



Assises des infectiologues 2017



# **Infectio et Bactériologiste – Apports respectifs à l’heure du MALDITOF et de la PCR universelle.**

Le point de vue du bactériologiste... et l’expérience du CHU Henri-Mondor

*Jean-Winoc DECOUSSER*

*Unité de Bactériologie – Hygiène, département de Microbiologie*



# Plan

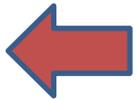
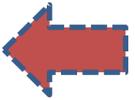


- **Introduction:** situation générale et locale
- **Aujourd'hui:** exemples d'une synergie
  - Hémoculture positive
  - Biopsie / liquide articulaire
- **Perspectives**
- **Discussion**
- **Conclusion**



# Introduction: situation générale



- Cf. « la cigale et la fourmi »: *nous voilà fort dépourvu...*
- *(Impact d'une antibiothérapie inadaptée sur l'évolution individuelle d'une infection)*
- Impact **individuel et collectif** de la pression antibiotique
  - Antibiothérapie future / microbiote
  - **Maîtrise de la diffusion des Bactéries multi-résistantes (BMR):**
    - **Bon usage des antibiotiques** 
    - **Lutte contre la transmission croisée:** précautions standard, précautions renforcées (incluant personnel dédié si Bactérie Hautement Résistantes et émergentes) 



# Interactions Infectiologiques – Bactériologistes CHU Mondor



- Intenses
- Raisonnés et raisonnables, mais .....
  - Tout,
  - Tout de suite,
  - Très précisément.



**Unité transversale de traitement des infections (U2TI) Dr Raphael LEPEULE**



# Situation 1: hémoculture positive



- **Approche standard:**

- J0: Coloration de Gram
- +/- « Etat frais » (= mobilité)
- Isolement pour identification à J1
- J0: Antibiogramme (+/- CMI) directement à partir du flacon d'hémoculture, à confirmer à J1
- J0/J1: idem portes d'entrée



- **Approche Optimisée (phénotypie)**

- + culture rapide (3h) pour Maldi-Tof
- +  $\beta$ -lacta Test<sup>®</sup>
- + détection antigénique (agglutination anti-pneumococcique)
- + portes d'entrée: identification,  $\beta$ -lacta Test<sup>®</sup>, détection PLP2a
- CMI milieux liquide

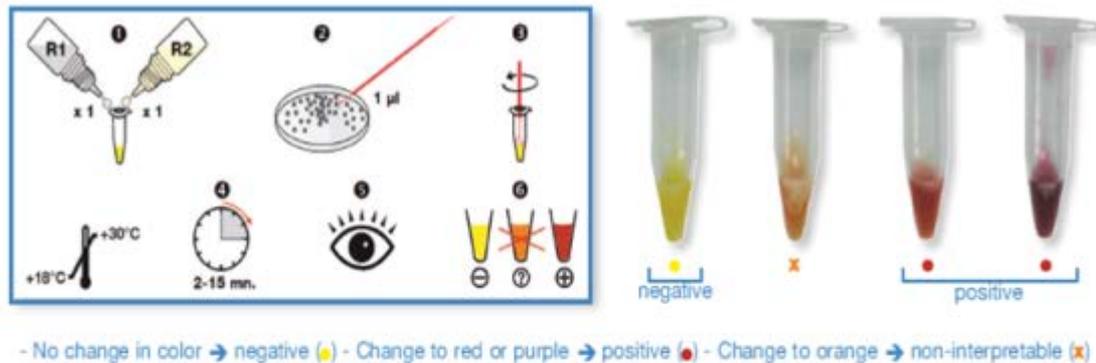
- **Approche Optimisée (génomique)**

- PCR ciblées
- Panel de PCR ciblées
- (ARN16S)



# Le test $\beta$ -LACTA™

- Test chromogénique rapide (15 minutes)
- Détection de la résistance aux C3G sur colonies chez les entérobactéries <sup>1</sup>



Protocole et interprétation des résultats du test  $\beta$ -LACTA™ <sup>2</sup>

<sup>1</sup> : Renvoisé *et al.* 2013, J Clin Microbiol.

<sup>2</sup> : Ben Soltana *et al.* 2012, ECCMID

- **Performances sur colonies (résistance aux C3G) <sup>1</sup> :**
  - Sensibilité globale : 87,7 %, 96% pour *E. coli* et *K. pneumoniae*, 67,4 % pour les entérobactéries du groupe 3
  - Spécificité : 99,6 %, test positif pour toutes les EBLSE
- **Urines, hémocultures: possible mais manipulations ++**

# MALDI-TOF sur culture précoce

- **Approche standard:** culture de 18h
- **Approche rapide:** culture de 3 à 5 heures
  - Ensemencement riche sur milieux riche en atmosphère enrichie
  - « raclage » à 3-5h (+  $\beta$ -LactaTest<sup>®</sup>)
- Performances acceptables même si inférieures à l'approche standard
- Ne fonctionne pas sur anaérobies et autres bactéries à culture lente...





# Panels PCR



- = **panels multiplexes bactériologie:**
  - identification genres/espèces
  - Identification gènes de résistance
  - +/- identification « universelle » 16S
- **Sur hémocultures positives**
- **Sur prélèvements:**
  - Peau et tissus mous
  - Respiratoires haut/bas, intraabdominaux
- **Sensibilité variable** en fonction:
  - Du comparatif (culture?)
  - Du prélèvement (hémocultures vs prélèvement, prélèvement à examen direct positif, prélèvement à examen direct négatif)
  - Du multiplexage
- (Panels syndromique)

# Panel PCR hémocultures



- Pb: **résistance par régulation** (*P. aeruginosa*), **diversité** des supports génétiques de la résistance (bla oxacillinase >> *mec* ou *van*)
- **Adaptation épidémiologie locale**

GROUP	PATHOGEN
Universal Bacteria	
Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Coagulase negative staphylococci
	<i>Streptococcus</i> spp.
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Streptococcus pyogenes/ dysgalactiae</i>
	<i>Enterococcus</i> spp.
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
	Corynebacteriaceae
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter freundii/koseri</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella varicola</i>
	<i>Proteus</i> spp.
	<i>Serratia marcescens</i>
	Non-fermenting bacteria
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
other Gram-negative bacteria	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Neisseria meningitidis</i>
Anaerobic bacteria	<i>Propionibacterium acnes</i>
Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i> spp.
Fungi	<i>Aspergillus</i> spp.
	<i>Candida</i> spp.
	<i>Candida albicans</i>
	<i>Candida dubliniensis</i>
	<i>Candida glabrata</i>
	<i>Candida lusitana</i>
	<i>Candida lusitana</i>

GENE	RESISTANCE AGAINST
<i>aac(6')aph(2')</i>	Aminoglycoside
<i>ermA</i>	Macrolide/Lincosamide
<i>mecA</i>	Oxacillin
<i>mecC</i> (LGA251)	Oxacillin
<i>vanA</i>	Vancomycin
<i>vanB</i>	Vancomycin
<i>aacA4</i>	Aminoglycoside
<i>ctx-M</i>	3rd generation Cephalosporine
<i>kpc</i>	Carbapenem
<i>imp</i>	Carbapenem
<i>ndm</i>	Carbapenem
<i>oxa-23</i>	Carbapenem
<i>oxa-24/40</i>	Carbapenem
<i>oxa-48</i>	Carbapenem
<i>oxa-58</i>	Carbapenem
<i>vim</i>	Carbapenem

## FilmArray Blood Culture Identification Panel

1 Test. 27 Targets. All in about an hour.



**Gram-Positive Bacteria**

*Enterococcus*  
*Listeria monocytogenes*  
**Staphylococcus**  
*Staphylococcus aureus*  
**Streptococcus**  
*Streptococcus agalactiae*  
*Streptococcus pyogenes*  
*Streptococcus pneumoniae*



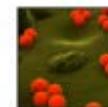
**Gram-Negative Bacteria**

*Acinetobacter baumannii*  
*Haemophilus influenzae*  
*Neisseria meningitidis*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
**Enterobacteriaceae**  
*Enterobacter cloacae* complex  
*Escherichia coli*  
*Klebsiella oxytoca*  
*Klebsiella pneumoniae*  
*Proteus*  
*Serratia marcescens*



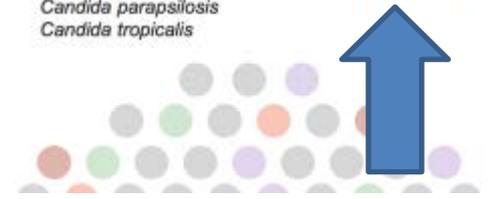
**Yeast**

*Candida albicans*  
*Candida glabrata*  
*Candida krusei*  
*Candida parapsilosis*  
*Candida tropicalis*



**Antibiotic Resistance Genes**

*mecA* - methicillin resistant  
*vanA/B* - vancomycin resistant  
*KPC* - carbapenem resistant



GROUP	PATHOGEN
	Universal Bacteria
Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Coagulase negative staphylococci
	<i>Streptococcus</i> spp.
	<i>Streptococcus agalactiae</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Streptococcus pyogenes</i> / <i>dysgalactiae</i>
	<i>Granulicatella adiacens</i>
	<i>Abiotrophia defectiva</i>
	<i>Enterococcus</i> spp.
	<i>Enterococcus faecalis</i>
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i> spp.
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>koseri</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Klebsiella variicola</i>
	<i>Proteus</i> spp.
Non-fermenting bacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Anaerobic bacteria	<i>Propionibacterium acnes</i>
	<i>Fingoldia magna</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i> group
Fungi	<i>Candida</i> spp.
	<i>Candida albicans</i>
	<i>Candida glabrata</i>
	<i>I. orientalis</i> ( <i>C. krusei</i> )
	<i>Candida tropicalis</i>

GENE	RESISTANCE AGAINST
<i>aac(6)aph(2')</i>	Aminoglycoside
<i>ermA</i>	Macrolide/Lincosamide
<i>ermC</i>	Macrolide/Lincosamide
<i>mecA</i>	Oxacillin
<i>mecC</i> (LGA251)	Oxacillin
<i>vanA</i>	Vancomycin
<i>vanB</i>	Vancomycin
<i>aacA4</i>	Aminoglycoside
<i>ctx-M</i>	3rd generation Cephalosporins
<i>kpc</i>	Carbapenem
<i>imp</i>	Carbapenem
<i>ndm</i>	Carbapenem
<i>oxa-23</i>	Carbapenem
<i>oxa-24/40</i>	Carbapenem
<i>oxa-48</i>	Carbapenem
<i>oxa-58</i>	Carbapenem
<i>vim</i>	Carbapenem

*Hischebeth GT et al.*  
*J Microbiol Methods.* 2016  
 Se/Sp: 66,7 % / 100%



# Détermination des CMI

- **Approche standard: Etest®**
  - Unitaire ou X 4 sur boîte carrée
  - Problèmes: colistine, pipéracilline-tazobactam, tigecycline
- **Plaque BMD (Broth Micro Dilution) « à façon »**
  - pour BLSE/BHRe et *Pseudomonas aeruginosa*
  - Méthode la plus proche de la méthode de référence
  - Problème: fosfomycine, autres molécules



## SENSITITRE CUSTOM PLATE FORMAT

Plate Code: FRAM1GN Date: 21-Dec-16 2011140914

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	FOX	MERO	CZA	C/T	TAZ	AZT	IMI	P/T4	CIP	AMI	COL	COL	ANTIMICROBICS FOX Cefoxitin TRM Temocillin MERO Meropenem CZA Ceftazidime/avibactam ETP Ertapenem C/T Ceftolozane/tazobactam 4 TAZ Ceftazidime AZT Aztreonam IMI Imipenem TGC Tigecycline P/T4 Piperacillin / tazobactam constant 4 SXT Trimethoprim / sulfamethoxazole CIP Ciprofloxacin AMI Amikacin COL Colistin GEN Gentamicin POS Positive Control
	2	0.12	0.5/4	0.5/4	0.5	1	1	2/4	0.25	1	0.25	16	
B	FOX	MERO	CZA	C/T	TAZ	AZT	IMI	P/T4	CIP	AMI	COL	COL	
	4	0.25	1/4	1/4	1	2	2	4/4	0.5	2	0.5	32	
C	FOX	MERO	CZA	C/T	TAZ	AZT	IMI	P/T4	CIP	AMI	COL	GEN	
	8	0.5	2/4	2/4	2	4	4	8/4	1	4	1	1	
D	FOX	MERO	CZA	C/T	TAZ	AZT	IMI	P/T4	CIP	AMI	COL	GEN	
	16	1	4/4	4/4	4	8	8	16/4	2	8	2	2	
E	TRM	MERO	CZA	C/T	TAZ	AZT	IMI	P/T4	CIP	AMI	COL	GEN	
	4	2	8/4	8/4	8	16	16	32/4	4	16	4	4	
F	TRM	MERO	CZA	C/T	TAZ	AZT	IMI	P/T4	CIP	AMI	COL	GEN	
	8	4	16/4	16/4	16	32	32	64/4	8	32	8	8	
G	TRM	MERO	CZA	C/T	TAZ	AZT	TGC	TGC	TGC	TGC	TGC	TGC	
	16	8	32/4	32/4	32	64	0.25	0.5	1	2	4	8	
H	TRM	MERO	ETP	ETP	ETP	ETP	ETP	SXT	SXT	SXT	SXT	POS	
	32	16	0.06	0.12	0.25	0.5	1	1/19	2/38	4/76	8/152		



Chrome Fichier Modifier Afficher Historique Favoris Personnes Fenêtre Aide

decousser - PubMed - NCBI x EUCAST: Warnings!

www.eucast.org/ast\_of\_bacteria/warnings/

## AST of bacteria

Organization

EUCAST News

Clinical breakpoints

Expert rules and intrinsic resistance

Resistance mechanisms

Guidance documents

Consultations

MIC distributions and ECOFFs

Zone distributions and ECOFFs

### AST of bacteria

- Media preparation
- MIC determination
- Disk diffusion methodology
- Disk diffusion implementation
- Compliance of manufacturers
- Breakpoint tables

## EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures.

The EUCAST disk diffusion development laboratories, a network of laboratories coordinated from the EUCAST development laboratory in Växjö, Sweden, from time to time discover products (disks, media batches, gradient tests or procedures) which are not performing to the expected standard. When this is the case we inform the manufacturer and publish a warning on this page.

We do not systematically test all products so the lack of a warning does not imply that there is no problem with the product in question.

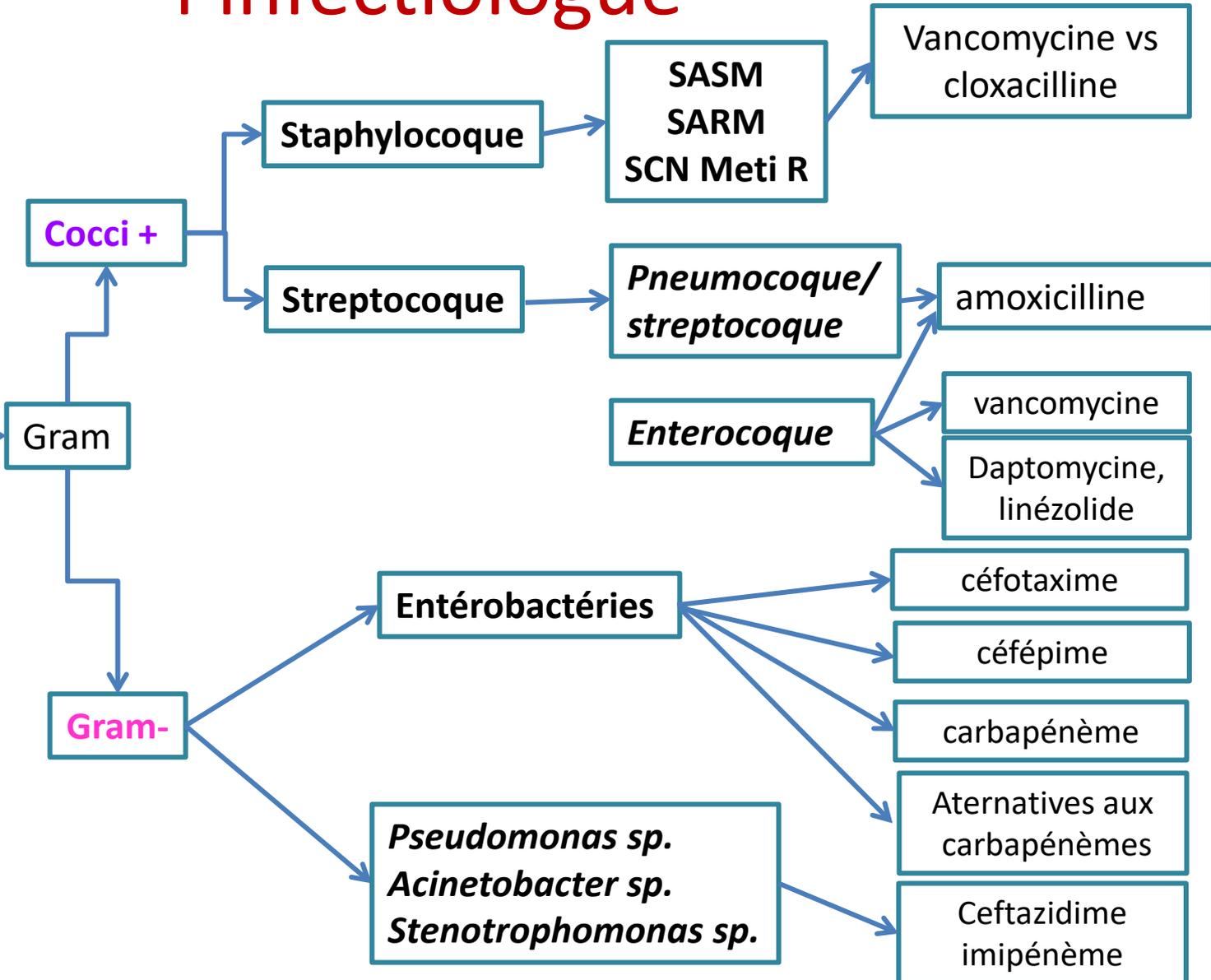
Laboratories which experience problems with a susceptibility test method, and suspect that this may be related to a particular product, may contact EUCAST for advice.

... Warnings!

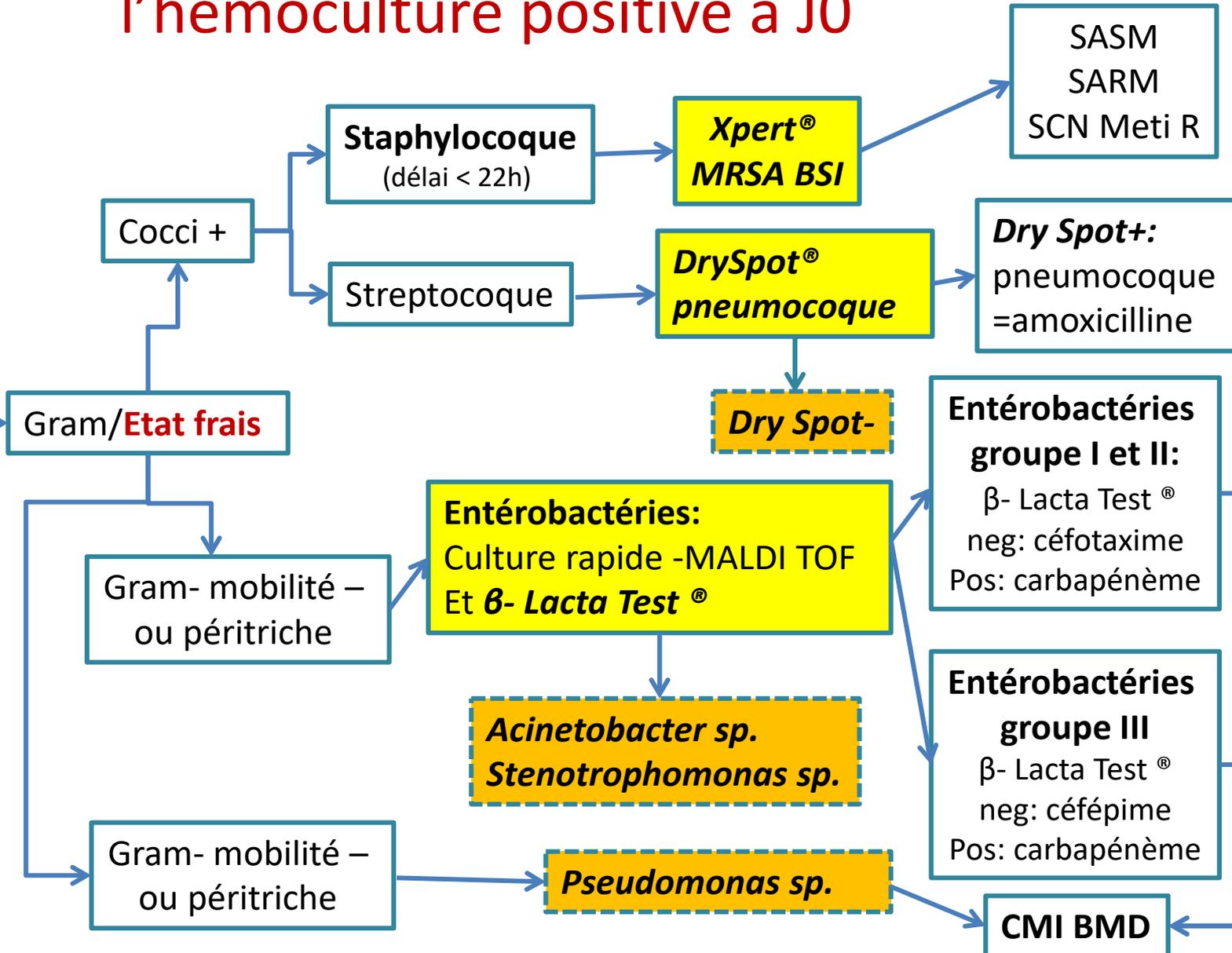
- Problems with piperacillin-tazobactam gradient tests from two manufacturers** - the warning issued 2015 will be removed when problem is resolved.
- Wide variation in disk quality in 16 disks from nine manufacturers** - the warning issued in 2015 and reiterated 2016 will be removed when issue is resolved.
- Problems with colistin gradient tests from both bioMérieux and Liofilchem** - the warning initially issued July 2016 was finalised 28 November, 2016.



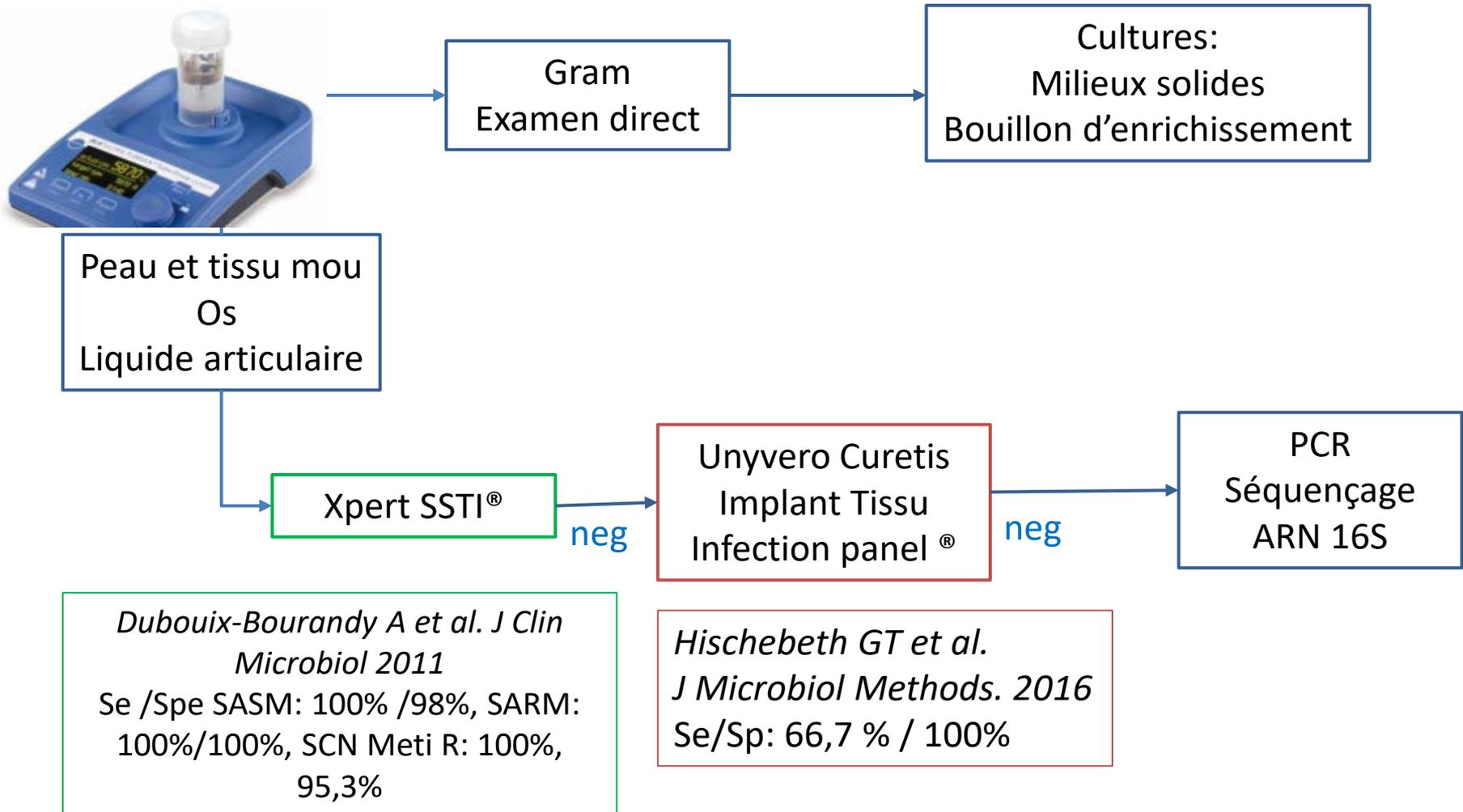
# L'hémoculture positive à J0 pour l'infectiologue



# Réponse bactériologiste: Approche optimisée de l'hémoculture positive à J0



# Situation 2: infection peau- tissu mou/ostéo- articulaire



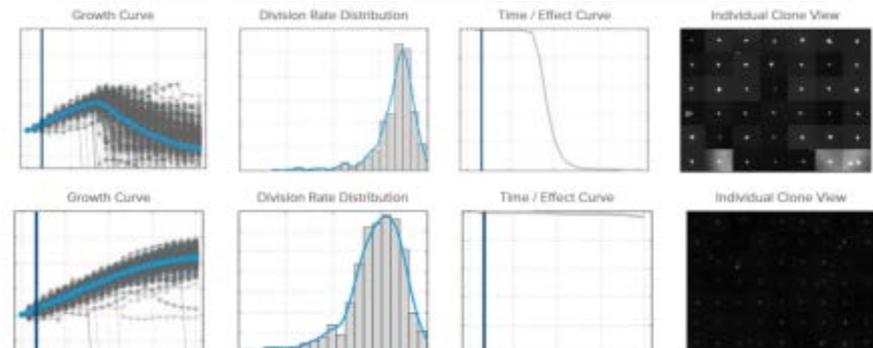
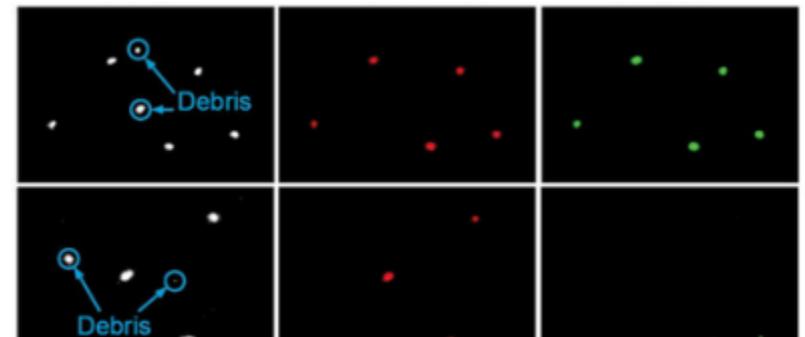
# Perspectives

- **Réorganisation du laboratoire:**
  - Hémocultures « sorties » la nuit
    - Repiquage pour identification rapide
    - Gram?
    - Antibiogramme?
- « accélérer » l'identification et l'antibiogramme: **approche Accelerate<sup>®</sup>**
- **Séquence de nouvelle génération (NGS) sur prélèvements: métagénomique « shotgun »**
  - Techniquement en place
  - Délai
  - interprétation

# ACCELERATE pheno™



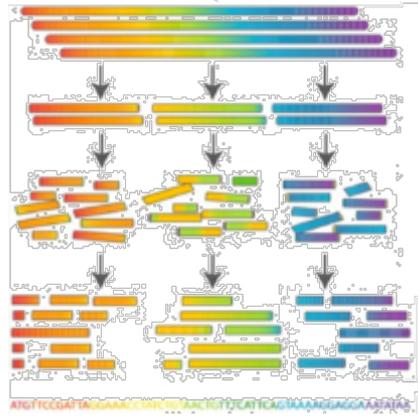
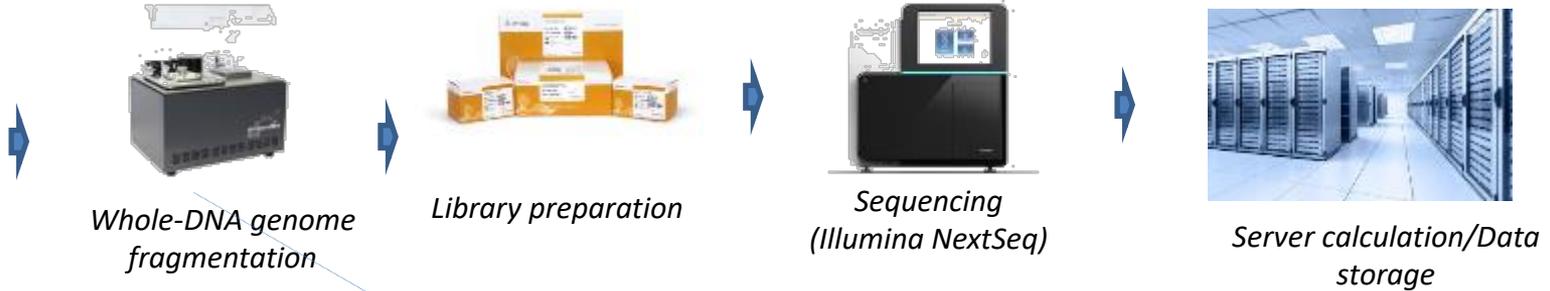
- « Test de sensibilité phénotypique rapide »
- Système permettant :
  - Directement à partir du flacon d'hémoculture
  - Identification bactérienne en ~1h30 (sondes FISH)
  - Sensibilité à un panel d'antibiotiques basée sur des CMI en ~5h30 par **analyse morphocinétique** des croissances bactériennes
- = identification et antibiogramme (CMI rendu en S/I/R) en moins de 7h
- Coût ++
- *Pour P. aeruginosa et E. faecium?*
- Validation FDA
- Évaluation en cours



# Métagénomique « shotgun »: le fantôme ultime des infectiologues (et des bactériologistes)?



Automated  
standardized  
pathogen  
genome  
extraction



**MG-RAST**  
metagenomics analysis server

- Séquençage de tous les ADN (ARN) présents
- Soustraction des séquences humaines
- Comparaison des séquences aux banques de génomes publiées / privées
- Identification + présence de gènes de résistances
- Sensibilité +++ et spécificité +++

Courtesy of Christophe Rodriguez



# Discussion



- = « **puzzle** », chaque situation sa solution:
  - À l'encontre des stratégies commerciales de mise à disposition

- Forcément « **rentable** »

Delpont JA et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017

Beganovic M, Costello M, Wierzchowicz SM. J Clin Microbiol. 2017

- Pas forcément les patients les plus graves ou les plus compliqués
- Bien connaître les **performances des tests** utilisés (bactériologistes)
- Bien faire passer ces notions aux infectiologues
- Résister à la pression commerciale (...des panels de PCR)

Delpont JA et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017

Beganovic M, Costello M, Wierzchowicz SM. J Clin Microbiol. 2017



# Conclusions

- **Retour évident sur investissement** pour:
  - Les patients
  - Le laboratoire (bactériologistes / internes /techniciens)
  - Les infectiologues
- Chacun retrouve son « **cœur de métier** »
- **Respect mutuel – compétences spécifiques**
- **Le laboratoire de bactériologie au centre:** oui mais pas que...
  - pharmacie
  - Pharmacologie (dosage antibiotique)
  - EOH – laboratoire d'hygiène: dépistage BMR / BHRé
- **Coûts:** vrai souci **administratif**
- **Continuité** ( samedi, dimanche, nuit...): « **le progrès ne vaut que si il est partagé par tous** »
  - Intérêts des techniques rapides / automatisées
- ***Nous allons y arriver.....***