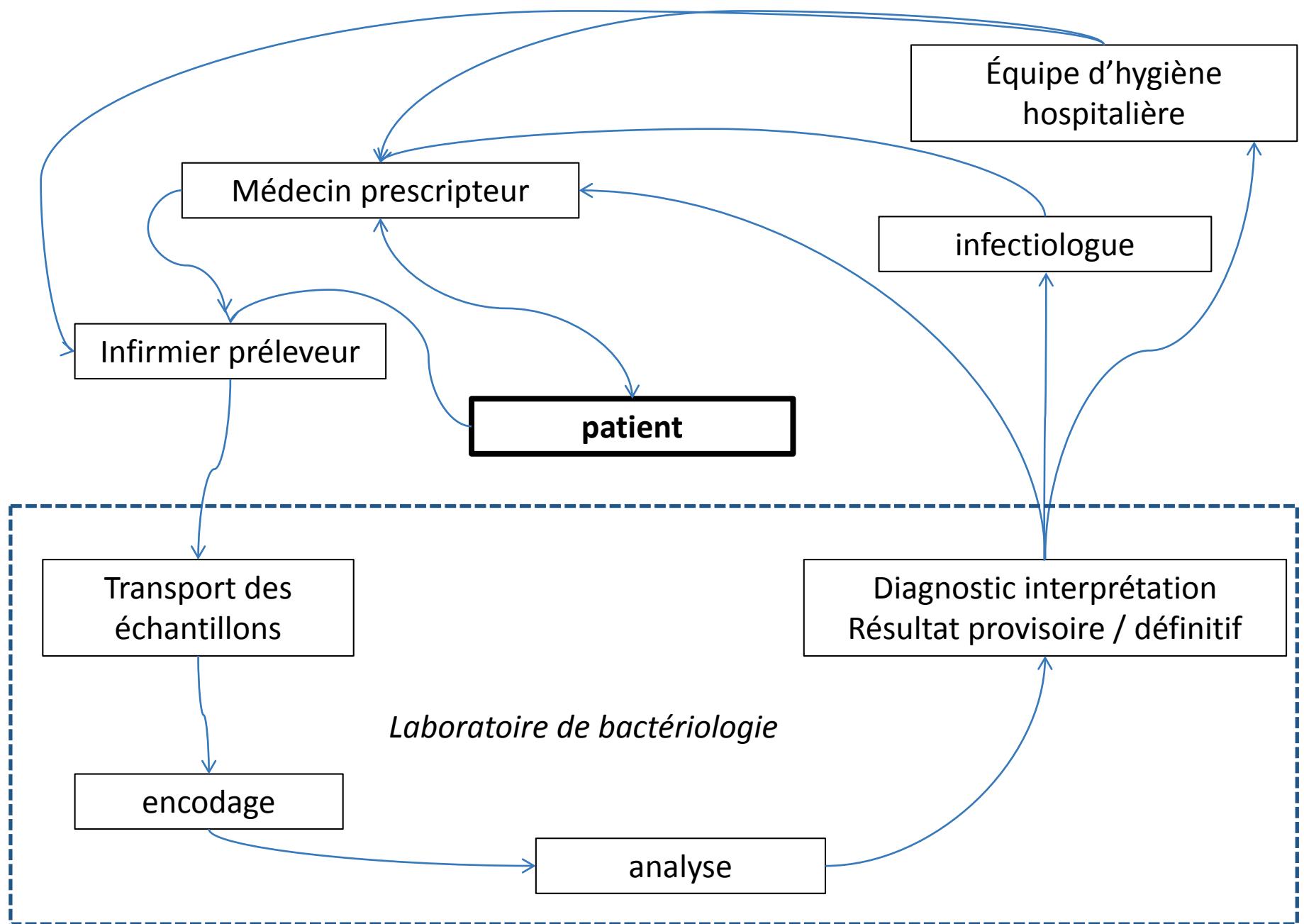


Rôle de la microbiologie pour la maîtrise des infections à bactéries multirésistantes

Patrick De Mol

Microbiologie médicale

Université de Liège



LE ROLE DU MICROBIOLOGISTE DANS LA MAITRISE DES BMR

Assurer le dépistage des BMR

Quel(s) prélèvement(s) ?

Les sites à prélever dépendent du type de BMR



MRSA

Nez, plis inguinaux,
plaies cutanées ,
escarres,
Rectum

ESBL-E

Ecouvillonage
rectal

A. baumannii

Peau, rectum,
gorge

VRE

Ecouvillonage
rectal

Milieux sélectifs, Commerciaux ou «Maison» additionnés d'antibiotiques

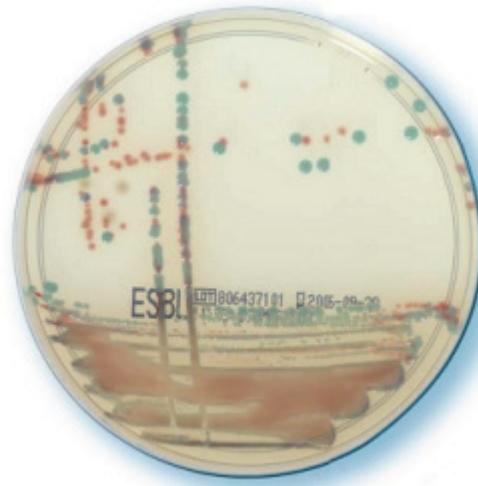
Enrichissement en milieu liquide

Augmente la sensibilité mais augmente le délai de rendu

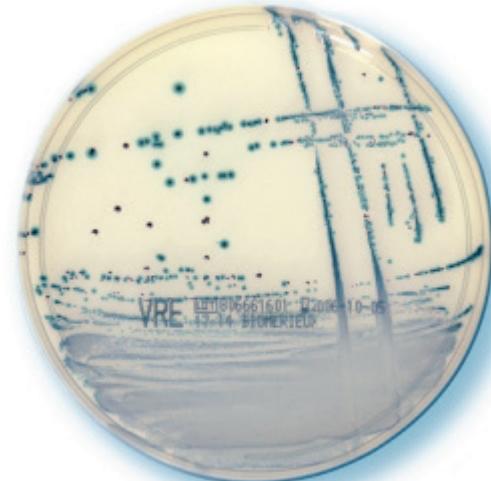
Milieux chromogènes pour BMR



SARM en rose
Chromagar



Milieu à la
cefpodoxime pour les
ESBL
ChromID



VRE
ChromID

Recherche phénotypique de BLSE (1)

Direct screening of clinical samples:

β -Lactamase Screening Agar (BLSE agar bi-plate)

Chromogenic media (e.g. chromID ESBL)

Screening:

Disk diffusion

Ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, aztreonam



Detection of ESBL production

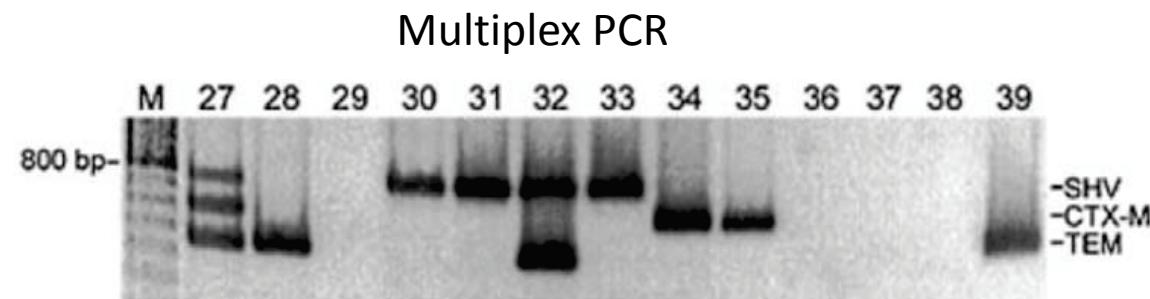
Phenotypic:

– Confirmation :

- Cephalosporin (CTAX, CAZ)/clavulanate combination discs
- Broth microdilution (MIC determination)
- Cefepime/Clavulanate combination discs or CTAX/CAZ combination discs on cloxacillin (250 mg/L) containing media

Genotypic:

- PCR detection of *bla genes* (+ sequencing)
- Multiplex PCR
- ESBL DNA Micro-array (Checkpoints)



ESBL detection

Detection method	sensibility	specificity	PPV	PNV
Microscan	83,5	72,9	81,6	75,4
Phoenix	98,8	52,2	75	96,6
Vitek2	85,9	78	84,9	79,3
DDS	92,9	96,6	97,5	90,5
Etest	94,1	84,7	89,9	90,9

Typing of ESBL producers

PFGE: Pulsed field gel electrophoresis

- Restriction of genome with rare-cutters (e.g. *XbaI*)
- Gold standard to study genetic background

MLST: Multi locus sequence typing

- Sequence 7 housekeeping genes
adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, recA
- Widely used, unambiguous databases

mMLST (mini-MLST):

- Sequence more variable regions in only 3 genes
- Allows quick detection during outbreak

Serotyping

Unités à risque (1)

oui

non

Enterobactérie
ESBL+ dans
prélèvement
clinique/screening

Enterobactérie
ESBL+ dans
prélèvement
clinique

Non *E coli*

E Coli

Précautions
additionnelles

Précautions
générales +
surveiller
apparition
de cas groupés

Cas groupés

Cas unique

Précautions
additionnelles

Précautions
Générales +
surveiller
apparition de cas
groupés

(1) USI, unités d'hémato-oncologie, hémodialyse, brûlés

**Attitude pratique concernant les Entérobactéries productrices de
β-lactamases à spectre élargi**

Mécanismes de résistance aux carbapénèmes

- Entérobactéries céphalosporinases + modifications des porines carbapénèmases
 - *Pseudomonas spp* modifications des porines efflux carbapénèmases
 - *Acinetobacter spp* céphalosporinases + modifications des porines carbapénèmases

Classification des carbapénèmases

Classification Ambler	Type Enzyme	Spectre d'activité	Germe(s)
A type sérine	KPC	Toutes les β -lactamines	Entérobactéries <i>Ps. aeruginosa</i>
A type sérine	SME	Carbapénèmes et aztréoname mais <u>pas</u> C3G	<i>S. marcescens</i>
A type sérine	NMC-A, IMI	Carbapénèmes et aztréonam mais <u>pas</u> C3G	<i>Enterobacter spp.</i>
A type sérine	GES	Imipénème et C3G	<i>Ps. aeruginosa</i> Entérobactéries
B métallo- β -lactamase	IMP, VIM	Toutes les β -lactamines sauf aztréoname	Entérobactéries <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Acinetobacter spp.</i>
D type sérine	OXA	Carbapénèmes (faible activité)	<i>Acinetobacter spp</i> (Entérobactéries)

Organism	Carbapenemases		
	Class A	Class B (MBLs)	Class D (oxacillins)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	+++ ^a	++
<i>Escherichia coli</i>	+/-	+/-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+/-	+/-	+
<i>Providencia</i> spp.		+/-	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+/-	+/-	
<i>Serratia marcescens</i>	+/-	+	
<i>Enterobacter</i> spp.	+/-	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	+/-	+/-	
<i>Morganella morganii</i>		+/-	
<i>Salmonella enterica</i>	+/-		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+++	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+/-	
<i>Acinetobacter baumannii</i>		+	+++
<i>Acinetobacter</i> spp.		+	+

++, high prevalence (>10%) in certain regions; ++, moderate prevalence (1–10%); +, low prevalence but >1 case; +/-, isolated cases; MBL, metallo-β-lactamase.

^a Endemic in certain regions: VIM-1/4 in Greece and NDM-1 in India.

Détection des carbapénèmases, signes d'appel

Diamètre d'inhibition pour meropenem ou imipenem < 22 mm

Diamètre d'inhibition pour ertapenem < 21 mm

Présence de colonies discrètes dans la zone d'inhibition des carbapenems (ertapenem)

CMI (E-test) carbapenemes $\geq 2 \mu\text{g/ml}$

CMI (E-test) ertapeneme $\geq 0,5\mu\text{g/ml}$

Résistance (habituelle) au C3G

Brillance CRE agar



Souches seulement sensibles a la colistine et tigecycline

Tres faible hydrolyse des carbapenemes
Detection via l'ertapeneme +++

Définition de "SOUCHE SUSPECTE« de CPE

1. *Enterobacteriaceae*

Les bactéries les plus fréquentes:

Klebsiella pneumoniae,
Escherichia coli,
Enterobacter cloacae.

- ET

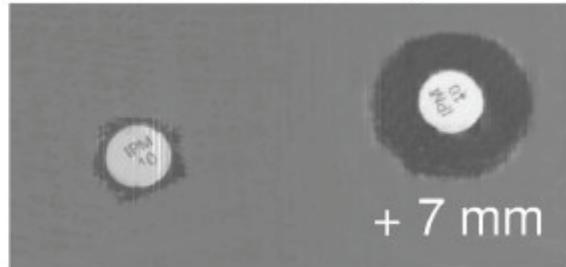
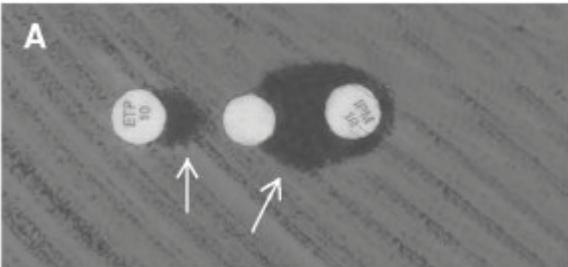
2. *Non-sensible pour les carbapénèmes*

sensibilité réduite (intermédiaire ou résistante) aux carbapénèmes:

- CMI ≥ 1 mg/L au méropénème ou
une zone d'inhibition de ≤ 23 mm au méropénème (disque de 10 µg).
- tester la sensibilité pour d'autres carbapénèmes comme l'ertapénème et l'imipénème (cut-off: voire EUCAST ou CLSI).

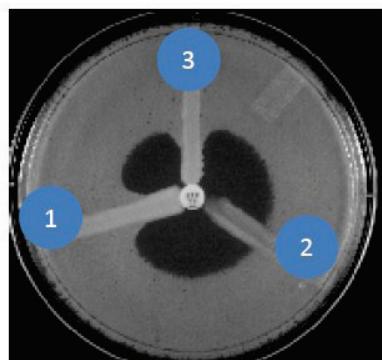
DDST

BA-CD (IMP)



Synergie acide boronique et carbapenemes = KPC

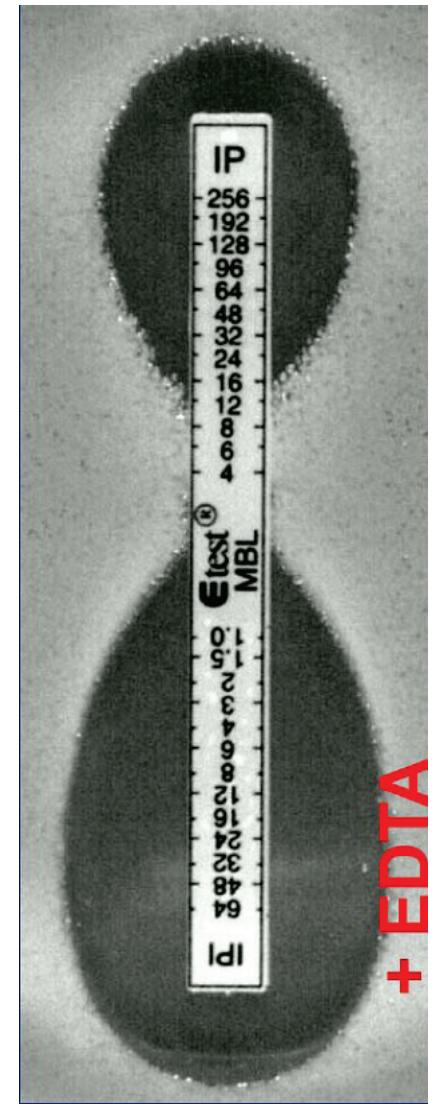
Test de Hodge modifié



Inhibition
carbapenemase
par
EDTA = metallo-
protease

- 1: *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (témoin positif)
- 2: *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 (témoin négatif)
- 3: Souche testée

Image: CDC



+ EDTA

Staphylococcus aureus résistant à la méticilline SARM/MRSA

- Résistance intrinsèque à la méticilline ou SARM
- Acquisition d'une PLP additionnelle (PLP2a)
Synthèse : gène *mecA* porté par le *SCCmec* (voir plus loin).
La PLP 2a a une très mauvaise affinité pour les β lactamines, ce qui entraîne une résistance croisée à toute cette famille d'antibiotiques.
- Ces souches de SARM sont souvent multirésistantes.
 - Aminosides (sauf la gentamicine)
 - Macrolides.
 - Fluoroquinolones

Détection des SARM (1)

- L'expression de résistance va être favorisée par :
 - Le pH du milieu
 - L'utilisation d'un milieu hypertonique
 - La diminution de la température d'incubation à 30 °C
- Résistance homogène :
 - La majorité de la population exprime la résistance
 - Pas de précautions particulières dans les conditions habituelles de l'antibiogramme

Détection des SARM (2)

- Résistance hétérogène :
 - Une faible partie de la population (parfois 1 sur 1000) exprime la résistance dans les conditions standards de culture.
 - Le niveau de résistance est variable suivant la souche, (haut ou bas niveau)
 - La proportion de la population résistante est constante (même après plusieurs repiquages)

Détection phénotypiques des SARM

- Avec les disques d'oxacilline chargés à 5 µg et
 - Milieu de MH, incubation à 30°C ou
 - milieu MH hypersalé à 2 ou 4 %, incubation à 35°C
 - inoculum fort : 10^7 UFC/ml,
 - incubation 24 h et 48h
- Pour la lecture des boites, il faut être attentif à la présence de microcolonies dans la zone d'inhibition qui témoignent de la résistance.
- Diamètre < à 20 mm : souches résistantes à l'oxacilline.

Détection phénotypiques des SARM

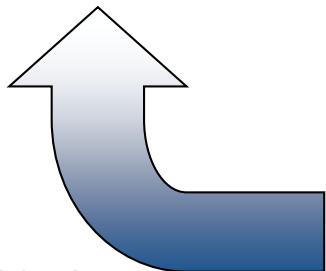
- Avec les disques de céfoxidine (30 µg) dans les conditions standards de l'antibiogramme :
 - en milieu de Mueller-Hinton
 - avec un inoculum de 10^6 UFC/ml
 - Incubation à 35°C, 18-24 h.
- La céfoxidine est un meilleur substrat pour l'expression de la résistance à l'oxacilline
- La céfoxidine est d'utilisation plus facile car on utilise un milieu MH sans sel, un inoculum normal, une température d'incubation de 35°C.
- Diamètre ≥ 27 mm : souche sensible à l'oxacilline. Diamètre < 23 mm : souche résistante.

La révolution en bactériologie

Maldi-Tof

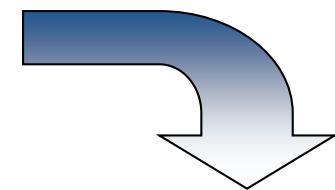
Objectifs du laboratoire de Microbiologie clinique

Prise en charge optimale du patient



!!! Dialogue clinicien / biologiste !!!

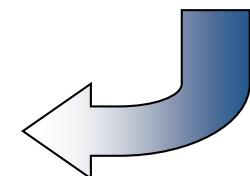
Collection de l'échantillon



Analyse de l'échantillon: présence de pathogènes

Identification

Sensibilité aux antibiotiques



Le plus rapide et le moins coûteux possible!!

Identification bactérienne

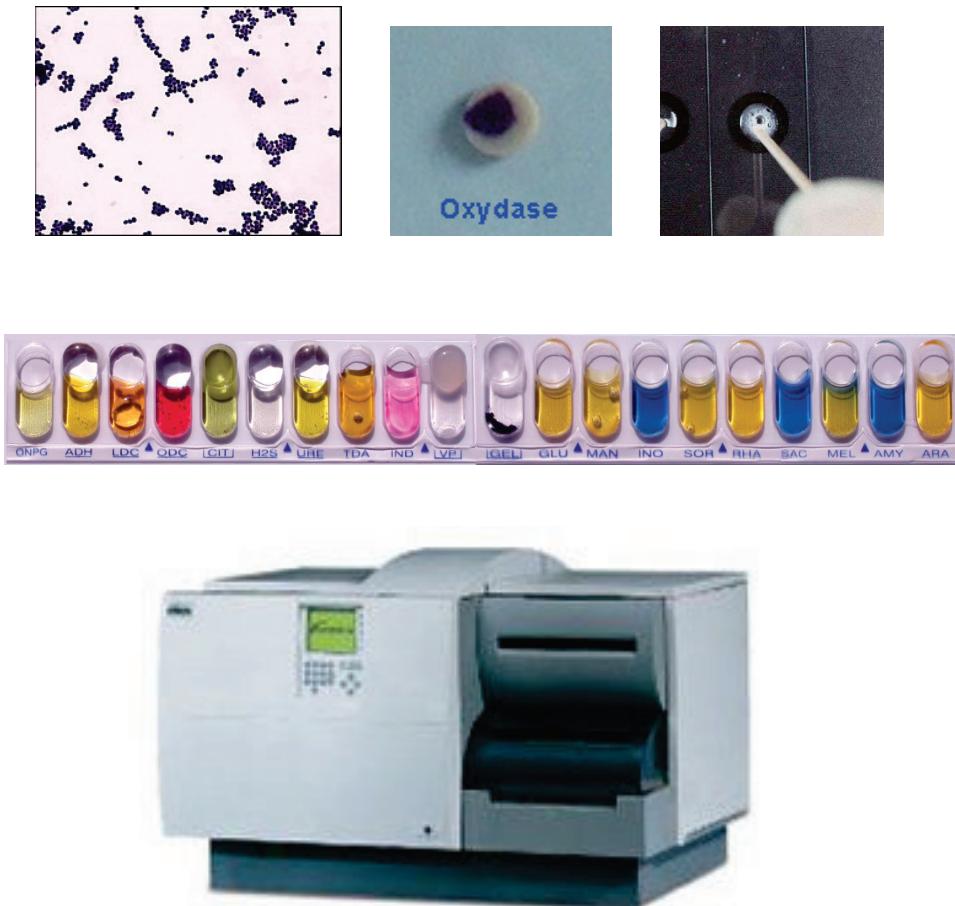
Stratégie classique

A partir d'une culture sur milieu solide:

- Coloration de Gram
- Tests rapides: oxydase, catalase...
- Tests phénotypiques
 - Caractères biochimiques

Unique évolution au cours des années:

Automatisation et miniaturisation

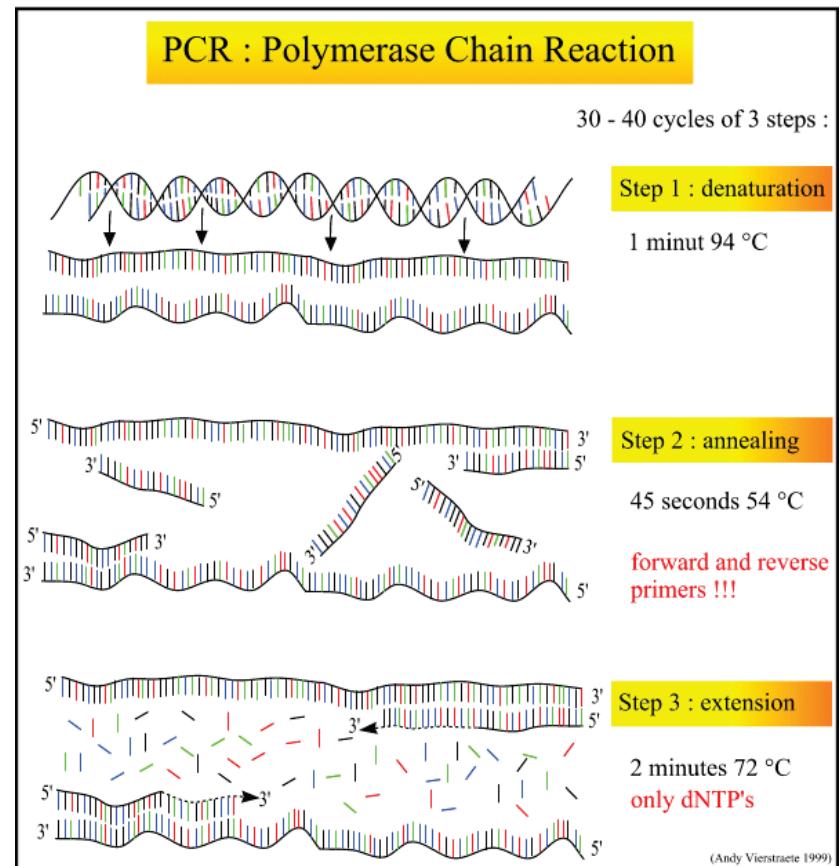


Identification bactérienne

Biologie moléculaire

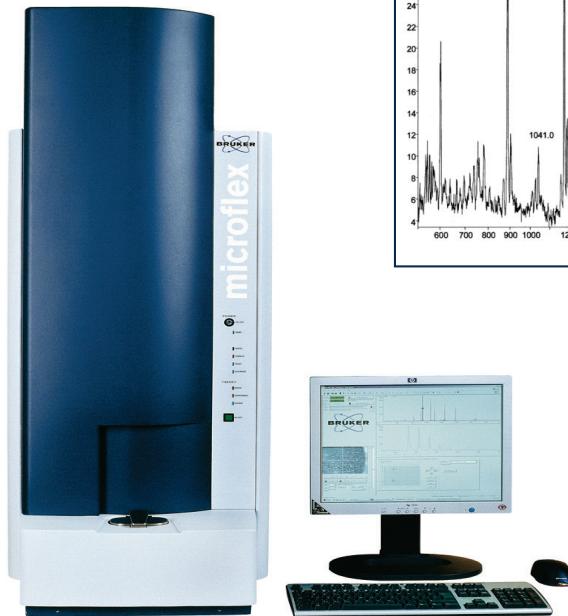
A partir d'une culture sur milieu solide ou du prélèvement primaire:

- PCR
 - ☹ Manipulations complexes
 - ☹ Multiples analyses d'espèce ou de genre à réaliser en parallèle
 - ☹ Analyse coûteuse
- Microarrays

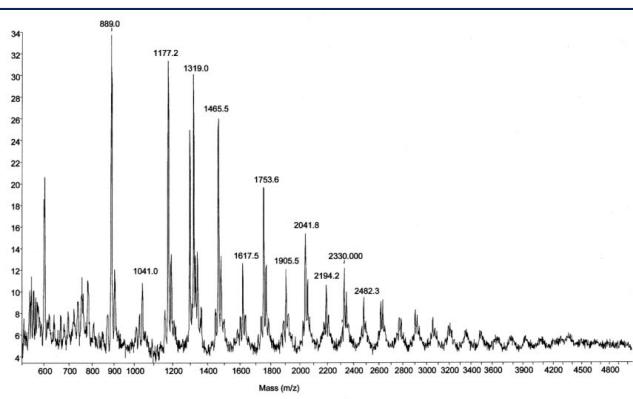


Identification bactérienne

Spectrométrie de masse MALDI-TOF



Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics)



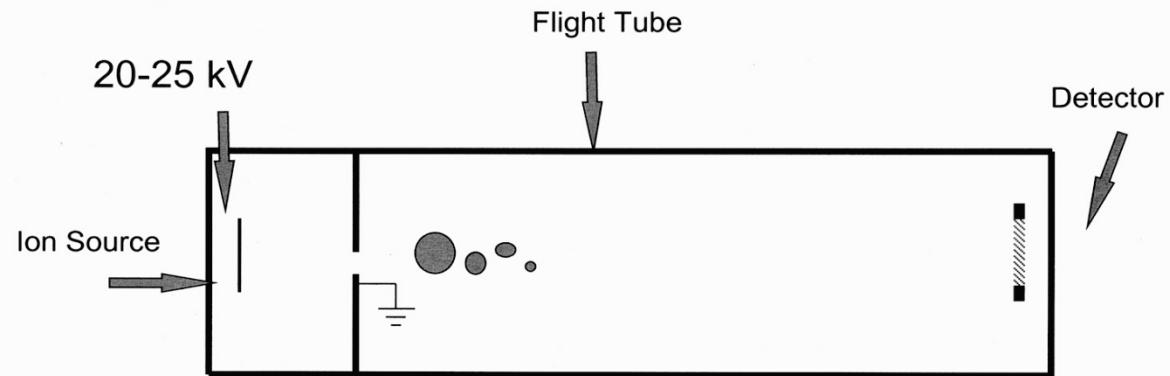
Axima (Shimadzu)

Spectrométrie de masse MALDI-TOF

MALDI-TOF (Time of Flight)

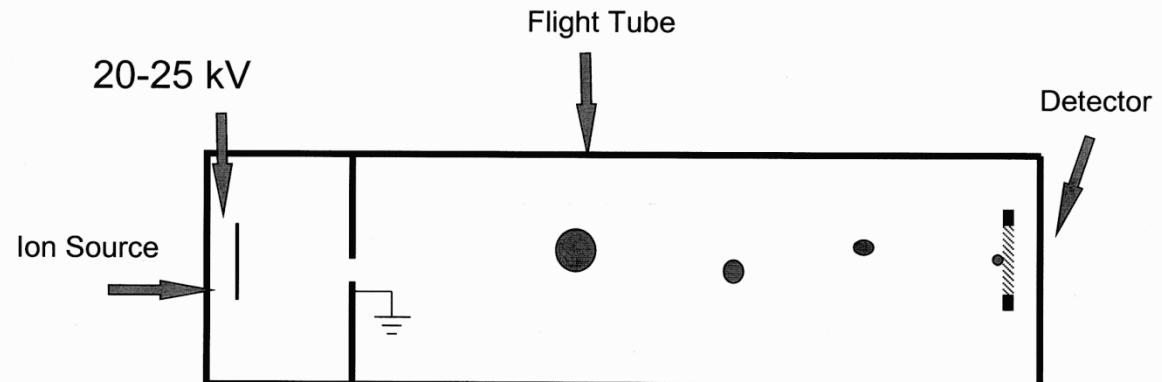
1. Différence de potentiel

Accélération des ions



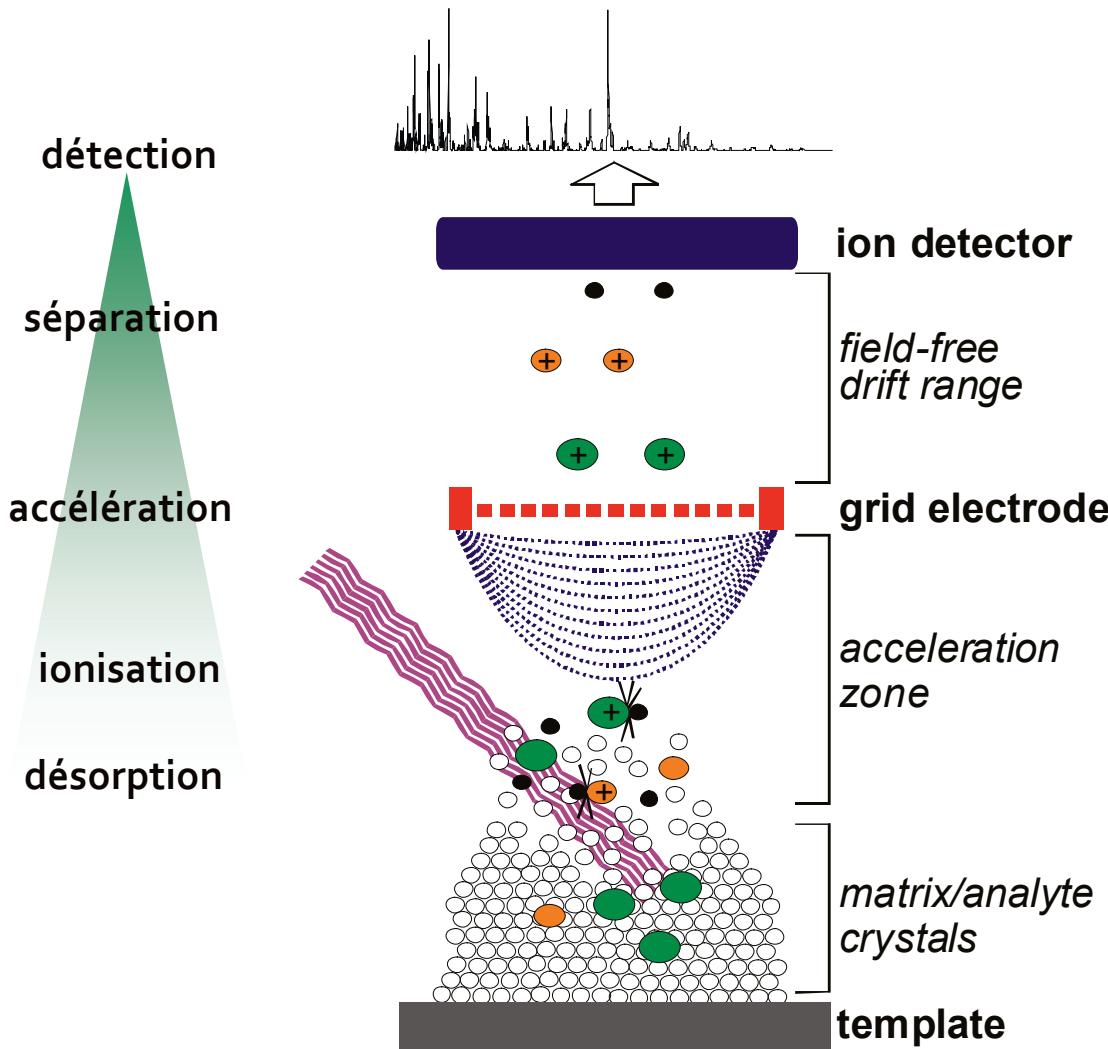
2. Séparation dans le tube de vol

- Les petits ions atteignent plus vite le détecteur que les gros
- Mesure du temps



Spectrométrie de masse

MALDI-TOF



$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2$$

m: masse
z: charge
U: voltage
L: longueur du tube
t: temps
e: charge élémentaire

Banque de données de spectres

- **Fournie par la firme.**
 - Bruker: 3995 spectres d'organismes cellulaires (3679 bactéries et 316 champignons)
- **Comparaison du spectre obtenu avec les spectres présents dans la banque de données**
- **Scores d'appariement et identification bactérienne la plus plausible.**

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	no reliable identification	(-)	red

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Clostridium perfringens B 1968_NCTC 3110_BOG	2.514	1502
2 (++)	Clostridium perfringens B 1038_NCTC 4964_BOG	2.454	1502
3 (++)	Clostridium perfringens B 1971_ATCC 3626_BOG	2.305	1502
4 (++)	Clostridium perfringens A 1037_NCTC 8237_BOG	2.254	37763
5 (++)	Clostridium perfringens D 2150_NCTC 8346_BOG	2.253	107819
6 (++)	Clostridium perfringens C 1041_NCTC 10720_BOG	2.11	79668
7 (-)	Comamonas testosteroni DSM 50244 HAM	1.308	285
8 (-)	Listeria gray murri DSM 20596 DSM	1.262	1641
9 (-)	Bacillus atrophaeus DSM 675 DSM	1.163	1452
10 (-)	Clostridium beijerinckii 1072_ATCC 25752_BOG	1.136	1520

Possibilité d'enrichir la base de données

!!! Attention: Mauvaise discrimination des bactéries aux profils protéiques similaires

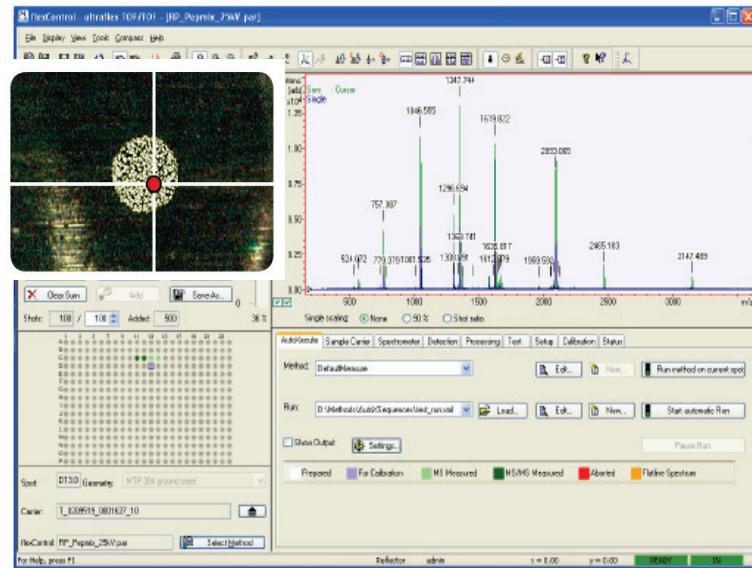
Au laboratoire

Analyse de culture bactérienne sur gélose

1. Dépôt direct sur la cible
2. Ajout de la matrice
3. Séchage
4. Introduction dans le spectromètre



Première identification
en moins de 2 minutes!



Microbiologie médicale – CHU Liège

Evaluation: Février 2010

Groupe bactérien	Nombre de souches testées	Identifications acceptées selon l'algorithme (%)
Entérobactéries	541	98,7
Non fermentants	207	95,6
Staphylocoques	83	97,5
Streptocoques	110	89
<i>Haemophilus / Moraxella</i>	42	97,6
<i>Neisseria sp.</i>	4	100
<i>Campylobacter sp.</i>	5	100
Anaérobies	21	95,2
TOTAL	1013	96,7

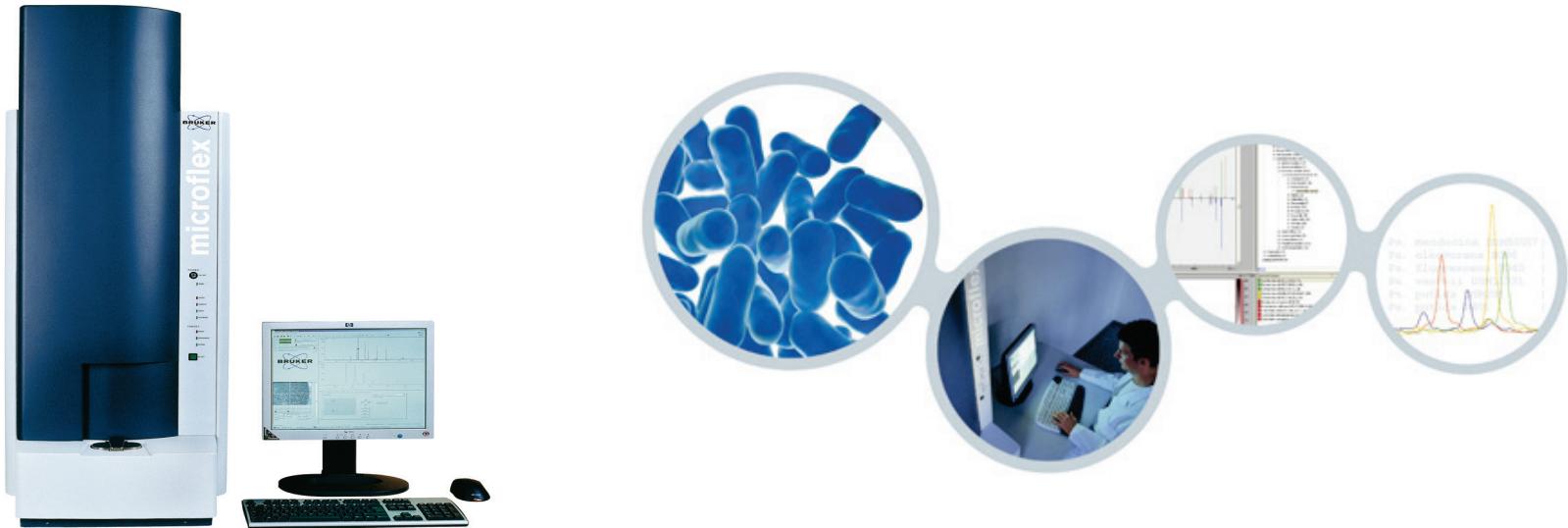
Discussion

Comparaison spectrométrie de masse MALDI-TOF vs autres méthodes d'identification

	MALDI-TOF MS		Identifications phénotypiques par caractères biochimiques	Biologie moléculaire
	Dépôt direct	Extraction		
Durée de préparation	5 minutes	20 minutes	1 à 20 minutes	60 minutes
Durée d'identification	2 minutes	2 minutes	5 à 48 heures	45 minutes à 48 heures
Coût (consommables)	0,1 €/éch	0,5 €/éch	5 €/éch	30-50 €/éch
	Sepsityper kit: 4 €/éch			
Identifications possibles	Bactéries aérobies/anaérobies Levures Mycobactéries Champignons filamentueux		Espèces les plus fréquentes d'intérêt clinique	Toutes théoriquement
Compétence requise	Basique		Modérée	Elevée

Conclusion

Spectrométrie de masse MALDI-TOF:



Technique d'identification bactérienne
incontournable dans un laboratoire de routine
bactériologique