

Diagnostic Rapide des Bactériémies



Didier Tandé - CHRU Brest
D.Tandé/RCAI 2015

1

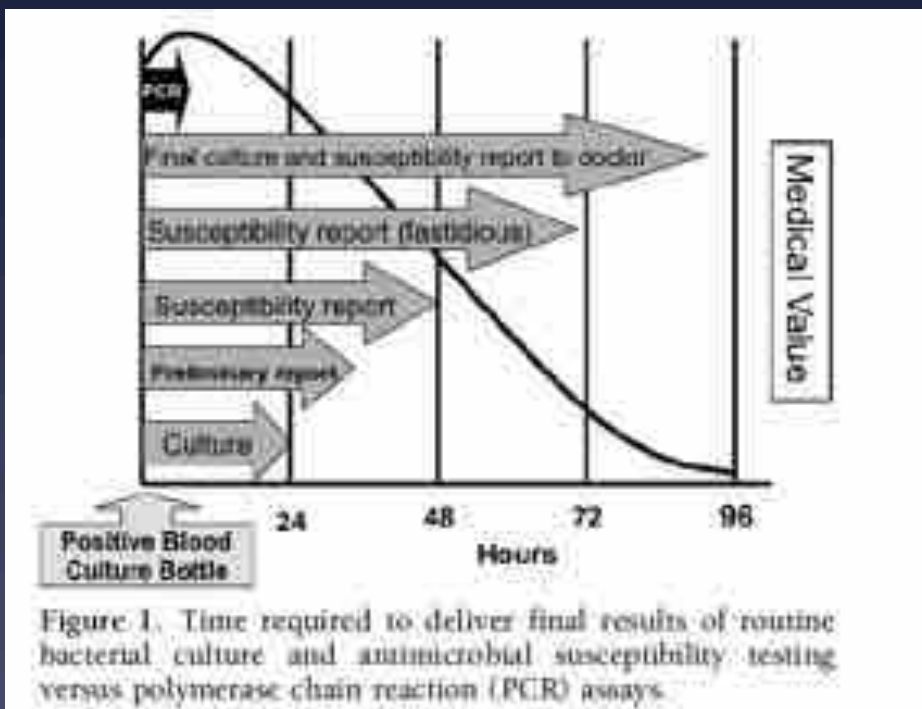
Pourquoi aller vite ?

- Chaque heure est comptée :
 - ✓ Après 6h chaque heure coûte 7,6% de mortalité en plus (Kumar)
- Meilleur pronostic si antibiothérapie adaptée rapidement (Ibrahim, Kollef)
- **Meilleure gestion** des antibiotiques à large spectre
- Avec l'augmentation des résistances :
 - les choix deviennent plus difficiles
 - Délais d'adaptation allongés
 - Coûts augmentés
- **Durées de séjours et coûts diminués**

Le classique

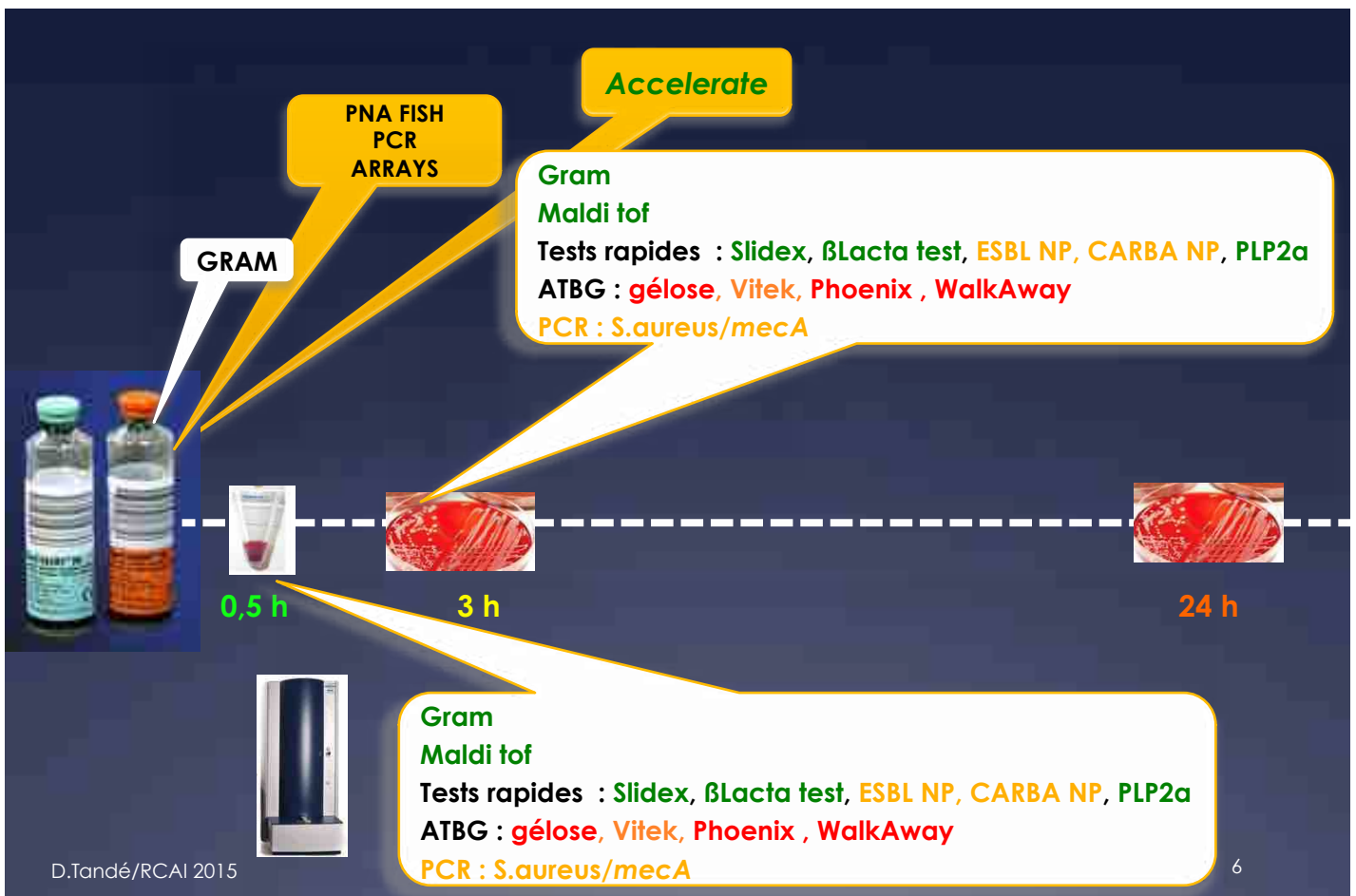
- L'hémoculture est toujours "le Gold standard" ???
- Détection jusqu'à 1 CFU / pour 10 ml de sang
- Charge bactérienne : 1 à 30 CFU /ml et ≥ 100 pour les enfants
- **Délai de positivation : 15 h (2,6 – 127 h)**
- **Délai de rendu de résultat : 48 à 72 h**
- Mais fonction de :
 - ✓ ATBpie préalable
 - ✓ Difficulté pour les pathogènes de pousse lente ou fastidieuse
 - ✓ Volumes trop bas dans plus de 50% des cas

👉 Fournir des résultats dans un délai qui peut avoir un impact sur la prise en charge



Les solutions

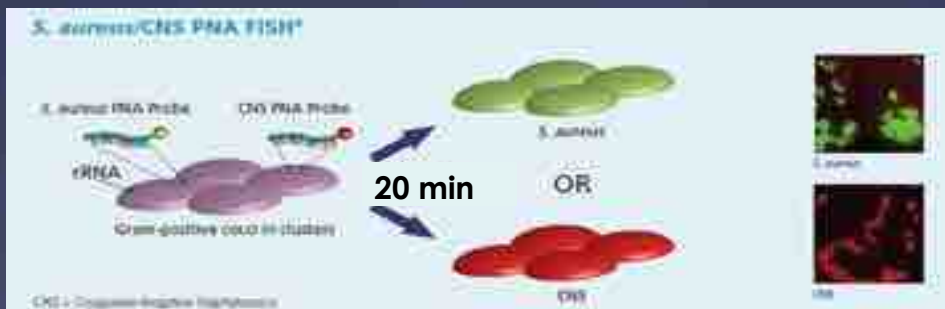
- Diagnostic sur flacons d'hémoculture positif
 - ✓ Technique biochimique et immunologique
 - ✓ Spectrométrie de masse
 - ✓ Biologie moléculaire
- Diagnostic directement sur le sang total
 - ✓ Biologie moléculaire



PNA FISH ou Quick FISH (AdvanDx)

Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization

- Hybridation avec sondes fluorescentes
- 20 minutes de délai
- 5 minutes de temps technicien
- Fait après un gram et rendu dans le même moment
- Se de 97 à 100% et Sp de 90 à 100%



Deck JCM 2012 ; Stone JCM 2013 ; Deck Diagn Microbiol Infect Dis 2014 ; Martinez JCM 2014

PNA FISH (AdvanDx)

Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization

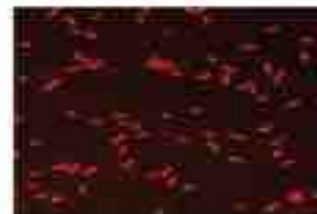
GNR+



E. coli



K. pneumoniae



P. aeruginosa

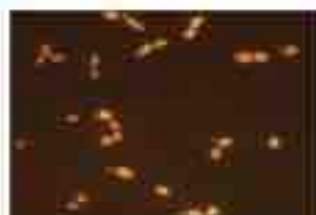


Mixed

Yeast+



C. albicans



C. parapsilosis



C. glabrata



Mixed

PNA FISH ou Quick FISH (AdvanDx)

- * **Forrest, JAC 2006 : Impact sur la gestion des bactériémie à SCN**
 - * PNA FISH Staph + ASP vs méthode conventionnelle
 - * **Diminution de la durée de séjour** de 6 à 4 jours (p<0,05)
 - * **Diminution du coût** d'environ 4000 \$ par patient
- * **Forrest, JCM 2006 : Impact sur la consommation d'antifongique**
 - * PNA FISH Candida + ASP vs comparaison historique 2003 vs 2004
 - * Résultat identification de C.albicans plus rapide : 9,5 h vs 44 h (p<0,001)
 - * Diminution de la consommation de Caspofungine en DDD de 8,7 à 3,2
 - * **Économie de 1700\$ par patient** (réactifs inclus)
- * **Ly, Ther Clin Risk Manag 2008 : Impact sur la prise en charge des Staphylocoques**
 - * Étude randomisée et en aveugle
 - * PNA FISH Staph ± ASP (communication des résultats dans les 3 heures)
 - * **Diminution de la mortalité** : 16,8 vs 7,9% (p<0,05)
 - * **Diminution des ATB** chez les patients avec SCN : - 2,5 jours (p<0,01)

PCR multiplex

➤ Tests de détection des SARM /SASM / SCN

➤ PCR temps réel, automatisées

	temps	S.aureus Se / Sp	MecA Se / Sp
GeneXpert MRSA/SA BC (Cepheid) :	1h	100% / 98,6%	98,3% / 99,4%
BD GeneOhm StaphSR (Becton Dickinson) :	2h	> 99%	96 à 100% / 95 à 98%

➤ Rapide, Efficace et ... pas très bon marché !

➤ Et les PCR maisons ...

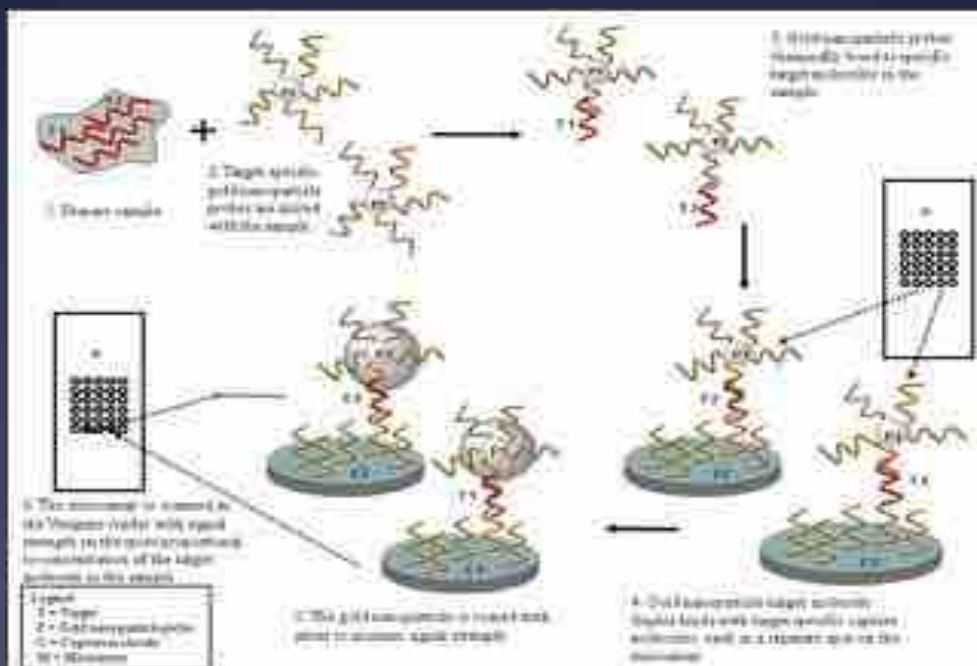
L'exemple d'une PCR staphylocoque

Frye JCM 2011 :

- PCR Staph SR (Becton Dickinson) vs identification par culture
- Pas de programme d'intervention
- **2 fois par jour** en semaine et **1 fois par jour** le WE
- Réduction de délai de l'identification : 13,2 h ($p < 0,0001$)
- **Mais pas de résultat en terme de qualité de l'antibiothérapie**
- Impact possible
 - ✓ sur le délai d'une ATBpie adaptée pour les SASM
 - ✓ Sur la suspension de la Vanco sur les SASM et les SCN contaminants

Verigene (Nanosphere)

Extraction / Amplification / Hybridation



Verigene

Verigene® Gram-positive assay

* **9 espèces, 4 genres et 3 gènes de résistance :**

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*

Streptococcus anginosus group, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*,

Enterococcus faecalis, *Enterococcus faecium*

Staphylococcus spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Listeria* spp.,

mecA , vanA and vanB

Verigene® Gram-negative assay

* **5 espèces, 4 genres et 6 gènes de résistance :**

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*

Acinetobacter spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp.

CTX-M, IMP, KPC, NDM, OXA, VIM

Verigene

- **Gram nécessaire**
- **Couverture de 82 à 95% des microorganismes des hémocultures**
- **Concordance avec les techniques classiques :**
 - ✓ **92 - 98%** pour les gram positifs
 - ✓ **90 - 98%** pour les gram négatifs
- **Agrément FDA 2013**
- **Technique en 2,5 heures**
- **5 à 10 minutes de travail technicien**

Verigene

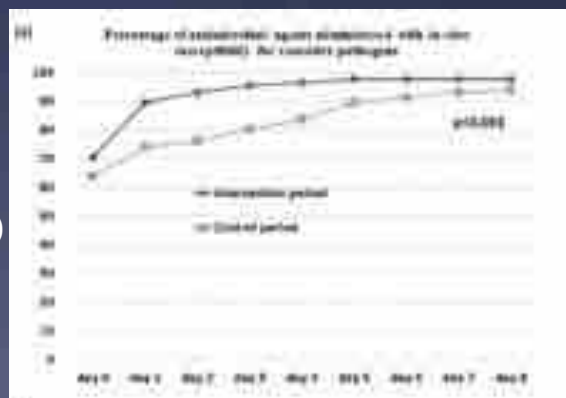
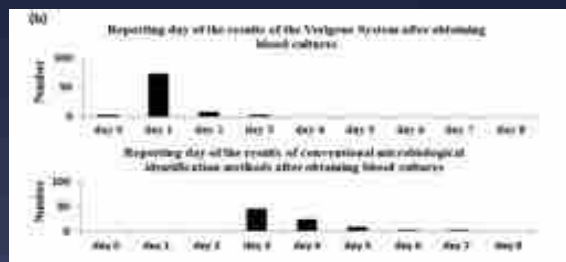
Ledeboer JCM 2015

- Étude dans 13 Centres US
- 1847 hémocultures sur 3 automates différents
- Identification : **NPA = 99,7% et PPA = 97,9%**
 - ✓ Les manques : *K.variicola*, *Pseudomonas hors pyo*, *Serratia*, *S.maltophilia*, *Neisseria*, *Haemophilus*
- Gènes de résistance : **NPA = 99,9% et PPA = 98,3%**
 - ✓ Ratés : 2 NDM / 53 et 2 CTX-M / 183
- 48 hémocultures polymicrobiennes :
 - ✓ Avec 2 bactéries appartenant au panel : 21 / 22 au moins 1 et 12 / 22 les 2
 - ✓ Avec 2 bactéries dont 1 appartenant au panel : 13 / 13



- * Etude prospective au Japon (Suzuki 2015)
- * Tous les patients avec hémoc positives sauf :
 - * multi microbiennes
 - * Contamination évidentes
 - * Bacilles gram positif au gram
 - * Gram difficile à interpréter
 - * Hémoculture redondante
 - * Patient mort ou mourant
- * Travaillé du Lundi au Dimanche avec intervention de l'infectiologue
- * 147 cas en phase 1 (conventionnelle) en rétrospectif et 92 en phase 2 (Verigene) en prospectif
- * pas ou peu de différences significatives entre les phases (patients , épidémiologie)

- 96 % de bonnes identifications avec Verigene
- Délai incubation – résultat = 21 h
- Délai antibiothérapie efficace plus court ($p < 0,001$)
- 90% traités efficacement le 1^{er} jour
- Coûts réduits vs phase 1 : 8505 vs 3618 yens ($p < 0,001$)
- Mortalité à J30 réduite : 3 vs 13% ($p < 0,019$)



Biofire Film Array (bioMérieux)

Enterococcus spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *S. aureus*,
Streptococcus spp., *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*,

Acinetobacter baumannii, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*,
P. aeruginosa, *Enterobacteriaceae*, *Enterobacter cloacae* complex, *E. coli*,
K. oxytoca, *K. pneumoniae*, *Proteus* spp., *S. marcescens*,

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

mecA, vanA/B KPC

Biofire Film Array (bioMérieux)

➤ Multi PCR

➤ Automate

➤ Travail technicien : 5 min

➤ Délai de résultat : 65 min

➤ Au coup par coup ...

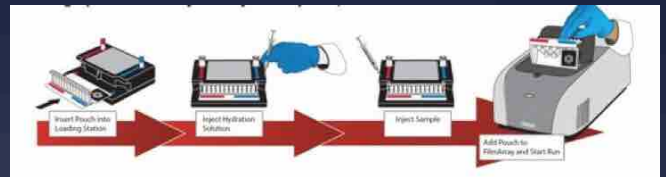
➤ Performances :

✓ Southern TR, 2015 : Se = 75,6% (94,6 %)

✓ Blaschke AJ, 2012 : Se = 91%

✓ Altun O, 2013 : Se = 91,6

✓ Rand KH, 2014 : Se = 88,1% (99%)



Biofire Film Array (bioMérieux)

➤ Mais échec décrits dans toutes ces études

➤ Certains SCN ne sont pas détectés : *S. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. auricularis*, *S. carnosus*, *S. lentus*, *S. pettenkoferi*, *S. pseudointermedius*

➤ Manque de sensibilité pour : *S. capitis*, *S. pasteurii*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*

➤ Attention au patients sous atb

➤ Attention aux hémocultures polymicrobiennes

➤ Ne différencie pas *E. faecium* de *E. faecalis*

N'y a t'il donc que la biomol ?

La spectrométrie de Masse



Utilisation normale

- Repiquage des hémocultures
- Incubation 18 heures
- Maldi sur les colonies

C'est déjà du temps de gagner

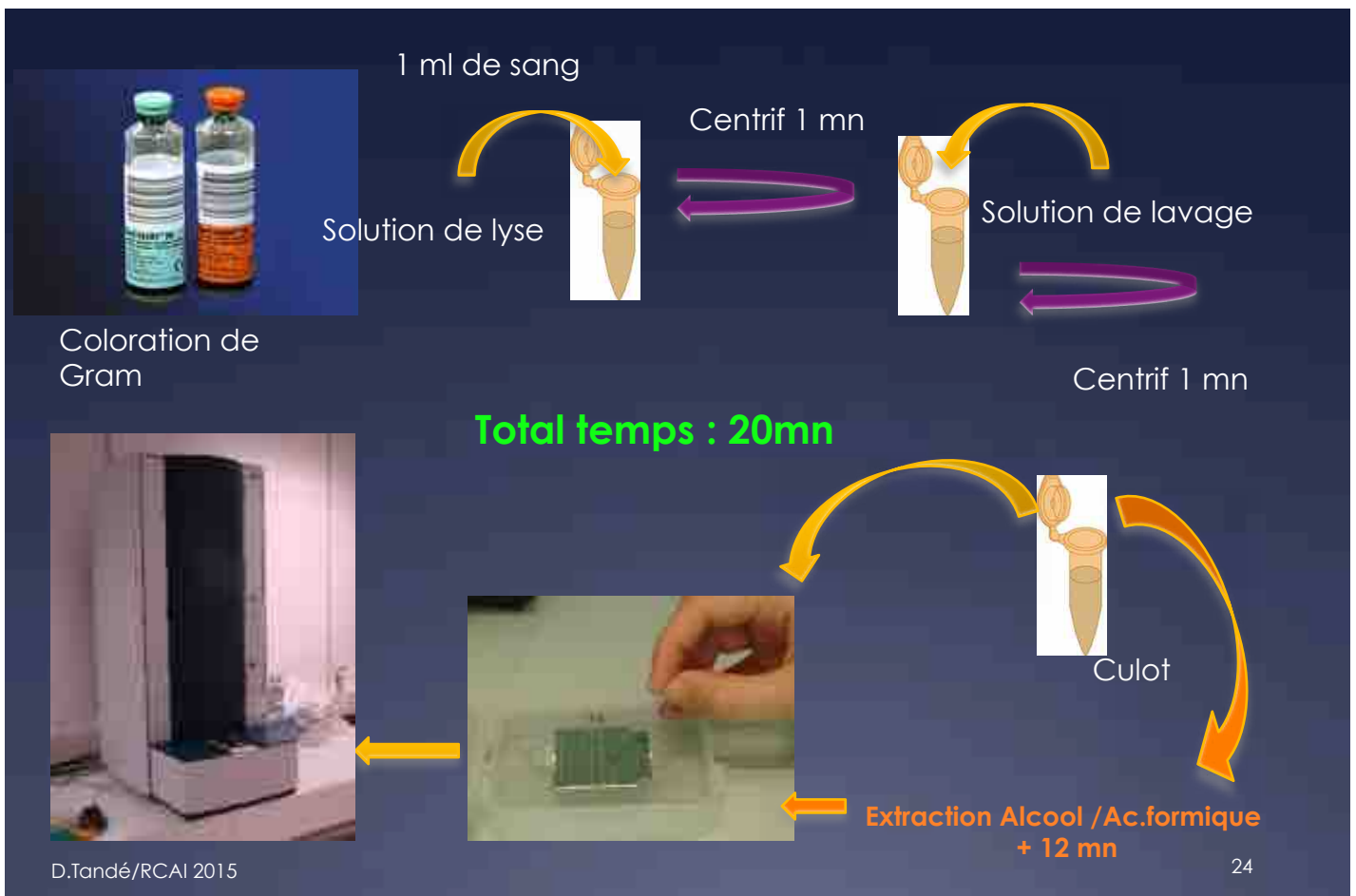


La spectro directement sur le flacon

	Moussaoui	Klein	Brest	March-Rossello	Chen
	Gel séparateur	lyse centrifugation	Lyse centrifugation	centrif différentielle	pousse précoce
		SepsiTyper/Amust	saponine, SDS, Tween	séparation à faible vitesse	3 heures
Volume	2 / 1,5 ml	1 ml	1 ml	5 ml	3ml
Centrif nbre	3	2	2	3	1
Centrif mn	12	2	2	40	5
Identification	culot	culot	culot	culot	culot
Extraction	Alcool / Acide formique : 2 ou 3 centrifugations et séchage ≈ 12 mn				ensemencement gélose chocolat
Identification	sur le Sumageant				de 2 à 4 heures "colonies farinées"

D.Tandé/RCAI 2015

23



D.Tandé/RCAI 2015

24

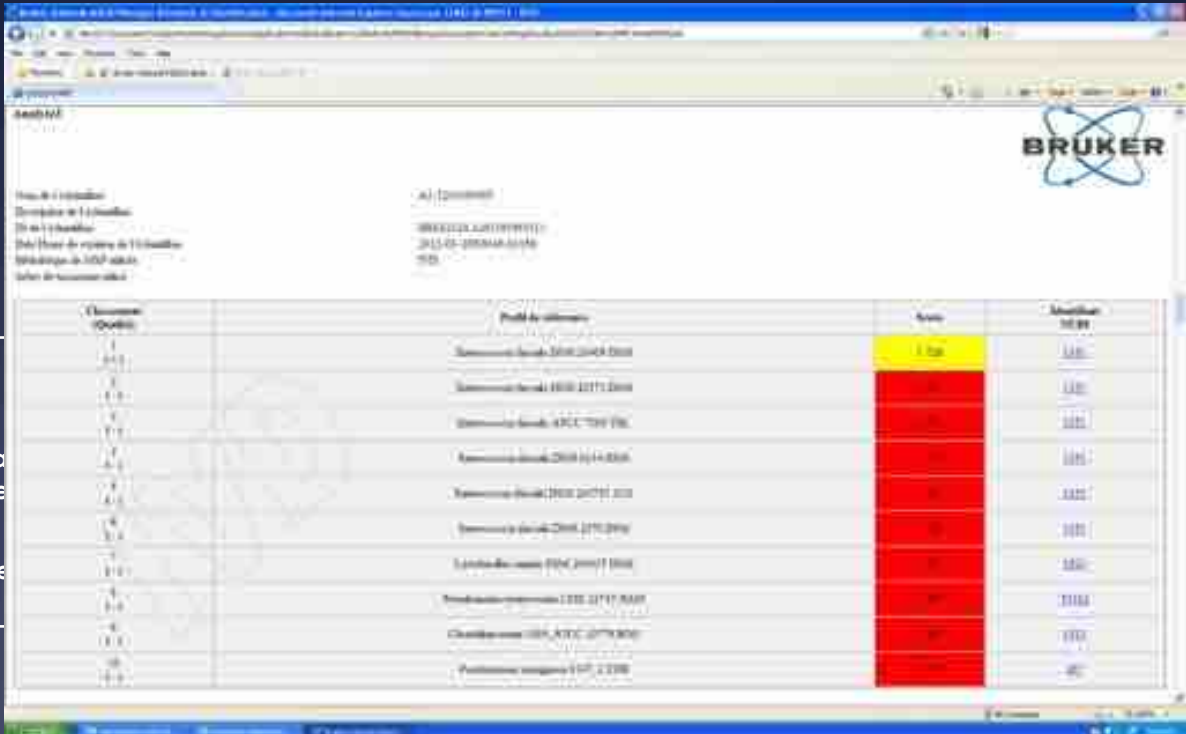
La spectro directement sur le flacon

différents auteurs : différents scoring !

	March-Rossello	Moussaoui	Schubert	La Scola	La Scola
	Eur J Clin Microbiol infect Dis	CMI	J Mol Diagn	Plos One	Plos One
dépôts	4	2	1	4	4
Propositions identiques	≥ 2 dépôts	≥ 4 ^{ème} ID	≥ 3 ^{ème} ID	2 dépôt/4	4 dépôts/4
Top score	≥ 1,4	≥ 1,4	≥ 1,5	≥ 1,9	≥ 1,2

les 4 mêmes résultats

La spectro directement sur le flacon



Classement (Score)	Profil de référence	Score	Identification
1	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,9	Staphylococcus aureus
2	Staphylococcus aureus (ATCC 12228) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
3	Staphylococcus aureus (ATCC 25922) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
4	Staphylococcus aureus (ATCC 10541) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
5	Staphylococcus aureus (ATCC 27922) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
6	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
7	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
8	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
9	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
10	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
11	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
12	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
13	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
14	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
15	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
16	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
17	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
18	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
19	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus
20	Staphylococcus aureus (ATCC 29214) (100)	1,8	Staphylococcus aureus

La spectro directement sur le flacon

différents auteurs : différents scoring !

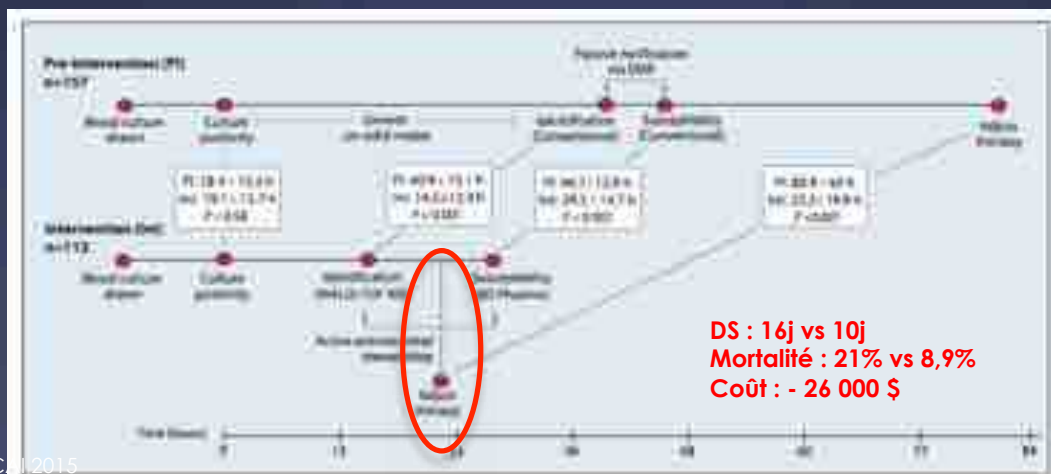
	March-Rossello	Moussaoui	Schubert	La Scola	La Scola
	Eur J Clin Microbiol Infect Dis	CMI	J Mol Diagn	Plos One	Plos One
dépôts	4	2	1	4	4
Identifications identiques	≥ 2	≥ 4	≥ 3	2 dépôt/4	4 dépôts/4
Top score	≥ 1,4	≥ 1,4	≥ 1,5	≥ 1,9	≥ 1,2
GP	98,4%	89%	79%	67%	
GN	97,3%	91%		88%	

D.Tandé/RCAI 2015

27

La spectro directement sur le flacon ... mais pas seulement !

- Houston CH de 1000 lits (Perez, J Infect 2014)
- Bactériémies à GN BMR
- **Identification et antibiogramme classique (157 pts) vs Maldi tof et ATBG sur le flacon (112pts)**
SANS programme intervention vs AVEC programme d'intervention



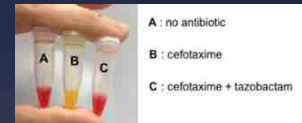
D.Tandé/RCAI 2015

28

À parti du culot ...

➤ Recherche de BLSE : test ESBL NDP

- ✓ *Dortet 2015* : <http://dx.doi.org/10.3201/eid2103.141277>
- ✓ Incubation de **15 mn** et virage au jaune
- ✓ **Se, Sp, VPN et VPP : 100%**



➤ Recherche de Résistance aux C3G : β Lacta test (BioRad)

- ✓ *Prod'hom, New Microbe and New infect 2015*
- ✓ Incubation **30 mn** et virage rouge / orangé
- ✓ **Se : 75%** (5 AmpC négative) , **VPP : 100%** et **VPN : 96,8%**

➤ Recherche de Carbapénèmase : CARBA NP

- ✓ 3h d'incubation en bouillon avec Imi + ZnSO4 puis test

À parti du culot ...

➤ Recherche des *S.aureus* et du *MecA* :

- ✓ **Immunochromatographie** : Héraud, Ann Lab Med 2015;35:454-457
 - ❖ **Binax Now *S. aureus*** : **Se = 94%** et **Sp = 87%**
 - ❖ **Binax Now *S. aureus* PBP2a** : **Se = 100%** et **Sp = 100%**
- ✓ **PCR** : Clerc CMI 2014;20:355-360
 - ❖ **GeneXpert MRSA/SA BC assay** : **Se = 99%** et **Sp = 100%**



➤ Antibiogramme classique

➤ Antibiogramme en milieu liquide

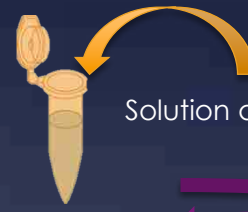
À parti du culot ...



1 ml de sang
+
Solution de lyse



Centrif 1 mn



Solution de lavage

Centrif 1 mn



Surnageant éliminé

Ajout de l'antibiotique



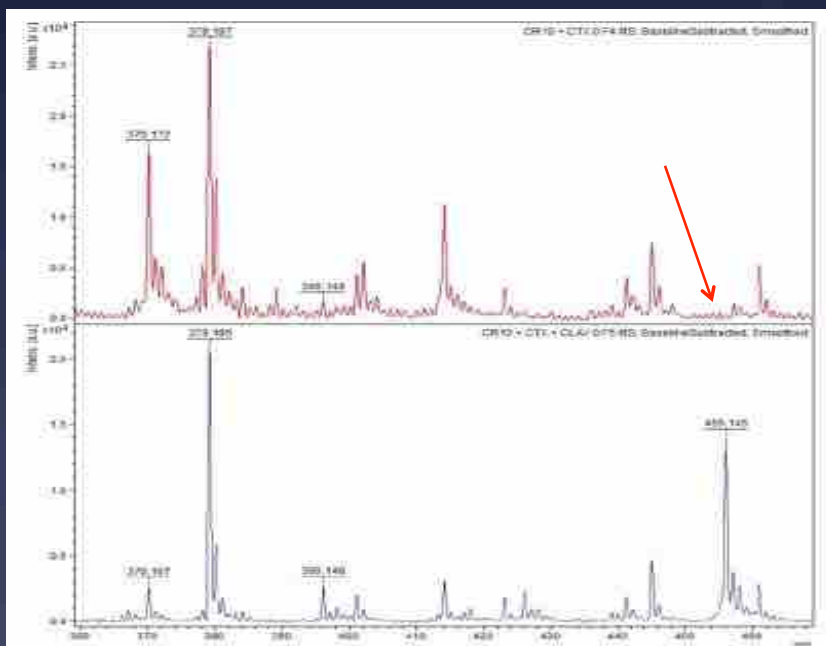
Surnageant

Incubation

Centrif 1 mn

Détection des BLSE

E.coli et *K.pneumoniae*



69 ESBL -

127 ESBL+ :

102 CTX-M

25 Non CTX-M

Ratio $I_{370}/(I_{370}+I_{456}) \geq 0,342$ (courbe ROC)

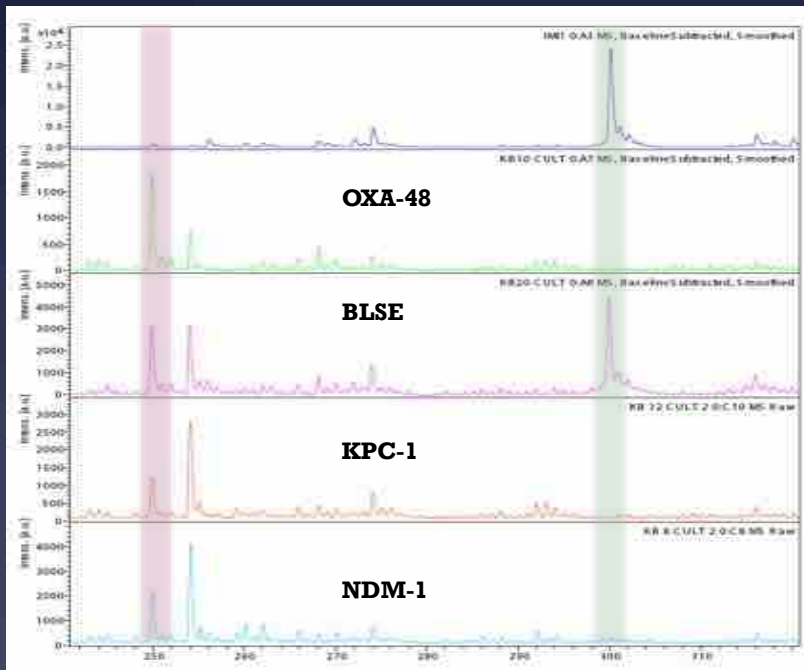
Se = 90,5%

Sp = 96%

Si on ne garde que les CTX-M

Se = 98%

Détection des carbapénémases



55 Carb -

117 CARB+ :

30 classe A

47 classe B

40 classe D

Ratio $I_{254}/(I_{254}+I_{300}) \geq 0,759$ (courbe ROC)

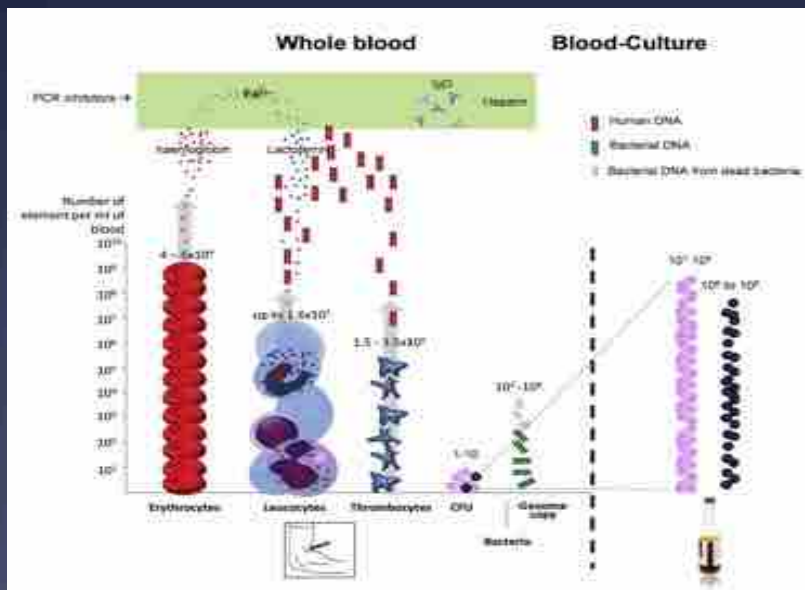
Se = 95%

Sp = 85,5%

FP : 5 AmpC HP et 3 BLSE

FN : 4 VIM 1 OXA2-244 et 1 OXA-181

À Partir du sang total ...



À Partir du sang total ...

- PCR spécifiques d'espèces : *Whipple*; *Bartonella*, *Coxiella*
- Détection multiples :

Méta analyse (Chang, PlosOne 2014)
(Dark, Intensive Care Med 2015)
Bonne spécificité
Sensibilité moyenne et variable

TABLE 1. Main commercially available systems for identification of microbes directly from blood samples

System	Method	Time to result (hours)	Blood volume (mL)	Microorganism coverage	Resistance and virulence markers	Sensitivity, specificity, and correlation with conventional methods (%)	Comments	Ref.
SepiFast Poleyn, Bremen, Germany	Broad-range PCR + sequencing	8 & 12 h	1-10 ²	>145 bacteria (Gram positive and Gram negative) and fungi	0	21-87, 81-91, NR	Proc can be used in other sterile samples. Cons: variable sensitivity and specificity	(13,36,38-41)
SepiFast Ruche Molecular System, Basel, Switzerland	Multiplex broad-range real-time PCR	3.5-5	1-3	6 Gram positive, 8 Gram negative, 3 fungi	mevA [*]	43-95, 60-100, 40-83	Proc time to result. Cons: variable sensitivity and specificity, no quantification	(15-17,74)
FluorPlex Seegene, Seoul, Korea	Multiplex PCR + multiplex real-time PCR	3-5	1	21 bacteria (Gram positive and Gram negative) at species level (90 at genus level), 8 fungi	mevA, virA/B	17-65, 77-92, 73	Proc fast. Cons: limited number of studies, succession of reaction and errors, no identification	(3,35)
VITEK BDS Lab, Jena, Germany	Multiplex PCR + electrophoresis	8	3	14 Gram positive, 18 Gram negative, 7 fungi	0	NR, NR, 70	Proc highly sensitive. Cons: limited number of studies, several manual steps	(9,41,75)
PLEX-ID, Alere Molecular, Carlsbad, CA, USA	Multiplex broad-range & PCR/ES-MS	3	1.25-5 [†]	Up to 900 (Gram positive, Gram negative, fungi)	mevA, virA/B, sepAB	32-91 [‡] , 88-99, 79-87 [‡]	Proc universal detection of mixed bacterial populations, semi-quantitative. Cons: no seroconversional studies	(1,76,77)

ES-MS, electrospray ionization mass spectrometry.
^{*}With an additional test.
[†]With an additional test for patient with positive detection of *Staphylococcus aureus*.
[‡]For the latest version.
[§]Depending on the sample volume (1.25 versus 5).

Nombreuses manipulations

À Partir du sang total ...

Avantages

- Indépendant de la culture
 - gain de temps
 - organismes non cultivables
- Indépendant d'une antibiothérapie
- Un instantané de la bactériémie
- Limite de détection basse
 - Attention faibles volumes d'échantillon !
- PCR quantitative :
 - différencie les contaminations ?
 - Idée de la sévérité ?
 - Suivi de l'évolution ?

Inconvénients

- Trop sensible : Faux positifs ?
 - DNA environnement
 - contaminants des réactifs
 - DNA circulants de bactéries mortes
 - DNA après guérison
- Lourdeur de mise en œuvre
- Ne remplace pas la culture
- à intégrer dans le work flow
- Le prix

Est ce que cela va servir ?

Pas à grand chose si pas de programme de prise en charge par les infectiologues ...

Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction–Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing

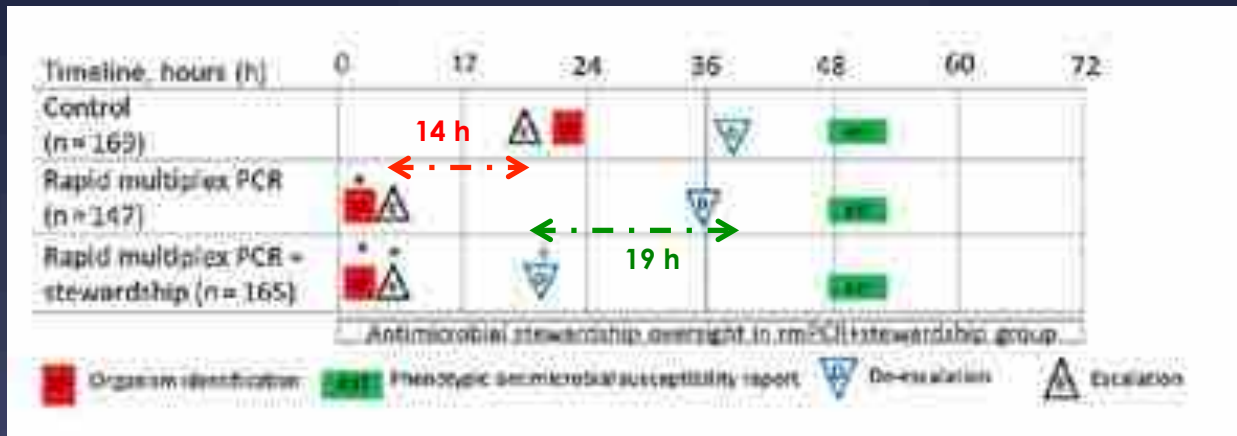
Ritu Banerjee,^{1*} Christine B. Teng,^{2,*} Scott A. Cunningham,² Sherry M. Ihde,² James M. Steckelberg,⁴ James P. Moriarty,⁵ Nilay D. Shah,⁶ Jayawant N. Mandrekar,⁶ and Robin Patel^{1,4}

Clinical Infectious Diseases® 2015;61(7):1071–80

- Étude prospective, randomisée et contrôlée : 743 patient en 3 groupes
- 617 inclus
- Processus normal : 207 pt FA BCID : 198 pt FA BCID + ASP : 212 pt
- **Equipe Infectiologie disponible 24/24 ...**
- 81% de microorganismes présents dans le panel
- parmi les 410 patients avec FA BCID et Culture classique discordants (3,2%)
 - Hémocultures multimicrobiennes (6)
 - Résistances non détectées (4)
 - **Discordance vraie (3)**

Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction–Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing

Ritu Banerjee,^{1*} Christine B. Teng,^{2,*} Scott A. Cunningham,² Sherry M. Ihde,² James M. Steckelberg,⁴ James P. Moriarty,⁵ Nilay D. Shah,⁶ Jayawant N. Mandrekar,⁶ and Robin Patel^{1,4}



- Diminution des ATB non nécessaires (conta non traitées ou moins de 24 h)
- Diminution des ATB Large Spectre : Tazo, Vanco
- Diminution du délai d'adaptation : **escalade** et **désescalade**
- Pas de différence mortalité et coûts

D.Tandé/RCAI 2015

39

À méditer ...

we are more adept at validating the analytical performance of new tests than we are at establishing their clinical utility and cost effectiveness...

Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2015) 34:2149–2160
DOI 10.1007/s10996-015-2460-y



REVIEW

Rapid molecular diagnostic tests in patients with bacteremia: evaluation of their impact on decision making and clinical outcomes

K. Z. Vardakas^{1,2} · F. I. Anifantaki¹ · K. K. Trigkidis¹ · M. E. Falagas^{1,2,3}

D.Tandé/RCAI 2015

40

Merçi

Brest 2016