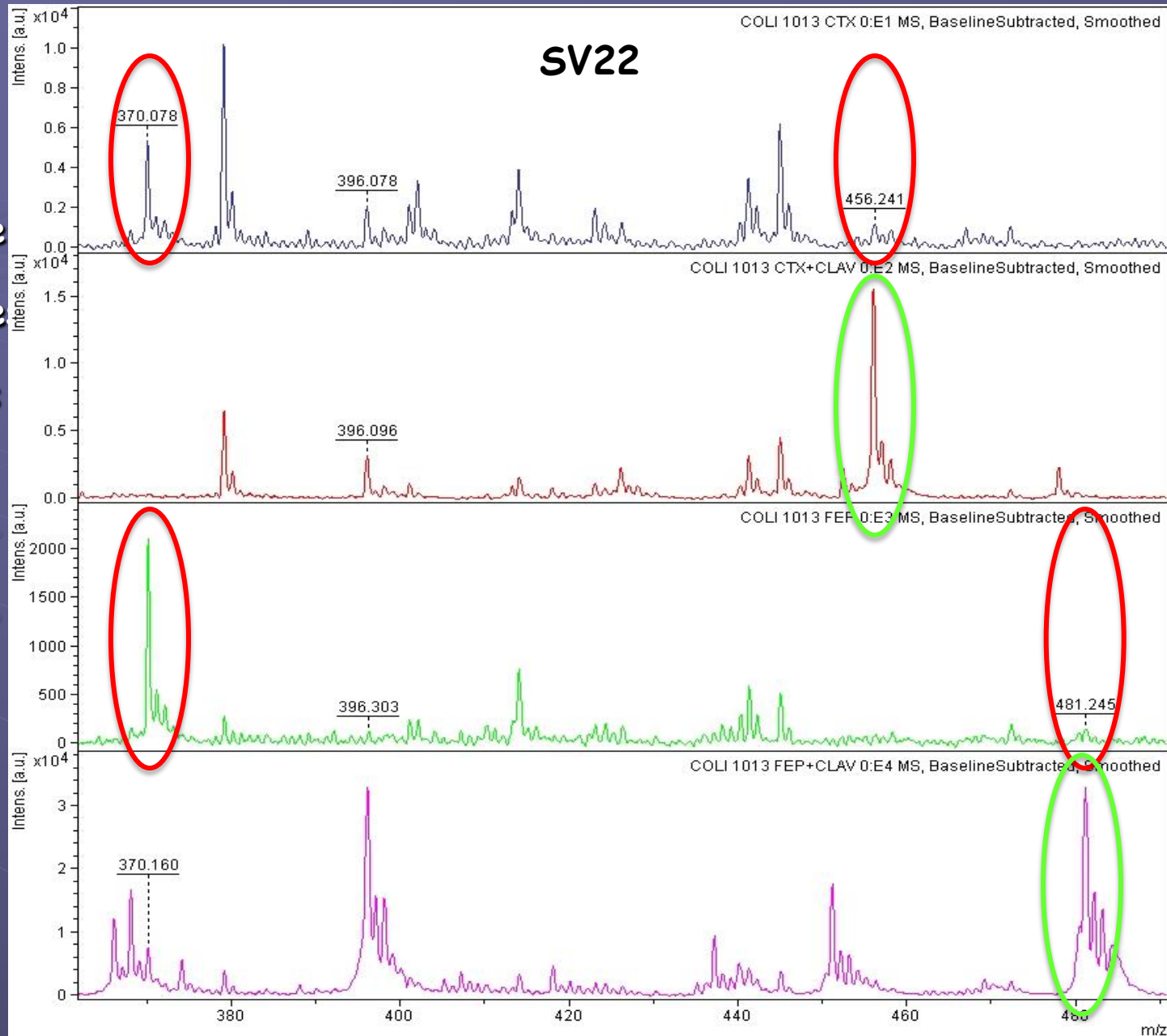


E. coli : faux positifs

- Pour le CTX : SV22 : $I_{370} \text{ CTX} > \text{seuil (52)}$
- Pour le FEP : CS37 - SV12 - SV19 - SV22 : $I_{370} \text{ FEP} > \text{seuil (60)}$
- Toutes des pénicillinases de haut niveau



- Souche
- Souche
- Toutes



Résultats : validation du seuil pour *K.pneumoniae*

CTX	<i>Klebsiella</i> S (n= 25)	<i>Klebsiella</i> R (n= 21)
Test - (< 45)	24	4
Test + (> 45)	1	17

Se : 81%

Sp : 96%

4 Faux négatif

FEP	<i>Klebsiella</i> (n= 25)	<i>Klebsiella</i> R (n= 21)
Test - (< 67)	23	4
Test + (> 67)	2	17

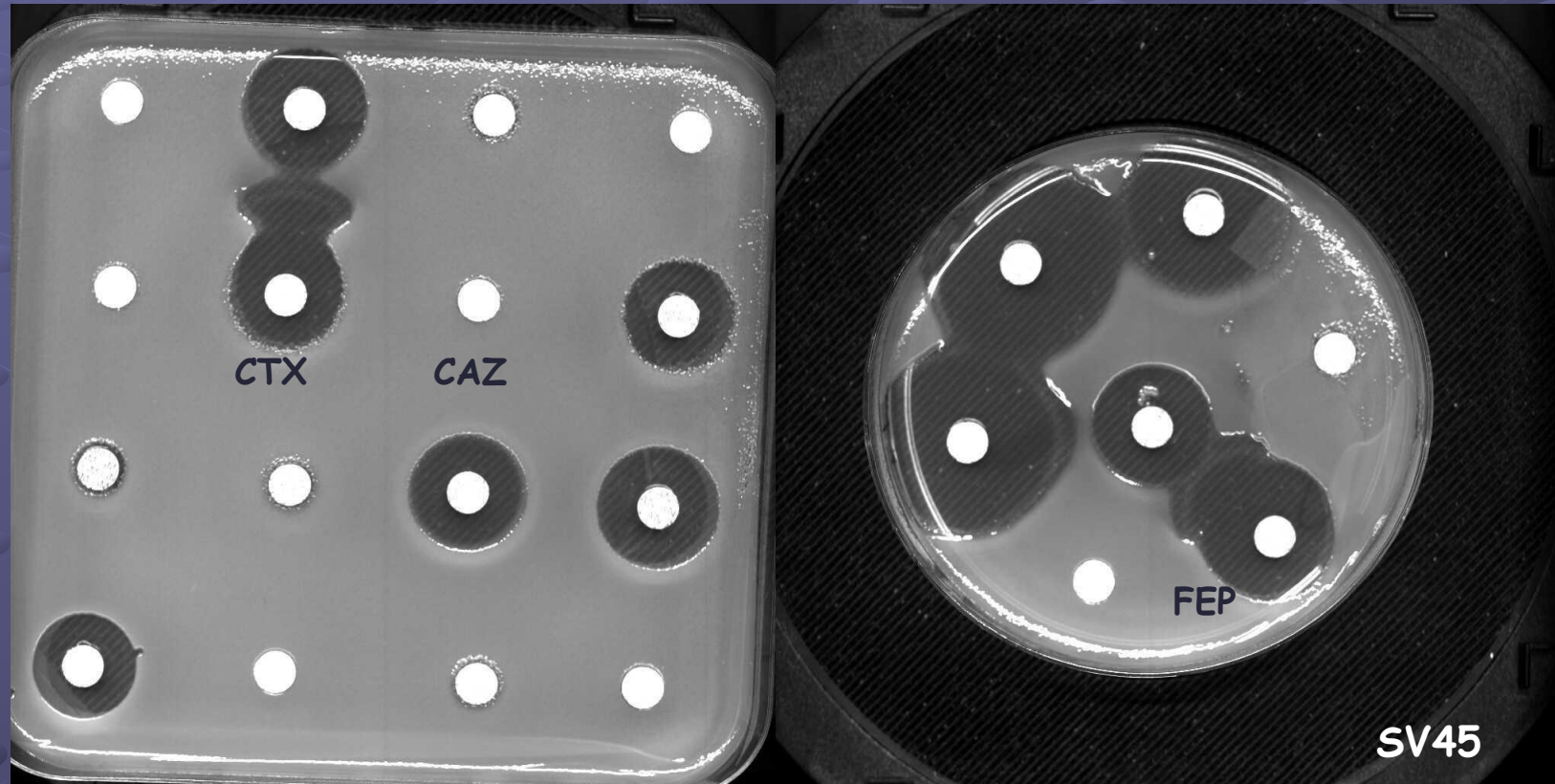
Se : 81%

Sp : 92%

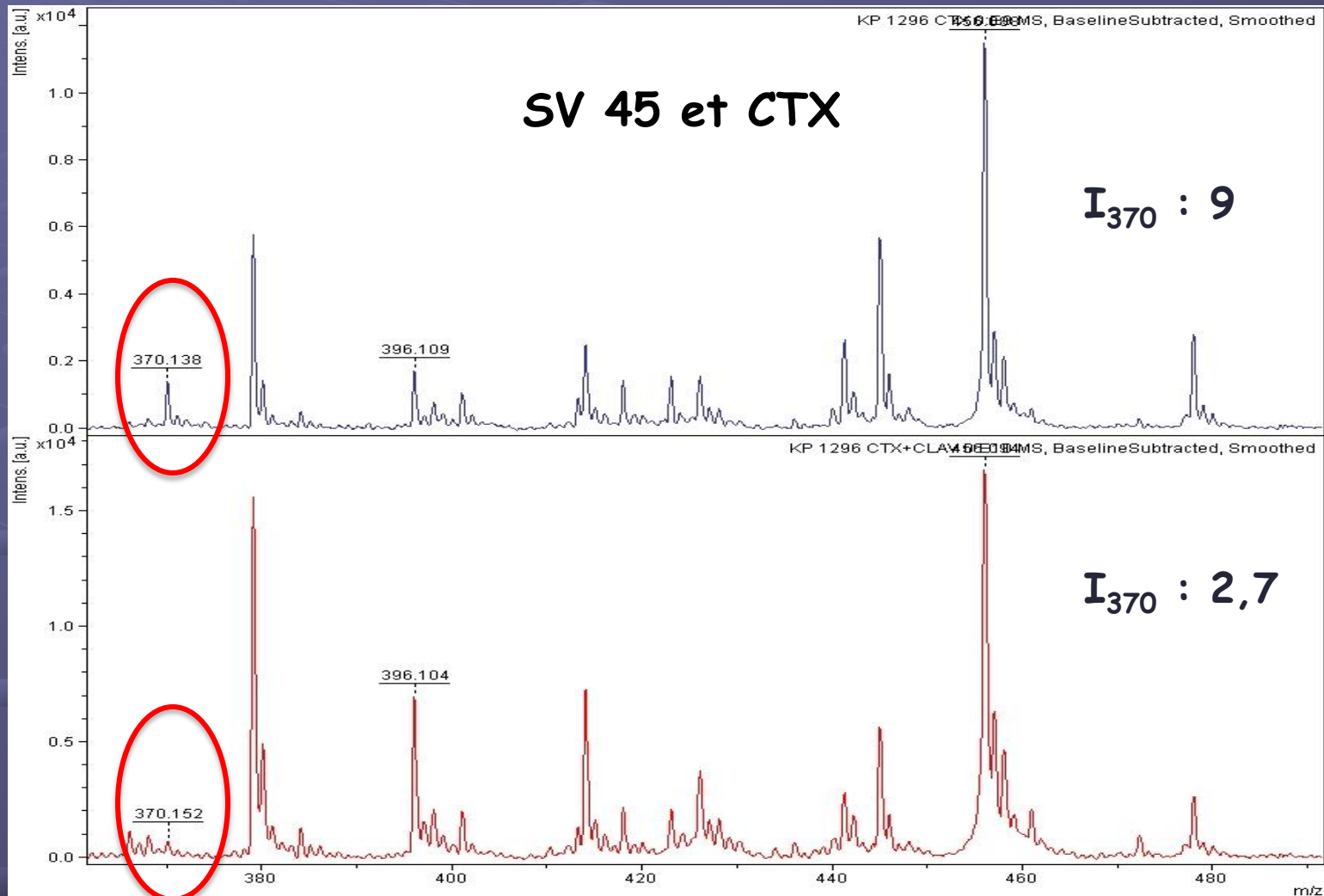
4 Faux négatif

Klebsiella pneumoniae : Faux négatif

- Pour le CTX : KR20 - SV45 - SV47 - SV54
- Pour le FEP : KR20 - SV45 - SV47 - SV54
- Toutes de type non CTX-M ...

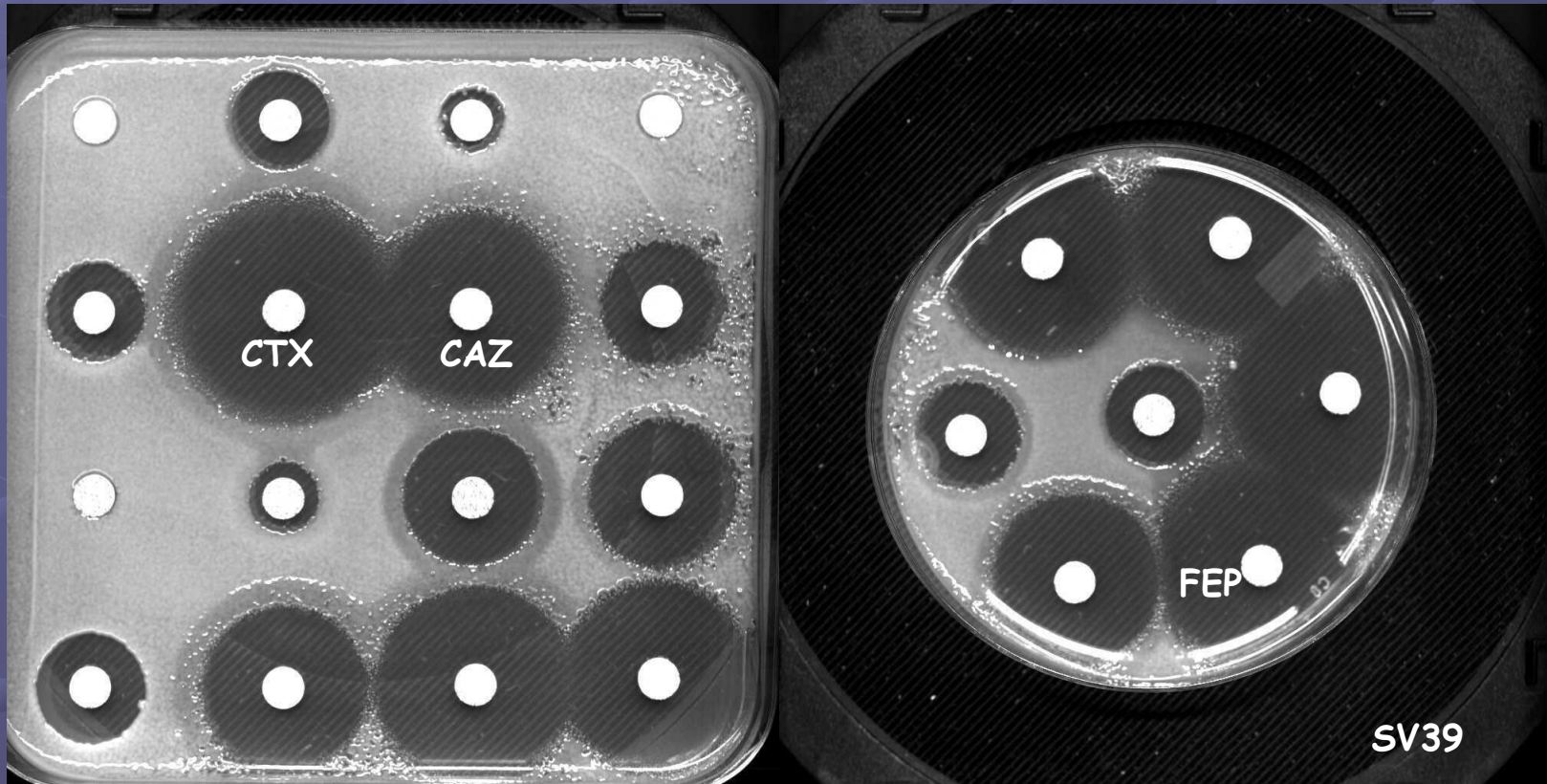


Klebsiella pneumoniae : Faux négatif



Klebsiella pneumoniae : Faux positif

- Pour le CTX : SV39
- Pour le FEP : SV39 - SV13



I₃₇₀ CTX : 76

I₃₇₀ CTX/clav : 9

I₃₇₀ FEP : 74

I₃₇₀ FEP/clav : 32

Evolutions ...

- Tests **en 20 mn** dans les mêmes conditions
 - Validation pour 20 souches de "type CTX-M"
 - Validation pour 20 souches SHV ± TEM
- Hémocultures testées directement après extraction **en 20 mn**



Résultats : colonies

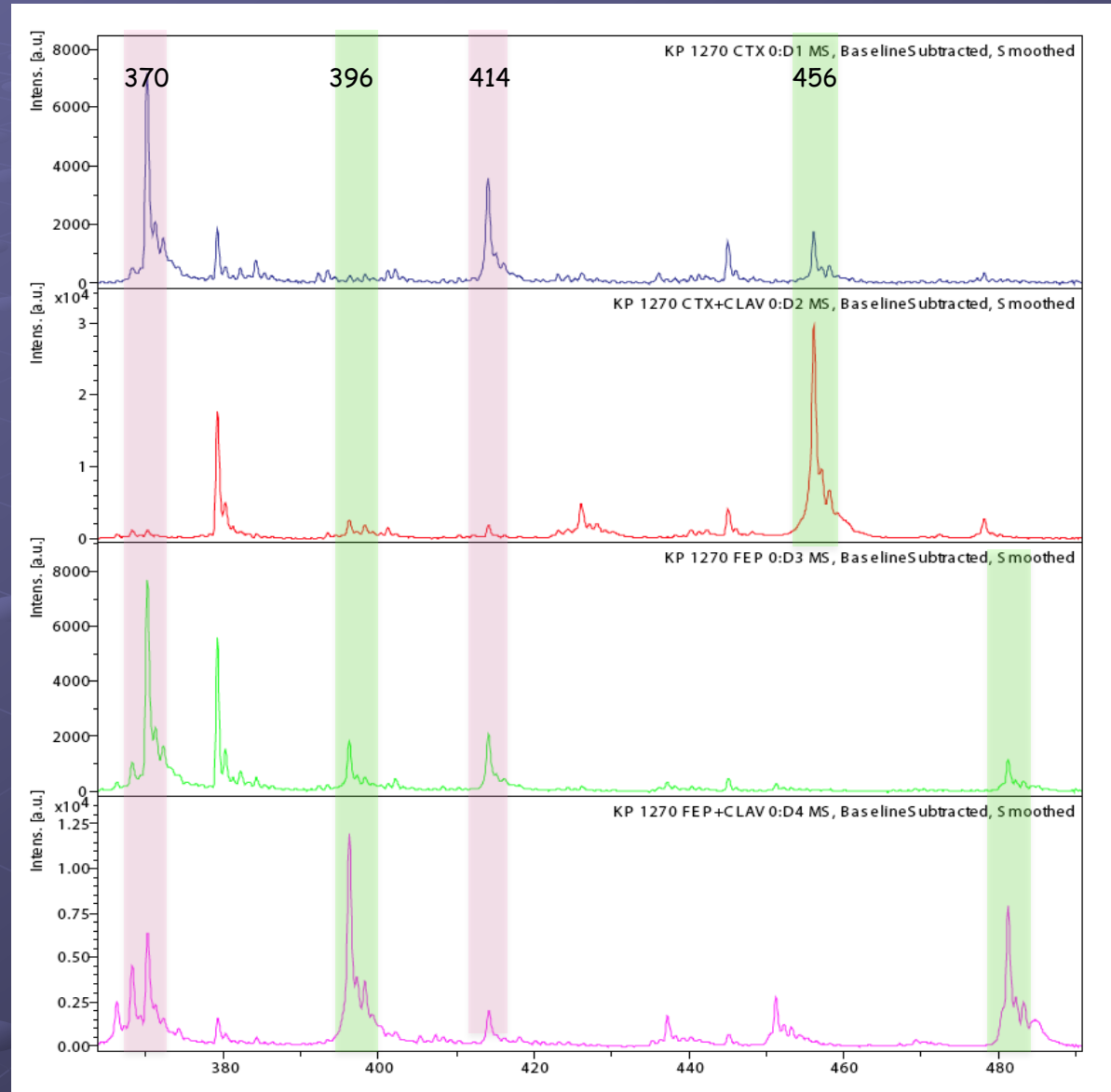
Souches "CTX-M"

- 8 K.p et 12 E.c :

- 19 I_{370} > seuil pour CTX
- 19 I_{370} > seuil pour FEP

- Ex : KP 1270

- I_{370} CTX = 80
- I_{370} FEP = 72



Résultats : colonies

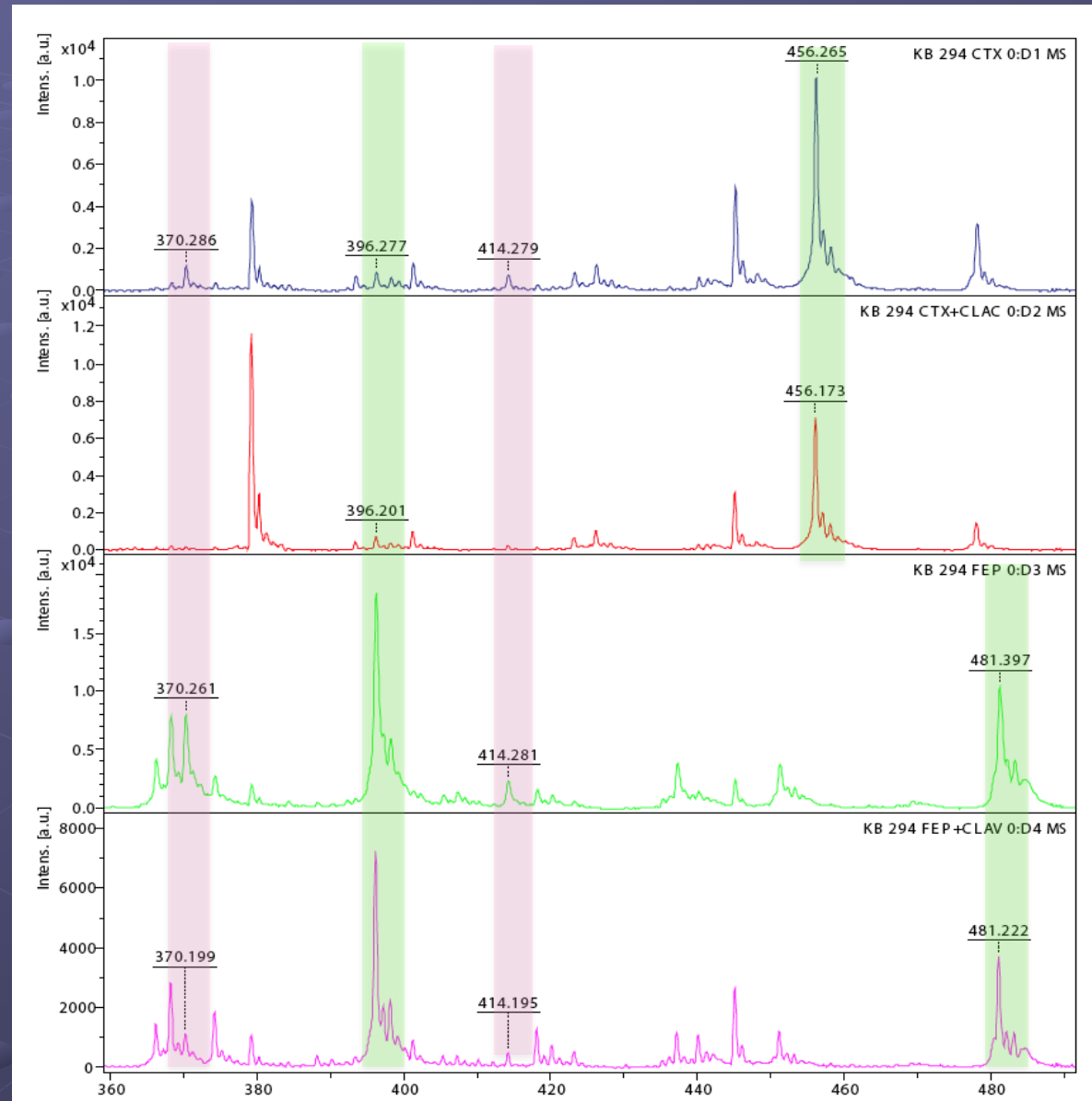
Souches "SHV ± TEM"

● 5 K.p et 15 E.c :

- 7 I_{370} > seuil pour CTX
- 11 I_{370} > seuil pour FEP

● Ex : E.c 294

- I_{370} CTX = 9
- I_{370} FEP = 23



Résultats : colonies

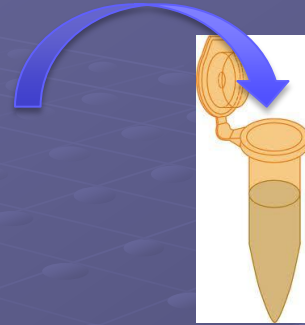
souche	Espèce	résistance	CMI CTX	CMI FEP	CMI CAZ	Coeff CTX	Coeff FEP
2011-189	K.pneumoniae	SHV-2a	>32	3	16	58	91
2011-087	E.coli	TEM 24	1,5	1	>256	23	73
2012-228	K.pneumoniae	TEM-1 + SHV-12	4	0,75	96	68	96
2011-142	E.coli	SHV-12	>32	1	96	8	46
2012-200	E.coli	SHV-5	2	0,38	24	33	62
2010-232	E.coli	TEM-1 + SHV-12	32	4	48	14	49
2011-098	K.pneumoniae	TEM-1 + SHV-2a	16	2	>256	63	86
2011-294	E.coli	TEM-1 + SHV-12	1,5	0,25	12	9	21
2010-162	E.coli	SHV-12	>256	6	3	90	97
2011-170	E.coli	TEM 24	8	1,5	>256	56	100
2011-08	E.coli	TEM-1 + SHV-12	1	0,19	8	9	44
2011-046	E.coli	SHV-12	3	0,75	48	52	100
2012-239	E.coli	TEM-1 + SHV-12	12	2	>256	46	95
2011-240	K.pneumoniae	TEM-1 + SHV-12	3	0,5	96	51	92
2011-164	K.pneumoniae	TEM 24 + SHV-11	0,75	0,5	128	7	23
2012-225	E.coli	TEM-1 + SHV-12	0,75	6	0,125	43	80
2010-144	E.coli	TEM-1 + TEM-12	0,19	1	8	4	49
2010-148	E.coli	TEM-3 + SHV-28	>32	16	96	16	18
2010-213	E.coli	TEM-29	0,125	0,19	3	0	9
2010-34	E.coli	TEM-1 + SHV-38	0,047	0,032	0,19	0	16



And the last but not the least ...



1 ml de sang
+
Solution de lyse



Centrif 1 mn



Solution de lavage

Centrif 1 mn

Total temps : < 1 heure

Surnageant éliminé

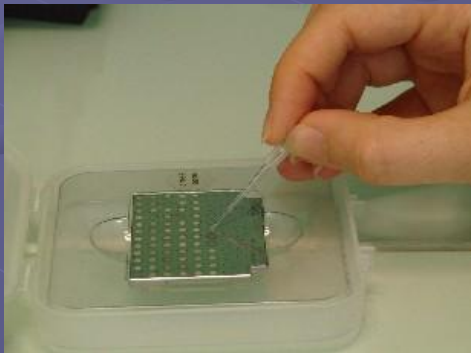


Ajout de la solution antibiotique

Incubation
20mn

Centrif 1 mn

Surnageant



Résultats : Hémo-cultures

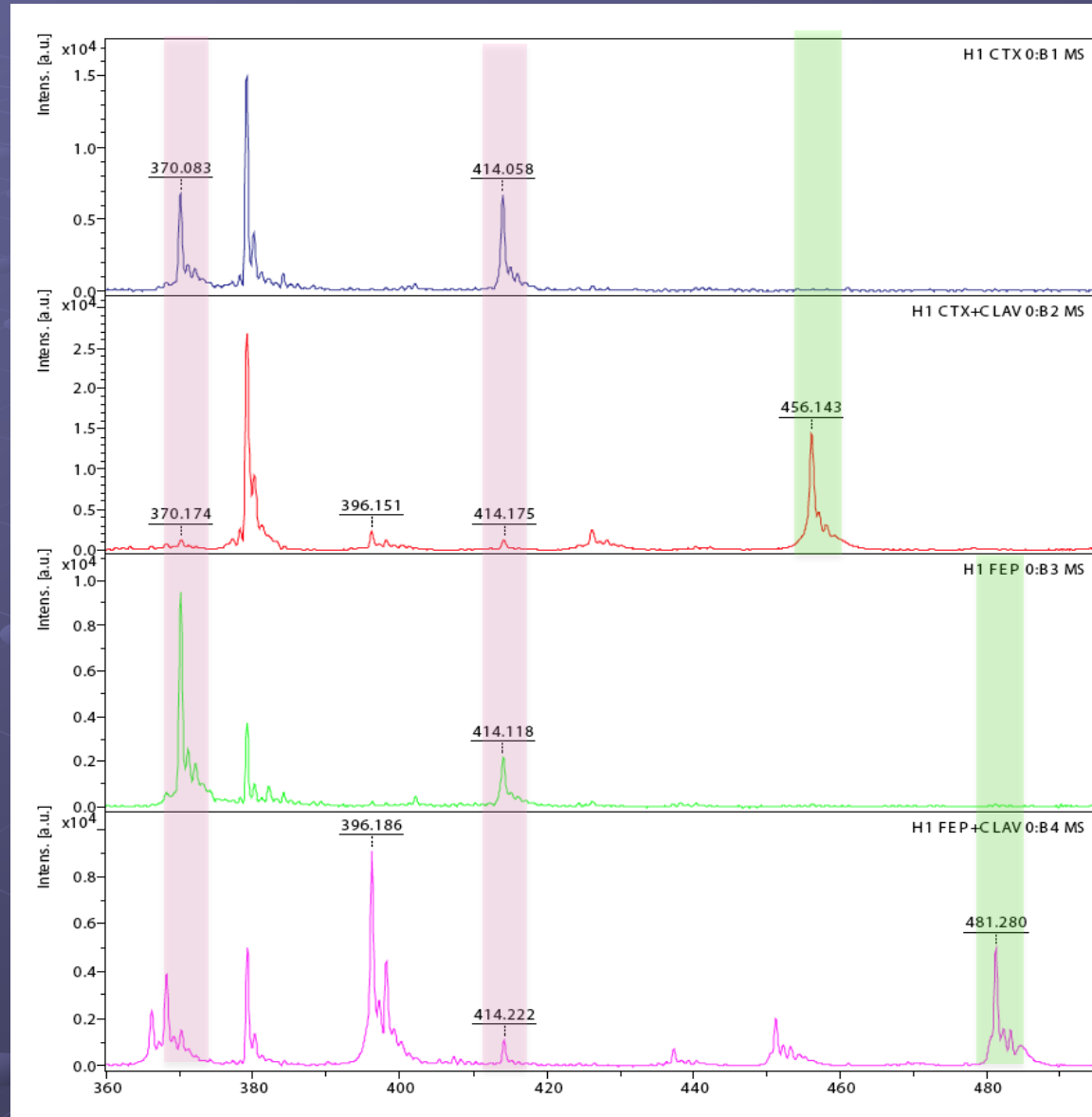
- 20 souches type CTX-M :

☞ 20 tests positifs

- Ex : K.p 1209-1305

☞ $I_{370} \text{ CTX} = 100$

☞ $I_{370} \text{ FEP} = 100$



Et la course continue ...

CARBAPENEM-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE



9,000

DRUG-RESISTANT
INFECTIONS
PER YEAR



600

DEATHS

CARBAPENEM-
RESISTANT
KLEBSIELLA SPP.

7,900



1,400

CARBAPENEM-
RESISTANT
E. COLI

THREAT LEVEL

URGENT



This bacteria is an immediate public health threat that requires urgent and aggressive action.



CRE HAVE BECOME RESISTANT TO ALL
OR NEARLY ALL AVAILABLE ANTIBIOTICS



Détection des carbapénèmases

c'est possible !

- Souches incubées à 37° C sous agitation : une öese de 1µl / 30 µl
- ...
- Centrifugation
- Surnageant déposé sur la plaque
- Addition de la matrice HCCA
- Analyse des spectres : Détection des pics entre 100 et 1000 daltons
 - Pics des molécules et de leurs métabolites non dégradés
 - Pics des molécules après action des enzymes : carbapénèmases

Que mesure t-on ?

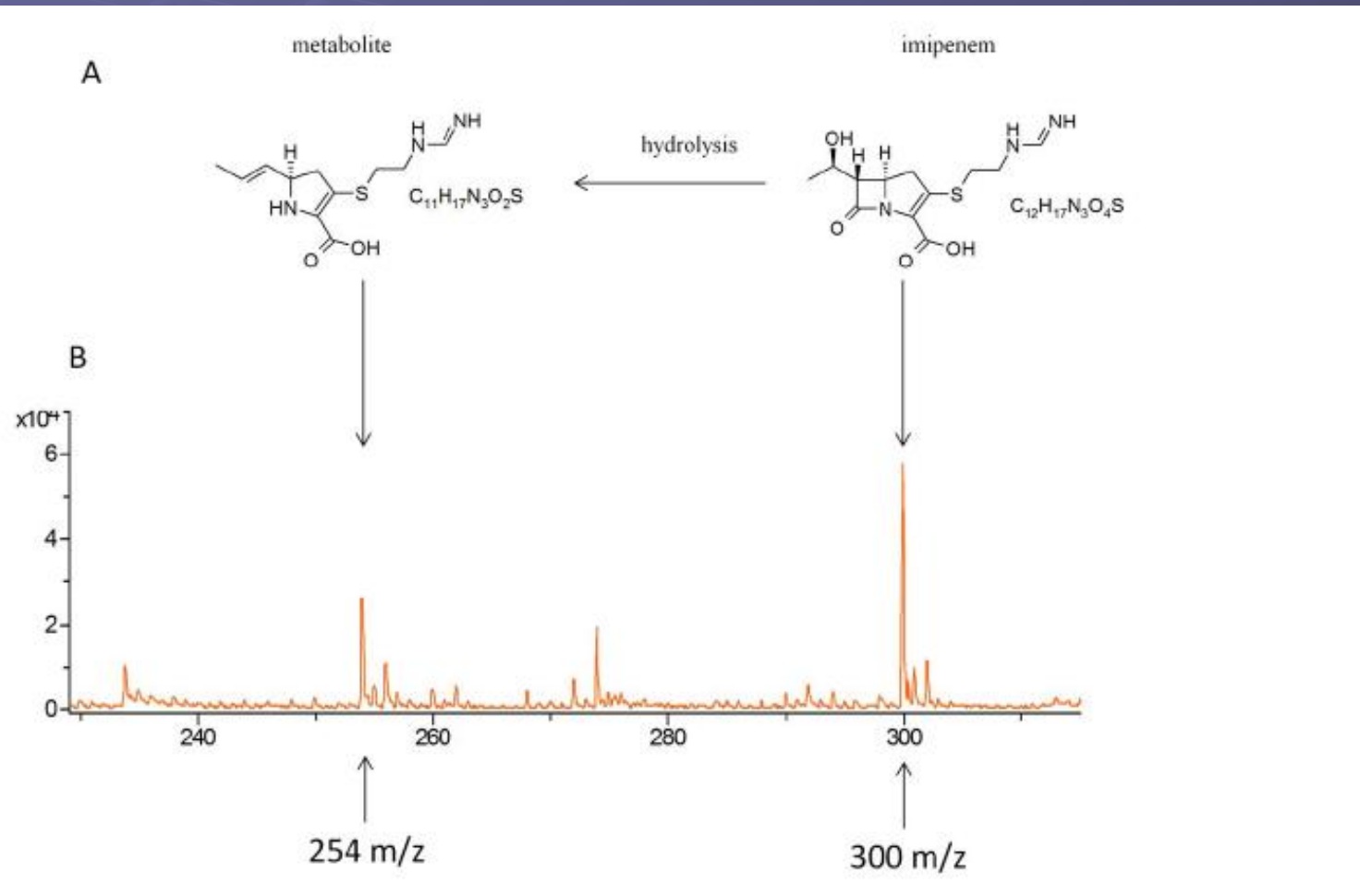
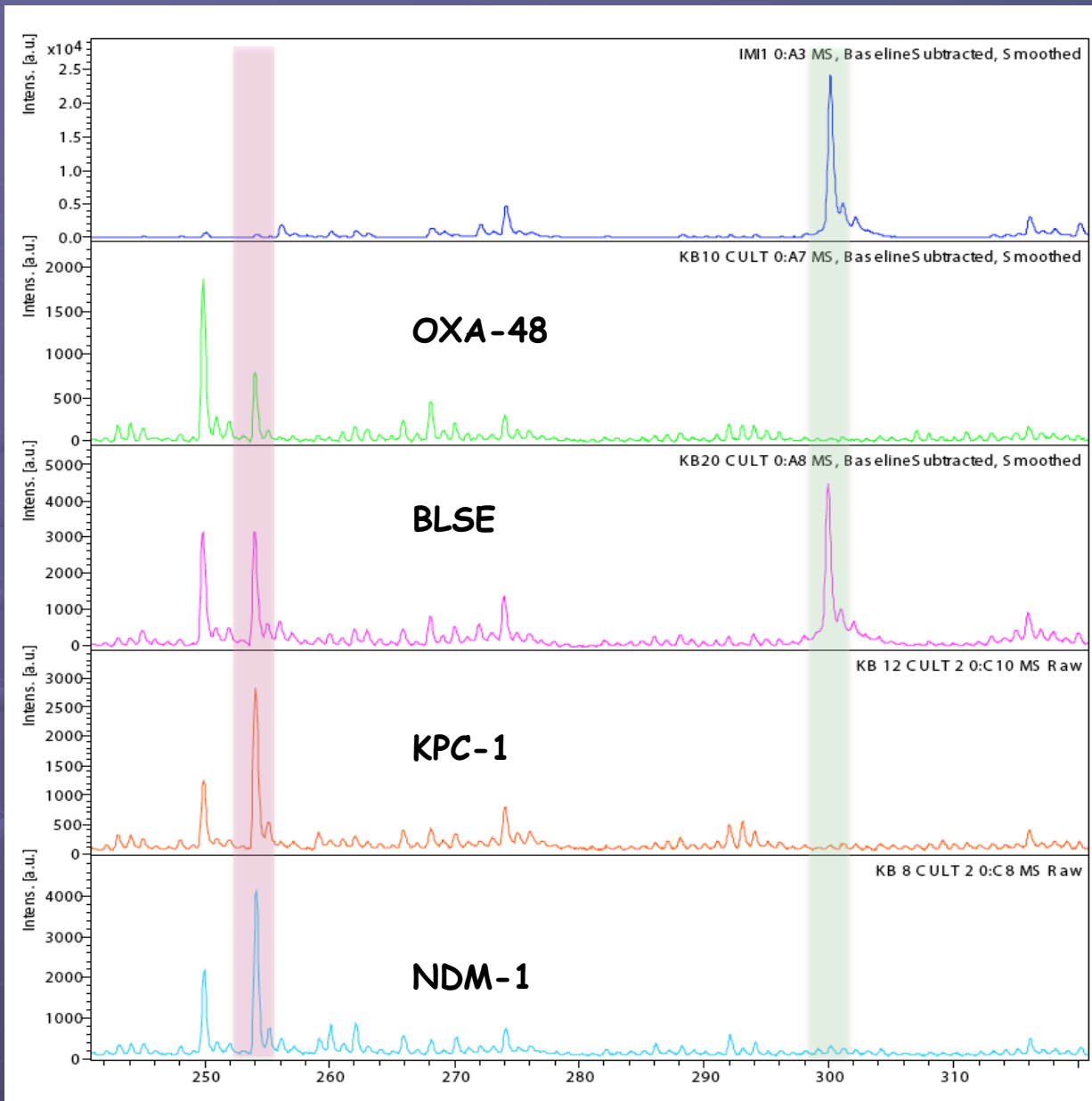


Figure 1. MALDI-TOF MS analysis of imipenem. (A) Imipenem and its natural degradation product. (B) Mass spectra of imipenem and its natural degradation product as determined using the Ultraflex mass spectrometer.
doi:10.1371/journal.pone.0031676.g001

M.Kempf PLoS ONE 2012

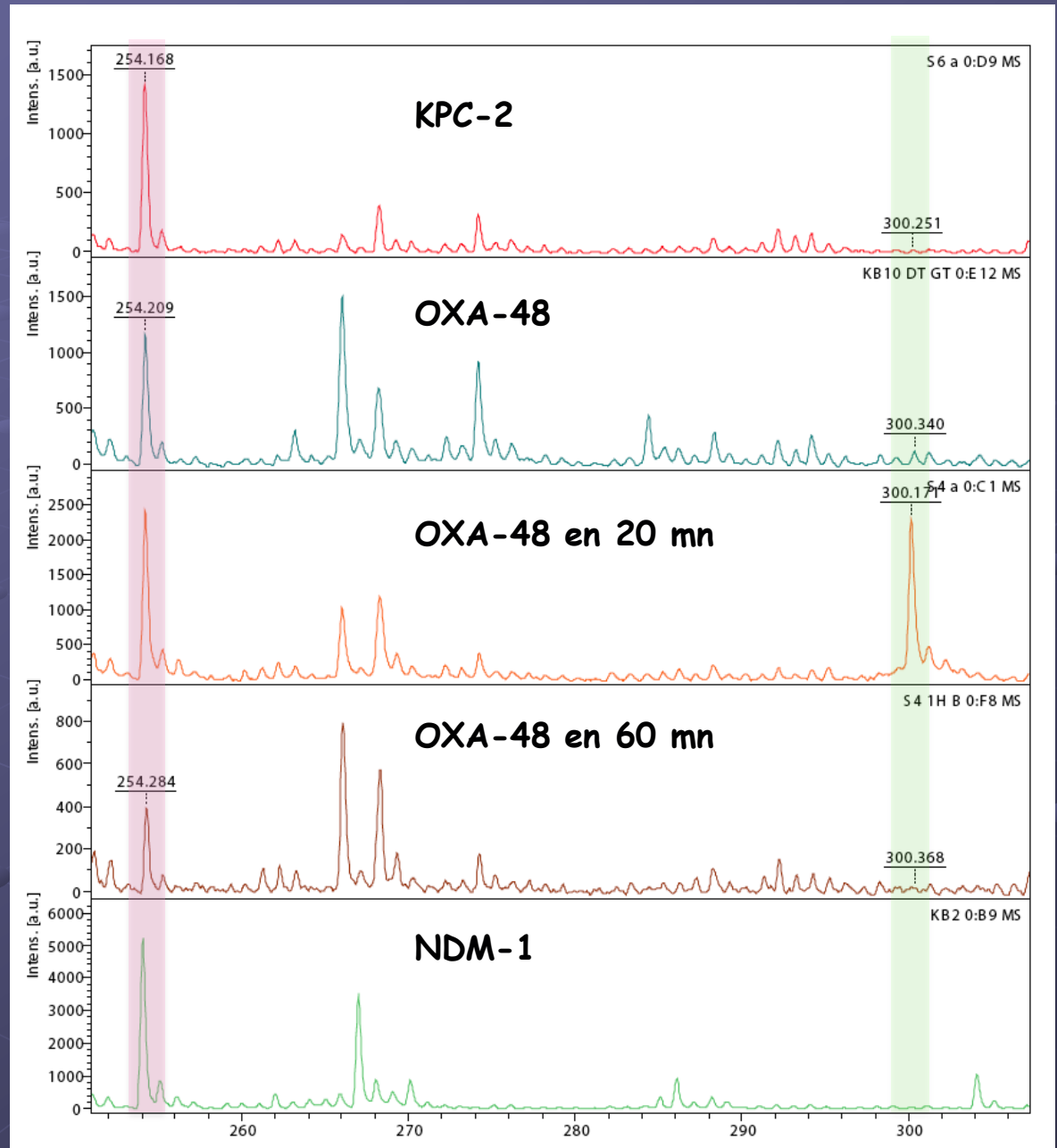
En pratique ...

- incubation 20 mn avec imipénème 0,5 mg/ml
- analyse :
 - Ratio $I_{254} / I_{300} + I_{254}$
- tests : 174 souches d'entérobactéries
 - 127 CARB - dont :
 - ⇒ 19 BLSE, 89 Case, 3 Case+BLSE, 3 Imperméabilité
 - 47 CARB + dont :
 - ⇒ 24 OXA, 2 IMP, 5 NDM, 3 VIM, 1 NOR, 9 KPC, 3 IMI



Hémocultures

- 9 souches :
 - 4 KPC, 1 NDM, 1 IMP, 3 OXA
 - 9 souches CARB-
 - Toutes les CARB + sont détectées
 - Toutes les CARB - sont négatives



Il nous reste à

□ Pour les BLSE :

- Revalider un seuil par la méthode statistique pour des durées courtes
- Passer des souches SHV et TEM sur les hémocultures
- Tester des *E.coli* producteurs de céphalosporinases
- Tester d'autres espèces

□ Pour les Carbapénèmases :

- Travailler l'ertapénème avec ses différents pics
- Tester plus de souches sur les hémocultures

□ Automatiser la détection

Remerciements



Camille Lasserre
Luc Quaesaet

Gaëlle Cuzon
Thierry Naas

Peio Mogabure
Katrin Sparbier

PY Donnio
J Vaucel
F Geffroy
P Pouedras
A Cady
JF Ygout

Ertapénème

