

Identification par MALDI-TOF MS et antibiogramme directement à partir de bouillons

Tré-Hardy Marie, Lambert Barbara, Despas Noémie, Bressant Florian, Laurenzano
Clémentine, Rodriguez-Villalobos Hector, Verroken Alexia

Despas Noémie
Assistante Phn Biologiste - Microbiologie



Cliniques universitaires
SAINT-LUC
UCL BRUXELLES



Introduction

Routine - CUSL

Matériels et Méthodes

Objectifs

Résultats

Cas pratique

Littérature

Conclusion

Intérêt des bouillons d

REAGENTS

BD Tryptic Soy Broth

Formula** Per Liter Purified Water

Bacto™ Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17.0 g
Bacto Soytone (Peptic Digest of Soybean Meal)	3.0
Glucose (=Dextrose)	2.5
Sodium Chloride	5.0
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2.5

pH 7.3 ± 0.2

**Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

Stimule la croissance

Permet la détection

Faible quantité de bactéries

Bactéries réprimées par antibiotiques





Introduction

Routine - CUSL

Matériels et Méthodes

Objectifs

Résultats

Cas pratique

Littérature

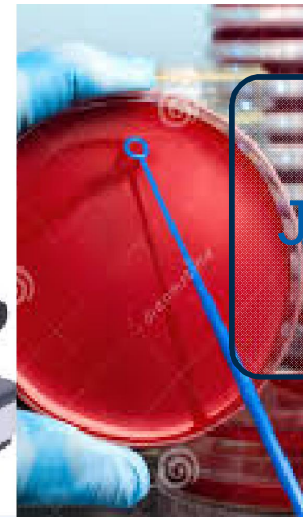
Conclusion

Tissu stérile et LCR



J0

TSB trouble → Positif



J1 → J7

Culture positive



+
24h

A l'heure actuelle, une étape

Lecture antibiogramme



+
48h



Est-il possible de gagner 24H en sautant l'étape de la culture solide ?

Peut-on directement réaliser l'ID et l'antibiogramme à partir d'un bouillon d'enrichissement positif ?





Introduction

Routine - CUSL

Matériels et Méthodes

Objectifs

Résultats

Cas pratique

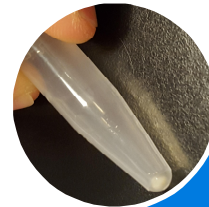
Littérature

Conclusion

Identification par MALDI-TOF MS



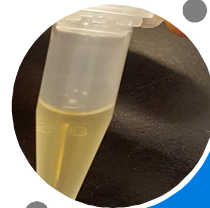
MALDI-TOF MS
(Acide formique + Matrice)



Qulot



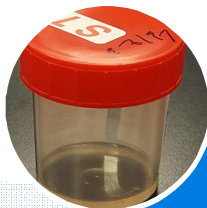
Centrifugation
(13 000 rpm; 2min)



1 ml de bouillon
(Quand TSB positif)



Mise en culture dans TSB



Echantillon





Tryptone Soya Broth
(Oxoid, Thermo scientific, Dardilly, France)
Rehydraté selon les recommandations du constructeur

Maldi-TOF MS

MicroFlex LT platform (Bruker, Daltonik, Bremen, Germany).

Spectre d Biotyper 3.0,
database 3.1.2.

Score d cut-off prédéfini de 1.8 pour une
identification acceptable jusqu



Test de sensibilité



Culot de
centrifugation



0,5 McFarland



Diffusion
(Bio-Rad, Marnes-la-
Coquette, France)



Antibiogramme
automatisé
(Phoenix, Becton
Dickinson, Franklin
Lakes, NJ, USA)



Antifongogramme
(Neo-Sensitabs, Rosco
Diagnostics, Taastrup,
Denmark)



Lecture après 18h (Bactéries) ou
24h (Champignons) selon les
règles de l'





Introduction

Routine - CUSL

Matériels et Méthodes

Objectifs

Résultats

Cas pratique

Littérature

Conclusion

1^{er} objectif :
Validation de la
procédure
Bouillons négatifs,
Bouillons spikés avec
souches de référence

2^{ème} objectif :
Validation des
performances sur
échantillons
cliniques
Juin 2016 → Mai 2017





Introduction

Routine - CUSL

Matériels et Méthodes

Objectifs

Résultats

Cas pratique

Littérature

Conclusion

1^{er} objectif :
Validation de la
procédure
Bouillons négatifs,
Bouillons spikés avec
souches de référence

2^{ème} objectif :
Validation des
performances sur
échantillons
cliniques
Jun 2016 → Mai 2017



14 Souches de référence

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35146

Haemophilus influenzae ATCC 8468

Klebsiella pneumoniae (ref strain)

Enterobacter cloacae NCTC 13406

Enterococcus faecium (ref strain)

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Staphylococcus epidermidis (ref strain)

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Streptococcus agalactiae ATCC 23880

Candida albicans ATCC 9559

Candida krusei ATCC 6258

+ 5 X

Négatifs

En triplicat



2 minutes

Identification
par
MALDI-TOF MS

MALDI-TOFMS
(Acide formique + Matrice)

Qulot

Centrifugation
(13 000 rpm)

1 ml de bouillon
(S TSB positif)

e dans TSB

4 minutes

Echantillon

Résultats Identification

Souches de référence



100 %
Identification
par
MALDI-TOF MS
(14/ 14)

Bouillons négatifs



100 %
Absence
d
par
MALDI-TOF MS
(15/ 15)

2 min ⇔ 4 min

→ Choix de la procédure « 2 min de centrifugation »
par facilité



Résultats Test de sensibilité

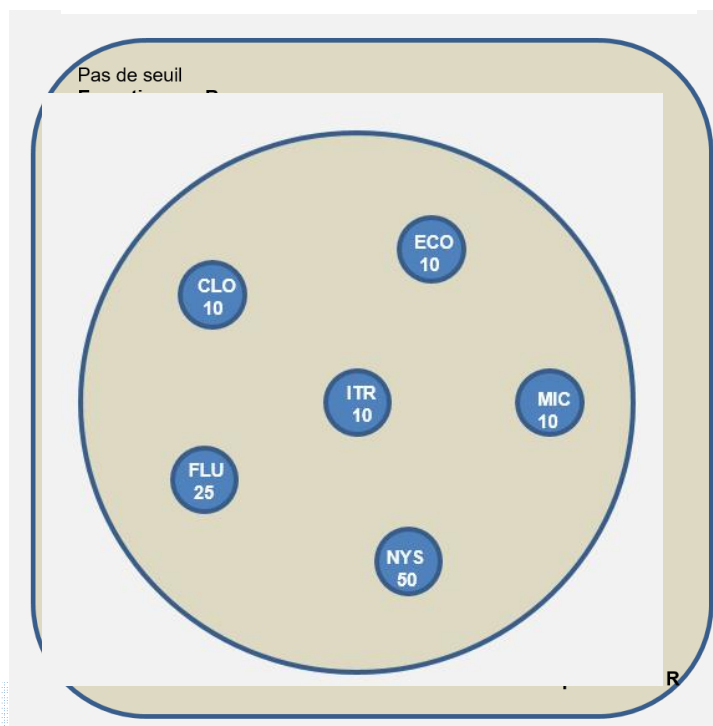


Correspondance à 100 % SI Rentre
l antifongigramme à partir de la culture classique et
l antifongigramme direct à partir du bouillon
(6 germes/ 6) (36 antifongiques/ 36)

Staphylococcus (aureus, epidermidis)

Pénicilline G		R
Ampicilline		R
Oxacilline	>2	R
Teicoplanine	2	S
Vancomycine	2	S
Linézolide	<=0.5	S
Ciprofloxacine	>4	R
Moxifloxacine	>1	R
Amikacine		R
Tobramycine	>4	R
Gentamicine	>4	R
Erythromycine	>2	R
Clindamycine	>1	R
Triméthoprim-Sulfaméthoxazole	>4/76	R
Tétracycline	>2	R
Acide fusidique	<=1	S
Mupirocine	<=1	S
Mupirocine (Haute dose)		I
Rifampicine	<=0.25	S
Fosfomycine avec G6P	<=16	S

Pseudomonas aeruginosa



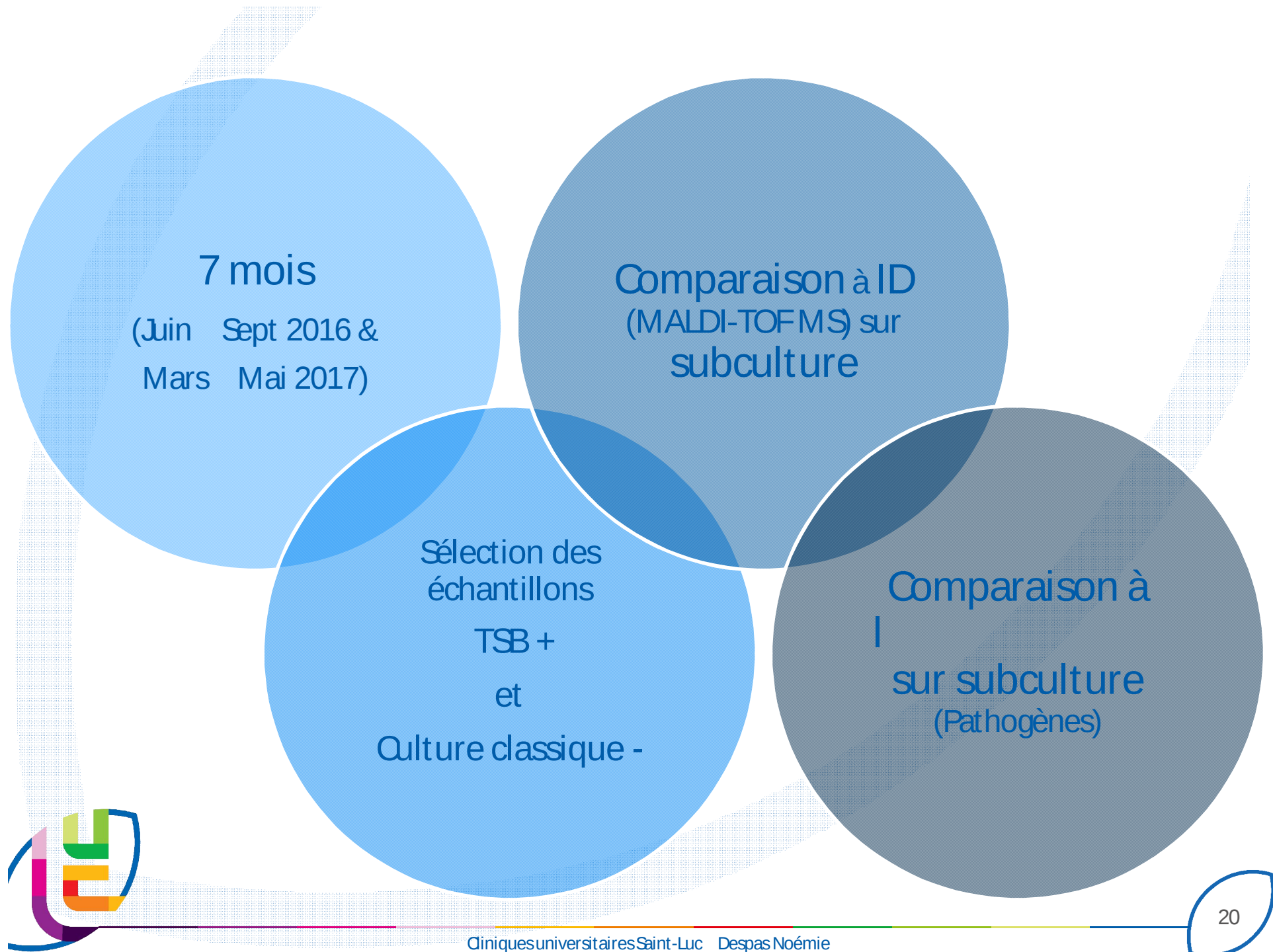
Enterobacteriaceae (E coli, K.pn, Ent. clo)

Ampicilline	<=2	S
Pipéracilline	<=4	S
Pipéracilline-Tazobactam	<=4/4	S
Céfuroxime	4	S
Céfoxitine	<=4	S
Ceftriaxone	<=1	S
Ceftazidime	<=1	S
Céfépime	<=1	S
Imipénème	<=0.25	S
Méropénème	<=0.125	S
Témocilline	8	S
Lévofloxacine	<=0.5	S
Ciprofloxacine	<=0.25	S
Amikacine	<=4	S
Tobramycine	<=1	S
Gentamicine	<=1	S
Colistine	<=1	S
Tigécycline	<=0.5	S
Amoxicilline-Clavulanate (f)	4/2	S
Ertapenem	<=0.25	S

1^{er} objectif :
Validation de la
procédure
Bouillons négatifs,
Bouillons spikés avec
souches de référence

2^{ème} objectif :
Validation des
performances sur
échantillons
cliniques
Juin 2016 → Mai 2017

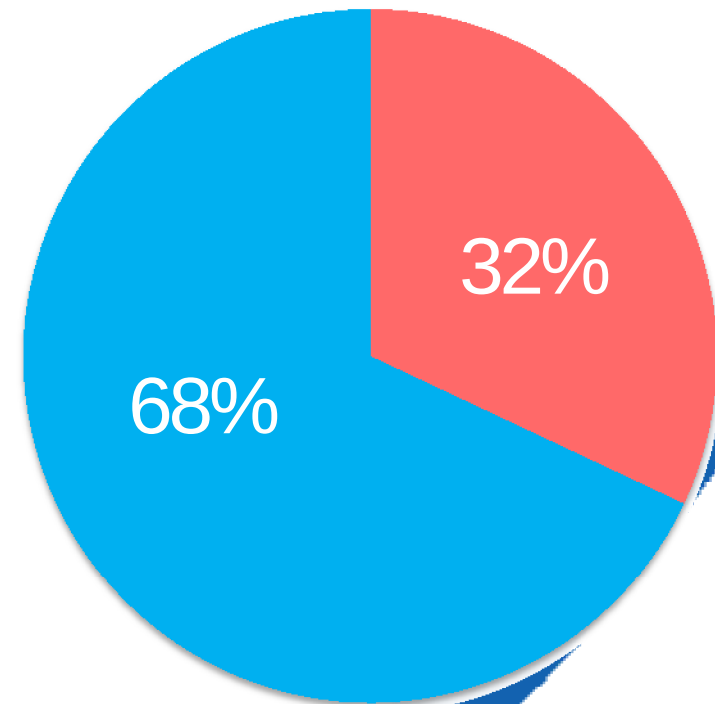




Biopsies peropératoires diverses (13%)
 Biopsie non opératoire (1%)
 Coeliaque/Illiaque (1%)
 Foie (2%)
 Ganglion (2%)
 Matériel implanté (3%)
 Orthopédiques (6%)
 Placenta (1%)
 Pancreas (1%)
 Rein (1%)
 Sein (1%)

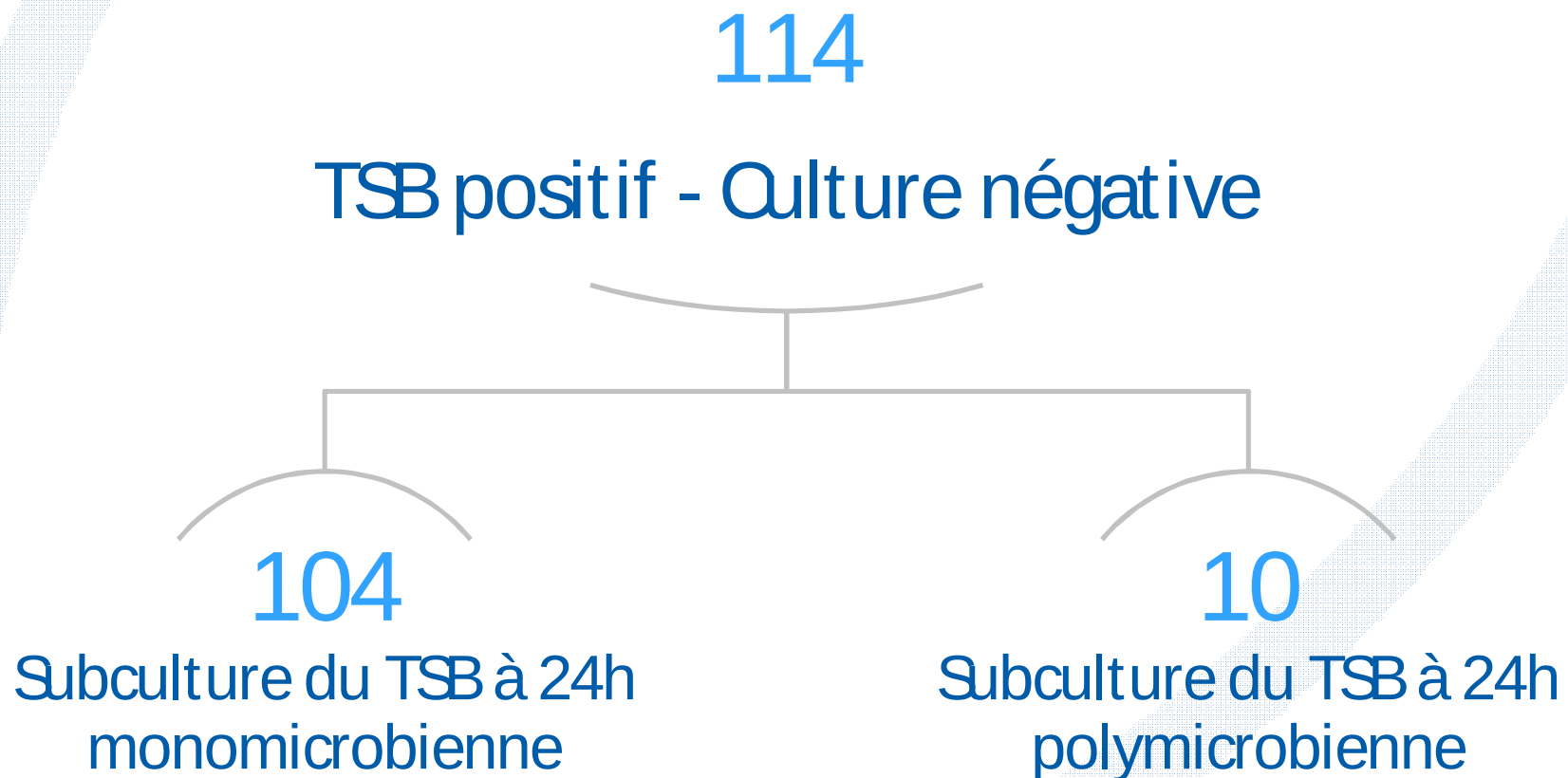
Abcès thoracique (2%)
 Amniotique (2%)
 Articulaire (2%)
 Ascite (7%)
 Echantillon ORL (1%)
 LBA (1%)
 LCR (36%)
 Lavage - spondylodiscite (1%)
 Liquide - abcès inguinal (1%)
 Liquide - débridement (pied diabétique) (1%)
 Liquide - drainage (1%)
 Liquide - kyste rénal (1%)
 Liquide per-op (incluant TRH) (3%)
 Liquide - préservation rein (1%)
 Pleural (8%)

Origine des prélèvements



■ Tissus solide/matériel

■ Liquide



104

Culture monomicrobienne



104 Culture monomicrobienne

84 (81%)

Résultats ID concordants

3 (3%)

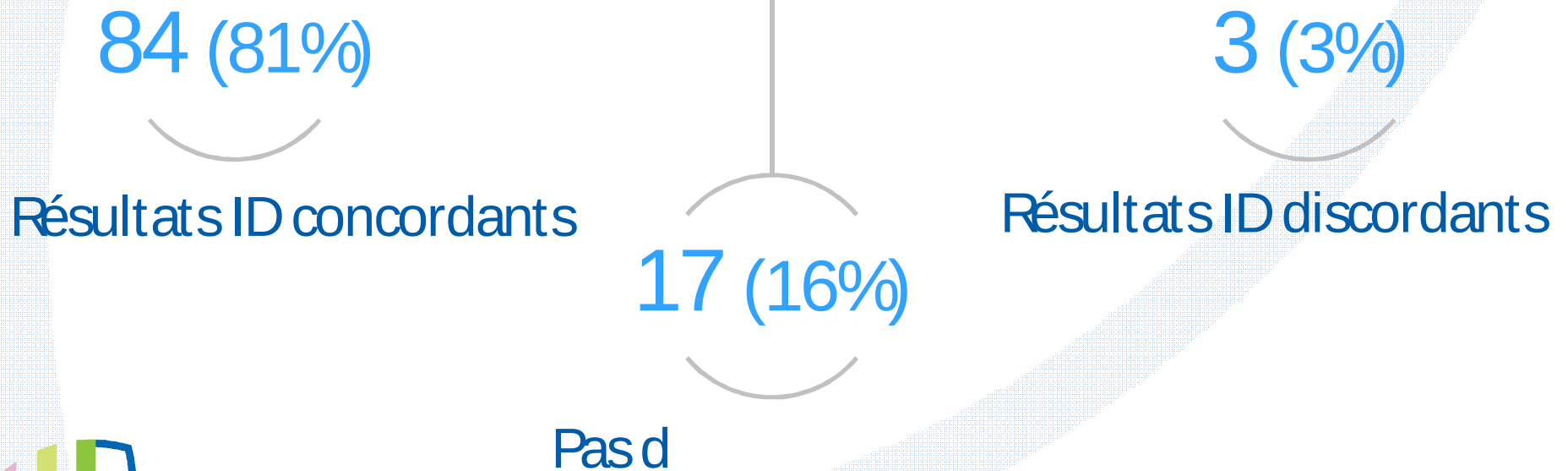
Résultats ID discordants

17 (16%)

Pas d



104 Culture monomicrobienne

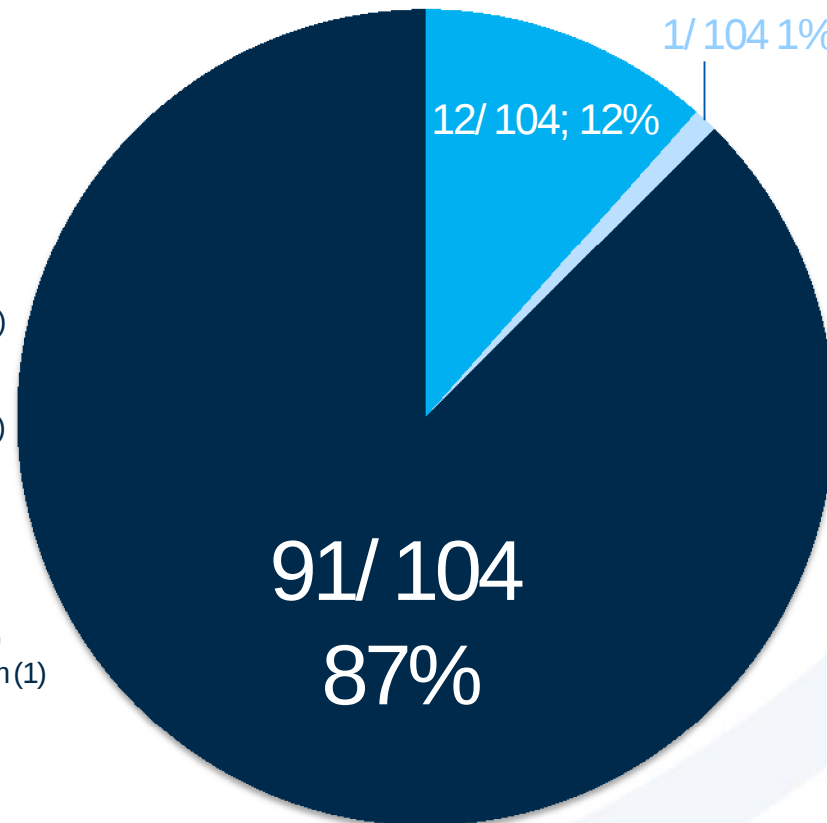


Distribution germes : Subculture

104
Culture monomicrobienne

■ Gram positif

Staphylococcus epidermidis (23)
Staphylococcus aureus (3)
Staphylococcus capitis (8)
Staphylococcus warneri (4)
Staphylococcus caprae (1)
Staphylococcus haemolyticus (5)
Staphylococcus lugdunensis (3)
Staphylococcus cohnii (2)
Staphylococcus hominis (3)
Streptococcus agalactiae (1)
Streptococcus bovis group (1)
Streptococcus sanguinis group (2)
Streptococcus masiliensis (2)
Streptococcus mitis group (8)
Streptococcus salivarius group (2)
Enterococcus faecalis (4)
Enterococcus faecium (1)
Corynebacterium striatum (1)
Corynebacterium accolens (1)
Corynebacterium jeikeium (1)
Corynebacterium mucifaciens (1)
Corynebacterium tuberculostrictum (1)
Rothia dentocariosa (1)
Rothia mucilaginosa (1)
Micrococcus luteus (5)
Propionibacterium acnes (4)
Clostridium septicum (1)
Lactococcus rhizophila (1)



■ Levure

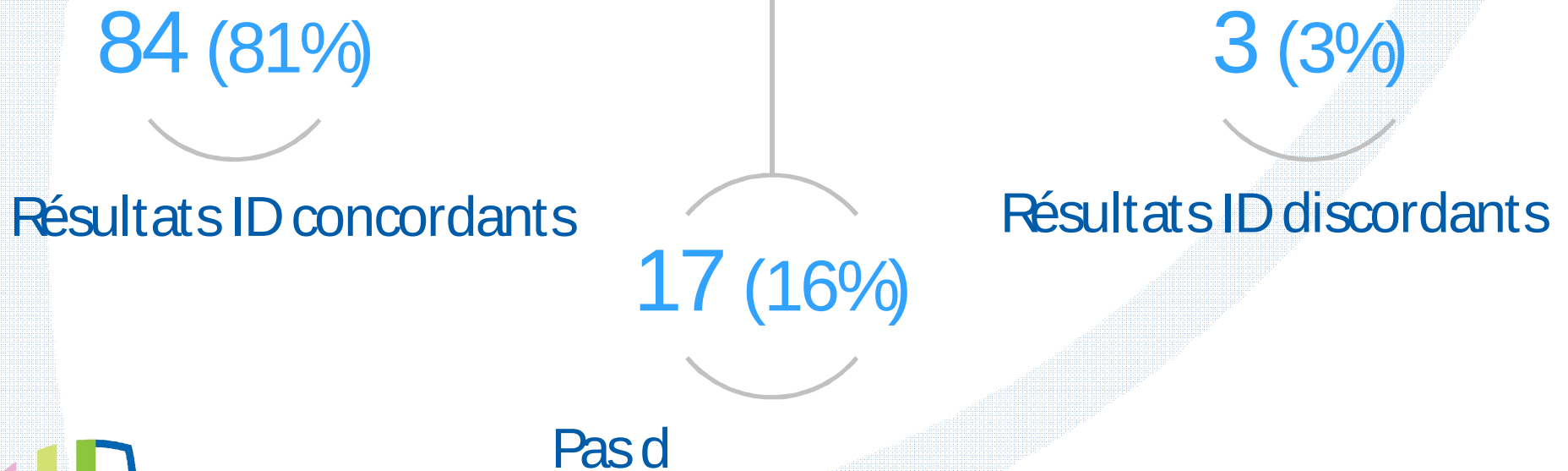
Candida albicans (1)

■ Gram négatif

Acinetobacter lwoffii (1)
Pseudomonas aeruginosa (1)
Klebsiella pneumoniae (2)
Klebsiella oxytoca (1)
Escherichia coli (3)
Enterobacter cloacae (1)
Morganella morganii (1)
Citrobacter koseri (1)
Proteus mirabilis (1)



104 Culture monomicrobienne



Distribution germes : Concordance ID

84 (81%)

Résultats ID concordants

8/10 Entérobactéries
2/10 Non-fermentants

91,6 %
(10/ 12)

2 No ID

12 Gram -

91
Gram +

80,2%
(73/ 91)

3 discordances
15 No ID

100%
(1/ 1)
Levure

43/ 73 Staphylococcus
12/ 73 Streptococcus
5/ 73 Enterococcus



104 Culture monomicrobienne

84 (81%)

Résultats ID concordants

3 (3%)

Résultats ID discordants

17 (16%)

Pas d





17 (16%)

Pas d'identification



9/17 - Sanguinolents

Interférence des GRs ?

Utilisation d

Sepsityper ? (Bruker Daltonik, Bremen, Germany)



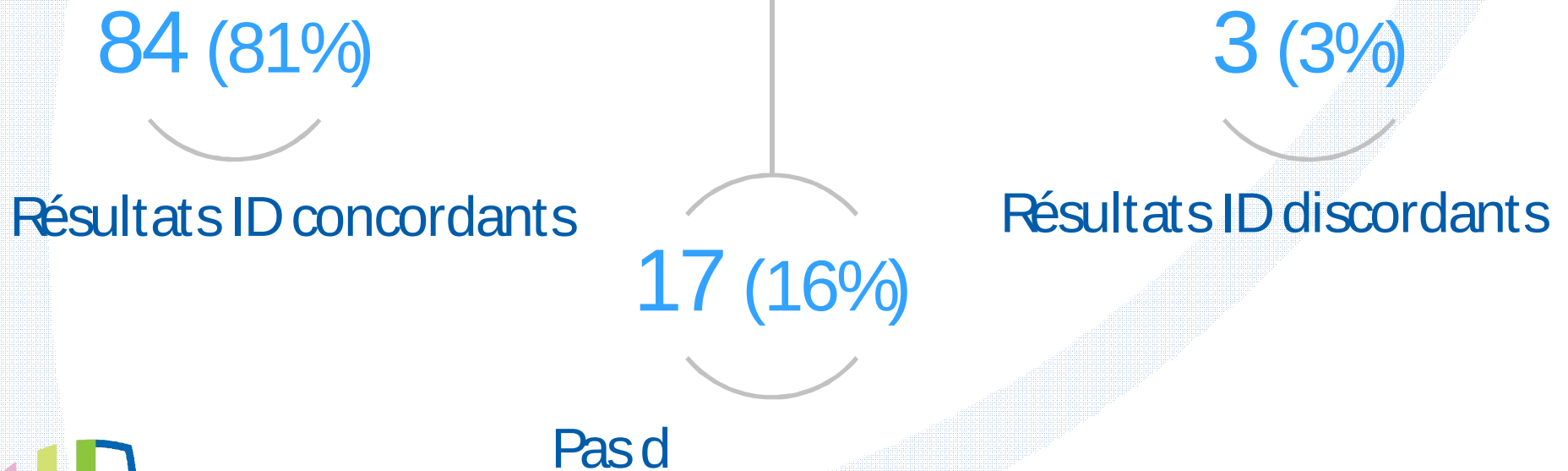
Autres ?

Même phénomène dans la routine

Plusieurs spots



104 Culture monomicrobienne



Biopsie estomac

Veillonella atypica
(Direct)

S. salivarius
(Subculture)

3 (3%)

Résultats ID discordants

Faux-Positifs ?

Germes difficilement subcultivables

- *V. atypica* : anaérobe
- *G. adiacens* : streptocoque déficient
- *Peptoniphilus harei* : anaérobe

Tissu granulomateux sublingual

Granulicatella adiacens
(Direct)

S. massiliensis
(Subculture)

Faux-Négatifs ?

Limite du MALDI-TOF MS pour
|
polymicrobiennes

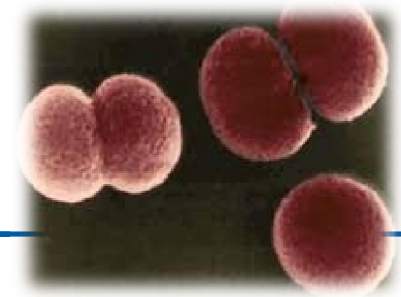
Tissu intra-articulaire hanche

Peptoniphilus harei
(Direct)

S. epidermidis
(Subculture)



S. pneumoniae



- Streptocoque du groupe mitis
- Distinction entre les streptocoques de ce groupe difficile par MALDI-TOF MS
- Désoxycholate (test de solubilité biliaire) sur le culot de centrifugation
- Concordance totale entre le désoxycholate « direct » et l'optochine sur subculture
 - 9 S. mitis Group non pneumoniae
 - 1 S. pneumoniae (ATCC 49619)



Résultats Test de sensibilité

Acinetobacter lowfii	Staphylococcus aureus
Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus epidermidis
Klebsiella pneumoniae	Staphylococcus warneri
Klebsiella oxytoca	Staphylococcus lugdunensis
Escherichia Coli	Staphylococcus hominis
Enterobacter cloacae	Streptococcus bovis group
Morganella morganii	Streptococcus sanguinis group
Citrobacter koseri	Streptococcus mitis group
Proteus mirabilis	Enterococcus faecalis
Corynebacterium striatum	Enterococcus faecium
Corynebacterium accolens	

Intérêt clinique ?

58,6% (51/ 87) des germes identifiés
ont été considérés comme pathogène
par le clinicien



114

TSB positif - Culture négative

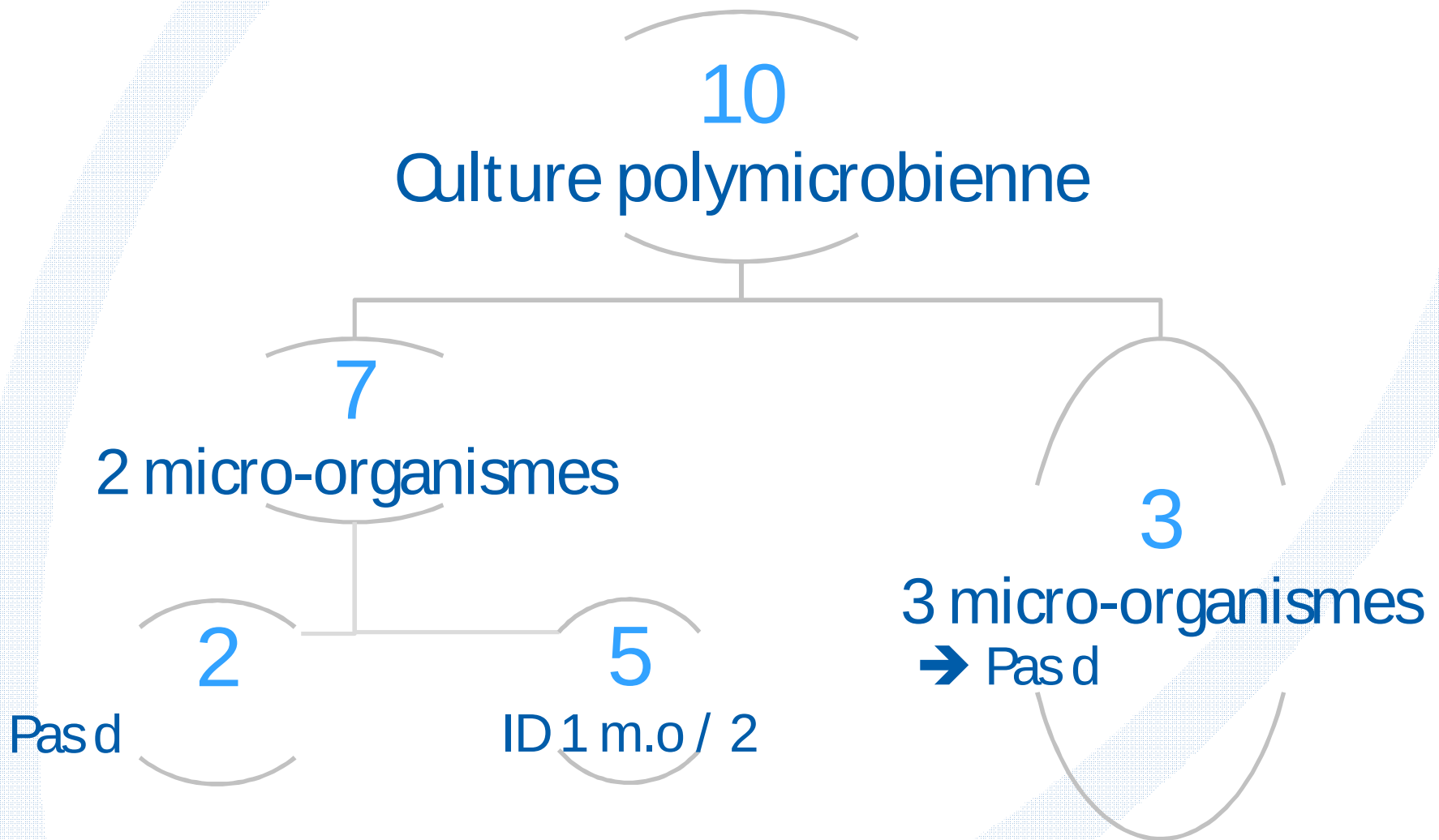
104

Subculture du TSB à 24h
monomicrobienne

10

Subculture du TSB à 24h
polymicrobienne







Introduction

Routine - CUSL

Matériels et Méthodes

Objectifs

Résultats

Cas pratique

Littérature

Conclusion

Amputation pied droit



TSB trouble → Positif



Lundi 10/8

Mardi 11/8
CGP à I



Culture positive



Lecture antibiogramme



Mercredi 12/8
S aureus
(Maldi
subculture)

Jeudi 13/8
Antibiogramme
S aureus OXA S

Amputation pied droit



Lundi 10/8



TSB trouble → Positif



Lecture antibiogramme



Mercredi 12/8
Antibiogramme :
S aureus OXA S
Gain de 24h

Mardi 11/8

CGP à l

ID directe par MALDI-TOF MS:

S aureus
Gain de 24h





Introduction

Routine - CUSL

Matériels et Méthodes

Objectifs

Résultats

Cas pratique

Littérature

Conclusion

Autres études : Identification directe par MALDI-TOF MS ?



Ábrók et al., 2015

Milieux d
sélectifs pour *S. agalactiae*



Sparbier et al., 2012

Milieux d
sélectifs pour *Salmonella*



Verroken et al., 2016

Hémocultures positives





Introduction

Routine - CUSL

Matériels et Méthodes

Objectifs

Résultats

Cas pratique

Littérature

Conclusion



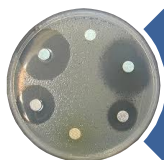
1^{ère} étude appliquée aux bouillons d
la culture conventionnelle associée est négative



Procédure simple, facile à intégrer dans un laboratoire de routine et
rapide (2min)



Bonnes performances pour I



Bonnes performances pour les antibiogrammes directs : 96 %



Gain de temps de 24H : Identification, antibiogramme et
instauration d



Perspectives : développer la communication avec le clinicien





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

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



Note

MALDI-TOF MS identification and antimicrobial susceptibility testing directly from positive enrichment broth



Tré-Hardy Marie*, Lambert Barbara, Despas Noémie, Bressant Florian, Laurenzano Clémentine, Rodriguez-Villalobos Hector, Verroken Alexia

Department of Microbiology, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:

MALDI-TOF MS identification
NSEB
CSF
Sterile fluid samples
Biopsies

ABSTRACT

A rapid preparation procedure was validated for MALDI-TOF MS identification followed by an antimicrobial susceptibility testing directly from a non-selective enrichment broth of sterile fluid samples associated with negative classical cultures. This method can be easily integrated in the laboratory routine allowing precious time gain for microbe identification and subsequent adequate treatment initiation.

