



De l'antibiogramme à la détection précoce des résistances : apport des nouvelles technologies utilisées en microbiologie (MALDI TOF MS, IR, NGS)

Jean-Winoc DECOUSSER

EOH et Laboratoire d'Hygiène

Hôpitaux Universitaires Henri-Mondor,

Assistance Publique – Hôpitaux de Paris – UPEC



Conflit d'intérêt

- Aucun
- ... à part celui d'avoir une double formation bactériologiste – hygiéniste



- Nouveautés +++
- Mais vrai **progrès** pour le **patient/la collectivité** ou **gadgets** pour les **biologistes / cliniciens**?

Quelle légitimité?

Département Médico-Universitaire, Biologie – Pathologie
Département de Diagnostic, prévention et traitement des infections
Pr Jean-Michel Pawlotsky, PU-PH



Laboratoire de
Virologie

Laboratoire de
Bactériologie

Laboratoire de
Mycologie-Parasitologie

Unité Transversale de
Traitement des
Infections

Equipe Opérationnelle
d'Hygiène –
Laboratoire d'Hygiène

Stephane Chevaliez
PU-PH

Paul-Louis Woerther,
MCU-PH

Francoise Botterel,
PU-PH

Raphaël Lepeule,
PH

Jean-Winoc Decousser,
PU-PH

Plateforme de sérologies microbiennes

Plateforme de quantification des génomes microbiens

Plateforme d'identification par spectrométrie de masse

Plateforme NGS

➤ Structure intégrée et intégrant
tous les domaines de la
microbiologie

ET

➤ L'EOH

ET

➤ L'équipe mobile d'infectiologie

= Échanges +++

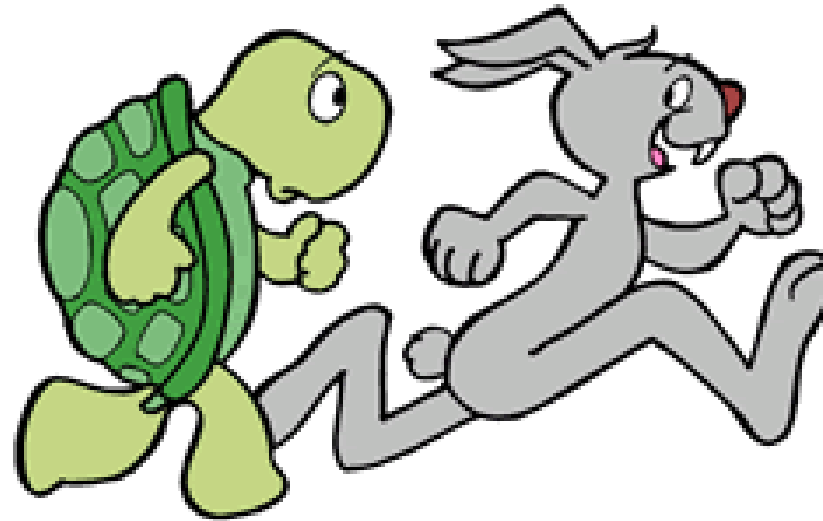
= compréhension des besoins et
des impératifs de chacun

= approche microbiologique
transversale (cf. panels de PCR)

= environnement « pacifié »

Plan

- **Introduction:** éléments de contexte
- **Avant**
- **Aujourd'hui**
- **Demain**
- **Oui mais**



Comment fonctionne un infectiologue devant un patient potentiellement infecté / colonisé?



Infection ? Versus autres causes d'inflammation / fièvre...

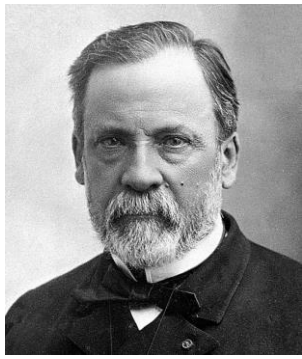
Si infection: Virus - Bactérie- Champignon – parasite ?

Si bactérie: **quelle bactérie ?** quelle résistance « naturelle »?

Si bactérie: quelle résistance « acquise »?

Autres questions: épidémie, portage de BMR / BHRe....

ANTIBIOGRAMME



Avant: la microbiologie de « Pasteur »

1822-1895

- = basée sur **la mise en culture**, l'identification puis la caractérisation (= sensibilité aux anti-infectieux) d'un agent pathogène
- **temps de la culture** (+ problème lié aux conditions de culture, qui nécessite de cibler les agents pathogènes suspectés)
- + **temps de l'identification**
- + **temps de la caractérisation** (antibiogramme ou autre...)



24h



<1 euros

24h



5 euros



1 – 2 euros

= 48H
Cf. la réévaluation à 48h des antibiothérapies

En attendant... l'escalade / la désescalade

- **Infection:** En fonction de la gravité / risque d'un microorganisme résistant: **traitement antibiotique**
« empirique » ou **« probabiliste »** = basé sur la connaissance / la probabilité des microorganismes impliqués et de leurs résistances acquises
 - **« Pari » microbiologique:** 10 – 20% d'échec?
 - En fonction de l'arrivée des résultats: **réévaluation** puis **désescalade** (ou escalade)
- **Portage de BMR:** mise en précautions complémentaires « préventive » en fonction des facteurs de risques de portage de BMR :
 - En fonction des résultats: maintien ou levée des PC.



Aujourd'hui: les techniques rapides !

- **Infection** vs autres causes d'inflammation
- **Identification** « rapide » et large des agents pathogènes impliqués
- **Détection rapide** de la présence de gènes de résistance acquise
- **Antibiogramme rapide**
- **Comparaison** rapide des souches



Bacteriology | Research Article | 11 April 2022

Stop Waiting for Tomorrow: Disk Diffusion Performed on Early Growth Is an Accurate Method for Antimicrobial Susceptibility Testing with Reduced Turnaround Time

Daniel M. Webber, Meghan A. Wallace, Carey-Ann D. Burnham

<https://doi.org/10.1128/jcm.03007-20>

Disk diffusion is a slow but reliable standard method for measuring the antimicrobial susceptibility of microorganisms. Our objective was to improve the turnaround time for this method by reducing the time that cultures are incubated before setting up ...

Clinical Microbiology | Research Article | 07 April 2022

Saving Time in Blood Culture Diagnostics: a Prospective Evaluation of the Qvella FAST-PBC Prep Application on the Fast System

Semjon Grinberg, Susanne Schubert, Kristina Hochauf-Stange, Alexander H. Dalpke, Marco Narvaez Encalada

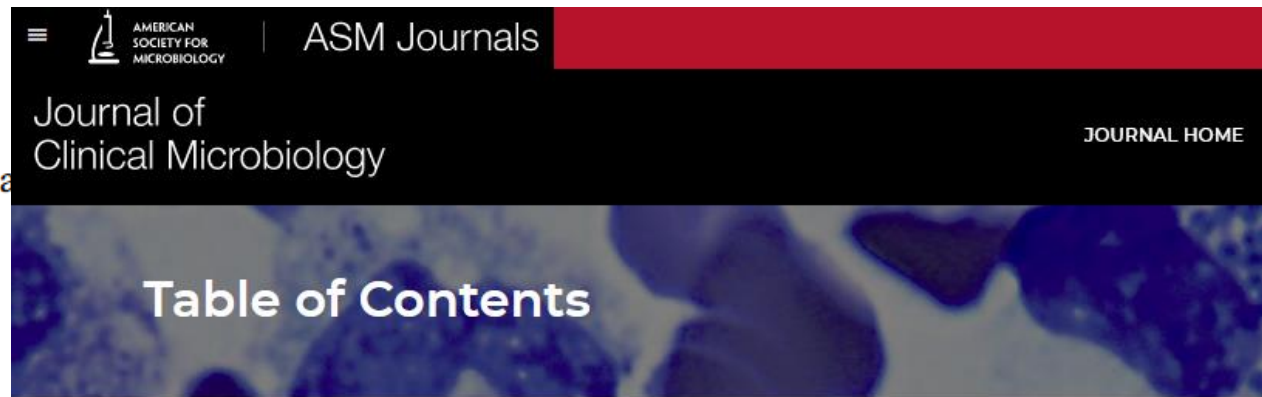
<https://doi.org/10.1128/jcm.02533-21>

Time to results for identification (ID) and antimicrobial susceptibility testing (AST) from blood cultures is an important factor impacting outcome in sepsis. In this study we evaluated a novel device, the FAST™ system from Qvella that concentrates ...

Clinical Microbiology | Research Article | 11 April 2022

Utility of Broad-Range PCR Sequencing for Infectious Diseases Clinical Decision Making: a Pediatric Center Experience

Caitlin Naureckas Li, Mari M. Nakamura



ASM Journals / Journal of Clinical Microbiology / Vol. 60, No. 5

Volume 60 • Number 5 • May 2022

Current Issue



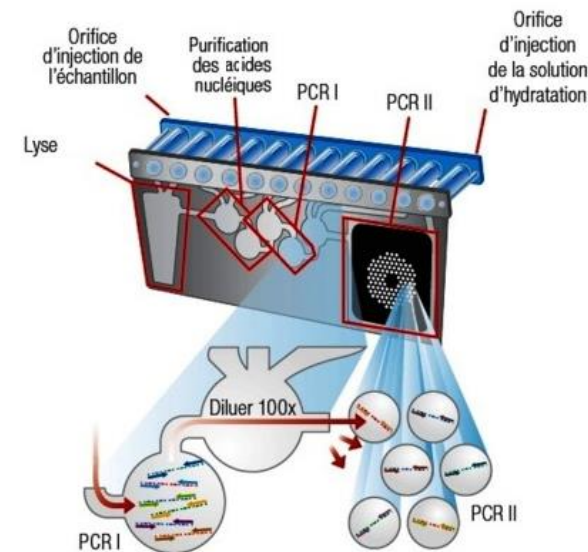
Techniques rapides: chercher directement dans le prélèvement la trace « ADN » de l'agent infectieux

- **Polymérase Chain Réaction:** ciblant un, puis plusieurs microorganismes, +/- gène de résistance ou de virulence
 - Virologie précurseur remplace culture cellulaire (longe et couteuse)
- **Multiplexage:** plus de cibles, avec des « *panels syndromiques* » qui regroupent les différents microorganismes (bactéries / virus / champignons)
- **Automatisation / simplification:** 7 j/7, 24h/24



Xpert SSTI[®] (Cepheid):
recherche de *S. aureus* et gène de résistance sur un écouvillon)
Xpert Carb R / ERV

30 – 40
euros /
test



 FilmArray[®]



100
euros /
test

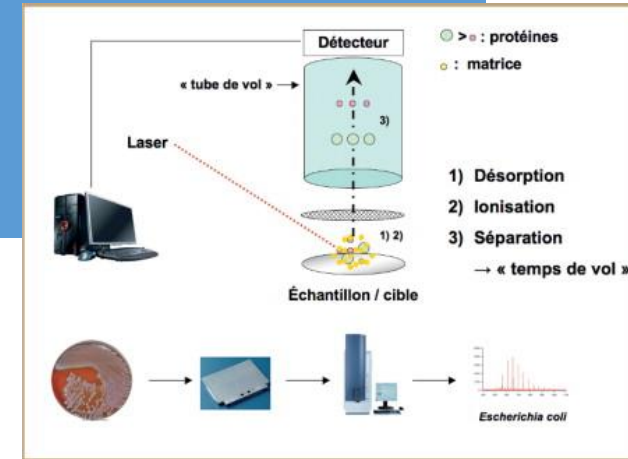
Machines dédiées

Techniques rapide d'identification / comparaison

- **Identification:** Spectromètre de masse + une source d'ionisation laser + un analyseur à temps de vol + banques de spectre = MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time Of Flight) = **5 minutes**
- **Comparaison de bactéries / levures:** spectrométrie infrarouge = spectre d'absorption + transformée de Fourier = **15 minutes**



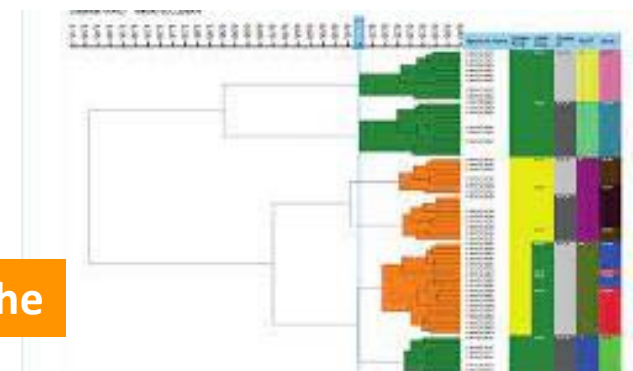
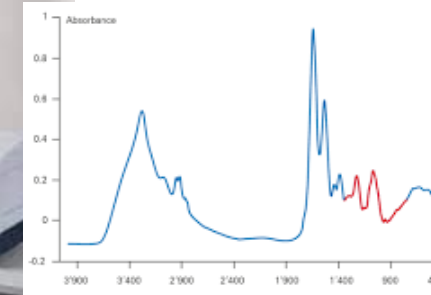
200 000 euros HT



0,30 euros /souche

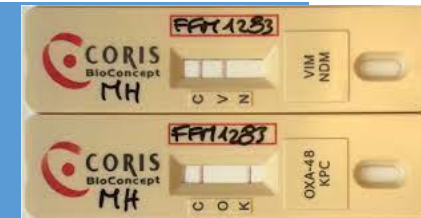


70 000 euros HT

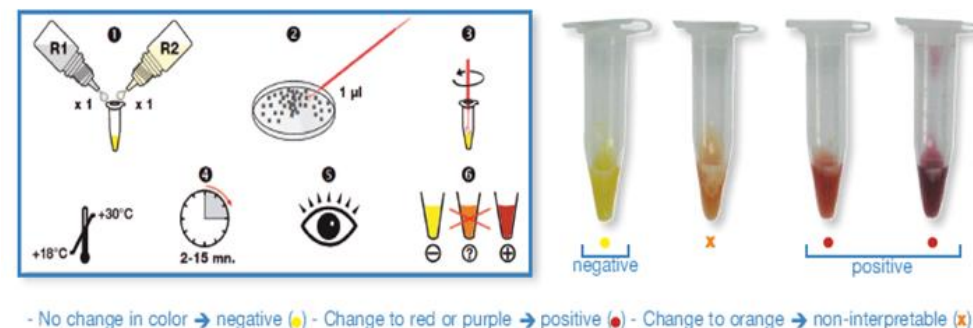
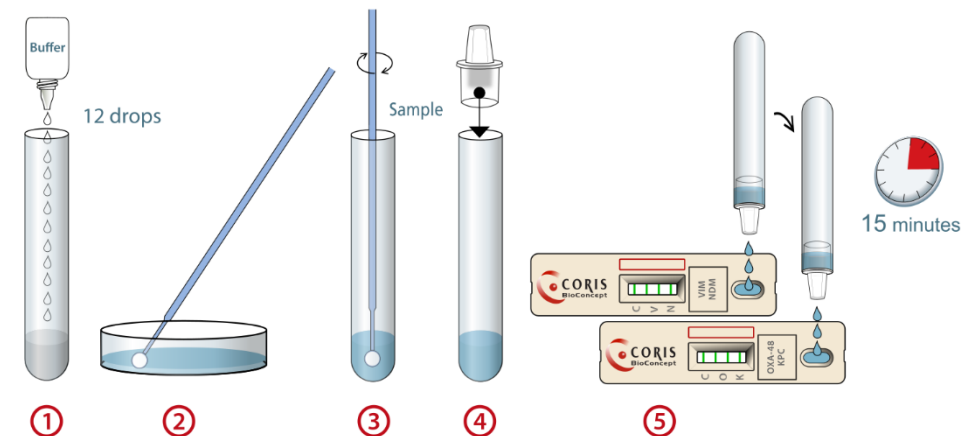


7 euros /souche

Détection de mécanisme de résistance



- Recherche directe **par PCR** des **gènes de résistance** sur prélèvement / sur culture : 1 heure (30-40 euros /test)
- Identification **immunologique** du **produit** du gène de résistance sur culture
 - Gènes des BLSE - Carbapénémases:
 - Gènes de la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus*: 15 minutes
- Identification **biochimique** de l'activité enzymatique:
 - Béta Lactamase à Spectre Etendu: Beta lacta test® - 5 minutes
 - Carbapenemase: Rapidec Carba NP®



< 10 euros / test

Antibiogramme rapide

- **Ensemencement** directement à partir du flacon d'hémoculture
 - Rappel: pas de communication des résultats d'hémoculture la nuit
- Lecture plus rapide des antibiogrammes standard: 4- 6 – 8 – 16/20 heures= **rapid antimicrobial susceptibility testing (dRAST)**
 - Automatisation – critères d'interprétation adaptés
- Utilisation de nouvelles technologie pour déterminer rapidement les concentrations minimales inhibitrices= **analyse morphocinétique** des croissances bactériennes
 - Caméra / microscope qui détecte dans un milieu gélosé la croissance des bactéries en présence d'antibiotiques vs référentiel en 6/7 h
 - **Accelerate Pheno system**®
 - **dRAST**® (**Quantamatrix**)



1 – 2 euros



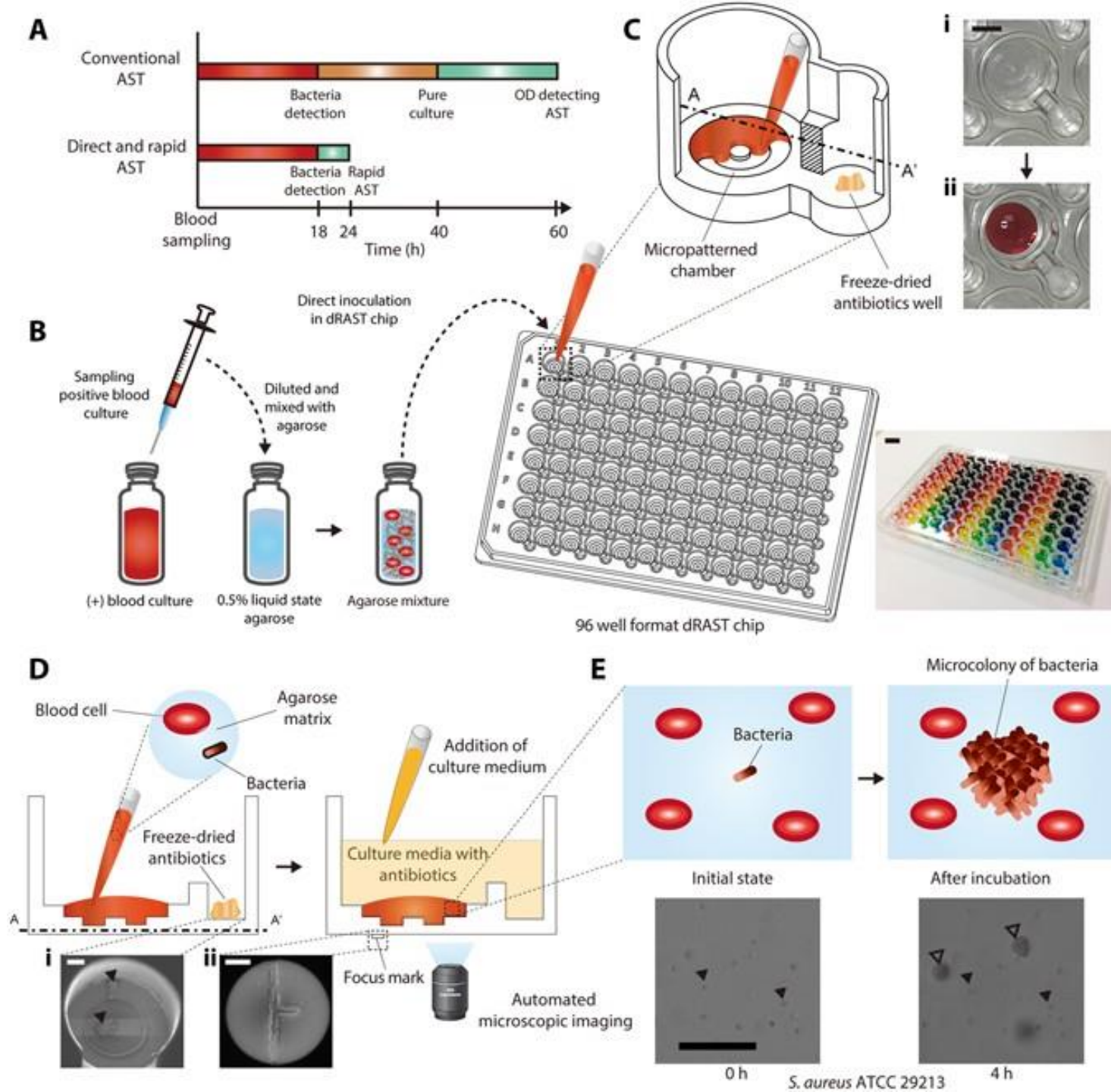
100 à 250 euros
/ test

Machine dédiée

OPEN **Direct, rapid antimicrobial susceptibility test from positive blood cultures based on microscopic imaging analysis**

Received: 13 January 2017
Accepted: 27 March 2017
Published online: 25 April 2017

Jungil Choi¹, HyunYong Jeong^{2,3}, GiYoon Lee^{2,4}, Sangkwon Han¹, Shinhun Han¹, Bongwan Jin¹, Taegeun Lim^{1,2,4}, Shin Kim⁵, Dong Young Kim¹, Hee Chan Kim^{5,6,7}, Eui-Chong Kim⁸, Sang Hoon Song⁹, Taek Soo Kim⁸ & Sunghoon Kwon^{1,2,3,4,9}



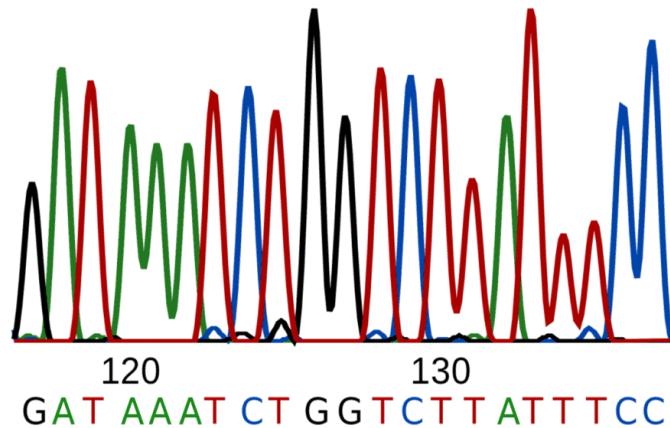
Et aujourd'hui / demain: séquençage!!



- **Amplification et séquençage** de tout ou partie spécifique d'un microorganisme
- **Amplification et Séquençage** d'une partie ciblée et conservée parmi tous les microorganismes: « amplification et séquençage de l'ARN 16S »
- **Séquençage de tout le génome d'un microorganisme**: « whole genome sequencing »
 - Isolé en culture
 - Seul / majoritaire / rendu majoritaire dans un prélèvement
- **Séquençage de tout sans a priori**= « shotgun metagenomic »
 - Microorganisme pathogène (bactérie / virus / champignons / parasites / ADN / ARN) + **microbiote** associé + gènes et expressions des gènes humains puis TRI
- = identification + contenu en gènes de résistance + virulence + fond génétique = **5 jours** (possible »en temps » réel mais 5 fois plus cher)

La révolution *Next Generation Sequencing* (NGS)

- Avant: 1 séquence à la fois (méthode de Sanger)



Max 1000 paires de bases (*E. coli* 4,5 millions de pb)
1 seule séquence à la fois: nécessité de « pureté » au départ
Ne marche pas pour les prélèvements plurimicrobiens

- Maintenant: millions de réactions de séquences en parallèle

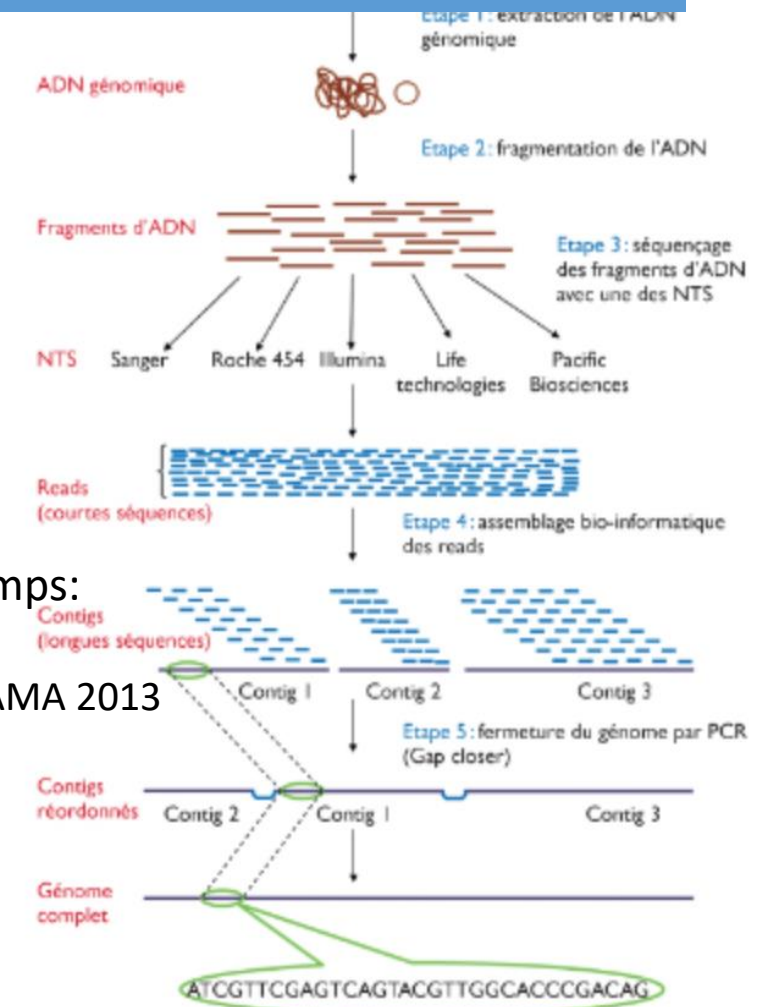
Plus de limite de taille
Plusieurs cibles en même temps:

➤ Émergences +++

Loman et al. *E. coli* O104:H4 JAMA 2013

Zhang et al. *Chlamydia psittaci*

Lancet Microb 2022



La révolution *Next Generation* (NGS)

- **Connaissance du génome du micro**

- fond génétique: clone « successful? »
- Compréhension de la dissémination

Ex: Citrobacter amalonaticus NDM et résistance à la rifaximine

- **Connaissance du microbiote d'un patient:**

- CDC: « microbiome disruption indice » (MDI)
- Composition (diversité) :
 - prévention contre la colonisation d'une BMR

INVITED ARTICLE

HEALTHCARE EPIDEMIOLOGY

Robert A. Weinstein, Section Editor

Infection Control in the Multidrug-Resistant Era: Tending the Human Microbiome

Prithish K. Tosh^{1,2} and L. Clifford McDonald²

¹Epidemic Intelligence Service, and ²Division of Healthcare Quality Promotion, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

Royer et al. Clin Inf Dis 2020:

Phantasme de l'Hygiéniste
d'une prévention des
infections / épidémies
« individualisée » au patient
et/ ou au microorganisme
retrouvé

Infection Control & Hospital Epidemiology (2019), 40, 585–589
doi:10.1017/ice.2019.28



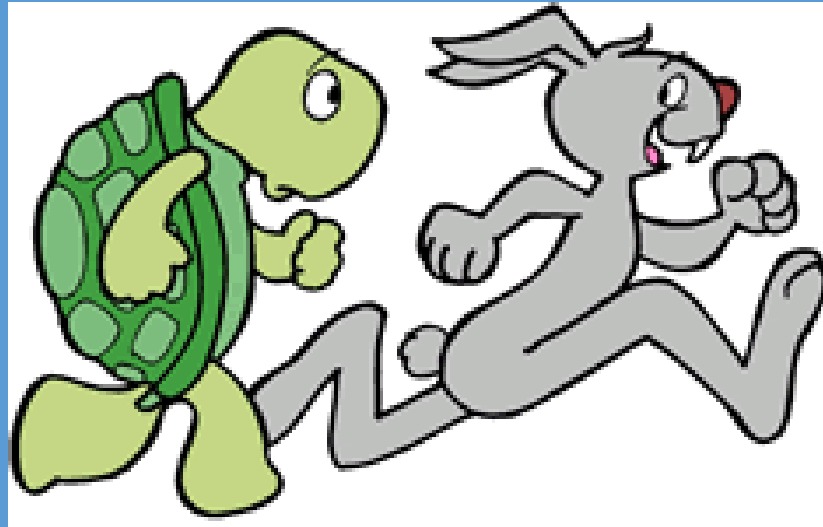
Review

The human microbiota and infection prevention

R. Araos MD¹ and Erika M.C. D'Agata MD, MPH²

¹Instituto de Ciencias e Innovación en Medicina, and Millennium Nucleus for Collaborative Research on Bacterial Resistance (MICROB-R), Facultad de Medicina Clínica Alemana Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile and ²Division of Infectious Diseases, Rhode Island Hospital, Brown University, Providence, Rhode Island, United States

Oui mais....



- Impact sur la prise en charge du patient?
- Impact sur la collectivité?

Performances: (parfois) à améliorer

- Exemple du panel syndromique méningite

1 test. 14 cibles.

Résultats en 1 heure environ

Virus	Bactéries	Levure
<ul style="list-style-type: none">• Cytomégalovirus (CMV)• Entérovirus• Virus herpès (HSV-1)• Virus herpès 2 (HSV-2)• Herpesvirus (V-6)• Paréechovirus humain• Virus varicelle-zona (VZV)	<ul style="list-style-type: none">• <i>Escherichia coli K1</i>• <i>Haemophilus influenzae</i>• <i>Listeria monocytogenes</i>• <i>Neisseria meningitidis</i>• <i>Streptococcus agalactiae</i>• <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>Cryptococcus neoformans / gattii</i>

- **PCR: on ne trouve que ce que l'on cherche**
 - Panel adapté à l'épidémiologie locale (et non pas US)
Ex: OXA-181 vs KPC pour les EPC
- **IRTF** pour comparaison des souches: à préciser
 - Problème des épidémies de plasmides

- **NGS**

- délai
- Compétences bioinformatiques
- Correspondance avec les techniques de référence
- = Exemple antibiogramme « *in silico* » corrélé *E. coli* / *Klebsiella pneumoniae* < *Pseudomonas aeruginosa*

Impact du retard au diagnostic?



- **Individuel:** exemple du **choc septique** ou chaque heure perdue pour une antibiothérapie efficace est une perte de chance pour le patient
 - « élargir » le spectre de l'antibiogramme probabiliste
 - Mais pression antibiotique sélectionnant des microorganismes résistant chez le patient et son environnement
- **Autres infections que le choc septique?**
 - Bactériémie: délai à une antibiothérapie efficace= OR= 1,5 (IC95= 1,4- 1,7) mortalité
Kadri et al. LID 2021
- **Individuel:** exemple du portage de BHRé ou chaque jour de retard de la mise en place des PCC favorise les cas secondaires
 - « Plus » de PCC sur facteur de risques
 - Mais moins bien respecté, coût (chambre individuelle >> consommables), temps soignant, offre de soins...

- Plus on isole tôt, et bien, moins on a d'épidémie

Fournier S et al. Euro Surveill. 201

Occurrence of outbreak and number of secondary cases according to measures implemented around a carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) index case at Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, France, 2004-2012

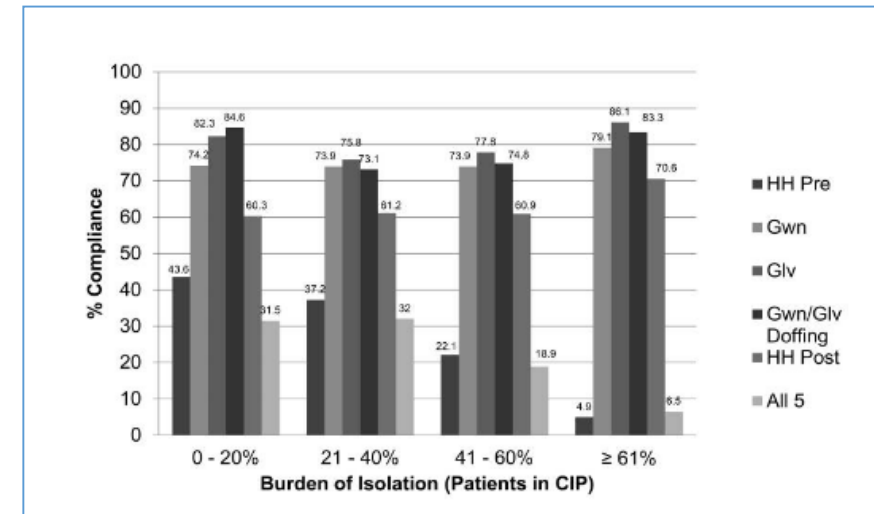
Event* and related cases	Measures implemented within two days following admission of the index case		Delayed measures of control ^b	P value
	Dedicated nursing staff	Barrier precautions		
Number of events	18	55	67	–
Number of outbreaks (proportion of outbreaks among events)	0 (0%)	6 (11%)	11 (16%)	0.17
Number of cases	18	74	108	–
Number of secondary cases (proportion of secondary cases among cases)	0 (0%)	19 (26%)	41 (38%)	0.001

- Plus on isole, moins on isole bien:

Dhar S et al. Infect Control Hosp Epidemiol. 2014

- On isole mieux ce que l'on a identifié

Buchanan et al. J Hosp Infect 2015



Impact sur la prise en charge du patient?



- Adaptation du traitement anti-infectieux

Clinical Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



- Co

Implementation of a Rapid Phenotypic Susceptibility Platform for Gram-Negative Bloodstream Infections With Paired Antimicrobial Stewardship Intervention: Is the Juice Worth the Squeeze?

- Du

- Mi

/ép

- Su

Evan D. Robinson,^{1,©} Allison M. Stilwell,² April E. Attai,³ Lindsay E. Donohue,⁴ Megan D. Shah,⁴ Brandon K. Hill,⁴ Zachary S. Elliott,⁴ Melinda Poulter,³ Frankie Brewster,³ Heather L. Cox,^{1,4,a} and Amy J. Mathers^{1,3,a}

VS Bactériémie, Filmarray® KPC, Odd ratio 0.37; IC 95% [0.16-0.84] Saltin et al. CID 2022

- Epidémie:???

Impact de la diminution de la consommation d'antibiotique

- **Impact individuel: durée de l'antibiothérapie**
 - **moins d'effet secondaires** (+1 j d'ATB =4% de chance en plus)
 - **Non Significatif sur développement de la résistance**
 - **Non Significatif sur la survenue de surinfections** (y compris à *C. difficile*, levures)

Clinical Microbiology and Infection 28 (2022) 479–490

Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

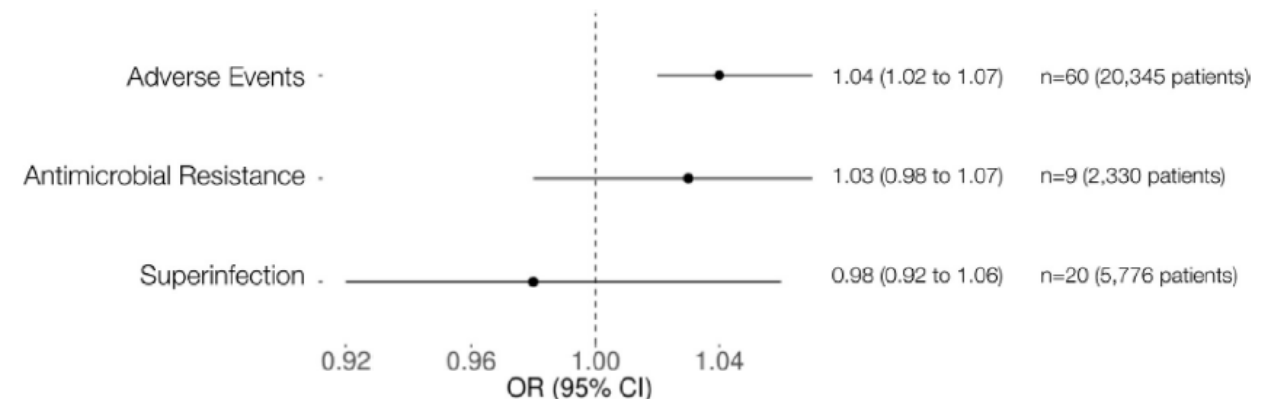
CMI
CLINICAL
MICROBIOLOGY
AND INFECTION
ESCMID member

ELSEVIER

Systematic review

Estimating daily antibiotic harms: an umbrella review with individual study meta-analysis

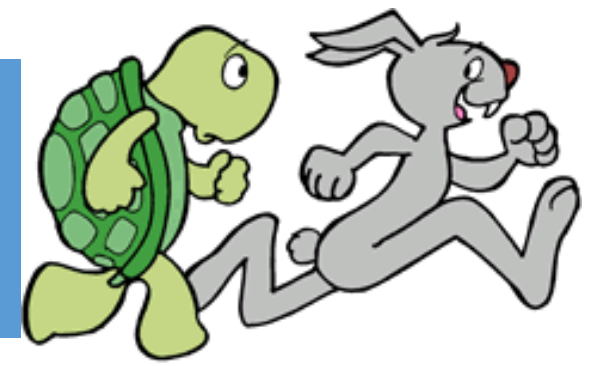
Jennifer Curran^{1,*}, Jennifer Lo², Valerie Leung^{3,4}, Kevin Brown^{3,5}, Kevin L. Schwartz^{3,5}, Nick Daneman^{2,3,6,7}, Gary Garber^{3,8,9}, Julie H.C. Wu³, Bradley J. Langford^{3,10}



Raison du manque d'impact du progrès technique?

- **Pas si simple** = rapidité du résultat = partie du problème
 - terrain / immunodépression
- **Organisation pluridisciplinaire 7j/7, 24h/24**
 - (ré)organisation des laboratoires: panels syndromiques, garde polyvalente commune sans spécialisation microbiologique
 - « chaîne » de transmission de l'information du laboratoire jusqu'au prescripteur au moment où le résultat est obtenu et transformé en acte
- **Prévention transmission croisée:** dépend de l'observance des PS / PC 24h/24, du personnel présent en nombre et en compétence...
- **Impact Collectif:** hôpital = 10 à 20% de la consommation d'antibiotique

Conclusions



- **Études à poursuivre** sur les impacts individuels/ collectifs / économiques
 - Coût du test versus coût de l'antibiotique générique (<1 euro)
- **« le progrès ne vaut que si il est partagé »**: techniques simples, peu coûteuses, 7j/7, 24h/24 dans tous les hôpitaux
- **Problème « écologique »**: tout le monde est concerné mais chacun peine à modifier ses pratiques à titre individuel
 - Pas de perte de chance individuelle >> impact écologique
- **Rôle de l'environnement hospitalier +++ (hygiène)**:
 - glissement de PS vers PCC: tests rapides pour mettre en place des PCC?
- **« Poids de l'hôpital » en consommation d'antibiotique**:
 - Formation des prescripteurs (et des patients) en ville : cf. dépistage streptocoque du groupe A en pharmacie



Merci pour votre attention