

Apport des nouveaux tests de diagnostic microbiologique dans le bon usage des anti-infectieux



Prof. Alban LE MONNIER
Service de Microbiologie Clinique
GH Paris Saint-Joseph - Université Paris-Sud Paris-Saclay



Déclarations d'intérêts de 2015 à 2019

- **Intérêts financiers** : aucun
- **Liens durables ou permanents** : aucun
- **Interventions ponctuelles** : aucune
- **Intérêts indirects** : aucun

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

Intervenant : LE MONNIER Alban

Titre : Apport des nouveaux tests de diagnostic microbiologique dans le bon usage des anti-infectieux

 L'orateur ne souhaite pas répondre

-  **Consultant ou membre d'un conseil scientifique**
=> bioMérieux OUI NON
-  **Conférencier ou auteur/rédacteur rémunéré d'articles ou documents**
=> MSD, Astellas, bioMérieux OUI NON
-  **Prise en charge de frais de voyage, d'hébergement ou d'inscription à des congrès ou autres manifestations**
=> MSD, Pfizer, Astellas, bioMérieux OUI NON
-  **Investigateur principal d'une recherche ou d'une étude clinique**
=> Sanofi-Pasteur, Astellas, MSD, Eumedica, I2A, Alere, ThermoFisher OUI NON

Antibio-gouvernance et bon usage des Antibiotiques

Une position centrale pour les référents antibiotiques



Prévention

Avis et conseils dans les services
=> antibiothérapies probabilistes
=> gérer les nouvelles molécules

Diagnostic

=> documentation microbiologique

Adaptation des traitements

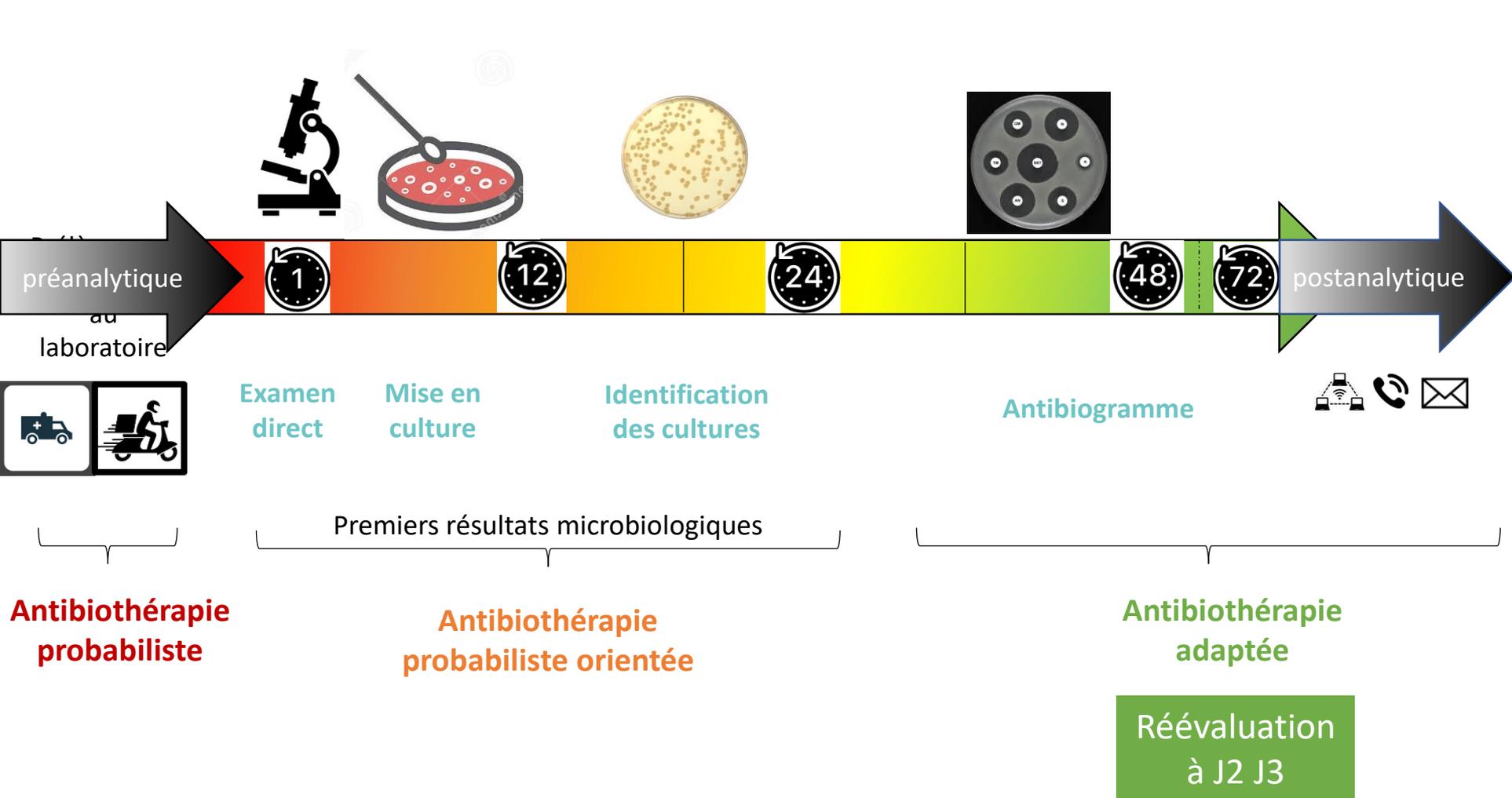
=> Arrêter les ATB inutiles
=> Désescalade
=> Relai IV - per os
=> Adaptation des doses

Suivi et durée

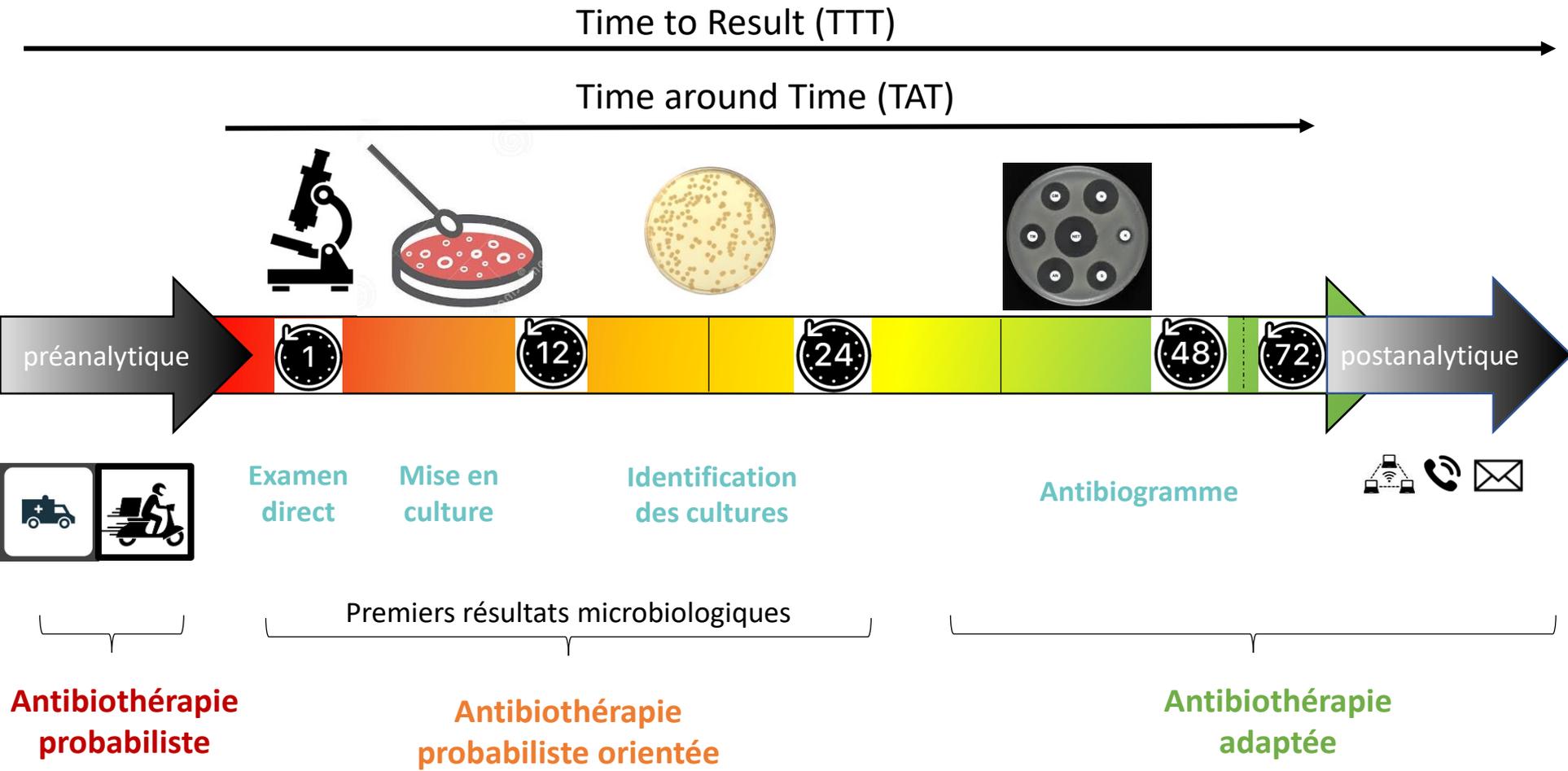
=> Critères d'efficacité ou d'échec
=> Raccourcissement des durées

=> Interactions importantes entre les référents ATB, les pharmaciens et les microbiologistes

Séquences du diagnostic bactériologique conventionnel



Comment faire plus vite ?



Quels besoins et quelles attentes respectives ?

point de vue du clinicien

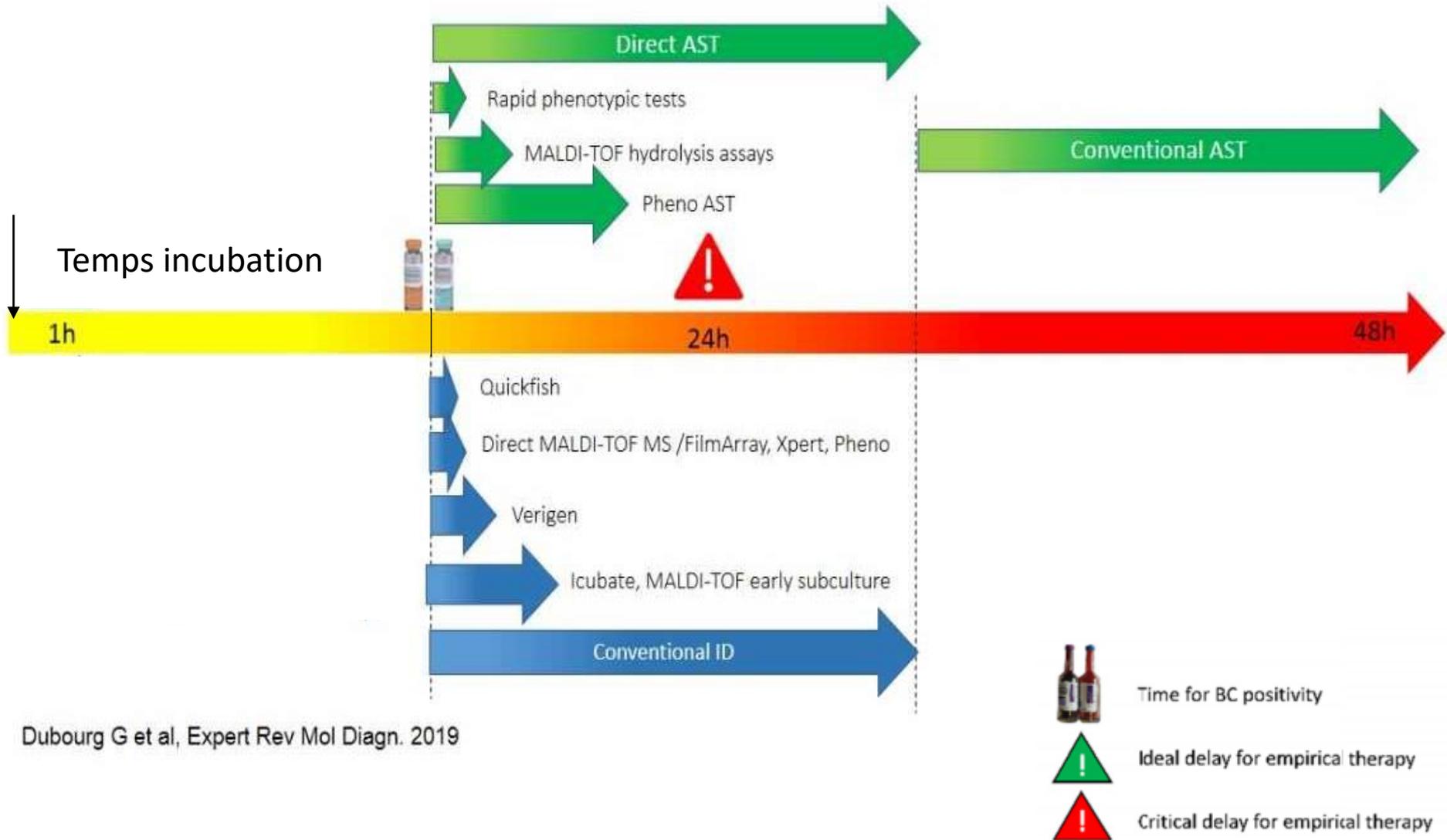
- Ultra rapide (<4h) ou rapide (<8h)
- Pan micro-organismes
- « A la demande »
- Accessible 24/7
- Gènes de résistance
- Pas de démultiplication des prélèvements (faible volume)

point de vue du microbiologiste

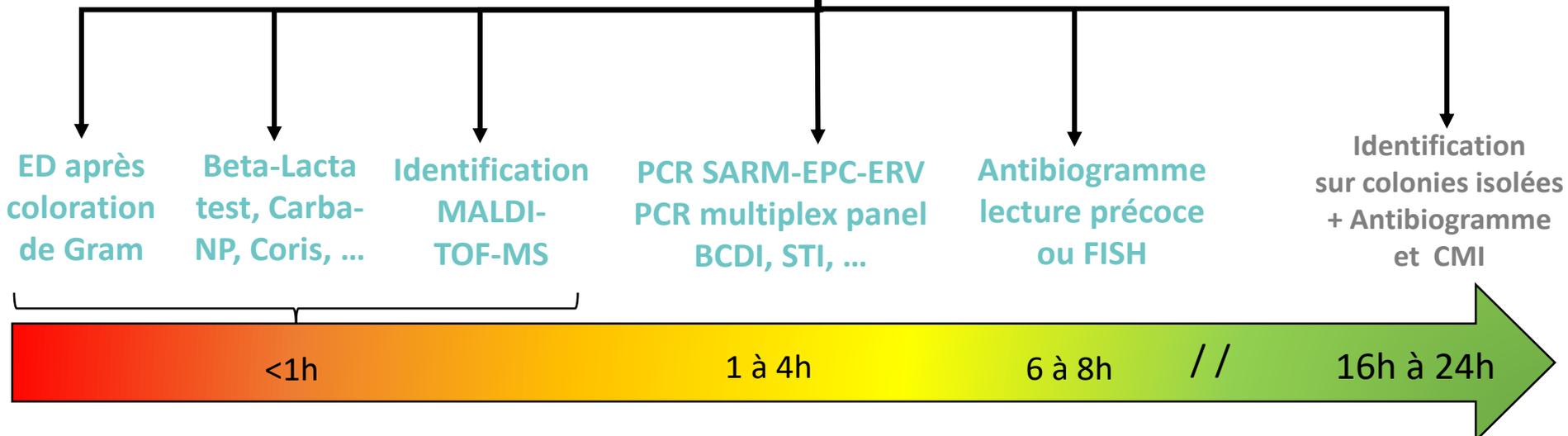
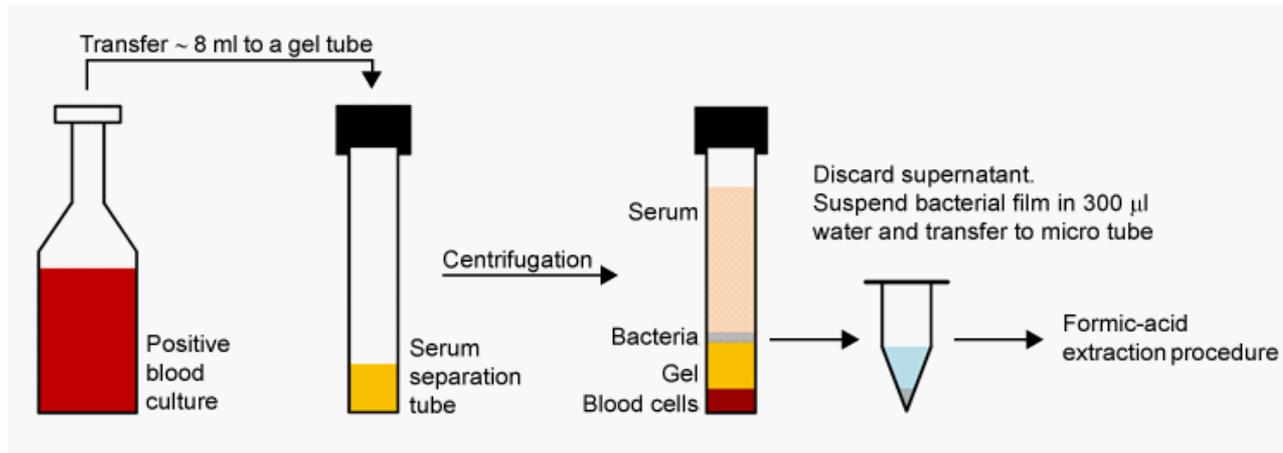
- Fiable et reproductible
- Performances analytiques (Se, Spe)
- Pas d'expertise technique
- Pas de locaux dédiés
- Technicité simple et TAT courts
- Automatisation complète
- Modulaire
- Test unique facile à accréditer
- Coût-efficace

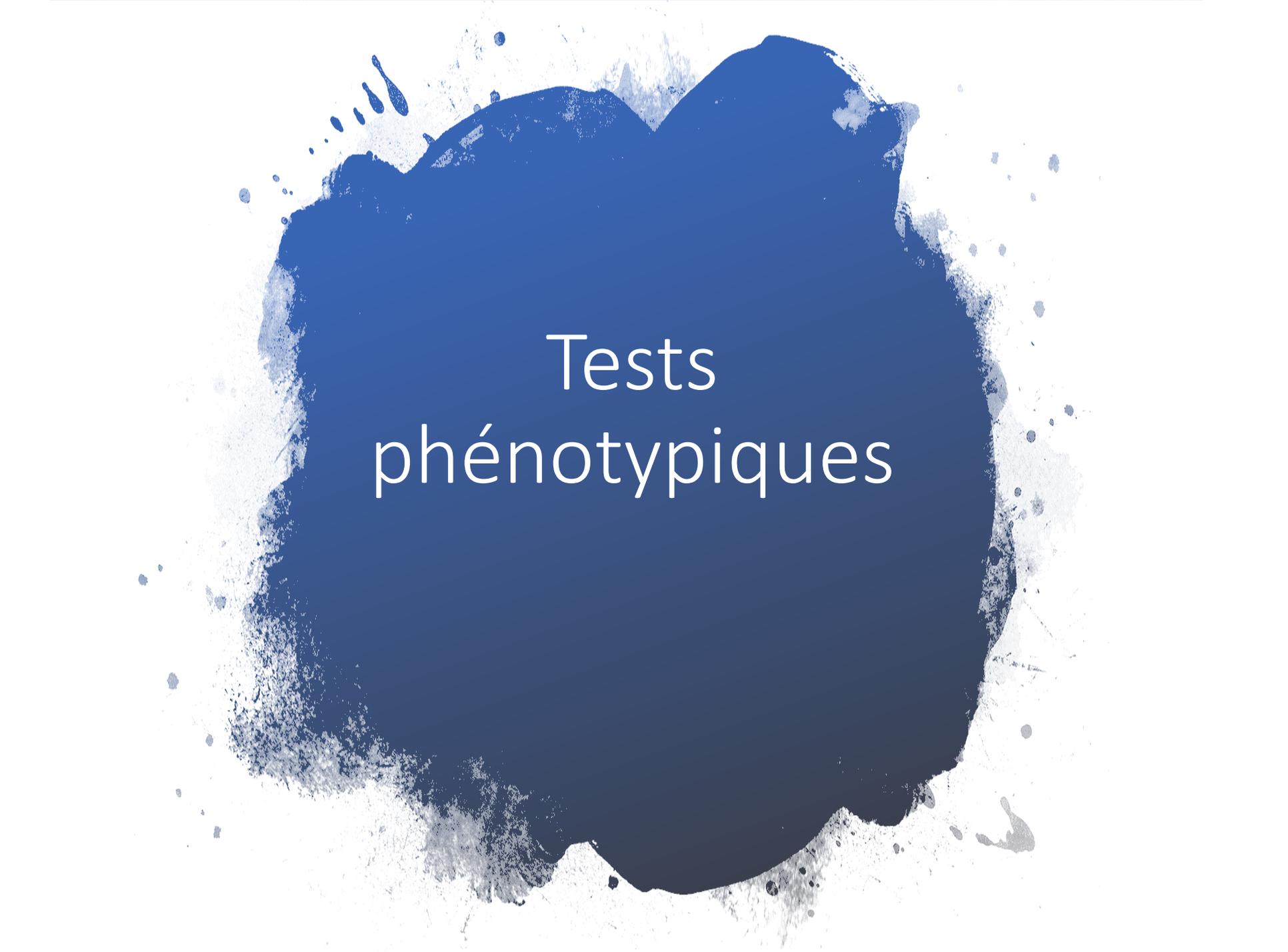


Comment réduire le temps d'analyse (TAT) ? L'exemple des hémocultures



Modification de la prise en charge des hémocultures (ID et ATBmme)





Tests phénotypiques

Méthodes immunologiques (ICT)

Phénotypique et non quantitatif

Applications

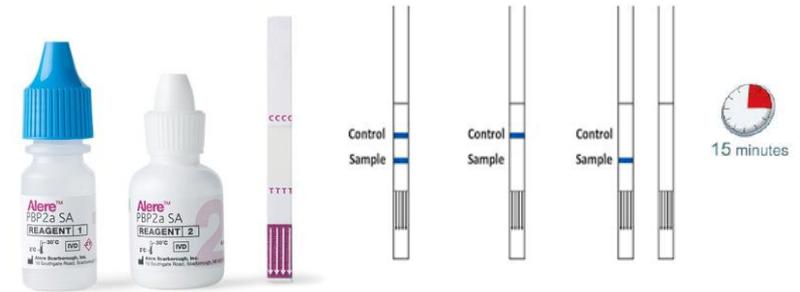
- Détection de la PL2a Staphylocoques
- Détection AG Solubles urinaires (Sp et Lp)
- Détection des carbapénèmases

Modalités de réalisation

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

Limites

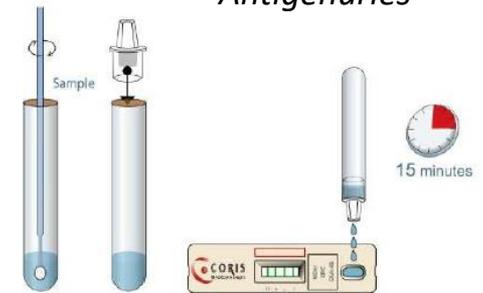
- Lecture subjective
- Tests fermés (prob des mécanismes nouveaux et rares)
- Peu adaptés à une application directement sur des prélèvements ou hémocultures positives



Détection PLP2a

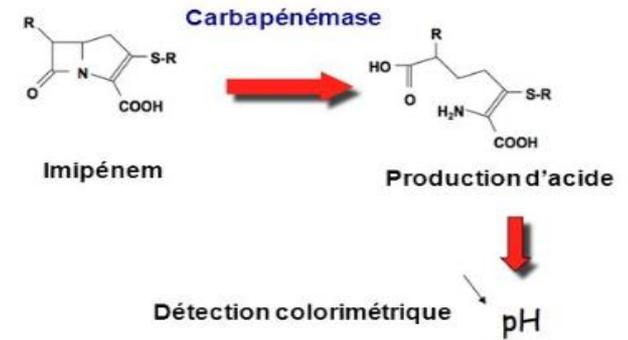


Antigénuries



Détection carbapénémase

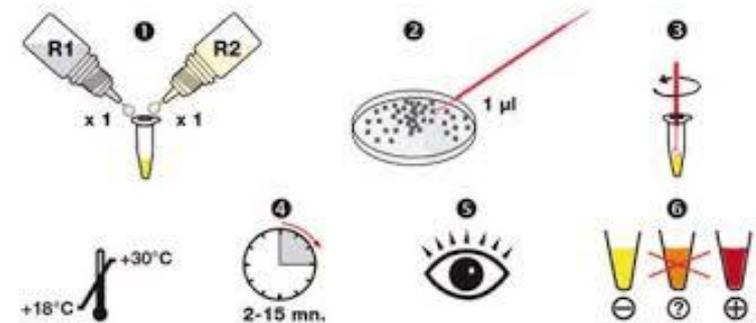
Méthodes chromogéniques



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

Applications

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

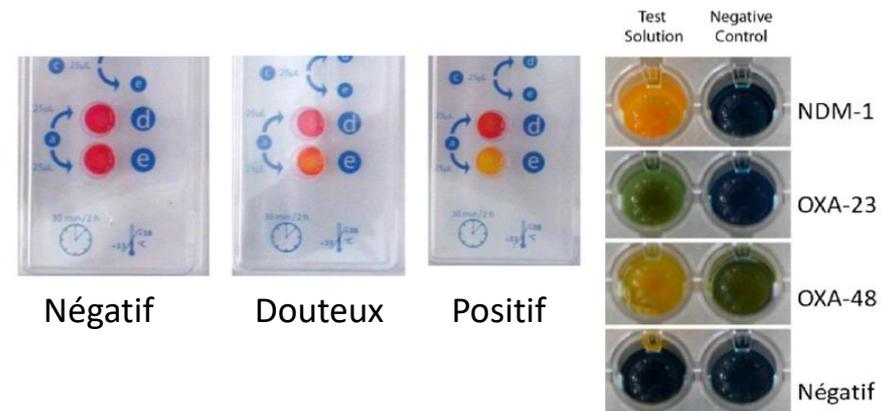


Bêta-Lacta et Bêta-Carba tests

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

Limites

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



Rapidec Carba NP test Blue Carba test

Méthodes phénotypiques réalisées directement sur les prélèvements primaires

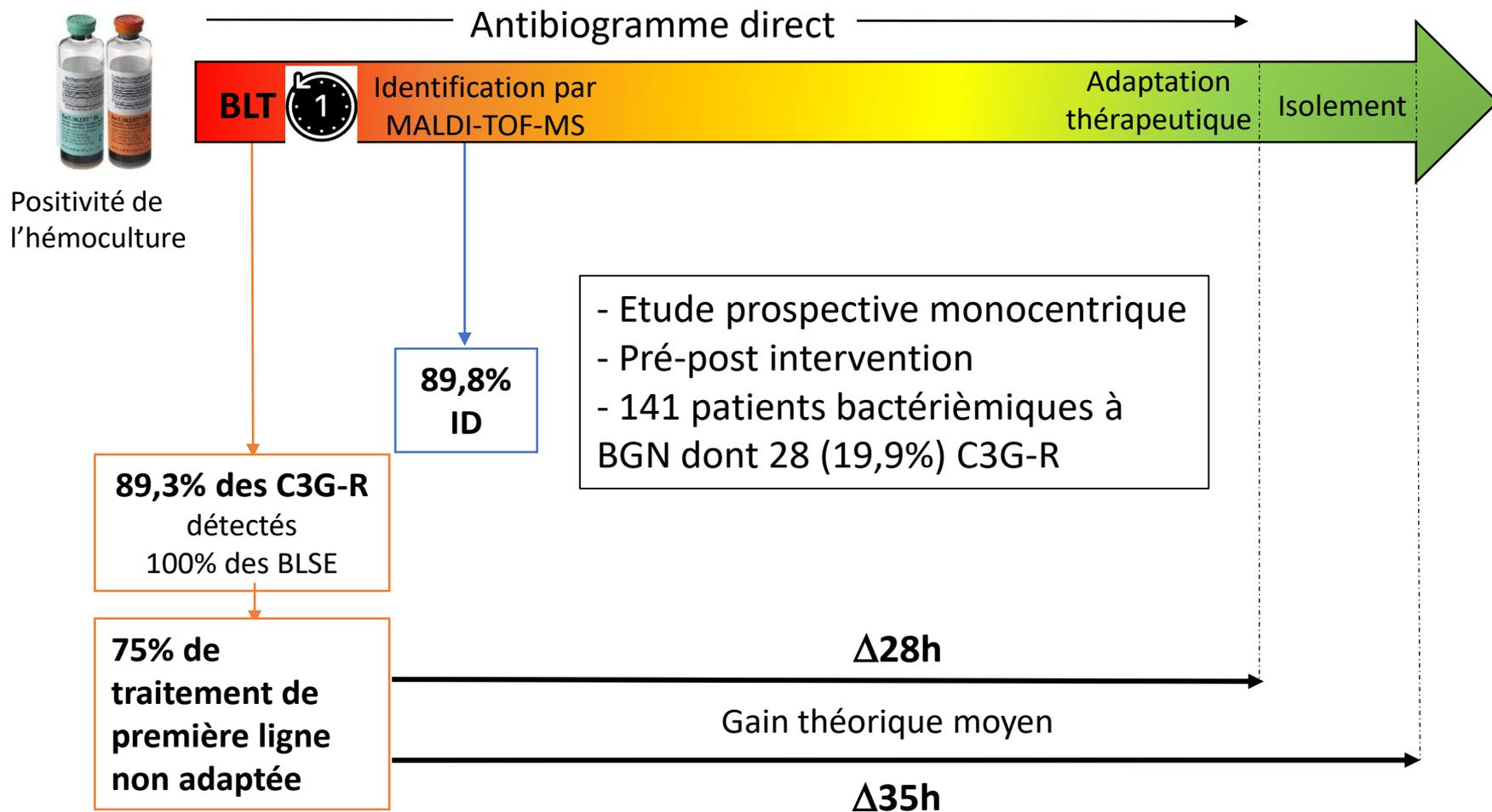
Nom	Cibles	Performances sur colonies	Adaptation prélèvement
Beta-Lacta test	BLSE, HCASE, Carbapénèmases	Se 87,7% Spe 99,6% <i>Renvoisé JCM 2014</i>	Urines <i>Gallah JCM 2014</i> <i>Amzalag Infect Dis 2016</i> Hémocultures positives <i>Compain JMM 2015</i> <i>Hasso JCM 2017</i> Aspirations bronchiques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

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



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

Mizrahi A¹, Amzalag J¹, Couzigou C², Péan De Ponfilly G¹, Pilmis B², Le Monnier A¹.



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

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



Clinical Microbiology and Infection 24 (2018) 402–408

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

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

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

RCT en cours (NCT03147807)

BLUE-Carba

N°EudraCT: 216-A00941-50 / P 150940

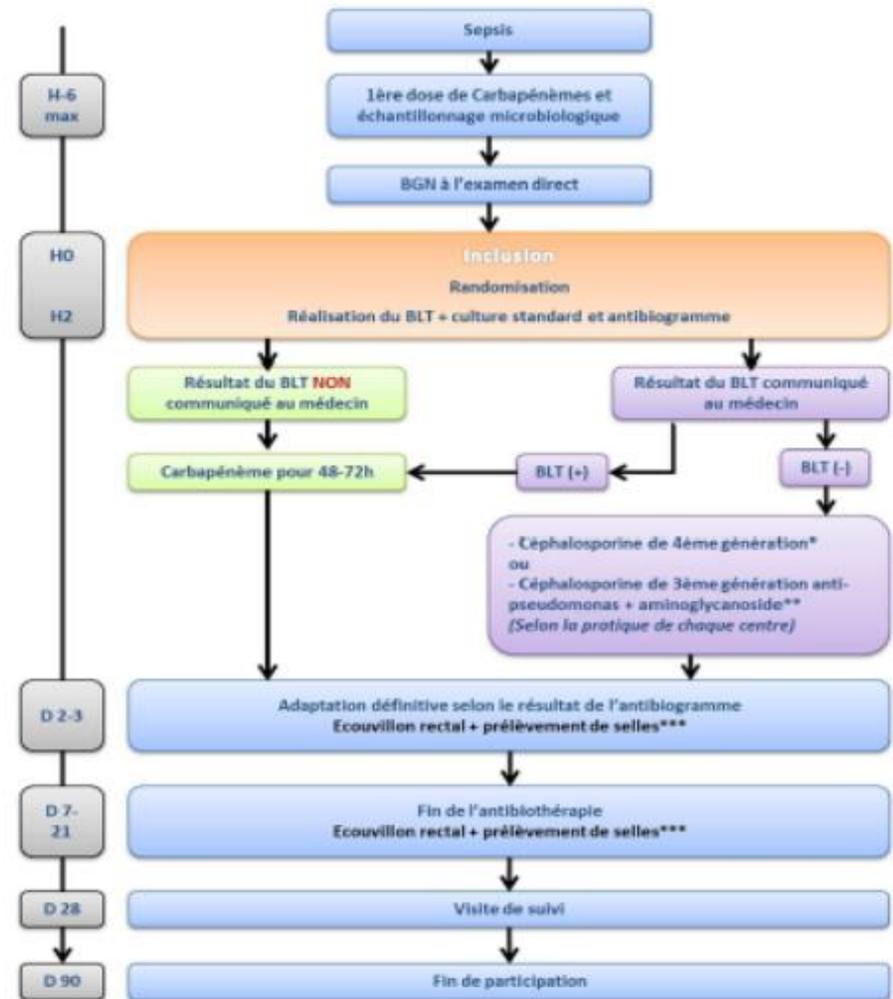
Utilisation du bêtalacta[®] test sur le culot bactérien issu de l'examen direct positif à bacille à gram négatif pour la désescalade précoce de l'antibiothérapie probabiliste par carbapénèmes au cours des infections respiratoires, urinaires et bactériémies en réanimation.

PHRC Blue Carba (en cours de recrutement)

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

doi: 10.1136/bmjopen-2018-024561.

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



* Céfépime

** Ceftazidime + amikacine

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



MALDI-TOF-MS
et
FISH

Applications du MALDI-TOF-MS

Identification bactérienne et fongique

Sur colonies isolées

Directement à partir des prélèvements primaires :

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

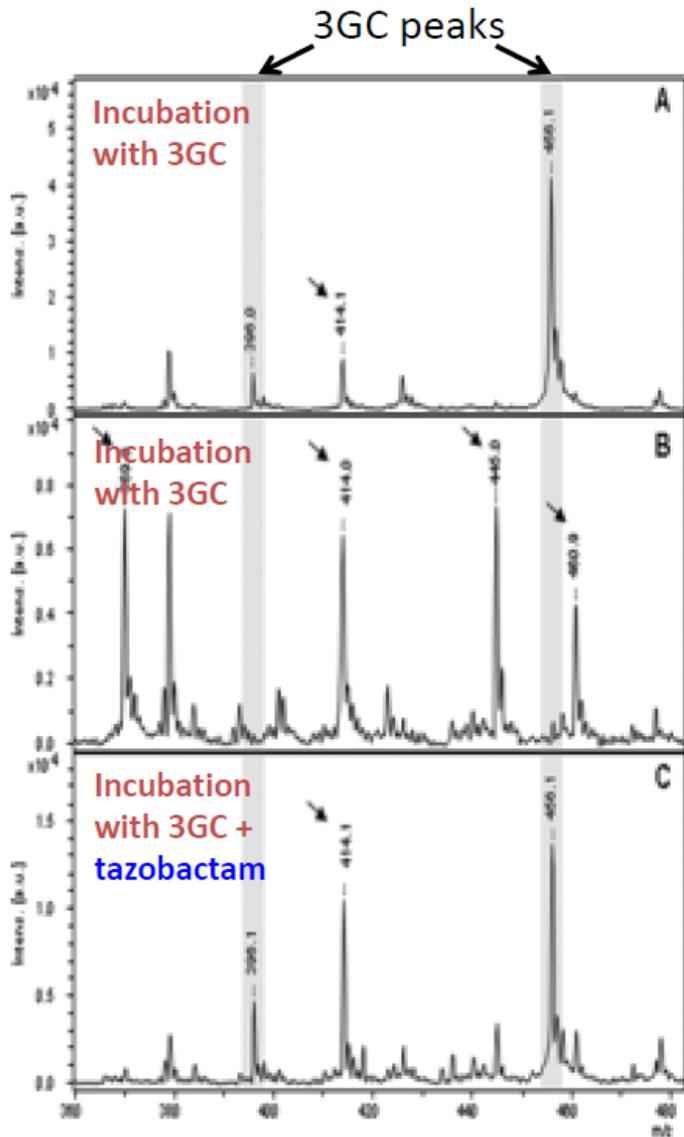
Etude de la clonalité, comparaison de souche (en développement)

Etude de la sensibilité aux antibiotiques par détection

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



Détection rapide des BLSE et Case



No ESBL

À partir de colonies isolées

Li et al Med Sci Monit basic Res 2014

A partir de surnageant
d'hémocultures positives

Oviano et al CMI 2014

ESBL

Impact sur workflow du laboratoire
Besoin d'harmonisation car
difficultés de standardisation

ESBL

=> Système commercial en cours de
développement

Détection rapide des carbapénèmases



MBT STAR-BL
Software Module

Bacteria: loop 1-10 μL

Carbapenem
solution



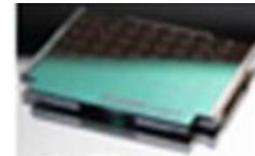
Incubation 37° C
20 min – 4h



Centrifugation
2 min 12000G



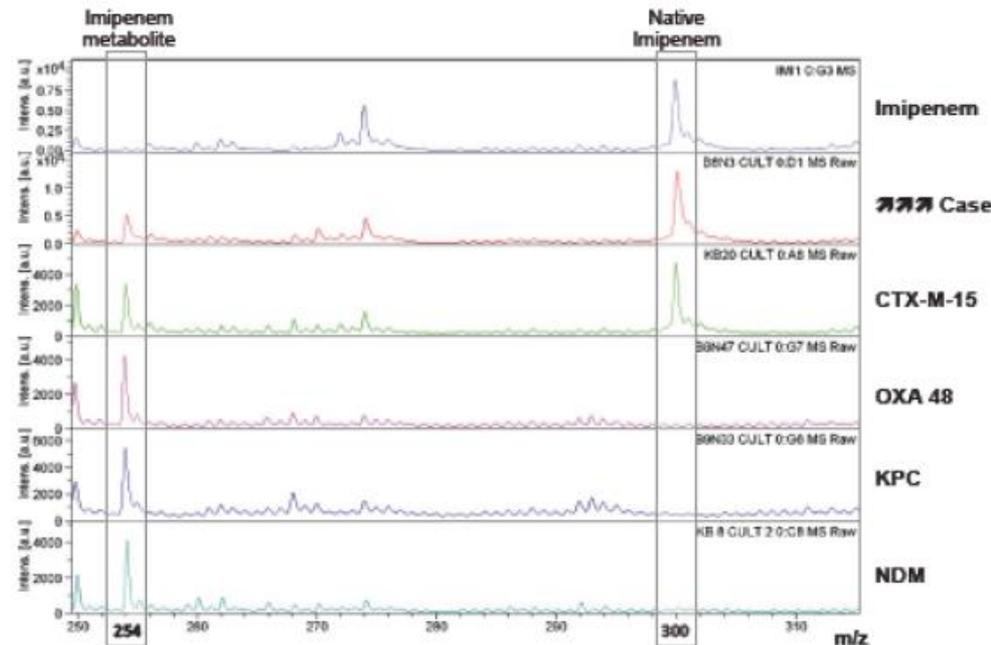
Surpennatant



Target :
1 μL supernatant + 1 μL matrix
STAR-BL



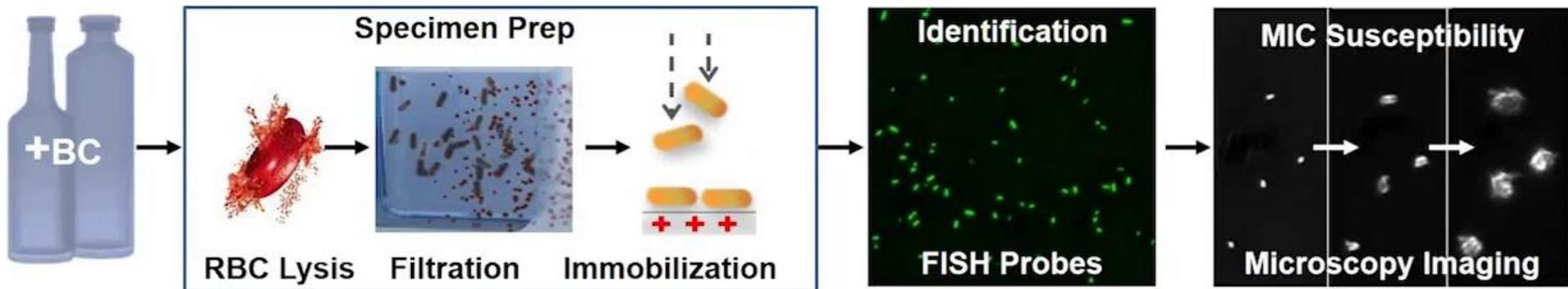
- Rapide et coût-efficace
- Seul système commercialisé à ce jour avec software module adapté (MBT STAR-BL)
- Il existe d'autres solutions développées localement (*in-house*)



Accelerate Pheno System



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



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

Accelerate Pheno System



Evaluation

- Performances analytiques

Prospective sur 125 flacons hémocultures (dont 10 polymicrobiennes)

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

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

Marschal JCM 2017 - Pancholi JCM 2018

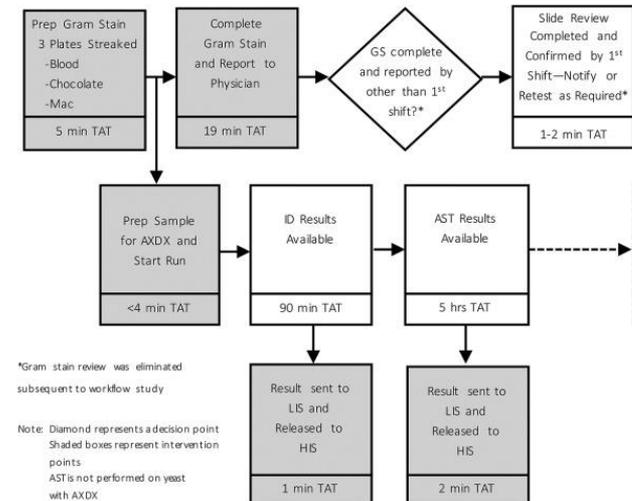
- Impact organisationnel

Amélioration significative workflow du labo et des TTT

Charnot-Katsikas JCM 2017

Limites

- Un seul test à la fois
- Plateforme compacte mais encombrante
- Pas adapté au nombre d'hémoculture positive gérées au quotidien => modularité 1 à 4
- Prix au test : ~350 €
- Pas d'étude d'impact clinique ou d'évaluation médico-économique



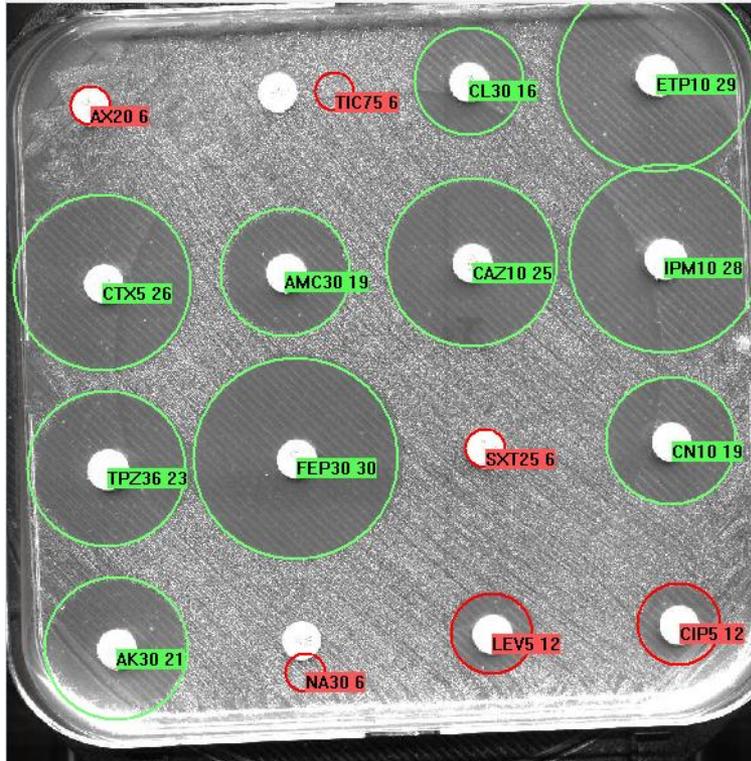


Optimisation
de nos
antibiogrammes

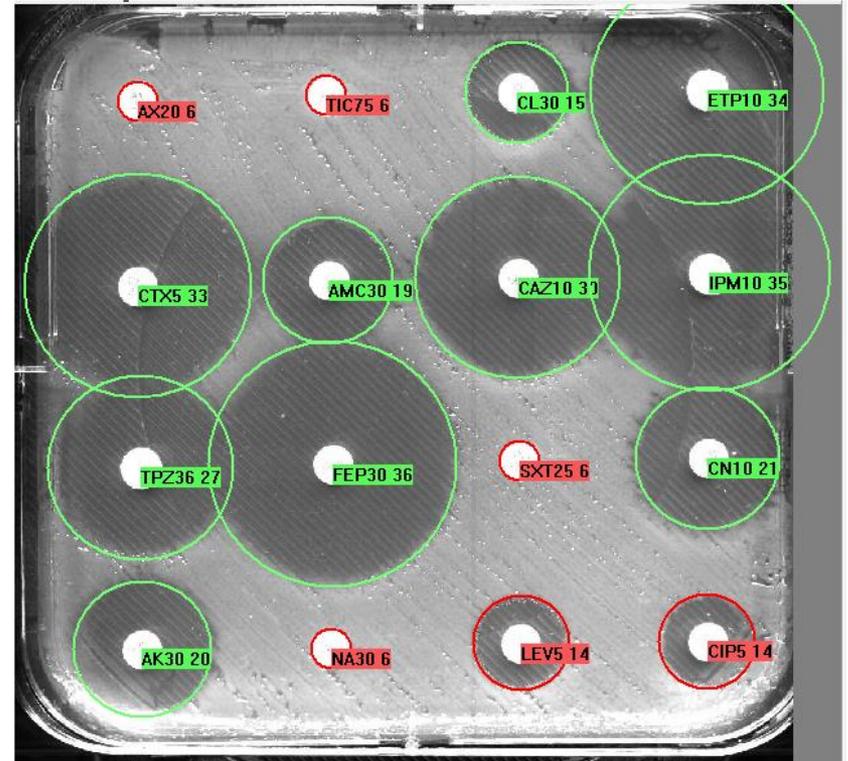
Prospective evaluation of rapid antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion on Mueller-Hinton rapid-SIR directly on blood cultures.

Périllaud C¹, Pilmis B², Diep J², Péan de Ponfilly G¹, Vidal B², Couzigou C², Mizrahi A¹, Lourtet-Hascoët J¹, Le Monnier A¹, Nguyen Van JC³.

Lecture de l'antibiogramme < 8h et après 18 heures d'incubation
Concordance : 97,4 % pour les BGN / > 98% pour les Staphylocoques



< 8 heures sur gélose MHR



18 heures sur MH à partir de la culture

Réalisation et lecture précoce des antibiogrammes conventionnels



Antibiogramme directement à partir des prélèvements cliniques

- **Utilisation des géloses MHR directement dans les urines**
Périllaud Dubois et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2019
Etude d'impact clinique présentée aux JINI 2019 Lyon et à l'ICAAC 2019 San Francisco
- **AB-DIRECT2** (PHRC en cours, 6 centres, coordination Bichat) : impact de l'antibiogramme réalisé directement à partir de prélèvements respiratoires profonds lors des PAVM

Recommandations CA-SFM et EUCAST 2018 - 2019

- Introduction de breakpoints spécifiques pour une lecture précoce à 4h 6h 8H
- Ne concerne pas toutes les espèces et tous les antibiotiques
- Etude multicentrique sur l'évaluation et la faisabilité des ces nouveaux breakpoints (en pratique Lecture 4h est difficile voire impossible mais intéressante 6h et surtout 8h)



Antibiogramme conventionnel (MH ou MHR)

Rapide / Souplesse et adaptabilité : choix du panel d'antibiotiques à tester non captif
Coût-efficace : rappel antibiogramme ~5€ (MH ou MHR + disques antibiotiques)

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



Outil de
biologie
moléculaire

Outil de Biologie moléculaire

PCR commerciales ou tests « maison »



- Réponse ultra-rapide : de 15 min à 2h
- Plateformes compactes et modulaires
- Tests « au coup par coup » (adaptés à l'urgence)
- Compatibles avec de nombreuses matrices biologiques (types de prélèvement)
- Simple et *user friendly* (*Nespresso like*) => compatible avec des approches de biologie médicale délocalisée

Diagnostic rapide

Sur prélèvements primaires

- Cdiff,
- MTb-Rif,
- SGB,
- Grippe,
- Ct/Ng

Dépistage de portage

A partir d'écouvillon

- EPC,
- ERV,
- SARM,
- SGB

Identification précoce de la résistance

Sur surnageant d'hémocultures

- SARM,
- EPC,
- ERV

Test de confirmation

Sur colonies isolées

- EPC,
- ERV

Mise en place d'organisation

Innovante

- Grippe,
- SGB, ...

Approche par biologie moléculaire ciblée

Exemple de la PCR SARM



Principe

- Détection gène *mecA* et cassette *SSCmec* (support génétique de la résistance)
- TAT très courts
- Délai pour les résultats 1h

Applications

- A partir de prélèvements (orthopédie septique, ponction articulaire préopératoire, dépistage portage nasal pré-opératoire, ...)
- Sur flacon hémoculture positive (SA/SARM BC) :



- Simple, rapide et sensible
- Baisse des coûts
- Diminution délai mise en route traitement anti staphylocoque adapté
- Diminution des durées d'hospitalisation
- Diminution de la prescription d'ATB en cas de SCoN

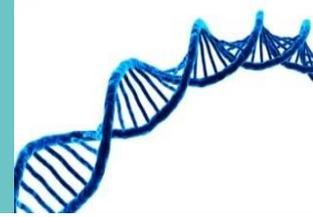


- Coût des tests
- Pas de de différence si pas de référent ATB associé à la prise de décision
- Pas de différence si pas de rendu en temps réel
- Peu de réactivité sur l'émergence de variants (ex *mecC*)
- Pas d'impact sur la mortalité



Stratégie de dépistage du SGB par PCR

en salle de naissance : un outil de bon usage des ATB ?



Evaluation coût-efficacité: 6 années de dépistage *per-partum* versus 4 années de dépistage anténatal à 35-37 SA

18 980 nouveau-nés (dépistage *per-partum*)

versus

11 818 nouveau-nés (dépistage anténatal)



-67%

méningites /bactériémies



-58%

INP probables
(définition HAS)



-64%

nombre de journées
d'hospitalisation
pour INP



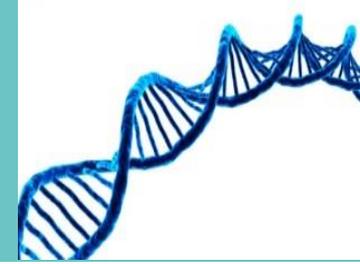
-60%

nombre de journées
d'antibiothérapie
pour INP

COÛT-EFFICACE

Délocalisation de la PCR Grippe aux urgences en période épidémique

Un outil pour la filiarisation rapide des patients ?



Etude réalisée en 2015 sur utilisation en pratique courante

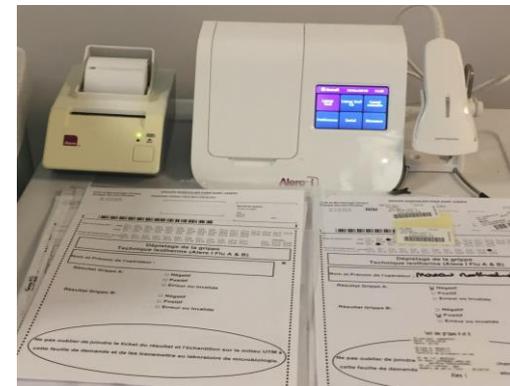
Biologie délocalisée aux urgences

Résultat à la demande 7j/7 et 24h/24 => 15 min

Objectifs : optimiser la prise en charge des patients atteints de grippe et les flux organisationnels en période épidémique



- Diminution du temps de passage aux urgences
- Diminution du taux d'hospitalisation (RAD pour patients valides)
- Pour les patients hospitalisés : isolement respiratoire précoce et prescriptions plus adaptées (antiviraux)
- Diminution significative des examens complémentaires (moins de Radio, moins de bilans biologiques (CRP, NFS, iono))
- Une réduction significative du nombre de prescriptions d'antibiotiques



=> **Excellente adhésion et enthousiasme de l'équipe et ... satisfaction des patients**

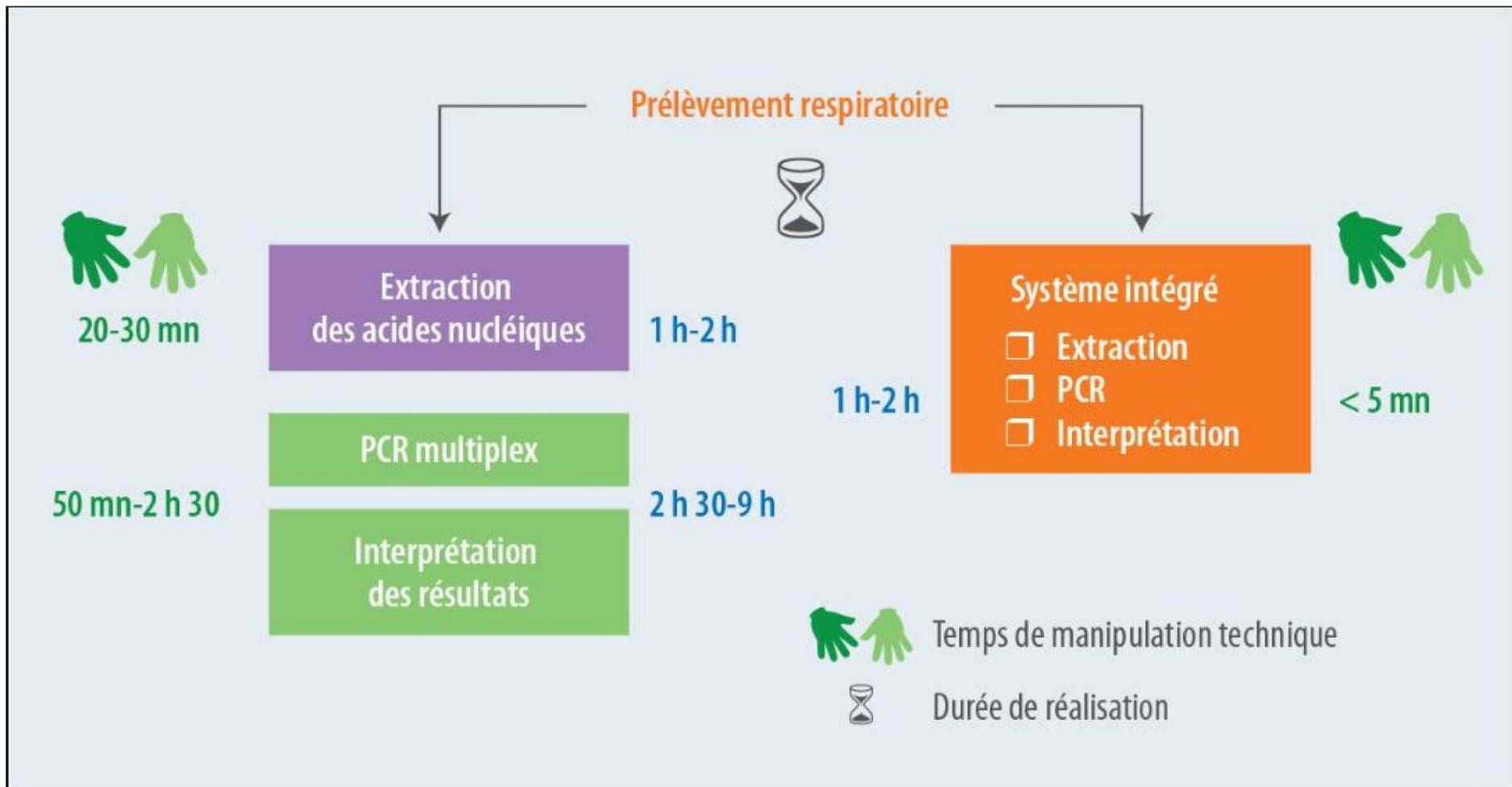


Approche
diagnostique
syndromique

De nouveaux équipements pour la PCR multiplexe

Plateau technique de biologie moléculaire

Plateforme intégrée, tout-en-un



Test conventionnel



Analyse syndromique



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



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

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

Caractéristiques des principales plateformes intégrées ou semi-intégrées et panels syndromiques disponibles en Europe

Plateforme	ePlex®	eSensor XT-8®	FilmArray®	DiagCORE Analyzer STAT-Dx®	Novodiag®	BD MAX®	Unyvero®	Verigene Nanogrid Technology®	MAGPIX® ou Luminex 100/200®	Nimbus® CFX96®
Panels	Rv	Rv	Rv, ME, BF, GE	R, GE	GE	GE	R, BF, GE	P, B, GE	P, ME, B, GE	P, GE
Automatisation	Totale	Totale	Totale	Totale	Totale	Totale	Partielle ^a	Partielle ^a	Partielle ^a	Partielle ^a
Technicité	Simple	Simple	Simple	Simple	Simple	Simple	Complexe	Complexe	Complexe	Complexe
Débit de tests	3-24 (modulaire)	8-24 (modulaire)	1-12 (modulaire)	1-8 (modulaire)	1-16 (modulaire)	1-24 (modulaire)	1-32 (modulaire)	1-32 (modulaire)	≤ 50	≤ 76
Délai de réponse	~ 1,5 h	~ 1 h	~ 1 h	~ 1 h	~ 1,25 h	2-3 h	~ 4 h	2,5 h	~ 5 h	3-5 h

^a Au moins deux équipements différents sont requis pour gérer les différentes phases analytiques (extraction, amplification et détection-lecture).

Abréviations des panels : R : infection respiratoire ; Rv : infection respiratoire (virus et bactéries atypiques) ; ME : méningo-encéphalite ; B : bactériémie ; BF : bactériémie/fongémie ; GE : gastro-entérite.

Autres panels : IST, IOA et IBPTM, santé de la femme

Pipeline : Fièvre de l'immunodéprimé, bilan pré-greffe fécale, Infection urinaire, fièvre au retour de voyage, infection intra-abdominale, ...

Des limites qu'il vous faut connaître

Performances analytiques variables selon les panels mais aussi les conditions d'utilisation (échantillon frais, congelé ...) pas assez sensible pour le suivi de patients (FP et FN)
=> à consolider

Cas de contamination (ex: germes ORL et panel M/E)
=> cela reste de la biologie moléculaire

Interprétation difficile de situations nouvelles cas HHV6 et panel M/E, co-infection digestive à plusieurs AI, colonisation asymptomatique vs infection, absence de quantification ou de question clinique clairement posée
=> besoin de plus de recul

Pas de détection des émergences de nouveaux clones ou gènes de résistances aux ATB
=> Besoin de réactivité des fabricants

Etudes médico-économiques souvent isolées, monocentriques, voire rétrospectives ...
=> à interpréter avec prudence

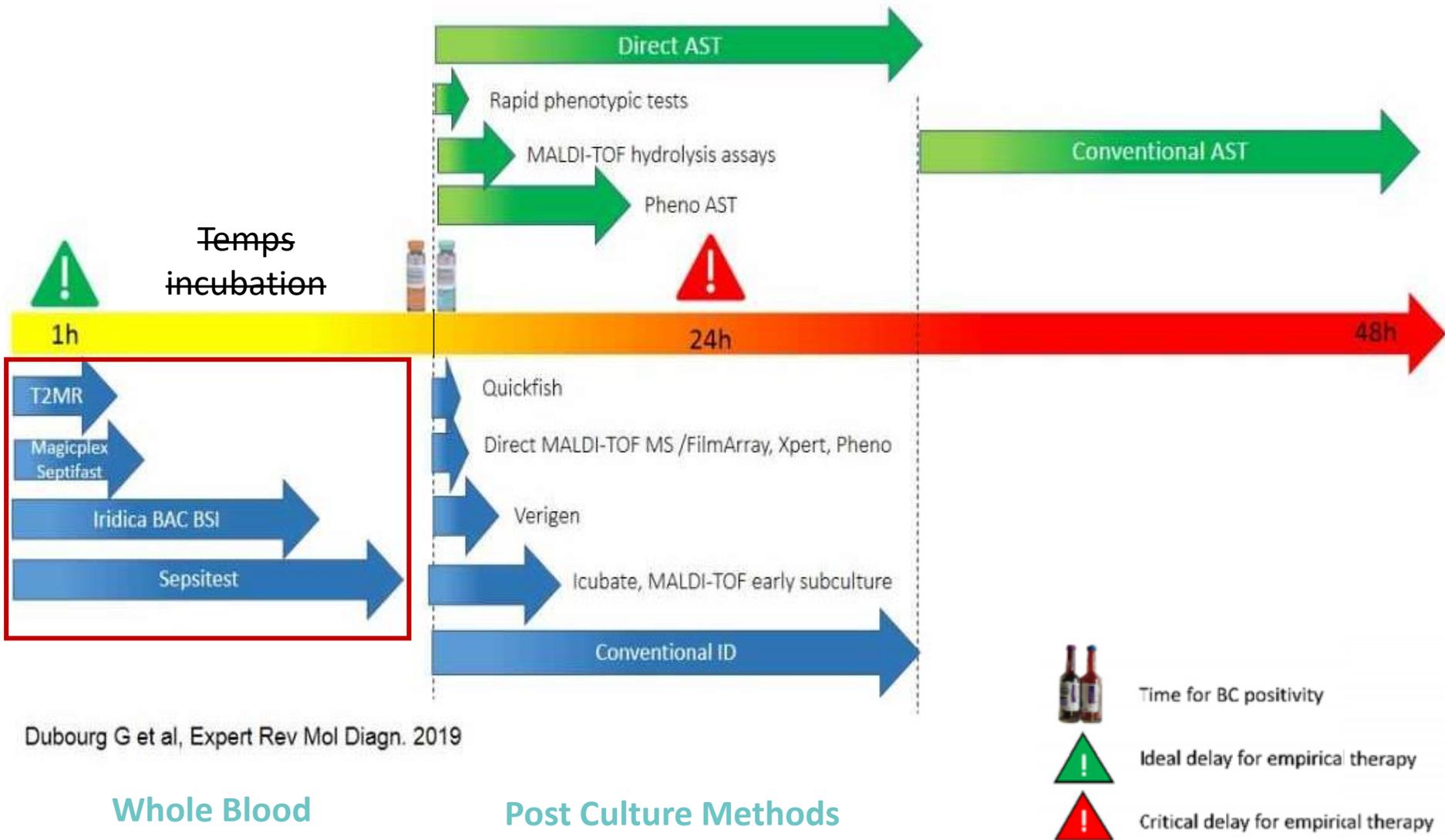
Coûts au test encore très(trop) importants
=> Marché de plus en plus concurrentiel qui devrait permettre de réduire les coûts à terme

Messages importants aux prescripteurs

- **Ne pas se désinvestir du raisonnement clinique** et du diagnostic différentiel
- **Pas de panel exhaustif** (manque certains agents infectieux et non exhaustivité des gènes de résistance)
- **Quelle est votre question ?** que faire des étiologies habituellement non demandées ou non évoquées, agents infectieux sans traitement à ce jour
- Outils de diagnostique rapide **pas adapté pour le suivi** de l'efficacité des traitements
- **La culture doit rester le gold standard** pour l'isolement des souches bactériennes (réalisation de l'antibiogramme, surveillance épidémiologique et de l'émergence de nouveaux clones pathogènes ou résistants, ...)
- **Dérives : rapide tendance à « exiger »** l'approche syndromique en première intention alors qu'elle n'est pas toujours justifiée médicalement

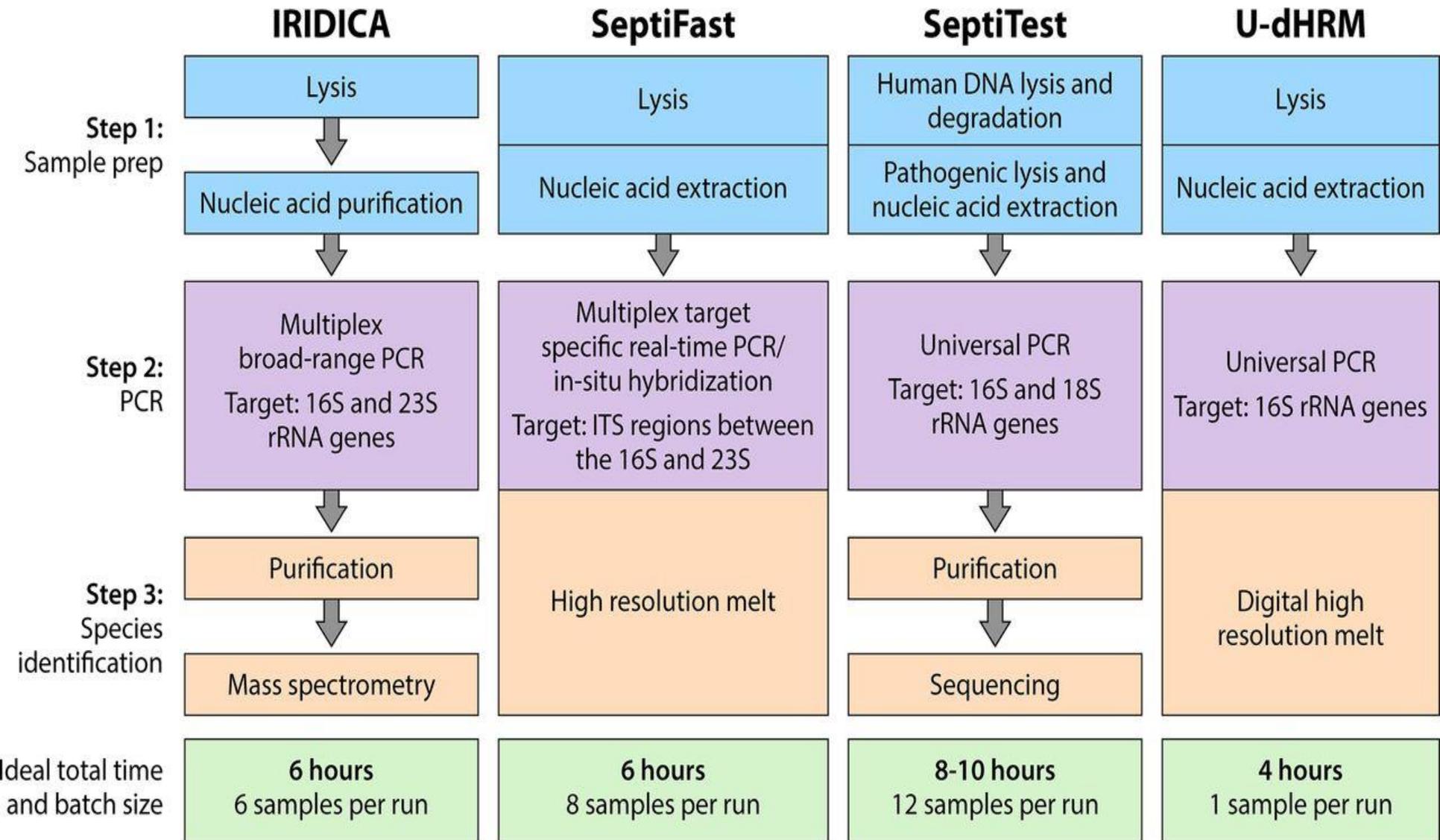
Comment réduire le temps d'analyse (TAT) ?

L'exemple des hémocultures



Dubourg G et al, Expert Rev Mol Diagn. 2019

Applications directement sur sang total



Conclusions

- **Révolution technologique** reléguant les techniques conventionnelles à la « préhistoire »
 - **Beaucoup de nouveautés mais pas de solution idéale**
 - **Quel positionnement et à quel coût ?**
 - Quels besoins (recrutement)
 - Quelles organisations locales déjà en place
 - Quels moyens (RH, locaux et équipements)
 - Problématique organisationnelle et de flux au labo
- => besoin de discuter de ce qui est possible avec son microbiologiste et des indications au cas par cas
- **Beaucoup d'étude d'évaluation des performances analytiques** mais manque encore d'étude prospective, multicentrique et méthodologiquement bien pensée pour évaluer l'impact clinique et médico-économique ...





Rapid is good but
accurate is
everything

Merci à

Pr Vincent CATTOIR

Dr Laurent DORTET

Dr Hervé JACQUIER

Dr Brigitte LAMY

Pr Frédéric LAURENT

Dr Assaf MIZRAHI

Dr Jean-Claude NGUYEN

Dr Benoît PILMIS

Dr Gauthier PEAN DE PONFILLY

Merci pour votre attention