

Place des TDR pour l'identification des résistances

Sepsis - Hémocultures

Journée Alsacienne d'Infectiologie

29 septembre 2023

Guillaume Gregorowicz

Laboratoire de Microbiologie, Hôpitaux Civils de Colmar

Introduction

- Diagnostic microbiologique : toujours trop long !
- Adaptation thérapeutique = ID + ATB
- Tests rapides → adapter plus tôt le traitement / mettre en œuvre des précautions adaptées (BMR)/ adapter les analyses effectuées (microbiologiste)

→ TTR (*Time To Result*)

- **TDR « idéal »**

→ Pour le **médecin**

- Rapide
- Fiable
- Résultats exhaustifs
- Disponible sur demande
- 1 seul prélèvement avec 1 seul tube

→ Pour le **microbiologiste**

- Performant (Se, Sp)
- Simple à mettre en œuvre (rapide)
- Unitaire (pas de nécessité de série)
- Compatible avec le flux de travail et les techniques déjà en place
- Sans besoin d'expertise spécifique (+++ si H24)
- Le moins coûteux possible

→ TAT (*Turnaround Time*)

Hémocultures

J0

3h

J+1

J+2

4h - 120h
Moyenne = 17h

Prélèvement
+
Acheminement

Incubation
(culture en milieu
liquide/automate)

« incompressible »

Prélèvement **positif**/automate
→ Examen direct **Gram**

Subculture
précoce 3-4 h ou classique
16-24 h

Subculture ATB 16-24h (ATB « direct »)

Identification
MALDI-TOF

Antibiogramme

Time To Result (TTR)

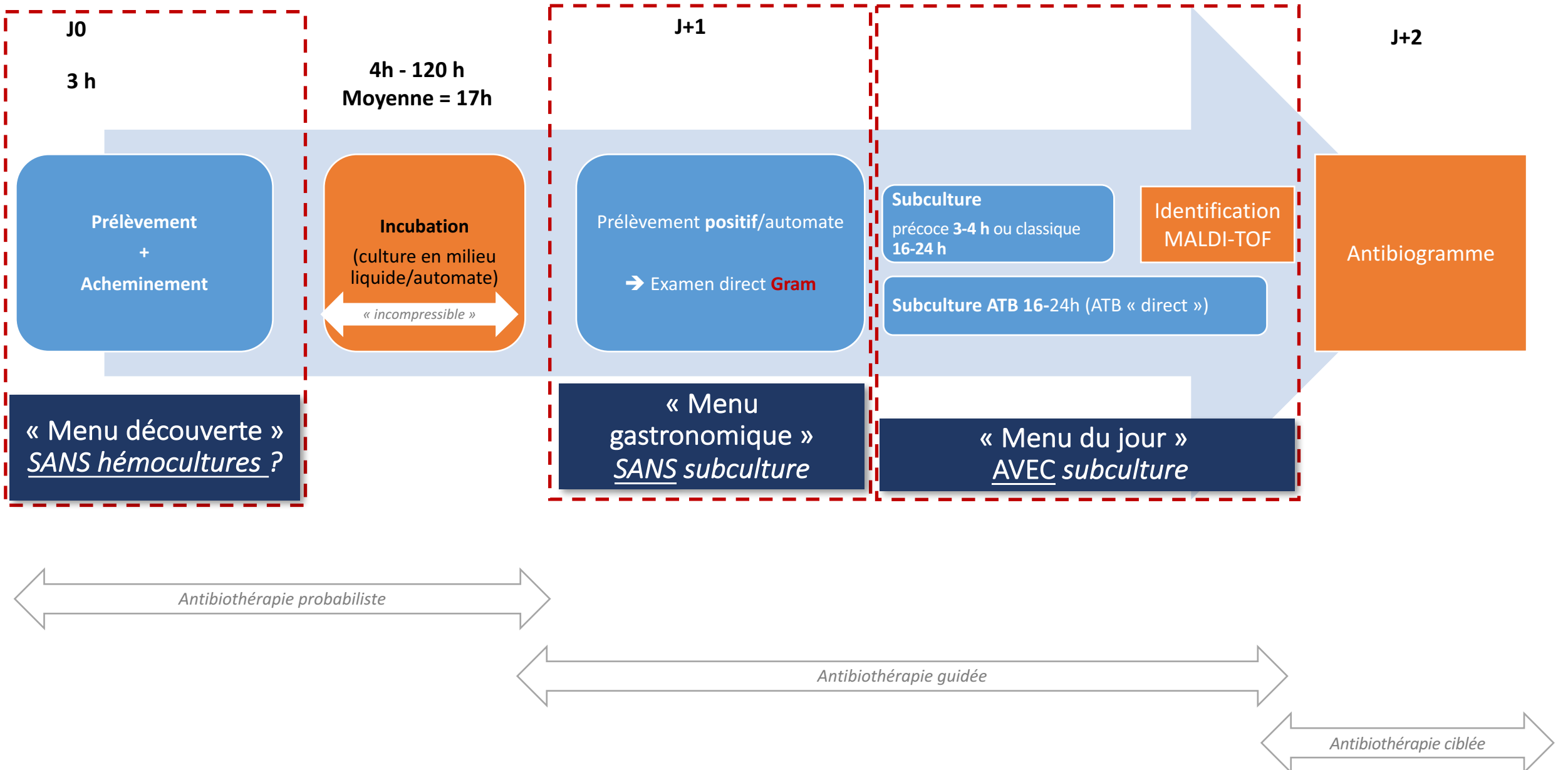
Turnaround Time (TAT)

Antibiothérapie probabiliste

Antibiothérapie guidée

Antibiothérapie ciblée

Hémocultures / TDR



Hémocultures / TDR

J0

3 h

J+1

J+2

4h - 120 h
Moyenne = 17h

Prélèvement
+
Acheminement

Incubation
(culture en milieu
liquide/automate)

« incompressible »

Prélèvement **positif**/automate
→ Examen direct **Gram**

Subculture
précoce 3-4 h ou classique
16-24 h

Identification
MALDI-TOF

Antibiogramme

Subculture ATB 16-24h (ATB « direct »)

AVEC subculture ?

Antibiothérapie probabiliste

Antibiothérapie guidée

Antibiothérapie ciblée

Tests ImmunoChromatographiques (ICT)

- Réaction Ag-Ac (recherche d'Ag)
- Lecture visuelle
- Test unitaire
- Rapide (5 à 15 min)
- Coût # 10 €
- Performances : bonnes à très bonnes

Limites :

- on ne trouve que ce cherche... (variant, *mecC*/SARM)
- Non utilisable sur l'échantillon primaire

→ Applications :

- **SARM** (ICT PLP2a Abbott)
- **Carbapénèmases/EB** (ICT Carba, Coris Bioconcept, NG-Test®)
- **BLSE CTX-M** (CTX-M MULTI, BGBiotech)

ICT PLP2a pour recherche de *mecA* (SARM)



	Sensibilité	Spécificité	bibliographie
Subculture sur gélose TSS	98,2%	99,0%	Données fournisseur
Subculture gélose Columbia au sang	99,1%	99,0%	Données fournisseur
Subculture avec induction*	99.6%	99,0%	Données fournisseur
Sur culture « précoces »**	85.7%	100%	Johannes Andries Delpont et <i>al.</i> , JMM, 2016
Valeur prédictive positive : 97,4%			Données internes au laboratoire, évaluation sur 310 souches de <i>S. aureus</i> isolées dans un contexte de bactériémie
Valeur prédictive négative : 96,6%			

* dans le halo du disque de cefoxitine 30 µg sur MHE.
** après culture de 3 h sur gélose au sang.

Tests colorimétriques

- Mise en évidence de la capacité d'inactivation de l'antibiotique/souche. Utilisation d'un substrat chromogénique, changement de couleur du substrat si hydrolysée ou indirectement (variation du pH)
- Test unitaire
- Lecture visuelle rapide (<15 min)
- Coût # 10 €

Limites :

- Lecture possiblement subjective
- Peu adapté à la recherche directe sur un échantillon
- Détection de variant

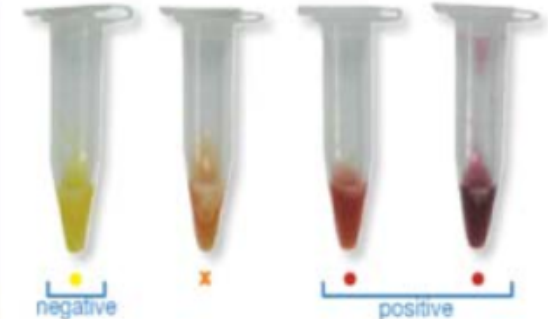
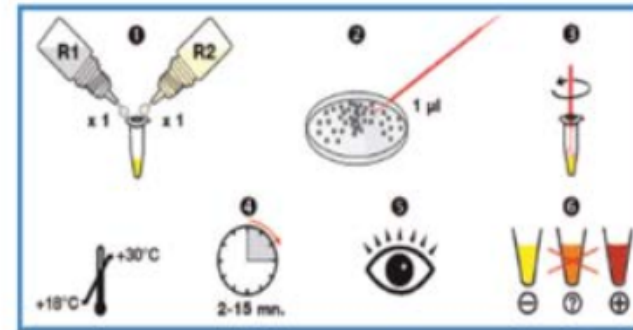
→ Applications :

- **BLSE (+/- CHN)/EB** (βLACTA Test bioRad)
- **Carbapénèmases/EB** (βCARBA Test bioRad, RAPIDEC carbaNP bioMérieux)

βLACTA Test (bioRad)



 **15 min**



- No change in color → negative (yellow) - Change to red or purple → positive (red/purple) - Change to orange → non-interpretable (orange)

→ **Subculture précoce 3-4h**

→ Sur **culot** d'hémoculture positive

→ Subculture classique 16-24h

βLACTA Test : performances

- **Sensibilité entérobactéries** ^{(1) (2) (3)} :
 - ❑ **Globalement 87,7%**
 - ❑ **BLSE > 95%**
 - ❑ **CHN groupe 3 : 21 %**
 - ❑ CHN groupe 1 : peu de données dans la littérature (faible sensibilité)
 - ❑ CHN plasmidique : faible sensibilité
- **Spécificité > 99%** quelque soit espèce et mécanisme de résistance
Non interprétable # 2% (groupe 3 ++ ou *K. oxytoca*)

Bactériémies à entérobactéries HCC + GHSO 2019 à 2021 (N = 1807 épisodes)

	% du total	C3G résistant (%)	CHN	BLSE	BLSE + CHN	EPC
Groupe 1 (Céphalosporinase bas niveau) : <i>E coli</i> , <i>Shigella</i>	62,0%	11,3%	1,4%	9,6%	0,1%	0,0%
Groupe 2 ou autres : <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> ...	25,3%	12,7%	0,0%	12,7%	0,0%	0,0%
Groupe 3 (Céphalosporinase inductible) : <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Serratia marcescens</i>	12,7%	30,0%	25,2%	3,0%	1,7%	0,0%
Total	-	14,0%	4,1%	9,4%	0,3%	0,0%

VPP # 99 %
VPN toutes EB = 96%
EB Groupe 3 [12,7%] = 74 %

(1) Morosini MI *et al.* Rapid detection of β-lactamase-hydrolyzing extended-spectrum cephalosporins in Enterobacteriaceae by use of the new chromogenic βLacta test. JCM. 2014

(2) Renvoisé A *et al.* . Evaluation of the βLacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2013

(3) Willey B. M. *et al.* Pilot Evaluation of the βLACTA Test for Predicting 3rd Generation Cephalosporin Resistance in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Proteus mirabilis* from Blood. ECCMID 2014

βLACTA Test : impact thérapeutique ?

JOURNAL
OF MEDICAL
MICROBIOLOGY

RESEARCH ARTICLE

Dépret et al., *Journal of Medical Microbiology* 2018;67:183–189
DOI 10.1099/jmm.0.000665



2018

β LACTA testing may not improve treatment decisions made with MALDI-TOF MS-informed antimicrobial stewardship advice for patients with Gram-negative bacteraemia: a prospective comparative study

F. Dépret,^{1,*} A. Aubry,¹ A. Fournier,¹ A. Charles-Nelson,^{2,3} S. Katsahian,^{2,3} F. Compain,^{1,3} J. L. Mainardi^{1,3} and M. P. Fernandez-Gerlinger^{1,3}

> *Infect Dis (Lond)*. 2018 Sep;50(9):668–677. doi: 10.1080/23744235.2018.1458147.
Epub 2018 Apr 2.

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 Mizrahi¹, J Amzalag¹, C Couzigou², G Péan De Ponfily¹, B Pilmis², A Le Monnier¹



International Journal of
Translational Medicine

2022



Article

Early Empirical Antibiotic Therapy Modification in Sepsis Using Beta-Lactam Test Directly on Blood Cultures

Assaf Mizrahi^{1,2}, Françoise Jaureguy³, Héloïse Petit³, Gauthier Péan de Ponfily^{1,2}, Etienne Carboneille³, Alban Le Monnier^{1,2}, Jean-Ralph Zahar^{3,4,*} and Benoît Pilmis^{2,5}

- Prospective, monocentrique
- 131 épisodes de bactériémies à BGN
- Equipe mobile d'infectiologie
- BLT et MALDI-TOF sur subculture précoce (3h)
- Avis infectiologue sur HC + (dossier clinique et microbio) puis 3h après avec soit MALDI-TOF soit MALDI-TOF + BLT → pas de différence sur adaptation du TTT entre les 2 groupes

- Prospectif, monocentrique
- 141 épisodes de bactériémies à entérobactérie
- Impact théorique BLT + ID MALDI-TOF (sur culot) sur adaptation TTT probabiliste
- 75% patients avec EB C3G-R avaient un traitement non adapté, gain 28h sur adaptation et 35 h PCC vs antibiogramme

- Prospectif, multicentrique (2)
- 170 épisodes de bactériémies à Entérobactérie
- Impact BLT (sur culot) communiqué à l'équipe mobile d'infectio sur l'adaptation TTT probabiliste
- Adaptation dans 1/3 des cas du TTT probabiliste (escalade ou désescalade)

→ **Intérêt ID + BLT et message le plus simple possible (+++ si médecin pas spécialiste)**

β LACTA Test - ICT PBP2a : exemple de positionnement (HCC)

J0

3 h

J+1

J+2

4h - 120 h
Moyenne = 17h

Prélèvement
+
Acheminement

Incubation
(culture en milieu
liquide/automate)

« incompressible »

Prélèvement **positif**/automate
→ Examen direct **Gram**

Subculture
précoce 3-4 h

Subculture ATB 16-24 h (ATB « direct »)

Identification
MALDI-TOF

Antibiogramme



Allo Identification
EB Allo β LACTA (si test positif uniquement)
S. aureus Allo SARM/SAMS (ICT PBP2a)

Possibilité d'**adaptation** thérapeutique

- Entérobactérie du groupe 3 → Céfépime
- Entérobactérie autre groupe → Céfotaxime (pas de modification)
- Entérobactérie avec BL test positif → carbapénème
- **S. aureus** : SARM/SAMS
- **Autres** : adaptation possible sur ID (ex : PYO, BGN non fermentaires, etc)

Méthodes avec subculture précoce 3-4h : SYNTHÈSE

Indication	Test	TAT	Performances	Limites	Coût Test
Identification	MALDI-TOF	-	Très bonnes	Bacilles Gram positif Co-infections Travail en (petites) « série » donc TAT ↗	< 1€
SARM	ICT PLP2a : PBP2a Abbott (unitaire)	5 min	Se > 85,3 % Sp # 100%	Coprésence dans l'échantillon positif S. aureus/CoNS Ne détecte pas SARM <i>mecC</i>	# 7€
C3G-R/EB	Colorimétriques : βLACTA test, Biorad (unitaire) - sur culot d'hémoculture - sur subculture précoce	< 15 min	- Subculture 3h : Se 87 %, Sp # 100% - Culot : Se 83 %, Sp # 100% (A. Scanvic et al. RICA 2013)	Sur culot : étapes de centrifugation/élimination surnageant/ remise en suspension, ID concomitante CHN	# 5€
Carba-R/EB	- Colorimétriques (unitaires) : βCARBA test Biorad, RAPIDEC Carba NP bioMérieux - ICT (unitaire) EPC Coris - PCR* (unitaire) Xpert Carba-R Cepheid ou équivalents	Colorimétrique, ICT < 15 min	Se et Sp # 100% pour les cibles présentes (ICT et PCR)	Cibles absentes (IMP-8/Xpert) Lecture (colorimétrique) Emergence de variants	# 10€
		PCR 1h30			# 10€ # 40 €
C3G-R Carba-R /EB	MALDI-TOF (Recherche d'hydrolyse d'un ATB/souche par MALDI-TOF) - « in house » - MTB STAR-BL/carba (Bruker)	30 min à 1h30	Se > 90 % Sp # 100% (Dortet et al, JAC 2018)	TAT important (donc coût ↗) Immobilisation d'un MALDI-TOF pendant l'analyse Peu adapté au coup par coup	(15€)
Vanco-R Entérocoques	PCR* (unitaire) Xpert VRE (<i>vanA</i> et <i>vanB</i>), Cepheid ou équivalents*	1h30	Se et Sp # 100% pour les cibles présentes	-	# 40€

* PCR possible directement à partir du flacon positif (sans subculture précoce)

Hémocultures / TDR

J0

3 h

J+1

J+2

4h - 120 h
Moyenne = 17h

Prélèvement
+
Acheminement

Incubation
(culture en milieu
liquide/automate)

« incompressible »

Prélèvement **positif**/automate
→ Examen direct **Gram**

Subculture
précoce 3-4 h ou classique
16-24 h

Identification
MALDI-TOF

Antibiogramme

Subculture ATB 16-24h (ATB « direct »)

SANS subculture ?

AVEC subculture ?

Antibiothérapie probabiliste

Antibiothérapie guidée

Antibiothérapie ciblée

PCR spécifiques



➔ Principes équivalents PCR/TAAN et autres plateformes :
GeneOhm StaphSR (BDmax, BD), Portrait Staph ID/R
(Great Basin Scientific)...

- A partir de l'hémoculture positive avec CPA
 - Test unitaire
 - ID *S. aureus/spa* (Se 99,6%, sp 99,5%) et Méti-R /*mecA* et SCC*mec* (Se 98,1%, sp 99,6%)
 - TAT # 1h
 - Ct disponibles
 - Limites : co-infection/contamination CoNS/SA
-
- **Autres applications** (sur prélèvement) **Xpert (cepheid)** :
 - *S. aureus* SARM/ostéo-articulaires
 - TB : MTB/rifampicine/XDR/crachat
 - ERG, EPC/selles, frottis autres
 - Virus respiratoires (grippe, SARS-COV2, VRS)
 - IST (*C. trachomatis*, *N. gono*, *M. genitalium*)
 - HPV, Strepto B
 - VIH, VHB, VHC (sang)
 -

PANEL PCR syndromiques « hémocultures »

Filmarray BCID2 (biofire/bioMérieux)

Gram-negative Bacteria

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex

Bacteroides fragilis

Enteric Bacteria

Enterobacter cloacae complex

Escherichia coli

Klebsiella aerogenes

Klebsiella oxytoca

Klebsiella pneumoniae group

Proteus spp.

Salmonella spp.

Serratia marcescens

Haemophilus influenzae

Neisseria meningitidis

Pseudomonas aeruginosa

Stenotrophomonas maltophilia

Yeast

Candida albicans

Candida auris

Candida glabrata

Candida krusei

Candida parapsilosis

Candida tropicalis

Cryptococcus neoformans/gattii

Gram-positive Bacteria

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecium

Listeria monocytogenes

Staphylococcus spp.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus lugdunensis

Streptococcus spp.

Streptococcus agalactiae (Group B)

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pyogenes (Group A)

Antimicrobial Resistance Genes

*bla*_{CTX-M}

*bla*_{IMP}

*bla*_{KPC}

mcr-1

mecA/C and MREJ

*bla*_{NDM}

*bla*_{OXA-48-like}

*bla*_{VIM}

vanA/B



PYO réa HCC 2020-2022

Antibiotique	REANIMATION CHIRURGICALE - PASTEUR 2 total = 71		REANIMATION CHIRURGICALE - POLE 3 Total = 38		REANIMATION MEDICALE - PASTEUR2 Total = 92	
	S ou SFD	R	S ou SFD	R	S ou SFD	R
Ticarcilline	72%	28%	74%	26%	64%	36%
Ticarcilline + ac. clav.	69%	31%	66%	34%	60%	40%
Piperacilline	72%	28%	74%	26%	60%	40%
Pipéracilline + tazobactam	72%	28%	74%	26%	60%	40%
Ceftazidime	85%	15%	79%	21%	67%	33%
Cefepime	86%	14%	79%	21%	68%	32%
Ceftolozane + tazobactam	100%	0%	100%	0%	97%	3%
Aztréonam	99%	1%	84%	16%	87%	13%
Méropénème	82%	18%	79%	21%	77%	23%
Imipénème	80%	20%	87%	13%	73%	27%
Amikacine	92%	8%	100%	0%	96%	4%
Tobramycine	87%	13%	97%	3%	89%	10%
Ciprofloxacine	92%	8%	97%	3%	88%	12%

CAZ R

CHN = 99%

BLSE = très rares

Carbapénèmes = rares

➔ Mécanismes de résistance chromosomiques/inductibles comme AmpC /CHN = **non détectables** (PYO, EB groupe 3)

- Test unitaire, ID et gènes de résistances (2h)
- Commercialisé depuis 2020
- Pas de Ct
- **Autres panels** : ME, digestif, respiratoire, IOA (+ à venir fièvre du voyageur)

PANEL PCR syndromiques « hémocultures »

Filmarray BCID2 (biofire/bioMérieux)

Gram-negative Bacteria

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex
Bacteroides fragilis

Enteric Bacteria

Enterobacter cloacae complex
Escherichia coli
Klebsiella aerogenes
Klebsiella oxytoca
Klebsiella pneumoniae group
Proteus spp.
Salmonella spp.
Serratia marcescens

Haemophilus influenzae

Neisseria meningitidis

Pseudomonas aeruginosa

Stenotrophomonas maltophilia

Yeast

Candida albicans
Candida auris
Candida glabrata
Candida krusei
Candida parapsilosis
Candida tropicalis
Cryptococcus neoformans/gattii

Gram-positive Bacteria

Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Listeria monocytogenes
Staphylococcus spp.
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus lugdunensis
Streptococcus spp.
Streptococcus agalactiae (Group B)
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes (Group A)

Antimicrobial Resistance Genes

*bla*_{CTX-M}
*bla*_{IMP}
*bla*_{KPC}
mcr-1
mecA/C and MREJ
*bla*_{NDM}
*bla*_{OXA-48-like}
*bla*_{VIM}
vanA/B



QIAstat-Dx® BCID GN and GPF Plus Qiagen (2025)

QIAstat-Dx BCID GPF Plus AMR RUO Panel

14 Gram-positive and 1 pan Gram-negative bacterial, 3 fungal and 11 AMR targets

Bacteria

Bacillus cereus group
Corynebacterium
Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Listeria monocytogenes
Micrococcus spp.
Staphylococcus aureus
*Staphylococcus capitis/hominis**

Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus lugdunensis
Streptococcus agalactiae
Streptococcus anginosus group
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes
Pan Gram-Negative

Fungi

Candida (Pan)
Cryptococcus gattii/neoformans
Fusarium

AMR genes

cfr	Erm(A)
vanB	BlaZ
TetM	Aac(6') aph(2')
vanA	Erm(C)
mecA	mecC
TetK	

* *Staphylococcus capitis/hominis* are both detected but not differentiated.

GP, Gram-positive; GN, Gram-negative; BCID, blood culture identification; GPF, Gram-positive fungal; AMR, antimicrobial resistance; RUO, research use only

QIAstat-Dx BCID GN Plus AMR RUO Panel

13 Gram-negative bacterial and 18 AMR targets

Bacteria

<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Enterobacteriales</i> (Pan)
<i>Proteus</i> spp.	

AMR genes

CTX-M	GES	SHV
IMP	aac(6')-Ib (aka:aacA4)	NDM
VIM	AmpC	TEM
armA	OXA-58	OXA-48 like
OXA-23	PER	OXA-24/40
VEB	KPC	SPM



- ID par PCR et gènes de résistances (1h)
- Test unitaire
- Ct (aide à interprétation)
- Commercialisation prévue pour 2025
- ➔ Evaluations à venir

Autres tests commercialisés : ePlex (Roche), Unyvero (Curetis), Verigen (Luminex) BC-GP panel, BC GN panel (microarray), iCube iC-GPC Assay (microarray)...

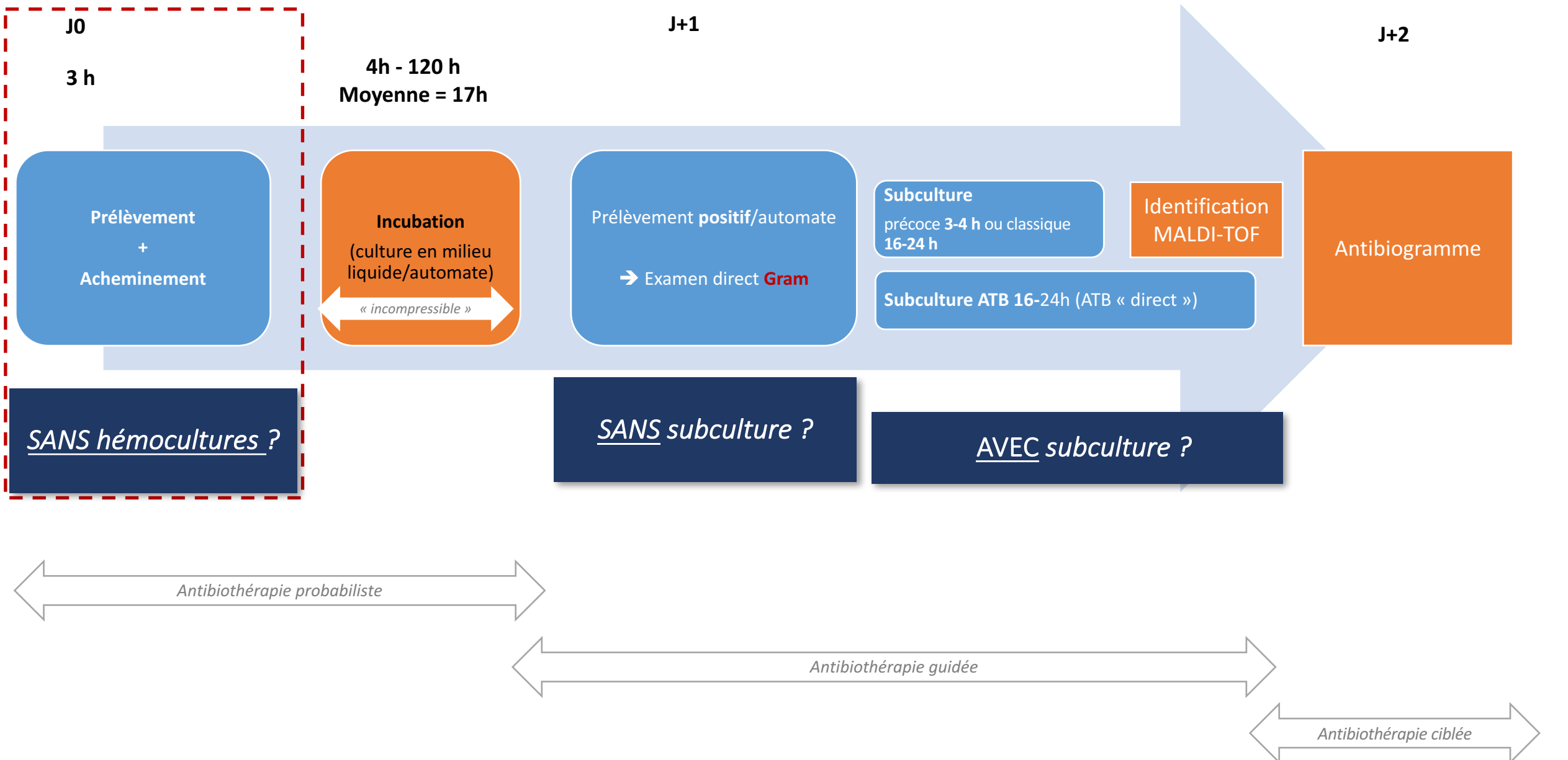
Méthodes SANS subculture : SYNTHÈSE

Indication	test	TAT	Performances	Limites		Coût Test
ID +/- Gène de résistance	PCR unitaire Xpert MRSA/SA (gène <i>mecA/C</i> + gène <i>spa</i> de <i>S. aureus</i>) Cepheid (2019)	1h	Se > 90% Sp 100%	Coprésence dans l'échantillon positif <i>S. aureus</i> /SCN Coût (taux de contamination/CoNS des HC)		# 40€
	PCR syndromique unitaire - BCID biofire bioMérieux (2016v1/2020v2) - QIAstat-Dx® BCID GN and GPF Plus (2025)	1-2h	- ID : Se 98,9%, Sp 99,6% Rhoads DD et al, J Clin Microbiol. 2023 - Études prospective débutée août 2023 (USA)	Détection génotypique de la résistance Gestion des FP ? Cibles non présentes dans le panels		# 150€
ID	MALDI-TOF sur culot HC+ Sepsityper Bruker Vitek®MS Blood Culture bioMérieux (2012)	1 h	# 80% (BGN 90%, GP 76%, lev. 66%) Morgenthaler et al, Int J Microbiol. 2015	Temps technique (culot, extraction) , manipulation ++ (30 min), Immobilisation d'un MALDI-TOF pendant l'analyse Co-infections Travail en petites séries		<15€
ATBg	RAST (<i>Rapid Antimicrobial susceptibility Testing</i>) EUCAST (<i>E. coli</i> , <i>KP</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Ab</i> , Entérocoques, Pneumo)	4-6-8 h selon germe	Critères FDA • CA > 90 % • VME < 1,5 % • ME < 3 %	Référentiel avec diamètres spécifiques Lecture difficile, nécessité d'un second antibiogramme classique si illisible	5-8h post HC + microbiologiste et clinicien pour adapter TTT ? H24 ?	# 5€
	MUELLER-HINTON RAPID-SIR (I2A) milieu enrichi (BGN et Staph)	6-8 h	Études et PHRC en cours	Disposer d'automate/réactifs du fournisseur (SIR Orion ou Lynx I2A)		# 5€
	Vitek REVEAL , test unitaire bioMérieux (2023) (BGN)	5-6h	• CA : 96,1 - 96,3 % (PYO) (BGN) • VME : 1,6 % - 1,3 %(PYO) (BGN) • ME : 4,2 % - (PYO)	Panel de molécules testées non adaptable Coût		# 150€
	ASTar (Q-linea) test unitaire	6h	?			
	Accelerate PHENO , Id par sondes FISH + ATB rapide (optique), test unitaire Accelerate/BD (2017) (CP, BGN)	ID 1h30-2h ATB 6-7 h	• ID : bonnes voire très bonnes mais FP possible • ATB : variables selon germes/atb (PYO << EB)	Modularité 1 automate 1 patient pdt durée du test FP ? Vraies ou fausses co-infections ?		# 350€

Méthodes SANS subculture : SYNTHÈSE

Indication	test	TAT	Performances	Limites	Coût Test
ID +/- Gène d résistar	PCR multiplexe Yeast + MRSA / CA / ...	1h	Spéc. > 99%	Contamination des K/échantillons positifs / GCN	# 40€
Idéalement ID + orientation ATB concomitamment → adaptation précoce de l'antibiothérapie pour le clinicien en 1 fois					# 150€
Plusieurs possibilités à partir d'une HC +					
ID	• Gram et → MALDI-TOF sur culot → βLACTA Test sur culot si BGN/EB → PCR <i>S. aureus</i>/SARM si CPA • Gram et approche syndromiques (panel PCR) • Gram et subculture précoce (3h) puis → MALDI-TOF sur subcult. précoce → ICT PLP2a sur subcult. précoce si <i>S. aureus</i> → βLACTA Test sur subcult. précoce si BGN/EB	TAT # 2h			<15€
ATBg		TAT # 2h			# 5€
		TAT # 3-4h			# 5€
					# 150€
		Antibiogramme : réduction possible à l'avenir 16-24h → 5-8h			# 350€

Hémocultures / TDR



Hémocultures SANS cultures ?



Review

Diagnosis of Bloodstream Infections: An Evolution of Technologies towards Accurate and Rapid Identification and Antibiotic Susceptibility Testing

Kristel C. Tjandra ¹, Nikhil Ram-Mohan ¹, Ryuichiro Abe ¹, Marjan M. Hashemi ¹, Jyong-Huei Lee ², Siew Mei Chin ², Manuel A. Roshardt ², Joseph C. Liao ^{3,4}, Pak Kin Wong ^{2,5,6} and Samuel Yang ^{1,*}



Expert Review of Molecular Diagnostics



ISSN: 1473-7159 (Print) 1744-8352 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/iero20>

Emerging methodologies for pathogen identification in bloodstream infections: an update

Grégory Dubourg, Didier Raoult & Florence Fenollar

1 mL de sang :

- 10⁶ 10⁷ GB
- 10⁸ PLQ
- 10⁹ GR
- Protéines diverses et autant d'inhibiteurs de PCR

+/- 0,1 à 1 bactérie

➔ **qPCR** (classique) et **NGS** (séquençage haut débit) trop peu sensible (> 100 UFC/mL) : présence d'inhibiteur dans le sang, dépendante du nb de copie du gène

➔ **Techniques ID +/- ATB** : PCR nichées, PCR digitale (droplet digital PCR), qPCR + HRM (analyse courbe de fusion hte résolution) et antibiogramme phénomoléculaire, spectroscopie Raman...

Étape préalable indispensable = **Prétraitement des échantillons** (capture, séparation, concentration)

- Méthodes chimiques (immunocapture/capture magnétique et lyse)
- Méthodes physiques (acoustiques, électrocinétiques, hydrodynamiques, magnétiques, microfiltration...)

➔ Performances variables en fonction des microorganisme qui conditionne : automatisation, TTR, performances du diagnostic

➔ Nombreuses preuves de concept mais peu de méthodes validées FDA (USA) / IVD-R (UE) pour le diagnostic en 2023

Hémocultures SANS cultures ?

Technologies	Sample	Company	ID				AST	
			Sens. (CFU/mL)	Spec.	Breadth	TAT	Output	TAT
EMERGING								
qPCR-HRM	WB *	Non-commercial	1	100%	37 bacteria (expandable)	8 h (with AST)	MIC	8 h (with ID)
SERS	WB	Spectral Platforms	1	94%	>30 pathogens	20 min	S/R (enzyme-based)	unspecified
ddPCR/IC3D	WB	Velox Bio	10	100%	unspecified	1–4 h (with AMR)	resistance marker	1–4 h (with ID)
Flow Cytometry	BC (+)	FASTinov	N/A	N/A	N/A	N/A	MIC	<26 h
PNA-FISH	WB	HelixBind	<10	95%	21 pathogens	2.5 h (with AMR)	resistance marker	2.5 h (with ID)
EXISTING								
PCR+T2MR	WB	T2 Biosystems	1–10	91%	5 candida species, ESKAPE organisms >90	27–29 h (with AMR)	resistance marker	27–29 h (with ID)
Multiplex PCR	WB	MagicPlex (SeeGene)	30	66–92%	pathogens with 27 pathogens at species level	27–30 h (with AMR)	resistance marker	27–30 h (with ID)
Real-time PCR+Sequencing	WB	SepsiTest (MolzYM)	10–40	86–100%	>1350 pathogens	30–31 h	N/A	N/A
Multiplex PCR	BC (+)	BioFire (FilmArray)	10 ⁶ to 10 ⁸	82–92%	8 Gram+/11 Gram–/5 fungi	25 h (with AMR)	resistance marker	25 h (with ID)
DNA Microarray	BC (+)	Luminex (Verigene)	10–100	84–99%	8 Gram+/5 Gram–	26.5 h (with AMR)	resistance marker	26.5 h (with ID)
MALDI-TOF + AST cards	BC (+)	Biomerieux (VITEK 2)	10 ⁶	61–98	1316 pathogens	30–36 h (with AST)	MIC	30–36 h (with ID)
PNA FISH + morphokinetic cellular analysis	BC (+)	Accelerate Diagnostics (Accelerate Pheno)	0.8 to 1.7	86–100	7 Gram+/8 Gram–/2 fungi	32 h (with AST)	MIC	32 h (with ID)
Traditional Blood Culture	WB	BD (BACTEC)	1	100%	Broad	30 h	MIC	54 h (with ID)

* WB: direct from whole blood, BC (+): from positive blood culture; Sens.: sensitivity; Spec.: specificity; TAT: Turnaround time.

Système idéal ?

TAT court, sensible, spécifique, exhaustif, Identification + ATB phénotypique, coût raisonnable

➔ n'existe(ra) pas

Avenir de ces méthodes ?

➔ Toutes HC ?

➔ Filières spécifiques

- Sepsis/immunodéprimé ?
- EI à hémocultures négatives ?
- Germes à croissance lente ou non cultivables ?
- Infections fongiques ?
- Infections décapitées ?

Pb de l'ADN libre (taux de FP)

Conclusion

Antibiorésistance et TDR

- Beaucoup d'innovation
 - Certains TDR déjà quasi « indispensables » (PLP2a/SARM, BLT/EB C3G-R, PCR...)
- ➔ Toujours complémentaire culture + ATB qui est et restera le « gold standard » !
- ➔ Ne pas hésitez à **discuter au cas par cas** avec le microbiologiste y compris en dehors des situations pour lesquels il avait prévu de les utiliser (ex : arthrite septique, méningite sur une DVE, pyélo ?, ...)

Mais...

- ➔ Ne pas oublier **de travailler sur les fondamentaux** pour améliorer notre « gold standard »



- **Délais** prélèvement – incubation ➔ moyenne HCC **3h**
- **Désinfection** cutanée (et des opercules des flacons avec OH 70° !) ➔ **39% de contamination/HC positives** dans certains services (SAU & réa ++) vs # 0% dans d'autres services (médecines internes) aux HCC en 2022
- Performances des HC étroitement liées au **remplissage** des flacons ➔ **29 mL par épisode** en moyenne HCC 2022 (Se 75% vs 98 % pour 40-60mL par épisode)

...sans prélèvement de qualité même le « test idéal » est inutile

Conclusion

Antibiorésistance et TDR

- Beaucoup d'innovation
- Certains TDR déjà quasi « indispensables » (PLP2a/SARM, BLT/EB C3G-R, PCR...)
- ➔ Toujours complémentaire culture + ATB qui est et restera le « gold standard » !
- ➔ Ne pas hésitez à **discuter au cas par cas** avec le microbiologiste y compris en dehors des situations pour lesquels il avait prévu de les utiliser (ex : arthrite septique, méningite sur une DVE, pyélo ?, ...)

Avenir ?

- ➔ La place des technologies innovantes & coûteuses reste à définir
 - **Besoins** (clinicien + microbiologiste) ?
 - **Ecologie** locale et des moyens (HCC entérobactéries C3G-R # 15%, Carba-R <0,1%)
 - **Choix des patients/filières** qui pourront bénéficier de ces techniques ?
 - Permanence de soins **H24** ?
 - Etudes médico-économiques plutôt favorables mais surcoût ➔ **projet global** (équipe infectio +++)



Merci pour votre attention

Annexe 1 : RAST (méthode EUCAST)

Rapid AST EUCAST

Break points version 5.0 April 2022

Avis du CASFM 2023

The proportion of readable zone diameters

The proportion of zone diameters (%) which are possible to read* after 4 – 20 h of incubation.

Organism	4 hours (%)	6 hours (%)	8 hours (%)	16-20 hours (%)
<i>Escherichia coli</i>	90	99	99	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96	98	98	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	88	97	100
<i>Acinetobacter baumannii</i>	99	100	100	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	55**	91	95	100
<i>Enterococcus faecalis</i>	93	99	100	ND
<i>Enterococcus faecium</i>	44	93	99	ND
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	68	83	95	100

*The table displays “possible to read”, not “possible to interpret”, since some of the zone diameters will be in the ATU.

**Cefoxitin and aminoglycosides are easy to read while norfloxacin and clindamycin are more difficult.

ND: No data available, testing have not been performed.

Méthode directe rapide proposée par l'EUCAST (DRSA ou RAST)

L'EUCAST propose une méthode de détermination rapide de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (DRSA ou RAST “Rapid Antimicrobial susceptibility Testing”, directement à partir des flacons d'hémoculture positifs. Cette méthodologie est basée sur la technique « classique » de diffusion en milieu gélosé, mais avec un inoculum modifié (125 ± 25 µL du bouillon d'hémoculture non dilué, prélevé entre 0 et 18 h après positivisation du flacon) et des instructions de lecture particulières. Cette méthode, validée avec les flacons de plusieurs automates [BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMérieux) et VersaTREK (ThermoFisher)], propose des concentrations critiques spécifiques, adaptées à des temps d'incubation courts de 4, 6 et 8 h pour *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, et de 6 et 8 h pour *Pseudomonas aeruginosa*. Depuis 2022, l'EUCAST propose également des concentrations critiques associées à une incubation de 16 à 20 h pour *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *S. pneumoniae*, lorsque les résultats à 4, 6 ou 8 h ne sont pas interprétables.

Avec cette méthode, la lecture des diamètres est parfois difficile : si les diamètres ne sont pas suffisamment lisibles ou si les résultats obtenus sont dans la zone d'incertitude technique aux différents temps d'incubation préconisés, il peut être nécessaire de réaliser un antibiogramme « classique » à partir de colonies isolées en milieu gélosé.

Les instructions (méthodologie, contrôles de qualité, concentrations critiques, règles de lecture) doivent être scrupuleusement suivies, et tous les documents correspondants (régulièrement actualisés) doivent être consultés directement sur le site de l'EUCAST (https://www.eucast.org/rapid_ast_in_bloodcultures).

https://www.eucast.org/rapid_ast_in_bloodcultures

Annexe 2 : βLACTA Test / évaluation HCC

Espèce	phénotype	Antibiogramme										Résultats obtenus
		Tazocilline	cefoxitine	Cefotaxime	ceftazidime	ceftriaxone	cefepime	ertapénème	imipénème	méropénème	aztréonam	
Pseudomonas aeruginosa	BLSE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	+
Klebsiella oxytoca	Hyperoxy	R						R	R	R	R	+
Klebsiella pneumoniae	SHV-1	R	S	S	I (2 mg/L - 14 mm)	S	S	S	S	S	S	douteux
Morganella morganii	AmpC --	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	-
Citrobacter freundii	BLSE	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	+
Enterobacter cloacae	BLSE	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	+
Citrobacter amanolalyticus	BLSE inducible chromosomique (AmpC)	S	R	S (3 mg/L - 20 mm)	S	R (8 mg/L - 20 mm)	S	S	S	S	R	+
Pseudomonas aeruginosa	AmpC non surexprimée + D2 muté	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	-
Escherichia coli	CHN (hyperproduite ou plasmidique)	ZIT	R	S (20 mm)	I (3 mg/L - 19 mm)	-	S (34 mm)	S	S	S	S (25 mm)	-
Escherichia coli	CHN (hyperproduite)	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	-
Enterobacter cloacae	CHN (AmpC déréprimée)	R	R	R	R	2	S	R	S	S	R	douteux/ -
Morganella morganii	CHN (AmpC déréprimée)	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	+
Enterobacter cloacae	VIM-1 sans BLSE	R	R	R	R	I	I (2 mg/L)	S	S	S	S	douteux
Enterobacter cloacae	VIM-1 avec BLSE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	+
Escherichia coli	NDM-5 avec BLSE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	+
Klebsiella pneumoniae	KPC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	+
Citrobacter koseri	OXA-48 sans BLSE associée	R	S	S ==> R	S	S (25 mm) ==> R	S ==> R	R	S	S	S (35 mm)	+ / douteux
Citrobacter freundii	OXA-181 avec BLSE associée	R	R	R	R	R	R	non testé	S	S	R	+
Klebsiella pneumoniae	CHN (plasmidique DHA-2)	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	+
Enterobacter aerogenes	CHN (AmpC déréprimée)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-
Escherichia coli	PHN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-
Escherichia coli	TRI	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	douteux/ -
Enterobacter cloacae	CHN	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	+
Proteus mirabilis	CHN (plasmidique ACC-1)	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	+
Klebsiella pneumoniae	OXA-163	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	+

Annexe 3 : βLACTA Test revue littérature performances

Souches utilisées	Performances	Réf.
Vrais positifs : 73 Faux positifs : 8 Vrais négatifs : 374 Faux négatifs : 18 Ininterprétables : 9	Spécificité = 97.9% Sensibilité = 80.2 % VPN = 95.4% VPP = 90.1%	Fiche technique fournisseur : sur subculture 18-20 h
Vrais positifs : 265 Faux positifs : 8 Vrais négatifs : 220 Faux négatifs : 37 Ininterprétable : 0	Spécificité = 99.6 % Sensibilité = 87.7% (67,4 % pour groupe 3 et 21% pour CHN groupe 3) VPN = 98.2 % VPP = 97 %	sur subculture 18-20 h Renvoisé A, et al, . Evaluation of the βLacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2013 Dec;51(12):4012-7. doi: 10.1128/JCM.01936-13.
Vrais positifs : 76 Faux positifs : 0 Vrais négatifs : 251 Faux négatifs : 6 (3 E. coli plasmidique CMY-2 AmpC, et 3 AmpC CHN groupe 3) Ininterprétable : 5 (1 E. coli Sensible, 1 E coli SHV-2, 2 E. coli SHV-12, 1 KP VIM)	Spécificité = 100 % Sensibilité = 92.7% VPN = 97.7 % VPP = 100 %	sur subculture 18-20 h Morosini MI, et al., Rapid detection of β-lactamase-hydrolyzing extended-spectrum cephalosporins in Enterobacteriaceae by use of the new chromogenic βLacta test. J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1741-4. doi: 10.1128/JCM.03614-13.
Vrais positifs : 72 Faux positifs : 2 (K. oxytoca hyperoxy) Vrais négatifs : 486 Faux négatifs : 5 (4 AmpC déréprimée et 1 plasmidique) Ininterprétable : 6 (1 BLSE, 1 AmpC plasmidique, 1 AmpC déréprimée, 3 OXA-1)	Spécificité = 99.6 % Sensibilité = 93.5% VPN = 99 % VPP = 97.3 %	M. Ben Soltana et al, Evaluation of a new chromogenic test (β LACTA™) for rapid detection of third-generation cephalosporins non-susceptible Enterobacteriaceae, ECCMID 2012.
Vrais positifs : 46 Faux positifs : 0 Vrais négatifs : 218 Faux négatifs : 5 Ininterprétable : 0	Spécificité = 100 % Sensibilité = 90,2 % VPN = 97,7% VPP = 100 %	sur subculture de 2 - 3h Hasso M, Porter V, Simor AE. Evaluation of the β-Lacta Test for Detection of Extended-Spectrum-β-Lactamase (ESBL)-Producing Organisms Directly from Positive Blood Cultures by Use of Smudge Plates. J Clin Microbiol. 2017 Dec;55(12):3560-3562. doi: 10.1128/JCM.01354-17.
Vrais positifs : 22 Faux positifs : 0 Vrais négatifs : 126 Faux négatifs : 5	Spécificité = 100 % Sensibilité = 81.5% VPN = 96% VPP = 100 %	sur subculture de 3-6 h B.M Willey et al, Pilot Evaluation of the βLACTA Test for Predicting 3rd Generation Cephalosporin Resistance in Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca and Proteus mirabilis ECCMID 2014
164 souches	Ceftazidime R Sensibilité : 95% Spécificité : 86%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> subculture 24h, incubation 30 min Laurent T, Huang TD, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of the βLACTA test, a novel commercial chromogenic test for rapid detection of ceftazidime-nonsusceptible Pseudomonas aeruginosa isolates. J Clin Microbiol. 2013 Jun;51(6):1951-4.

Annexe 4 : MALDI-TOF / résistance aux antibiotiques

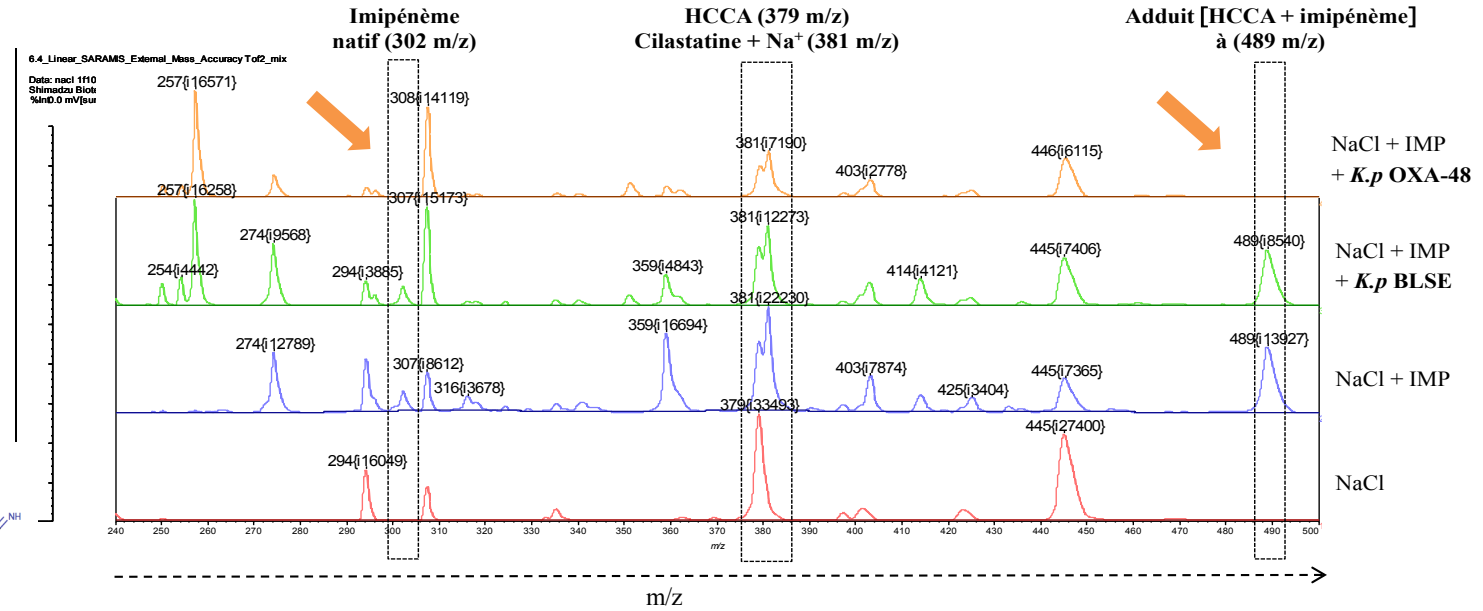
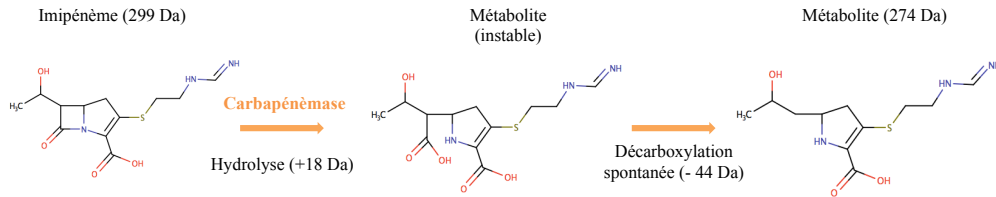
J Antimicrob Chemother 2018; 73: 2352–2359
doi:10.1093/jac/dky209 Advance Access publication 11 June 2018

Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy

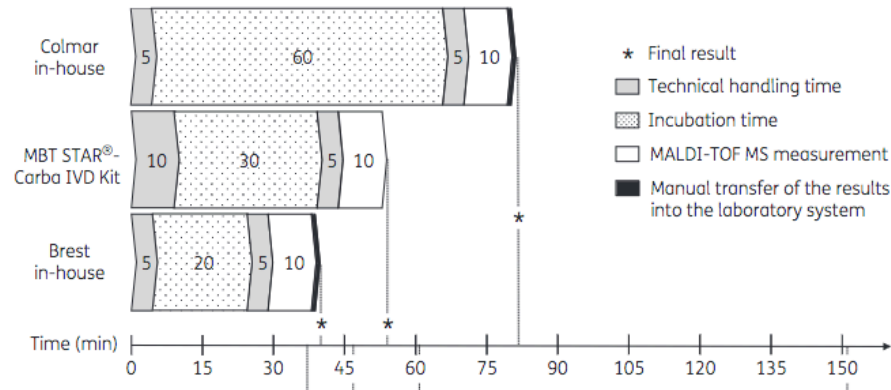
MALDI-TOF for the rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: comparison of the commercialized MBT STAR®-Carba IVD Kit with two in-house MALDI-TOF techniques and the RAPIDE® CARBA NP

Laurent Dortet^{1,3,4}, Didier Tandé⁴, Dominique de Briel⁵, Sandrine Bernabeu^{1,3}, Camille Lasserre⁴, Guillaume Gregorowicz⁵, Agnès B. Jousset^{1,3} and Thierry Naas^{1,3}

¹Department of Bacteriology-Hygiene, Hôpital de Bicêtre, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France; ³Research Unit EA 7361 'Structure, dynamics, function and expression of broad spectrum β -lactamases', Faculty of Medicine, University Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France; ⁴Department of Microbiology, CHU de Brest, Brest, France; ⁵Department of Microbiology, Hôpitaux Civils de Colmar, Colmar, France



- Test « phénotypique »
- Sensible (95-100%)
- Spécifique (98,2%-100%)
- Adaptée pour de nombreux ATB (Carba, C3G, colistine...)
- relativement rapide 45 – 80 min
- Limites : certains variants émergents (faible hydrolyse), temps de manipulation important (donc TAT $\nearrow$)



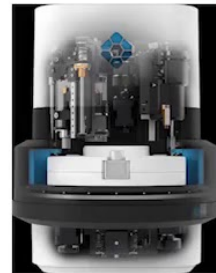
Annexe 5 : Antibiogramme rapide et ID → Accelerate PHENO (Accelerate/BD)

- A partir de l'hémoculture positive (BGN, CPA, CPCH, levure)
- ID 1h30-2h et ATB (6-7h)
- Réduction du TTR vs conventionnel (subculture) de 8-12h vs 1,5-3J (1)
- Commercialisé depuis 2018



System

- 1-4 module(s)
- Control & Analysis PCs
- Touchscreen monitor



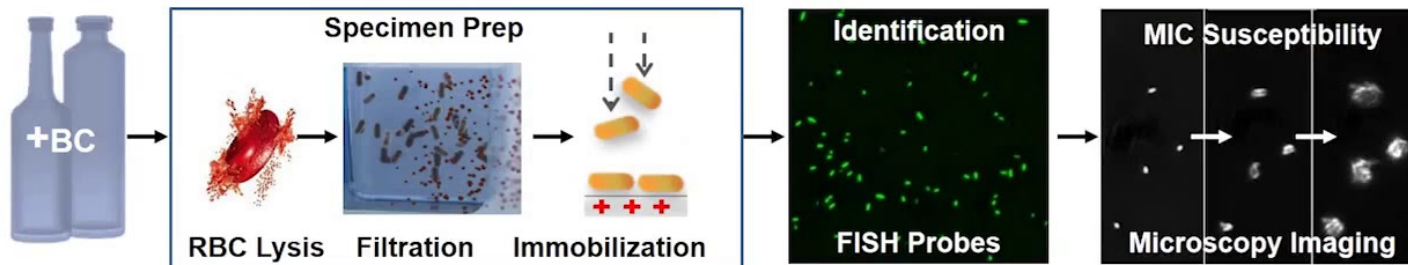
Module

- Automated pipetting robot
- Digital camera
- Custom microscope

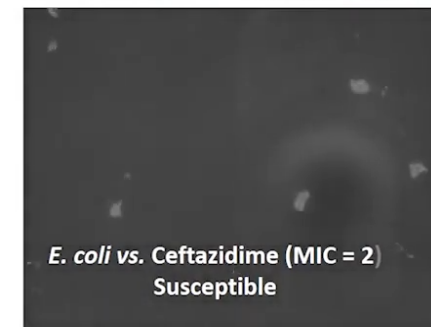
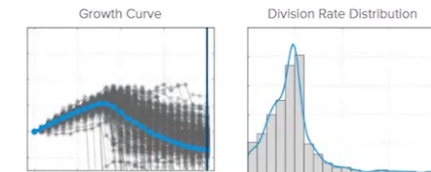
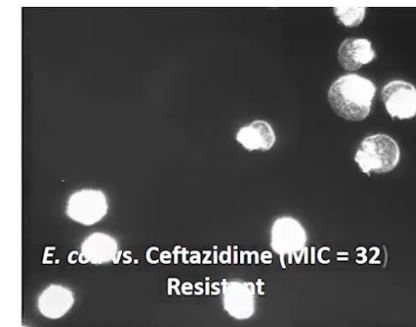
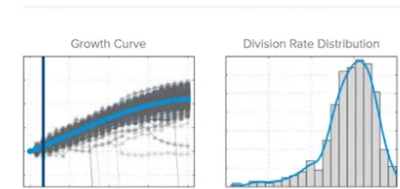


Kit

- 48 flow-channel cassette
- Reagent cartridge
- Sample vial



ID : Fluorescence in situ hybridation



ATB : Lecture optique continue croissance μ colonies + comparaison à un algorithme de souches connue (# Vitek2 bioMérieux, Phoenix BD etc)

(1) Humphries R, Di Martino T. Effective implementation of the Accelerate Pheno™ system for positive blood cultures. J Antimicrob Chemother. 2019 Jan 1;74(Suppl 1):i40-i43.

Annexe 5 : Antibiogramme rapide et ID ➔ Accelerate PHENO (Accelerate/BD)

Table 1. Pathogens detectable by Accelerate Pheno™ and antimicrobials tested for each pathogen.

Gram-positive bacteria	Identification	Ampicillin	Ceftaroline	Daptomycin	Linezolid	Vancomycin	Methicillin resistance (cefoxitin)						
<i>Staphylococcus aureus</i>	+		+	+	+	+	+						
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	+					+	+						
CoNS	+			+		+	+						
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+		+	+	+							
<i>Enterococcus faecium</i>	+	+		+	+	+							
<i>Streptococcus</i> spp.	+												
Gram-negative bacteria	Identification	Ampicillin-sulbactam	Piperacillin-tazobactam	Cefepime	Ceftazidime	Ceftriaxone	Ertapenem	Meropenem	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Ciprofloxacin	Aztreonam
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> spp.	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Citrobacter</i> spp.	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Serratia marcescens</i>	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+		+	+	+			+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+		+						+				
Yeasts													
<i>Candida albicans</i>													
<i>Candida glabrata</i>													

Cenci E, Paggi R, Socio GV, Bozza S, Camilloni B, Pietrella D, Mencacci A. Accelerate Pheno™ blood culture detection system: a literature review. Future Microbiol. 2020 Oct;15:1595-1605.

Annexe 5 : AntibioGramme rapide et ID ➔ Accelerate PHENO (Accelerate/BD)

Comparative Study > Microbiol Spectr. 2021 Dec 22;9(3):e0183621.
doi: 10.1128/Spectrum.01836-21. Epub 2021 Dec 22.

Systematic Evaluation of the Accelerate Pheno System for Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria Isolated from Blood Cultures

Yera A Patel¹, Thomas J Kirn², Melvin P Weinstein², Priyanka Uprety²

Affiliations + expand
PMID: 34937177 PMCID: PMC8694102 DOI: 10.1128/Spectrum.01836-21

TABLE 1 Diagnostic accuracy of Accelerate Pheno blood culture detection system for *Enterobacteriales* (n = 263)^a

Antibiotics	Categorical agreement		VME		ME		mE	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Amikacin	261	97	3	60	1	0.4	4	2
Ampicillin-sulbactam	235	83	2	3	2	2	37	16
Aztreonam	262	93	2	7	3	1	13	5
Cefepime	263	90	4	13	3	1	20	8
Ceftazidime	263	88	1	4	10	4	21	8
Ceftriaxone	263	94	2	5	3	1	11	4
Ciprofloxacin	262	87	7	8	0	0	26	10
Ertapenem	262	97	3	60	2	1	2	1
Gentamicin	263	99	0	0	1	0.4	2	1
Meropenem	240	98	0	0	1	0.4	4	2
Piperacillin-tazobactam	261	88	1	11	6	3	25	10
Tobramycin	263	93	1	3	2	1	16	6

^aEnterobacteriales (n = 263), 156 *E.coli*, 60 *Klebsiella* spp., 20 *Proteus mirabilis*, 17 *Enterobacter*, and 10 *S. marcescens*. VME, very major errors; ME, major errors; mE, minor errors.

- Etude mono centrique rétrospective + prospective
- BGN uniquement : 263 EB, 21 PYO
- Evaluation : ATB vs référentiel/CLSI

TABLE 2 Diagnostic accuracy of Accelerate Pheno blood culture detection system for *Pseudomonas aeruginosa* (n = 21)^a

Antibiotics	Categorical agreement		VME		ME		mE	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Amikacin	21	100	0	0	0	0	0	0
Cefepime	14	79	1	50	1	9	1	7
Ceftazidime	12	25	0	0	6	67	3	25
Ciprofloxacin	21	76	2	40	0	0	3	14
Gentamicin	21	81	0	0	0	0	4	19
Meropenem	20	80	0	0	0	0	4	20
Piperacillin-tazobactam	21	38	0	0	3	19	10	48
Tobramycin	21	95	0	0	0	0	1	5

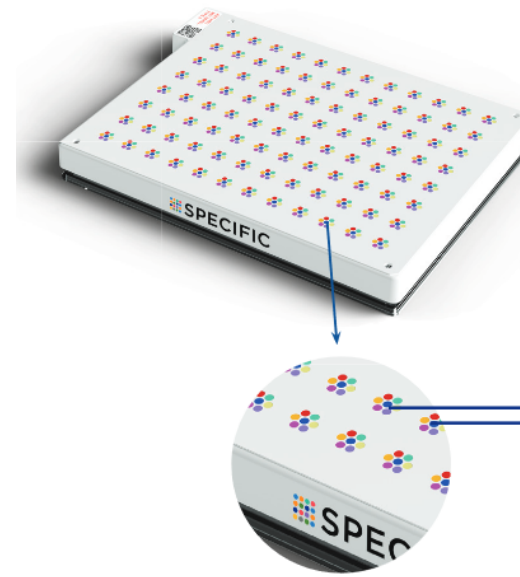
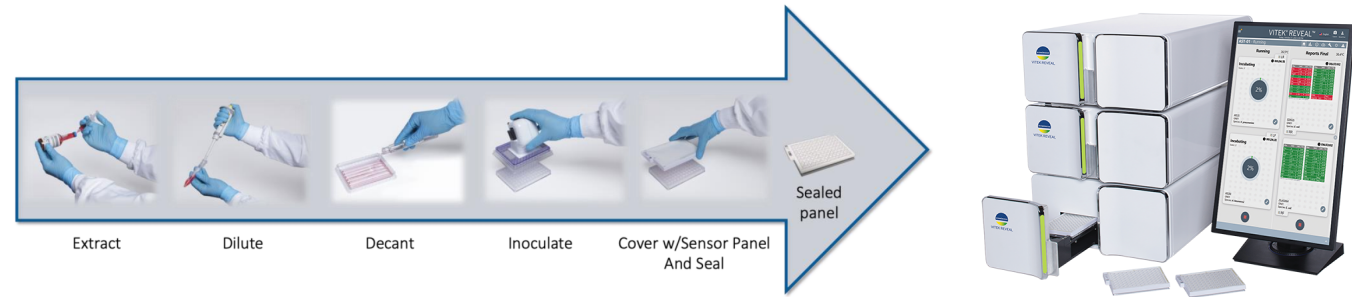
^aVME, very major errors; ME, major errors; mE, minor errors.

Performances très variables +++ pour PYO

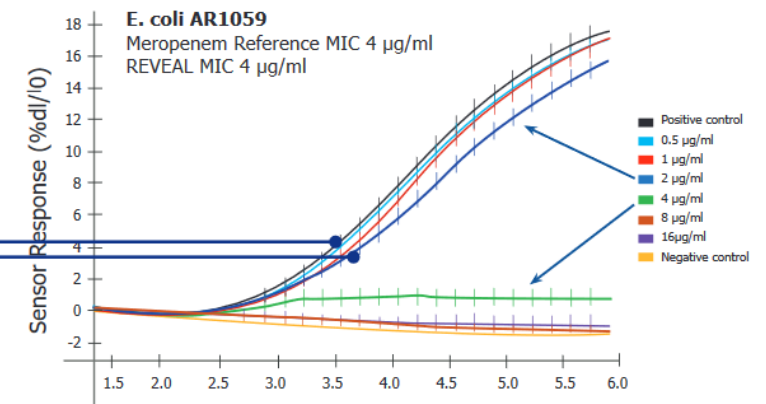
Annexe 6 : Antibiogramme rapide ➔ Vitek Reveal (Specific Diagnostics/bioMérieux)

- Antibiogramme phénotypique rapide 5-6h pour **BGN**
- A partir du flacon positif
- **CMI** « estimée »
- Détection de croissance par mesure de la production de COV (composés organiques volatiles) toutes les 10 min dans chacun des puits
- **A coupler à Id rapide :**
 - MALDI-TOF sur subculture précoce/culot (= Id + ATB à 6h post positivité du flacon)
 - ou
 - PCR syndromique

➔ Commercialisation **2023**, évalué par les CNR (carbapénèmase/Bicêtre, Pseudomonas/Besançon, Entérocoque/Rennes)



Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)



Annexe 6 : AntibioGramme rapide ➔ Vitek Reveal (Specific Diagnostics/bioMérieux)

Performance of the Reveal Rapid Antibiotic Susceptibility Testing System on Gram-Negative Blood Cultures at a Large Urban Hospital

Robert Tibbetts ^a, Sheeja George^a, Reece Burwell^b, Lara Rajeev^b, Paul A. Rhodes^b, Pragya Singh^b, Linoj Samuel ^a

^aHenry Ford Health System, Division of Clinical Microbiology, Detroit, Michigan, USA

^bSpecific Diagnostics, Mountain View, California, USA

TABLE 5 Performance of Reveal AST with blood samples contrived with CDC AR Bank isolates

Parameter and study detail	Performance with spiked challenge strains
Parameter, % (no. positive/total no.)	
EA	97.7 (509/521)
CA	95.2 (496/521)
mE	4.0 (21/521)
ME	0 (0/122)
VME	1.0 (4/384)
Reveal avg TTR	4.4 h
Study set details	
No. of antibiotics	19
No. of species	6
No. of strains	33
No. of strain/antibiotic pairs	521
No. susceptible	122
No. intermediate	15
No. resistant	384
R (%)	73.7

TABLE 3 Performance of the Reveal AST system by antimicrobial against Sensititre and Vitek 2

Antimicrobial	Reveal avg TTR (h)	Sensititre as reference									Vitek 2 as reference								
		No. of strains ^a				% Agreement (no.)		No. of errors			No. of strains ^a				% Agreement (no.)		No. of errors		
		Total	S	R	I	EA	CA	mE	ME	VME	Total	S	R	I	EA	CA	mE	ME	VME
Ampicillin	3.5	66	24	42	0	100 (66)	90.9 (60)	6	0	0	67	23	43	1	94.0 (63)	89.6 (60)	7	0	0
Piperacillin	4.6	101	61	23	17	97.0 (98)	93.1 (94)	6	0	1									
Ampicillin/sulbactam	4.6	86	49	16	21	98.8 (85)	66.3 (57)	29	0	0	87	44	31	12	90.8 (79)	81.6 (71)	16	0	0
Piperacillin-tazobactam	4.9	101	97	2	2	96.0 (97)	96.0 (97)	2	0	2	104	97	3	4	94.2 (98)	93.3 (97)	6	0	1
Cefazolin	4.2	86	69	17	0	94.2 (81)	100 (86)	0	0	0	88	68	17	3	97.7 (86)	96.6 (85)	3	0	0
Cefepime	5.2	101	84	17	0	92.1 (93)	100 (101)	0	0	0	104	86	17	1	90.1 (94)	99.0 (103)	1	0	0
Cefotaxime	4.2	91	72	19	0	100 (91)	100 (91)	0	0	0									
Ceftazidime	4.9	101	86	11	4	98.0 (99)	96.0 (97)	3	1	0									
Ceftriaxone	4.1	91	72	19	0	100 (91)	100 (91)	0	0	0	93	74	19	0	97.8 (91)	100 (93)	0	0	0
Cefoxitin	4.1	86	82	2	2	95.3 (82)	88.3 (76)	10	0	0									
Aztreonam	5.1	101	82	19	0	97.0 (98)	99.0 (100)	1	0	0	93	74	19	0	100 (93)	100 (93)	0	0	0
ESBL screen	4.4	85	68	17	0	NA	100 (85)	0	0	0	87	70	17	0	NA	100 (87)	0	0	0
Ertapenem	5.7	91	89	1	1	100 (91)	97.8 (89)	2	0	0	93	90	2	1	97.8 (91)	96.8 (90)	2	0	1
Imipenem	4.9	101	99	0	2	97.0 (98)	97.0 (98)	3	0										
Meropenem	6.0	101	101	0	0	95.0 (96)	95.0 (96)	4	1		104	103	1	0	94.2 (98)	94.2 (98)	4	1	1
Amikacin	4.3	101	101	0	0	100 (101)	100 (101)	0	0		104	104	0	0	100 (104)	100 (104)	0	0	
Gentamicin	4.4	101	95	6	0	100 (101)	99.0 (100)	1	0	0	104	97	6	1	99.0 (103)	100 (104)	0	0	0
Tobramycin	4.5	101	96	5	0	100 (101)	98.0 (99)	2	0	0	104	96	4	4	100 (104)	98 (102)	2	0	0
Ciprofloxacin	3.9	101	80	21	0	98.0 (99)	98.0 (99)	1	1	0	104	81	22	1	98.1 (102)	99.0 (103)	0	1	0
Levofloxacin	4.1	101	80	21	0	98.0 (99)	98.0 (99)	2	0	0									
Tetracycline	4.2	91	67	24	0	98.9 (90)	98.9 (90)	0	1	0									
Tigecycline	4.2	91	91	0	0	100 (91)	100 (91)	0	0		93	93	0	0	100 (93)	100 (93)	0	0	
Nitrofurantoin	4.4	91	81	3	7	98.9 (90)	92.3 (84)	6	0	1	93	77	3	13	98.9 (92)	86.0 (80)	13	0	0
Trimethoprim/sulfa	3.8	91	63	28	0	100 (91)	98.9 (90)	0	1	0	93	65	28	0	97.9 (91)	97.9 (91)	0	2	0

^aThe number of strains evaluated varies by drug, with species-drug pairs exhibiting intrinsic resistance excluded from the analysis. Three strains do not have Sensititre results. The number of strains evaluated for each comparator was used as the denominator for the respective %EA and %CA calculations.

- ➔ A ce jour 3 études, résultats homogènes
- CA : 96,1 - 96,3 % (PYO) (BGN)

○ VME : 1,6 % - 1,3 % (PYO) (BGN)

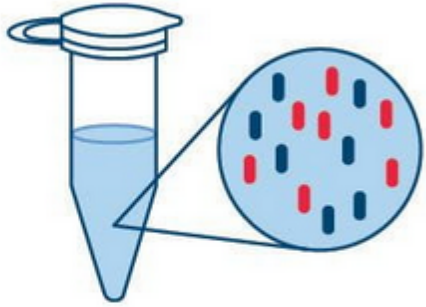
○ ME : 4,2 % (PYO)
- ➔ D'autres études à venir +++

- Couchot J, Fournier D, Bour M, Rajeev L, Rhodes P, Singh P, Jeannot K, Plésiat P. Evaluation of the Reveal® rapid AST system to assess the susceptibility of Pseudomonas aeruginosa from blood cultures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2023 Mar;42(3):359-363.

- Tibbetts R, George S, Burwell R, Rajeev L, Rhodes PA, Singh P, Samuel L. Performance of the Reveal Rapid Antibiotic Susceptibility Testing System on Gram-Negative Blood Cultures at a Large Urban Hospital. J Clin Microbiol. 2022 Jun 15;60(6):e0009822.

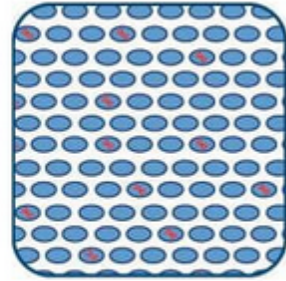
- Martin Rottmann, Paul Rhodes, Pragya Singh, Jean Louis Hermann, Katy Jeannot, Vincent Cattoir, Etienne Carboneille, Patrick Plesiat, Alan Williams, Laurent Dortet, Clinical evaluation of the SPECIFIC REVEAL™ Rapid AST System with Gram-negative bacteremia samples in 6 hospitals in France and England, ECCMID 2022.

Annexe 7 : dPCR principe

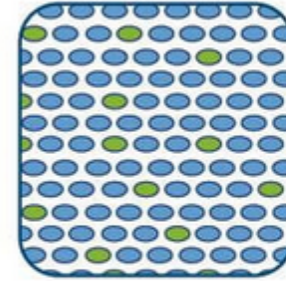


**Dilution d'échantillon et
préparation du mélange
réactionnel de PCR**

Bleu – Cible Rouge – Fond
(ADNg, ADNc,
amorces/sondes, Master Mix)



**Fractionnement de la
réaction de PCR en
milliers de réactions
individuelles**



**Amplification par PCR en
point final des fractions**

Vert – Réactions positives Bleu –
Réactions négatives



**Affichage et
quantification absolue**

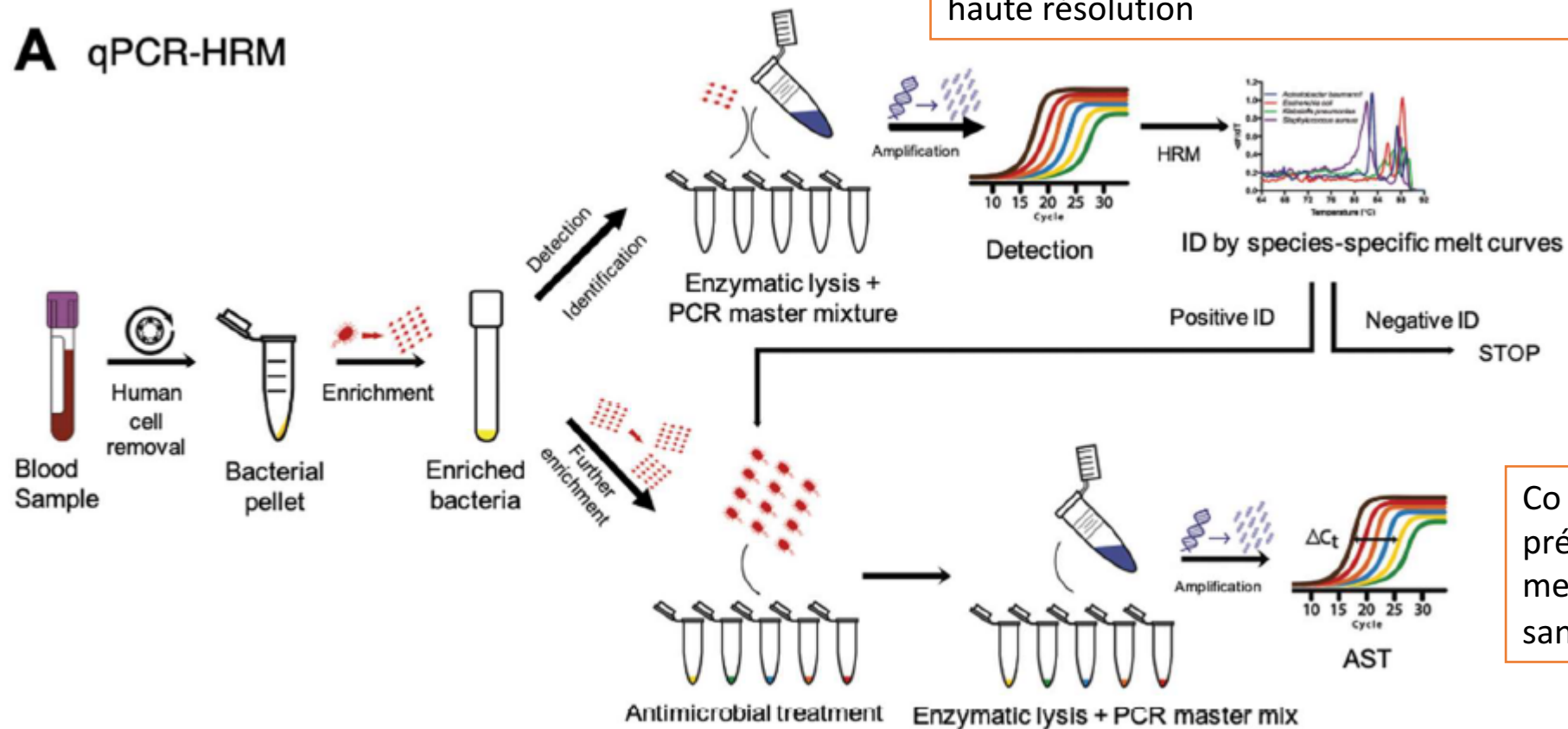
➔ Augmente la sensibilité (diminution des inhibiteurs de PCR) et la spécificité (diminution des compétition entre les cibles)

➔ Technique quantitative

Annexe 8 : qPCR-HRM + phenomolecular AST

➔ ID par courbes de fusion (T° à laquelle ADN monocaténaire = ADN bicaténaire qui est corrélée au CG% donc spécifique de la séquence amplifiée) en haute résolution

A qPCR-HRM



Co incubation courte échantillon prétraité avec ATB puis PCR et mesure du delta du Ct avec et sans ATB ➔ corrélé à la CMI

Annexe 9 : PCR nichées Magicplex™ Sepsis Real-time (Seegene) sur sang total

- Sang total 1 mL
- Prétraitement (lyse GB/GR, dégradation ADN, concentration, lyse bactérienne)
- 3 PCR nichées successives
- Kit utilisable sur différents automates de RT-PCR
- 90 Id + 3 gènes de résistance (Gram +)
- **5-7h**
- Méningo ?

Sensibilité # 30%, Sp 95%

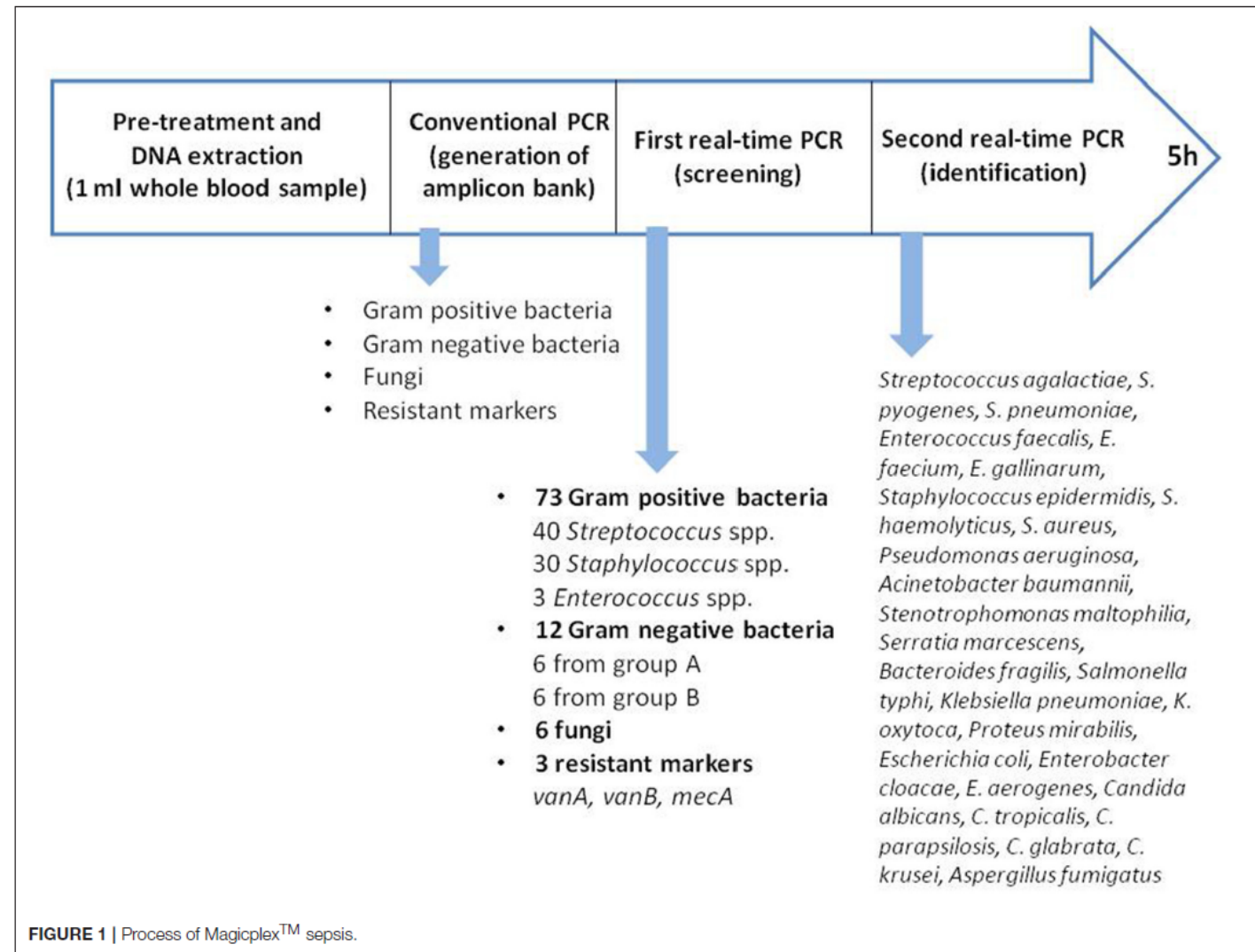
Grande variabilité entre les études

Influence de la population étudiée +++

Pb interprétation si PCR + / BC - ?

Se > BC si traitement atb ?

Faux positif (ADNémie) ?



Annexe 10 : critères FDA validation méthode ATB

- **EA** (*essential agreement*) = nb de souche avec même CMI que la méthode de référence (+/-1 dilution de raison 2)/ **nb total de souche testées**
- **CA** (*categorical agreement*) = Nb de souche avec même catégorisation clinique (S/I/R) que la méthode de référence / **nb total de souche testées**
- **mE** (*minor error*) = Nb de souche catégorisée I avec la méthode évaluée et S ou R avec la méthode de référence / **nb total de souche testées**
- **ME** (*major error*) = Nb de souche catégorisée R avec la méthode évaluée et S avec la méthode de référence / **nb de souche S avec la méthode de référence**
- **VME** (*very major error*) = Nb de souche catégorisée S avec la méthode évaluée et R avec la méthode de référence / **nb de souche R avec la méthode de référence**

- **Absence de culture < 10%**
- **CA et EA ≥ 90%**
- **ME ≤ 3%**
- **VME ≤ 1,5%**