



Détection BMR et BHRe le rôle du Maldi-Tof

Tours Surveillances 2016
Didier Tandé
CHRU Brest

À méditer ...

La politique de maîtrise de la diffusion de la résistance bactérienne dans les établissements de santé relève de la responsabilité conjointe de la direction et de la Commission ou Conférence Médicale d'Établissement (CME), dont elle doit être **une priorité**, comme elle doit l'être également pour le référent antibiotique et l'EOH. La mise à disposition, par l'établissement, des moyens nécessaires pour l'application des recommandations préconisées, est indispensable.

Ce qui est une BHRe

- bactérie **commensale du tube digestif**
- résistante à de nombreux antibiotiques
- avec des mécanismes de résistance aux antibiotiques **transférables** entre bactéries
- émergente selon l'épidémiologie connue, c'est-à-dire n'ayant diffusé en France que sous un mode sporadique ou un mode épidémique limité

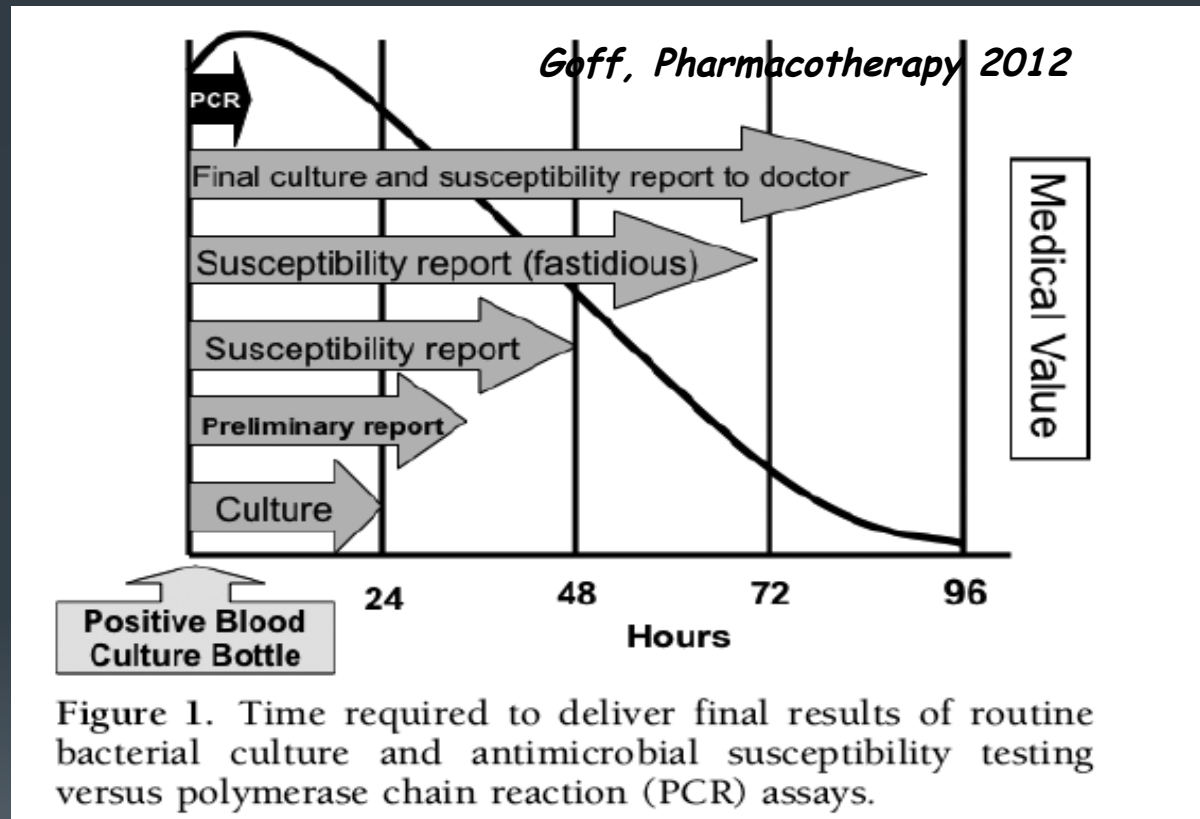
Ainsi, on considèrera comme BHRe :

- parmi les bacilles à Gram négatif : **Entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC)**,
- parmi les cocci à Gram positif : ***E. faecium* résistant aux glycopeptides (ERG)**

Ce qui n'est pas une BHRe

- les bactéries saprophytes comme *A. baumannii* ou *P. aeruginosa*, quelle que soit leur multirésistance aux antibiotiques
- les autres bacilles à Gram négatif résistants aux carbapénèmes sans production de Carbapénémases
- les bactéries multirésistantes (BMR) aux antibiotiques comme SARM et les entérobactéries produisant des BLSE
- *Enterococcus faecalis* résistant aux glycopeptides ; *E. faecalis* est rarement impliqué dans les épidémies. Il doit être géré comme une BMR.

Une chose est très claire !



👉 Fournir des résultats dans un délai qui peut avoir un impact sur la prise en charge

Les enjeux vis à vis des BMR et BHRe

- Les suspecter
- Les identifier
- Aller vite
- Ne pas se tromper
- Alerter les services concernés le plus vite possible
- Épargner les antibiotiques de large spectre
- Les utiliser à bon escient et dans le bon timing
- Gagner du temps dans les dépistages
- "Limiter les coûts" autant que possible

Face aux B

- Épargner les Ca
- Utiliser les Cépl
- Traitement préc
- Alertes en temp
- Identification re
- Identification re



égatif ...

mes : BLSE/CARB

👉 Utilisation du Maldi-tof (BRUKER)



β -lactamases et Maldi-Tof

Une utilisation originale

Que mesure t-on ?

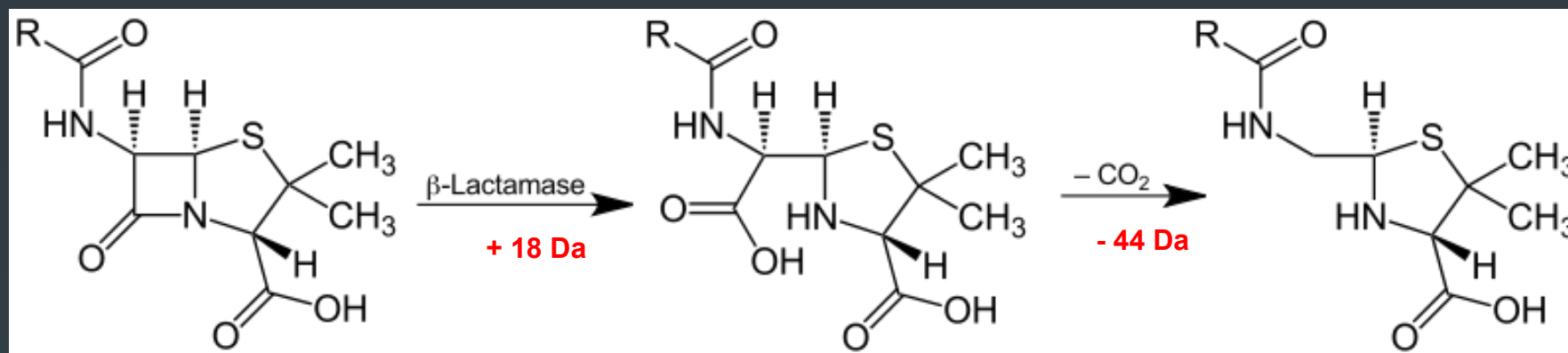


Table 1: Masses (Da) and the corresponding molecular forms defining the sensitivity pattern and the resistance pattern for different antibiotics, respectively (calculated masses).

	MW [g/mol]	Sensitivity pattern							Resistance pattern								
		[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

Résistance sur les colonies

- Souches incubées à 37°C sous agitation : une öese de 1 µl / 30 µl ATB
- ...
- 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

Résistance sur les hémocultures



1 ml de sang
+
Solution de lyse



Centrif 1 mn



Solution de lavage

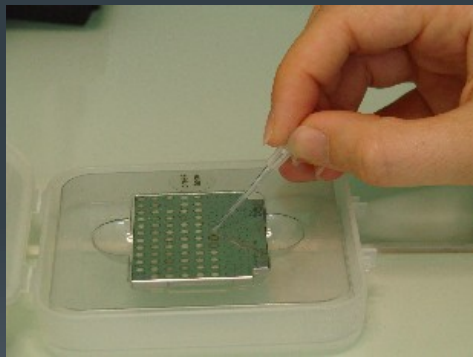


Centrif 1 mn



Ajout de l'antibiotique

Incubation 20 ou 60mn



Identification sur le culot

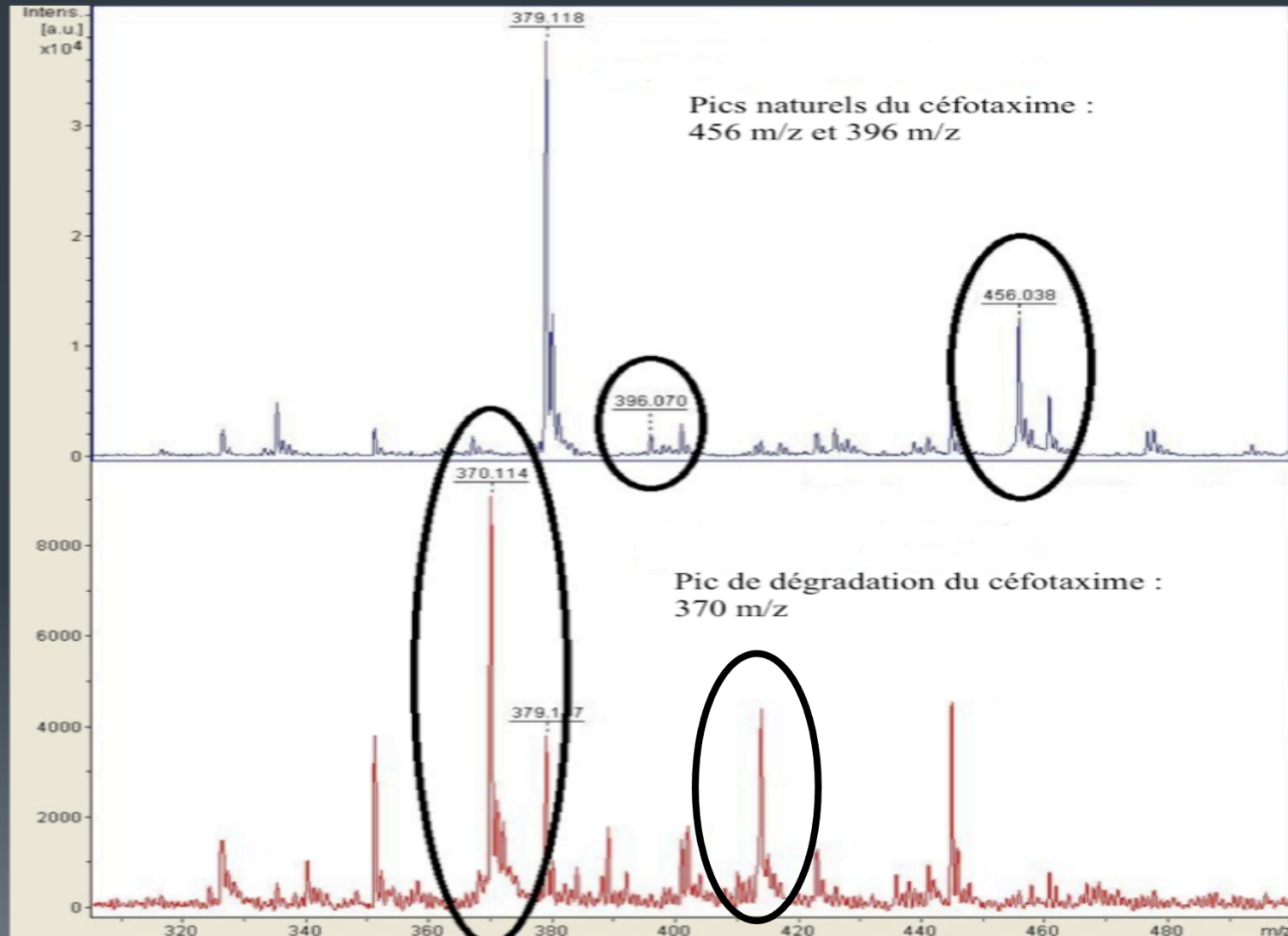
Centrif 1 mn



Culot



Détection des BLSE : comment ?



BLSE sur colonies et Hémocultures

- Antibiotique : Céfotaxime à 0,5 mg/ml
- Colonies : test en 20 minutes (n = 275)
- Hémocultures : test en 1 heure (n = 175)
- Valeur étudiée : intensité relative des pics 370 et 414 : $I_{370}+I_{414} / (I_{370}+I_{414}+I_{396}+I_{456})$

Colonies	BLSE CTX-M	Non BLSE
n	143	132
Test positif I>26	142	5
Test négatif I<26	1	127

Hémocultures	BLSE CTX-M	Non BLSE
n	104	71
Test positif I>26	104	8
Test négatif I<26	0	63

Se = 99%

Sp = 96%

VPP = 96,5%

VPN = 99%

Se = 100%

Sp = 89%

VPP = 93%

VPN = 100%

BLSE sur colonies

- Antibiotique : Céfotaxime à 0,5 mg/ml
- Colonies : test en 20 minutes (n = 275 *E.coli* et *K.pneumoniae*)
- Valeur étudiée : intensité relative des pics 370 et 414 : $I_{370}+I_{414} / (I_{370}+I_{414}+I_{396}+I_{456})$

Colonies	BLSE CTX-M	Non BLSE
n	143	132
Test positif I>26	142	3
Test négatif I<26	1	129

Se = 99%

Sp = 98%

VPP = 98%

VPN = 99%

BLSE sur Hémocultures

- Antibiotique : Céfotaxime à 0,5 mg/ml
- Hémocultures : test en 1 heure (n = 175 *E.coli* et *K.pneumoniae*)
- Valeur étudiée : intensité relative des pics 370 et 414 : $I_{370}+I_{414} / (I_{370}+I_{414}+I_{396}+I_{456})$

Hémocultures	BLSE CTX-M	Non BLSE
n	104	71
Test positif $I > 26$	104	8
Test négatif $I < 26$	0	63

Se = 100%

Sp = 89%

VPP = 93%

VPN = 100%

BLSE sur colonies et Hémocultures

➤ Problème :

➤ Résultats plus mitigés pour des BLSE non CTX-M (SHV et TEM)

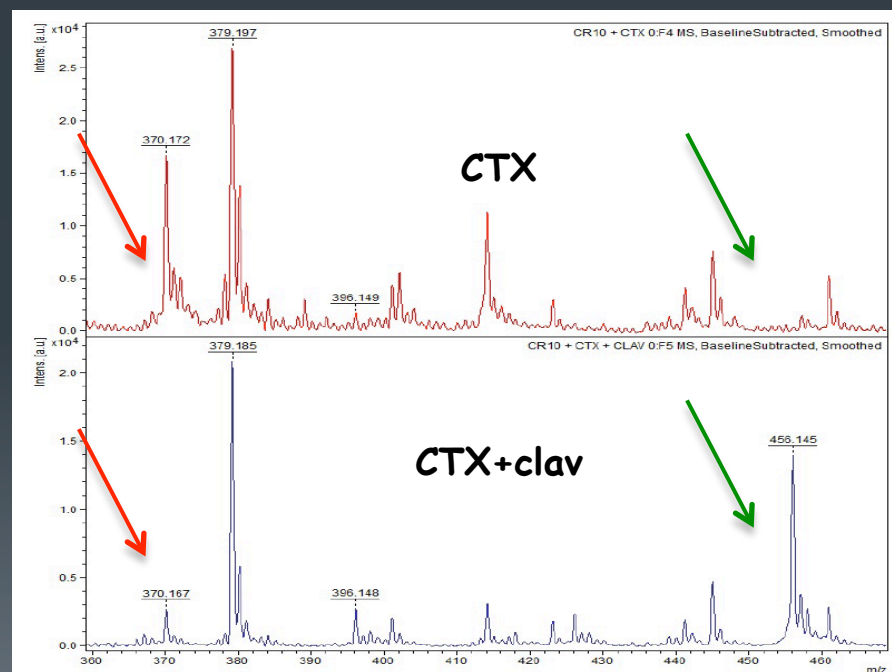
➤ Pas franchement de mieux avec l'inhibiteur

➤ Reprendre le travail avec une 2^{ème} Céphalo ?

➤ Quel intérêt en pratique ?

➤ Y a t il plus simple ?

➤ Y a t il plus rapide ?



BLSE sur Hémocultures

- Soyons malins et profitons de différents tests !
 - ✓ Le plus vite possible
 - ✓ Le moins couteux possible
 - ✓ Le moins de manipulations possible
 - ✓ Sans besoin de techniciens spécialisés
- En clair pas de bio mol ni d'antibiogramme ...

BLSE sur Hémocultures

- Identification et Sensibilité aux C3G en moins de 20 minutes !

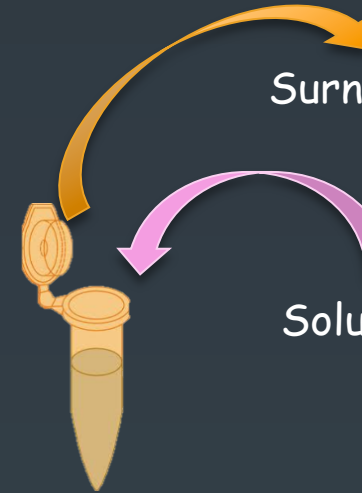
ça vous dit ?



1 ml de sang
+
Solution de lyse



Centrif 1 mn

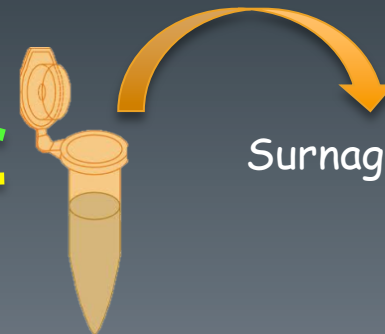


Surnageant éliminé

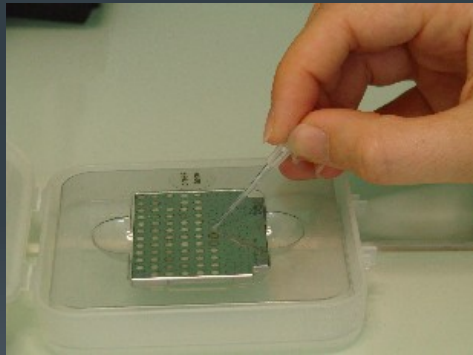
Centrif 1 mn



Solution de lavage



Surnageant éliminé



Identification sur le culot

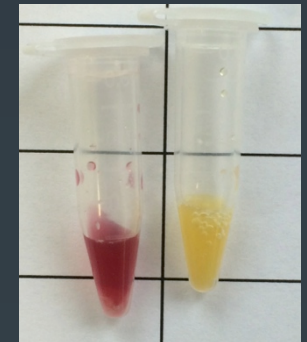
Tests rapides :

β-Lacta test

PCR

BLSE sur Hémocultures

- Identification et Sensibilité aux C3G en moins de 20 minutes !
- 148 souches d'entérobactéries de phénotype connu :
 - 74 *E.coli*, 47 EB du groupe 2, 26 EB du groupe 3
 - 95 BLSE, 25 CaseH, 2 SHV₁, 1 hyperOXY, 25 C3G sensibles
- Hémoculturesensemencées et incubées dans le BacT/ALERT
- Identification directement sur le flacon ≤ 5 mn
- β -lacta test (Biorad) effectué sur le culot d'ID ≤ 15 mn



BLSE sur Hémocultures

	C3G résistant n = 123	C3G sensible n = 25	BLSE n = 95	CaseH n = 25
β-Lacta test +	95	1	93	1
β-Lacta test -	28	24	2	24

Se : 74%

Sp : 96%

VPN : 46%

VPP : 99%

- Résultats excellents sur les BLSE
- Résultats mauvais sur les CaseH
 - Sélection des EB ne produisant pas ou peu de CaseH
 - EB des groupes 0, 1 et 2 (< 1% des *E.coli* des hémocs à Brest en 2015)

BLSE sur Hémocultures

- Travail sur toutes les hémocultures de routine de Février à Mai 2016
- Identification systématique sur tous les flacons aérobies (sans charbon)
- Si Groupe 0 à 2 : test immédiat

	C3G résistant n = 8	C3G sensible n = 29
β-Lacta test +	7	0
β-Lacta test -	1*	29

Se : 87,5%
Sp : 100%
VPP : 100%
VPN : 97%

* *E.coli* avec une CaseH mais qui restait sensible au Céfotaxime

- 6 des 29 patients avec EB C3G Sensible, avaient reçu un carbapénème
- 2 des 8 patients avec une souche Résistante avaient reçu une molécule jugée inactive



Les EPC

Entérobactéries Productrices de Carbapénèmes



Le rôle du laboratoire

Le laboratoire de biologie médicale en charge des analyses des prélèvements microbiologiques d'un établissement de santé doit repérer le plus rapidement possible les bactéries suspectes d'être des BHRe (résistance aux carbapénèmes par production d'une carbapénémase chez les entérobactéries et la résistance aux glycopeptides chez *Enterococcus faecium*).

La détection de ces BHRe doit reposer sur la pratique de **dépistage ciblant les patients à risque**.

Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly?

David M. Livermore^{1,2*}, Jenny M. Andrews³, Peter M. Hawkey⁴, Pak-Leung Ho⁵, Yoram Keness⁶, Yohei Doi⁷, David Paterson⁸ and Neil Woodford²

- Distribution par NEQAS : *K.pneumoniae* ST258 / KPC
 - CMI Imipénème : 8 mg/l
 - CMI Méropénème : 16 mg/l
- 'Most participants reported reduced susceptibility to imipenem (12.8% susceptible, 17.9% intermediate, 69.3% resistant) and to meropenem (7.6% susceptible, 9.3% intermediate, 83.1% resistant).'
- 'MICs. . .(mostly from gradient or automated systems) were very variable, from 0.5 to ≥ 32 mg/l with a mode of 8 mg/l for imipenem and 0.25 to ≥ 64 mg/l with a mode of ≥ 16 mg/l for meropenem.'

Proposition *(Nordmann CMI 2012)*



- ➔ Rechercher une carbapénémase dès que il y a **une légère baisse** de sensibilité **de l'un** des carbapénèmes

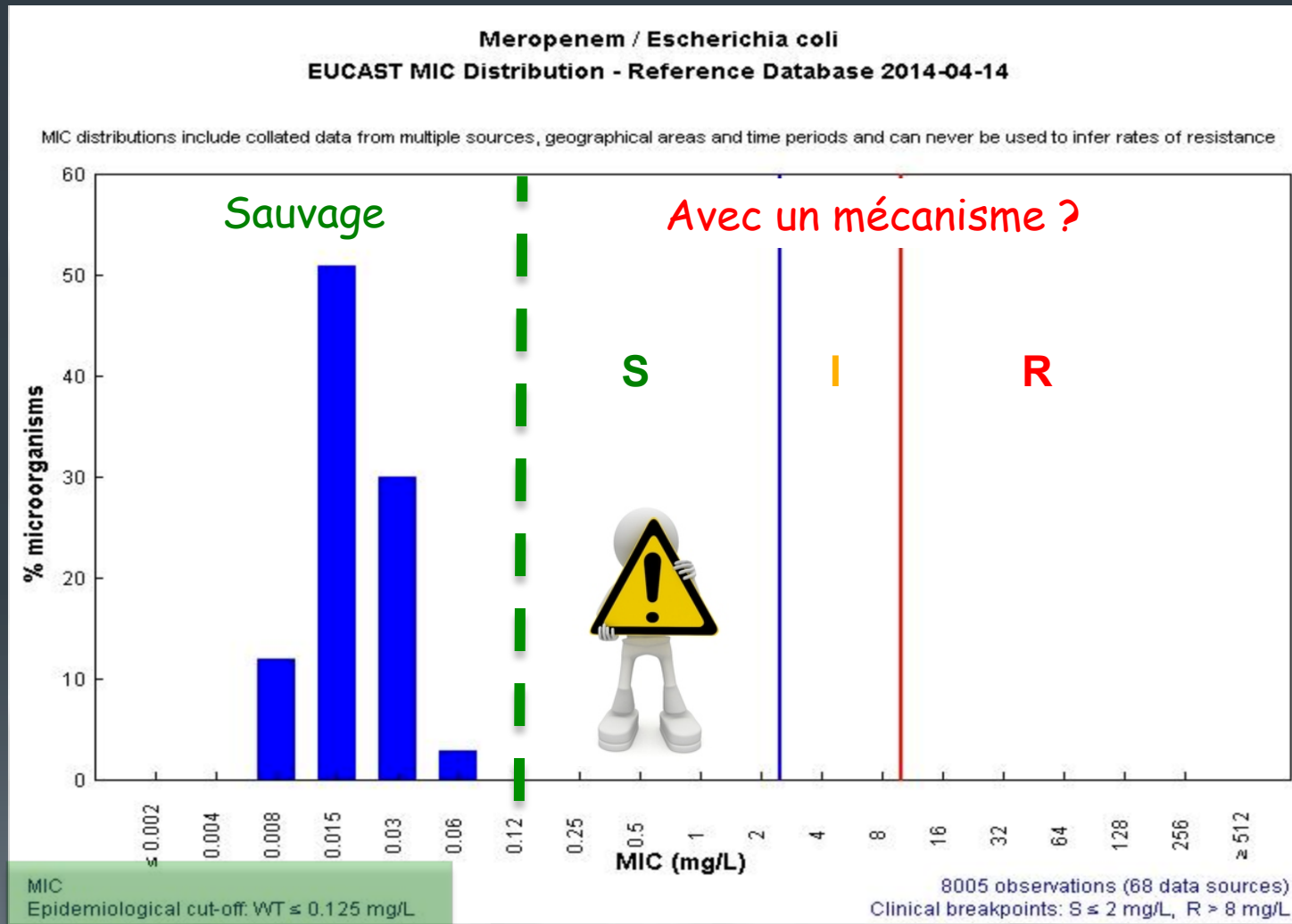
Ertapénème : $\geq 0,5 \text{ mg/l}$ ($BP \leq 0,5 \text{ mg/l}$)

Imipénème ou Méropénème : $\geq 1 \text{ mg/l}$ ($BP \leq 2 \text{ mg/l}$)

Mais l'EUCAST 2014

- ➔ Do not use the clinical breakpoints to detect resistance mechanisms but the ECOFFs (*epidemiological MIC values*)

Qu'est ce que l'ECOFF ?



Eucast 2014

Table 1. Clinical breakpoints and screening cut-off values for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (according to EUCAST methodology).

Carbapenem	MIC (mg/L)		Disk diffusion zone diameter (mm) with 10 µg disks	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem ¹	≤2	>0.12	≥22	<25 ²
Imipenem ³	≤2	>1	≥22	<23
Ertapenem ⁴	≤0.5	>0.12	≥25	<25

¹Best balance of sensitivity and specificity

²In some cases zone diameters for OXA-48-producers are up to 26 mm, so <27 mm may be used as a screening cut-off in countries where OXA-48 is endemic, but at the expense of lower specificity.

³With imipenem, the separation between the wild-type and carbapenemase-producers is relatively poor. Imipenem is therefore not recommended for use as a stand-alone screening test compound.

⁴High sensitivity but low specificity, and therefore not recommended for routine use.

Et pourtant le CA-SFM 2015 ...

Il faut donc considérer comme SUSPECTE d'EPC toute souche de SENSIBILITE DIMINUEE (I/R) à au moins l'une des carbapénèmes. La détection des EPC par de simples tests phénotypiques n'est pas aisée car le niveau de résistance aux carbapénèmes est variable et peut parfois être à la limite du seuil de sensibilité. L'ertapénème est le carbapénème qui possède la meilleure sensibilité pour la détection des EPC. Ainsi, toute souche possédant une diminution de sensibilité à l'ertapénème [CMI > 0,5 mg/L ou un diamètre d'inhibition (disque 10 µg/ml) < 28 mm (CASFM-2013) ou < 25 mm (CASFM 2015)] par test de diffusion en gélose peut être soumise à l'algorithme de screening des souches productrices de carbapénémase (annexe 2).

Les souches suspectes d'EPC selon cet algorithme doivent être soumises à un test de confirmation de production de carbapénémase.

Parmi les tests de confirmation, le Hodge test (CASFM-2013) n'est plus recommandé car difficile à standardiser : présence de faux-positifs et de faux-négatifs. Parmi les autres tests de confirmations, actuellement disponibles certains, parmi lesquels des tests enzymatiques, peuvent présenter des problèmes de sensibilité (non détection des OXA-48-like qui sont les carbapénémases les plus fréquentes en France).

Donc la question est :

Comment confirmer une carbapénèmase ?

... obtenir **en 4 jours maximum** (temps de transfert de la souche inclus) l'identification du mécanisme de résistance de(s) souches suspectes d'être des BHRe.



La concurrence ...

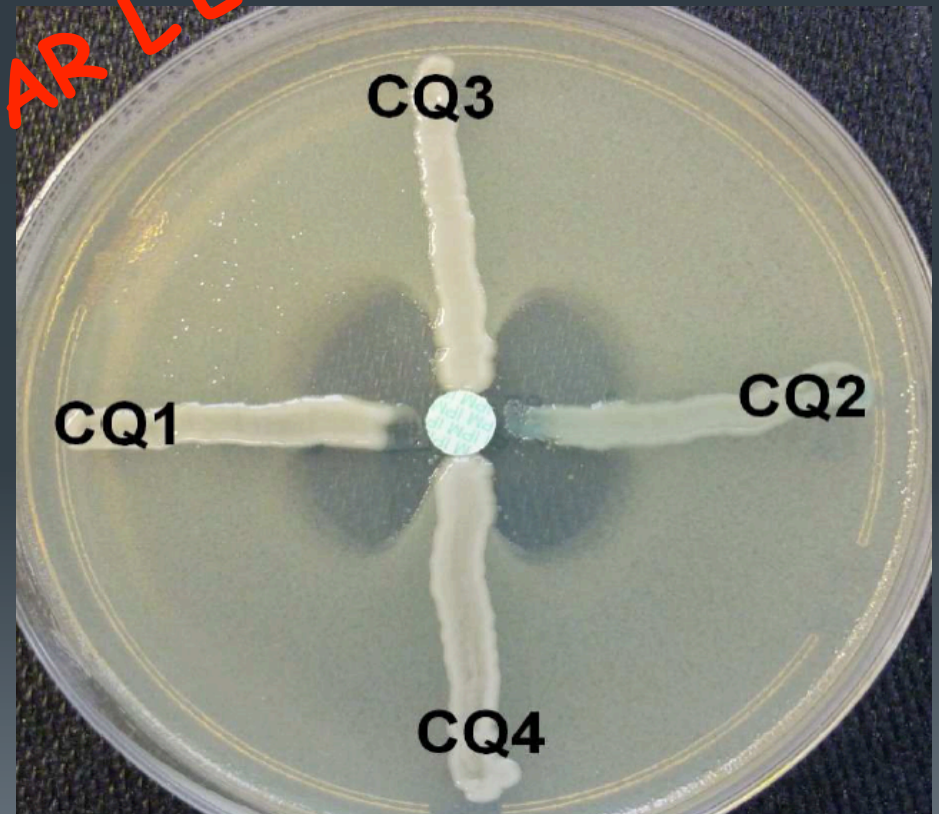
Méthodes phénotypiques : Hodge

CQ1 et CQ2 : absence de carbapénèmases

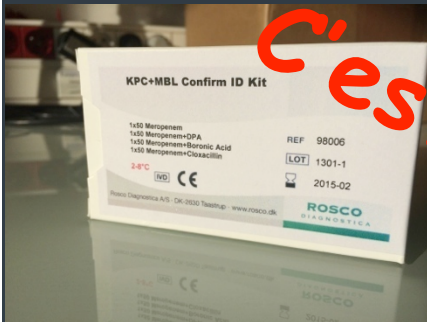
CQ3 et CQ4 : *K.pneumoniae* OXA-48

Mais :

- Manque de spécificité (faux positifs) :
association imperméabilité et Cased
association imperméabilité et BLSE
- Manque de sensibilité (faux négatifs) :
NDM et VIM

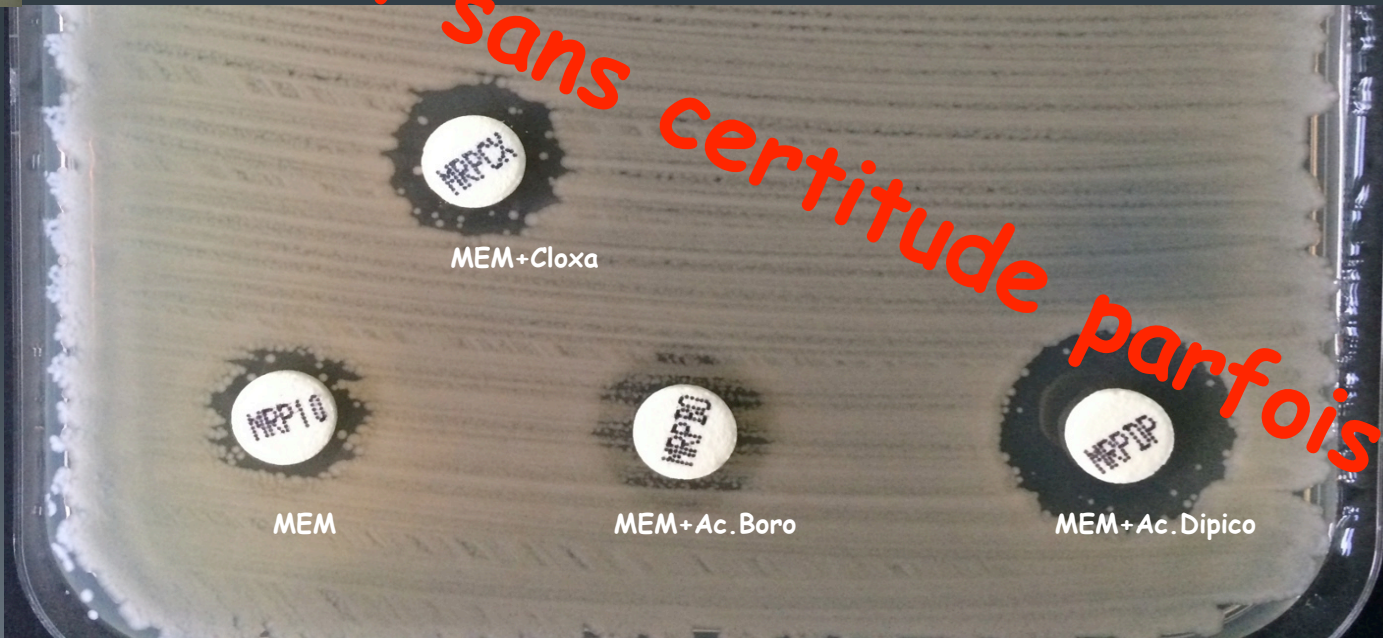


Méthodes phénotypiques : disques combinés



Disques Rosco ou Mast ou maison ...

C'est 24 h et sans certitude parfois !



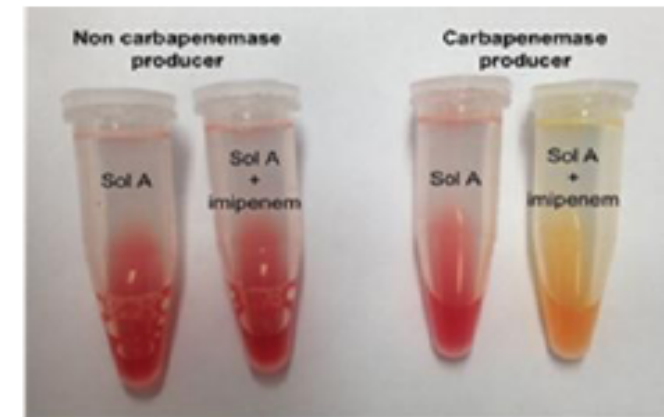
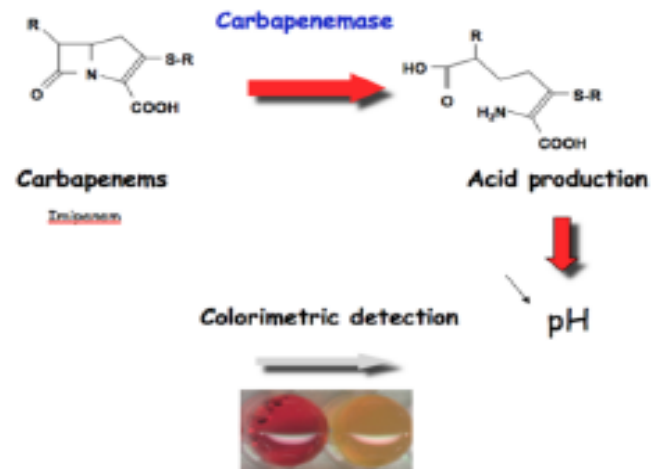
Classe B : MBL

Méthodes phénotypiques : Carba NP test

Rapid Detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

Patrice Nordmann, Laurent Poirel, and Laurent Dortet

To rapidly identify carbapenemase producers in Enterobacteriaceae, we developed the Carba NP test. The test uses isolated bacterial colonies and is based on in vitro hydrolysis of a carbapenem, imipenem. It was 100% sensitive and specific compared with molecular-based techniques. This rapid (<2 hours), inexpensive technique may be implemented in any laboratory.



OK

simple to use

rapidity (30 mins to 2 hours)

sensitivity

specificity

works with *P. aeruginosa*

Méthodes phénotypiques : Carba NP test ?

Antimicrobial Agents
and Chemotherapy

Strategy for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae

Laurent Dortet, Ludivine Bréchar, Gaëlle Cuzon, Laurence
Poirel and Patrice Nordmann
Antimicrob. Agents Chemother. 2014
10.1128/AAC.01239-13.
Published Ahead of Print 27 January 2014

que cela
Ouahhh !

OK	Not OK
simple to use	adjustment not obvious
rapidity (30 mins to 2 hours)	reagent preparation and stability
sensitivity	some weak reactions for OXA-48
specificity	need for an heavy inoculum
works with <i>P. aeruginosa</i>	impacts of isolation media

Est ce si facile

Complete gene identification ^a	+	-	-	+/-
---	---	---	---	-----

^a PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

^b The number of \$'s correlates with the effective (relative) price of the test.

^c The number of +'s correlates with the expertise and training needed to perform and interpret the test.

Méthodes phénotypiques : Rapidec Carba NP (bioMérieux)



Improvements *versus* Carba NP

ready-to-use kit, all reagents included

easy implementation

long shelf-life

calibrated inoculum

equivalent performance to Carba NP

quality control

Preliminary evaluation with 142 *Enterobacteriaceae* strains (bioMérieux unpublished data) :

- 87 CPE : 27 KPC, 20 OXA-48, 17 NDM, 13 VIM, 9 IMP, 1 GES
- 55 non-CPE

Sensitivity*	Specificity*	Non-determinable
99%	100%	1%

* *versus* genotype

Couteux et parfois pas facile de lire pour certaines carba

Méthodes de biologie moléculaire : PCRs

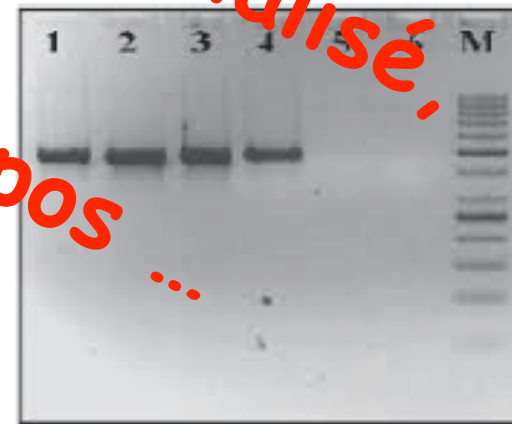
- PCR en temps réel :

- ex: Check-MDR Real Time PCR / GenExpert carbapenemase
- Détermine la présence ou non d'une carbapénémase +/- type
- 4,5 h
- Coût +++



- PCR spécifique +/- séquençage :

- OXA-48 like / KPC / VIM / IMP / NDM
- 3 à 5 h
- Expertise ++
- Coût +



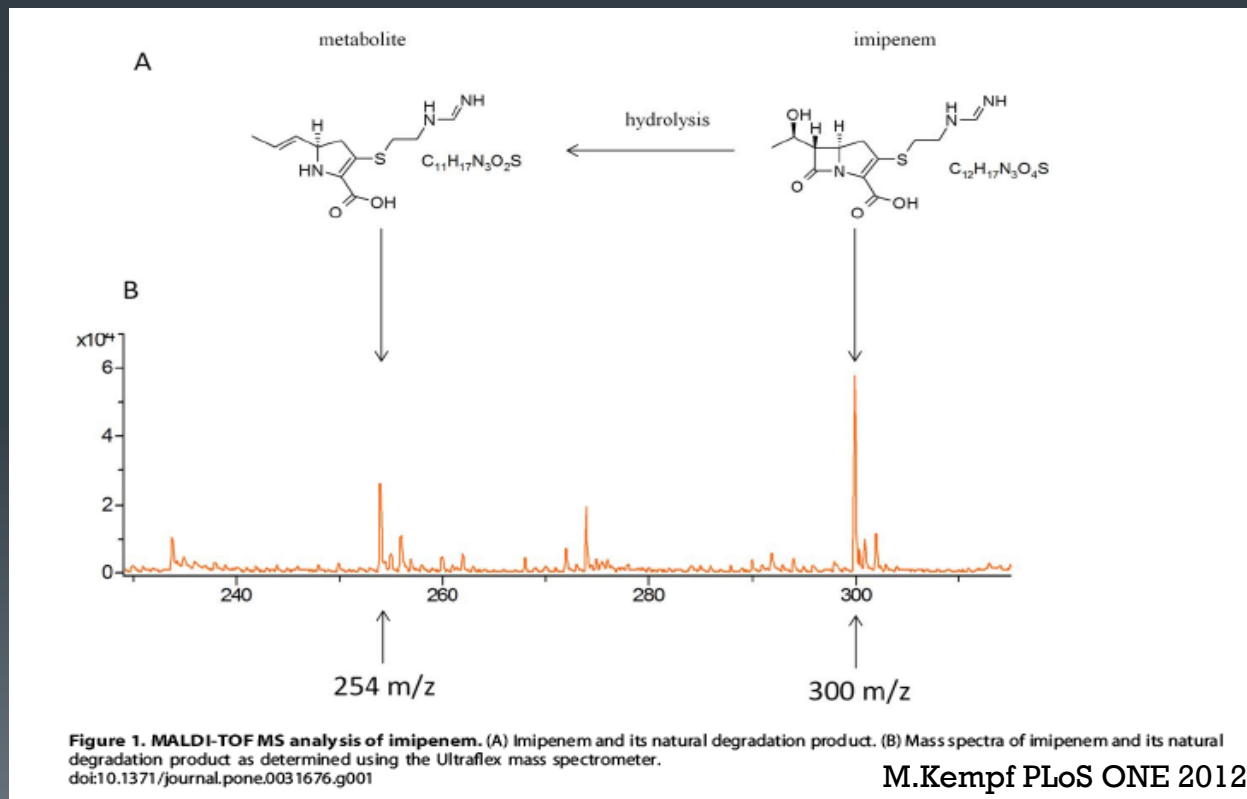
Couteux, Personnel spécialisé, Faux neg et Faux pos ...

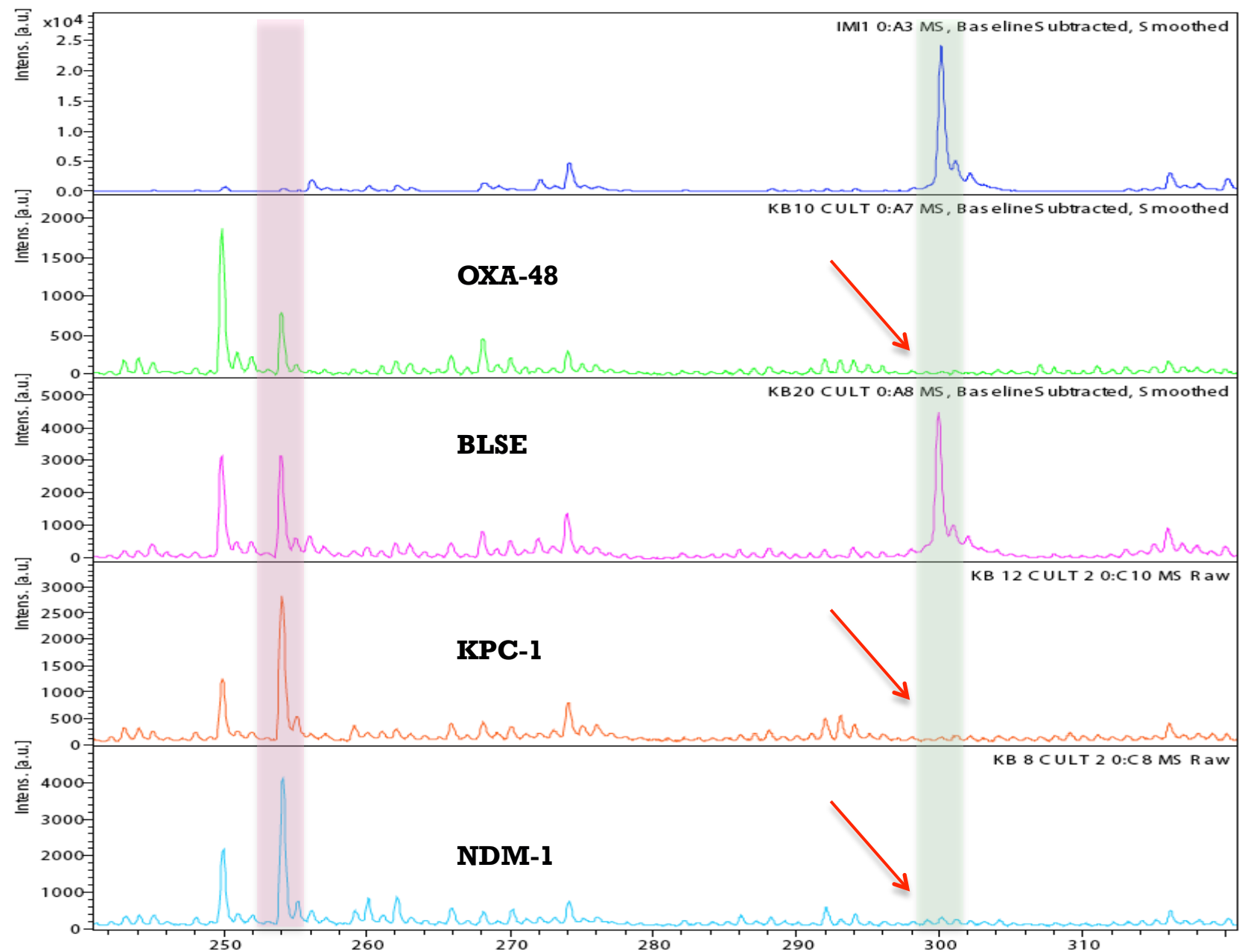


A nous maintenant ...

Le Maldi ToF

- Ce qu'on mesure : Ratio $I_{254} / I_{300} + I_{254}$





Le Maldi Tof



Efficient Detection of Carbapenemase Activity in *Enterobacteriaceae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes

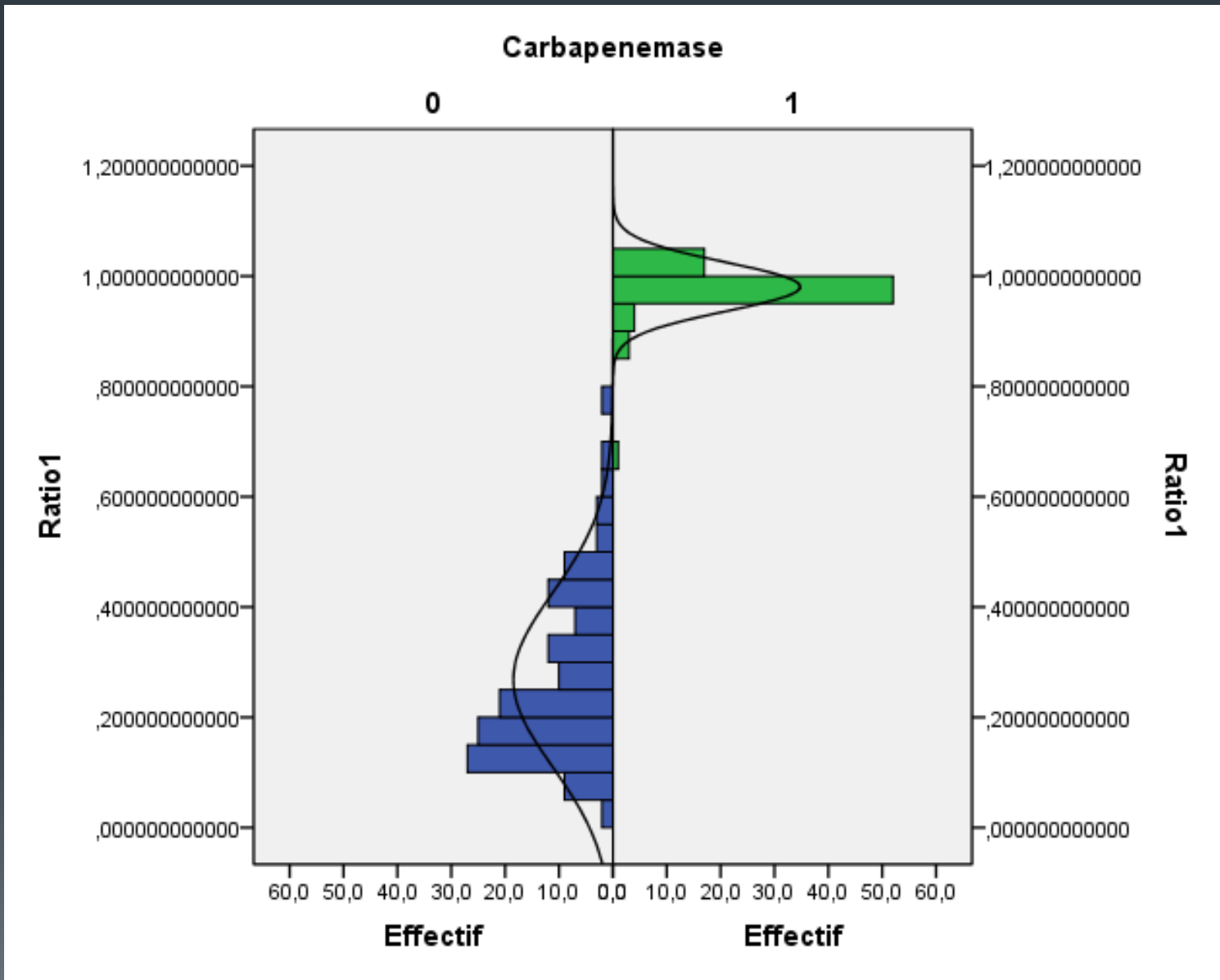
Camille Lasserre,^a Luc De Saint Martin,^b Gaëlle Cuzon,^c Pierre Bogaerts,^d Estelle Lamar,^a Youri Glupczynski,^d Thierry Naas,^c Didier Tandé^a

Service de Bactériologie, CHU La Cavale Blanche, Brest, France^a; Service de Médecine Interne, CHU La Cavale Blanche, Brest, France^b; Service de Bactériologie, APHP, LabEx LERMIT, University of Paris-Sud, Orsay, France^c; Laboratoire de Bactériologie, CHU Dinant-Godinne UCL Namur, Yvoir, Belgium^d

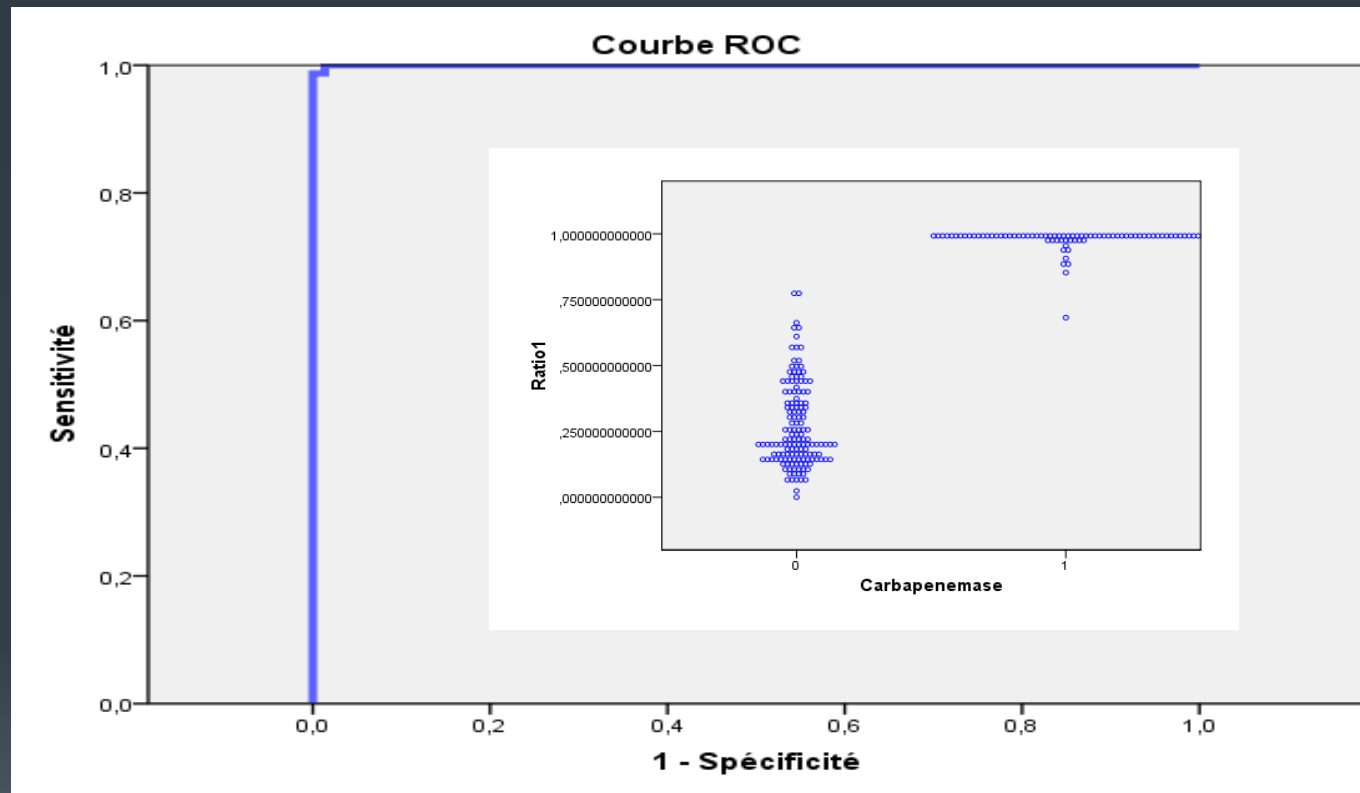
Synopsis



- ❑ Incubation 20 mn avec imipénème 0,5 mg/ml
- ❑ Tests : 223 souches d'entérobactéries
 - 146 CARB - dont :
 - ⇒ 24 BLSE, 103 Case, 10 Case+BLSE, 9 Imperméabilité
 - 77 CARB + dont :
 - ⇒ 52 OXA, 7 NDM, 4 VIM, 8 KPC, 3 IMI, 2 IMP, 1NmcA
- ❑ Etablissement d'un seuil pour le ratio $I_{254} / I_{300} + I_{254}$
- ❑ Validation sur 43 souches du CNR (25 EPC et 18 non EPC)



Analyse de la courbe ROC : indice de youden



seuil	Se	1 - Sp	Youden
,77415932438152	,987	,007	0,980
,81603243213329	,987	,000	0,987
,86501253883755	,974	,000	0,974



Analyse de la courbe ROC : indice de youden

➤ Seuil 0,82

- ✓ 146 non-EPC < seuil
- ✓ 76 EPC > seuil
- ✓ 1 OXA-204 à 0,68 < seuil

Répétabilité

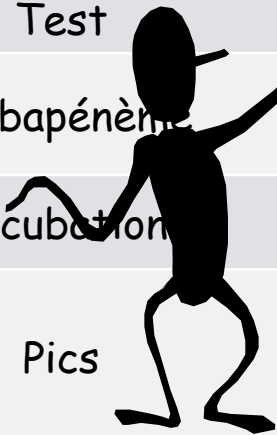
- 30 souches :
 - ✓ 15 EPC de toute classe
 - ✓ 15 non-EPC au hasard
- Testées 10 fois 10 jours de suite
 - ✓ *test de stabilité de l'imipénème*
- Calcul de la moyenne et de la DS
- Calcul du coefficient de corrélation intra classe : (ANOVA)
 - ✓ ICC : 0,98 (*intervalle de confiance 0,956-0,985*)

Validation externe

- 43 souches anonymes envoyées par le CNR Kremlin-Bicêtre
 - ✓ 25 EPC : 9 OXA-48, 9 KPC, 5 NDM, 2 OXA-181
 - ✓ 18 non-EPC : 12 AmpC, 4 AmpC+BLSE, 1 porine, 1 BLSE
- Testées en aveugle
- Levée de l'anonymat par le CNR
- Comparaison à la biologie moléculaire (KB) par Khi^2 : $R^2 = 1$
 - ✓ 25 EPC : ratio 0,83 - 1
 - ✓ 18 non-EPC : ratio 0,05 - 0,34
 - ✓ Se et Sp : 100%

Étude comparative 2015 en aveugle : 120 EPC + 55 non EPC

	Brest	Colmar	Bruker KB
Matériel Test	Biotyper (Bruker) maison	Vitek MS (bioMérieux) Maison	Biotyper (Bruker) STAR-BL CE IVD
Carbapénème	Imipénème 0.5mg/ml	Imipénème 0.5mg/ml	Imipénème 0.25mg/ml
Incubation	20 mn	2 h	30mn
Pics	Imipénème : 300 d Métabolite : 254 d	Imipénème : 300 d Métabolite+matrice : 489 d	Imipénème Standard (Réserpine)
Lecture	Ratio : M/M+I	Disparition IMII	Log (Standard/IMI)
Cut-off	≥ 0,82	100% de disparition	Pos > 0.4 / Neg < 0.2
ID bactérienne	Non	Non	Oui
Se	100%	97.5%	100%
Sp	100%	100%	92.7%





À partir des hémocultures

- Mais est ce vraiment utile à Brest ?
- A Regio de Calabre probablement ...
- A Athènes certainement !

BHRe sur Hémocultures

- 169/175 souches du CNR (souches du test de comparaison)
- phénotype connu : 115 Carba + et 54 Carba -
- Incubation 60 mn avec imipénème 0,5 mg/l

	Carba n = 115	Non Carba n = 54
test + I \geq 81	105	8**
test - I \geq 81	10*	46

Se : 91%

Sp : 85%

VPP : 93%

VPN : 82%

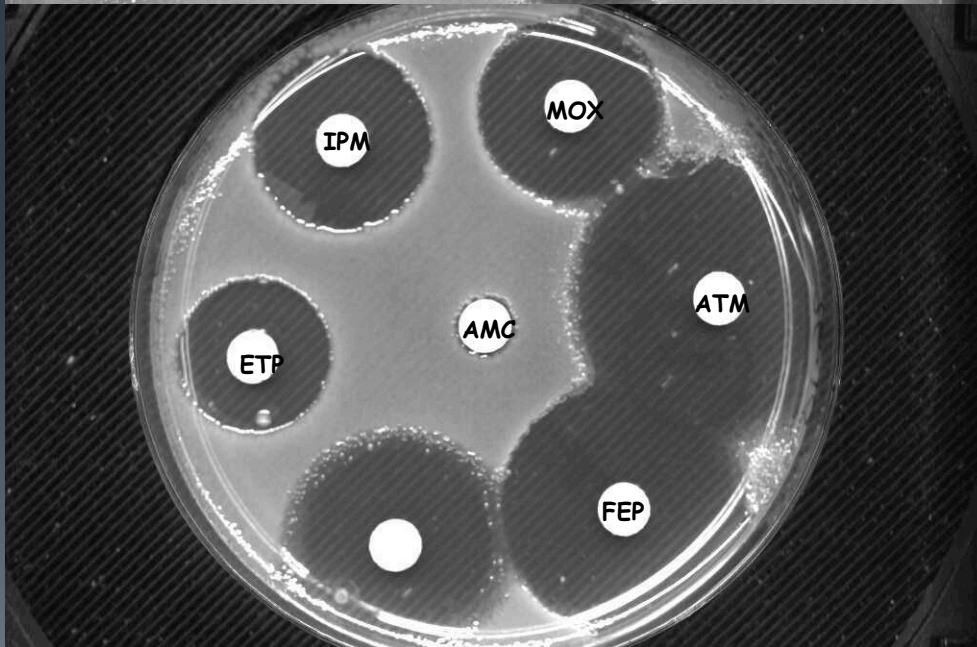
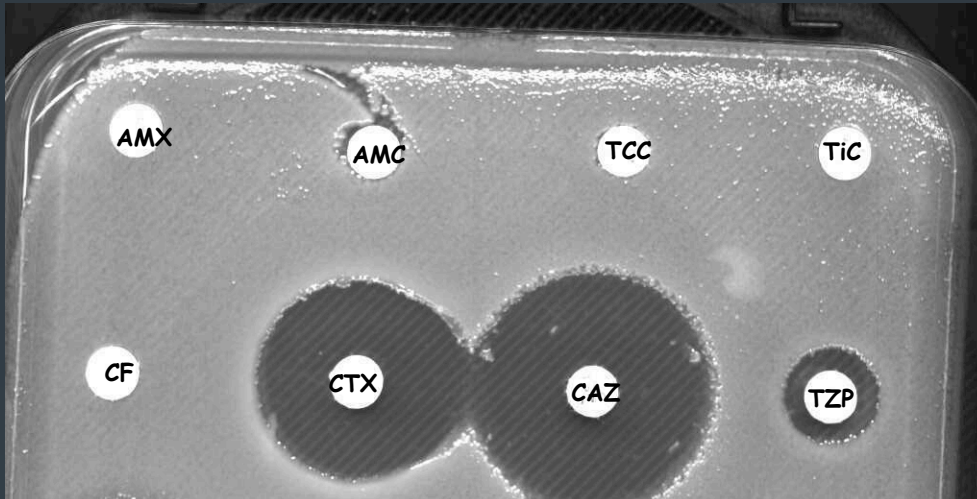
* FN : 1 NDM, 5 VIM, 4 OXA (48/181/232/244)

** FP : 5 Case H +++, 3 CTX-M-15+SHV-11

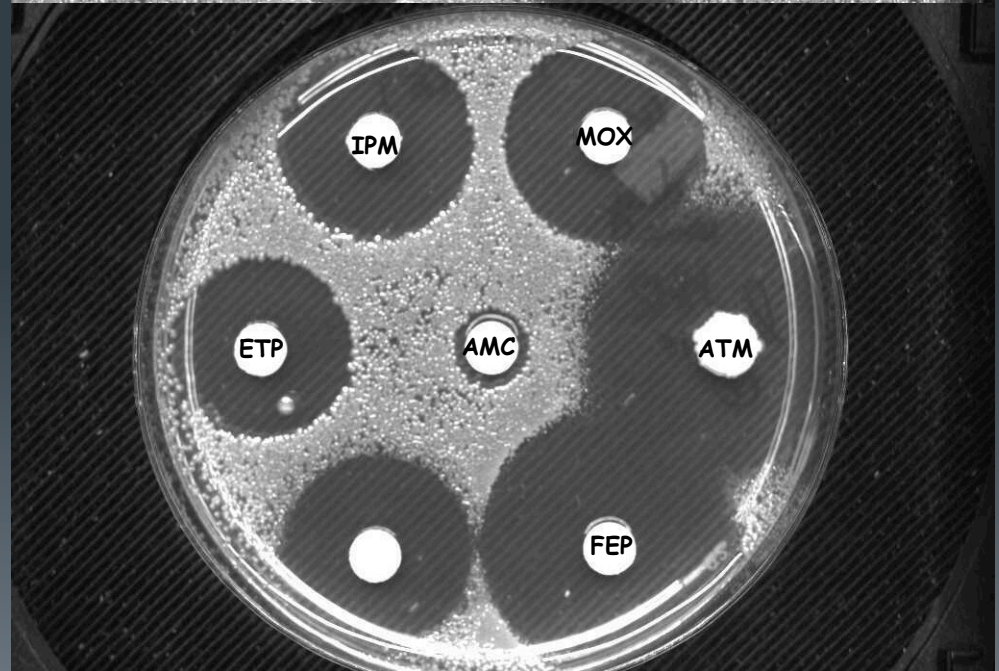
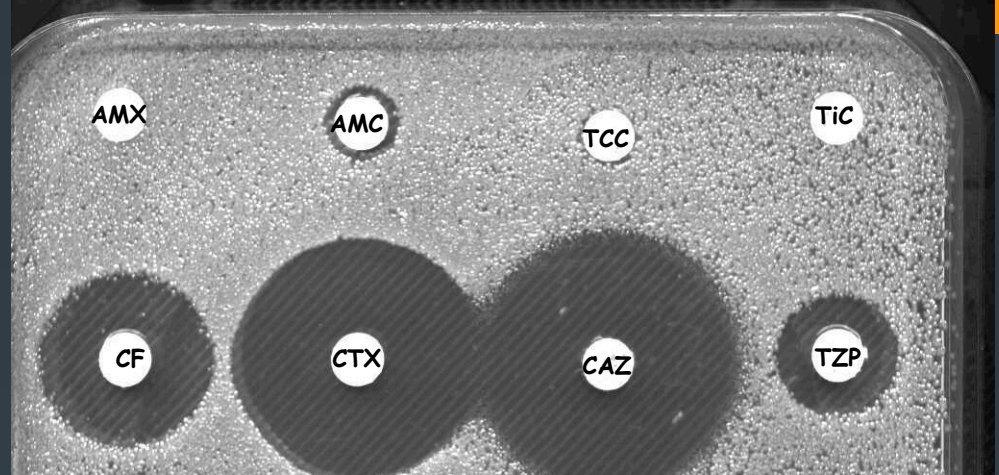


Retour rapide sur investissement !

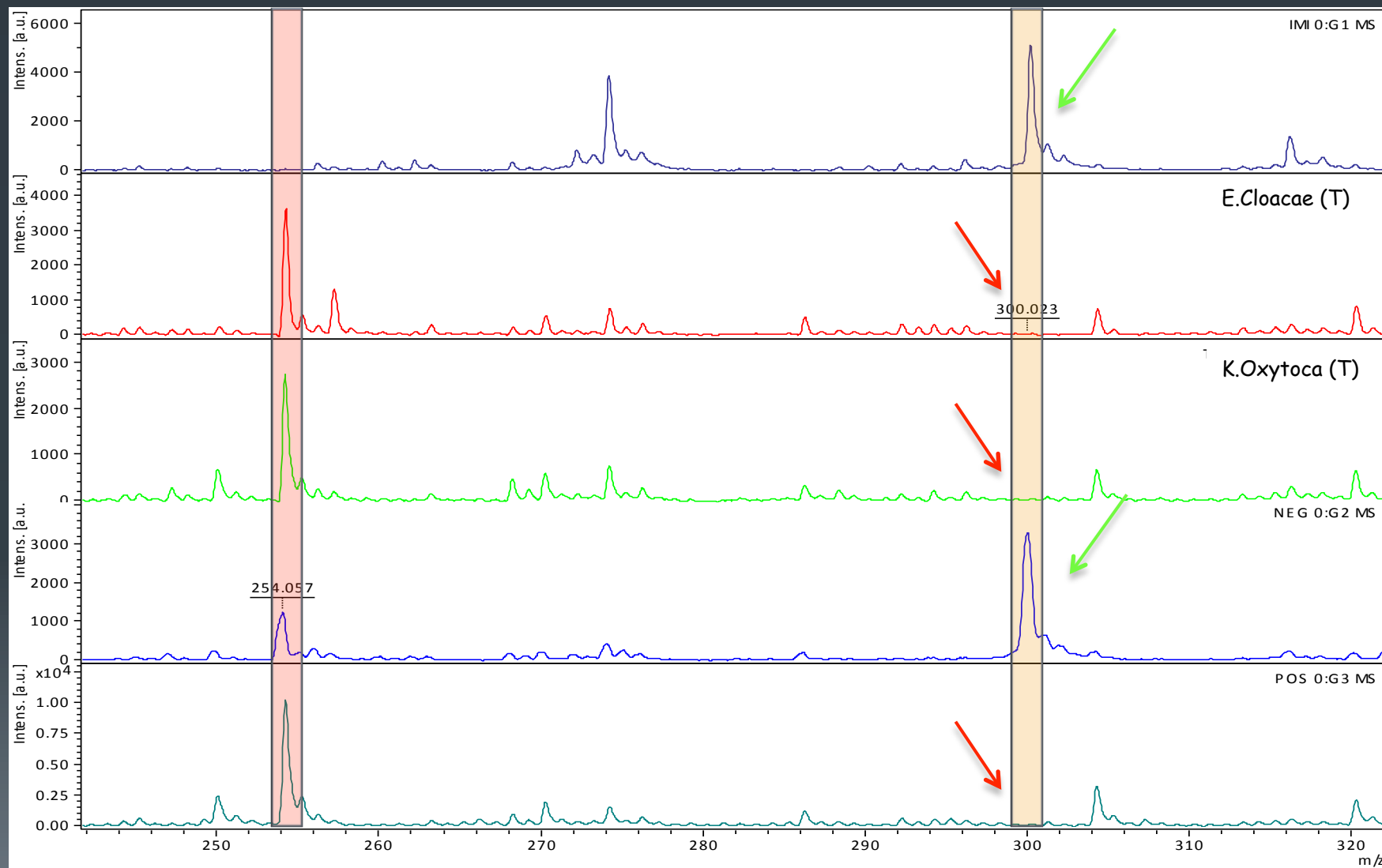
Le 22 10 13
E.cloacae Mr T



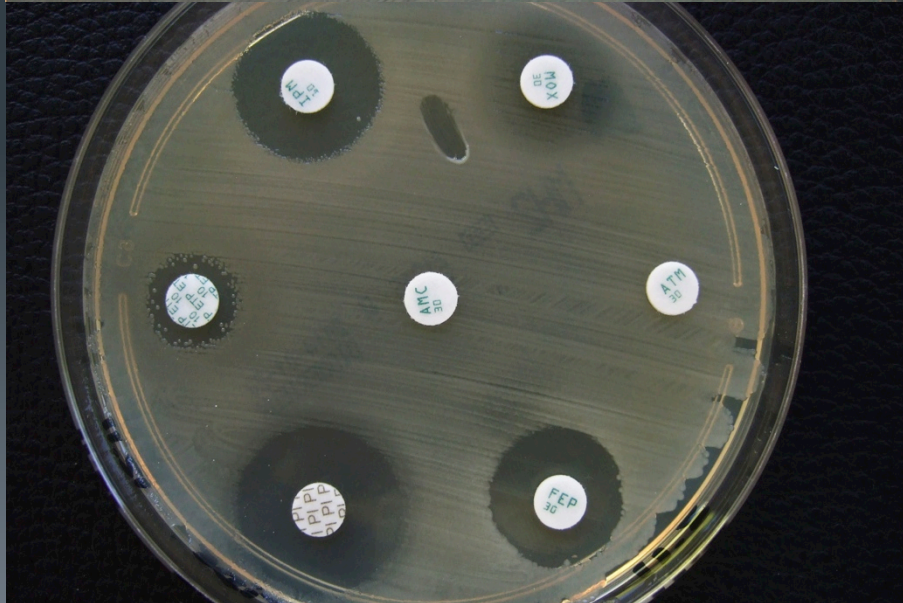
Le 03 11 13
K.oxytoca Mr T



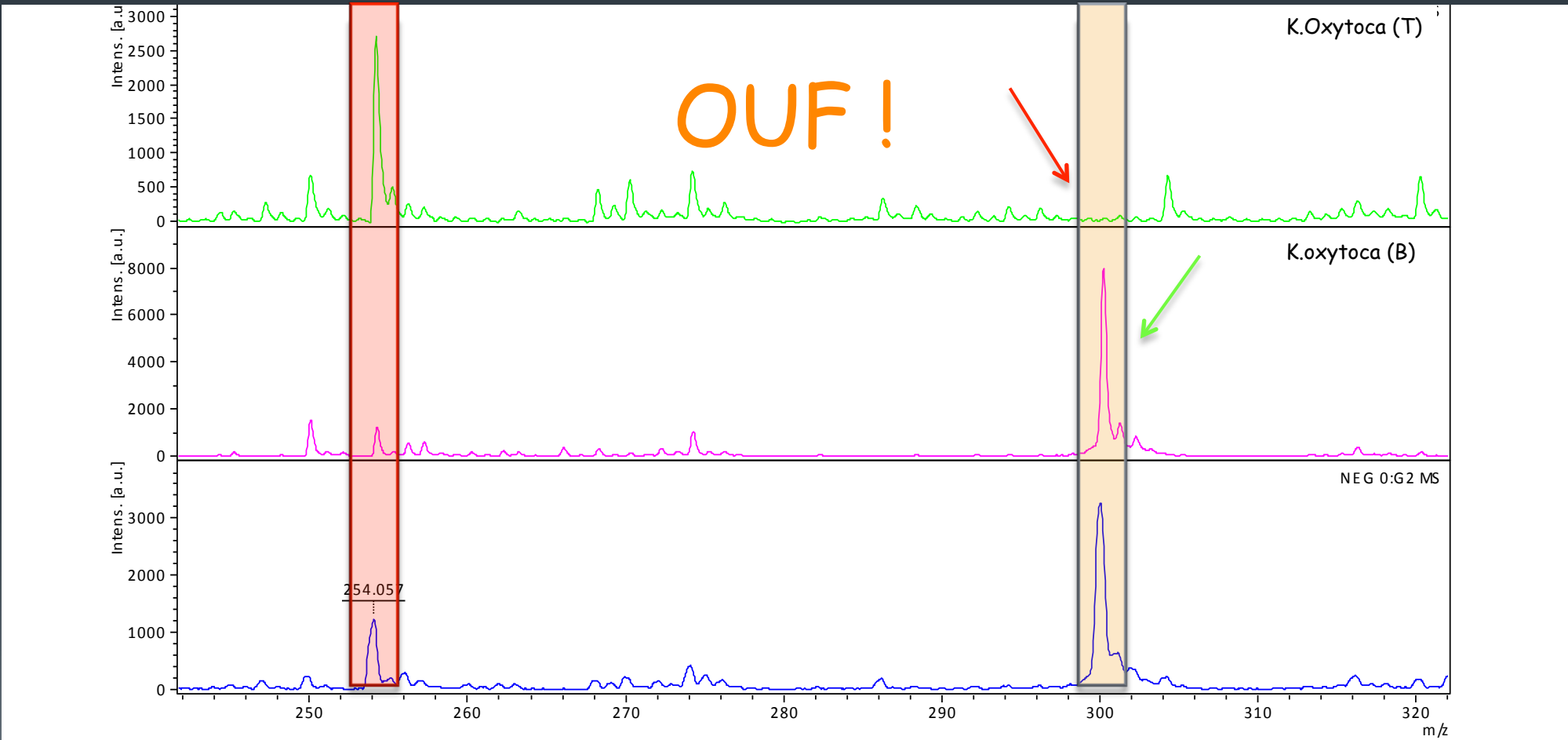
Une solution rapide, efficace et pas chère !



Le 05 11 13 Panique à bord ...



- Un coup de MALDI bien sur ...



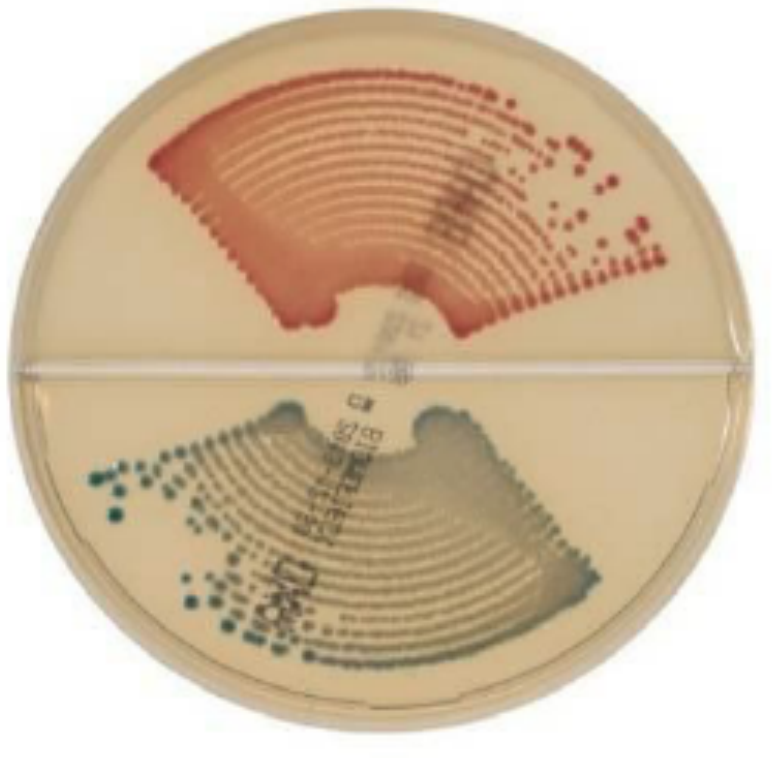
Quels milieux pour le dépistage ?

TABLE 2 Sensitivity and specificity of Supercarba, ChromID ESBL, and CHROMagar KPC media

Sensitivity or specificity	Value for sensitivity (%) or specificity (%) on the following medium:			CRE Brilliance	CARBA SMART chromID
	Supercarba	ChromID ESBL	CHROMagar KPC		
Sensitivity	95.6	87.7	40.3	76.3	98,4
Specificity	82.2	24.2	85.5	57.1	67,5
Sensitivity for Ambler class of carbapenemase ^a					
Class A	100	100	66.7	85	90
Class B	90	98	55.8	78.4	
Class D	100	70	13.6	69.8	96,5

^a Sensitivity was determined for each Ambler class of carbapenemase: class A carbapenemases are of the KPC type, class B carbapenemases are of the VIM, IMP, and NDM types, whereas class D carbapenemases are of the OXA-48 type.

À partir du milieu sélectif



- Identification au Maldi
- Résistance en 20 mn
- Téléphoné à 21 mn !
- Hygiéniste au combat à 22 mn



- Transmission au **Centre National de Référence** ou au centre local disposant des outils pour répondre sur les mécanismes
- Les techniques de **biologie moléculaire** restent les seules Gold standard pour l'identification des enzymes

Notre méthode semble mûre...

- pour une somme Modique
- elle est Utile
- elle est Rapide
- elle est Efficace



Name First name

Function - Country

MALDI Biotyper

The Market Leading Microbiology
Mass Spectrometry System

www.bruker.com

MBT STAR-BL

60 Tours 2016

MBT STAR-BL

Automated processing and calculation



Diapo de Peio Mogabure

- After spectra acquisition, processing and recalibration, **defined mass ranges** corresponding to the **non-hydrolyzed** and the **hydrolyzed** forms of the respective **antibiotic** are searched for signal peaks
- The **intensities** of the peak maxima are used to calculate the logRQ value (a measure of hydrolysis efficiency)
- The **logRQ value** is the logarithm of the ratio of the summed intensity of hydrolyzed forms to the summed intensity of non-hydrolyzed forms. Higher logRQ values indicate a higher degree of antibiotic hydrolysis.

$$\log RQ = \log \frac{\Sigma \text{intensities}_{\text{hydrolyzed}}}{\Sigma \text{intensities}_{\text{non-hydrolyzed}}}$$

MBT STAR-BL

Automated processing and calculation



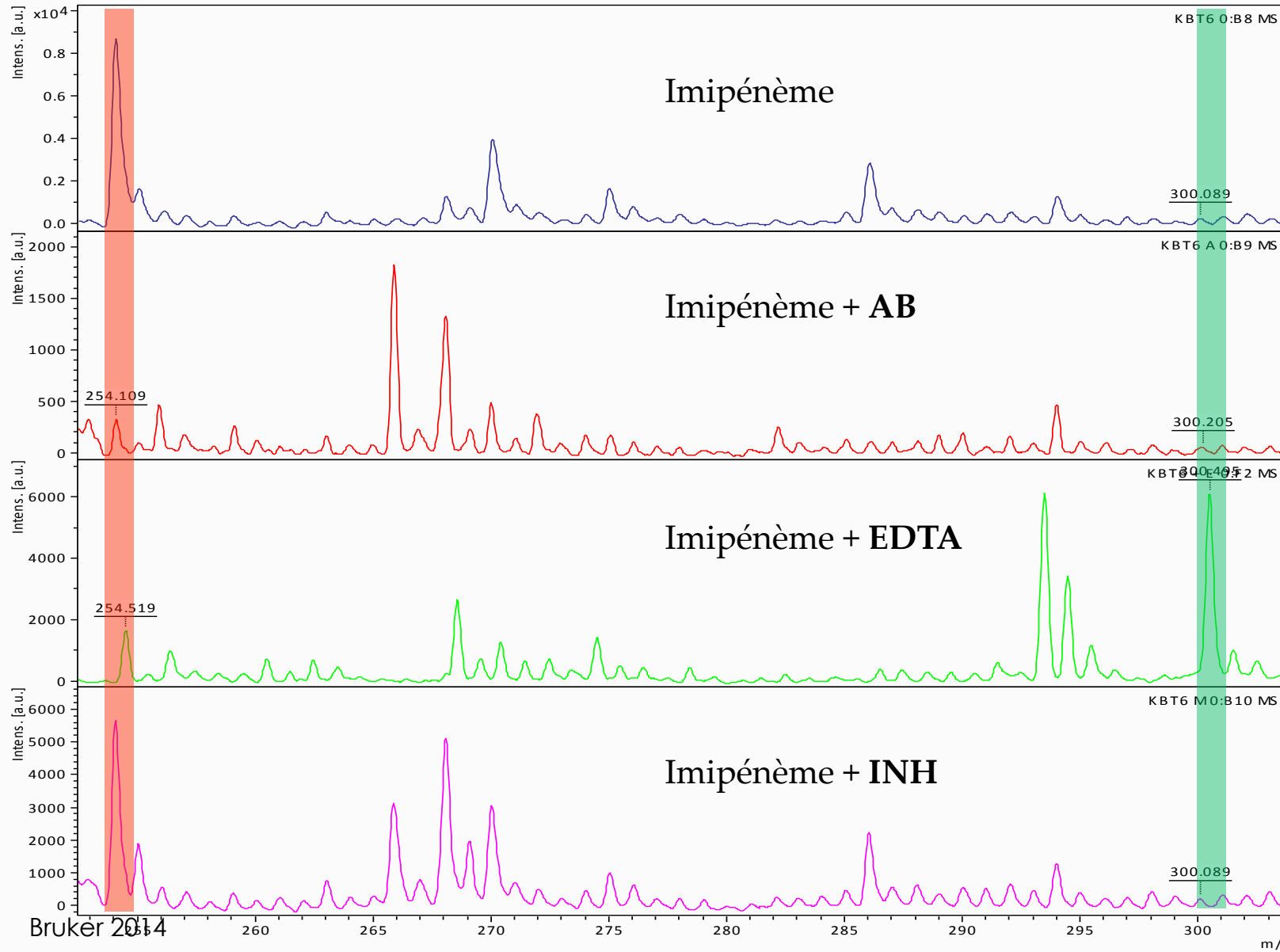
Diapo de Peio Mogabure



#	Run	Sample	Species	ID Control	IMI
		neg. control		not performed	● -0.13
		pos. control		not performed	● 1.13
1	150428-1442-ID-CONTROL-101456	1	Klebsiella pneumoniae	not performed	● -0.14
2	150428-1442-ID-CONTROL-101456	2	Klebsiella pneumoniae	not performed	● 0.94

Hydrolyzed
Non-hydrolyzed

E. coli KTB6



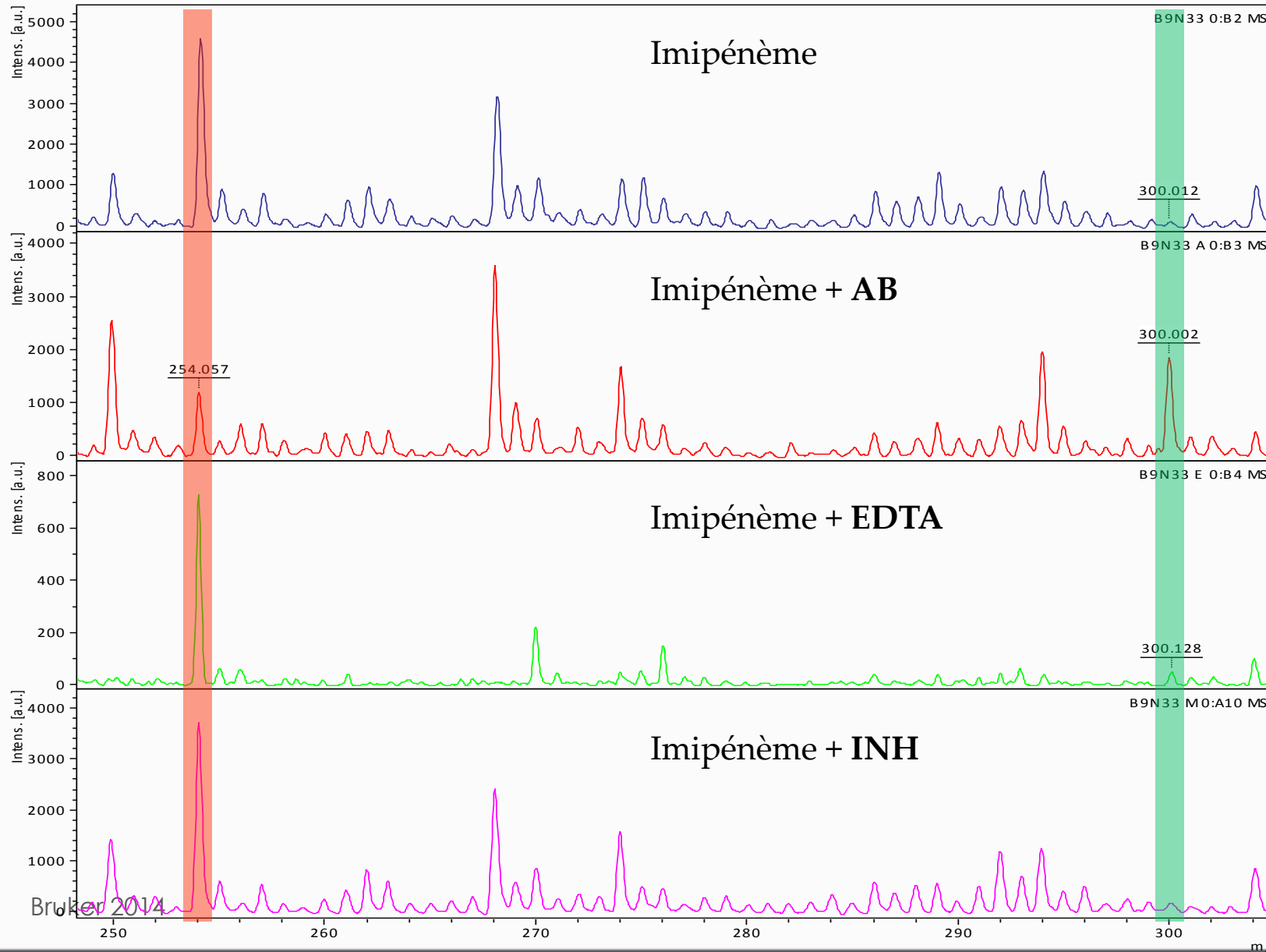
→ NDM-1

I = 11%

I = 76%

I = 1%

Kpneumoniae B9N33



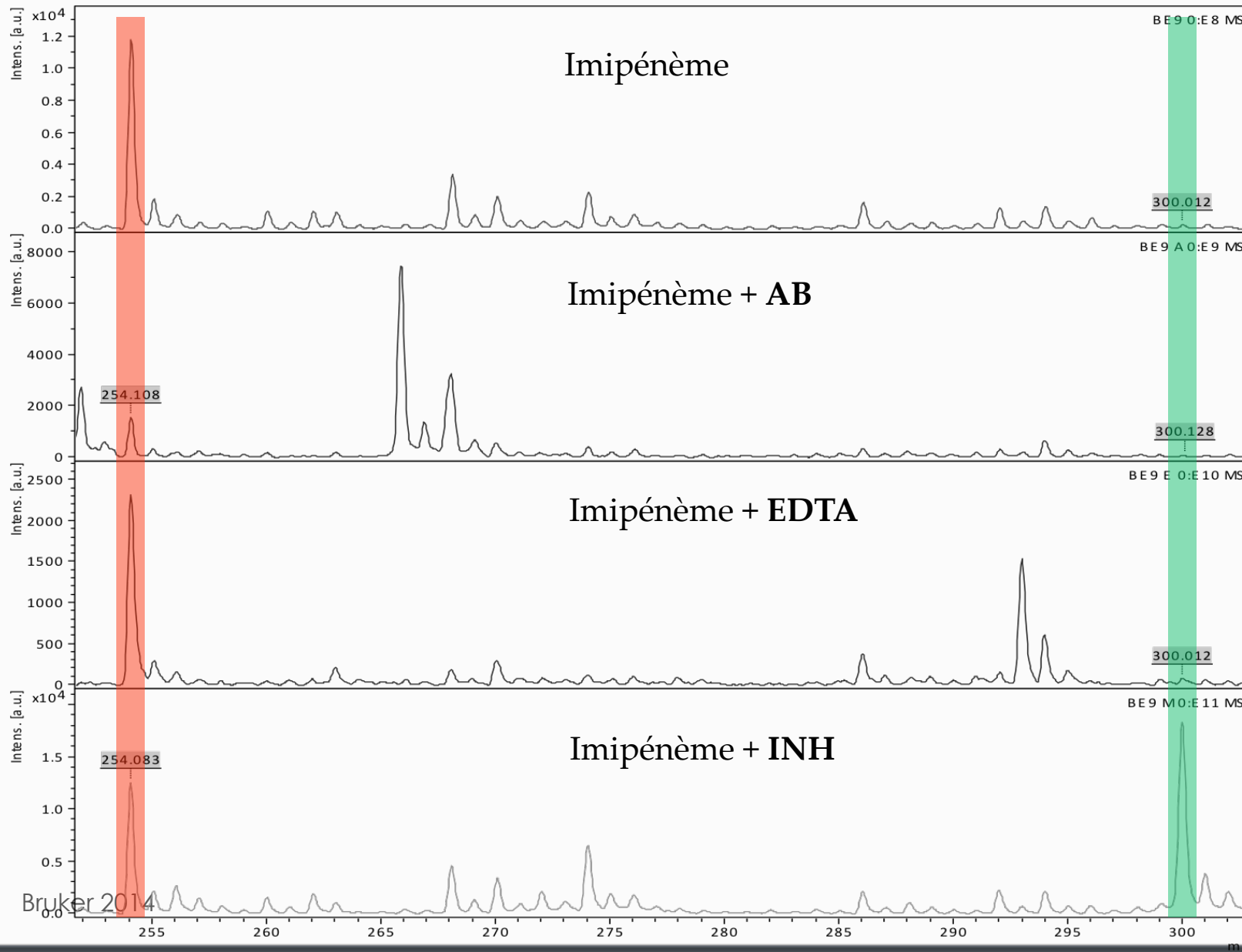
→ **KPC-2**

I = 60%

I = 5%

I = 1%

K.pneumoniae Be9



→ OXA-48

1% = 1%

1% = 1%

1% = 59%

N'oublions pas les SARM ...

- Détection de clones ?
- Caractérisation de pics spécifiques ?
- Identification Maldi + test SARM ?
- Applications
 - ✓ Colonies
 - ✓ Hémocultures
 - ✓ Dépistages
- Intérêts ?



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio



The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci[☆]

Daniel D. Rhoads^{*}, Hannah Wang, James Karichu, Sandra S. Richter



- Pic à 2415 d correspondant à la PSM-mec protéine (phenol soluble moduline)
- 12 souches test de *S.aureus* : USA 100 à USA 1200
- Pic positif : USA 100, 200, 600 possédant un gène *mec* de classe A
- Test sur les hémocultures à *S.a* après culture :
 - $Sp = 100\%$ et $Se = 39\%$!
- Question : combien avons nous de ces clones ?

Rapid Detection of Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry

Cheryl A. Mather,^{a,d*} Brian J. Werth,^b Shobini Sivagnanam,^c Dhruva J. SenGupta,^a Susan M. Butler-Wu^{a*}

Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA^a; Department of Pharmacy, University of Washington School of Pharmacy, Seattle, Washington, USA^b; Vaccine and Infectious Disease Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA^c; Department of Anatomic Pathology, University of Washington, Seattle, Washington, USA^d

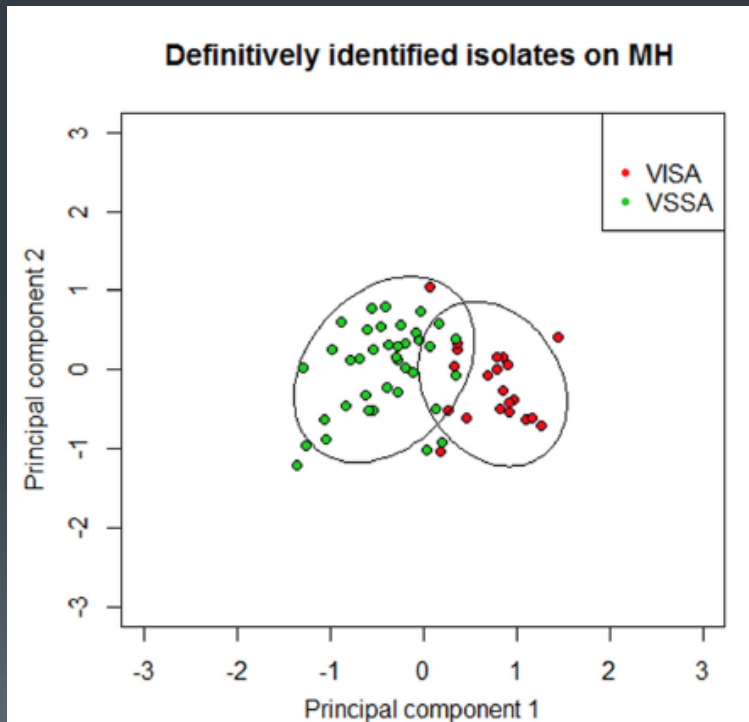


FIG 2 PCA of VISA and VSSA isolates definitively identified on MH agar. PCA of 21 VISA and 38 VSSA isolates with reproducible phenotypes separated by using the 14 peaks identified by forward stepwise multiple regression was performed. Ellipses denote the 90% confidence intervals around the groups.

- identified 60 peaks that were present in 75% of a given group with an intragroup CV of 50%.
- 14 peaks that optimally separated VISA from VSSA (VISA-versus-VSSA SVM) provided 100% separation of VISA and VSSA isolates
- correct identification of 76% of the hVISA isolates, 100% of the VISA isolates and 89% of the VSSA isolates, for an overall classification accuracy of 89% (71/80)
- With an estimated hVISA prevalence of 5% and an estimated VISA prevalence of 1%, the algorithm we developed would result in a NPV of 98.6% and a PPV of 31.8%.

Evaluation of combined use of MALDI-TOF and Xpert[®] MRSA/SA BC assay for the direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles



María Pilar Romero-Gómez*
Marta Muñoz-Velez
Rosa Gómez-Gil
Jesús Mingorance

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Paseo de La Castellana, 261, Madrid 28046, Spain

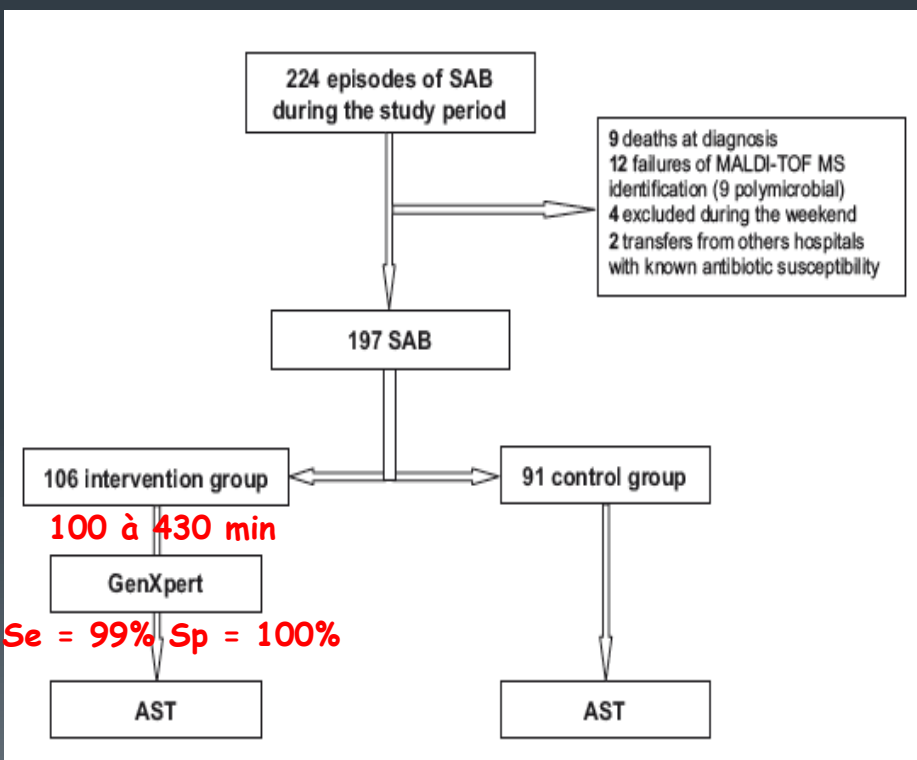
- Utilisation séquentielle du Maldi-Tof Bruker et du GeneXpert
- Identification en 2 à 3 h sur le Maldi
- GeneXpert sur les positif et résultat en 1 h
 - 66 SASM correctement détectés
 - 24/25 SARM correctement détectés (1 souche mecA + / SSCmec -)

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR-based rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia

Clin Microbiol Infect 2014; 20: 355–360

O. Clerc¹, G. Prod'hom², L. Senn^{1,3}, K. Jaton², G. Zanetti^{1,3}, T. Calandra¹ and G. Greub^{1,2}

1) Infectious Diseases Service, 2) Institute of Microbiology and 3) Hospital Preventive Medicine Service, University Hospital Centre and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland



	Intervention n = 106		Control n = 91	
	MRSA	MSSA	MRSA	MSSA
Empirical anti-MRSA tx, all	22/24 (91.7)	14/82 (17.1)*	18/19 (94.7)	21/72 (29.2)*
Empirical anti-MRSA tx, without PA	20/22 (90.9)	6/74 (8.1)**	16/17 (94.1)	18/69 (26.1)**

Data are n (%). MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; PA, penicillin allergy; Tx, treatment.
*p 0.09, **p 0.01 (Fisher's exact test).
Empirical anti-MRSA treatment = prescription of glycopeptides or daptomycin.

8 allergies BL !

- 2 patients avec SARM non traités → changement
- 5 patients avec SASM avec anti SARM → changement

Complementary use of MALDI-TOF MS and real-time PCR–melt curve analysis for rapid identification of methicillin-resistant staphylococci and VRE

Wai-Sing Chan¹, Tsz-Ming Chan¹, Tsz-Wan Lai¹, Jasper Fuk-Woo Chan², Raymond Wai-Man Lai³, Christopher Koon-Chi Lai⁴ and Bone Siu-Fai Tang^{1*}

Colonies	<i>S.aureus</i>	n = 77	100%
	Entérocoques	n = 47	
Hémocultures	Entérocoques	n = 16	97,5%
	<i>S.aureus</i>	n = 40	

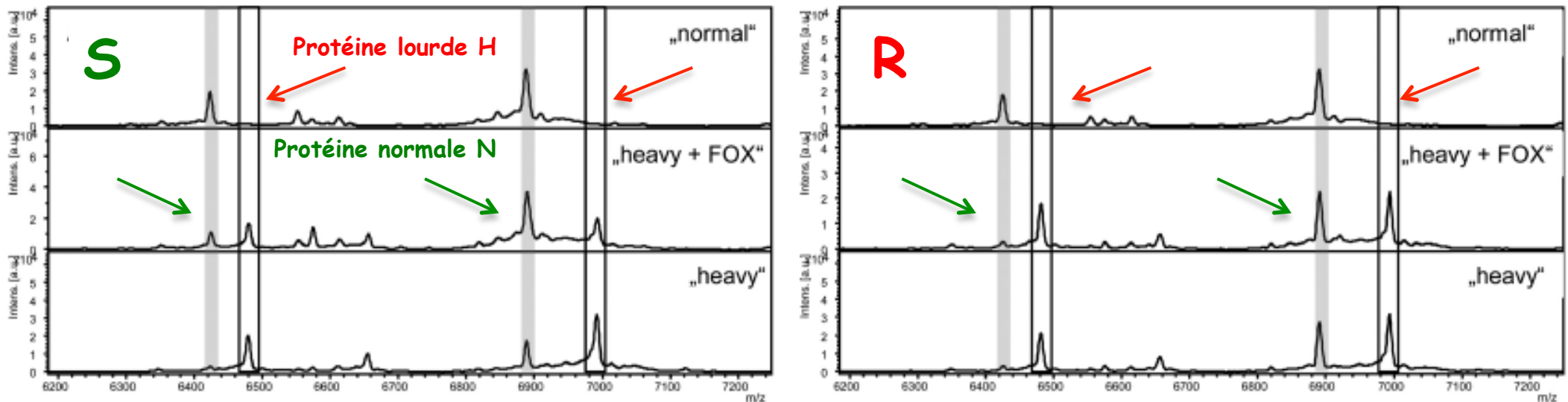
Results: The results revealed 100% concordance with antibiotic susceptibility testing or other reference methods for all culture isolates and enterococcal blood cultures. The percentage of concordance for staphylococcal blood cultures was 97.5%.

Conclusions: The method described herein was fast, economical, reliable and capable of detecting *meCA*_{LG251}, *vanB1* and *vanB2* genotypes, which are not included in most commercial assays. Large-scale screening is required to further test the performance of this protocol, especially for genotypes that are infrequently encountered.

MALDI Biotyper-Based Rapid Resistance Detection by Stable-Isotope Labeling

Katrin Sparbier,^a Christoph Lange,^a Jette Jung,^b Andreas Wieser,^b Sören Schubert,^b Markus Kostrzewa^a

BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany^a; Max von Pettenkofer-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany^b



- Incubation 3h puis passage au Maldi
- Ratio H/N des intensités pour les différents spectres très différents

MALDI-TOF MS typing of a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a neonatal intensive care unit.

Steensels D¹, Deplano A², Denis O², Simon A¹, Verroken A^{1,3}.

- In this study, we aimed to challenge matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) as a **typing tool of a nosocomial MRSA outbreak** in a neonatal intensive care unit
- Typing analysis by MALDI-TOF MS included mean spectrum profiles and subsequent dendrogram creation using BioNumerics software. Results were compared with *spa* typing and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).
- Results : Our study showed **good concordance (93%) between PFGE, *spa* typing, and MALDI-TOF MS** for the outbreak-related MRSA strains. MALDI-TOF MS typing showed excellent typeability and discriminatory power but **showed poor reproducibility**.

CONCLUSIONS: This study is one of the first to document the potential usefulness of MALDI-TOF MS with standardized data analysis as a typing tool for investigating a nosocomial MRSA outbreak. A concordance of 93% compared to reference typing techniques was observed. However, because of poor reproducibility, long-term follow-up of prospective isolated strains is not practical for routine use. Further studies are needed to confirm our observations.



In effect, the value of
microbiologic data is often inversely proportional
to the time interval necessary for its generation

Staneck JL (1985)

ce que



ore faire

merci

Camille Lasserre
Thierry Naas
Peio Mogabure
Gaelle Cuzon
Marie Kempf
Katrin Sparbier
Lénaig Tandé