

Intérêt des tests rapides de diagnostic dans la prise en charge des infections à BGN

Pr Alban LE MONNIER

Service de Microbiologie clinique

GH Paris Saint-Joseph, site Hôpital Saint-Joseph

Institut Micalis UMR 1319,

Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech

Déclaration de liens d'intérêt avec les industries de santé en rapport avec le thème de la présentation (loi du 04/03/2002) :

Consultant ou membre d'un conseil scientifique

=> bioMérieux, Pfizer, MSD

Conférencier ou auteur/rédacteur rémunéré d'articles ou documents

=> Astellas, AdvanzPharma, bioMérieux, Mobidiag/Hologic, MSD

Prise en charge de frais de voyage, d'hébergement ou d'inscription à des congrès ou autres manifestations

=> Astellas, AdvanzPharma, bioMérieux, MSD, Pfizer

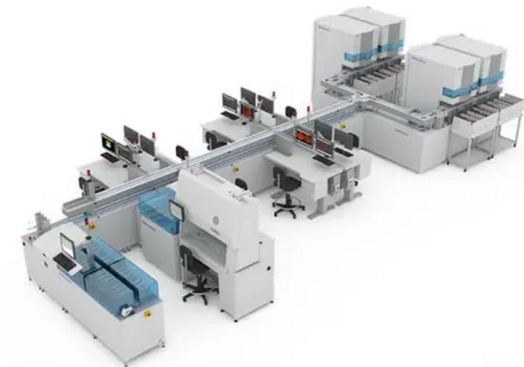
Investigateur principal d'une recherche ou d'une étude clinique

=> Astellas, Abbott, Eumedica, I2A, MSD, Sanofi-Pasteur, ThermoFisher

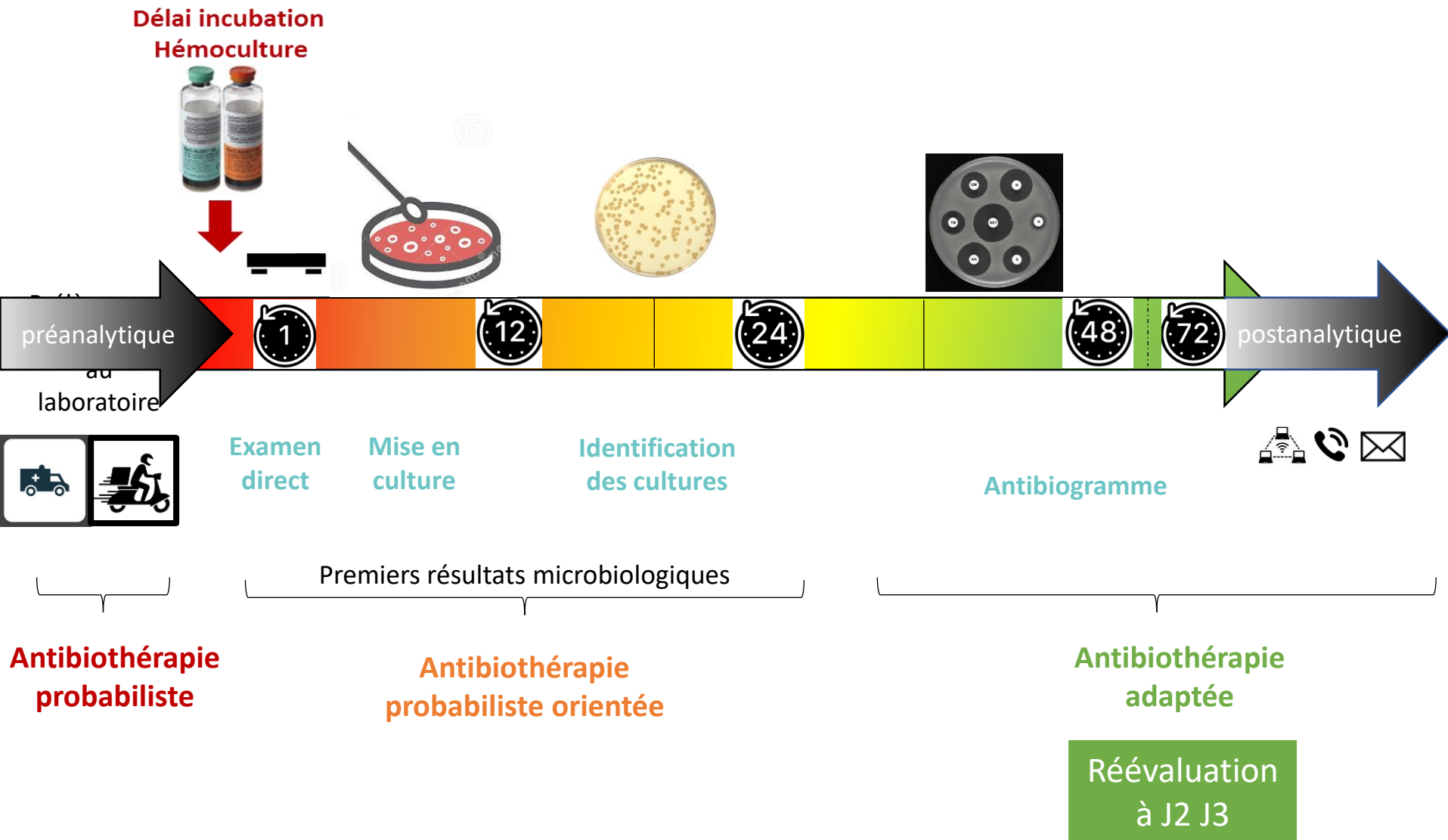
Contexte et enjeux

- **Enjeu du sepsis** : augmentation incidence (47 à 60 millions de personnes / an dans le monde), forte mortalité (=> 11 millions de morts soit 1 toutes les 3 sec) en cas de retard au traitement efficace ;
- **Contexte de l'émergence rapide de la résistance** aux antibiotiques et des bactéries multirésistantes (BMR, BHRe) ;
- **Contexte du bon usage des antibiotiques** => politiques lutte contre l'antibiorésistance dont l'épargne des ATB à large spectre ;
- **(R)évolution des laboratoires de microbiologie** (innovations majeures : MALDI-TOF-MS, PCR multiplexe, séquençage haut débit, automatisation, informatisation, ...).

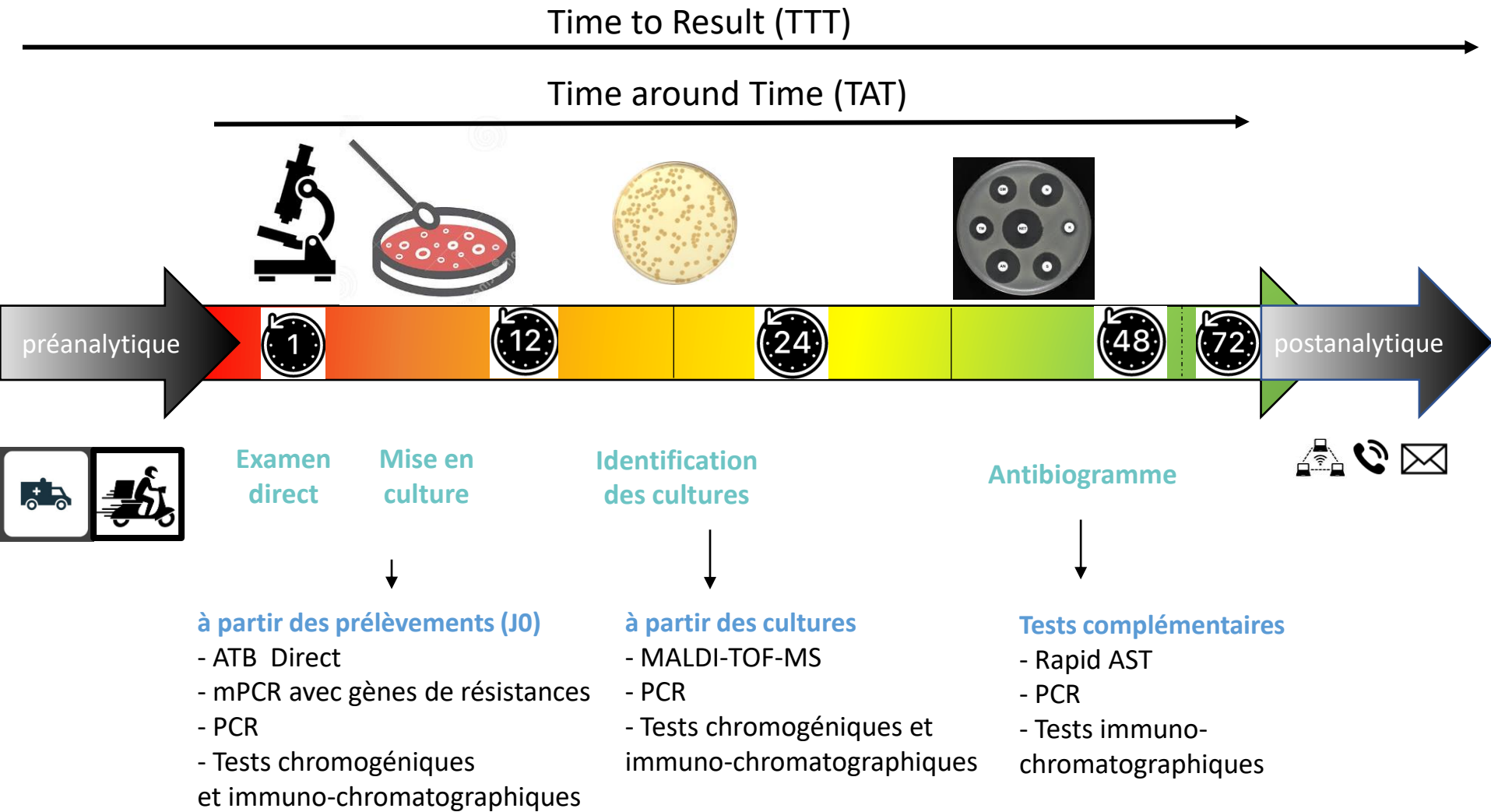
=> Littérature très riche sur l'intérêt des tests diagnostiques à réponse rapide et leur impact clinique ...



Séquences du diagnostic bactériologique conventionnel

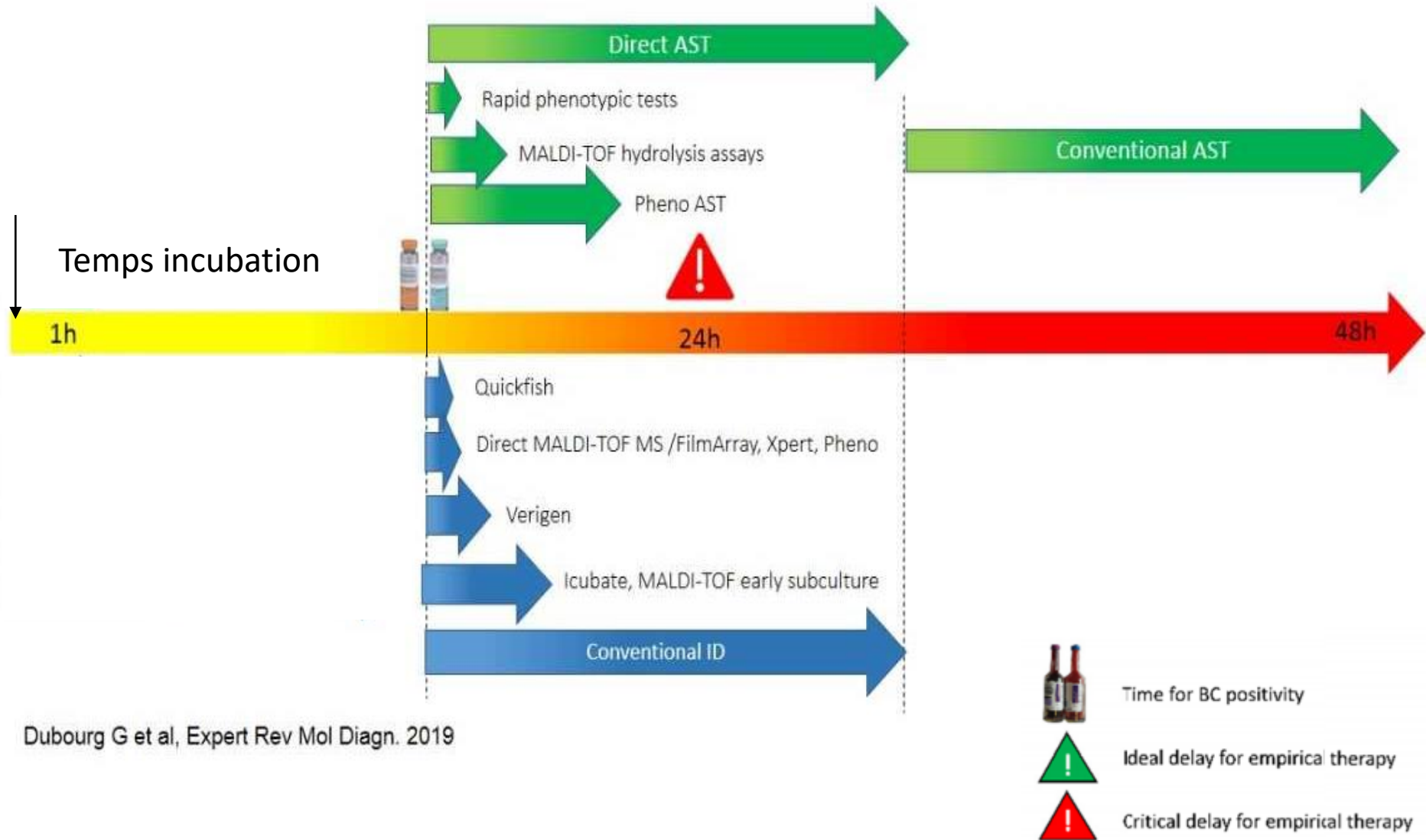


Comment faire plus vite ?



Comment réduire le temps d'analyse (TAT) ?

L'exemple des hémocultures

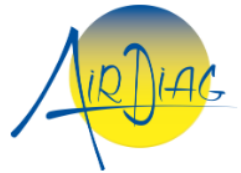




Move healthcare forward.



Groupe Diapor



Diagnostics





Tests Phénotypiques (colorimétriques et ICT)

Méthodes immunologiques (ICT)

Phénotypique et non quantitatif

Applications

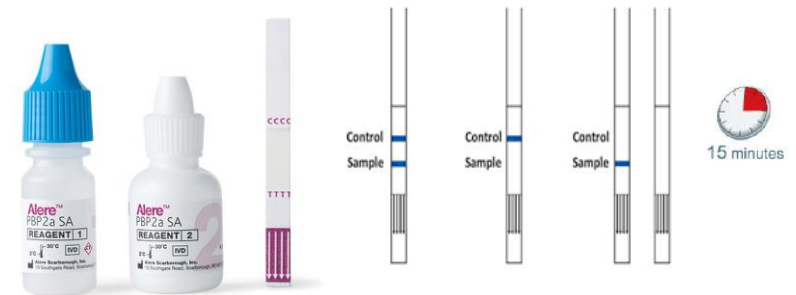
- Détection de la PL2a Staphylocoques
- Détection AG Solubles urinaires (Sp et Lp)
- Détection des carbapénèmases

Modalités de réalisation

- Sur colonies isolées, sur subculture de 4h, liquides biologiques
- Lecture visuelle en quelques minutes
- Coûts raisonnables

Limites

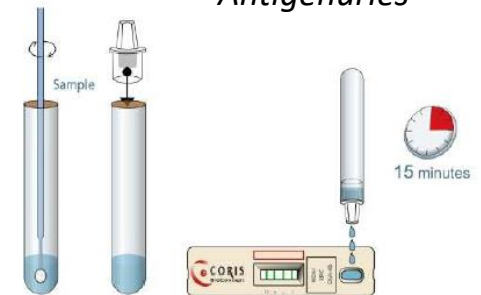
- Lecture subjective
- Tests fermés (prob des mécanismes nouveaux et rares)
- Peu adaptés à une application directement sur des prélèvements ou hémocultures positives



Détection PLP2a

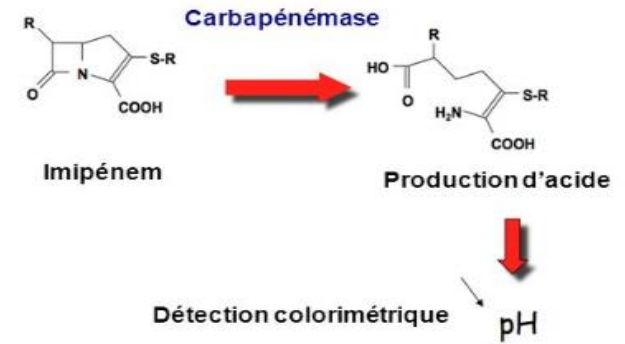


Antigénuries



Détection carbapénémase

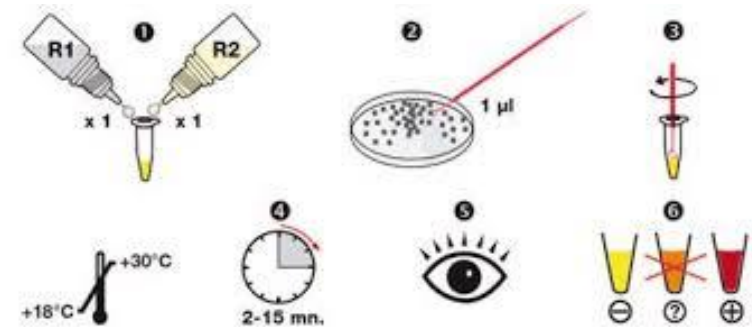
Méthodes chromogéniques



Test d'hydrolyse non ciblés phénotypique et non quantitatif
Substrat chromogénique => produit colorés

Applications

- # Cefinase (pénicillinase)
- Détection des céphalosporinases (BLSE, Hcase)
- Détection des carbapénèmases
- Détection de la résistance à la colistine ...



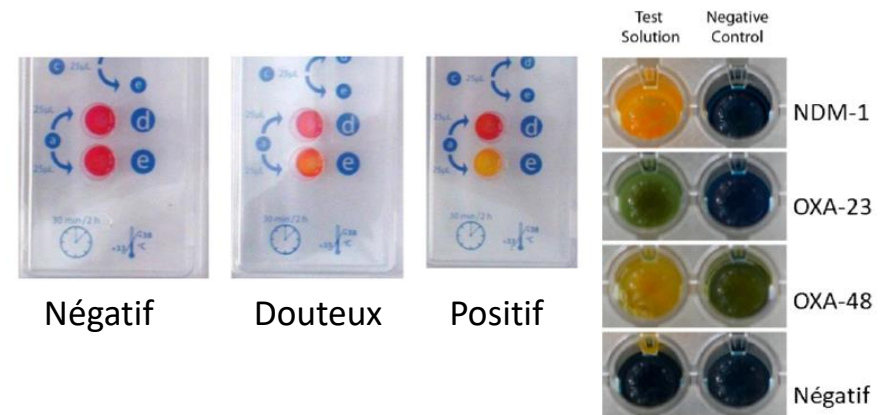
Bêta-Lacta et Bêta-Carba tests

Modalités de réalisation

- Sur colonies isolées
- Basé sur virage d'indicateur coloré
- Lecture visuelle en quelques minutes à 2-4h
- Tests peu coûteux

Limites

- Lecture subjective parfois difficile
- Performances variables (sensibilité limitée, FP et FN)
- Problèmes pour certains variants
- Nécessité d'exprimer un niveau de résistance suffisant ou un fort inoculum !



Rapidec Carba NP test
Blue Carba test

Méthodes phénotypiques réalisées directement sur les prélèvements primaires



Nom	Cibles	Performances sur colonies	Adaptation prélèvement
Beta-Lacta test	BLSE, HCASE, Carbapénèmases	Se 87,7% Spe 99,6% <i>Renvoisé JCM 2014</i>	Urines <i>Gallah JCM 2014</i> <i>Amzalag Infect Dis 2016</i> Hémocultures positives <i>Compain JMM 2015</i> <i>Hasso JCM 2017</i> Aspirations bronchiques <i>Gallah CMI 2018</i>
ESBL-NDP	BLSE	Se 92,6% Spe 100% <i>Nordmann JCM 2012</i>	Urines <i>Dortet JCM 2014</i> Hémocultures positives <i>Affolabi JMM 2017</i>
RAPIDEC Carba NP	Carbapénèmases	Se 96% Spe 96% <i>Poirel JCM 2015</i>	Urines <i>Dortet CMI 2014</i>

- Adaptation des conditions de réalisation et de lecture du test
- Variation des substrats
- Performances analytiques variables selon l'inoculum bactérien

β LACTA test performance for detection of extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative bacilli directly on bronchial aspirates samples: a validation study[☆]

S. Gallah¹, Y. Benzerara¹, J. Tankovic¹, P.-L. Woerther², H. Bensekri³, J.-L. Mainardi^{3,4}, G. Arlet^{1,5,6}, S. Vimont^{1,5,7}, M. Garnier^{5,8,9,*}



Clinical Microbiology and Infection 24 (2018) 402–408

Objectives: Incidence of extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative bacilli (ESBL-PE-GNB)-related infections is worryingly increasing worldwide. ESBL-PE-GNB detection directly on bronchial aspirate samples (BAS) performed for suspected pneumonia may help save empirical carbapenems. Our objectives were to optimize β -LACTA™ test (BLT) realization and evaluate BLT performance for ESBL-

The β -LACTA test detected ESBL-PE-GNB directly on bronchial aspirates positive for GNB on MGSE and/or growing with 10^4 CFU/mL with 100% sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values.

validation cohort, 21 (17%) gave positive BLT (ten in BAS positive and 11 in BAS negative on MGSE). All BLT-positive BAS grew with ESBL-PE-GNB, including five hyper-L2-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains. BLT detected ESBL-PE-GNB directly on clinical BAS positive for GNB on MGSE and/or growing with $\geq 10^4$ CFU/mL with 100% sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values. *Conclusions:* BLT is an accurate tool for ESBL-PE-GNB detection directly on BAS. Further studies are needed to evaluate the impact of BLT-guided early antimicrobial de-escalation strategies. **S. Gallah, Clin Microbiol Infect 2018;24:402**

RCT en cours (NCT03147807)

BLUE-Carba

N°EudraCT: 216-A00941-50 / P 150940

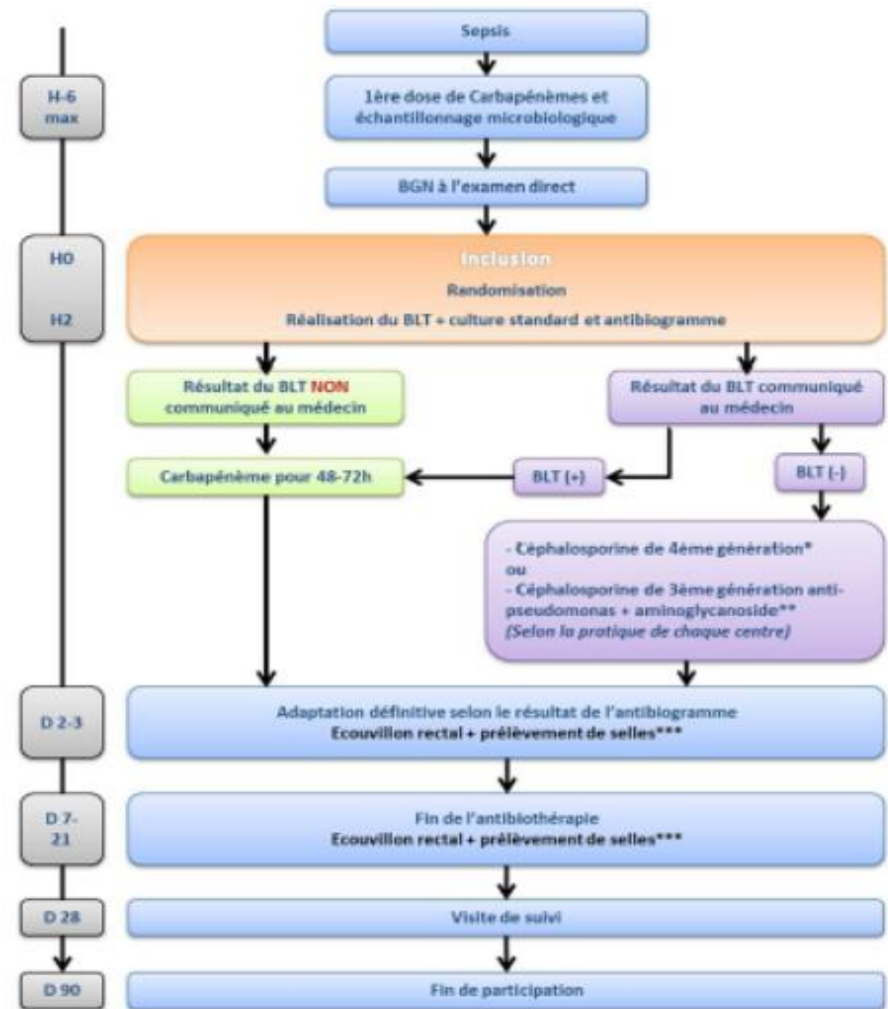
Utilisation du bêtalacta[®] test sur le culot bactérien issu de l'examen direct positif à bacille à gram négatif pour la désescalade précoce de l'antibiothérapie probabiliste par carbapénèmes au cours des infections respiratoires, urinaires et bactériémies en réanimation.

PHRC Blue Carba (analyse en cours)

[BMJ Open](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-024561). 2019 Feb 19;9(2):e024561.

doi: 10.1136/bmjopen-2018-024561.

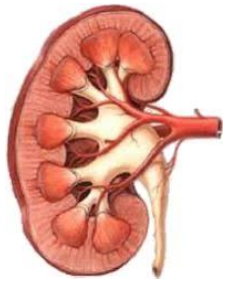
Multicentre randomised controlled trial to investigate usefulness of the rapid diagnostic β LACTA test performed directly on bacterial cell pellets from respiratory, urinary or blood samples for the early de-escalation of carbapenems in septic intensive care unit patients: the BLUE-CarbA protocol.



* Céfépime

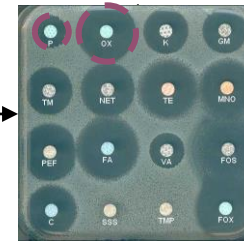
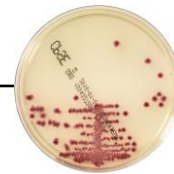
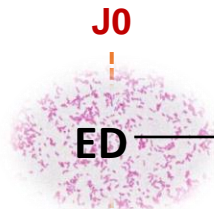
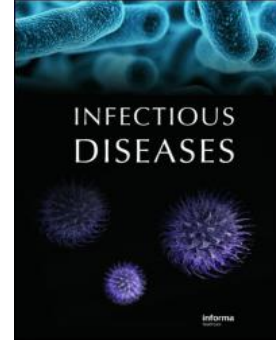
** Ceftazidime + amikacine

*** Prélèvement de selles pour 75 patients/ bras en Île-de-France



Impact of the beta-lacta test on the management of urinary tract infections at the emergency department

Assaf Mizrahi^{a,b,*}, Diane Naouri^{c*}, Claire Hobson^d, Jonas Amzalag^a, Benoît Pilmis^{b,d}, Carine Couzigou^{d,e}, Olivier Ganansia^e and Alban Le Monnier^{a,b}



Etude prospective, monocentrique
Impact théorique
203 patients avec suspicion clinique d'infections urinaires inclus dont 43% de PNA et 21% de prostatites

BLT sur les culots urinaires avec ED positif

94,4% des BLSE détectées

Quand résistance à C3G => 73% des traitements 1^{ère} ligne non adaptés


$\Delta t = 51,3h$

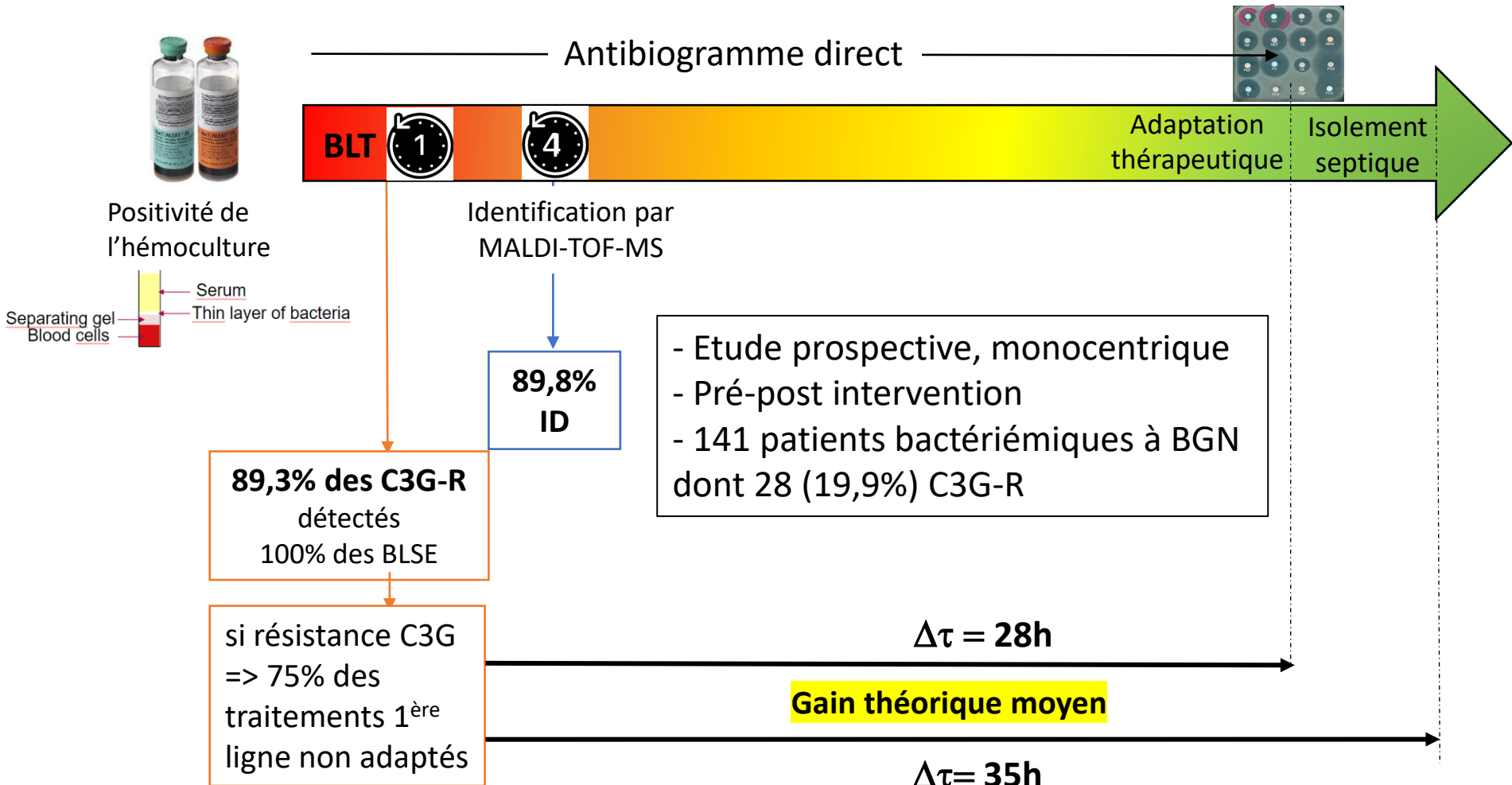
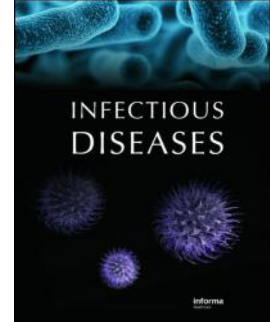
Gain théorique moyen

$\Delta t = 52,4h$



Clinical impact of rapid bacterial identification by MALDI-TOF MS combined with the bêta-LACTA™ test on early antibiotic adaptation by an antimicrobial stewardship team in bloodstream infections

A. Mizrahi^a , J. Amzalag^a, C. Couzigou^b, G. Péan De Ponfilly^a, B. Pilmis^b and A. Le Monnier^a

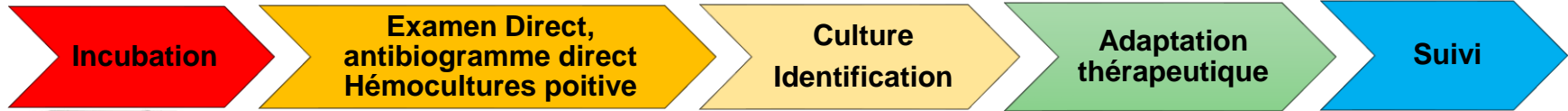


Early empirical antibiotic therapy modification in sepsis using β -Lacta test directly on blood cultures

Assaf Mizrahi, Françoise Jaureguy, Héloïse Petit, Gauthier Péan de Ponfilly, Etienne Carbonnelle, Alban Le Monnier, Jean-Ralph Zahar, Benoît Pilmis

Etude bicentrique, prospective, interventionnelle (ASTeam)
=> 170 épisodes de bactériémies à BGN

Antibiogramme direct



BLT MALDI-TOF-MS

Sensitivity = 79.2%
Specificity = 99.32%
PPV= 95%; NPV= 96.7%

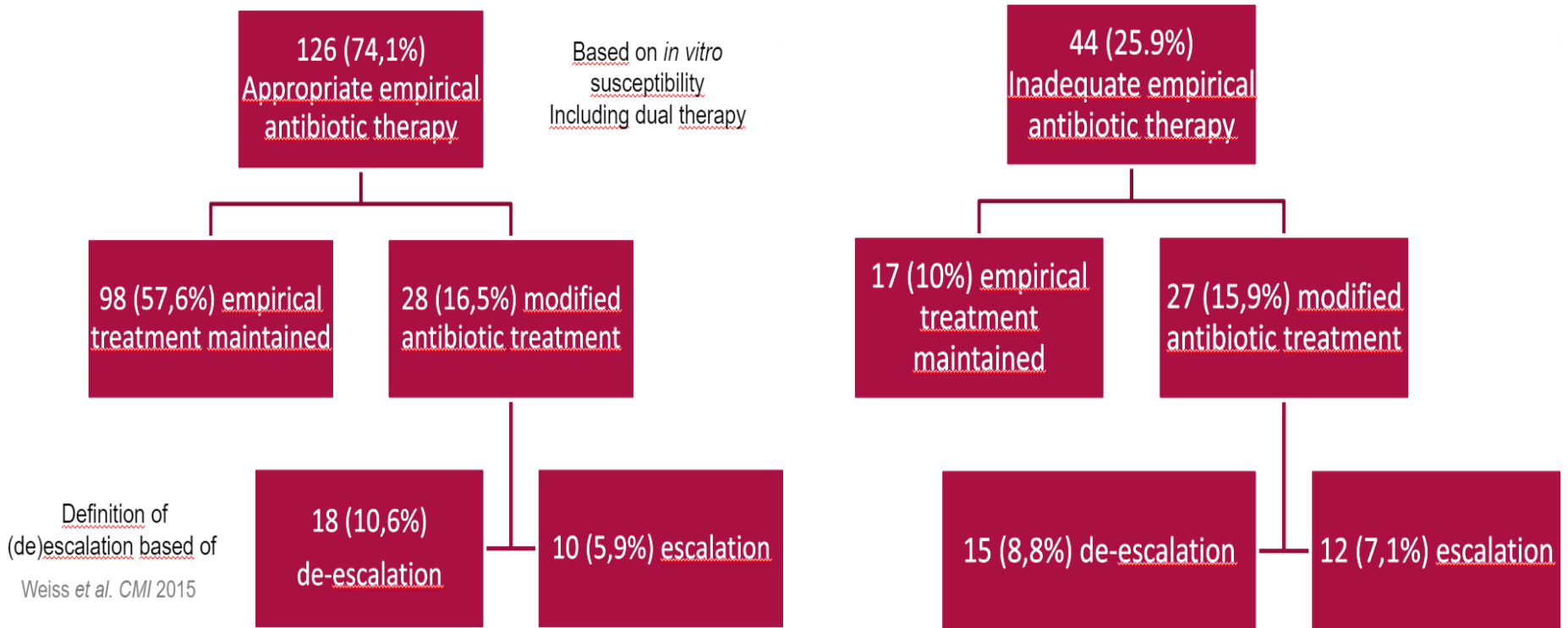
100% détection des BSLE
Delta délais confirmés
Importance du couplage Ident/BLT



Serum

Thin layer of bacteria

Separating gel
Blood cells



Adaptation précoce antibiothérapie guidé par BLT dans 55 cas (32,4%)

Limites à connaitre :

Sensibilité médiocre pour céphalosporinases déréprimées, pénicillinases HN, TRI et Oxa ...
Importance de le combiner à d'autres tests rapides (RAST, MHR, ...) => to fill the gap of BLT



MALDI-TOF-MS

Applications du MALDI-TOF-MS

Identification bactérienne et fongique

Sur colonies isolées

Directement à partir des prélèvements primaires :

- Ultrarapide : utilisation de kit extraction à partir de culot de centrifugation (hémocultures positives, urines)
- Rapide : sur subculture précoce de 4h (hémoculture, etc.)

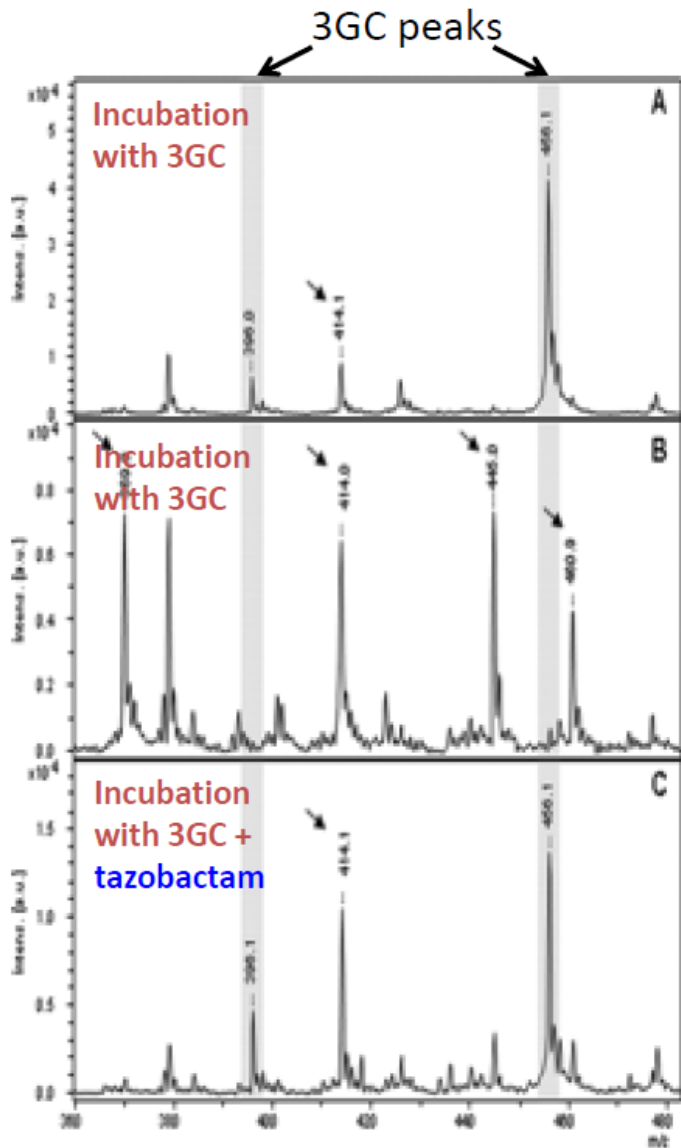
Etude de la clonalité, comparaison de souche (en développement)

Etude de la sensibilité aux antibiotiques par détection

- de clones de résistants
- de la croissance bactérienne en présence d'ATB (MBT - ASTRA)
- de protéines responsables de la résistance (MS/MS) (ex PLP2a et SARM)
- de la modification de la cible d'une ATB (étude prospective en cours, Colistine)
- de la dégradation d'un ATB sous action d'une bêta-lactamase



Détection rapide des BLSE et Case



No ESBL

À partir de colonies isolées

Li et al Med Sci Monit basic Res 2014

A partir de surnageant d'hémocultures positives

Oviano et al CMI 2014

ESBL

Impact sur workflow du laboratoire

Besoin d'harmonisation car difficultés de standardisation

ESBL

=> Système commercial marqué CE-IVD

Détection rapide des carbapénèmases



MBT STAR-BL
Software Module

Bacteria: loop 1-10 μ L

Carbapenem
solution



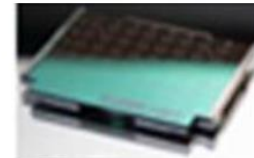
Incubation 37° C
20 min – 4h



Centrifugation
2 min 12000G



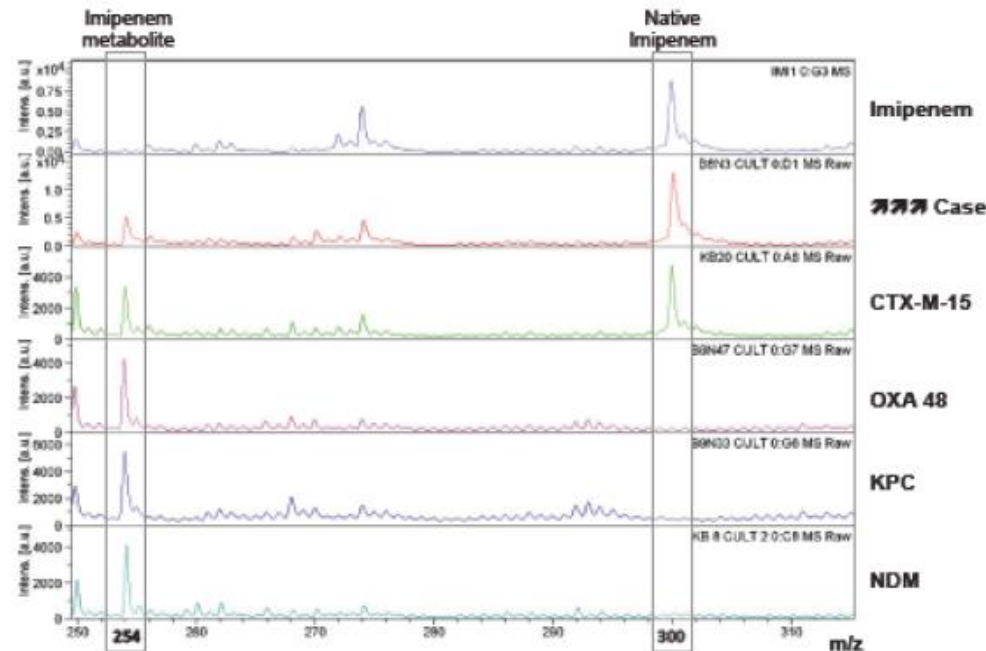
Surpennatant

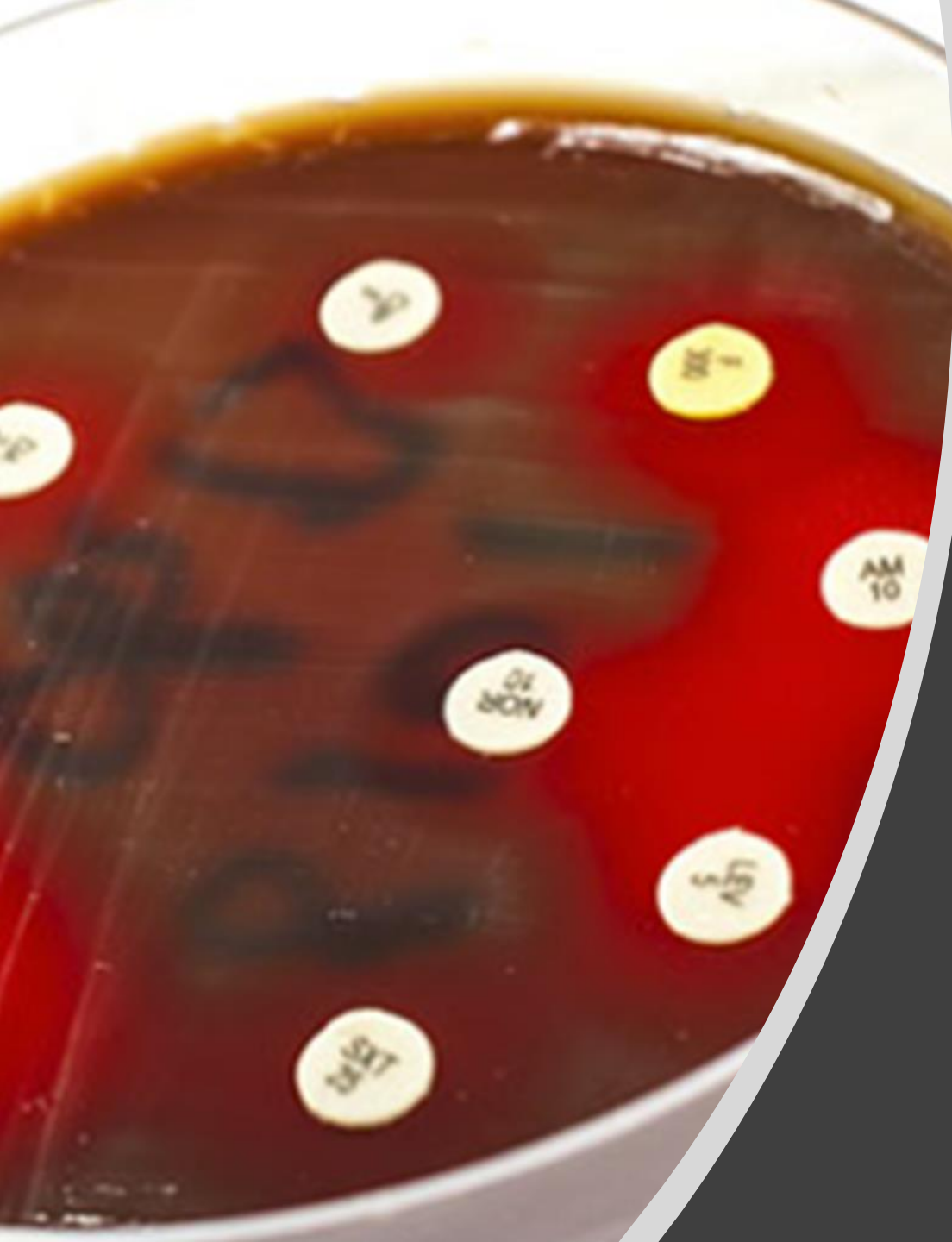


Target :
1 μ L supernatant + 1 μ L matrix
STAR-BL



- Rapide et coût-efficace
- Système commercialisé avec software module adapté (MBT STAR-BL)
- Il existe maintenant d'autres solutions développées localement (*in-house*) ou commercialisées ...





Lecture
précoce des
antibiogrammes

Rappel antibiogramme standard

Gold standard : antibiogramme par diffusion en milieu gélosé => **lecture 18-20h**

Estimation de la CMI par mesure des diamètres d'inhibition

=> Catégorisation en SIR (selon recommandations CLSI, EUCAST/CA-SFM)

Objectifs

- Confirmer le diagnostic d'espèce ou de genre par la mise en évidence des **résistances naturelles attendues**,
- Mettre en évidence les **résistances acquises** par la bactérie,
- Mise en évidence de **mécanismes de plus en plus complexes**,
- Outil de surveillance épidémiologique de la résistance



RAST from EUCAST

Antibiogrammes à lecture précoce

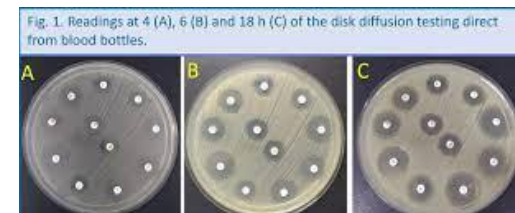
L'EUCAST propose depuis fin 2018 des breakpoints spécifiques pour une lecture précoce à 4h, 6h et 8h pour la réalisation d'antibiogrammes rapides (RAST) directement à partir de flacons d'hémocultures positifs

=> Evaluation des performances dans 55 laboratoires du Nord et Sud de l'Europe
=> En pratique Lecture difficile à 4h mais résultats intéressants à 6h et surtout 8h

Table 2 Number of disks with unclear inhibition zone edge or zone within ATU

Reading time	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	ATU	UZE	ATU	UZE	ATU	UZE
4-h reading	121	47	37	36	N/A	N/A
6-h reading	97	3	26	6	19	82
8-h reading	91	0	26	0	18	6

ATU, area of technical uncertainty; UZE, unclear zone edge; N/A, not applicable



Soo YT *et al.* EJCMI 2020

- Limites :**
- Piperacilline-tazobactam et *E. coli* !?
 - Se limite à quelques combinaisons bactérie/antibiotique ...
 - En attente d'études d'impact clinique et medico-économiques

Antibiogramme direct à partir du prélèvement



Impact de l'antibiogramme réalisé directement sur les prélèvements respiratoires profonds des patients suspects de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) tardive (≥ 5 jours) en réanimation sur l'adéquation du traitement antibiotique à J1 épargnant les carbapénèmes

AB DIRECT 2

(PHRC en cours, 6 centres, coordination Bichat)

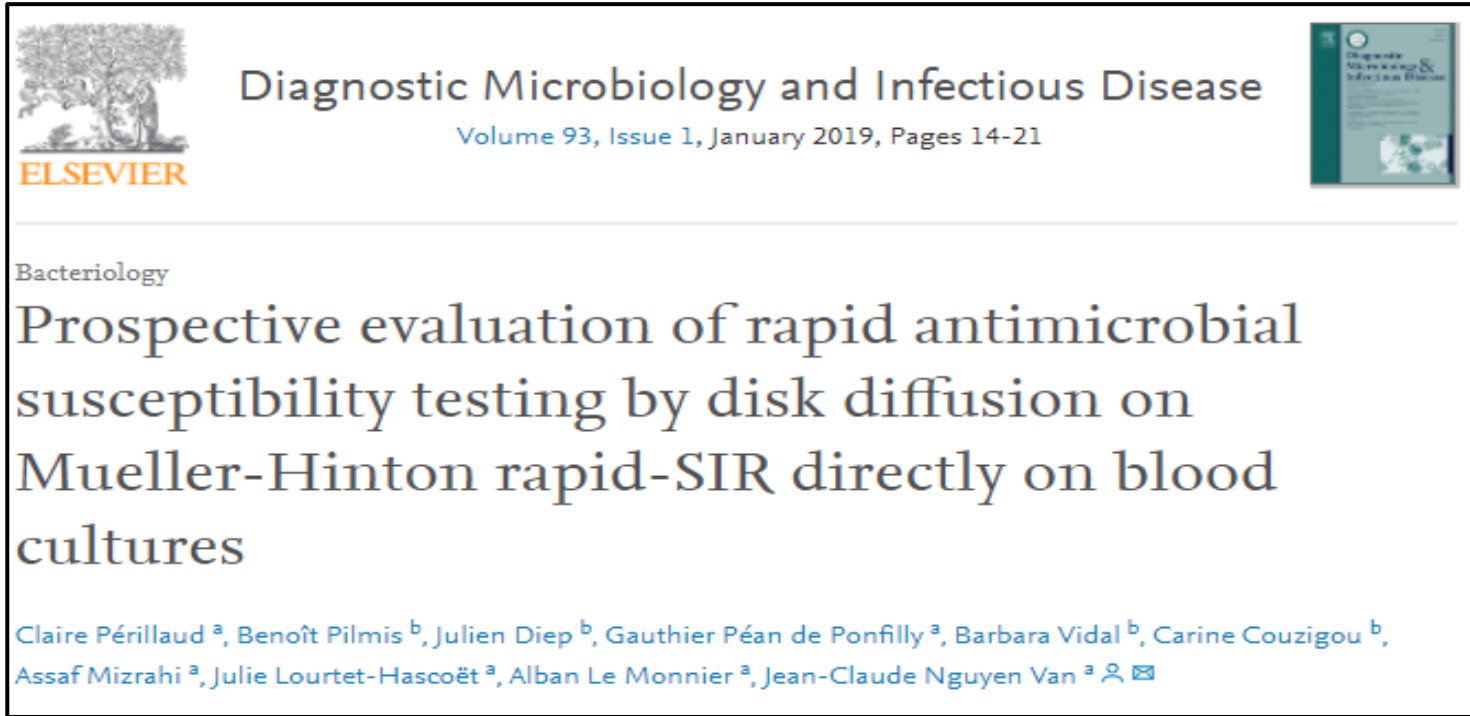
Design : Etude multicentrique, prospective, randomisée chez patients de réanimation ventilés suspects de PAVM à BGN (ED positif ≥ 10 formes/lame)

Objectif principal : impact d'une stratégie utilisant la spectrométrie couplée à l'antibiogramme direct (S-AB-D) dans des prélèvements respiratoires profonds sur le taux d'antibiothérapies adéquates épargnant l'utilisation des carbapénèmes en comparaison d'une stratégie usuelle spectrométrie et antibiogramme conventionnel (S-AB-C) en cas de PAVM tardive due à un bacille à Gram négatif.

Antibiogrammes : MHR

Performance of rapid antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion on MHR-SIR agar directly on urine specimens

Claire Périllaud-Dubois¹ · Benoît Pilmis² · Julien Diep² · Gauthier Péan de Ponfilly¹ · Simon Perreau¹ · Louise Ruffier d'Epenoux¹ · Assaf Mizrahi¹ · Carine Couzigou^{2,3} · Barbara Vidal^{2,3} · Alban Le Monnier¹ · Jean-Claude Nguyen Van¹



< 8 heures sur gélose MHR

18 heures sur MH à partir de la culture

Lecture de l'antibiogramme < 8h et après 18 heures d'incubation

Concordance (*Categorical agreement*) :

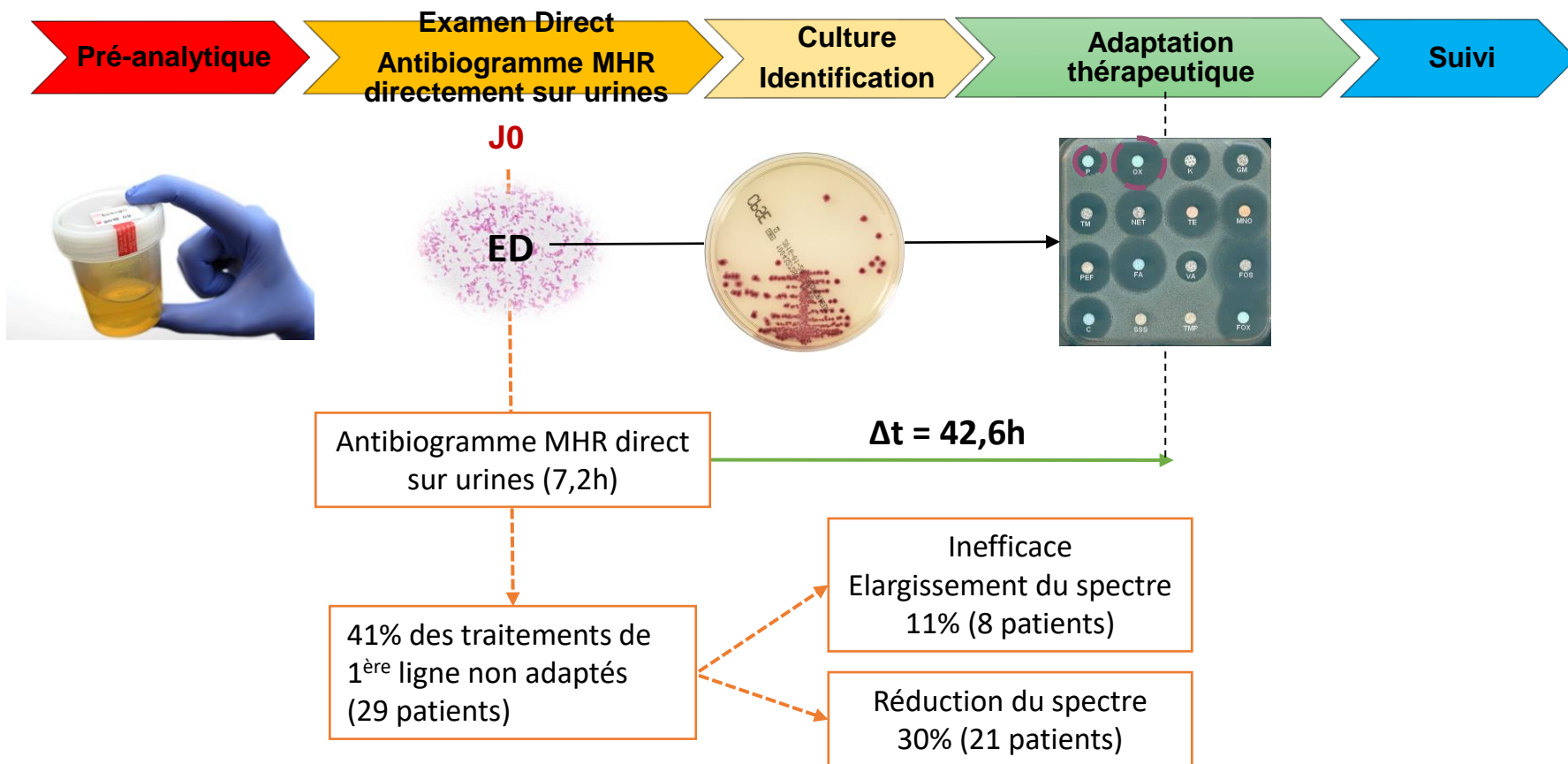
97,4 % pour les BGN / > 98% pour les Staphylocoques



Clinical impact of rapid susceptibility testing on Mueller-Hinton Rapid-SIR directly from urine specimens

Benoît Pilmis¹ · Olivier Jiang² · Michael Thy¹ · Steven Defarge² · Assaf Mizrahi² · Carine Couzigou¹ · Barbara Vidal¹ · Alban Le Monnier² · Jean-Claude Nguyen Van² 

Etude prospective monocentrique
Comparaison aux méthodes standards
70 patients avec infections urinaires inclus
dont 71% de PNA, 21% d'infections urinaires basses compliquées et 7% de prostatites





Clinical impact of rapid susceptibility testing on MHR-SIR directly from blood cultures

Benoît Pilmis¹, Michael Thy¹, Julien Diep¹, Sophie Krob¹, Claire Périllaud², Carine Couzigou^{1,3}, Barbara Vidal^{1,3}, Assaf Mizrahi², Julie Lourtet-Hascoët¹, Alban Le Monnier² and Jean-Claude Nguyen Van^{2*}

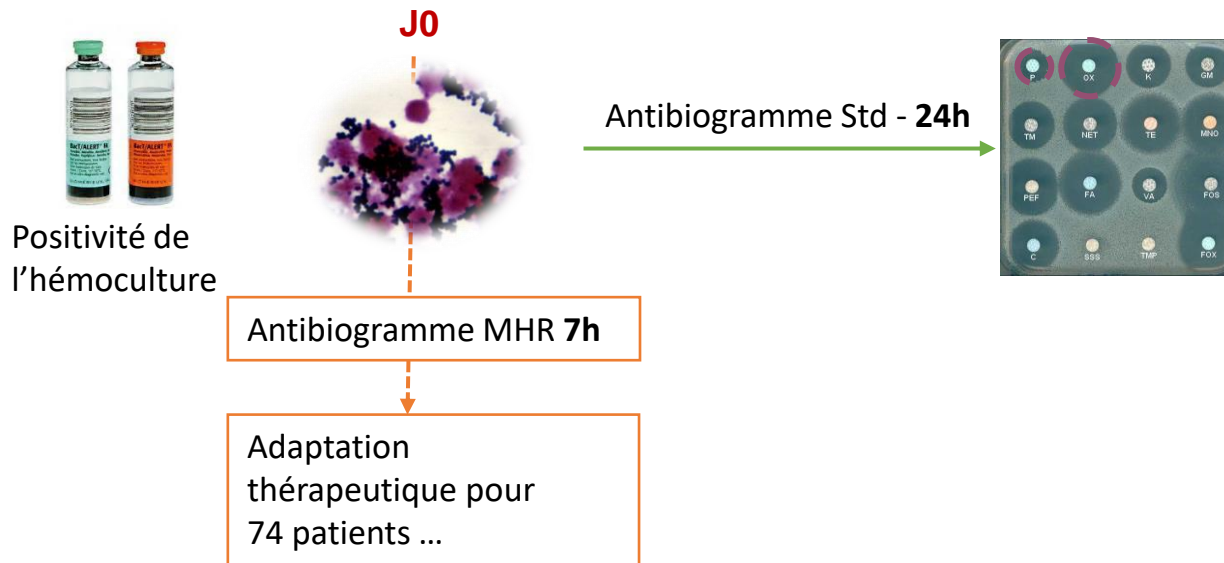
J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkz271

Etude prospective (janvier à août 2018), monocentrique, interventionnelle (ASTeam) avec comparaison aux méthodes standards

167 patients bactériémiques

-134 à BGN dont 12 (9%) BLSE

- 33 à *S. aureus*

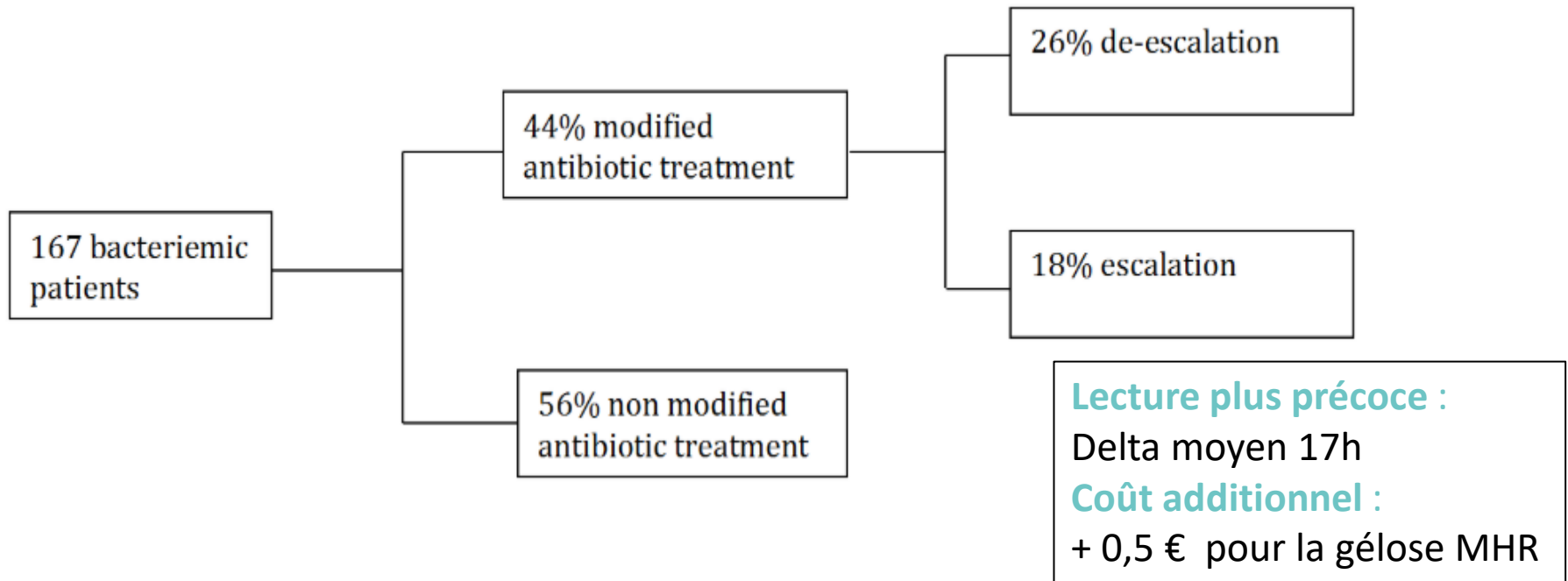


Evaluation de l'impact clinique d'une lecture précoce < 8H



167 épisodes de bactériémies consécutives

79% à Entérobactéries dont 12 BLSE et 21% à *Staphylococcus aureus*



Impact significatif sur adaptation précoce des antibiothérapies et mise en isolement mais importance de l'intervention de l'antimicrobial stewardship

Lecture précoce des antibiogrammes (RAST)

Antibiogramme conventionnel lu précocement (MH (RAST from EUCAST) ou MHR)

- Rapide / Souplesse et adaptabilité : choix du panel d'antibiotiques à tester non captif
- Coût-efficace : rappel antibiogramme ~5€ (MH ou MHR + disques antibiotiques)
- Possible directement à partir des prélèvements cliniques (urines et directement dans les hémocultures positives)

Quelques limites

- Nécessite une standardisation de la lecture automatisée séquentielle (SIR-SCAN auto)
- Optimisation des caméras et IA pour traiter les images
- Limité sur quelques combinaisons bactéries/antibiotiques (RAST from EUCAST) et non validé pour Pyo ou streptocoques (MHR)

=> Encore peu de recul besoin de large étude d'impact clinique et médico-économique prospective multicentrique en vie réelle

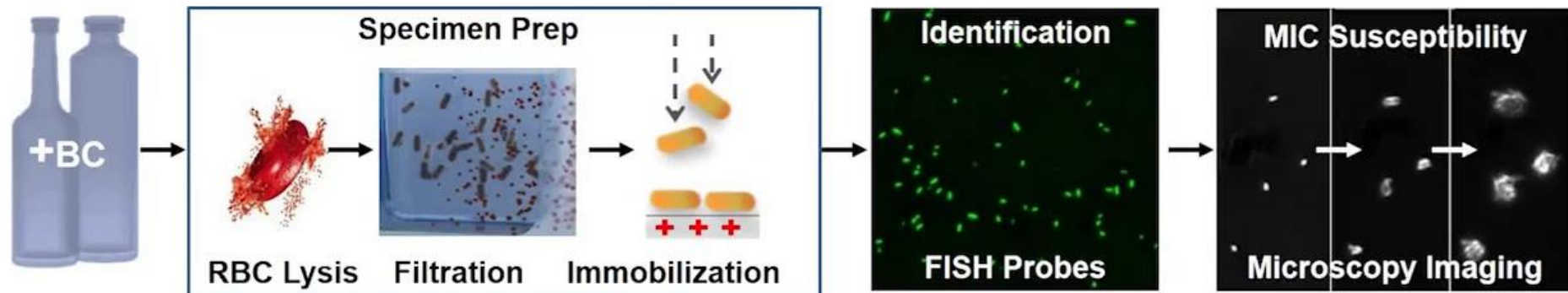
Systemes automatisees d'antibiogrammes rapides



Accelerate Pheno System



- A partir des surnageants d'hémoculture positive
- TAT ~5 min
- Identification bactérienne et levures par méthode FISH (sondes universelles et spécifiques)
- Antibiogramme avec lecture automatisée au microscope (suivi de la cinétique de croissance)



=> Résultats préliminaires d'identification disponible en 1h30
=> Résultats complets avec de véritables CMI en 7h

Accelerate Pheno System



Evaluation

- Performances analytiques

Prospective sur 125 flacons hémocultures (dont 10 polymicrobiennes)

Entérobactéries 70%, *Pseudomonas aeruginosa* 8%, ...

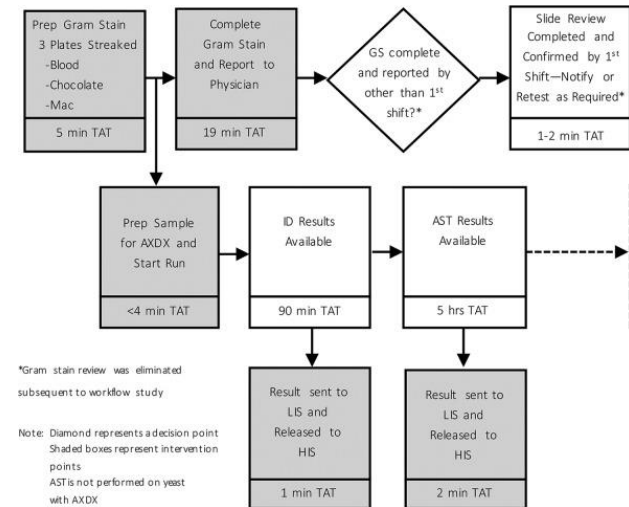
=> 96,4% de concordance / antibiogramme conventionnel sur subculture

Marschal JCM 2017 - Pancholi JCM 2018

- Impact organisationnel

Amélioration significative workflow du labo et des TTT

Quelques études d'impact clinique et d'évaluation médico-éco



Charnot-Katsikas JCM 2017

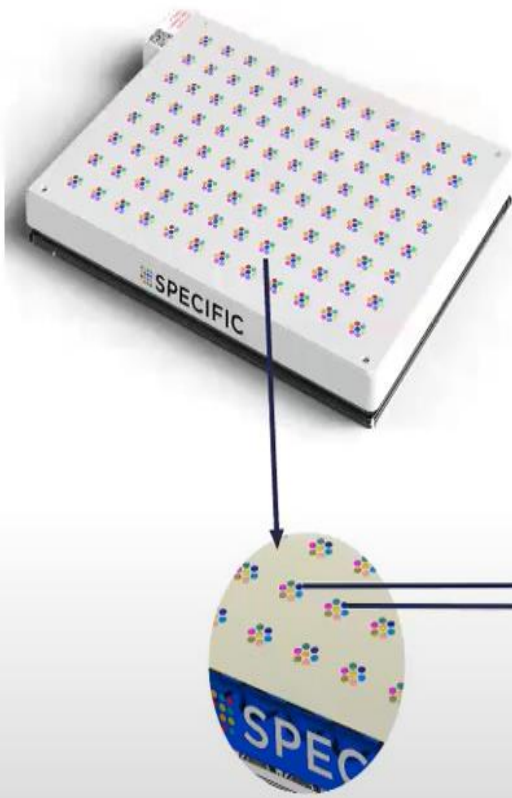
Limites

- Un seul test à la fois
- Plateforme compacte mais encombrante
- Panel d'antibiotiques captif
- Pas adapté au nombre d'hémoculture positive gérées au quotidien => modularité 1 à 4
- Prix au test : ~350 €

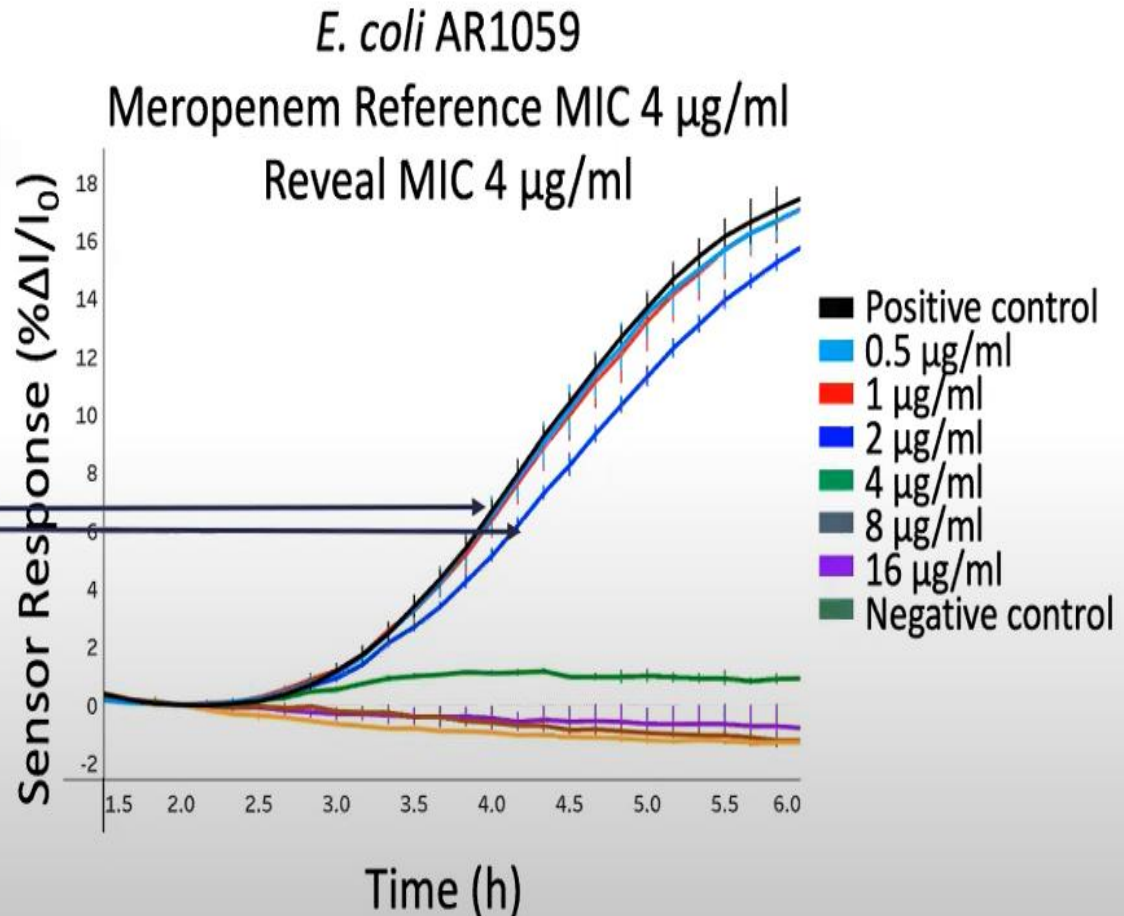
Principe du dispositif REVEAL®



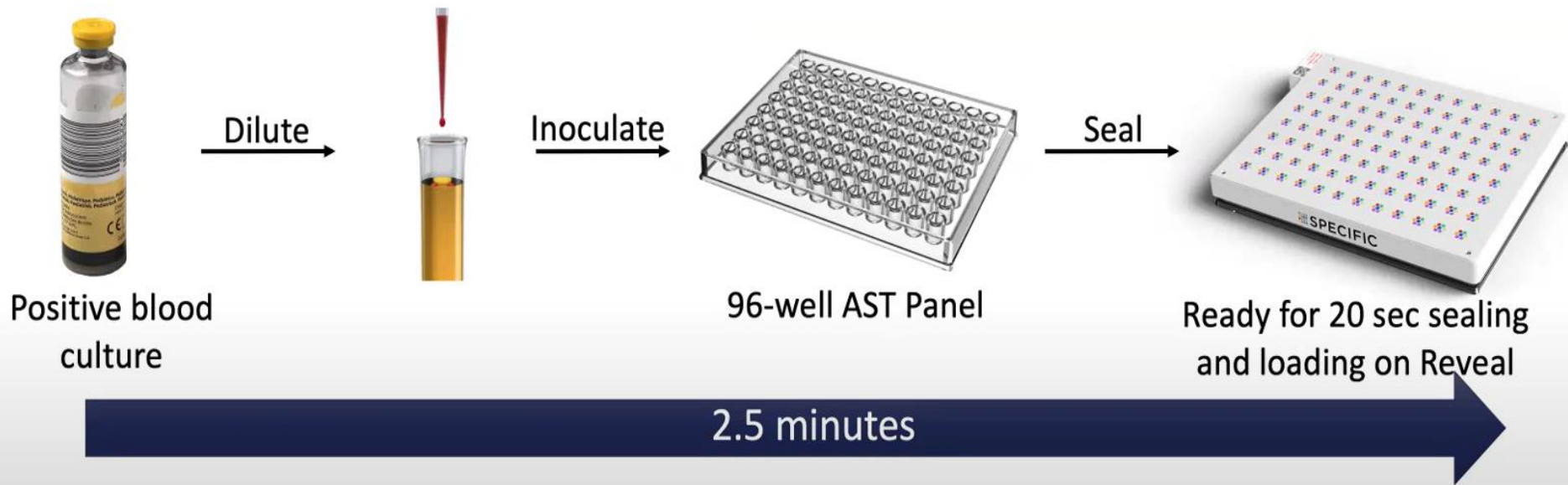
- Detection of Volatile Compounds Emission during bacterial growth



SPECIFIC REVEAL®
RAPID AST SYSTEM



Processus au laboratoire du dispositif REVEAL®



Work flow overview

Positive BC



Gram stain



Inoculate



Agar plates

<30min



4-6 h



≈5 h (fully loaded)



Rapid MALDI ID ≈4h

Reveal workflow: Same shift ID-AST-MIC

16-24 h



Disk Diffusion from blood culture: Next day ID-AST

40-48 h



Disk Diffusion from Isolate: Second Day ID-AST (+MIC)

Overall performance of Reveal AST

Performance by antibiotic assayed

Antibiotic	Total	#S	#I	#R	%CA	mE	ME	VME
Amikacin	83	78	2	3	100%	0	0	0
Aztreonam	71	41	3	27	95.8%	2	1	0
Cefepime	81	52	2	27	97.5%	2	0	0
Cefotaxime	67	35	2	30	97.0%	2	0	0
Cefoxitin	54	52	0	2	100%	0	0	0
Ceftazidime	82	50	2	30	98.8%	1	0	0
Ceftolozane_tazobactam	16	14	0	2	100%	0	0	0
Cefuroxime	51	31	0	20	100%	0	0	0
Ciprofloxacin	83	55	3	25	90.4%	3	5	0
Ertapenem	64	62	0	2	100%	0	0	0
Gentamicin	83	65	0	18	100%	0	0	0
Imipenem	82	78	1	3	97.6%	2	0	0
Levofloxacin	83	58	4	22	97.6%	2	0	0
Meropenem	83	81	1	1	97.6%	1	1	0
Nitrofurantoin	33	32	0	1	100%	0	0	0
Piperacillin	82	27	1	54	97.6%	1	1	0
Piperacillin_tazobactam	81	65	5	11	92.6%	5	0	1
Tobramycin	83	63	2	18	98.8%	1	0	0
Tri_sulfamethoxazole	67	33	1	33	97.0%	1	1	0

Categorical agreement : 97.5%

minor Errors (mE) 1.7% (23/1329)

Major errors (ME) 0.9% (9/979)

Very Major Errors (VME) 0.3% (1/329)

- Performances intéressantes dans les 5h
- A venir de nouveaux panels ATB avec de nouveaux range de CMI (0,125 – 64 mg/L)
- Mais pas d'identification

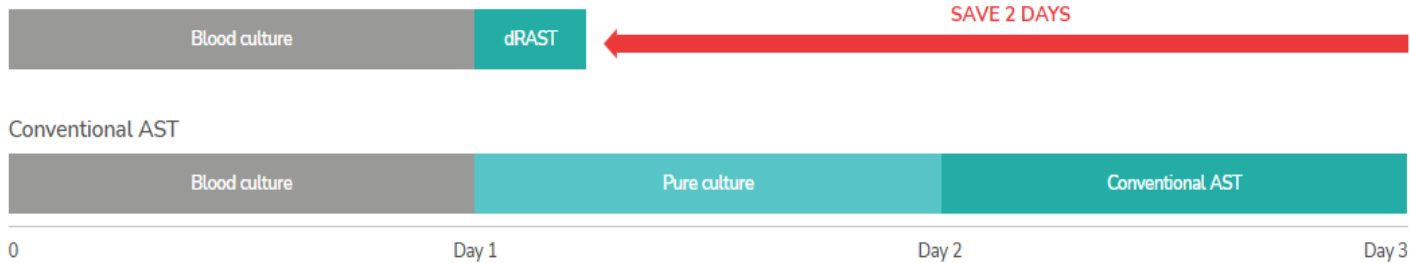
dRAST™ Quantamatrix

Direct & Rapid Antimicrobial Susceptibility Test

Technologie de microfluidique / analyse d'image microscopique
A partir de flacons d'hémoculture
Résultats de CMI en 4h
2 panels: 1 Gram Neg. + 1 Gram Pos.

dRAST™ from PBC

* AST: Antimicrobial Susceptibility Test



- Technologie éliminant le besoin d'un isolat pur,
 - Système tout intégré avec temps de préparation réduit,
 - Pas de maintenance quotidienne,
 - 12 tests simultanés en Random Access,
 - Système expert avec choix possible des guidelines.
- Mais
- pas d'identification
 - à quel cout ??



CE-IVD, MFDS KOREA

CE-IVD, MFDS KOREA



dRAST™ Quantamatrix

Panel Gram negatif

EUCAST panel Gram Positive

EUCAST panel Gram Negative

CLSI panel Gram Positive

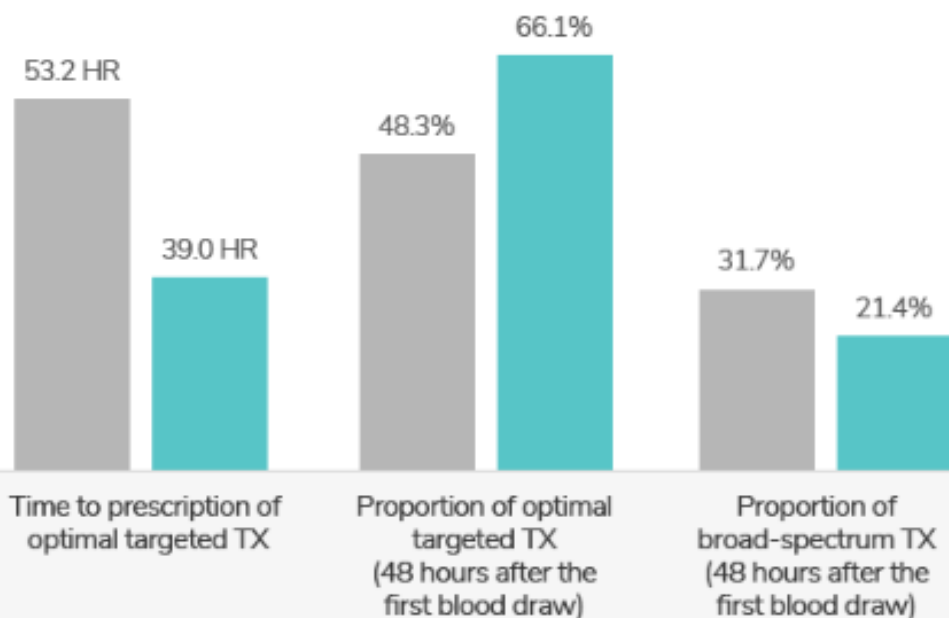
CLSI panel Gram Negative

	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
Amikacin	✓	✓	✓			
Amoxicillin / Clavulanic acid	✓					✓
Ampicillin	✓					
Cefepime	✓	✓	✓	✓	✓	
Cefotaxime	✓		✓			
Cefotaxime/Clavulanic acid	✓					
Ceftazidime	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ceftazidime / Avibactam	✓	✓				
Ceftazidime/Clavulanic acid	✓					
Ciprofloxacin	✓	✓	✓	✓		
Colistin	✓	✓	✓			
Gentamicin	✓	✓	✓			
Imipenem	✓	✓	✓		✓	✓
Levofloxacin	✓	✓	✓	✓	✓	
Meropenem	✓	✓	✓		✓	✓
Piperacillin	✓	✓	✓			
Piperacillin / Tazobactam	✓	✓	✓			
Trimethoprim / Sulfamethoxazole	✓		✓	✓	✓	✓

EUCAST panel: 18 Gram-positive , 17 Gram-negative antibiotics with multiple concentrations

Useful for implementation of antimicrobial stewardship

■ Conventional AST Group
■ Rapid AST Group (using dRAST)



Time to initiation of optimal, targeted antimicrobials decreased by 14 hours (39.0 hrs vs 53.2 hrs)

Proportion of patients receiving optimal, targeted treatment at 48 hours from the first blood draw was higher in the dRAST group (66.1%) compared to the conventional AST group (48.3%)

Proportion of patients receiving broad-spectrum treatment at 48 hours was lower in the dRAST group (21.4%) compared to the conventional AST group (31.7%)

Kim et al., JAC 2019

Kim et al., Journal of Medical Microbiology 2018

Kim et al., Clin Microbiol Infect. 2021



Biologie Moléculaire (PCR et mPCR)

Biologie moléculaire

PCR spécifiques et universelle (PCR rADN 16S)

Cibles spécifiques pour l'identification

Gènes de résistance

- PCR « EPC » : OXA-48-like (dont OXA-181), KPC, NDM, VIM, IMP
- PCR *mcr1* : résistance à la colistine

Au final assez peu de cibles spécifiques des BGN

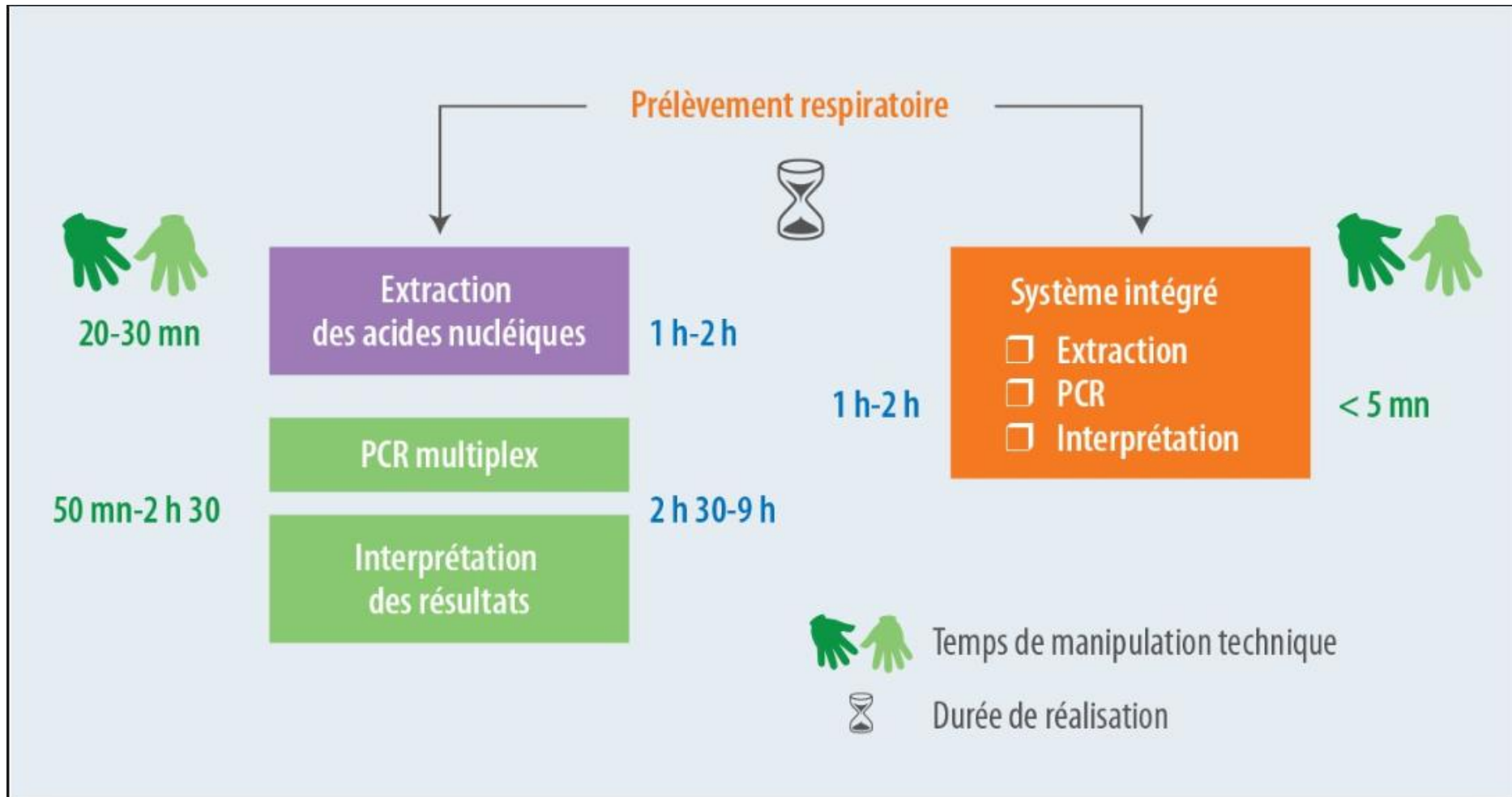
PCR mutliplexe (mPCR) ou PCR « syndromique »

=> Identification agents causal et de quelques résistances ...

De nouveaux équipements pour la PCR multiplexe

Plateau technique de biologie moléculaire

Plateforme intégrée, tout-en-un



Approche syndromique adapté au sepsis (panels bactériémie/fongémie BCID)



	Unyvero	FilmArray BC	ePlex
Cibles	<p>26 cibles bactériennes</p> <p>9 cibles fongiques</p> <p>16 gènes de résistance <i>mecA, mecC, vanA, vanB</i> <i>CTX-M, KPC, NDM, VIM, IMP, OXA, Aac(6')aph(2''), aacA4, ermA</i></p>	<p>19 cibles bactériennes</p> <p>5 cibles fongiques</p> <p>3 gènes de résistance <i>mecA, vanA/B, KPC</i></p>	<p><u>Panel BCID-GramPos</u> 20 cibles 4 gènes de résistance <i>mecA, mecC, vanA, vanB</i></p> <p><u>Panel BCID-GramNeg</u> 21 cibles 6 gènes de résistance <i>CTX-M, KPC, NDM, VIM, IMP, OXA</i></p> <p><u>Panel BCID-Fungi:</u> 16 cibles</p>
Méthode	PCR multiplexe	PCR nichée automatisée	PCR multiplexe micro-fluidique + eSensor
Délai de résultat	≈ 5h30 heures	≈ 1h10	≈ 1h10
Etude d'impact	Etude non interventionnelle (juin 2017 => en cours)	Etude interventionnelle (Juin 2018, 24/7 => en cours)	Etude interventionnelle (Septembre 2018 => en cours)

=> Nécessité d'un regard critique sur la composition des panels espèces et l'interprétation des gènes de résistance

Approche par biologie moléculaire syndromique

Exemple de la technologie BioFire, FilmArray



Panel BCID 1ère génération

Gram positif	Gram négatif	Levures	Gènes de résistance
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>mecA</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Enterobacteriaceae	<i>Candida glabrata</i>	<i>vanA/B</i>
Staphylococcus	Complexe <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Candida krusei</i>	KPC
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	
Streptococcus	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Candida tropicalis</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Proteus</i>		
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>		
	<i>Haemophilus influenzae</i>		
	<i>Neisseria meningitidis</i> (encapsulée)		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

≈ 1 heure 30

Approche par biologie moléculaire syndromique

Exemple de la technologie BioFire, FilmArray



Panel BCID-2 (2e génération)

Gram positif	Gram négatif	Levures	Gènes de résistance
<i>Enterococcus faecalis</i>	Complexe <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>	IMP
<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Candida auris</i>	KPC
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Candida glabrata</i>	OXA-48-like
Staphylococcus	Enterobacteriaceae	<i>Candida krusei</i>	NDM
<i>Staphylococcus aureus</i>	Complexe <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	VIM
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida tropicalis</i>	Mcr-1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	CTX-M
Streptococcus	<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>mecA/C</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> groupe		<i>mecA/C</i> et MREJ
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Proteus</i>		<i>vanA/B</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Salmonella		
	<i>Serratia marcescens</i>		
	<i>Haemophilus influenzae</i>		
	<i>Neisseria meningitidis</i> (encapsulée)		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	Stenotrophomonas maltophilia		

≈ 1 heure 30

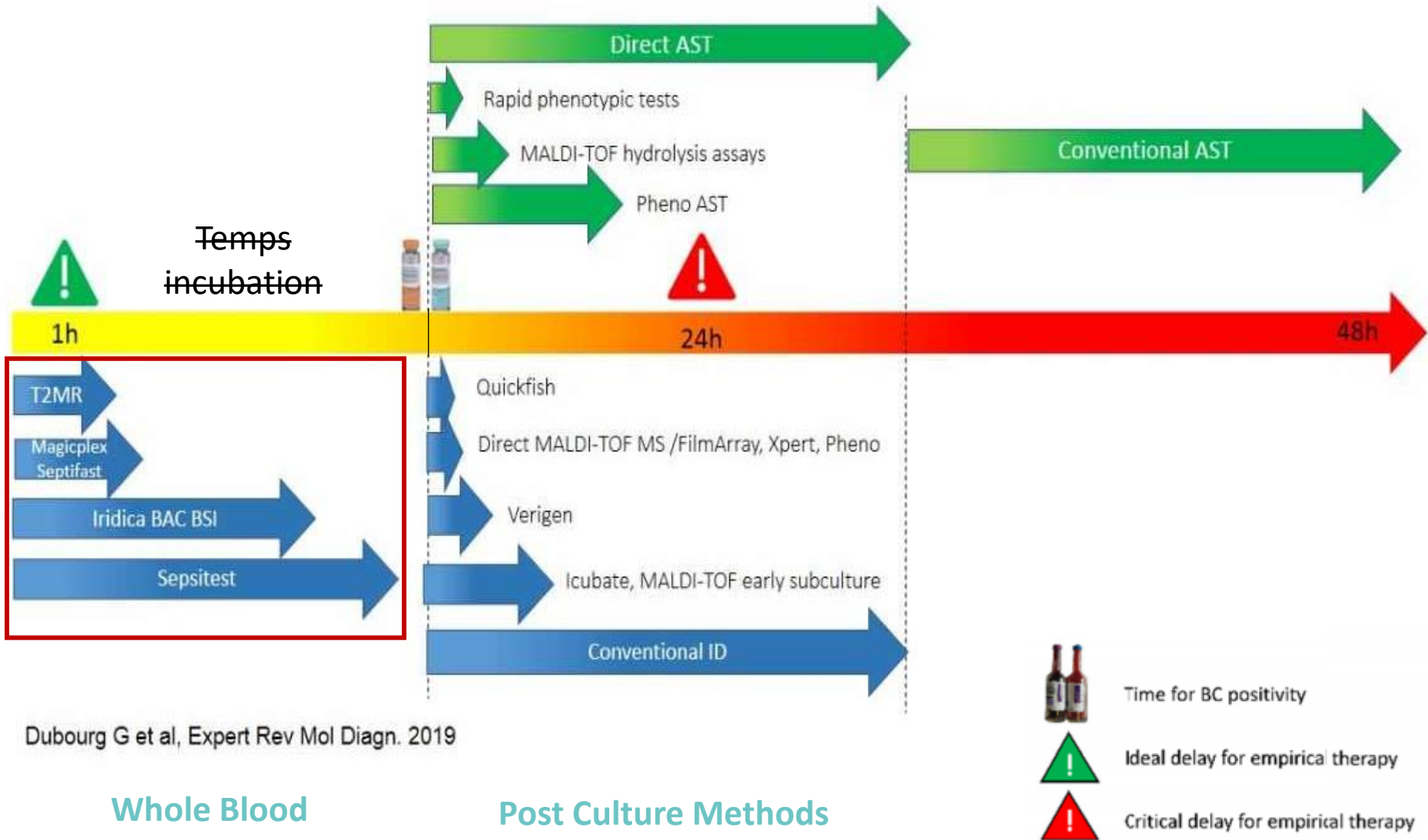
Limites et contraintes des tests rapides de détection de la résistance

- Solutions innovantes pas toutes matures pour un usage en routine
- Performances analytiques variables
 - des performances analytiques pas toujours adaptées ni évaluées dans la vraie vie
 - sensibilité parfois insuffisante : quel compromis pour quel temps gagné ?
 - Question de l'infection versus la colonisation ...
- Panels de gènes de résistance détecté : pas exhaustif et pas assez adaptatif
 - Détection de gènes de résistance versus expression phénotypique de cette résistance
- Problématique des aspects réglementaires et accréditation
- (sur)coûts importants

=> quels compromis pour quel temps gagné et quel impact clinique ?

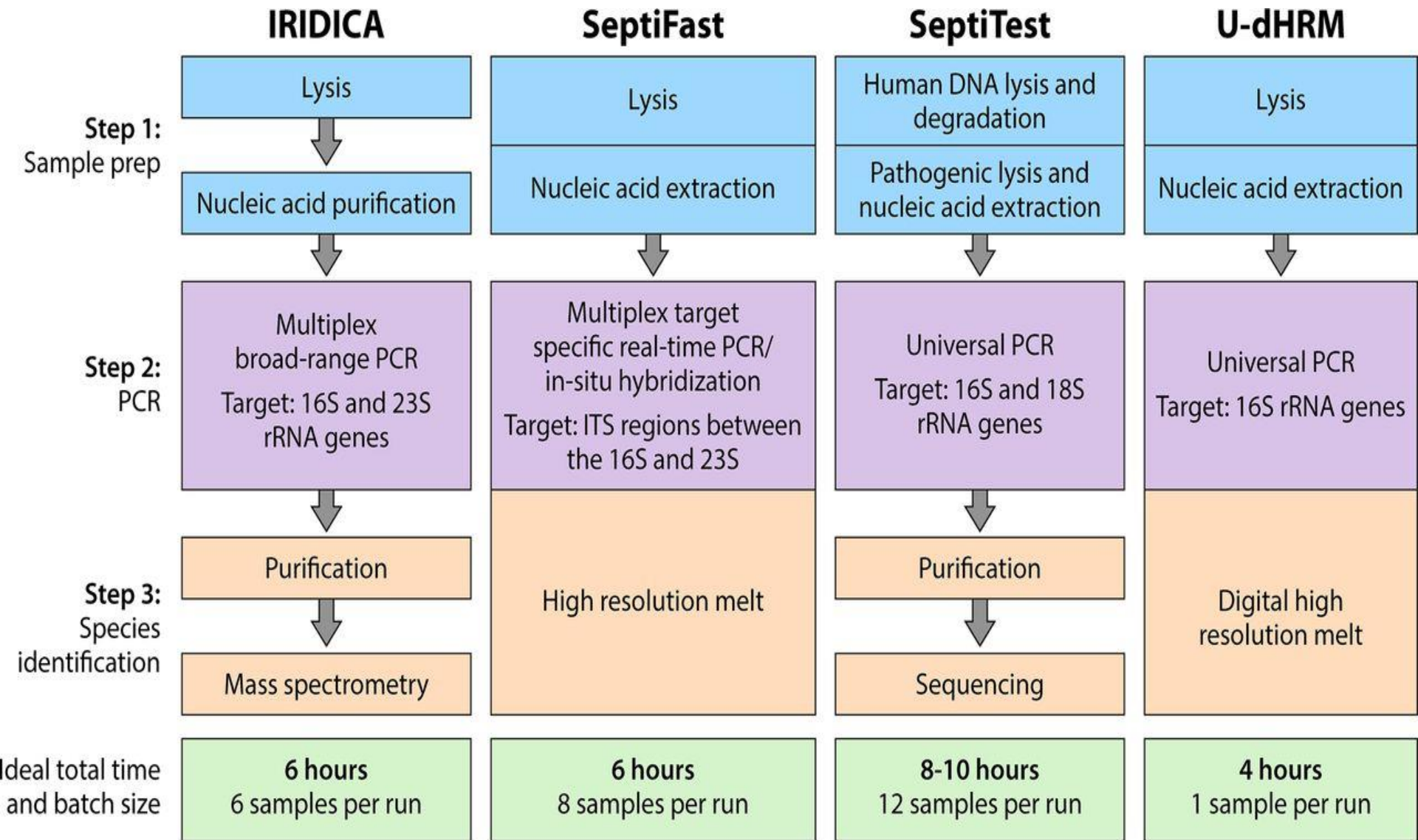
Comment réduire le temps d'analyse (TAT) ?

L'exemple des hémocultures



Dubourg G et al, Expert Rev Mol Diagn. 2019

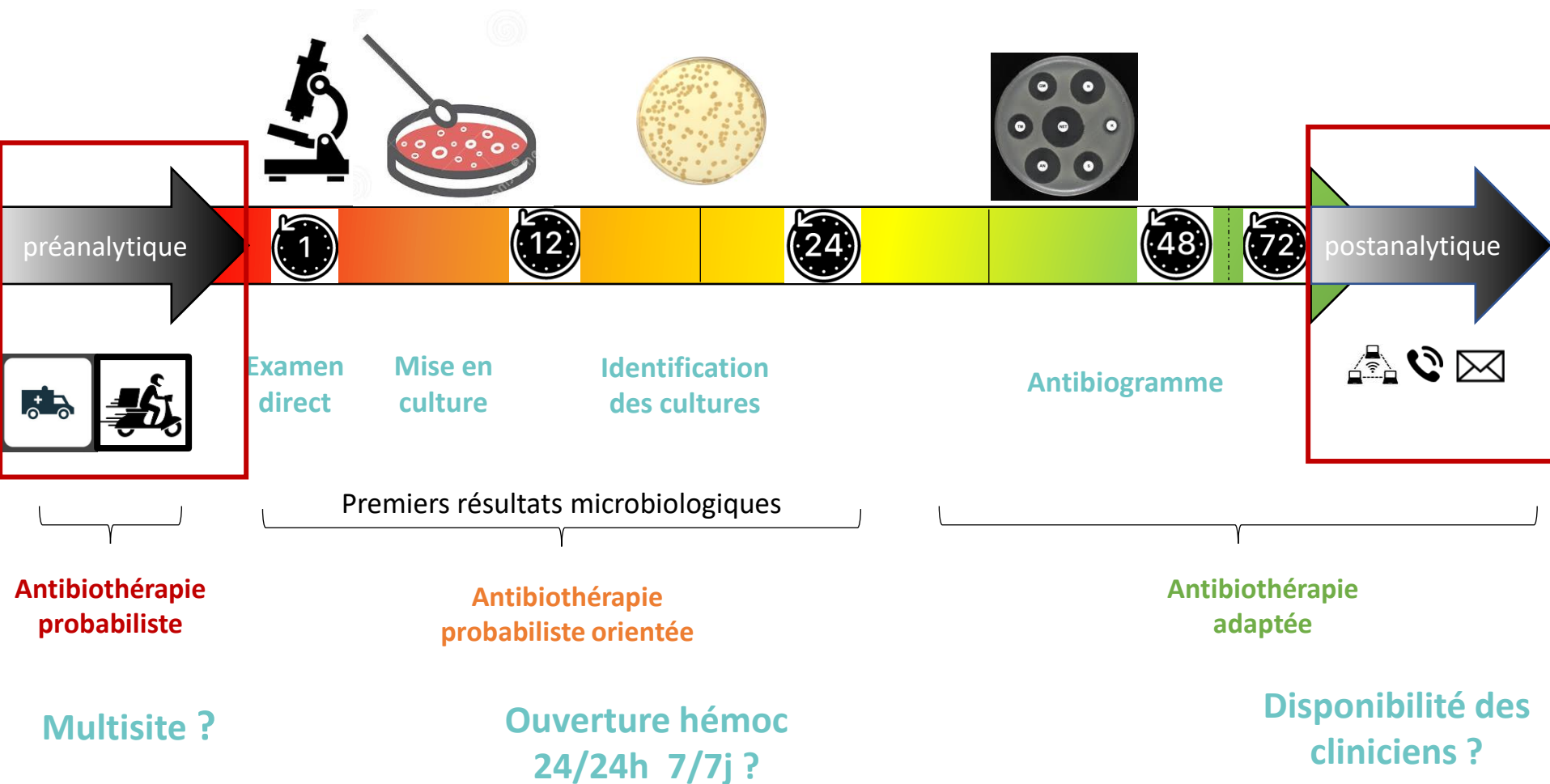
Applications directement sur sang total



Encore quelques problèmes à régler ...

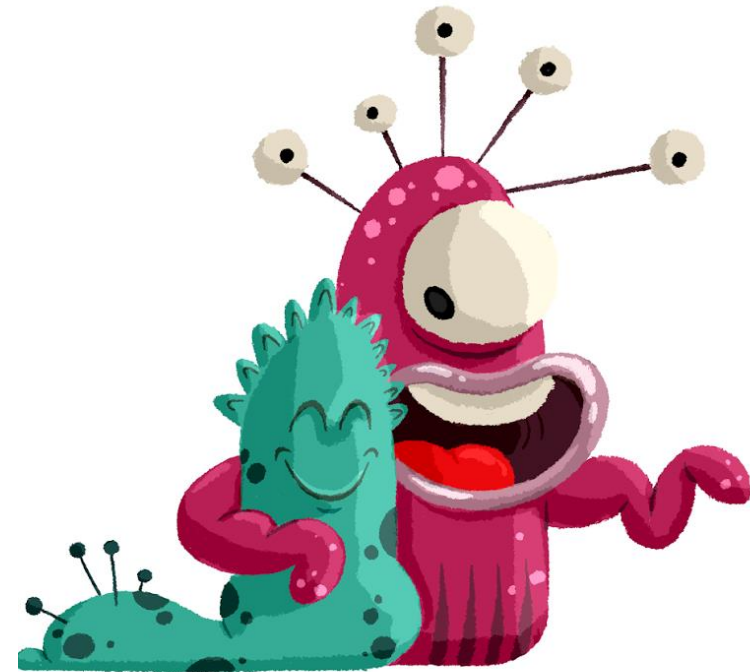
- Faciliter l'accès à des plateformes de séquençage haut débit intégrées et accélérer les temps de retour des résultats sur des gros volumes ;
- Gestion et analyses des Téra données générées (vers de nouveaux métiers data scientist);
- Savoir différencier la colonisation de l'infection et s'affranchir des flores commensales ;
- Séquencer tous les supports génétiques y compris humain
inconvenient ou opportunité ? (marqueurs d'inflammation signant la maladie versus la colonisation) ;
- Avancer sur la corrélation entre génotype (gène) et phénotype (expression du gène) de résistance ...

Quel est le niveau de maitrise de vos organisations ... ?



Conclusions

- **Révolutions technologiques** reléguant les techniques conventionnelles à la « préhistoire »
- **Beaucoup de nouveautés** mais pas de solution idéale unique
- **Quel positionnement et à quel coût ?**
 - Bien identifier les besoins et les adapter aux organisations locales déjà en place
 - Quels moyens (RH, locaux et équipements)
 - Problématique organisationnelle / flux au labo
 - Gagner la confiance des prescripteurs
- **Tests complémentaires aux tests de référence** : l'antibiogramme doit rester le gold standard (surveillance épidémiologique et émergence de nouveaux mécanismes de résistance)
- **Perspectives futures** probablement sur la métagénomique V2.0



=> Importance de discuter avec votre microbiologiste de ce qui est possible au cas par cas

**Rapid is good but
accurate is
everything**

Merci à

Pr Vincent CATTOIR

Pr Laurent DORTET

Dr Najoua EL HELALI

Dr Hervé JACQUIER

Dr Brigitte LAMY

Pr Frédéric LAURENT

Dr Assaf MIZRAHI

Dr Jean-Claude NGUYEN

Dr Benoît PILMIS

Dr Gauthier PEAN DE PONFILLY

Merci pour votre attention