



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Identification rapide par MALDI-TOF de levures après une culture courte.

Bellanger AP¹, Gbaguidi-Haore H², Liapis E³, Scherer E¹, Millon L¹.

1. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Besançon, France
2. Service d'Hygiène Hospitalière, CHRU Besançon, France
3. Laboratoire de Bactériologie, CHRU Besançon, France



Introduction



- Les candidémies représentent
 - 5 à 10% des infections nosocomiales¹
 - Taux de mortalité \approx 40%¹
- L'identification rapide de l'espèce en cause est importante
 - Permet l'initiation d'un traitement antifongique adapté
- Système de lyse / extraction de l'hémoculture positive pour identification MALDI-TOF²⁻⁴
 - Rendement d'identification \approx 70-80%, chronophage, couteux

Contexte



- Des publications récentes ont évalué la possibilité d'identifier les bactéries issues d'hémocultures positives par MALDI-TOF après un temps de culture très court sur gélose¹⁻⁵
 - ≈ 2h à 3h de culture sur gélose sang préchauffée et incubée sous CO₂
 - Goutte de sang non étalée = « spot »: concentration du microorganisme
 - Rendement d'identification ≈ 60-70%¹⁻⁵

Objectifs



- Evaluer l'intérêt de cette technique pour l'identification des levures après une culture courte
- Déterminer les paramètres techniques qui permettent d'optimiser le rendement d'identification

Matériel & Méthodes (1)



- 3 souches de 8 espèces de *Candida* sp fréquemment isolées en routine
 - *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*
 - Souches issues de notre collection locale
 - isolées dans prélèvements profonds et antifongogrammes réalisés
 - identifiées par MALDI-TOF après 48h de culture sur milieu chromogène Candida
- 2 types de flacon d'hémoculture:
 - Aérobie (BD BACTEC™ Standard Aerobic medium) et Fongique (BD BACTEC™ Mycosis)
- 3 types de condition d'incubation
 - milieu chromogène *Candida* CHROMagar (BD) à 30°C
 - gélose sang BD™ Columbia Agar, sous CO2 (37°C) et sans CO2 (35°C)
- 3 temps de culture: 3h, 4h, 5h

Matériel & Méthodes (2)



- Les flacons d'hémoculture étaientensemencés la veille
 - 2 mL de suspension de levures fraîches (culture de 48h) calibrée à 0,4 McF
- Incubation dans un système BD BACTEC™ séparé de la garde de soir / nuit
- Détection positive → Dépôt de 4 à 6 gouttes « spots »/ milieu testé
- Identification MALDI-TOF
 - Après 3h, 4h, 5h de culture
 - Dépôt d'1 μ L d'acide formique 70% sur chaque spot (et d'1 μ L de matrice)
 - Identification retenue dès que score $\geq 1,7$
- Essai préliminaire: influence du sang sur la pousse
 - 3 essais avec *C. albicans* / avec & sans sang/ 4 mL par flacon « négatif » après 8 j d'incubation

Analyse statistique

- Les data ont été analysées avec Stata v14.1
- Analyse descriptive
- Analyse univariée
- Régression logistique **multivariée** à effets aléatoires
 - Effets souches pris en compte
 - **Objectif: Déterminer les paramètres techniques optimaux**
 - Variable réponse = score d'identification $\geq 1,7$ oui/non
- A p value $< 0,05$ était considérée comme statistiquement significative

Résultat brut



- Effet « **sang** »: pas de différence observée avec / sans présence de sang
 - Risques infectieux (viral) et AES → arrêté
- 432 résultats MALDI-TOF générés (18 scores x 24 souches)
 - Absence d'erreur d'identification
 - Différence de performance selon les espèces
 - Rendement **global** d'identification bas : 30 %
 - Score MALDI-TOF moyen: $1,55 \pm 0,03$

Paramètres techniques d'intérêt



Analyse Multivariée

Variable	Odd Ratio (OR)	Intervalle de Confiance (95%)	p
Flacon (référence aérobie)			
Flacon fongique	1,7	0,9-2,9	0,07
Condition incubation (référence gélose sang 35°C)			
Gélose sang sous CO ₂ à 37°C	1,3	0,6-2,5	0,48
Gélose CHROMagar à 30°C	2,5	1,3-5	0,008
Temps incubation (référence 3h)			
4h	4	1,9-9,2	<0,001
5h	21	9-48	<0,001

© RICA 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Paramètres techniques d'intérêt



Analyse Multivariée

Variable	Odd Ratio (OR)	Intervalle de Confiance (95%)	p
Flacon (référence aérobie)			
Flacon fongique	1,7	0,9-2,9	0,07
Condition incubation (référence gélose sang 35°C)			
Gélose sang sous CO ₂ à 37°C	1,3	0,6-2,5	0,48
Gélose CHROMagar à 30°C	2,5	1,3-5	0,008
Temps incubation (référence 3h)			
4h	4	1,9-9,2	<0,001
5h	21	9-48	<0,001

© RICA I 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Paramètres techniques d'intérêt



Analyse Multivariée

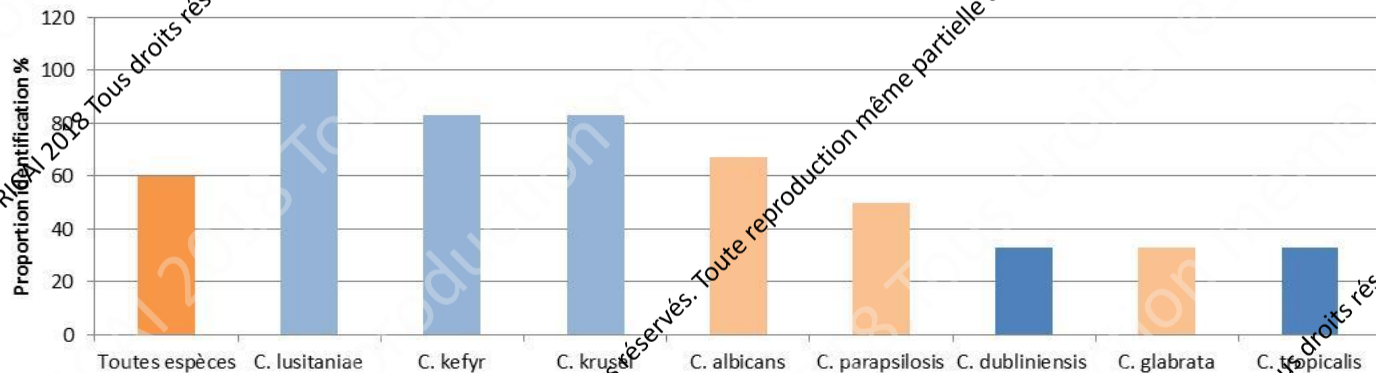
Variable	Odd Ratio (OR)	Intervalle de Confiance (95%)	p
Flacon (référence aérobie)			
Flacon fongique	1,7	0,9-2,9	0,07
Condition incubation (référence gélose sang 35°C)			
Gélose sang sous CO ₂ à 37°C	1,3	0,6-2,5	0,48
Gélose CHROMagar à 30°C	2,5	1,3-5	0,008
Temps incubation (référence 3h)			
4h	4	1,9-9,2	<0,001
5h	21	9-48	<0,001

© RICA I 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

A 5h-milieu chromogène



- Rendement d'identification **global optimisé: 60%**
- Score MALDI-TOF moyen $1,78 \pm 0,06$



	Scores MALDI+TOF
Toutes espèces	1,78
<i>C. lusitaniae</i>	2,03
<i>C. kefyr</i>	1,97
<i>C. krusei</i>	1,92
<i>C. albicans</i>	1,78
<i>C. parapsilosis</i>	1,72
<i>C. dubliniensis</i>	1,64
<i>C. glabrata</i>	1,59
<i>C. tropicalis</i>	1,58

Résultats « optimisés » : peu de data (6) / situation

Conclusion



- Un 1^{er} essai d'évaluation de la culture courte pour identifier les levures
 - Une alternative possible aux technique de lyse
 - Rendement ≈60% SI on respecte les critères d'optimisation
- Des limites / Des améliorations
 - Attendre au moins 5h ; tester des temps plus longs (6h par exemple)
 - Mise en œuvre possible en fonction de quand dans la journée l'hémo-culture se positive
 - Tester d'autres milieux chromogènes Candida
 - Tester plus de souches :
 - Persistance des différences entre espèces?
 - Amélioration performance pour *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*?



RICAI 2018

38ème Réunion Interdisciplinaire
de Chimiothérapie Anti-Infectieuse

Merci pour votre attention!



Pr L Millon



Dr H Gbaguidi-Haore



Dr E Liapis



Dr E Scherer



Dr AP Bellanger