

# Les méthodes de dépistage de la résistance actuelles et à venir

Pr. Richard Bonnet

Service Bactériologie

Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques (Lab. Ass.)

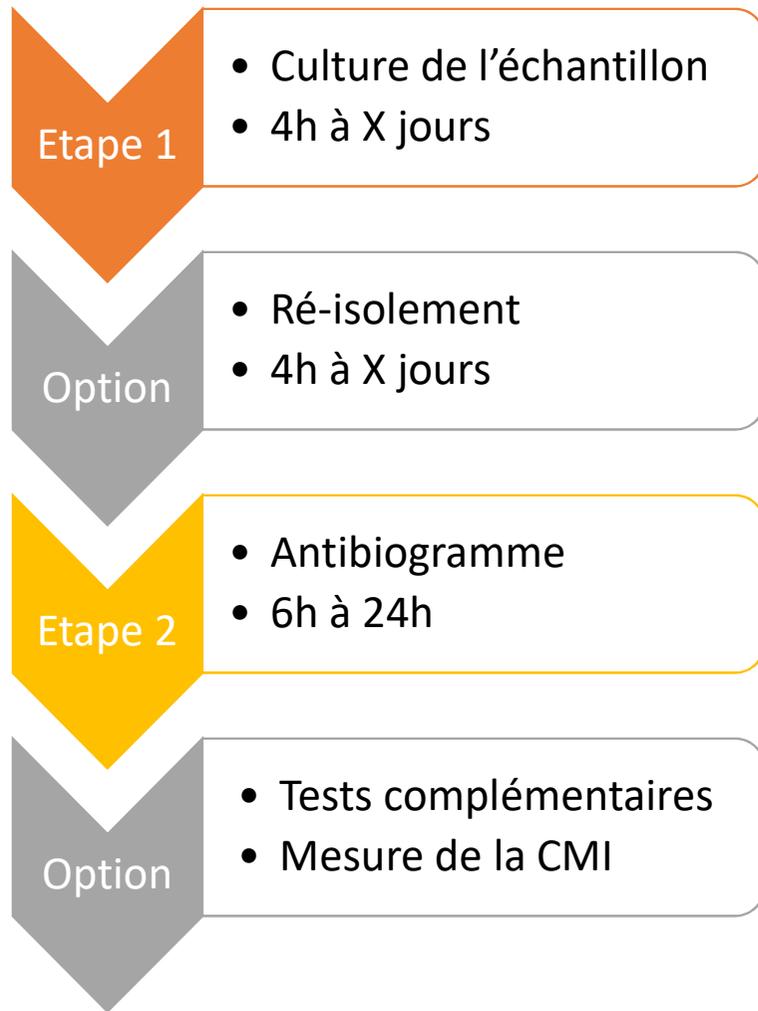
UMR Inserm 1071 usc INRA 2018

CHU de Clermont-Ferrand, Université Clermont Auvergne

# Introduction

- Augmentation rapide de la prévalence des bactéries résistantes, multirésistantes et même pan-résistantes aux antibiotiques
  - Augmentation de la mortalité et du temps d'hospitalisation
  - Ajustement régulier de la politique d'utilisation des antibiotiques
- Détection de la résistance aux antibiotiques :
  - Rôle majeure des lab. de Bactériologie
  - Intéresse les bactéries Gram positif et surtout Gram négatif

# Antibiogramme/CMI: techniques phénotypiques irremplaçables



## • Avantages :

- Critères d'interprétation
- Quantification de la résistance => Optimisation PK/PD
- Détection des mécanismes inconnus
- Faible coût et réalisable par tout lab.
- Technique de référence

## • Inconvénients :

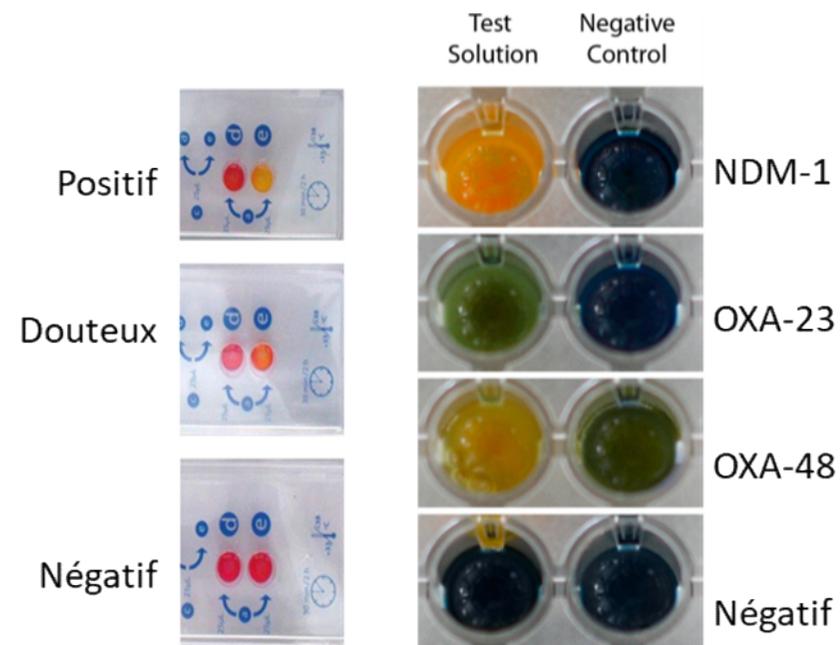
- Difficile à standardiser
- Corrélation in vitro / in vivo imparfaite
- Pas d'identification précise du mécanisme
- Temps de réalisation (48-72h le plus souvent)

# Des méthodes complémentaires

- **Méthodes chromogéniques**
- **Méthodes immunologiques**
- **Méthodes basées sur la spectrométrie de masse (SM)**
- **Méthodes moléculaires et génomiques :**
  - Amplification/Hybridation multiplex ou non
  - Amplification/Hybridation en « array »
  - **Séquençage à haut débit (NGS)**

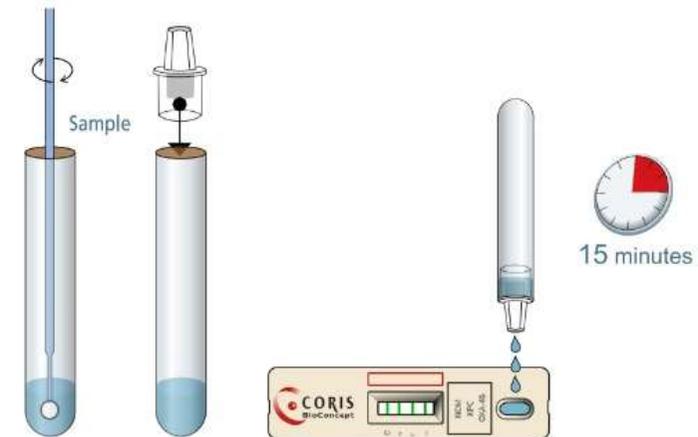
# Les méthodes chromogéniques

- Tests phénotypiques non quantitatifs
- 2 domaines principaux d'utilisation:
  - Détection de l'activité carbapénémases
  - Détection de la résistance à la colistine
- Sur colonies isolées
- Temps de réalisation: 2-4 heures
- Basées sur le « virage » d'un indicateur coloré
- Tests « ouverts » et peu coûteux
- Principales limites:
  - Pas d'identification du mécanisme
  - Sensibilité parfois limitée
  - Lecture subjective et parfois difficile



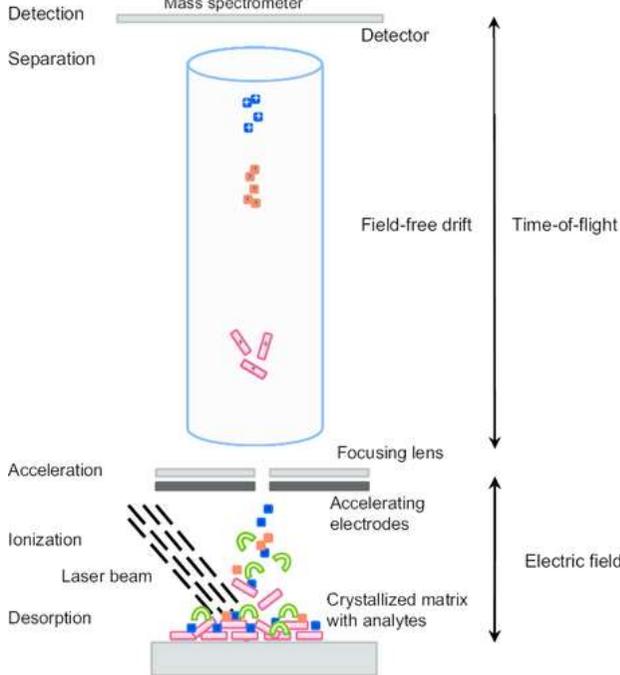
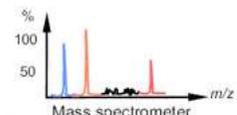
# Les méthodes immunologiques

- Tests phénotypiques non quantitatifs
- 2 domaines principaux d'utilisation:
  - Détection de la PLP2a des Staph. résistants à la méticilline
  - Détection de carbapénémases
- Sur colonies isolées
- Immuno-chromatographie
- Temps de réalisation: qlqs minutes
- Principales limites:
  - Lecture subjective
  - Test « fermé » (problème des mécanismes nouveaux ou rares)
  - Sensibilité sur hémoculture: 18%

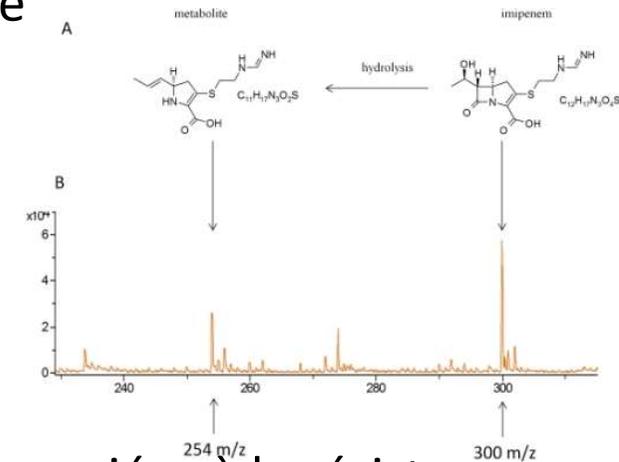


# Les méthodes par SM

MALDI-TOF MS



- MALDI-TOF: détection des modifications d'un antibiotique
  - Détection de l'activité carbapénémase
  - Sur colonies isolées
  - Délai: <4h
  - Peu coûteux
  - Performances restant à confirmer



- LC-MS/MS: identifications de protéines associées à la résistance
- PCR/ESI-MS: analyse de produits de PCR par SM (mutations/gènes)

# Les méthodes moléculaires et génomiques

- Spécifiques
- Sensibilité potentielle pour des approches sans culture préalable
- Potentiellement rapide
- Standardisation et lecture objective possible
- Limites: - faux positifs liés aux gènes non exprimés
  - technique « fermée »
  - faux négatifs liés aux mécanismes inconnus ou nouveaux
  - le coût

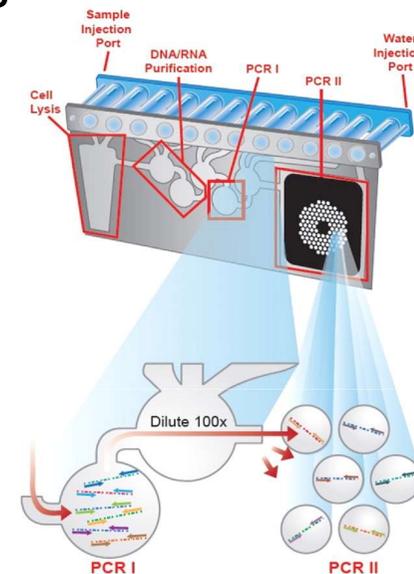
# Les méthodes moléculaires : Amplification/hybridation

- Tests génotypiques souvent multiplexés (plusieurs cibles)
- Révélation automatisée ou non
- Principaux domaines d'utilisation:
  - Détection de la résistance à la méticilline
  - Détection des gènes de résistance vanA et vanB
  - Détection de carbapénémases
  - Détection de BLSE
  - Détection de la résistance chez *M. tuberculosis*
- Sur colonies isolées ou sur prélèvements
- Temps de réalisation: qlqs min (PCR isothermales) à qlqs heures
- Compatible avec une utilisation au lit du malade (POCT)
- Limites: nombres de cibles détectables en parallèle



# Les méthodes moléculaires : les « arrays »

- Tests génotypiques d'amplification/hybridation en « arrays »
- Différents systèmes de révélation automatisé
- Principaux domaines d'utilisation:
  - => Approche syndromique du diagnostique microbiol.
- Sur colonies => prélèvements ou hémocultures
- Temps de réalisation: <2-4 heures



# Les méthodes génomiques: Séquençage massif (NGS)

- Séquençage Sanger :

1<sup>ère</sup> Génération (1<sup>ère</sup> G) : 1 séquence de 600 à 1000 pb (Erreurs:  $\sim 10^{-4}$ )

- Séquençage à haut débit ou NGS :

2<sup>ème</sup> G : X Gb en fragments de 75 à 400 pb (Erreurs:  $10^{-3}$  à  $10^{-2}$ )

3<sup>ème</sup> G : X Gb en fragments de X kb (Erreurs: 5 à 30  $10^{-2}$ )

ATC-T <- Consensus 80-90%  
ATCAT...  
ATCAT...  
ATCGT... }  $\geq 30$  lectures (30x)  
.../...  
ATCTT...  
ATCCT...

⇒ ↗ le nombre de lecture des bases pour ↘ les erreurs (profondeur de séquençage  $> 30x$ )

⇒ Séquençage de plusieurs échantillons / run (Génome bactérien :  $\sim 5\text{Mb} \Rightarrow 30x5=150\text{Mb}$ )

# Les méthodes génomiques: Séquençage massif (NGS)

- Accès aux génomes (WGS) ou transcriptomes (RNAseq) complets (ou presque)
- Les promesses:
  - Détection des gènes de résistance et des altérations associées à la résistance (SNP/INDEL)
  - Détection des gènes associés à la pathogénicité
  - Suivi épidémiologique des BMR (MLST et analyse des SNP)
  - Potentiellement utilisable directement sur prélèvements => Approche syndromique
  - Approche quantitative possible (RNAseq):
    - Expression des gènes de résistance
    - Analyse de la réponse de l'hôte à partir du prélèvement

# La diversité des systèmes NGS



Du séquenceur pailasse



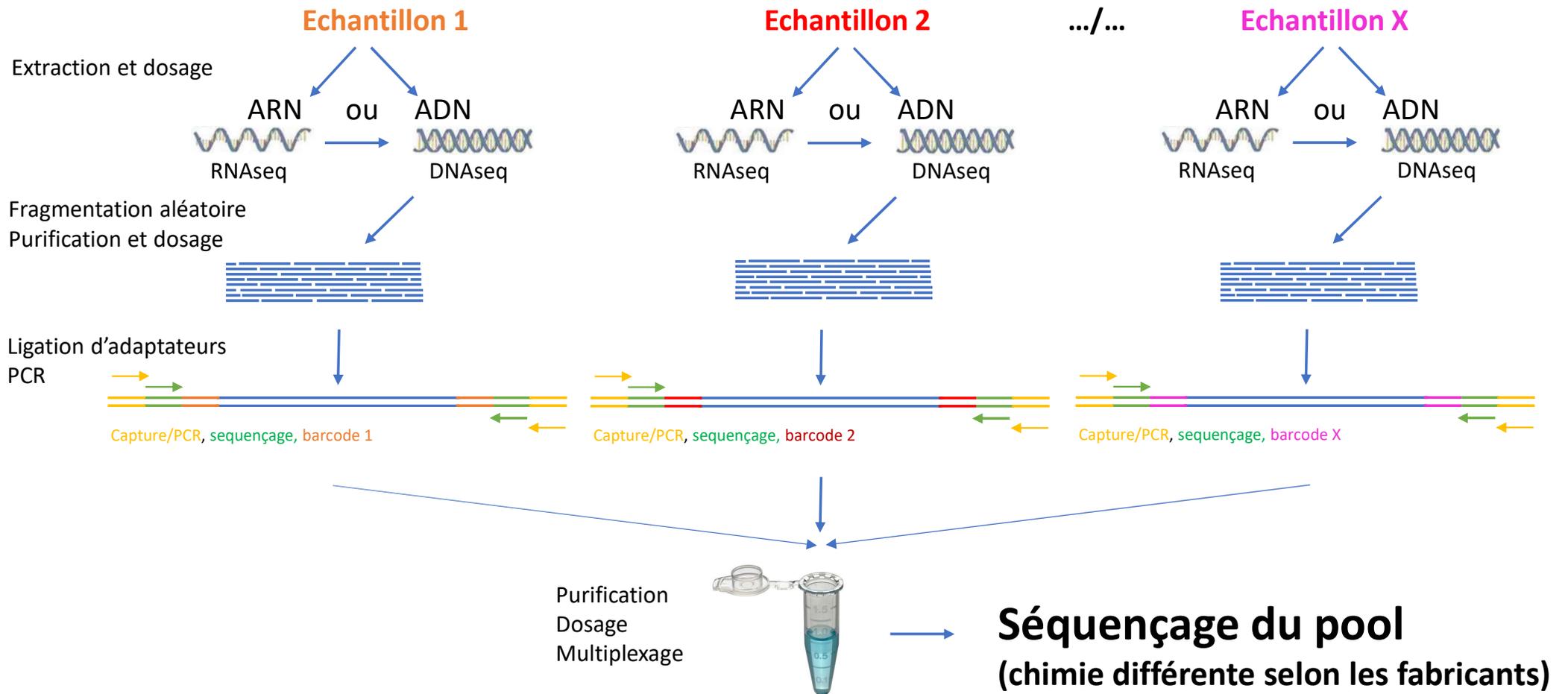
au séquenceur de poche



# NGS : les systèmes et leur performance

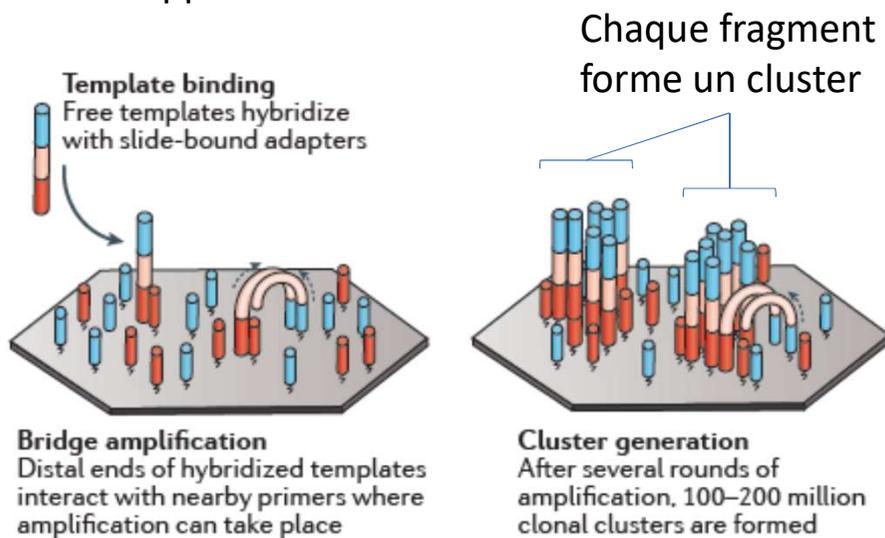
	Société	Séquenceurs	Nombre de bases/run	Tailles des reads	Taux d'erreur	Durée du séquençage	Coût / Gb
<b>2G</b>	Roche	454	0,3 à 0,7 Gb	400 à 1000 pb	1% (indel)	10 à 23h	9500-40000 \$
	Thermo Fisher Sc.	Ion PGM Ion Proton	0,03 à 15 Gb	200 à 400 pb	1% (indel)	4-7h	80-2400 \$
	Applied Biosystems	SOLiD systems	10-15 Gb	35-75 pb	≤1% (biais AT )	6 à 10j	70-130 \$
	ILLUMINA	MiniSeq	1,6 à 7,5 Gb	1 x 75pb à 2 x 150pb	≤1% (mutation)	7 à 14h	200-300 \$
		MiSeq	0,5 à 15 Gb	1 x 36 pb à 2 x 300 pb	0,1% (mutation)	4 à 56h	110-1000 \$
		NextSeq	16 à 120 Gb	1 x 75 pb à 2 x 150 pb	≤1% (mutation)	15 à 29h	33-43 \$
		HiSeq	47-900 Gb	1 x36 pb à 2 x 150 pb	0,1% (mutation)	7h à 6j	7-130 \$
<b>3G</b>	Pacific Biosciences	PacBio RSII	0,5-1 Gb	~20 kb	10-15% (indel), <1% CCS)	30min-4h	1000 \$
	Oxford Nanopore	MinION	10-20 Gb / 48h	jusqu'à 200 kb	5% (2D) 13% (1D)	3min à 48h	50-100 \$

# Principe du multiplexage pour le NGS

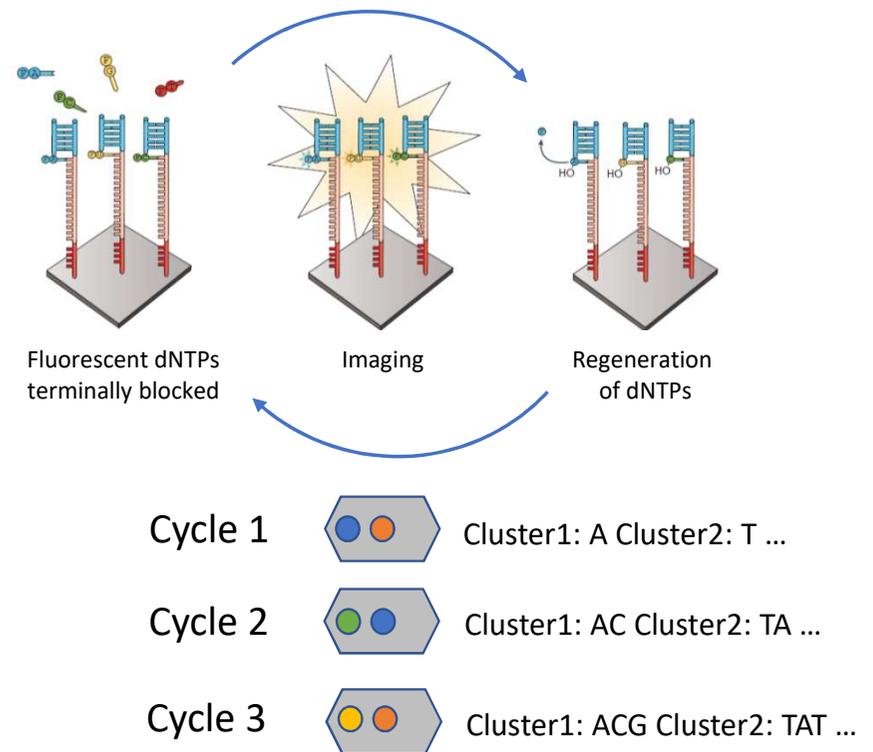


# Principe du NGS : Séquençage 2G (ex. Illumina)

## 1- Clusterisation par amplification en pont sur support solide

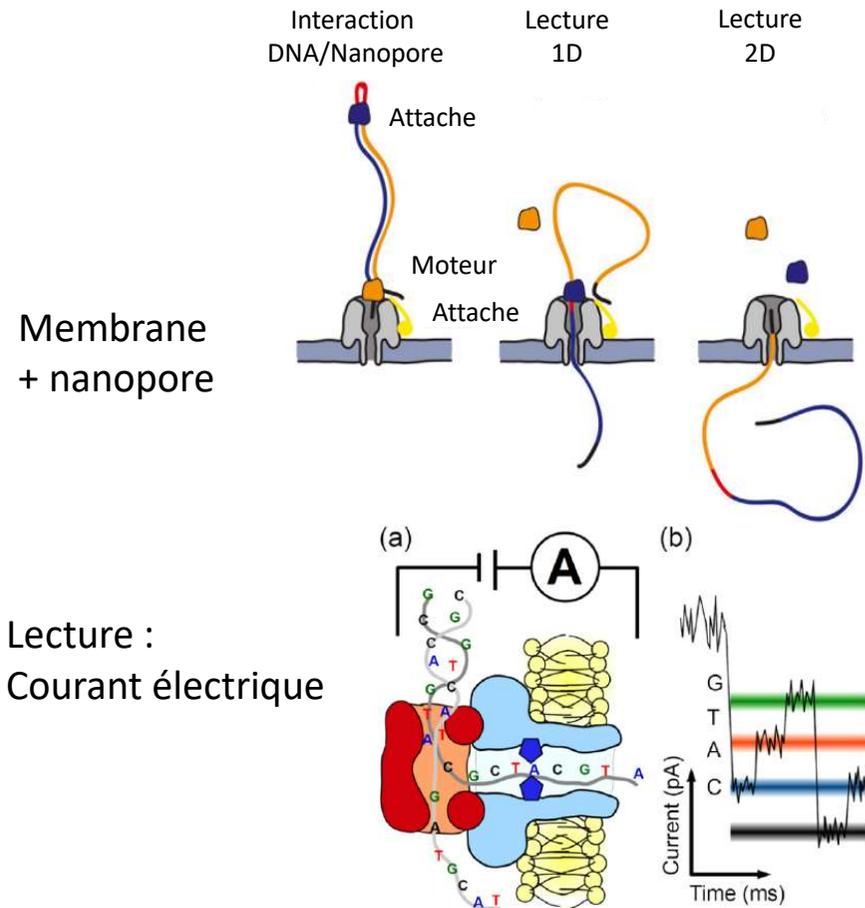
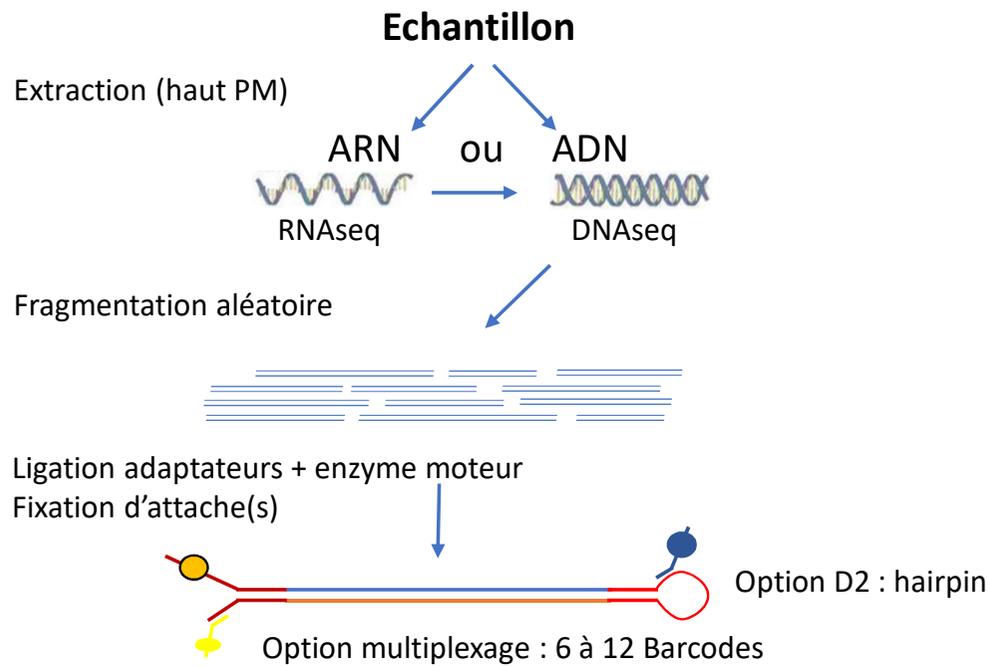


## 2- Lecture cyclique de la séquence pour chaque cluster



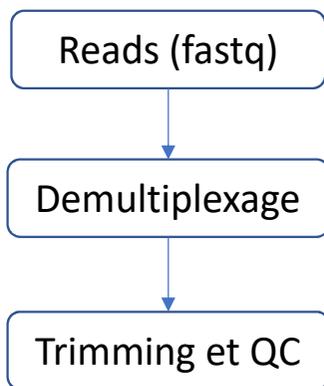
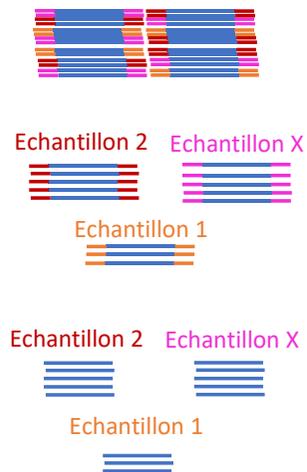
75 à 300 cycles de séquençage = séquence de 75 à 300 bases (+ 1)

# Principe du NGS : Séquençage 3G (ex. Oxf. Nanopore)



# NGS : principe de l'analyse des données

## 1- Préparation des reads



## 2a- Assemblage de novo



## 2b- Assemblage par mapping (Reséquençage)



Séquences consensus

Contigs



Orientation des contigs (PE)

Scaffolds

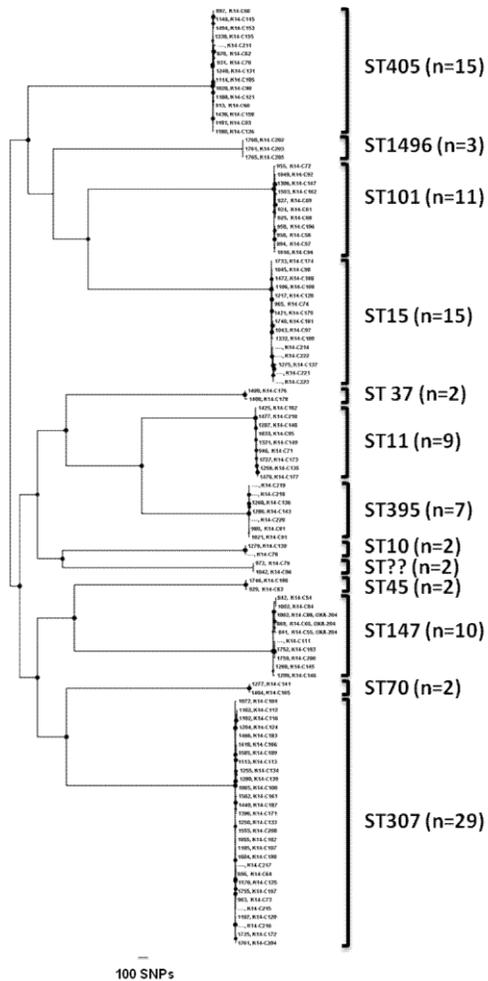


fragments génomiques réassemblés

Analyse des séquences conservées:  
Identification  
Phylogénèse et typage (SNP, cgMLST)

Analyse des séquences variables:  
Resistome  
Virulome  
Mobilome

# NGS : suivi épidémiologique des BMR



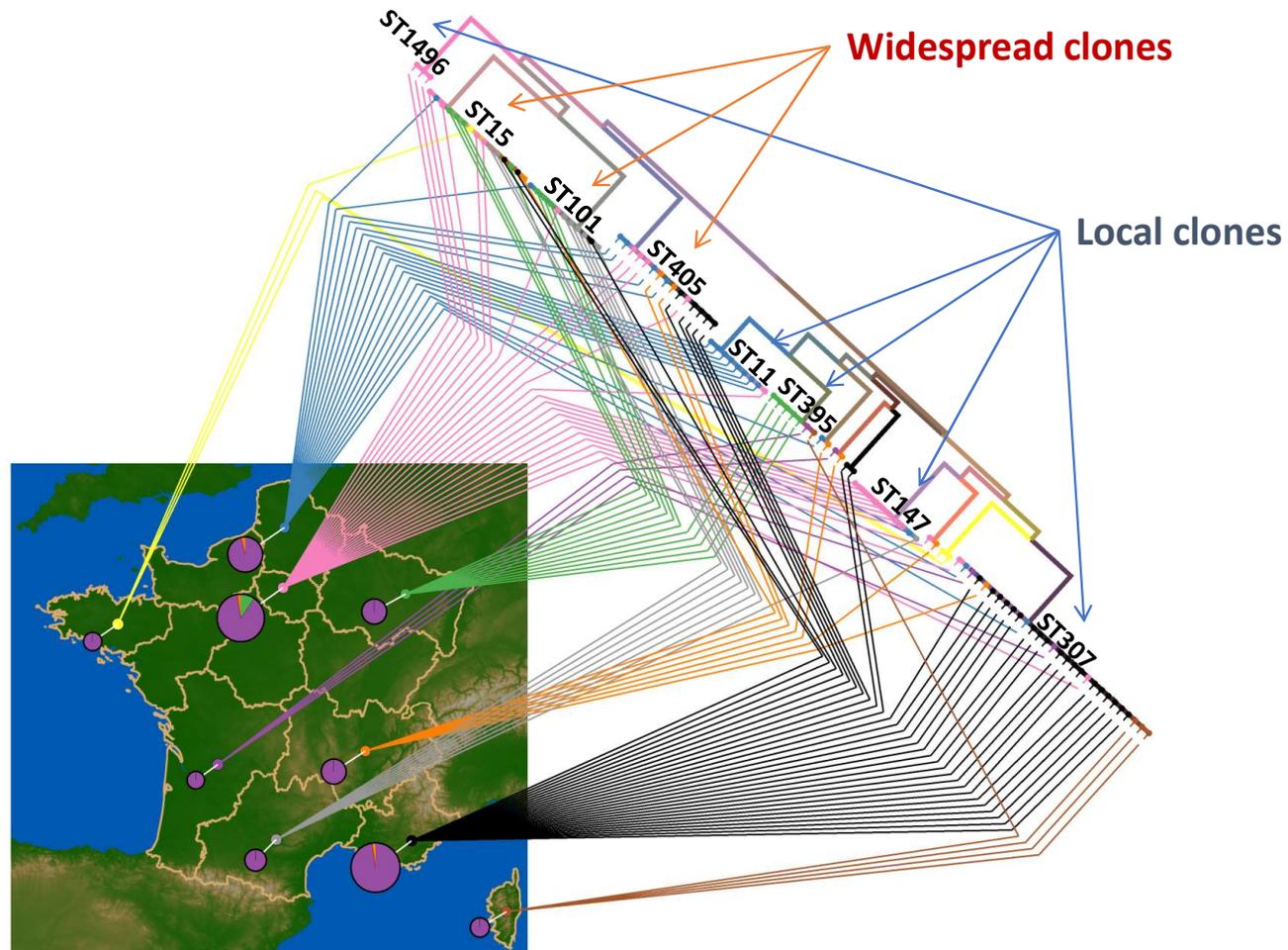
**K. pneumoniae carbapenemase : 1 isolat / épisode épidémiologique survenu en 2014**

Core genome ~1 Mb contenant 54000 SNPs:

=> 13 clusters identifiés par leur ST

=> 7 clusters dont les isolats diffèrent par < 15 SNPs = diffusion épidémique

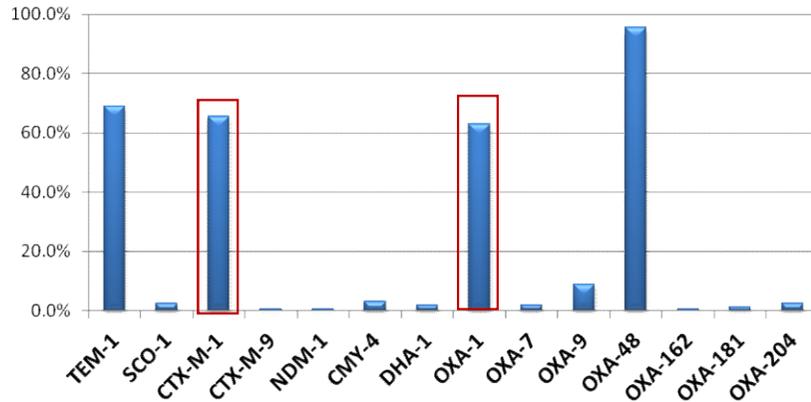
# Geophylogénie des *K. pneumoniae* oxa-48 in France in 2014



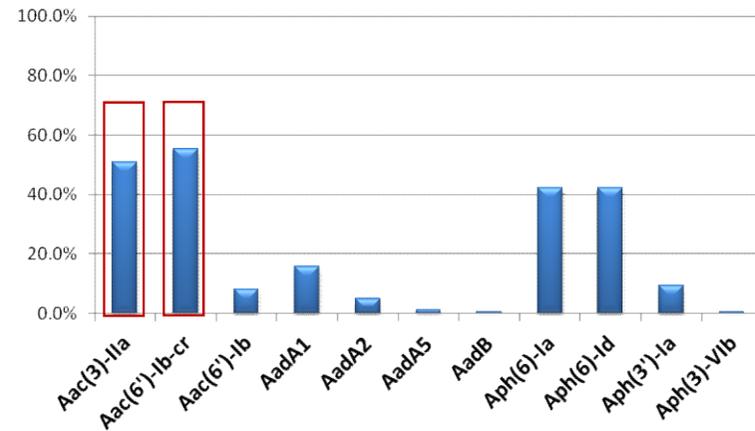


# Detection of antibiotic resistance genes by WGS

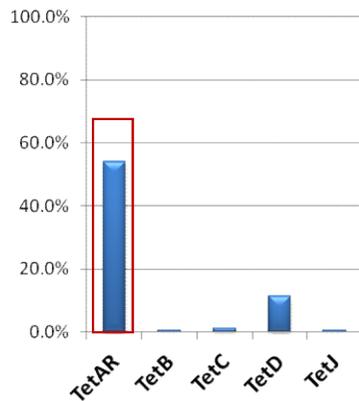
**Class A, B, C and D  $\beta$ -lactamases**



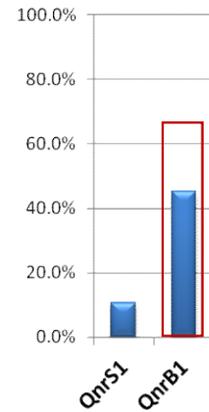
**Aminoglycosides-modifying enzymes**



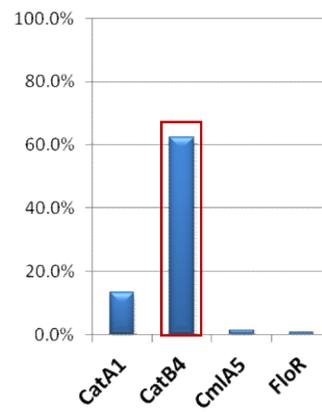
**Cyclines**



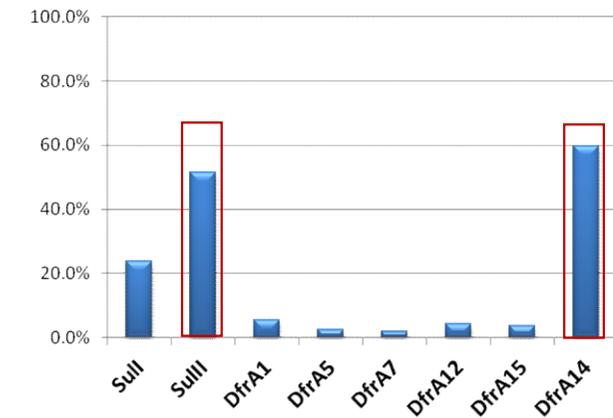
**Fuoroquinolones**



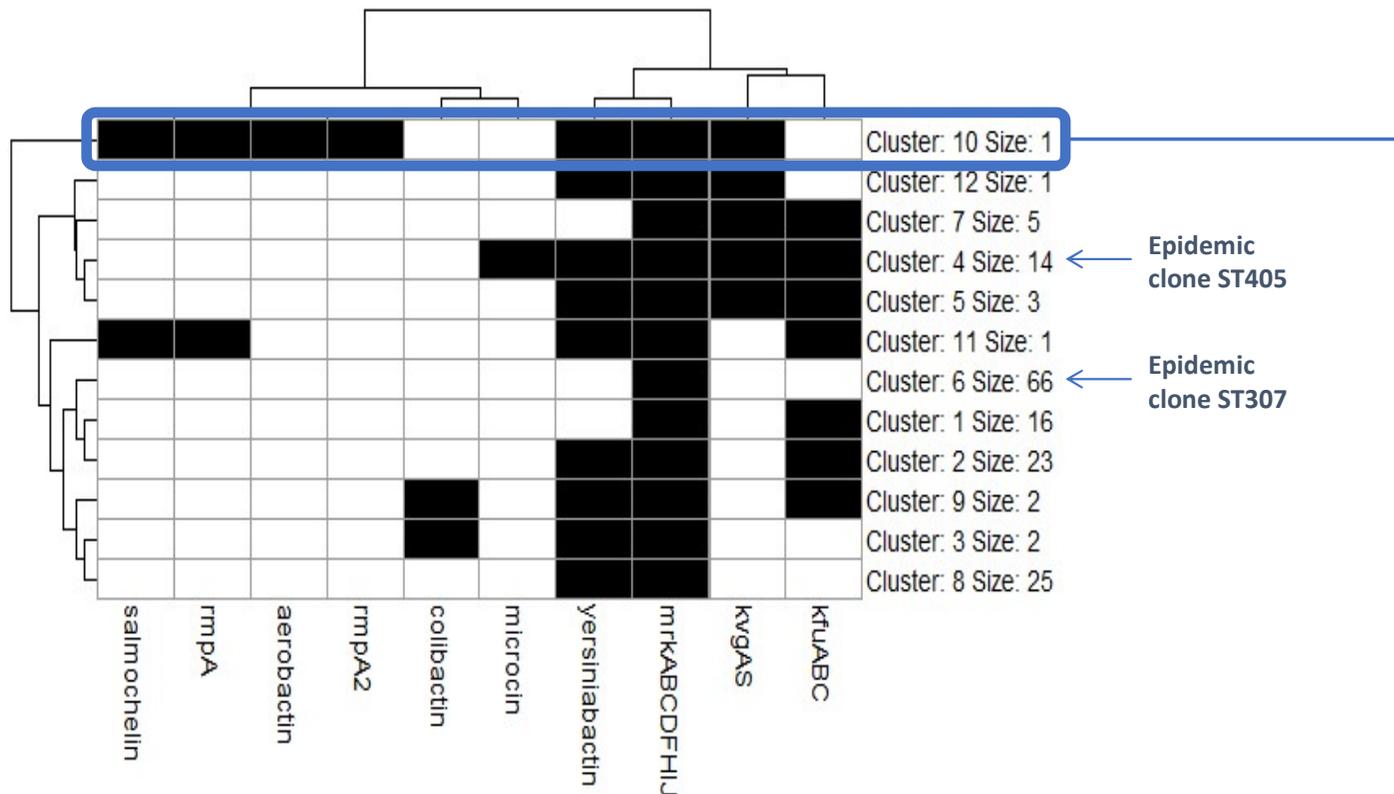
**Phenicols**



**Sulfonamides & trimethoprim**



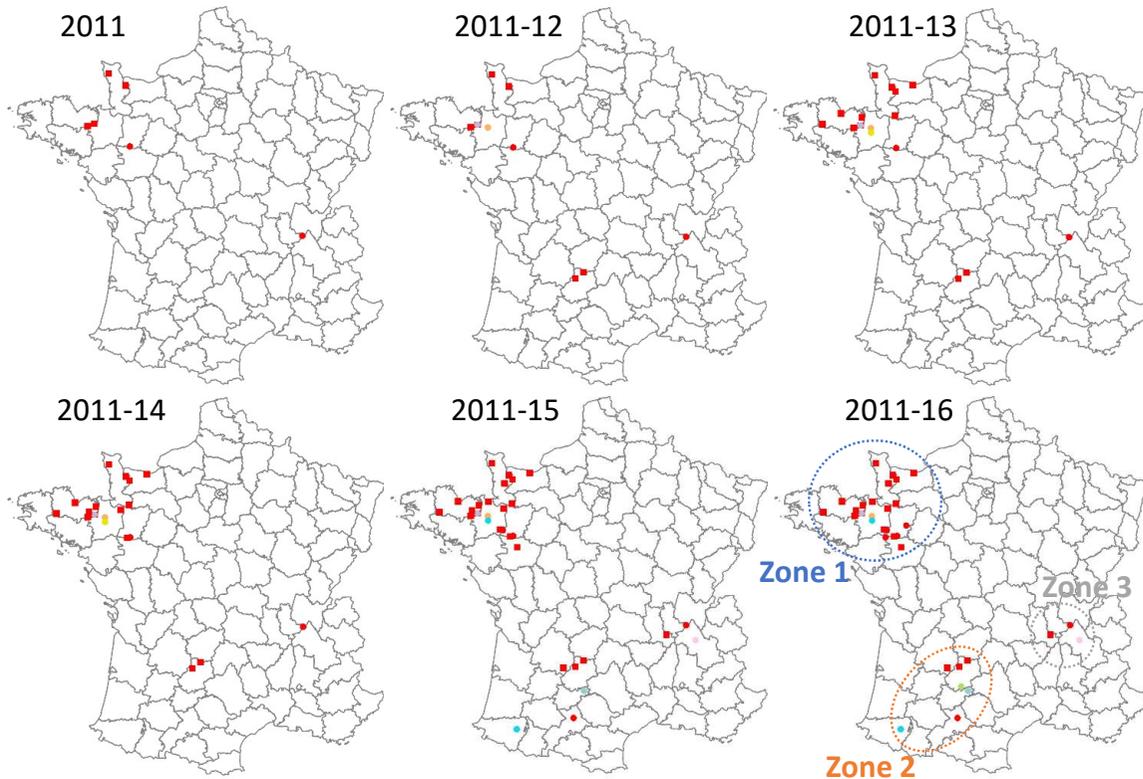
## Genes associated with virulence



One strain ST38 harboring genes encoding:

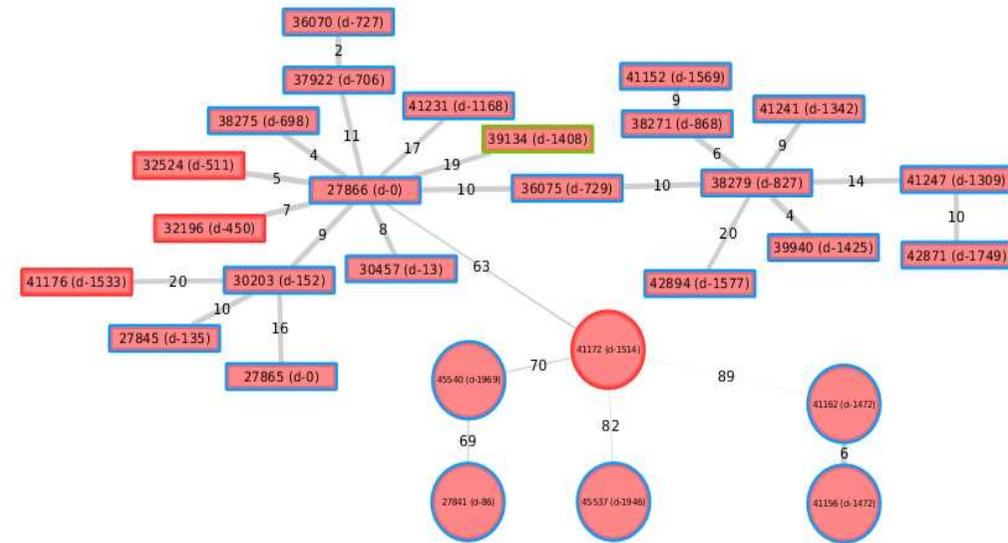
- Siderophores (salmochelin, aerobactin, yersiniabactin)
- Capsule up-regulators (rmpA, rmpA2)
- K2 capsule (wzi allele)
- = gene combination associated with invasive infections

# NGS: Etudes d'une épidémie E. coli BLSE sur 5 ans



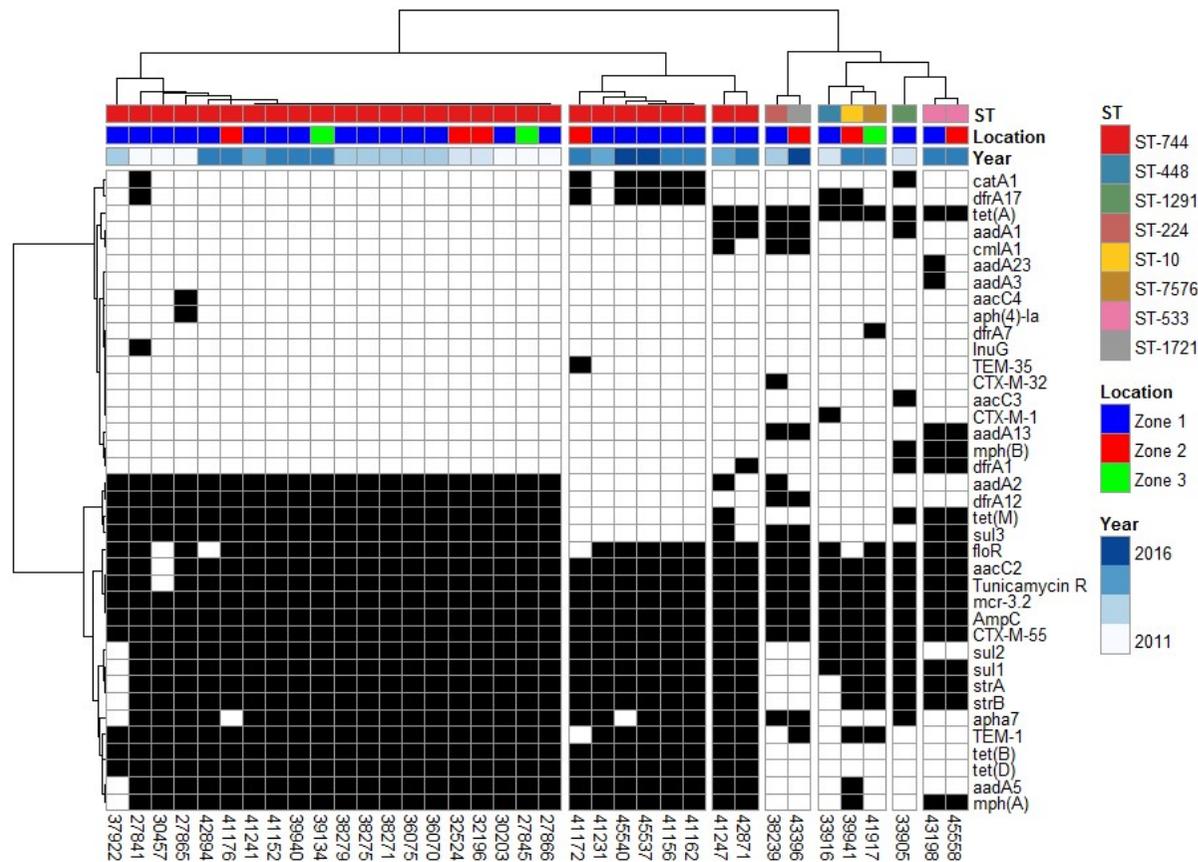
- ST-10    ● ST-533    ● ST-7576    ■ ST-744 ( $\leq 20$  SNPs)
- ST-448    ● ST-1291    ● ST-744 (others)

## *E. coli* BLSE CTX-M-55 - Analyse des SNP du génome conservé



# NGS: l'épidémiologie des mécanismes de résistance

Gènes de résistance en fonction du fond génétique, de la localisation et l'année d'isolement



# NGS et antibiogramme

- Staphylococcus: Gordon *et al.* J. Clin. Microbiol. 2014
  - « Training set » :
    - 2 sites géographiques sur une période de 13 ans
    - 501 *S. aureus* (4/5 portage nasal et 1/5 septicémies)
    - 46 fonds génétiques différents, 1/3 SAMR, 2/3 SAMS
  - Antibiogramme: disques et automates puis CMI EUCAST si discordances
  - Base de données de résistance « Home Made » : 21 antibiotiques ciblés
  - Séquençage Illumina et recherche des gènes sur l'assemblage de novo
  - VME: génotype négatif et phénotype résistant / ME: génotype positif et phénotype sensible

# Prédiction de l'antibiogramme par NGS

- Staphylococcus: Gordon *et al.* J. Clin. Microbiol. 2014
  - 439 isolats (88%): parfaite concordance
    - 62 isolats (12%): 123 différences phénotype/génotype
  - Après répétition du phénotype: 40% des erreurs corrigés !
    - 452 isolats (90%): parfaite concordance
    - 49 isolats (10%): 71 différences phénotype/génotype
  - Persiste des erreurs de détection génotypique (algorithme v1)
    - Ex. 2% VME pour pénicilline
    - => Gènes fragmenté (300pb)
    - => Ajustement de l'algorithme (v2: couverture > 30%)

# Prédiction de l'antibiogramme par NGS

- Staphylococcus: Gordon *et al.* J. Clin. Microbiol. 2014
  - Training set de 501 isolats avec algorithm v2

TABLE 4 Derivation set results<sup>a</sup>

Antimicrobial agent	No. of isolates resistant by phenotype		No. of isolates susceptible by phenotype		Total no. of isolates	Very major error rate (%)	Major error rate (%)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
	Susceptible by genotype	Resistant by genotype	Susceptible by genotype	Resistant by genotype					
Penicillin	4	438	59	0	501	0.8	0	0.99 (0.98–1.00)	1.00 (0.92–1.00)
Methicillin	1	158	341	1	501	0.2	0.2	0.99 (0.96–1.00)	1.00 (0.98–1.00)
Ciprofloxacin	7	165	326	3	501	1.4	0.6	0.96 (0.91–0.98)	0.99 (0.97–1.00)
Erythromycin	1	133	366	1	501	0.2	0.2	0.99 (0.95–1.00)	1.00 (0.98–1.00)
Clindamycin	0	88	89	0	177 <sup>c</sup>	0	0	1.00 (0.95–1.00)	1.00 (0.95–1.00)
Tetracycline	0	28	473	0	501	0	0	1.00 (0.85–1.00)	1.00 (0.99–1.00)
Vancomycin	0	0	501	0	501	0	0	N/A <sup>d</sup>	1.00 (0.99–1.00)
Fusidic acid	3 <sup>b</sup>	38	458	2	501	0.6	0.4	0.93 (0.79–0.98)	1.00 (0.98–1.00)
Trimethoprim	5	10	308	0	323	1.5	0	0.67 (0.39–0.87)	1.00 (0.98–1.00)
Gentamicin	0	7	494	0	501	0	0	1.00 (0.60–1.00)	1.00 (0.99–1.00)
Mupirocin	0	2	174	2	178	0	1.1	1.00 (0.20–1.00)	0.99 (0.96–1.00)
Rifampin	1	2	498	0	501	0.2	0	0.67 (0.13–0.98)	1.00 (0.99–1.00)
<b>Overall</b>	<b>22</b>	<b>1,069</b>	<b>4,087</b>	<b>9</b>	<b>5,187</b>	<b>0.2</b>	<b>0.4</b>	<b>0.98 (0.97–0.99)</b>	<b>1.00 (0.99–1.00)</b>

>30% couverture

Mécanismes inconnues ?

<sup>a</sup> Comparison of results for individual antimicrobial agents for 501 carriage/bacteremia isolates by phenotype (Vitek or disc diffusion) and predicted susceptibility using v2.0 genotypic prediction method. The result (resistant or susceptible) by phenotype refers to Vitek or disc diffusion results, and the result by genotype refers to the predicted susceptibility using the v2.0 genotypic prediction method.

<sup>b</sup> Two isolates had two nonsynonymous mutations in *fusA* not previously described in the literature (T326I plus E468V and T326I plus V90I) which may be responsible for the observed phenotypes.

<sup>c</sup> One isolate failed to grow for clindamycin testing.

<sup>d</sup> N/A, not applicable.

# NGS et antibiogramme

- Staphylococcus: Gordon *et al.* J. Clin. Microbiol. 2014
  - Validation set de 491 isolats avec algorithme v2

>30% couverture  
ME: 4,5% gènes inactivés par INDEL

TABLE 5 Validation set results<sup>a</sup>

Antimicrobial agent	No. of isolates resistant by phenotype		No. of isolates susceptible by phenotype		Total no. of isolates	Very major error rate (%) (95% CI)		Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
	Susceptible by genotype <sup>b</sup>	Resistant by genotype	Susceptible by genotype	Resistant by genotype <sup>b</sup>		Major error rate (%) (95% CI)	Very major error rate (%) (95% CI)		
Penicillin	3 (2)	379	84	25 (9)	491	0.6 (0.1–1.8)	5.1 (3.3–7.4)	0.99 (0.98–1.00)	0.77 (0.68–0.84)
Methicillin	2 (1)	55	432	2 (1)	491	0.4 (0.05–1.5)	0.4 (0.05–1.5)	0.96 (0.87–0.99)	1.00 (0.98–1.00)
Ciprofloxacin	6 (4)	64	420	1 (0)	491	1.2 (0.4–2.6)	0.2 (0.05–1.1)	0.91 (0.82–0.96)	1.00 (0.98–1.00)
Erythromycin	4 (2)	79	405	3 (3)	491	0.8 (0.2–2)	0.6 (0.1–1.8)	0.95 (0.87–0.98)	0.99 (0.98–1.00)
Clindamycin	2 (2)	77	2	0	81	2.5 (0.3–8.6)	0.0 (0–4.4)	0.97 (0.90–1.00)	1 (0.20–1.00)
Tetracycline	0	18	471	2 (2)	491	0.0 (0–0.7)	0.4 (0.05–1.5)	1.00 (0.78–1.00)	1.00 (0.98–1.00)
Vancomycin	0	0	491	0	491	0.0 (0–0.7)	0.0 (0–0.7)	N/A <sup>c</sup>	1.00 (0.99–1.00)
Fusidic acid	4 (4)	39	448	0	491	0.8 (0.2–2)	0.0 (0–0.7)	0.91 (0.77–0.97)	1.00 (0.99–1.00)
Trimethoprim	2 (2)	1	197	2 (1)	202	1.0 (0.1–3.5)	1.0 (0.1–3.5)	0.33 (0.02–0.87)	0.99 (0.96–1.00)
Gentamicin	2 (2)	2	487	0	491	0.4 (0.05–1.5)	0.0 (0–0.7)	0.50 (0.09–0.91)	1.00 (0.99–1.00)
Mupirocin	0	2	489	0	491	0.0 (0–0.7)	0.0 (0–0.7)	1.00 (0.20–1.00)	1.00 (0.99–1.00)
Rifampin	0	5	486	0	491	0.0 (0–0.7)	0.0 (0–0.7)	1.00 (0.46–1.00)	1.00 (0.99–1.00)
<b>Overall</b>	<b>25 (19)</b>	<b>644</b>	<b>4,410</b>	<b>35 (16)</b>	<b>5,112</b>	<b>0.5 (0.3–0.7)</b>	<b>0.7 (0.5–0.9)</b>	<b>0.97 (0.95–0.98)</b>	<b>0.99 (0.99–1.00)</b>

<sup>a</sup> Comparison of susceptibility results for 491 bacteremia and carriage isolates by phenotype (Phoenix/disc diffusion consensus result) and genotype prediction tool v2.0. The result (resistant or susceptible) by phenotype refers to Phoenix or disc diffusion consensus results, and the result by genotype refers to the predicted susceptibility using the v2.0 genotypic prediction method.

<sup>b</sup> Figures in parentheses are numbers of isolates with discrepant phenotype confirmed on repeat testing.

<sup>c</sup> N/A, not applicable.

BORSA ?

Mécanismes inconnues ?

Performances voisines des test phénotypiques et > critères FDA (VME: <1,5%, ME: <3%)

# NGS et antibiogramme

- E. coli et K. pneumoniae : Stoesser *et al.* JAC 2013
  - 1 site (UK) sur 4 ans (2008-2011)
  - 33 E. coli R C3R et 41 E. coli S C3G
  - 29 K. pneumoniae R C3G et 40 K. pneumoniae S C3R
- Antibiogramme: duplicates sur automate puis CMI EUCAST
- Base de données de résistance « Home Made »:
  - 3 familles d'antibiotiques ciblés: b-lactamines, aminosides et quinolone
  - >1000 déterminants génétiques: gènes ou mutations chromosomiques acquises
- Séquençage Illumina et recherche des gènes sur l'assemblage de novo avec blast
- VME: génotype négatif et phénotype résistant / ME: génotype positif et phénotype sensible

# NGS et antibiogramme

- E. coli et K. pneumoniae : Stoesser *et al.* JAC 2013

Versus antibiogramme automatisé:

- VME : 2 %
- ME : 2-3 %

Après mesure des CMI pour les discordances:

- 61% des discordances corrigées
- VME : 1,2 % (FDA: <1,5 %)
- ME : 2 % (FDA: <3 %)

Cependant...

- Pas d'ertapénème, amikacine, ...

- Peu d'antibiotiques affectés par des mécanismes mal connus (efflux, imperméabilité, r bas niveau)

# NGS et antibiogramme

- E. coli et K. pneumoniae : Stoesser *et al.* JAC 2013

**Table 5.** List of relevant genotypic profiles for 13 *E. coli* and 15 *K. pneumoniae* isolates with genotype-gradient diffusion susceptibility discrepancies for one or more antimicrobials

Species	Number of isolates	Antibiotic discrepancy	Genotypic prediction	Genotypic mechanism for resistance prediction	Phenotypic result	MIC (mg/L) on gradient diffusion (EUCAST susceptibility breakpoint)	Supplementary data Table no./ complete genotypic profile number
<i>E. coli</i>	1	amoxicillin	R	P3 TEM-promoter and <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	S	6 (8)	S4/3
<i>E. coli</i>	1	ceftriaxone <sup>a</sup>	S	none	R	>32 (1)	S4/3
		ceftazidime <sup>a</sup>	S		R	4 (1)	
<i>E. coli</i>	1	ceftriaxone <sup>b</sup>	R	T-32A <i>ampC</i> promoter mutation	S	0.38 (1)	S4/10
		ceftazidime <sup>b</sup>	R		S	1 (1)	
<i>E. coli</i>	1	ceftazidime	R	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	S	0.25 (0.25)	S4/2
<i>E. coli</i>	7	ceftazidime	R	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	S	1 (1)	6×S4/4, 1×S4/2
<i>E. coli</i>	1	ceftazidime	R	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	S	0.5 (1)	S4/14
<i>E. coli</i>	1	ceftazidime	R	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	S	1 (1)	S4/6
<i>K. pneumoniae</i>	2	amoxicillin	R	<i>bla</i> <sub>LEN</sub>	S	4, 8 (8)	S7/4
<i>K. pneumoniae</i>	1	amoxicillin	R	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	S	6 (8)	S7/3
<i>K. pneumoniae</i>	1	co-amoxiclav	R	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>	S	8 (8)	S7/19
<i>K. pneumoniae</i>	1	ceftriaxone <sup>c</sup>	R	<i>bla</i> <sub>SHV-27</sub>	S	0.064 (1)	S7/11
		ceftazidime <sup>c</sup>	R		S	0.25 (1)	
<i>K. pneumoniae</i>	1	ceftriaxone <sup>d</sup>	S	none	R	8 (1)	S7/8
		ceftazidime <sup>d</sup>	S		R	64 (1)	
<i>K. pneumoniae</i>	1	ceftriaxone <sup>e</sup>	S	none	R	>32 (1)	S7/1
		ceftazidime <sup>e</sup>	S		R	8 (1)	
<i>K. pneumoniae</i>	1	meropenem	S	none	R	>32 (2)	S7/7
<i>K. pneumoniae</i>	1	ciprofloxacin	R	2 <i>gyrA</i> mutations (S83F+D87A)	S	0.064 (0.5)	S8/5
<i>K. pneumoniae</i>	1	ciprofloxacin	R	2 <i>gyrA</i> mutations (S83I+D87N)	S	0.047 (0.5)	S8/10
<i>K. pneumoniae</i>	2	ciprofloxacin	S	1 <i>parC</i> mutation (S80I)	R	8, >32 (0.5)	S8/4
<i>K. pneumoniae</i>	1	ciprofloxacin	S	1 <i>parC</i> mutation (S80I) + <i>aac(6)-Ib-cr</i>	R	2 (0.5)	S8/12
<i>K. pneumoniae</i>	1	ciprofloxacin	S	1 <i>parC</i> mutation (E84K) + 1 <i>parE</i> mutation (S458T)	R	>32 (0.5)	S8/17
<i>K. pneumoniae</i>	1	gentamicin	S	none	R	16 (2)	S9/1

<sup>a-e</sup>Multiple genotype-phenotype discrepancies observed for several antibiotics for the same isolate.

15 *E. coli* discordants CMI-génotype

- 9 ME avec CMI au breakpoint

- 4 ME avec CMI proches du breakpoint

- 2 VME franches pour les C3G

18 *K. pneumoniae* discordants CMI-génotype

- 4 /10 ME avec CMI au breakpoint

- 8 VME franches pour ciprofloxacin, gentamicine, C3G, et méropénème

# NGS et antibiogramme

- *Pseudomonas aeruginosa* : Kos et al. AAC 2015
  - 388 isolats issus d'un programme de surveillance international
    - Diversité confirmée par MLST et une analyse phylogénomique
  - Sensibilité aux antibiotiques par la mesure des CMI CLSI
    - Méropénème, amikacine, levofloxacin et colistine
  - Base de données de résistance « Home Made »:
    - 1700 déterminants génétiques: gènes et mutations chromosomiques acquises
  - Séquençage Illumina et recherche des gènes sur l'assemblage de novo

# NGS et antibiogramme

- *Pseudomonas aeruginosa* : Kos et al. AAC 2015

Microbiological Susceptibility Data

		NS	S	
Sequence Data	NS	154	14	Meropenem
	S	15	199	
	NS	181	12	Levofloxacin
	S	16	179	
	NS	63	30	Amikacin
	S	42	253	

Méropénème (R:  $\Delta$ oprD et/ou carbapénémases)  
154 R: 143 oprD mutés et 11 carbapénémases seules R  
14 FP: 13 oprD mutés et 1 IMP-13 non exprimé  
15 FN: mécanismes ?

ME: 4% et VME: 4% => > critères FDA

# NGS et antibiogramme

- *Pseudomonas aeruginosa* : Kos et al. AAC 2015

Microbiological Susceptibility Data

		NS	S	
Sequence Data	NS	154	14	Meropenem
	S	15	199	
	NS	181	12	Levofloxacin
	S	16	179	
	NS	63	30	Amikacin
	S	42	253	

Levofloxacin (I/R:  $\Delta$ gyrA/B +/-  $\Delta$ parC/E ou acc6'-Ib-cr)  
181 R: 163  $\Delta$ gyrA et 17  $\Delta$ gyrB  
12 FP: 6  $\Delta$ gyrA et 6  $\Delta$ gyrB  
16 FN: mécanismes ?  
  
ME: 3% et VME: 4%

# NGS et antibiogramme

- *Pseudomonas aeruginosa* : Kos et al. AAC 2015

Microbiological Susceptibility Data

		NS	S	
Sequence Data	NS	154	14	Meropenem
	S	15	199	
	NS	181	12	Levofloxacin
	S	16	179	
	NS	63	30	Amikacin
	S	42	253	

## Amikacine

63 R: Enzyme de mod., méthylase ARNr (63% concordance)  
(30 FP): 17 *aac6'-Ib* et 1 *aacA7* non exprimés  
42 FN !!!

ME: 5% et VME: 11%

2 isolats R Colistine: non prédite par le NGS

# Conclusion : les apports du NGS

- Surveiller et comprendre la transmission des BMR
- Développer de nouvelles molécules ou des stratégies thérapeutiques:
  - Etude de la conservation des cibles dans les génomes bactériens
  - Etudes des mécanismes de résistance associés
  - Etude des échecs thérapeutiques : rechute ou réinfection?
- Développer de tests de dépistage de la résistance aux antibiotiques
  - Identification de nouveaux mécanismes (mecC, mcr...)
  - Sélection de cibles moléculaires
  - Identification des faux négatifs et faux positifs
- Diagnostic microbiologique ?

# Conclusion : Les limites du NGS pour le diagnostique microbiologique de routine

- Prédiction de la sensibilité aux antibiotiques par NGS
  - Nombre limité d'études => preuve de concept plutôt favorable
  - Sensibilité et spécificité à évaluer pour les différentes bactéries et antibiotiques
  - Pas de standardisation:
    - Absence d'une base de données de la résistance unique, validée, standardisée et mise à jour
    - Absence de critères de validation et d'outils bio-informatiques standardisés
  - Limites intrinsèques du séquençage de l'ADN par WGS :
    - Déterminants de la résistance inconnus ou nouveaux
    - Impact des associations de mécanismes de résistance ?
    - Impact du nombre de copies des gènes, des processus de régulation ?
  - Coût du NGS 2G: 60-200€ / isolats (Antibiogramme: <8€)
  - Délai du NGS 2G: ≥48h
- Détection directe des microorganismes sur prélèvements
  - Sensibilité < PCR et culture
  - Délai > PCR, arrays et autres techniques rapides
  - Coût > PCR et culture