

Optimiser la prise en charge avec des outils de diagnostic rapide

Journée inter-réseaux du CCLIN Sud-Ouest

Olivier Barraud

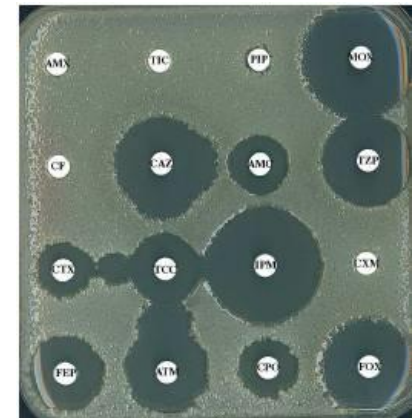
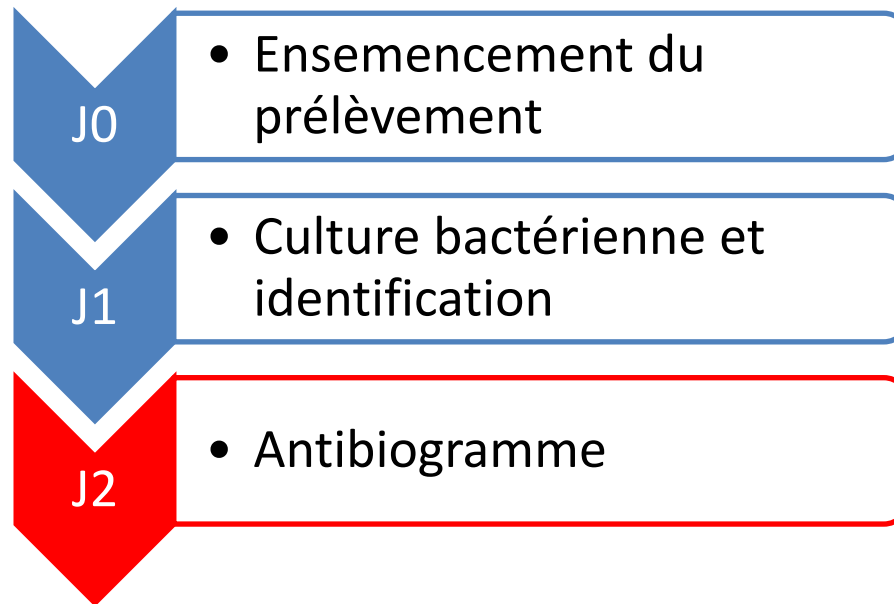
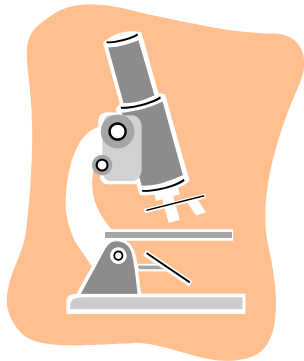
Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges

Faculté de Médecine, Université Limoges

UMR Inserm 1092

Le constat

- **Techniques conventionnelles de bactériologie**
 - Basées sur la culture bactérienne
 - 24 h au mieux pour obtenir l'identification du pathogène
 - 36-48 h au mieux pour obtenir un antibiogramme



« Outils de diagnostic rapide »?

- « Quelle rapidité » ?
 - À partir du prélèvement (J0) *Gram, antigénurie légionelle...*
 - À partir des colonies bactériennes (J1) *milieux chromogènes, MALDI-TOF...*
- « Quel(s) type(s) de diagnostic(s) ? »
 - Identification d'un agent pathogène *grippe, S. aureus...*
 - Recherche d'une résistance aux antibiotiques *vanA, OXA-48...*
- « Quel(s) type(s) de test ? »
 - Tests phénotypiques / tests génotypiques *tests d'agglutination, (q)PCR...*
 - Tests simplex / tests multiplex *approches ciblées, approches syndromiques...*
- Dans quel contexte ? Pour qui ?
 - Diagnostic clinique *infection respiratoire, digestive, méningée...*
 - Dépistage, prévention *dépistage nasal de S. aureus, recherche de BMR...*

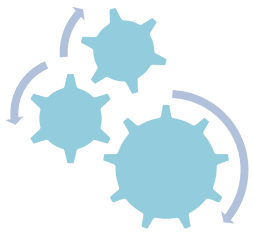


Choix éditorial

Outils de diagnostic rapide
ET résistance aux antibiotiques

Outils de diagnostic rapide
ET approches syndromiques

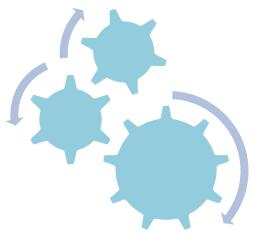
Outils de diagnostic rapide ET résistance aux antibiotiques



Les objectifs

Résistance
aux
antibiotiques

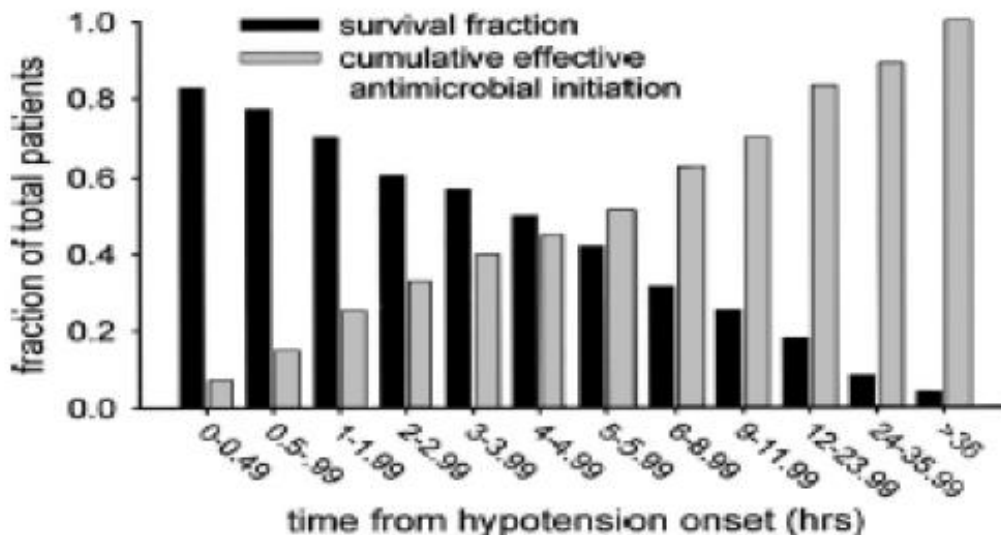
- **Diagnostic dans le cadre d'une infection**
 - Identifier à partir d'un prélèvement ou d'un germe la résistance éventuelle (ou la sensibilité...) d'un germe responsable d'une infection
- **Diagnostic dans le cadre d'un dépistage**
 - Identifier les patients porteurs sains de certains germes (BMR, BHRe) dans un contexte de prévention, à titre individuel ou à titre collectif



Les objectifs

Résistance
aux
antibiotiques

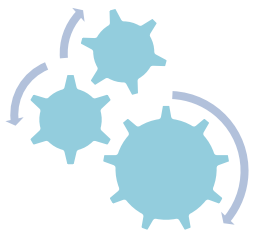
- **Intérêt à titre individuel**
 - instauration d'une antibiothérapie précoce et adaptée
 - situations d'urgence +++



Choc septique

- Lien fort entre retard d'une antibiothérapie adaptée et décès du patient
- ATB adaptée dans la 1^{ère} heure d'une hypotension : 80 % de survie
- Chaque heure sans ATBthérapie adaptée = ↘ 7,6 % de la probabilité de survie

Kumar, Critical Care Medicine, 2006



Les objectifs

Résistance
aux
antibiotiques

- **Intérêts à titre collectif**

- **éviter une surconsommation des antibiotiques**

Préserver les ATB à large spectre, « bon usage des ATB »

⇒ Moindre pression de sélection antibiotique

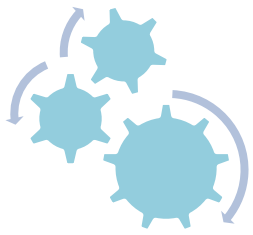
LES
ANTIBIOTIQUES
UTILISÉS À TORT
ILS DEVIENDRONT
MOINS FORTS

- **dépister les patients porteurs de BMR, BHRe (épidémie ++)**

Limiter la diffusion de la résistance

⇒ Instauration rapide des mesures d'hygiène adaptées





Les outils à disposition

Résistance
aux
antibiotiques

- Outils **phénotypiques** :

= détection directe ou indirecte de **protéine(s)** impliquée(s) dans la résistance



Résistance exprimée
Facilement applicable à J1



Détection difficile à J0

- Outils **génotypiques** :

= détection de **gène(s)** impliqués dans la résistance (mutation / acquisition)

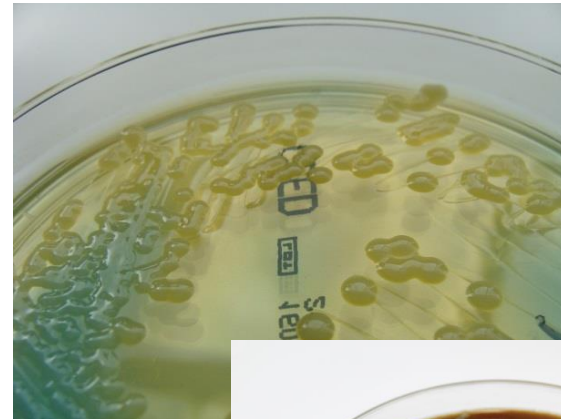
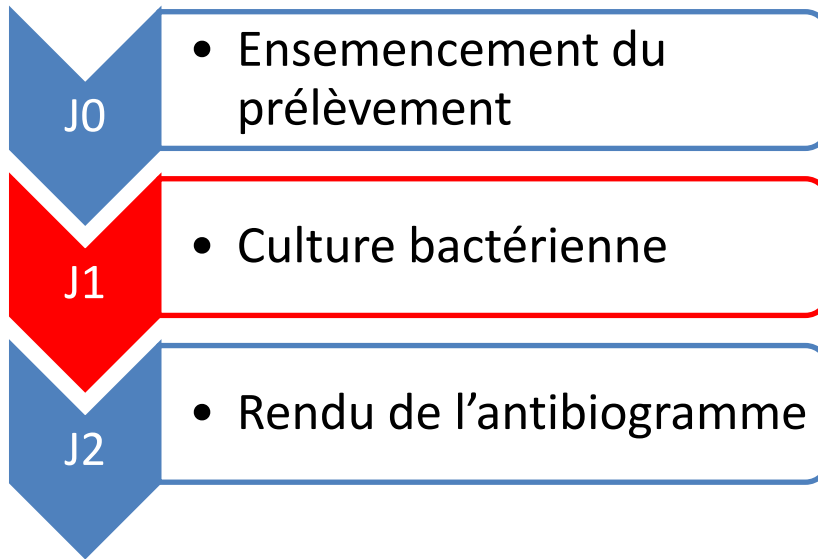


Souvent plus rapide
Applicable à J0



Ne détecte que ce qui est connu
Ne préjuge pas de la résistance

Outils applicables à partir de la culture bactérienne

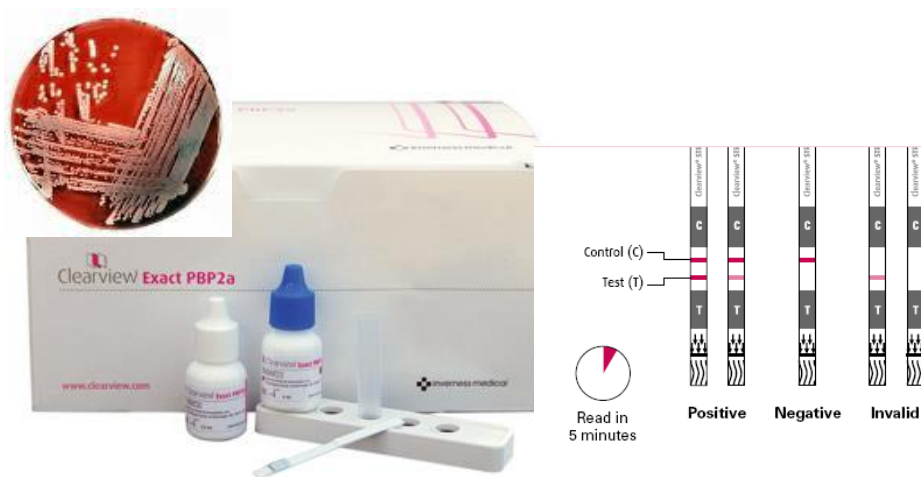


■ Outils phénotypiques +++

■ Outils génotypiques

■ Recherche d'une protéine par immunochromatographie

- colonies de staphylocoques / flacons d'hémocultures positifs à cocci Gram + en amas
- recherche de la PLP2a avec des anticorps anti-PLP2a



■ Clearview Exact PBP2a (Alere)

⇒ Résultats < 10 min



■ BinaxNOW PBP2a™ (Alere)

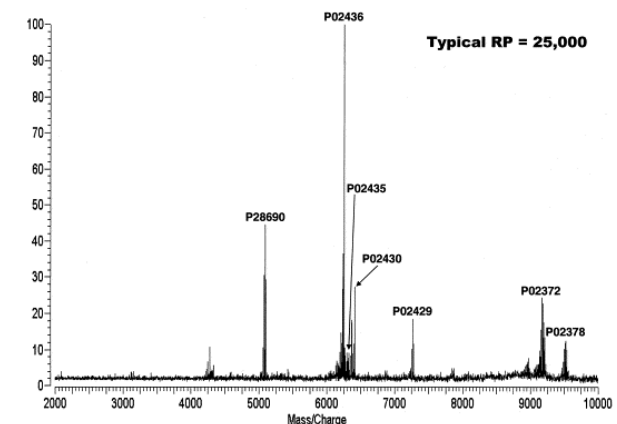
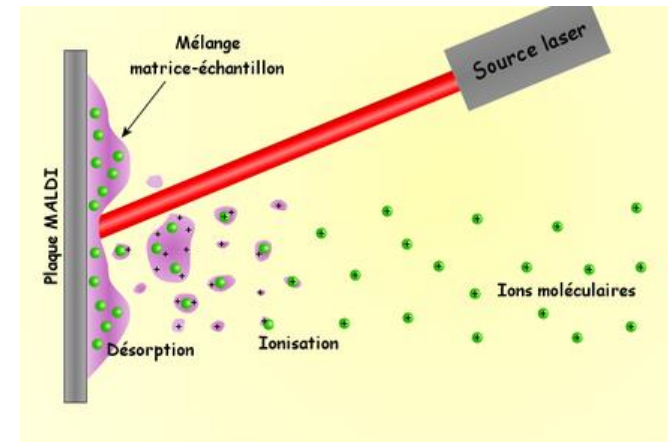
⇒ Résultats < 30 min

- ⇒ Optimisation de la prise en charge : oxacilline versus vancomycine
- ⇒ Dépistage BMR : SARM

■ Recherche d'une protéine par spectrométrie de masse

- colonies bactériennes (BGN notamment)
- mise en contact de la colonie en présence d'un antibiotique

- Application actuelle du MALDI-TOF :
Identification des bactéries et levures
- Autres applications :
 - MALDI-TOF : Mesure de l'hydrolyse des β -lactamines par détection des métabolites
Ampicilline \rightarrow acide pénicilloïque (90 min)
 - Autres techniques de spectrométrie :
détection de peptides spécifiques de protéines impliquées dans des mécanismes de résistance

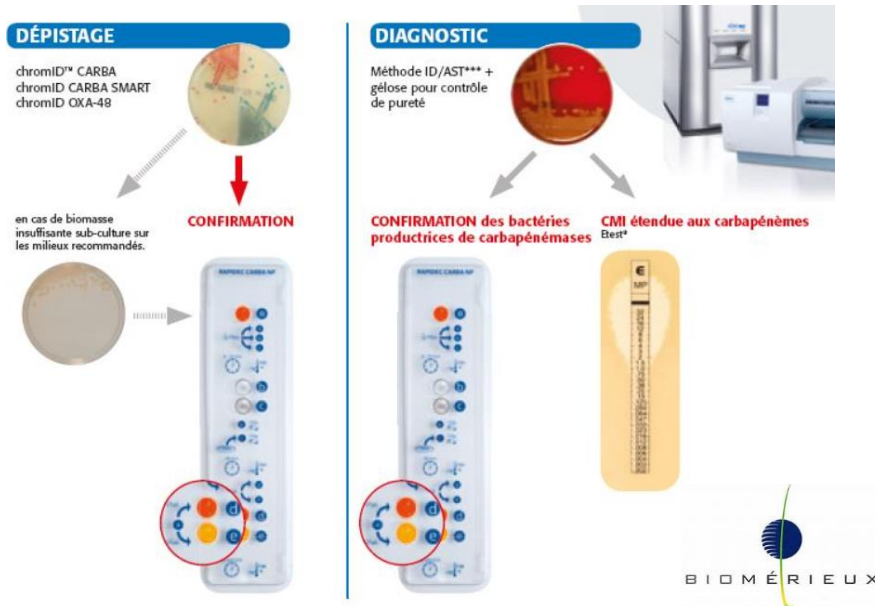


■ Recherche de l'activité enzymatique d'une protéine

J0

J1

J2



• Rapidec[®] CARBA NP

- entérobactéries, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*
- BGN + Imipenem + Zinc
- Si carbapénémase +, changement de pH → jaune
- Se : 97,8% ; Sp : 97,8%

⇒ Résultats en 30 min à 2 h

Dortet, AAC, 2012

• Rapid Polymyxin NP test ELITech

- Entérobactéries
- BGN + colistine + glucose
- Si colistine R, consommation de glucose : changement de pH → jaune

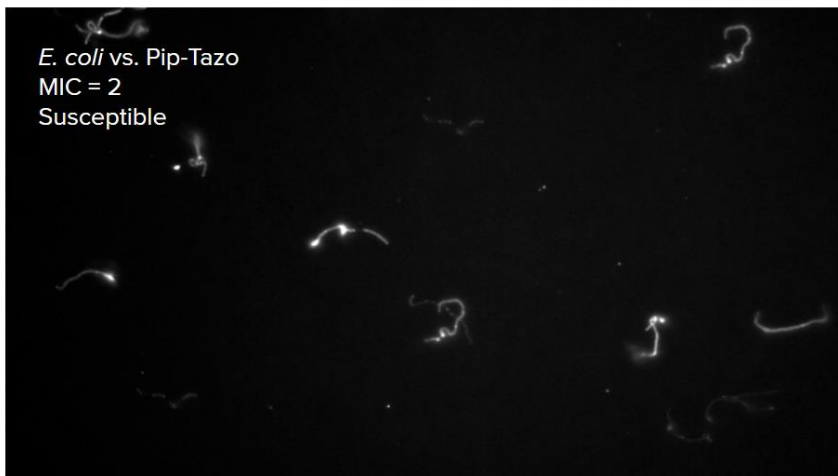
⇒ Résultats en 2-3h

Nordmann, EID, 2016

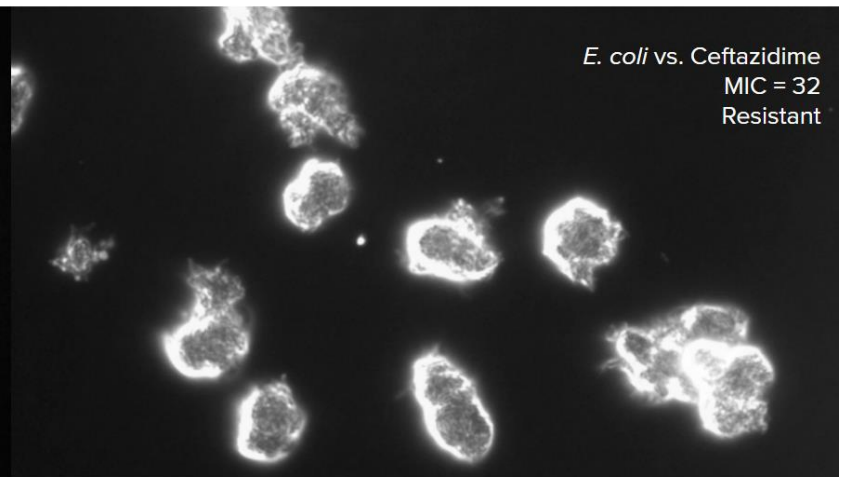
■ Mesure accélérée des CMI via un microscope



- Accelerate PhenoTest™ BC kit
 - *Morphokinetic Cellular Analysis (MCA)*
 - Taille, forme, taux de division observée via un microscope : observation de microcolonies
 - Utilisable à partir de flacons d'hémocultures positifs



E. coli vs. Pip-Tazo
MIC = 2
Susceptible



E. coli vs. Ceftazidime
MIC = 32
Resistant

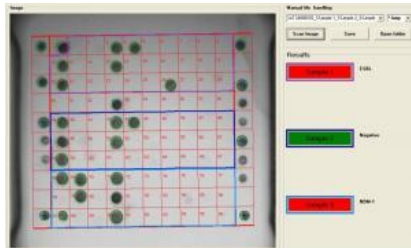
■ Détection de gènes de β -lactamases

J0

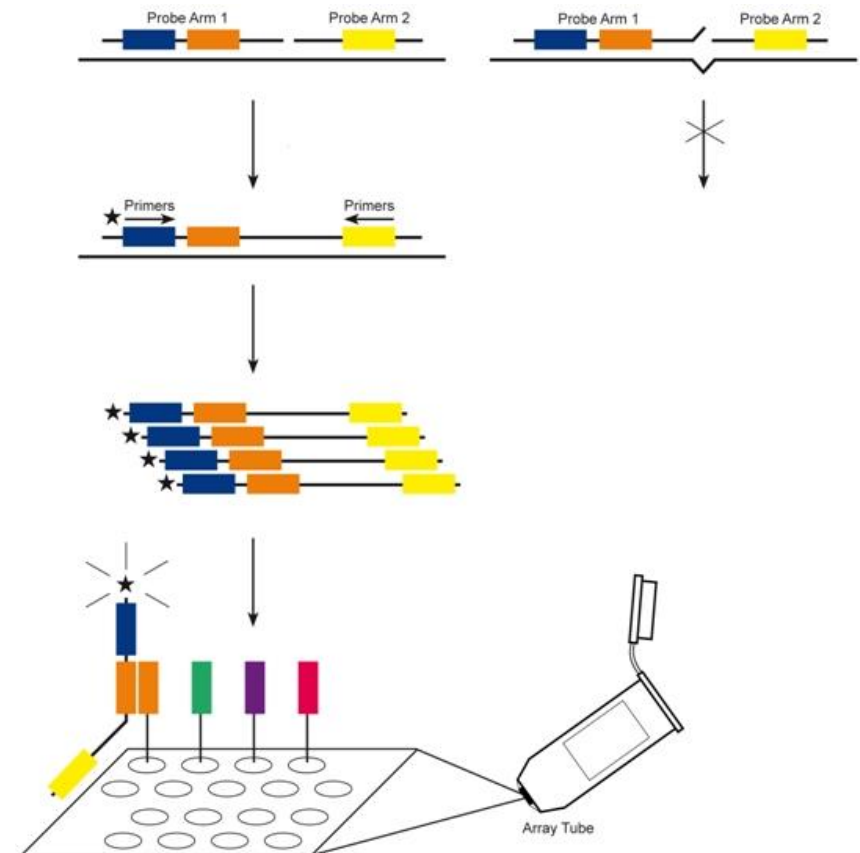
J1

J2

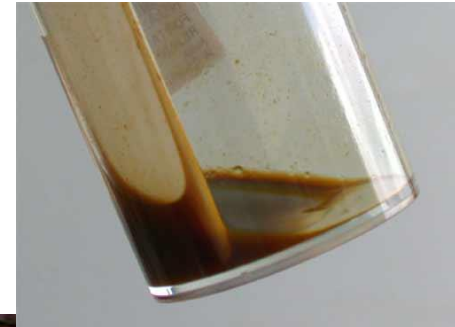
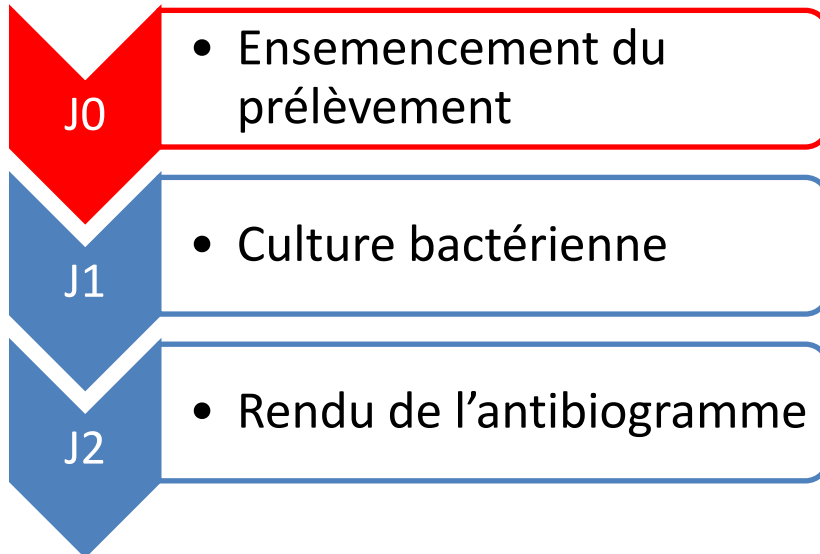
- Check-MDR
 - Extraction ADN BGN
 - Ligature, amplification
 - Détection après hybridation



- Des dizaines de cibles détectées :
 - **Pénicillinases BLSE**
 - **Céphalosporinases AmpC**
 - **Carbapénémases**



Outils applicables à partir d'un prélèvement biologique



■ Outils phénotypiques

■ Outils génotypiques +++ : PCR +++

■ Utilisation de géloses sélectives (± avec agent chromogène)

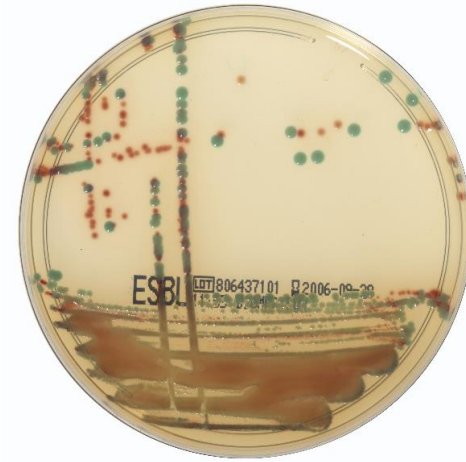


SARM

BBL™ CHROMagar™ MRSA II
(Becton-Dickinson)

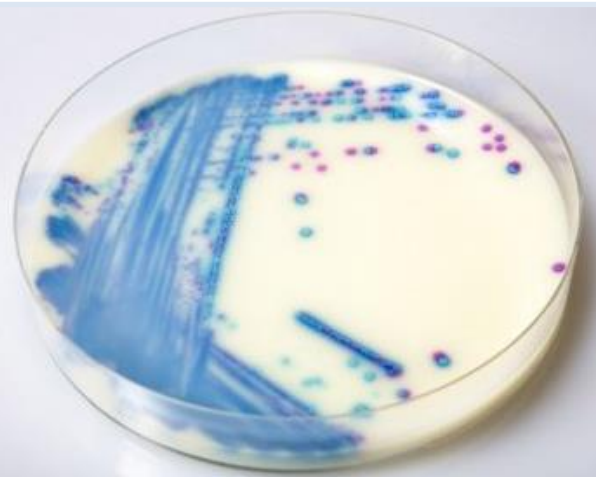


Brilliance™ MRSA
(Oxoid)



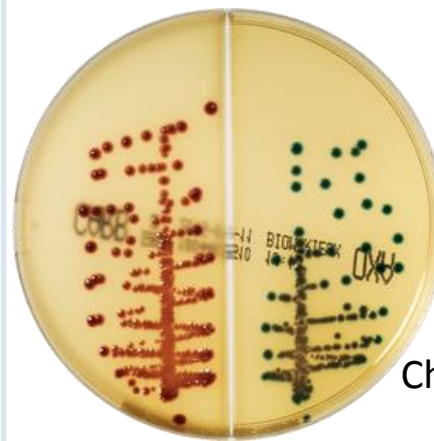
ChromID™ ESBL
(bioMérieux)

EBLSE



CHROMagar™ VRE
(CHROMagar)

ERV



ChromID™ CARBA SMART
(bioMérieux)

EPC

J0

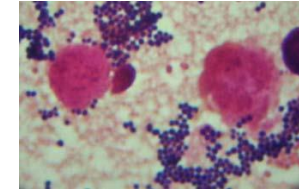
J1

J2

■ Détection de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM)

- Prélèvements :

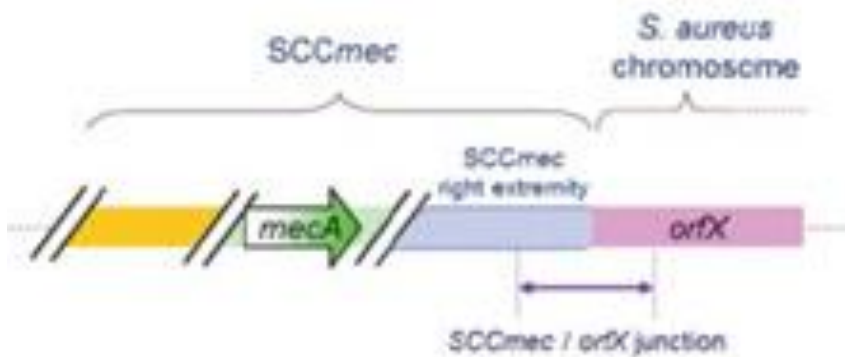
- Écouvillonnages nasaux
- Écouvillonnages de plaies cutanées
- *Flacons d'hémoculture positifs à cocci Gram + en amas**



- Gènes cibles :

- **Jonction cassette *SCCmec-orfX* +/- *mecA***
- *S. aureus* : *spa*, *nuc*

⇒ Résultats < 1-2 h



Faux positifs :






S. aureus « drop-out » : gène *mecA* absent
(OK avec les tests qui ciblent aussi *mecA*)

Faux négatifs :

Clones avec cassettes *SCCmec* différentes
Nouveaux variants *mecC*

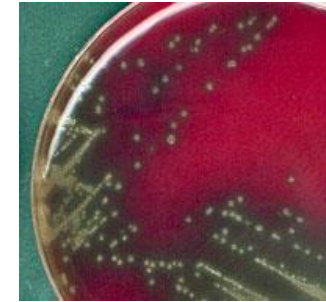
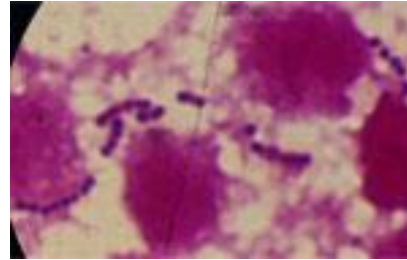
■ Détection de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM)



		Jonction <i>orfX</i> -SCC <i>mec</i>	<i>mecA</i>	<i>spa</i> ou <i>nuc</i>
NucliSENS EasyQ [®] MRSA (bioMérieux)		X	X	
BD GeneOhm [™] MRSA (Becton-Dickinson)		X		
GenoQuick [®] MRSA (Hain Lifescience)		X		
Xpert [®] MRSA Xpert [®] MRSA/SA SSTI Xpert [®] MRSA/SA BC (Cepheid)		X	X	X
GenoType [®] BC grampositive (Hain Lifescience)			X	

■ Détection des entérocoques résistants à la vancomycine (ERV)

- Quand ?
 - Épidémie à ERV, sujets contact
 - Rapatriement sanitaire
- Prélèvements
 - Coproculture
 - Ecouvillonnage rectal
- Gènes cibles : **vanA, vanB**
- Interprétation :
 - *vanB* : possibles faux + (anaérobies)
 - *vanA* : potentiel VRSA (USA)



- BD GeneOhm™ Van R (GeneOhm - BD)
- Xpert® Van A/VanB (GeneXpert – Cepheid)
- *GenoType® BC grampositive* (Hain Lifescience)

⇒ Résultats < 2 h

■ Détection de gènes de carbapénémases

- Quand ?
 - Épidémie à EPC
 - Rapatriement sanitaire
- Prélèvements
 - Ecouvillonnage rectal
- Gènes cibles : **oxa-48, ndm, kpc, imp-1, vim**



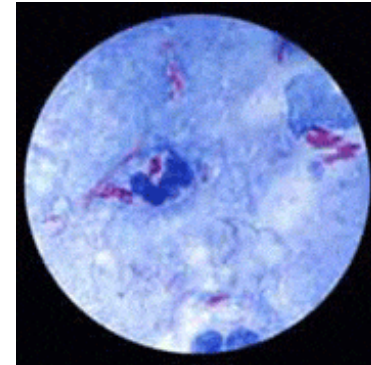
- Xpert® Carba-R (GeneXpert – Cepheid)

⇒ Résultats < 2 h

■ Détection de la résistance à la rifampicine de *M. tuberculosis*

- Quand ?
 - Suspicion forte de tuberculose
 - Présence de BAAR à l'examen direct

- Prélèvements :
 - Tubages gastriques, expectorations
 - Cultures bactériennes



- Gènes cibles :
 - Résistance à la **rifampicine** : ***rpoB***

■ Xpert® MTB/RIF (GeneXpert – Cepheid)

⇒ Résultats en 2 h



- + résistance à l'isoniazide : ***katG*** (haut niveau) et ***inhA*** (bas niveau)
- + résistance aux FQ (***gyr***), aux aminosides (***rrs***), à l'éthambutol (***embB***)

■ GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience)

■ GenoType® MTBDRs/ (Hain Lifescience)

⇒ Résultats en 5 h

■ Détection des résistances chez *Helicobacter pylori*

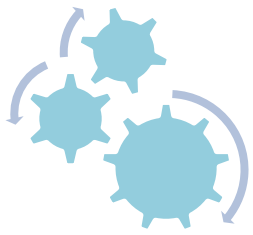
- Quand ?
 - En systématique sur les biopsies gastriques
 - En cas d'échec de traitement
- Problématique relativement simple car :
 - Prélèvement normalement stérile
 - 1 seule bactérie potentiellement présente
 - Des mécanismes de résistance liés à des mutations



■ GenoType® HelicoDR (Hain Lifescience)

⇒ Résultats en 5 heures

- Gènes cibles : plusieurs mutations détectées
 - **gyrA** : résistance aux fluoroquinolones
 - **ADN codant l'ARNr 23S** : résistance à la clarithromycine



Le bilan

Résistance
aux
antibiotiques

- **De très nombreux et de plus en plus d'outils à disposition !**

- Liste non exhaustive, outils en évolution permanente
- Mécanismes de résistance ciblés :
 - Bactéries à Gram + : SARM, ERV, mycobactéries
 - Bactéries à Gram -... : BLSE, EPC
 - Test de sensibilité ?

Approche plus simple
pour les GRAM+
car faible nombre de
mécanismes impliqués

- **Nécessité d'outils fiables**

- Études comparatives : « Gold standard » ?

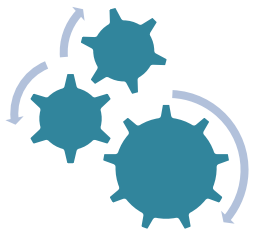
- **Outils à utiliser dans un contexte donné, non en systématique**

- Besoins des cliniciens, besoins des EOH...

- **À lier aux contraintes organisationnelles... (et financières !)**

- Qualité ISO15189, H24 ?, études de flux, études médico-économiques...

Outils de diagnostic rapide
ET approches syndromiques



Définition

Approches
syndromiques

- Recherche simultanée, à partir d'un même prélèvement biologique, de plusieurs agents pathogènes potentiellement impliqués dans une infection à l'origine de symptômes comparables
- Principe : **1 syndrome → 1 prélèvement → 1 seul test**
⇒ raccourcir le délai diagnostique, optimiser la prise en charge
- 4 principales approches :
 - infections méningées
 - infections sexuellement transmissibles (IST)
 - infections respiratoires
 - infections digestives
 - (sepsis / flacons d'hémocultures)
- Technologies basées exclusivement sur des **outils génotypiques**
→ multiplex : PCR, qPCR, PCR nichée, LAMP...



■ **Exemple d'une
approche ciblée**

OXA-48, KPC, NDM, VIM, IMP

grippe A, grippe B,
A H1N1 2009

Clinical IVD Tests

**Healthcare Associated
Infections**

Xpert Carba-R
Xpert MRSA
Xpert SA Nasal Complete
Xpert MRSA/SA SSTI
Xpert MRSA/SA BC
Xpert C. difficile
Xpert C. difficile/Epi
Xpert vanA /vanB
Xpert Norovirus

Critical Infectious Diseases

Xpert MTB/RIF
Xpert Flu
Xpert Flu/RSV XC
Xpert EV

Sexual Health

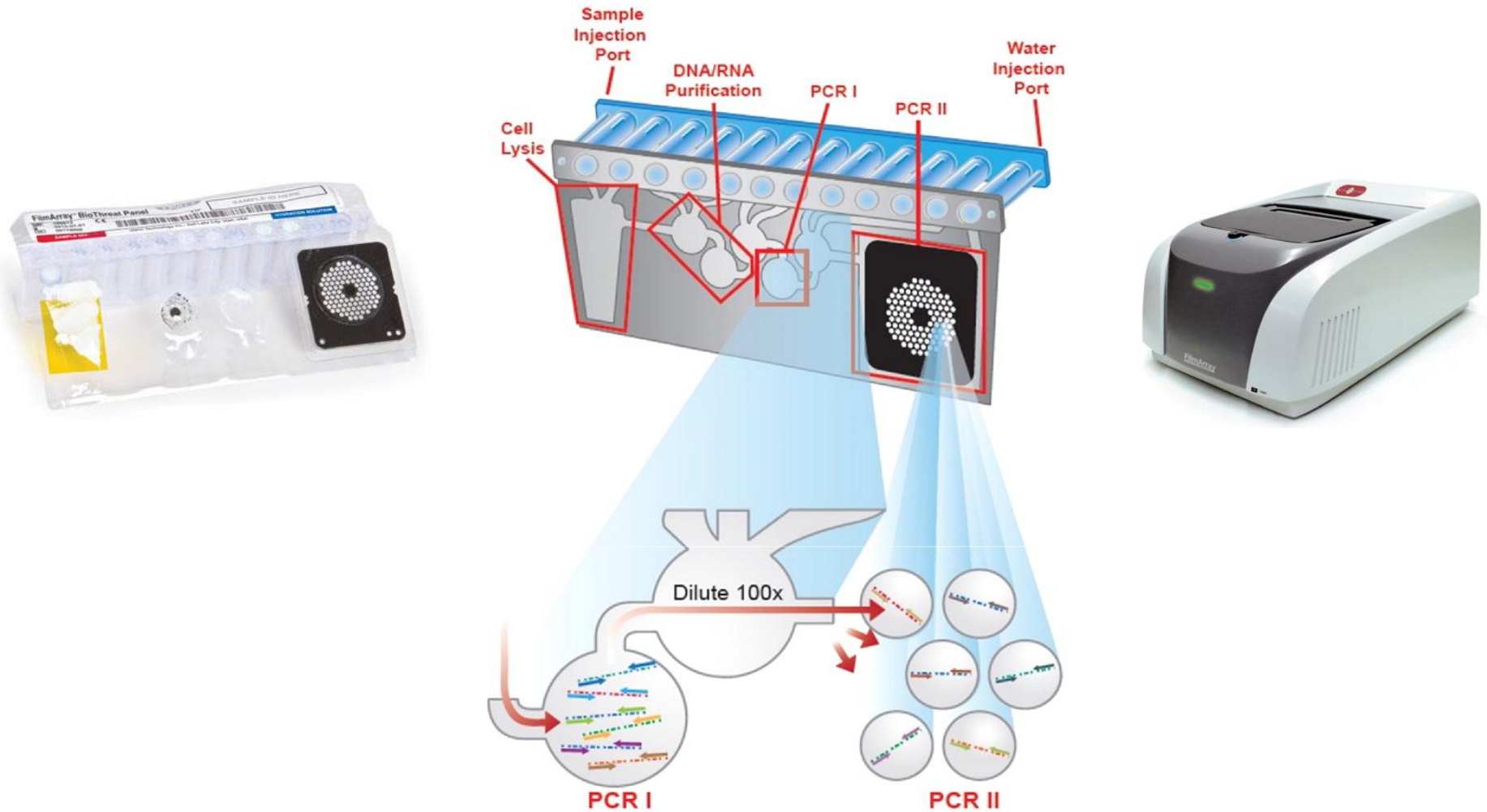
Xpert CT/NG
Xpert GBS
Xpert GBS LB
Xpert TV

toxine B, toxine binaire
Ribotype O29



Détection de la résistance
à la rifampicine

■ Exemple d'une approche syndromique



■ Exemple d'une approche syndromique

FilmArray™ Gastrointestinal Panel (Panel Gastrointestinal)



FilmArray®
The fastest way to better results.

Analyse de 22 agents pathogènes
gastro-intestinaux communs comprenant
virus, bactéries et parasites responsables
de diarrhées infectieuses

1 test. 22 pathogènes
Résultats en 1 heure environ

HAUT

Bactéries	<i>E. coli</i> diarrhéogène/ <i>Shigella</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Campylobacter</i> (<i>jejuni</i>, <i>coli</i> et <i>upsaliensis</i>) • <i>Clostridium difficile</i> (toxine A/B) • <i>Plesiomonas shigelloides</i> • <i>Salmonella</i> • <i>Yersinia enterocolitica</i> • <i>Vibrio</i> (<i>parahaemolyticus</i>, <i>vulnificus</i> et <i>cholerae</i>) • <i>Vibrio cholerae</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> entéroaggrégative (EAEC) • <i>E. coli</i> entéropathogène (EPEC) • <i>E. coli</i> entérotoxigénique (ETEC) lt/st • <i>E. coli</i> produisant des shga-toxines (STEC) stx1/stx2 • <i>E. coli</i> O157 • <i>E. coli</i> <i>Shigella</i>/entéroinvasive (EIEC)
Virus	Parasites
<ul style="list-style-type: none"> • Adénovirus F 40/41 • Astrovirus • Norovirus GI/GII • Rotavirus A • Sapovirus (I, II, IV and V) 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ <i>Cryptosporidium</i> ▶ <i>Cyclospora cayetanensis</i> ▶ <i>Entamoeba histolytica</i> ▶ <i>Giardia lamblia</i>

■ Exemple d'une approche syndromique

FilmArray™ Respiratory Panel (Panel Respiratoire)



Analyse de 20 virus et bactéries
respiratoires

1 test. 20 pathogènes respiratoires.
Résultats en 1 heure environ

Virus	Bactéries
<ul style="list-style-type: none"> • Adénovirus • Coronavirus HKU1 • Coronavirus NL63 • Coronavirus 229E • Coronavirus OC43 • Métapneumovirus humain • Rhinovirus humain/Entérovirus • Virus de la grippe A • Virus de la grippe A/H1 • Virus de la grippe A/H1-2009 • Virus de la grippe A/H3 • Virus de la grippe B • Virus parainfluenza 1 • Virus parainfluenza 2 • Virus parainfluenza 3 • Virus parainfluenza 4 • Virus respiratoire syncytial 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bordetella pertussis</i> • <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> • <i>Mycoplasma pneumoniae</i>

FilmArray™ ME (Panel Meningite / Encéphalite)



Analyse de 14 virus, bactéries et
levure

1 test. 14 cibles.
Résultats en 1 heure environ

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

■ Autre exemple d'une approche syndromique



HPN
HOSPITALIZED
PNEUMONIA
APPLICATION



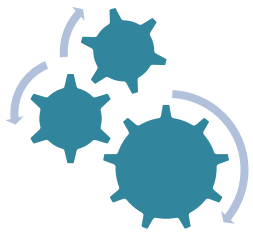
19 RESISTANCE MARKERS — 20 PATHOGENS
The Unyvero HPN Pneumonia Cartridge

GROUP	PATHOGEN
Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Citrobacter freundii</i>
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	<i>Proteus</i> spp.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Klebsiella variicola</i>
	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Morganella morganii</i>
Non-fermenting bacteria	<i>Moraxella catarrhalis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	<i>Legionella pneumophila</i>
Others / Fungi	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>

GENE	RESISTANCE AGAINST
<i>ctx-M</i>	3rd generation Cephalosporins
<i>ermB</i>	Macrolide/Lincosamide
<i>imp</i>	Carbapenem
<i>kpc</i>	Carbapenem
<i>mecA</i>	Oxacillin
<i>mecC</i>	Oxacillin
<i>ndm</i>	Carbapenem
<i>oxa-23</i>	Carbapenem
<i>oxa-24</i>	Carbapenem
<i>oxa-48</i>	Carbapenem
<i>oxa-58</i>	Carbapenem
<i>shv</i>	Penicillin
<i>sul1</i>	Sulfonamide
<i>tem</i>	Penicillin
<i>vim</i>	Carbapenem
<i>gyrA83</i>	Fluoroquinolone
<i>gyrA87</i>	Fluoroquinolone

curetis

unyvero



Le bilan

Approches
syndromiques

- **De plus en plus d'outils à disposition**
 - Liste non exhaustive, outils en évolution permanente, de + en + simples
 - Des panels assez comparables entre les constructeurs
 - **Moindre volume de prélèvement, moindres manipulations, moindre temps technicien, moindre coût que plusieurs approches ciblées**
- **Nécessité d'outils fiables**
 - Études comparatives : « Gold standard » ?
- **Outils à utiliser dans un contexte donné , non en systématique**
 - Besoins des cliniciens, interlocuteur H24 ?
- **À lier aux contraintes organisationnelles... (et financières !)**
 - Qualité, études de flux, études médico-économiques...
 - Des systèmes bientôt « au lit du malade »



**Ne pas abandonner
la culture et
l'antibiogramme !**



Optimiser la prise en charge avec des outils de diagnostic rapide

Journée inter-réseaux du CCLIN Sud-Ouest

Olivier Barraud

Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges

Faculté de Médecine, Université Limoges

UMR Inserm 1092