



HAL
open science

Évaluation et développement de nouveaux outils technologiques en microbiologie clinique

Stéphanie Le Page

► **To cite this version:**

Stéphanie Le Page. Évaluation et développement de nouveaux outils technologiques en microbiologie clinique. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01507401

HAL Id: dumas-01507401

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01507401>

Submitted on 13 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le Vendredi 31 Mars 2017

Par Mme **Stéphanie LE PAGE**

Née le 19 Août 1987 à Pessac

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 04 octobre 1988 tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

**EVALUATION ET DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX
OUTILS TECHNOLOGIQUES EN MICROBIOLOGIE
CLINIQUE**

----oOo----

JURY :

Président : Mr le Professeur Philippe COLSON

Membres : Pr Jean-Marc ROLAIN – Directeur de Thèse

Dr Charléric BORNET – Pharmacien Hospitalier AP-HM

Dr Gregory DUBOURG – Pharmacien Assistant Hospitalo-Universitaire AP-HM

Pr Hélène MARCHANDIN – Professeur CHU Montpellier

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie

27 boulevard Jean Moulin – CS 30064 – 13385 Marseille cedex 05 – France

Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 – WWW.pharmacie.univ-mrs.fr

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Sandrine NOURIAN
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Myriam TORRE

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE

M. Vincent PEYROT
M. Hervé KOVACIC

GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE

M. Christophe DUBOIS

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE

M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Caroline MONTET

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN
Mme Florence SABATIER-MALATERRE

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Nathalie BARDIN Mme Dominique ARNOUX Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Sylvie COINTE
----------------------------	-------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Henri PORTUGAL Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE

M. Jean-Pierre CALISSI

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY
Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARDCHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUESM. David BERGE-LEFRANC
M. Pierre REBOUILLON

CHIMIE THERAPEUTIQUE

Mme Catherine DIANA
Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANACHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIEM. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDET
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Anne-Marie PENET-LOREC

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Thierry ATHUYT

DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE

M. Marc LAMBERT

DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE
ET GESTION DE LA PHARMAFAC

M. Philippe BESSON

AHU

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

Mme Manon ROCHE

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE

Mme Camille DESGROUAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE
-----------------	----------------------

ATER

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL
-----------------	---

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1^{er} décembre 2015

REMERCIEMENTS

A toutes les personnes impliquées dans ce travail,

Au **Professeur Didier RAOULT**, qui m'a accueillie dans son laboratoire.

Au **Professeur Philippe COLSON**, pour m'avoir fait l'honneur d'être mon Président de Thèse, et qui m'a suivie et soutenue pendant tout mon internat.

Au **Professeur Hélène MARCHANDIN** et au **Docteur Charléric BORNET** qui ont gentiment répondu présent pour faire partie de mon jury.

Au **Docteur Gregory DUBOURG**, qui en plus d'avoir accepté d'être membre de mon jury de Thèse, m'a supportée et aidée avec son cynisme légendaire dans ce travail.

Je tiens particulièrement à remercier

Le **Professeur Jean-Marc ROLAIN**, initiateur de ce travail et qui m'a accueillie au sein de son équipe. Merci de m'avoir appris tant de choses et fait partager ces expériences uniques. Vous m'avez guidée et appris à me dépasser dans le travail. Merci pour tout Professeur.

Je remercie également :

Toute l'équipe de la faculté de Pharmacie que ce soit les étudiants (**Charbel, Abiola, Sushim, Winnie, Liliane, Lucie** (la petite nouvelle)) mais aussi **Muriel** et **André**.

A **Linda** ma technicienne préférée ou plutôt maintenant ma doctorante préférée (tu vas faire de grandes choses). Merci pour tout ce que tu m'as appris et pour ton soutien pendant ces 3 ans.

A mes chères collègues IPR : **Perrine, Louise** et **Lucie**. Ben alors les filles quand allons-nous dominer le monde ?

A mes amis biologistes, en commençant par **Popo** le rayon de soleil mais aussi **Sophie, Shirley, Chloé, Baptiste, Bassam, Mohamed et Xavier** pour avoir partagé ces années d'internat.

Je remercie particulièrement **Teresa** pour avoir été ma confidente et mon soutien moral. Nos pauses café me manquent beaucoup et à **Matteo** pour sa bonne humeur Italienne.

A mes fidèles amis bordelais, dont **Guigui** qui me fait l'honneur d'être présent pour ce moment si important pour moi.

A **Margaux, Booba et Marine** avec qui j'ai partagé les TP de Pharma et le Pyla.

A ma **Sookie**, ma meilleure amie avec qui j'ai partagé ces 9 ans d'études de Pharmacie et pas seulement ...

A **Michel et Anne-Marie** sans qui l'installation à Marseille n'aurait pas été pareil. Merci de nous avoir si chaleureusement accueillis.

A **Myriam, Yannick** et leurs 2 petits anges **lolo et Alice** que j'aime profondément.

A ma famille, merci d'être venu pour ce moment important de ma vie,

A mes grands-pères qui n'ont pas pu se déplacer,

A mes parents et mon frère pour tout leur amour et leur soutien pendant ces longues années d'études,

A ma belle-famille pour leur soutien et particulièrement Hélène et Françoise relectrices de mes écrits,

A **Pierro** qui m'a supportée, encouragée, aimée et sans qui je ne serai pas la personne que je suis devenue.

**« L'UNIVERSITE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES. CES OPINIONS
DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEURS AUTEURS. »**

SOMMAIRE

Liste des figures et tableaux

I-	Introduction.....	13
1.	Automatisation de l'identification bactérienne.....	15
a	L'ensemencement.....	17
i	Technique manuelle.....	17
ii	Les ensemenceurs automatiques.....	19
b	L'identification bactérienne.....	20
i	Techniques biochimiques et phénotypiques.....	20
1-	Les techniques manuelles.....	20
-	<u>Coloration de Gram</u>	22
-	<u>Galleries API</u>	22
2-	Les techniques automatisées.....	23
ii	Le MALDI-TOF.....	24
-	<u>Principe général</u>	24
-	<u>Identification bactérienne</u>	25
-	<u>Différents domaines d'application en</u> <u>microbiologie clinique</u>	26
2.	Automatisation des antibiogrammes.....	28
a	Réalisation des antibiogrammes.....	28
i	Milieu liquide.....	29
ii	Milieu solide.....	31
b	Systèmes automatisés.....	33
i	Milieu liquide.....	33
ii	Milieu solide.....	35
1-	Les ensemenceurs.....	35
2-	Lecture et interprétation des antibiogrammes.....	36
iii	Comparaison des deux méthodes.....	38
3.	Chaines automatisées.....	38
II-	Objectifs.....	40

III-	Automatisation de l'ensemencement et lecture plus précoce des antibiogrammes.	42
1.	Evaluation of the PREVI® Isola automated seeder system compared to reference manual inoculation for antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method.....	42
2.	Real-time video imaging as a new and rapid tool for antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion method: A paradigm for evaluating resistance to imipenem and identifying extended-spectrum –lactamases.....	54
3.	Evaluation of the Scan [®] 1200 as a rapid tool for reading antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion technique.....	61
IV-	Interprétation automatique des antibiogrammes : le logiciel Anti-Logic.....	71
1.	Preuve de concept.....	71
2.	Développement du logiciel.....	73
	1- <u>Création de la base d'apprentissage</u>	74
	2- <u>Fonctionnement général du logiciel anti-logic</u>	75
	3- <u>Création de la base de données de photos et de souches</u> ..	76
	4- <u>Validation de la base d'apprentissage</u>	78
	5- <u>Tests du logiciel</u>	79
	6- <u>Améliorations nécessaires du logiciel</u>	80
V-	Nouvelles technologies permettant la détection des Bactéries Multi-Résistantes...	82
VI-	Valorisation.....	96
VII-	Edition.....	98
VIII-	Conclusion.....	99
IX-	Perspectives.....	100
X-	Autres publications internationales réalisées lors du DES IPR DE 2013 à 2017...	101
XI-	Références.....	108

Liste des figures et tables

- Figure 1.** Présentation de l'ensemencement en quadrants.
- Figure 2.** Ensemencement quantitatif d'une urine.
- Figure 3.** Exemple d'une coloration de Gram : A- Souche de *S. aureus* en forme de grappe de raisins (Cocci à Gram +) ; B- Souche d'*Escherichia coli* (Bacille à Gram-négatif).
- Figure 4.** Exemple d'une galerie API d'*E. coli*.
- Figure 5.** Fonctionnement général du MALDI-TOF pour l'identification bactérienne.
- Figure 6.** Exemple d'un spectre bactérien obtenu pour *Enterococcus massiliensis*.
- Figure 7.** Domaines d'applications de l'utilisation du MALDI-TOF.
- Figure 8.** Présentation des différents mécanismes d'action des principaux antibiotiques testés pour la réalisation des antibiogrammes.
- Figure 9.** Tableau d'interprétation de différents antibiotiques donnés pour les souches d'Entérobactéries par la CA-SFM :
- Figure 10.** Exemple de la détermination de la CMI à la vancomycine d'une souche de *Staphylococcus aureus*. La CMI étant de 1.5µg/ml.
- Figure 11.** Comparaison des différents systèmes d'inoculation.
- Figure 12.** Présentation des différents systèmes d'acquisition d'images permettant la lecture et l'interprétation des antibiogrammes.
- Figure 13.** Présentation des chaînes automatisées existantes : A- BD Total Lab Automation of BD Kiestra ; B- Copan/bioMérieux WASPLab.
- Figure 14.** Exemple logiciel Xnview capable à partir d'un phénotype déterminé de reconnaître des photos d'antibiogrammes présentant le même phénotype avec une similarité de 87%. Avec une similarité de 80%, il reconnaît 4 antibiogrammes différents présentant le même phénotype.
- Figure 15.** Exemple de limitation du logiciel Xnview qui confond une photo d'antibiogrammes avec la photo de deux chiots présentant la même couleur.
- Figure 16.** Présentation du Top 15 des bactéries les plus fréquemment isolées à l'hôpital entre 2014 et 2016.
- Figure 17.** Présentation générale du fonctionnement du logiciel anti-logic.
- Figure 18.** Présentation des différents systèmes d'acquisition d'images.
- Figure 19.** Exemple de bonne reconnaissance de phénotypes par le logiciel.
- Figure 20.** Présentation schématique simplifiée des différentes étapes du dépôt du brevet à la délivrance.

- Table 1.** Tableau récapitulatif des différents types de géloses à utiliser en fonction des types de prélèvements.
- Table 2.** Présentation des différents systèmes automatisés d'ensemencement utilisés dans les laboratoires de microbiologie clinique en comparaison avec la technique manuelle.
- Table 3.** Présentation des différents systèmes automatisés d'identification bactérienne basée sur l'analyse des caractères phénotypiques et biochimiques.
- Table 4.** Présentation des différents systèmes automatisés en milieu liquide réalisant les antibiogrammes.
- Table 5.** Présentation des avantages et des inconvénients de la réalisation des antibiogrammes en milieu liquide et solide.
- Table 6.** Présentation des différents panels d'antibiotiques testés sur le top 15.
- Table 7.** Tableau récapitulatif des photos réalisées lors de ce travail.
- Table 8.** Résultats des tests réalisés sur la base d'apprentissage.
- Table 9.** Présentation des résultats obtenus.

I- INTRODUCTION

Actuellement dans le domaine de la microbiologie, les étapes permettant d'arriver à l'antibiothérapie définitive depuis l'arrivée des prélèvements en passant par l'identification bactérienne et la réalisation des antibiogrammes sont encore longues et nécessitent certaines améliorations. On peut noter que l'identification bactérienne et le temps de rendu des résultats des antibiogrammes représentent un élément critique en microbiologie clinique. L'amélioration de la rapidité d'obtention des résultats permettrait d'avoir une prise en charge du patient beaucoup plus adaptée plus précocement [1]. En effet, l'administration précoce d'une antibiothérapie adaptée possède au moins 3 avantages importants à savoir la réalisation d'économie par diminution du temps d'hospitalisation, une diminution de la mortalité des patients lors d'infections graves et la diminution de la propagation de la résistance aux antibiotiques [2-4].

Pour faire face au nombre croissant des prélèvements biologiques, le recours à l'automatisation depuis les années 80 semble une bonne alternative. L'automatisation en microbiologie clinique est une étape importante qui permet l'obtention des résultats plus rapidement, une diminution du nombre d'erreurs biologiques, une meilleure reproductibilité et une rentabilité intéressante [5-6]. La reproductibilité et la fiabilité des techniques sont les deux principaux avantages de l'automatisation. La microbiologie clinique est en pleine évolution. L'automatisation de l'inoculation [7-9], l'utilisation d'incubateurs intelligents mais surtout l'automatisation de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) a révolutionné les laboratoires de microbiologie clinique [10]. En effet, le gain de temps est considérable pour les cliniciens en comparaison aux galeries type API ou aux automates se basant sur l'étude des caractères biochimiques et phénotypiques comme le Vitek 2 (bioMérieux) ou le Phoenix (Becton Dickinson) [11]. Le MALDI-TOF est capable de réaliser une identification bactérienne directement à partir des prélèvements comme par exemple les flacons d'hémocultures une fois la présence bactérienne confirmée et à l'aide d'un protocole particulier [10] [12].

En ce qui concerne la réalisation des antibiogrammes dans les laboratoires de microbiologie clinique, elle est effectuée soit manuellement sur milieux gélosés soit par des automates en milieux liquides [5] [13]. La technique manuelle de diffusion sur milieux gélosés des disques d'antibiotiques a longtemps été considéré comme la technique de référence grâce à son faible coût et sa simplicité mais sa reproductibilité est opérateur dépendant [14-15]. En effet, cette technique permet la visualisation de phénomènes particuliers comme la présence du « bouchon

de champagne » chez les bactéries productrices de Béta-Lactamase à Spectre Etendu (BLSE), de phénomènes de synergies entre plusieurs antibiotiques ou encore les possibles contaminations, non visibles en milieu liquide.

Les systèmes automatisés en milieu liquide de microdilution tels que le Phoenix (Becton Dickinson), le Vitek 2 (bioMérieux) ou le Microscan WalkAway (Siemens) utilisent la détection de la croissance bactérienne par turbidimétrie et/ou colorimétrie que ce soit pour l'identification bactérienne ou la réalisation des antibiogrammes [14].

Des chaînes entièrement automatisées ont été développées par les industriels, capables de réaliser chacune de ces étapes : inoculation des prélèvements, utilisation d'étuves intelligentes, identification bactérienne et réalisation des antibiogrammes (l'ensemencement, le dépôt des disques d'antibiotiques, la lecture et l'interprétation de ces antibiogrammes) [16].

Ce travail de thèse va se présenter en 3 parties : une 1^{ère} partie qui va être une description de l'état de l'art dans le domaine de l'automatisation en microbiologie clinique ; une 2^{ème} partie expérimentale correspondant au travail réalisé pendant mon Master 2 et ma Thèse de Science avec l'évaluation de différents systèmes et le développement d'un logiciel et pour finir une 3^{ème} partie correspondant à la conclusion et aux perspectives de ce travail.

1. Automatisation de l'identification bactérienne

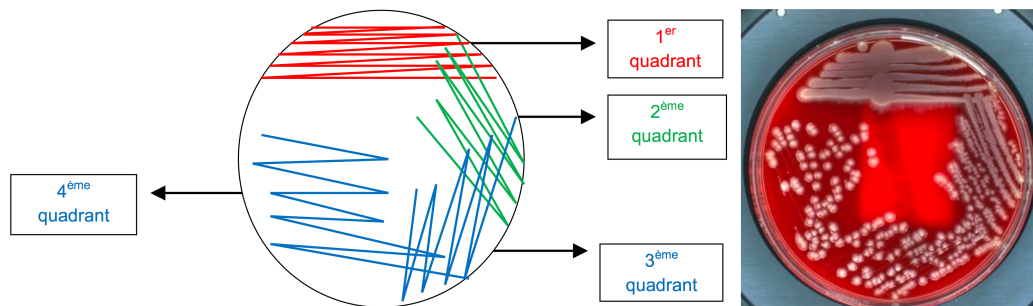
a. L'ensemencement

Après l'arrivée du prélèvement, l'ensemencement de l'échantillon biologique quel qu'il soit représente la première étape car c'est elle qui va nous permettre de savoir si un prélèvement est stérile ou s'il y a une pousse bactérienne permettant la confirmation d'une infection bactérienne qu'elle soit mono ou polymicrobienne. Cette étape consiste à inoculer les prélèvements biologiques sur des géloses spécifiques et à les incuber à 37°C dans des étuves pendant 20 à 24 heures au minimum. Le mode d'ensemencement est réalisé de façon à obtenir des colonies isolées ce qui permettra de s'assurer que le prélèvement est monomicrobien ou de différencier les différentes colonies bactériennes s'il y a une pousse polymicrobienne. Cette étape est nécessaire pour avoir une identification précise sans contamination éventuelle. Si le prélèvement est positif, une pousse bactérienne sera visible après ce temps d'incubation. Mais pour qu'un prélèvement soit rendu stérile, il faudra attendre au minimum 2 à 5 jours d'incubation sans pousse bactérienne car cette étape est dépendante du type de prélèvement, de la bactérie et du type d'infection suspectée. L'inoculation du prélèvement sera effectuée sur différents types de géloses qui pourront être spécifiques de la bactérie recherchée. En effet, certains prélèvements contiennent une flore microbienne comme c'est le cas pour les prélèvements de selles, il faut donc utiliser des géloses spécifiques sélectives qui vont contenir des antibiotiques et des nutriments spécifiques pour permettre l'isolement des bactéries pathogènes d'intérêt. Actuellement pour gagner du temps, cet ensemencement est réalisé à l'aide d'automates dédiés à cette étape. Ils possèdent la capacité d'ensemencer des prélèvements liquides comme les urines ou les prélèvements respiratoires (après une étape de fluidification en cas de besoin) mais aussi d'ensemencer les prélèvements non liquides (écouvillons...). Néanmoins, certains prélèvements nobles comme les Liquides Céphalo-Rachidien (LCR) sont encore ensemencés de façon manuelle car bien souvent les quantités sont faibles et précieuses.

i. Technique manuelle

La technique manuelle reste la technique de référence. Il s'agit de l'ensemencement en 4 quadrants qui permet l'obtention de bactéries isolées avec un caractère semi-quantitatif. Cette technique se déroule comme ci-dessous :

Figure 1. Présentation de l'ensemencement en quadrants.

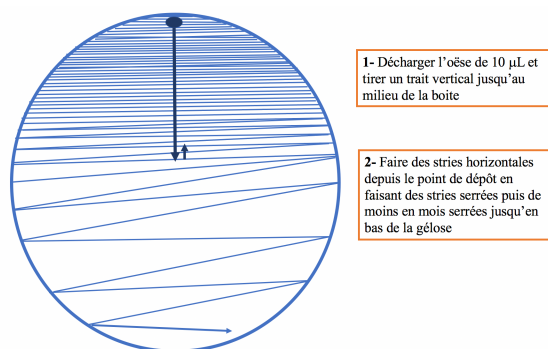


Elle peut s'adapter à la majorité des prélèvements mais pour certains types de prélèvements il peut être nécessaire d'avoir un ensemencement permettant de quantifier le nombre de bactéries présentes comme c'est le cas pour les urines ou les Liquides Broncho-Alvéolaire (LBA) afin de déterminer si elles sont pathogènes ou non (par exemple dans une urine on ne rendra que la bactérie *E. coli* à partir de 10^3 UFC/ml dans la plupart des cas).

Ensemencement quantitatif : Si on prend l'exemple d'une urine, cela consiste à ensemencer sur une gélose une quantité définie d'urine correspondant à $10 \mu\text{L}$ afin de voir s'il y a une pousse bactérienne mais aussi de permettre le dénombrement bactérien sur la gélose.

L'urine sera ensuite étalée sur l'intégralité de la gélose suivant le modèle ci-dessous.

Figure 2. Ensemencement quantitatif d'une urine.



Pour l'urine, l'utilisation de gélose non sélective est possible car normalement ce type de prélèvement est stérile.

Mais si l'on prend l'exemple de la coproculture, il pourra être nécessaire en fonction de la bactérie suspectée d'avoir une étape préalable d'enrichissement dans un bouillon. Il faudra

ensemencer aussi différents types de gélose sélective afin d'éliminer la flore normale et pouvoir isoler spécifiquement les bactéries pathogènes.

Table 1. Tableau récapitulatif des différents types de géloses à utiliser en fonction des types de prélèvements.

Type de prélèvement	Présence d'une flore bactérienne	Type de géloses à utiliser	
		Géloses classiques	Géloses enrichies ou sélectives
Urines	Non	Géloses chromogéniques Géloses BCP, CLED	
Selles	Oui Possible utilisation d'un bouillon d'enrichissement : Sélénite, Müller Kauffmann		- Milieux sélectifs de bactéries à Gram-négatif : Mac Conkey, Drigalski, Hektoën, SS... - Milieux sélectifs et enrichis avec pousse en microaérophilie pour <i>Campylobacter spp.</i> : Karmali, Shirrow. - Milieux sélectifs et enrichis avec pousse en anaérobie pour <i>C. difficile</i> . Milieu Sorbitol-Mac Conkey en cas de suspicion de SHU (<i>E. coli</i> O157H7 : sorbitol -).
Génitaux	Oui		- Gélose chocolat + mélange polyvitaminique + VCAT + CO2 : <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . - Gélose sélective au sang humain pour l'isolement de <i>Gardnerella Vaginalis</i> . - Gélose Granada : <i>Streptococcus agalactiae</i>
Crachats	Oui Fluidification du prélèvement		- Gélose Chocolat +/- antibiotiques : <i>Haemophilus influenzae</i> . - Gélose au sang +/- ANC, CAP : <i>Streptococcus pneumoniae</i> . - Gélose sélective BGN
Cutané	Oui		- Gélose au sang
LCR	Non		- Gélose chocolat + mélange polyvitaminique+ CO2 : <i>Neisseria meningitidis</i> . - Gélose au sang +/- ANC, CAP : <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
Hémocultures	Non		- Gélose au sang

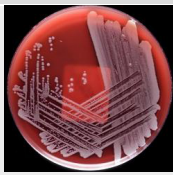
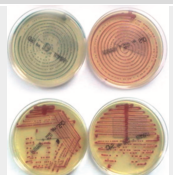

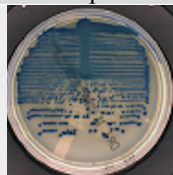
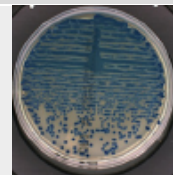
ii. Les ensemenceurs automatiques

Du fait de l'augmentation constante du nombre d'échantillons, l'utilisation d'ensemenceurs automatiques est devenue indispensable en routine. Ils permettent d'avoir une cadence beaucoup plus importante pour faire face au flux de prélèvements et possèdent une meilleure reproductibilité.

Actuellement, il existe différents types d'ensemenceurs automatiques capables d'ensemencer tous les types de prélèvements qu'ils soient liquides ou non (écouvillons ...). Ils possèdent tous

un système d'ensemencement différent, certains vont utiliser une bille magnétique aimantée, une öse ou un peigne [17]. Il existe 4 systèmes automatisés permettant l'ensemencement des prélèvements : l'Autoplak (NTE-SENER), l'InoquIA (BD-Kiestra), le PreLUD (i2a), le WASP (Copan) [18-19] et le PREVI® Isola (bioMérieux) [9] même si celui-ci ne sera plus commercialisé.

Table 2. Présentation des différents systèmes automatisés d'ensemencement utilisés dans les laboratoires de microbiologie clinique en comparaison avec la technique manuelle.

	Technique manuelle	PreLUD2	Autoplak	PREVI™ Isola	WASP®	InoquIA
Fabricant	-	i2a	NTE-SENER	bioMérieux	Copan	BD Kiestra
Type d'ensemencement		-				
	En stries : technique classique	Ecouvillon	öse réutilisable en métal	Peigne tournant à 360°	öse	Bille magnétique roulante
Nombre de gélose ensemencé par heure	Dépendant des techniciens	-	140 inoculations/h	180 inoculations/h		250 à 450 inoculations/h
Diversité des géloses ensemencées	A l'infini	-	6 silos de 40 géloses	5 silos de 30 géloses	9 silos de 42 géloses	12 silos de 60 géloses
Autres options	-	-		-	Lames pour coloration de Gram	Inoculation de lames, bouillons et plaques
Prélèvements	-	-	- Chargement en continu - Echantillons liquides uniquement	- Chargement en continu sur les racks.	- Chargement en continu - Vérification de l'inoculum (caméra) - Débouchage des tubes	- Chargement en continu - Vérification de l'inoculum (caméra) - Débouchage des tubes

Les différents systèmes automatisés, par rapport à la technique manuelle, ne sont pas beaucoup plus rapides mais permettent d'avoir une meilleure reproductibilité de l'ensemencement et une fluidité dans la prise en charge des prélèvements. En effet, l'étude de *Froment et al* a permis de montrer que l'utilisation d'un ensemenceur automatique permet une meilleure gestion du « Workflow », une amélioration de la vitesse d'interprétation et d'avoir des résultats plus précis pour les prélèvements polymicrobiens [20]. Une autre étude a montré la supériorité du système automatisé InoquIA (BD-Kiestra) par rapport au WASP (Copan) et à la technique manuelle

[17]. Il permet d'avoir davantage de colonies bien isolées évitant ainsi les repiquages pour purifier les prélèvements polymicrobiens. Ceci diminue significativement le temps de rendu des résultats et les coûts du laboratoire.

b. Identification bactérienne

Une fois les colonies bactériennes bien isolées, l'étape qui suit est cruciale : il s'agit de l'identification bactérienne. L'identification permet de fournir aux cliniciens un élément très important concernant la cause probable de l'infection, elle doit donc être fiable et rapide. Elle peut permettre une réadaptation du traitement anti-infectieux si les antibiotiques prescrits en probabiliste ne sont pas adaptés au germe identifié.

Cette identification, avant l'automatisation, était basée sur l'analyse de tests phénotypiques comme la coloration de Gram mais aussi sur l'analyse des caractères biochimiques par le biais de galeries type API (bioMérieux) qui reflètent entre autres la fermentation des sucres pour permettre une identification bactérienne par analogie avec des bases de données existantes. L'automatisation de l'identification concernait au début l'inclusion de tests phénotypiques et biochimiques contenus sur des supports miniaturisés, avec lecture et interprétation intégrées. On peut citer le Vitek[®] (bioMérieux), le Phoenix[®] (BD) et le MicroScan[®] (Beckman Coulter). C'est l'utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF utilisée pour l'identification bactérienne qui a révolutionné la microbiologie clinique de par sa rapidité et l'étendue de ses applications.

i. Techniques biochimiques et phénotypiques

a. Les techniques manuelles

Les techniques biochimiques et phénotypiques constituaient dans le passé la base de l'identification bactérienne. On pouvait retrouver notamment la coloration de Gram couplée aux techniques biochimiques qui comprenaient : les tests de fermentation des sucres, les tests enzymatiques (catalase, oxydase ...) mais aussi des tests de croissance en milieu minimum.

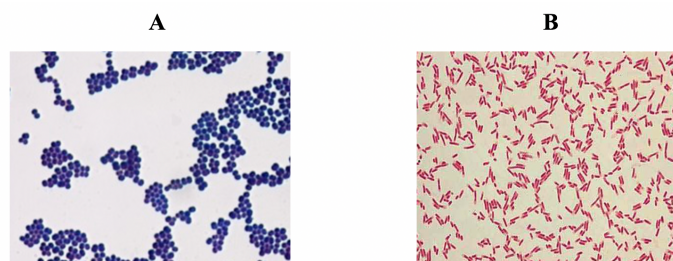
Principe de la coloration de Gram :

La coloration de Gram constitue la première étape pour décrire un microorganisme. En effet, elle va permettre de différencier les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif grâce à leurs propriétés chimiques et physiques de leur paroi cellulaire [21].

Cette coloration est une coloration double qui va utiliser le cristal violet et le Lugol qui vont colorer toutes les bactéries, puis on va réaliser une étape de décoloration à l'alcool et une étape de contre-coloration à la fuchsine.

Les bactéries à Gram-positif ont une paroi épaisse et très riche en peptidoglycane ce qui leur confère une certaine imperméabilité à la décoloration. Elles vont être capables de retenir le cristal violet et seront colorées en violet. Les bactéries à Gram-négatif possèdent une membrane externe et une couche plus fine de peptidoglycane, elles seront donc décolorées par l'alcool et apparaîtront en rose car colorées par la fuchsine. La coloration de Gram permet d'analyser la forme des bactéries pour différencier les bacilles des Cocci mais aussi de voir si elles forment des groupements particuliers comme par exemple les diplocoques en grains de café chez le *Pneumocoque* ou encore sous forme de grappe de raisins chez les *Staphylococcus aureus*.

Figure 3. Exemple d'une coloration de Gram : A- Souche de *S. aureus* en forme de grappe de raisins (Cocci à Gram +) ; B- Souche d'*Escherichia coli* (Bacille à Gram-négatif).



Principe des galeries miniaturisées de type API :

Ces tests se trouvaient d'abord sous la forme de test unitaire puis des galeries ont été développées. C'est le cas des galeries API (bioMérieux) qui regroupaient jusqu'à 50 tests de fermentation différents. C'est l'ensemble des données obtenues qui permettaient de classifier et de donner une identification bactérienne en se basant sur des référentiels contenant des bases de données de critères d'identifications bactériennes.

Les galeries API utilisent plusieurs types de tests : étude de la fermentation de divers glucides, des auxanogrammes et recherche directe d'une enzyme. Chaque tubule contient un substrat différent sur lequel le micro-organisme considéré va réagir. Ils sont remplis d'une

suspension bactérienne calibrée (de densité différente selon la galerie) puis protégés par de l'huile de paraffine pour permettre l'anaérobiose ou l'absence d'évaporation des ions volatiles afin de permettre le virage de la réaction. Les creux du support de la galerie doivent être remplis d'eau pour former une chambre humide, puis la galerie est posée dans le support avec le couvercle pardessus. L'ensemble est incubé à une température adaptée pendant 24 à 48h. Après addition des réactifs nécessaires à la révélation des différents tests, la galerie est lue conformément aux indications du fabricant et codée à l'aide de chiffres regroupés par l'analyse de 3 puits consécutifs. La comparaison de ce code à ceux référencés dans la base de données gérée par bioMérieux permet en général d'identifier ce micro-organisme.




Figure 4. Exemple d'une galerie API d'*E. coli*.



b. Les techniques automatisées

L'automatisation a débuté par le développement d'automates couplant l'ensemencement des supports des tests biochimiques avec son incubateur à un système de lecture associé à un logiciel d'interprétation. Il en existe différents types : le Vitek[®] (bioMérieux), le Phoenix[®] (BD) et le MicroScan[®] (Beckman). Ces différents systèmes sont aussi capables de réaliser les tests de sensibilité aux antibiotiques. Le temps de rendu de l'identification bactérienne va dépendre de la taille de l'inoculum, de l'agitation des systèmes d'ensemencement, de l'analyse informatique et des différents systèmes de détection de la positivité des réactions. L'analyse informatique s'effectue par comparaison des résultats obtenus à la base de données interne. Il n'y a aucun contrôle visuel possible car la réaction est révélée par fluorescence ce qui représente un gros inconvénient pour ces différents systèmes.

Table 3. Présentation des différents systèmes automatisés d'identification bactérienne basés sur l'analyse des caractères phénotypiques et biochimiques.

	Vitek 2™	MicroScan	Phoenix™
Fabricant	bioMérieux	Beckman Coulter	BD
Automate			
Utilisation	-Identification seule -Antibiogramme seul	-Identification seule -Antibiogramme seul -Identification couplée à l'antibiogramme	-Identification seule -Antibiogramme seul -Identification couplée à l'antibiogramme
Cartes d'identification	Cartes d'identification bactérienne différentes : Gram +, Gram -, NH et ANC → nécessité d'avoir une pré-orientation (coloration Gram ...)		
Contrôles visuels	Absence de contrôles visuels → utilisation de la fluorescence		
Distribution de l'inoculum	Automatisée	Manuelle	Automatisée si couplée au système AutoPrep®
Durée d'incubation interne	2h pour les Gram+ 3h pour les Gram – 6h pour ANC ET NH	2 heures	2 à 6h
Identification bactérienne	- Carte NH : bactéries du groupe HACEK, <i>Neisseria</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Capnocytophaga</i> -Carte ANC : quelques <i>Corynactéries</i> et les bactéries anaérobies	-Support spécifique HNID pour les <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i> et <i>Moraxella catarrhalis</i> -Support spécifique pour les bactéries anaérobies	Les bactéries anaérobies, <i>Haemophilus</i> et <i>Neisseria</i> ne sont pas identifiables
Rendu des résultats	Excellent = 96 à 99% Très bonne = 93 à 95% Bonne = 89 à 92% Acceptable = 85 à 88%	Probabilité élevée ≥ 85% Probabilité faible < 85% Biotype rare	1 seule identification est proposée avec une valeur de confiance de 90 à 95% Si doute → demande de tests complémentaires

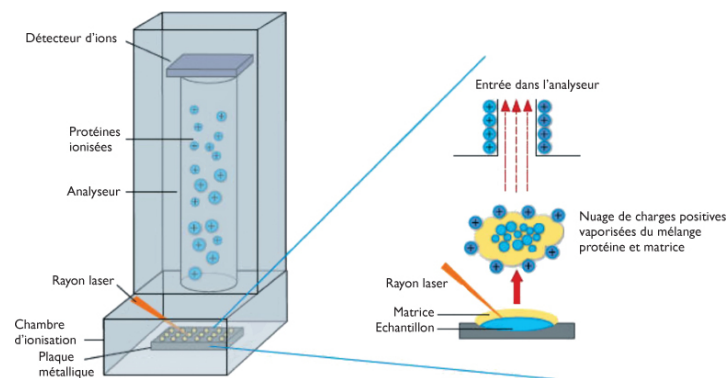
ii. Le MALDI-TOF

Principe général :

La spectrométrie de masse par MALDI-TOF est une technique basée sur l'analyse du spectre protéique. Cet appareil est composé d'un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur de temps de vol (TOF, *time-of-flight mass spectrometry*). Les différents échantillons bactériens sont déposés sur une cible (spots bactériens) et recouverts d'une matrice cristallisante qui aura un rôle protecteur pour préserver l'intégrité des molécules au cours des procédures d'analyses mais aussi un rôle très important dans l'ionisation. Ces échantillons vont être bombardés par un laser, les molécules vont s'ioniser et vont être accélérées à l'aide d'un champ électrique ce qui va leur donner un temps

de vol spécifique dans un tube sous vide. La molécule désorbée est projetée vers un détecteur, le temps de vol étant proportionnel à sa masse (m) sur sa charge (z) (m/z) (les plus légères étant détectées en premier). Les résultats sont obtenus sous forme d'une série de pics (spectre) correspondant aux différents fragments issus de la molécule originale. La gamme des m/z va de 1 000 à 20 000, soit de 1 à 20 kDa.

Figure 5. Fonctionnement général du MALDI-TOF pour l'identification bactérienne.

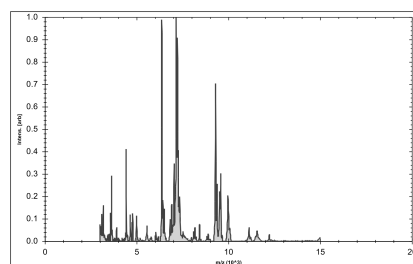


Application à l'identification bactérienne :

Le MALDI-TOF a pu être utilisé pour l'identification bactérienne car celui-ci analyse les protéines ribosomales qui présentent une diversité importante mais avec une conservation suffisante permettant de différencier les espèces par un profil protéique particulier [22]. L'identification par MALDI-TOF est plus précise et plus fiable que les méthodes par analyse phénotypique mais certaines espèces phylogénétiquement proches seront parfois peu différenciables et alors seul le genre bactérien pourra être déterminé.

Une analyse de l'ARNr 16S sera alors parfois nécessaire pour déterminer l'espèce bactérienne en question [23]. En pratique, il suffit de déposer une colonie bactérienne obtenue d'une gélose et de la déposer sur la cible. Le temps de rendu des résultats est alors très court de l'ordre de 1 à 3 heures pour un travail de routine hospitalière.

Figure 6. Exemple d'un spectre bactérien obtenu pour *Enterococcus massiliensis*.



Actuellement, il existe dans le domaine de la microbiologie deux MALDI-TOF différents : Le Microflex LT Maldi-Biotyper (Bruker®) et le Vitek-MS (bioMérieux® avec un spectromètre Shimadzu) [24-25]. Ils possèdent une base de données de spectres bactériens identifiés au niveau du genre et de l'espèce, et ils vont être capables de comparer un nouveau spectre à cette base. Un score d'identification sera déterminé, s'il est suffisant l'identification bactérienne sera donnée [26].

Les différents domaines d'application du MALDI-TOF en microbiologie clinique.

Le MALDI-TOF possède de nombreux domaines d'application que ce soit pour l'identification, le typage de souches ou permettre des analyses épidémiologiques [27].

Le MALDI-TOF n'est pas seulement utilisé pour réaliser des identifications bactériennes à partir de colonies, il peut aussi être utilisé pour réaliser une identification directe à partir du prélèvement biologique comme c'est le cas des hémocultures positives [28]. Dès que l'hémoculture est considérée comme positive par l'automate, un protocole spécial est réalisé consistant en différentes centrifugations et une lyse par acide formique afin d'obtenir l'identification correcte de la bactérie (à condition que le prélèvement soit monomicrobien). L'identification directe par MALDI-TOF a permis de gagner un temps considérable de l'ordre de 24 à 30 heures par rapport aux procédés classiques type galeries API et pourrait permettre un ajustement de l'antibiothérapie chez 12% des patients ayant une hémoculture positive [12]. L'identification directe à partir du prélèvement peut également être réalisée à partir des urines.

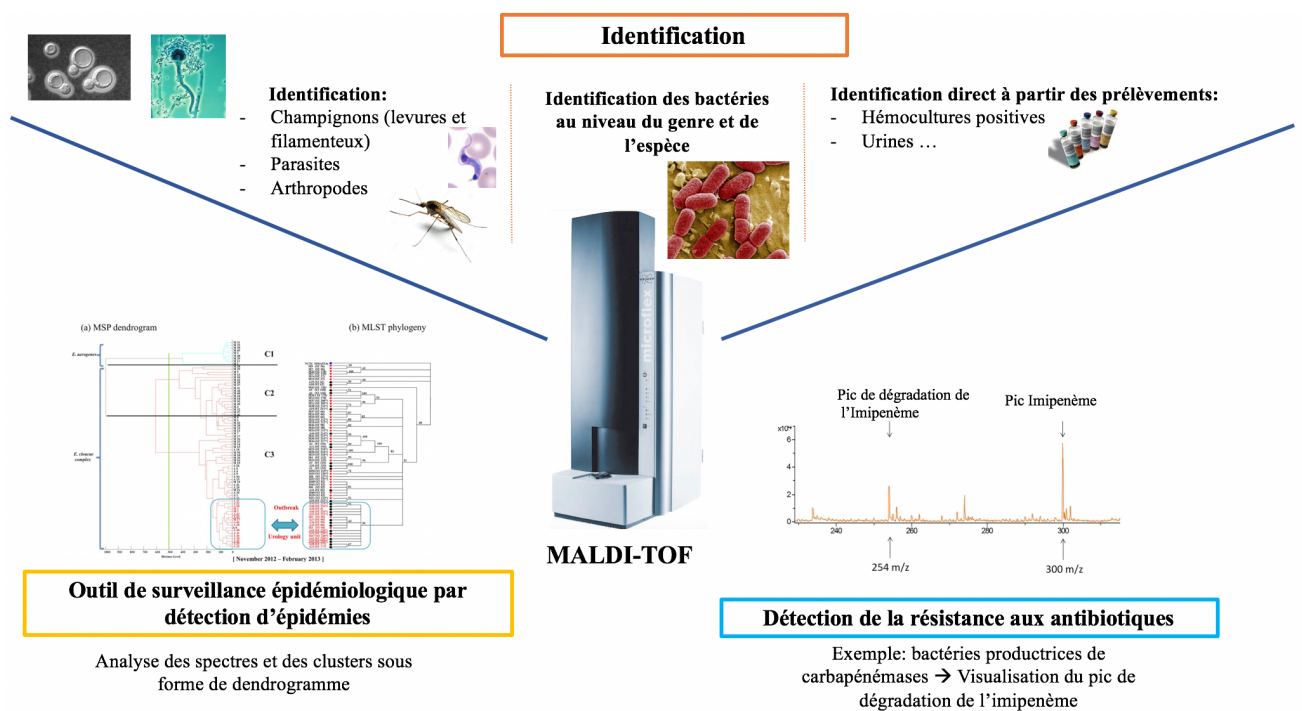
Le MALDI-TOF est aussi capable de réaliser l'identification de levures [29] et de champignons filamenteux [30-31] en mycologie et l'identification de parasites en parasitologie [32]. Il est aussi possible par exemple d'identifier directement *Plasmodium* (vecteur du paludisme) chez les anophèles afin de savoir si le moustique est infestant ou non [33]. Il offre aussi la possibilité d'identifier les sous-espèces d'arthropodes vecteurs de parasitoses de type moustiques, tiques ou encore punaises de lit à partir par exemple de l'analyse de leurs pattes. Il est également possible d'analyser le contenu de leur tube digestif et ainsi savoir s'ils sont porteurs de parasitoses ou de bactéries [34].

Le MALDI-TOF peut être aussi utilisé comme un outil de surveillance épidémiologique pour permettre la détection d'épidémies. Grâce à son logiciel, il va être capable d'analyser les spectres, de les typer et de les clustériser sous la forme d'un dendrogramme [35-36]. Le

dendrogramme va permettre la mise en évidence de souches inhabituelles ou peu communes. Cette technique a permis la mise en évidence d'épidémies nosocomiales dans un hôpital en Algérie.

Cet outil offre aussi la possibilité de détecter certaines résistances aux antibiotiques. C'est le cas notamment de bactéries à Gram-négatif qui possède une résistance aux Béta-Lactamines de type carbapénémases [37-38]. Cette technique consiste à mettre en présence la bactérie en cause avec de l'imipénème (Béta-Lactamines de la famille des carbapénèmes) et de détecter l'éventuel pic de dégradation de l'imipénème. Si la bactérie possède une carbapénémase, qui est une enzyme capable d'hydrolyser les carbapénèmes, le pic de dégradation de l'imipénème sera visible sur le spectre protéique car il possède une masse différente de l'imipénème.

Figure 7. Domaines d'applications de l'utilisation du MALDI-TOF.



Comparaison des différentes techniques :

Une étude a comparé les différents résultats d'identification de souches de *S. aureus* réalisé par le Vitek 2 utilisant les techniques phénotypiques, les séquences d'ARNr 16S et l'identification réalisée par le MALDI-TOF Bruker [39]. Les résultats obtenus sur 142 souches montrent que

le Bruker possède une meilleure identification avec 99,3% par rapport au vitek 2 qui obtient seulement 92,3%.

2- Automatisation des antibiogrammes

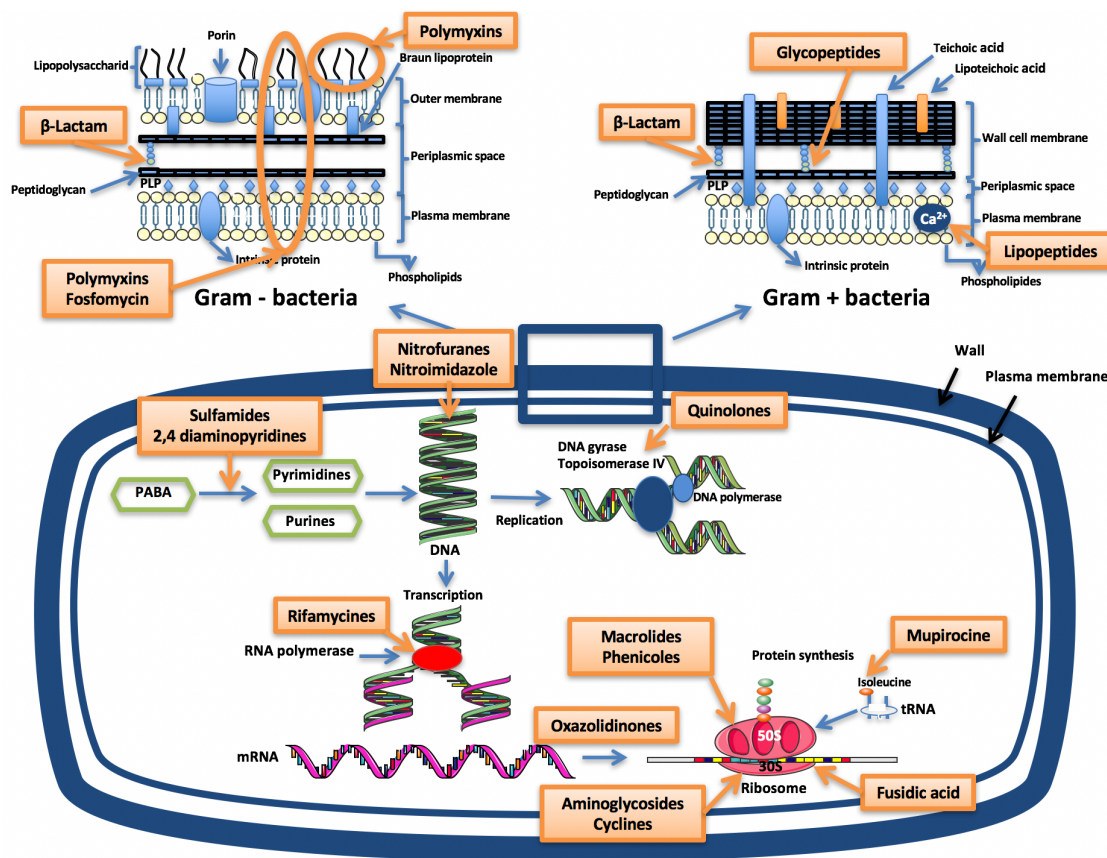
a. Réalisation des antibiogrammes

La réalisation des antibiogrammes est une étape importante qui va déterminer la sensibilité de la bactérie vis-à-vis de différents antibiotiques. Cette étape consiste à classer chaque antibiotique testé en 3 catégories : Sensible (S), Intermédiaire (I) ou résistante (R). L'analyse de l'ensemble de ces paramètres permettra de déterminer le phénotype de la bactérie et ainsi pouvoir aider le clinicien pour le choix du traitement. Les antibiogrammes doivent être réalisés selon les règles de différents systèmes experts : il s'agit en France du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, <http://www.sfm-microbiologie/org/>) et de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ou EUCAST (<http://www.eucast.org/>) [40] et aux Etats Unis du Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Ces systèmes experts ont déterminé les concentrations critiques à partir des Concentrations Minimales Inhibitrices qui délimitent les catégories S/I/R à partir de données pharmacocinétiques, pharmacodynamiques, microbiologiques et cliniques. Ces systèmes experts délivrent chaque année des référentiels contenant les bonnes pratiques de réalisation des antibiogrammes, les contrôles de qualité à tester et toutes les recommandations classées par espèce bactérienne. Le seuil de sensibilité des antibiotiques consiste à comparer les valeurs des CMI aux concentrations critiques.

Antibiotiques testés :

Les antibiotiques testés vont être spécifiques d'espèces bactériennes. En effet, nous ne testerons pas les mêmes antibiotiques pour des bactéries à Gram-positif ou des bactéries à Gram-négatif. Les antibiotiques possèdent des mécanismes d'action différents ainsi que des spectres d'action différents en fonction par exemple de la composition de la paroi bactérienne. De plus, la charge des disques peut être différente pour certains antibiotiques en fonction des espèces bactériennes. Il est donc important de bien choisir le bon panel d'antibiotiques à tester. Les référentiels des systèmes experts définissent aussi les antibiotiques à tester en fonction des espèces bactériennes.

Figure 8. Présentation des différents mécanismes d'action des principaux antibiotiques testés pour la réalisation des antibiogrammes.



i. Milieu liquide

La technique de microdilution en plaque en milieu liquide est une des techniques pour la réalisation des antibiogrammes. Cette technique repose sur le fait de réaliser des plaques contenant des dilutions d'antibiotiques afin de déterminer la CMI de la bactérie vis-à-vis des antibiotiques voulus. On peut utiliser des méthodes de dilution en bouillon ou en gélose pour mesurer quantitativement l'activité in vitro d'un agent antimicrobien contre un isolat bactérien donné.

Préparation du bouillon :

Ici nous allons développer la détermination de la CMI en milieu liquide (microdilution) à partir de bouillons de Mueller-Hinton (MH). Le MH est le milieu classique utilisé pour la réalisation des antibiogrammes. La première étape consiste à préparer le milieu de culture liquide. Ces

bouillons sont reconstitués à partir de poudres. Il faut utiliser les bouillons de MH ajusté en cations divalents pour les bactéries autres que celles à croissance lente et du bouillon MH au sang de cheval additionné de β -NAD ce qui correspond au bouillon MH-Fœtal (MH-F) pour les bactéries plus exigeantes.

L'étape suivante consiste à réaliser la gamme de dilution des antibiotiques à tester et de l'incorporer dans le bouillon de MH. Celle-ci va dépendre des laboratoires mais est en accord avec les valeurs critiques des systèmes experts afin d'obtenir la CMI vraie des bactéries.

Préparation de l'inoculum :

La préparation de l'inoculum est importante. A partir d'une culture isolée de bactérie, il faut réaliser une suspension bactérienne en solution salée pour atteindre une turbidimétrie équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme McFarland, ce qui correspond à un inoculum d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/ml. Il est recommandé d'utiliser un spectrophotomètre calibré pour ajuster l'inoculum.

Préparation des plaques :

Dans les 15 minutes qui suivent la préparation, diluer la suspension d'inoculum ajustée dans l'eau, le sérum physiologique ou le bouillon afin que, après inoculation, chaque puits contient environ 5×10^5 UFC / ml (plage de $2 \text{ à } 8 \times 10^5$ UFC / ml). La procédure de dilution pour obtenir cet inoculum final varie selon la méthode de délivrance de l'inoculum au puit individuel, elle doit être calculée pour chaque situation. Il faudra toujours ajouter 2 puits correspondants aux témoins : un témoin négatif contenant uniquement du milieu avec l'antibiotique afin de vérifier qu'il n'y a pas de contamination au niveau du milieu de culture et un témoin positif qui contient uniquement le bouillon seul sans antibiotiques et la bactérie à tester afin de s'assurer que la bactérie est vivante.

Les plaques seront alors incubées pendant 16 à 20 heures à 37°C. La lecture sera effectuée par un spectromètre de masse qui réalisera une lecture du trouble bactérien en cas de pousse ou par addition d'un colorant vital comme le rouge de Tétrazolium. La détermination de la CMI sera directement déterminée par lecture de la plaque.

Cette technique lorsqu'elle est réalisée manuellement est une technique fastidieuse mais des systèmes semi-automatisés ou automatisés ont été développés. Néanmoins, cette technique ne permet pas de vérifier clairement la présence de contaminations ou de phénomènes atypiques.

ii. Milieu solide

La méthode de diffusion par disque sur milieu solide est une technique de référence dans la réalisation des antibiogrammes, elle consiste à mesurer des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques dont le diamètre est inversement proportionnel à la CMI. Cette méthode est régie par les règles de l'EUCAST et peut être réalisée sur géloses rondes (90mm) ou sur géloses carrées (120mm).

Préparation de l'inoculum :

La première étape consiste à réaliser l'inoculum bactérien à partir de colonies bactériennes fraîches. Cet inoculum est une suspension bactérienne qui doit contenir une quantité relativement précise de bactéries. En effet, si cet inoculum est trop chargé en bactéries l'antibiogramme réalisé présentera des diamètres d'inhibition plus petits et pourra montrer de fausses résistances ; et inversement si l'inoculum possède trop peu de bactéries alors les diamètres seront plus grands et pour une bactérie faiblement résistante on pourra avoir l'impression qu'elle est sensible. Donc la réalisation de cet inoculum bactérien est une étape essentielle. L'inoculum est réalisé comme expliqué précédemment. L'inoculum bactérien obtenu doit-être inoculé sur la gélose dans les 15 min qui suivent sa préparation.

Le choix des géloses est le même que pour la microdilution sauf qu'ici nous allons utiliser des géloses solides de MH pour les bactéries à croissance ordinaire et du MH Fœtal gélosé pour les bactéries exigeantes. Tous les diamètres critiques ont été déterminés à partir de ces milieux.

Ensemencement :

La nouvelle technique d'ensemencement sur la gélose se fait par écouvillonnage dans 3 directions différentes afin d'obtenir une nappe bactérienne homogène. Pour ce faire, il faut plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne, éliminer l'excès de liquide et écouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions.

Le dépôt des disques pourra être réalisé après séchage de la gélose à l'aide de distributeurs automatiques de disques. Le nombre d'antibiotiques à tester sur une gélose est limité du fait du chevauchement des zones d'inhibition et pourra réduire les interférences entre les antibiotiques.

Un maximum de 6 disques est recommandé pour les géloses rondes et un maximum de 16 antibiotiques pour les géloses carrées. Le nombre d'antibiotiques testés va dépendre également de la bactérie, du type de prélèvement et des recommandations locales.

Une fois les disques déposés, il faut incuber les géloses pendant 16 à 24 heures à 37°C.

Lecture et interprétation :

La lecture et l'interprétation s'effectueront par la mesure des diamètres d'inhibition qui seront alors comparés aux référentiels des systèmes experts comme l'EUCAST [41-43]. Cette lecture pourra être effectuée de façon manuelle à l'aide d'une règle, d'un pied à coulisse ou d'un automate de lecture réalisant cette mesure de façon automatique.

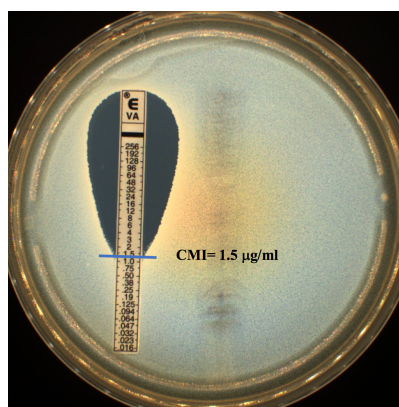
Figure 9. Tableau d'interprétation de différents antibiotiques donnés pour les souches d'*Entérobactéries* par la CA-SFM :

Autres antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)		Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)		Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Chloramphénicol	8 ¹	8 ¹	30	17	17	1. Interprétation valable pour le thiamphénilcol
Colistine	2 ²	2 ²		Note ^A	Note ^B	2. Interprétation valable pour la polymyxine B. A. Les diamètres d'inhibition ne permettent pas de détecter toutes les résistances acquises ce qui impose de déterminer la CMI en cas d'utilisation thérapeutique. Déterminer la CMI par dilution en milieu liquide (la micro-dilution est la méthode de référence). Les autres méthodes ne sont pas performantes pour cet antibiotique. B. La résistance acquise à la fosfomycine est homogène. La présence de colonies dans la zone d'inhibition ne doit pas être prise en compte.
Fosfomycine IV	64	128	200	16 ^B	13 ^B	3. Interprétation valable pour l'association fosfomycine-trométamol.
Fosfomycine orale (cystite)	64 ³	128 ³	200	16 ^B	13 ^B	
Nitrofurantoïne (cystite)	64	64	100	11	11	

Bandelette E-test :

La détermination de la CMI est également possible par cette technique qui remplace l'utilisation de disques d'antibiotiques par des bandelettes E-test qui contiennent un gradient de concentrations de l'antibiotique à tester. Cette bandelette contient un gradient prédéfini et continu de 15 concentrations d'antibiotiques. Cette bandelette est déposée sur une gélose préalablement ensemencée comme décrit précédemment. La lecture s'effectue après 16 à 20 heures d'incubation à 37°C. La détermination de la CMI s'effectue directement par lecture sur la bandelette au niveau du point d'intersection de l'inhibition bactérienne avec la bandelette.

Figure 10. Exemple de la détermination de la CMI à la vancomycine d'une souche de *Staphylococcus aureus*, la CMI étant de 1.5 µg/ml.







La méthode de diffusion par disques est une technique qui est simple, peu coûteuse. Elle offre la capacité de tester tous les antibiotiques voulus, la visualisation des contaminations est possible ainsi que la détection de phénomènes atypiques comme la présence de Béta-Lactamase à spectre étendu (BLSE) chez les bactéries à Gram-négatif. Néanmoins, les antibiogrammes sont souvent réalisés par la technique manuelle car les automates sont coûteux. La reproductibilité de l'ensemencement et la préparation de l'inoculum est opérateur dépendant ce qui est un point négatif pour cette méthode.

b. Systèmes automatisés

i. Milieu liquide

Actuellement il existe différents systèmes permettant la réalisation des antibiogrammes en milieux liquide par microdilution. Ces systèmes sont soit semi-automatisés soit entièrement automatisés. Nous allons ici développer les systèmes entièrement automatisés. Sur le marché actuel, il en existe 4 différents : le Microscan (Beckman coulter) [44], le système ID/AST Sensititre™ ARIS™ (ThermoFisher) [45], le Phoenix (Bekton Dickinson) [46] et le Vitek 2 (bioMérieux) [47]. Ces automates sont capables de déterminer les CMI vraies ou de faire une extrapolation des résultats à l'aide d'un algorithme spécifique par comparaison à une database de référence.

Table 4. Présentation des différents systèmes automatisés en milieu liquide réalisant les antibiogrammes.

	Microscan	Système ID/AST Sensititre™ ARIS™	Phoenix	Vitek 2
				
Fabricants	Beckman Coulter	ThermoFisher	Becton Dickinson	bioMérieux
Identification bactérienne couplée à l'antibiogramme	Oui	Non Cartes séparées.	Oui	Non Cartes séparées.
Préparation de l'inoculum	Prompt, Renokn SH 2000	Pipette multicanaux électroniques couplée à un auto-inoculateur AIM	Phoenix AP	-
Capacité Panels	96 microplaques 8 dilutions	64 microplaques 8 dilutions	100 microplaques 8 dilutions	30 à 120 cartes 1-6 concentrations testées qui couvrent les concentrations critiques basses et hautes
Principe de la détermination de la CMI	Lecture directe basée sur l'inhibition de la croissance bactérienne	Lecture directe basée sur l'inhibition de la croissance bactérienne	Lecture indirecte basée sur une modification de couleur liée à l'inhibition de la croissance bactérienne	Calcul grâce à un algorithme basé sur la vitesse de croissance en l'absence d'antibiotique et en présence de concentrations d'épreuves. Comparaison des résultats à une base de données.
Type de lecture	Fluorescence	Fluorescence	Colorimétrie (indicateur red-ox) et turbidimétrie	Néphélométrie
Temps de lecture	16-18 heures	16-18 heures	12 heures avec une lecture toute les 20 min	6-8 heures avec une lecture toute les 15 min
Systèmes experts d'interprétation	LabPro Alert	SENSITITRE™ SWIN™	Epicenter et BDXpert	Advanced Expert System (AES) et Myla (concentrateur de données)
Module d'épidémiologie	Oui	Oui	Oui	Non

Les avantages de ce type d'automates sont la diminution du temps technicien, la rapidité des résultats obtenus et l'obtention des CMI vraies (données quantitatives). Mais la nécessité d'avoir les CMI vraies n'est nécessaire que pour certains antibiotiques particuliers comme la vancomycine ou encore la colistine chez les bactéries à Gram-négatif. Cependant, si l'on regarde les dernières recommandations données par les systèmes experts concernant la colistine, il n'y a que la microdilution en plaque réalisée manuellement qui est recommandée.

Nous nous sommes rendu compte que certains systèmes comme le Vitek 2 n'ont une corrélation que de 0.82 pour la CMI à la colistine [48]. Ces systèmes ne sont donc pas parfaits. Les tests de sensibilité au Céfépime et à la Ceftazidime montrent de moins bons résultats avec ce type de méthode notamment pour la détection de BLSE [49].

De plus le Vitek 2 est basé sur une approximation de la résistance aux antibiotiques car celui-ci est comparé à une base de données.

ii. Milieu solide

L'automatisation de la réalisation des antibiogrammes par la méthode de diffusion par disques va permettre une standardisation des différentes étapes car c'est une technique souvent réalisée manuellement. En effet, la calibration de l'inoculum, lorsqu'elle est réalisée de façon manuelle, est opérateur dépendant et nécessite une standardisation [50].

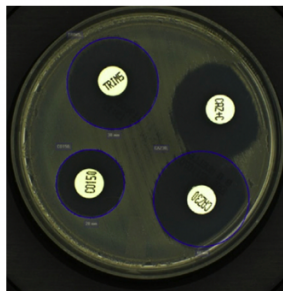
Nous allons nous intéresser ici aux ensemenceurs et aux lecteurs d'antibiogrammes.

a. Les ensemenceurs

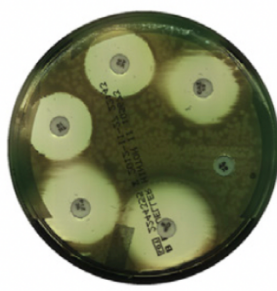
Il existe actuellement différents systèmes capables d'ensemencer des antibiogrammes en automatique : le PREVI Isola (bioMérieux) qui inocule à l'aide de son râteau [7], le WASP (Copan) qui inocule à l'aide d'une oëse, l'InoquI A (BD-Kiestra) avec une inoculation par bille magnétique et le Prelud qui inocule à l'aide d'un écouvillon. Seuls le Prelud et le WASP ont la capacité de déposer les disques d'antibiotiques de façon automatique.

Ces systèmes automatisés permettent d'avoir une meilleure reproductibilité de l'ensemencement ce qui est un élément important pour la lecture et l'interprétation.

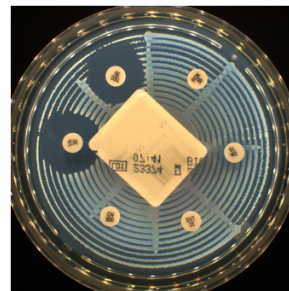
Figure 11. Comparaison des différents systèmes d'inoculation.



InoquI A BD Kiestra



WASP Copan



PREVI Isola bioMérieux

b- Lecture et interprétation des antibiogrammes :

En ce qui concerne les automates permettant la lecture et l'interprétation des antibiogrammes par la méthode de diffusion en disque, ils sont de 2 types : les automates permettant l'incubation et la lecture, et ceux ne permettant que la lecture. Au niveau des automates réalisant l'incubation et la lecture on retrouve actuellement 4 systèmes : le Sirscan 2000 (i2a) [51], le scan Advencis biosystem (bioMérieux), Full Lab Automation BD Kiestra et le WaspLab Copan/bioMérieux, les 2 derniers étant en cours de développement. Le Advencis Biosystem est capable de réaliser des vidéos en temps réel de la pousse bactérienne avec une très haute résolution d'images [52].

Les automates manuels permettant la lecture et l'interprétation sans incubation des boîtes sont : L'ADAGIO (BioRad) anciennement connu sous le nom de système Osiris (BioRad) [53], le Scan® 1200, qui de base est un scanner capable de réaliser du comptage de colonies [54] mais qui a été détourné pour réaliser la lecture et l'interprétation des antibiogrammes, et ce notamment de façon plus précoce [55].

Actuellement, peu de systèmes de lecture possèdent une haute résolution d'images. Ici on peut noter que seul le Scan® 1200 et le scanner Advencis Biosystem sont des scanners de dernière génération possédant la technologie nécessaire. La société Advencis a été rachetée par bioMérieux et ce scanner porte désormais le nom de EviSight™ Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Les différents systèmes de lecture sont capables de prendre une photo de la gélose, pour certains de faire de la reconnaissance de caractères sur les disques afin d'être sûr que les résultats rendus correspondent bien au bon antibiotique, de mesurer les diamètres et de classer en S/I/R suivant les dernières recommandations des 3 systèmes experts : EUCAST, CA-SFM et CLSI. Ces données sont ensuite transmises au Système de Gestion de Laboratoire (SIL) par l'Adagio et le Sirscan. Ils peuvent être additionnés d'un module d'épidémiologie par le biais ou non d'un concentrateur de données propre et d'un module de traçabilité des réactifs.

Figure 12. Présentation des différents systèmes d'acquisition d'images permettant la lecture et l'interprétation des antibiogrammes.

Systèmes avec incubateur intégré		Systèmes de lecture et d'interprétation automatisés des antibiogrammes en milieu solide		Systèmes sans incubateur intégré		
Système d'acquisition	EviSight™ Compact bioMérieux	Sirscan® i2a	Bionic V3®	Adagio BioRad	Scan 1200® Interscience	Scan 4000® Interscience
Types de boîtes	Géloses rondes (maximum de 6 géloses)	Gélose rondes et carrées	Géloses rondes	Géloses rondes et carrées	Gélose rondes	Géloses rondes et carrées
Reconnaissance des caractères	Non	Oui	Non	oui	Non	Non
Modules additionnels	Vidéo imaging en temps réel	Concentrateur de données Sirweb, module d'épidémiologie, connexion SIL	-	Module d'épidémiologie et de traçabilité des réactifs, connexion bidirectionnel au SIL *	Compteur de colonies	Compteur de colonies
Résolution de la caméra	100 Mp	1,2 Mp	-	1,3 Mp	1,2 Mp	1,2 Mp

iii. Comparaison des deux méthodes

Table 5. Présentation des avantages et des inconvénients de la réalisation des antibiogrammes en milieu liquide et solide.

	Milieu liquide	Milieu solide
Avantages	-Automatisation bien avancée -Meilleure reproductibilité - Validation biologique plus rapide	-Simple -Coût -Contaminations visibles -Phénomènes atypiques -Choix des antibiotiques à tester
Inconvénients	-Absence de visualisation de phénomènes atypiques -Absence de visibilité des contaminations	-Faible reproductibilité -Temps technique -Validation biologique longue et fastidieuse

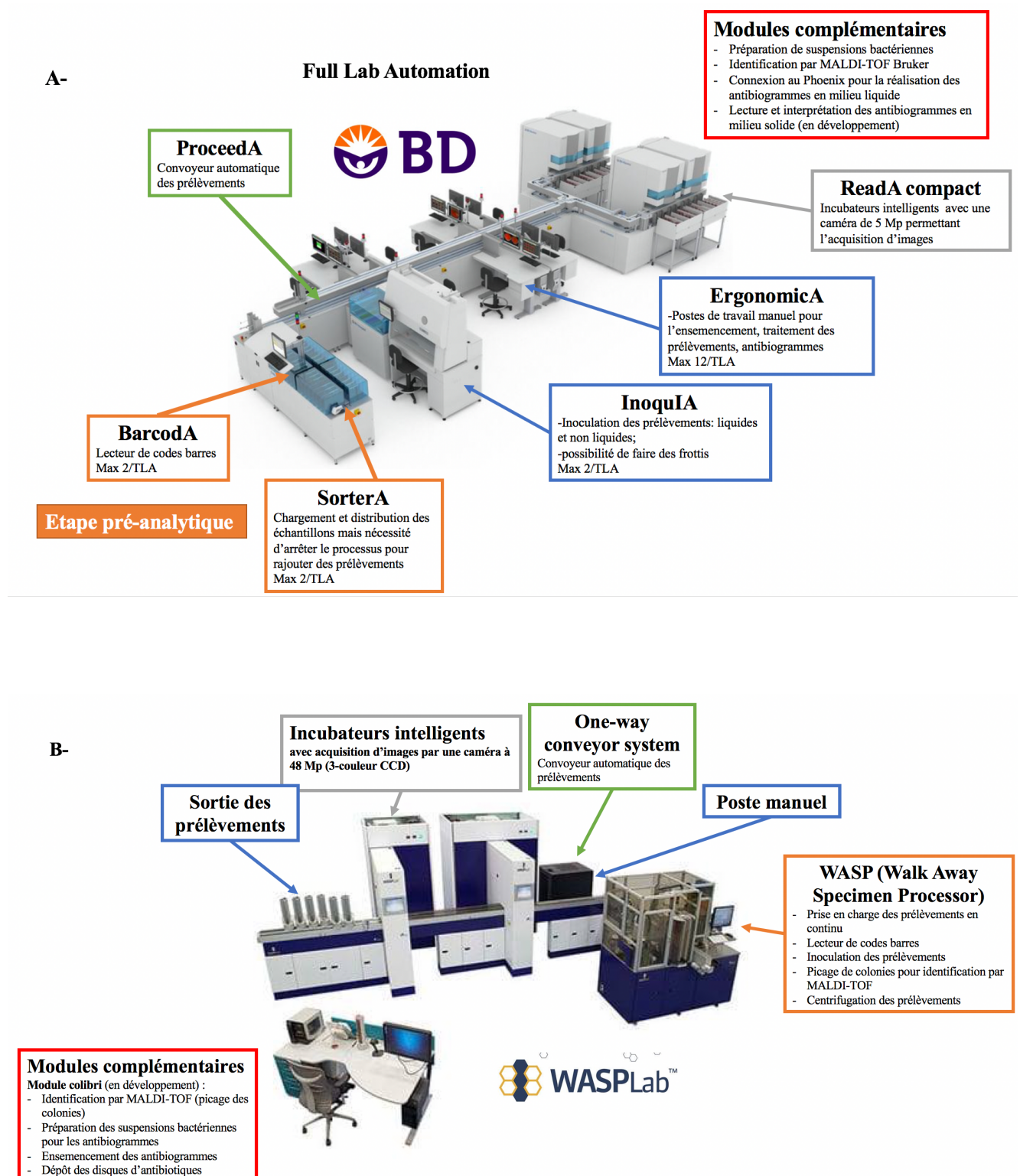
3- Chaines entièrement automatisées

L'automatisation en microbiologie a été longue à se développer en comparaison du développement d'automates de biochimie ou d'hématologie car la diversité des types et les faibles volumes d'échantillons complexifient ce processus.

Il existe actuellement sur le marché 3 grandes chaînes entièrement automatisées en cours de développement : Full Lab Automation BD Kiestra ; WASPLab-FMLA de Copan et bioMérieux et pour finir le PreLud par la société i2A mais que je ne développerai pas ici par manque d'informations. On retrouve toutes les étapes : le pré-analytique avec la distribution et la lecture des codes-barres des échantillons, les inoculateurs de prélèvements ainsi que les convoyeurs et les incubateurs intelligents possédant des caméras servant de système d'acquisition d'images de haute résolution.

A ces chaînes, plusieurs modules peuvent-être ajoutés soit sur demande soit parce qu'ils sont encore en cours de développement. C'est le cas d'automates capables de réaliser le picage des colonies et l'identification directe par MALDI-TOF ou des automates permettant de préparer les suspensions bactériennes calibrées, d'ensemencer les antibiogrammes, de déposer les disques d'antibiotiques mais aussi la lecture et l'interprétation des antibiogrammes [5].

Figure 13. Présentation des chaînes automatisées existantes : A- BD Total Lab Automation of BD Kiestra ; B- Copan/bioMérieux WASPLab.



II- Objectifs

Les objectifs de mon travail ont été multiples mais toujours axés autour de l'automatisation en microbiologie clinique et plus particulièrement autour de la réalisation et de l'interprétation des antibiogrammes.

Une première partie a consisté à évaluer différents systèmes permettant l'automatisation de l'ensemencement et la lecture plus précoce des antibiogrammes. Nous nous sommes d'abord intéressés à un automate réalisant l'inoculation des prélèvements le PREVI® Isola dont nous avons essayé de détourner le protocole afin de réaliser l'ensemencement des antibiogrammes. Pour la lecture plus précoce, nous avons évalué 2 scanners à haute résolution d'images dont le Scan Advencis Biosystem qui permet de réaliser des vidéos en temps réel de la pousse bactérienne. Le deuxième scanner est utilisé à l'origine dans le domaine de l'agroalimentaire, il est spécialisé dans le comptage de colonies bactériennes mais il offre aussi la possibilité de pouvoir lire et interpréter les antibiogrammes. Grâce à ces nouvelles technologies innovantes, nous avons cherché à démontrer que la lecture des antibiogrammes pouvait être réalisée plus précocement permettant un gain de temps de temps considérable pour le rendu des résultats aux cliniciens.

Dans une deuxième partie, nous avons cherché à développer un logiciel de reconnaissance automatique et d'interprétation des phénotypes basé sur la reconnaissance d'images pour les phénotypes les plus fréquents des bactéries les plus couramment rencontrées. Pour la mise au point du logiciel, nous avons dû créer une base de données de photos contenant ces phénotypes afin pouvoir tester ce logiciel. Un brevet a été rédigé afin de protéger cette preuve de concept originale concernant l'interprétation des antibiogrammes. Une société parisienne : la société Anéo, nous a fabriqué ce logiciel. Ce travail nous a amené à analyser l'épidémiologie locale de la résistance aux antibiotiques ainsi que la prévalence des différents phénotypes sur une période de 3 ans ce qui regroupe une analyse de plus de 100 000 antibiogrammes.

Dans une troisième partie, une revue de la littérature a été réalisée concernant les nouvelles technologies permettant la détection des bactéries multi-résistantes que ce soit au travers d'outils de surveillance épidémiologique, de nouveaux outils diagnostiques (phénotypiques ou moléculaires) mais aussi par le « Whole Genome Sequencing ».

Un autre aspect de mon travail au travers de mon DES IPR m'a amené à travailler sur un aspect important : la valorisation et la protection de la propriété intellectuelle par la rédaction de brevets.

Et pour finir durant mon internat, j'ai eu l'opportunité d'être nommée Scientific Assistant d'un journal international « International Journal of Antimicrobial Agents » (IF : 4.097) sous la supervision du Pr Rolain qui est éditeur en chef de ce journal.

III- Automatisation de l'ensemencement et lecture plus précoce des antibiogrammes

- 1. Evaluation of the PREVI® Isola automated seeder system compared to reference manual inoculation for antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method**, published in European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases [7] (IF: 2.857)

La réalisation de l'ensemencement des antibiogrammes par la méthode de diffusion par disques sur milieu gélosé reste peu développée et peu d'automates en sont capables. C'est une technique qui reste très souvent réalisée de façon manuelle et possède une faible reproductibilité (opérateur dépendant). De plus, elle est coûteuse en temps technicien.

Nous avons cherché à valider dans cet article un nouveau protocole du PREVI® Isola system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) pour réaliser l'ensemencement des antibiogrammes et nous avons comparé la lecture à 24 heures avec la technique de référence (à savoir la technique manuelle).

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps validé le protocole d'ensemencement à l'aide du cristal violet afin d'obtenir une nappe pour la bonne interprétation des disques d'antibiotiques et de la lecture des bandelettes E-tests pour l'obtention des CMI. Puis nous avons étudié la reproductibilité et la répétabilité de la méthode sur 3 souches de références en suivant les recommandations de l'EUCAST et de la CA-SFM. Pour finir nous avons étudié la concordance entre les 2 méthodes sur 258 isolats cliniques provenant de la routine du laboratoire de microbiologie de l'hôpital de la Timone, Marseille, France.

Ce travail a permis de montrer qu'il est possible de réaliser un ensemencement automatique des antibiogrammes ainsi qu'une détermination des CMI par Etest sur milieux gélosés grâce à ce nouveau protocole d'ensemencement tout en suivant les recommandations de l'EUCAST à l'aide du PREVI® Isola system.

Evaluation of the PREVI® Isola automated seeder system compared to reference manual inoculation for antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method

S. Le Page¹ · A. van Belkum² · C. Fulchiron² · R. Huguet² · D. Raoult¹ · J.-M. Rolain¹

Received: 22 May 2015 / Accepted: 4 June 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The disk diffusion (DD) method remains the most popular manual technique for antibiotic susceptibility testing (AST) in clinical microbiology laboratories. This is because of its simplicity, reproducibility, and limited cost compared to (automated) microdilution systems, which are usually less sensitive at detecting certain important mechanisms of resistance. Here, we evaluate the PREVI® Isola automated seeder system using a new protocol for spreading bacterial suspensions (eight deposits of calibrated inocula of bacteria, followed by two rounds of rotation) in comparison with manual DD reference testing on a large series of clinical and reference strains. The average time required for seeding one agar plate for DD with this new protocol was 51 s per plate, i.e., 70 agar plates/h. Reproducibility and repeatability was assessed on three reference and three randomly chosen clinical strains, as usually requested by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), and was excellent compared to the manual method. The standard deviations of zones of growth inhibition showed no statistical

discrimination. The correlation between the two methods, assessed using 294 clinical isolates and a panel of six antibiotics ($n=3,528$ zones of growth inhibition measured), was excellent, with a correlation coefficient of 0.977. The new PREVI® Isola protocol adapted for DD had a sensitivity of 99 % and a specificity of 100 % compared to the manual technique for interpreting DD as recommended by the EUCAST.

Introduction

Over the past ten years, the automation of biological specimen inoculation on agar plates, along with rapid bacterial identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, has revolutionized clinical microbiology laboratories and has facilitated the rapid processing of large-volume specimens [1–4]. Automation in microbiology is an important step which will enable large numbers of clinical samples to be processed rapidly, reproducibly, and cost-effectively. The reproducibility and reliability of automation are its two main benefits. Several automated systems have now been marketed for this purpose, but for antibiotic susceptibility testing (AST), there is still a major need for improvement compared to microbial detection and identification [2, 5]. However, because of the stringent AST requirements from the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) regarding the quality of reproducibility and repeatability of results and their interpretation, standardization of the inoculation of agar plates for the disk diffusion (DD) method remains critical. AST can be performed either manually using DD, which is currently the

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10096-015-2424-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ D. Raoult
didier.raoult@gmail.com

✉ J.-M. Rolain
jean-marc.rolain@univ-amu.fr

¹ URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France

² bioMérieux SA, Unit Microbiology, R&D Microbiology, La Balme Les Grottes 38390, France

most popular method in many laboratories, or via the use of automated liquid microdilution instruments [5]. Although AST using automated instruments (e.g., Phoenix (Becton Dickinson) [6], VITEK 2 (bioMérieux) [7], or MicroScan WalkAway (Siemens) [6]) that use turbidimetric and/or colorimetric growth detection has existed for decades [5], to the best of our knowledge, there is currently no peer-reviewed, automated instrument that is dedicated to the standardized inoculation of agar plates for DD.

Here, we report the use of the PREVI® Isola automated seeder system with a new protocol for spreading bacterial suspensions (eight deposits of calibrated inocula of bacteria, followed by two rounds of rotation) compared to the manual DD reference method recommended by the EUCAST.

Materials and methods

Bacterial isolates

The reference strains used in this study to validate and assess the repeatability and reproducibility of the technique included *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, as recommended by the EUCAST [9].

We used 294 strains in the study, including routine clinical isolates from the Clinical Microbiology Laboratory of Timone Hospital in Marseille, France, as well as reference strains from the Timone culture collection, as follows: 42 *E. coli*, 16 *Proteus mirabilis*, 38 *Klebsiella pneumoniae*, six *K. oxytoca*, 11 *Enterobacter aerogenes*, eight *E. cloacae*, 45 *P. aeruginosa*, five *Serratia marcescens*, 15 *Acinetobacter baumannii*, five *Morganella morganii*, 20 *Enterococcus faecalis*, seven *E. faecium*, 25 *S. aureus*, eight *S. epidermidis*, 12 *Streptococcus pneumoniae*, six *S. pyogenes*, 19 *S. agalactiae*, and six *Haemophilus influenzae*. All the strains are presented in Table 1, along with the resistance mechanism.

Antibiotic susceptibility testing (AST)

After identification by MALDI-TOF mass spectrometry, AST was performed on solid medium according to the DD method [3]. Inocula were obtained from fresh, 18–24-h cultures on Trypticase soy agar (TSA) or chocolate agar plus PolyVitex (PVX) for fastidious organisms. The cultures were seeded on Mueller–Hinton agar (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) alone or with blood for *Streptococcus* (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France). For the diffusion technique, this involved plating a suspension of 0.5 McFarland [$\sim 10^8$ colony-forming units (CFU)/ml] by flooding for 15 min after the inocula had already been prepared for the manually seeded plates at the same time as for the PREVI® Isola system, as recommended

the by EUCAST. Suspensions of organisms should be plated with the PREVI® Isola system immediately after making the 0.5 McFarland suspensions.

PREVI® Isola automatic seeding

Validation step of the PREVI® Isola protocol

The PREVI® Isola (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) inoculation protocol was first evaluated using a suspension of crystal violet. A machine-seeded suspension of crystal violet on blood agar enabled the number of calibrated deposits and the number of circles due to the circular application to be visualized. The new protocol for automatic plating was as follows: 40 μ l of each bacterial inoculum was prepared in sterile tubes for AST and pipetted by the instrument. Subsequently, 5 μ l of the inoculum was deposited every 45°. In other words, eight deposits were made on the agar plate. The plates were then streaked by the applicator for 720°, i.e., two rounds of streaking. Antibiotic disks were then placed on the agar plate using the same protocol as for the manual technique. The time required for streaking on agar using this new protocol was measured with a chronometer to determine the average number of plates streaked per hour.

Reproducibility was analyzed as defined by the EUCAST using the three reference strains, as well as three clinical isolates that were randomly chosen from the collection of isolates. AST for each isolate was repeated five times for the manual technique and ten times for the PREVI® Isola streaking protocol, followed by intra- and inter-precision tests. The zone of growth inhibition of each antibiotic tested was measured and the mean diameters of the manual and the new PREVI® Isola protocols were compared. For the reference strains, the zones of growth inhibition were compared to the expected diameter documented by the EUCAST.

Correlation between the two methods

The correlation between the PREVI® Isola technique and the standard reference manual technique was defined for the 294 clinical isolates and a panel of six antibiotics ($n=3,528$ zones of growth inhibition measured). A concordance curve was constructed by comparing the average zone diameters obtained for each antibiotic using the two techniques. A correlation coefficient was then calculated. The mean and standard deviation of the zone of growth inhibition in the three categories was then calculated, interpreted as susceptible, intermediate, or resistant, using the two methods of seeding AST. We then analyzed the results using Student’s *t*-test to obtain a *p*-value after verifying the equality of covariance (Fisher’s test). We considered that there was no significant difference between the two methods when the *p*-value was >0.05 .

Table 1 Presentation of the bacterial isolates used in this study

Type of analysis	Bacterial strains	Agar used for inocula	Agar used for AST	Number of strains	Type of resistance
Antibiotic susceptibility testing	<i>Escherichia coli</i>	TSA ^a	MH2 ^e	42	One strain with <i>bla</i> _{NDM-1} ; two strains with <i>bla</i> _{NDM-5} ; one reference strain ATCC
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TSA	MH2	38	Two strains with <i>bla</i> _{VIM} ; two strains with <i>bla</i> _{KPC-2} ; one strain with <i>bla</i> _{KPC-3} ; two strains with <i>bla</i> _{NDM-1} ; one strain with <i>bla</i> _{OXA-48} ; four strains resistant to colistin
	<i>Proteus mirabilis</i>	TSA	MH2	16	One strain with <i>bla</i> _{NDM-1}
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	TSA	MH2	6	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	TSA	MH2	11	One strain multi-resistant
	<i>Enterobacter cloacae</i>	TSA	MH2	8	
	<i>Serratia marcescens</i>	TSA	MH2	5	
	<i>Morganella morganii</i>	TSA	MH2	5	
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	TSA	MH2	15	One strain with <i>bla</i> _{VIM} ; two strains with <i>bla</i> _{IMP-2} ; one strain with <i>bla</i> _{OXA-23} ; one strain with <i>bla</i> _{OXA-24} ; one strain with <i>bla</i> _{OXA-58} ; two strains with <i>bla</i> _{NDM-1} ; one strain with <i>bla</i> _{VEB} ; two strains resistant to colistin
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TSA	MH2	35	One strain with <i>bla</i> _{IMP-1} ; two strains with <i>bla</i> _{VIM-2} ; one reference strain ATCC
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoid strains	TSA	MH2	10	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	TSA	MH2	20	
	<i>Enterococcus faecium</i>	COS ^b	MH2 with blood ^f	7	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	TSA	MH2	25	Two strains vancomycin-resistant; one reference strain ATCC
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TSA	MH2	8	One strain vancomycin-resistant
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	COS	MH2 with blood	12	
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	COS	MH2 with blood	19	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	COS	MH2 with blood	6	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	PVX ^c	PVX	6	
	Total	294			
Etest [®]	<i>P. aeruginosa</i>	TSA	MH2	10	
	<i>S. aureus</i>	TSA	MH2	10	
	<i>E. coli</i>	TSA	MH2	3	
	<i>Candida albicans</i>	SGC2 ^d	RPMI	3	
	<i>Candida krusei</i>	SGC2	RPMI	3	
	Total	29			

^a TSA: Trypticase soy agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

^b COS: Columbia agar+5 % sheep blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

^c PVX: chocolate agar plus PolyVitex (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

^d SGC2: Sabouraud chloramphenicol gentamicin 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

^e MH2: Mueller–Hinton agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

^f MH2 with blood: Mueller–Hinton agar with blood (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)

Analysis of discrepant results

A discrepant result was defined as a difference of interpretation (S, I, R) between PREVI[®] Isola and the manual technique according to the EUCAST guidelines. The manual technique was used as the gold standard. A very major error (VME) was

defined as a result leading to a susceptible phenotype using the PREVI[®] Isola method but which was resistant when using the standard method. A major error (ME) was defined as a result leading to a resistant phenotype using the PREVI[®] Isola method but which was susceptible when using the standard method. A minor error (mE) was defined as a result leading to an

intermediate phenotype using the PREVI® Isola method but to susceptibility or resistance using the standard method, and vice versa. All discrepant results were retested 12 times using each technique to assess the inter-experimental variability of the two techniques. The remaining discordance after this verification was tested specifically by the Etest® to determine the true minimum inhibitory concentrations (MICs).

Validation of the protocol with the Etest® technique

Twenty-six clinical isolates, including ten strains of *P. aeruginosa*, ten strains of *S. aureus*, three strains of *E. coli*, three strains of *Candida albicans*, and three strains of *C. krusei*, were used in this study. The MICs of vancomycin for *S. aureus* strains, colistin and ceftazidime for *P. aeruginosa* strains, and caspofungin, fluconazole, and voriconazole for yeast were determined using the Etest® method (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and by DD on Mueller–Hinton agar, as recommended by the EUCAST. For yeast strains, we used RPMI agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for antifungal susceptibility testing. The

MIC results were compared to those obtained using the reference manual technique.

Results

Development and validation of the PREVI® Isola protocol

The average time to seed using the PREVI® Isola and the manual technique was measured ten times. The average time for seeding one plate with PREVI® Isola was 51 s, compared to 1 min 40 s per agar for the manual technique, when 0.5 McFarland suspensions had already been prepared.

Reproducibility

All zone diameters were repeatedly within the expected ranges for the three quality control strains, and no difference was noted between the PREVI® Isola protocol and the reference method (Table 2). The reproducibility of zone diameters by the two methods for the three *E. coli*, *S. aureus*, and

Table 2 Repeated zone diameter measurements of three quality control strains and the three clinical isolates by the manual technique and the PREVI® Isola system

Isolate and method (n)	Diameter (mm, mean±SD) of zone of inhibition								
Reference strains used to evaluate the techniques with EUCAST guidelines									
<i>E. coli</i> CIP 7624	AMX	AMC	CTX	GM	AMK	AN	PEF	CIP	SXT
Reference diameter	(22.0–26.5)	(22.0–27.0)	(32.5–37.5)	(22.0–26.5)	(21.5–26.0)	(25.5–30.5)	(29.0–35.5)	(31.0–38.0)	(25.5–30.5)
Manual technique (5)	24.7±0.9	23.0±1.5	36.8±0.6	22.4±0.6	21.8±0.4	25.6±0.8	33.5±1.1	36.3±0.7	26.4±0.3
PREVI® Isola (10)	26.0±1.5	23.0±0.6	36.0±0.9	23.5±1.3	23.2±0.9	27.6±0.7	33.1±1.7	37.3±1.3	28.8±0.7
<i>P. aeruginosa</i> CIP 76110	TIC	PIP	CAZ	IMP	GM	TOB	AMK	CIP	COL
Reference diameter	(25.0–30.5)	(27.5–32.5)	(25.5–31.5)	(24.5–29.5)	(15.5–22.5)	(20.5–26.5)	(20.0–26.0)	(29.0–36.5)	(17.0–22.0)
Manual technique (5)	28.7±0.6	28.4±3.3	29.9±0.8	27.7±0.5	18.6±0.5	21.1±0.6	20.4±1.0	34.3±0.6	20.3±0.5
PREVI® Isola (9)	26.2±0.9	29.7±1.6	29.6±0.9	29.3±1.0	21.3±0.8	22.9±2.2	21.8±0.3	34.0±0.6	22.1±0.5
<i>S. aureus</i> CIP 7625	PEN	FOX	GM	SXT	ERY	L	RIF	VAN	FOS
Reference diameter	(31.0–38.5)	(28.0–35.0)	(24.0–28.5)	(28.0–32.5)	(26.5–31.5)	(24.5–29.5)	(34.0–39.0)	(17.5–20.5)	(24.0–35.0)
Manual technique (5)	33.9±1.2	34.4±0.7	27.6±0.6	29.6±0.2	31.2±0.2	28.9±0.3	37.6±0.0	20.7±0.6	29.5±1.2
PREVI® Isola (10)	34.4±0.5	34.7±1.5	27.2±0.5	30.5±0.5	30.4±0.8	29.3±0.3	37.0±0.5	20.4±0.7	30.7±1.1
Repeatability and reproducibility for three randomly selected clinical isolates									
<i>E. coli</i> (this study)	AMX	AMC	CTX	GM	AMK	AN	PEF	CIP	SXT
Manual technique (5)	6.0±0.0	17.1±0.5	29.5±0.8	27.1±0.7	16.1±0.2	6.0±0.0	13.2±1.0	23.5±0.9	23.9±0.5
PREVI® Isola (10)	6.0±0.0	17.5±1.0	30.5±0.8	31.6±2.2	16.7±0.2	6.0±0.0	15.3±0.5	23.7±0.7	26.0±1.3
<i>P. aeruginosa</i> (this study)	TIC	PIP	CAZ	IMP	GM	TOB	AMK	CIP	COL
Manual technique (5)	14.6±1.9	27.0±0.4	17.0±1.2	10.6±0.7	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	19.2±0.8
PREVI® Isola (10)	15.2±1.1	26.4±0.9	18.2±0.5	10.1±0.9	7.42±4.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	19.8±0.8
<i>S. aureus</i> (this study)	PEN	FOX	GM	SXT	ERY	L	RIF	VAN	FOS
Manual technique (5)	37.2±1.1	29.7±0.6	19.5±1.0	26.3±0.7	27.1±2.2	25.0±0.4	31.6±0.8	16.1±0.3	15.9±1.9
PREVI® Isola (10)	36.3±0.7	29.0±1.1	20.4±0.7	27.5±1.2	25.4±1.1	25.6±1.7	29.2±1.6	16.1±0.5	22.1±2.2

AMX amoxicillin, AMC amoxicillin–clavulanate, CTX cefotaxime, GM gentamicin, AMK amikacin, AN nalidixic acid, PEF pefloxacin, CIP ciprofloxacin, SXT trimethoprim–sulfamethoxazole, TIC ticarcillin, PIP piperacillin, CAZ ceftazidime, IMP imipenem, TOB tobramycin, COL colistin, PEN penicillin G, FOX cefoxitin, ERY erythromycin, L lincomycin, RIF rifampicin, VAN vancomycin, FOS fosfomicin

P. aeruginosa clinical isolates was also excellent and reproducible, and no differences were noted between the PREVI® Isola protocol and the reference method (Table 1).

Correlation between the two methods on clinical isolates

Figure 1 shows examples of the results obtained for DD using the PREVI® Isola system compared to using the manual reference technique. The raw concordance curve of measurements of the zone diameter between the two methods was excellent, with a correlation coefficient of 0.974 (Fig. 2a). The specificity of the PREVI® Isola method was 97 %, sensitivity 97 %, positive predictive value 98 %, and negative predictive value 97 %. Among the 294 strains, the percentage of discrepant results was 1.5 %, with 0.26 % VME (four

diameters), 0.06 % ME (one diameter), and 1.16 % mE (18 diameters), as presented in Supplementary Table S1. All the results of the statistical analysis are presented in Table 3 and all *p*-values were >0.05. In conclusion, no significant differences between the zones of growth inhibition using these two methods has been demonstrated (Table 3).

The 23 discrepant results were reanalyzed 12 times using the two techniques for inter-method variability. The results showed that only six diameters continued to conflict for one antibiotic; the remainder were not discrepant and were most likely due to operating errors or real inter-method variability (Supplementary Table S2). The six remaining discrepant results were for piperacillin–tazobactam with a β -lactamase inhibitor for four isolates and imipenem for the two other strains, and were mainly due to variability in the manual technique.

Fig. 1 Photos showing the concordance of the zones of growth inhibition between the manual technique and the PREVI® Isola protocol, labeled as follows: **a** isolate of *Klebsiella pneumoniae*; **b** isolate of *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamases (ESBLs); **c** isolate of *Staphylococcus aureus*

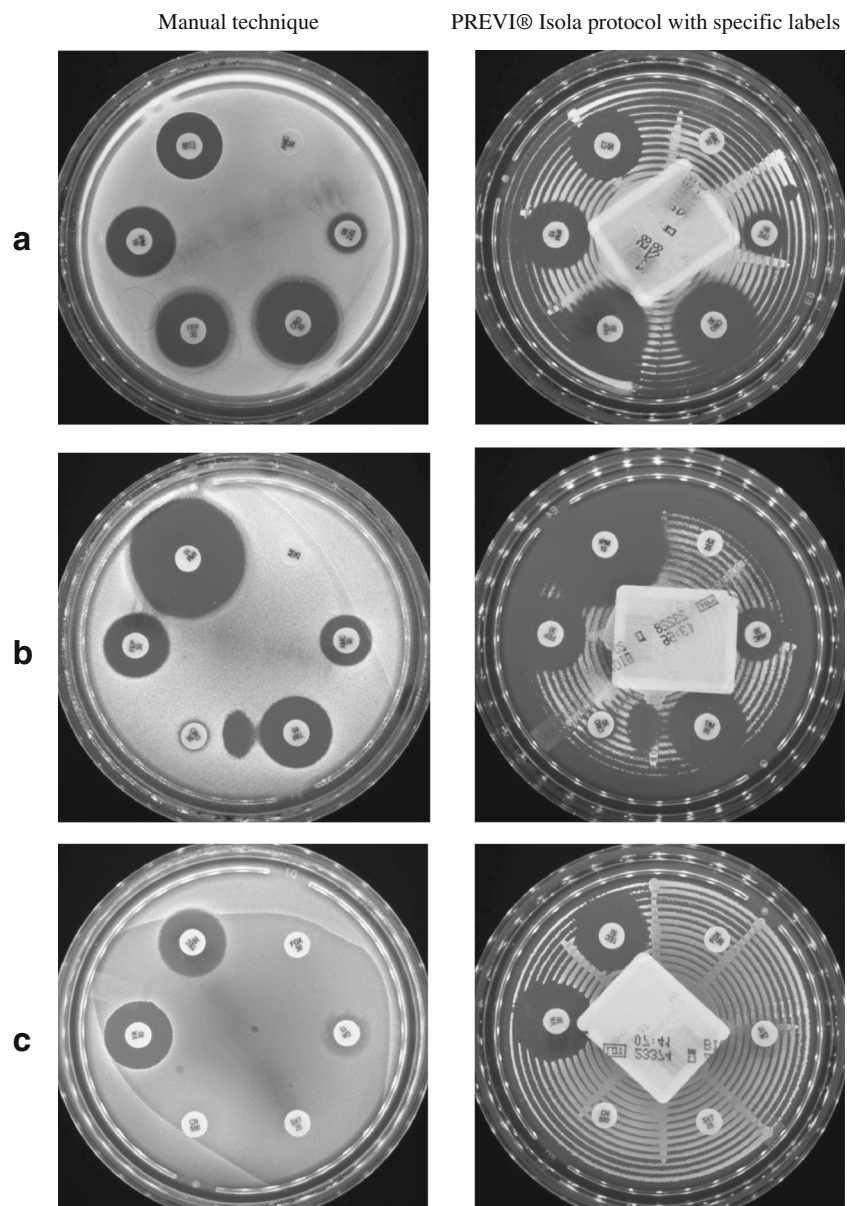
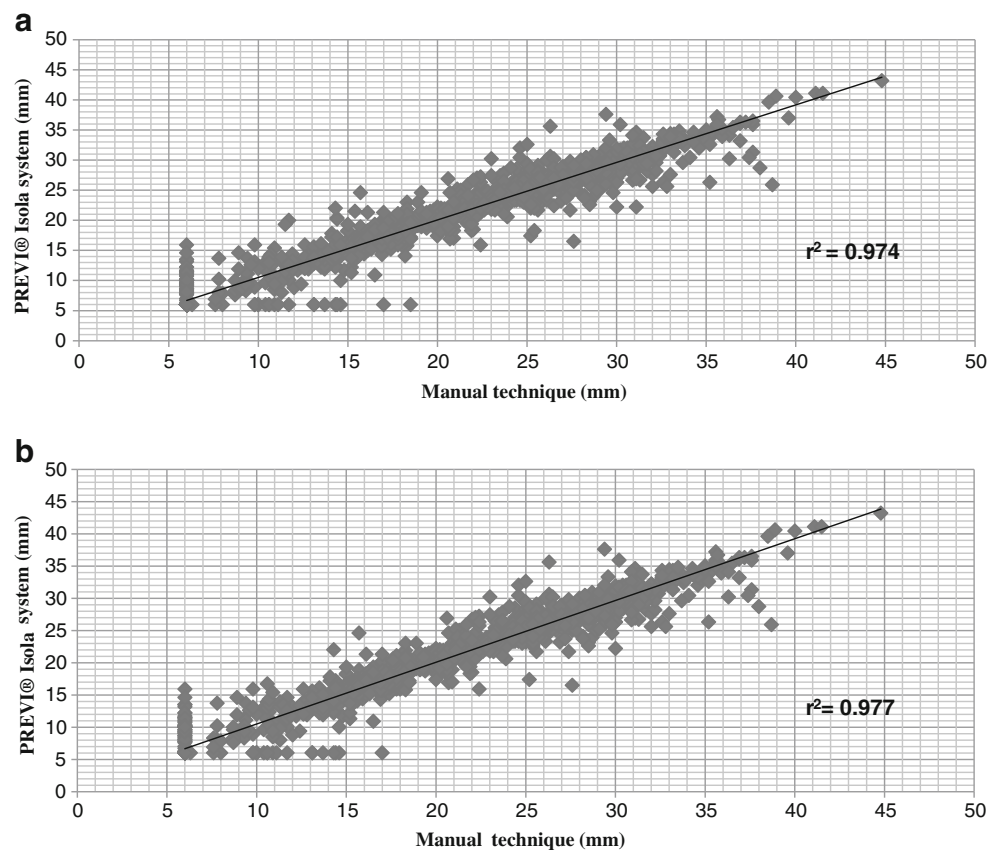


Fig. 2 Study of the correlation between the diameters obtained by the manual technique and the PREVI® Isola protocol for each antibiotic tested on the 294 strains ($n=1,764$): **a** raw r^2 with all the results; **b** corrected r^2 after reanalysis of discrepant results



After correcting for discrepant results, the concordance curve showed a correlation coefficient of 0.977 (Fig. 2b), the sensitivity and negative predictive value were 99 %, and the specificity and positive predictive value were 100 %.

Validation of the protocol with the Ettest® technique

The results show that the MICs, as defined by the PREVI® Isola protocol, were concordant with those obtained using the manual reference technique, with less than one dilution difference in the MICs (Table 3). Figure S1 gives an example of an MIC determination obtained after streaking with the PREVI® Isola method compared to the reference manual techniques for vancomycin for *S. aureus* (Fig. S1A) and for ceftriaxone for *E. coli* (Fig. S1B).

Discussion

We compared the use of the PREVI® Isola automated seeder system using a new protocol with the manual reference method for DD, as recommended by the EUCAST, to analyze a large series of reference and clinical strains. Although it is well known that the PREVI® Isola instrument is a robust and reproducible instrument for inoculating biological samples on a large variety of solid media [4, 8], to the best of our

knowledge, this is the first study to evaluate the performance of an automated system for streaking DD plates. We show that the reproducibility of the method was excellent, with rapid plating: 51 s per agar and without the lack of reproducibility of the manual technique, which was operator-dependent. Furthermore, the accuracy of DD for a representative number of clinical bacterial isolates that were susceptible or resistant to different antibiotics meant that this method could be approved as an alternative in the clinical microbiology laboratory. This system allows six antibiotics plated on 90-mm-diameter agar plates to be tested, but it would be possible to test 12 antibiotics for AST if two agar plates were seeded at the same time. Indeed, according to current international recommendations, a technique should be considered clinically valid when the percentage of VME is lower than 1.5 %, if the MEs do not exceed 3 %, and if the new method has an overall agreement of >90 % with the reference method [5]. This was the case in our study, which analyzed a large series of bacterial species and antibacterial drugs, and had an VME of only 0.25 %, an ME of 0.06 %, and a correlation coefficient of 0.977 with the reference method. We found that streaking the plates with a standardized inoculum was highly consistent, precise, and rapid, a critical point in the accuracy and reproducibility of DD. The zone of growth inhibition with the PREVI® Isola system was observed to be 2 to 5 mm larger than the manual technique for susceptible strains, but this does

Table 3 Statistical analysis of the 294 strains between the two methods of seeding: manual technique versus the PREVI® Isola system

Antibiotic(s)	EUCAST (mm)	Isolate(s)	Statistical analysis	No. tested	Concordant results			Comments			
					S	I	R				
Amoxicillin	16–21	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>E. faecium</i>		84	35	4	38				
			Mean diameter manual technique					26.9±3.4	18.0±0.7	6.0±0	
			Mean diameter PREVI® Isola					26.8±2.6	18.8±2.1	6.0±0	
				Student's test: <i>p</i> -value	>0.99	0.48	>0.99	NS			
	≥16	<i>H. influenzae</i>		6	3		3				
			Mean diameter manual technique					10.8±4.5		24.3±2.8	
Mean diameter PREVI® Isola			11.3±4.2						25.2±3.3		
			Student's test: <i>p</i> -value	0.90		0.70	NS				
Ticarcillin	≥22	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. aeruginosa</i> mucoid strains		45	1		44				
			Mean diameter manual technique							11.1±5.3	
			Mean diameter PREVI® Isola							10.8±5.1	
				Student's test: <i>p</i> -value			0.78	NS			
	Amoxicillin–clavulanate	16–21	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i> ; <i>S. marcescens</i> ; <i>M. morgani</i>		131	33	22	75			
				Mean diameter manual technique					23.4±2.1	18.6±1.9	7.6±3.1
Mean diameter PREVI® Isola				23.7±2.2					19.1±1.9	7.4±3.0	
				Student's test: <i>p</i> -value	0.46	0.38	0.69	NS			
18–22		<i>A. baumannii</i>		15			15				
			Mean diameter manual technique							6.1±0.4	
	Mean diameter PREVI® Isola								6.1±0.2		
			Student's test: <i>p</i> -value			>0.99	NS				
≥21	<i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. pyogenes</i> ; <i>S. agalactiae</i>		37	36		1					
		Mean diameter manual technique					30.4±3.6				
		Mean diameter PREVI® Isola					30.2±3.3				
				Student's test: <i>p</i> -value	0.80			NS			
	≥15	<i>H. influenzae</i>		6	6						
			Mean diameter manual technique					28.6±7.8			
Mean diameter PREVI® Isola			29.5±8.3								
			Student's test: <i>p</i> -value	0.85			NS				
Ticarcillin–clavulanate	≥22	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. aeruginosa</i> mucoid strains		45	3	7	35				
			Mean diameter manual technique					26.2±1.4	22.9±0.7	10.8±5.9	
			Mean diameter PREVI® Isola					24.5±0.5	22.3±0.9	10.5±5.5	
				Student's test: <i>p</i> -value	0.11	0.13	0.82	NS			
	22–24	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i>		58	26	5	25				
			Mean diameter manual technique					28.5±2.7	22.4±1.4	15.3±5.9	
Mean diameter PREVI® Isola			28.5±2.6					22.3±1.2	15.0±6.0		
			Student's test: <i>p</i> -value	>0.99	0.90	0.86	NS				
Piperacillin–tazobactam	17–21	<i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i> ; <i>S. marcescens</i> ; <i>M. morgani</i>		73	40	10	20				
			Mean diameter manual technique					25.6±3.3	18.9±1.0	9.4±3.9	

Table 3 (continued)

Antibiotic(s)	EUCAST (mm)	Isolate(s)	Statistical analysis	No. tested	Concordant results			Comments
					S	I	R	
Cefepime	14–19	<i>A. baumannii</i>	Mean diameter PREVI® Isola	15	26.0±3.6	18.8±1.0	10.2±3.7	NS
			Student's test: <i>p</i> -value		0.61	0.83	0.50	
			Mean diameter manual technique		1	1	12	
			Mean diameter PREVI® Isola				6.6±1.9	
			Student's test: <i>p</i> -value				6.8±1.9	
							0.80	
	≥19	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. aeruginosa</i> mucoid strains	Mean diameter manual technique	45	30		13	NS
			Mean diameter PREVI® Isola				6.6±1.9	
			Student's test: <i>p</i> -value				0.80	
			Mean diameter manual technique				10.5±3.2	
			Mean diameter PREVI® Isola				11.8±4.1	
			Student's test: <i>p</i> -value				0.72	
Cefepime	≥24	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i> ; <i>S. marcescens</i> ; <i>M. morgani</i>	Mean diameter manual technique	131	86		45	NS
			Mean diameter PREVI® Isola					
			Student's test: <i>p</i> -value					
			Mean diameter manual technique				30.3±3.4	
			Mean diameter PREVI® Isola				30.0±3.1	
			Student's test: <i>p</i> -value				0.55	
	23–26	<i>A. baumannii</i>	Mean diameter manual technique	15			15	NS
			Mean diameter PREVI® Isola				6.0±0.0	
			Student's test: <i>p</i> -value				6.0±0.0	
			Mean diameter manual technique				>0.99	
			Mean diameter PREVI® Isola				26	
			Student's test: <i>p</i> -value					
≥19	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. aeruginosa</i> mucoid strains	Mean diameter manual technique	45	17	1	26	NS	
		Mean diameter PREVI® Isola				9.0±4.4		
		Student's test: <i>p</i> -value				9.4±4.7		
		Mean diameter manual technique				23.5±2.7		
		Mean diameter PREVI® Isola				23.4±2.4		
		Student's test: <i>p</i> -value				0.91		
Ceftazidime	≥19	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. aeruginosa</i> mucoid strains	Mean diameter manual technique	45	3		41	NS
			Mean diameter PREVI® Isola				9.7±4.5	
			Student's test: <i>p</i> -value				9.5±4.7	
			Mean diameter manual technique				20.8±1.5	
			Mean diameter PREVI® Isola				20.8±1.5	
			Student's test: <i>p</i> -value				0.26	
Ceftriaxone	23–26	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i> ; <i>S. marcescens</i> ; <i>M. morgani</i> ; <i>A. baumannii</i>	Mean diameter manual technique	146	67	12	67	NS
			Mean diameter PREVI® Isola					
			Student's test: <i>p</i> -value					
			Mean diameter manual technique				30.5±3.0	
			Mean diameter PREVI® Isola				30.3±3.1	
			Student's test: <i>p</i> -value				0.57	
	≥30	<i>H. influenzae</i>	Mean diameter manual technique	6	4		2	NS
			Mean diameter PREVI® Isola				24.9±0.9	
			Student's test: <i>p</i> -value				24.7±0.9	
			Mean diameter manual technique				8.2±4.6	
			Mean diameter PREVI® Isola				8.3±4.6	
			Student's test: <i>p</i> -value				0.58	
Imipenem	17–24	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ;	Mean diameter manual technique	146	90	17	32	NS
			Mean diameter PREVI® Isola					
			Student's test: <i>p</i> -value					
			Mean diameter manual technique				37.0±5.9	
			Mean diameter PREVI® Isola				36.7±5.0	
			Student's test: <i>p</i> -value				0.94	

Table 3 (continued)

Antibiotic(s)	EUCAST (mm)	Isolate(s)	Statistical analysis	No. tested	Concordant results			Comments
					S	I	R	
		<i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i> ; <i>S. marcescens</i> ; <i>M. morgani</i> ; <i>A. baumannii</i>	Mean diameter manual technique		27.6±2.9	21.4±1.9	7.7±3.3	
			Mean diameter PREVI® Isola		27.6±2.7	22.2±1.0	8.5±3.9	
			Student's test: <i>p</i> -value		>0.99	0.15	0.43	NS
	17–22	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>P. aeruginosa</i> mucoid strains		45	26	4	15	
			Mean diameter manual technique		24.6±2.6	19.3±1.5	10.9±3.3	
			Mean diameter PREVI® Isola		25.0±3.0	19.5±1.5	11.4±3.3	
			Student's test: <i>p</i> -value		0.64	0.79	0.68	NS
Colistin	≥15	<i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i> ; <i>A. baumannii</i> ; <i>S. marcescens</i> ; <i>M. morgani</i>		88	66		21	
			Mean diameter manual technique		16.7±1.2		7.5±2.3	
			Mean diameter PREVI® Isola		17.0±1.3		7.4±2.1	
			Student's test: <i>p</i> -value		0.17		0.88	NS
Cefoxitin	25–27	<i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i>		33	13	1	19	
			Mean diameter manual technique		29.9±2.7		12.9±5.8	
			Mean diameter PREVI® Isola		29.5±2.5		13.8±6.3	
			Student's test: <i>p</i> -value		0.70		0.68	NS
Clindamycin	≥15	<i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i>		33	27		6	
			Mean diameter manual technique		31.4±3.8		6.0±0.0	
			Mean diameter PREVI® Isola		31.5±3.9		6.0±0.0	
			Student's test: <i>p</i> -value		0.92		>0.99	NS
	17–21	<i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. pyogenes</i> ; <i>S. agalactiae</i>		37	27	3	7	
			Mean diameter manual technique		30.2±4.1	17.9±1.6	6.0±0.0	
			Mean diameter PREVI Isola		30.2±3.6	19.8±1.3	6.0±0.0	
			Student's test: <i>p</i> -value		>0.99	0.18	>0.99	NS
Trimethoprim–sulfamethoxazole	13–16	<i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i>		33	30		3	
			Mean diameter manual technique		24.7±3.4		6.0±0.0	
			Mean diameter PREVI® Isola		25.1±2.8		6.0±0.0	
			Student's test: <i>p</i> -value		0.54		>0.99	NS
Gentamicin	≥20	<i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i>		33	31		2	
			Mean diameter manual technique		28.7±4.5		10.4±6.2	
			Mean diameter PREVI® Isola		28.8±3.8		10.4±6.2	
			Student's test: <i>p</i> -value		0.93		>0.99	NS
	≥17	<i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. pyogenes</i> ; <i>S. agalactiae</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>E. faecium</i>		63	60		3	
			Mean diameter manual technique		26.0±4.2		7.3±2.2	
			Mean diameter PREVI® Isola		26.2±3.6		8.3±4.0	
			Student's test: <i>p</i> -value		0.78		0.72	NS
	14–16	<i>H. influenzae</i>		6	6			
			Mean diameter manual technique		20.8±2.2			

Table 3 (continued)

Antibiotic(s)	EUCAST (mm)	Isolate(s)	Statistical analysis	No. tested	Concordant results			Comments	
					S	I	R		
Vancomycin	≥17	<i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. pyogenes</i> ; <i>S. agalactiae</i>	Mean diameter PREVI® Isola	70	21.8±1.9			NS	
			Student's test: <i>p</i> -value		0.42				
					60		9		
	8–17	<i>E. faecalis</i> ; <i>E. faecium</i>	Mean diameter manual technique	26	23.4±4.7		14.5±3.1	NS	
			Mean diameter PREVI® Isola		23.3±4.3		15.0±3.2		
			Student's test: <i>p</i> -value		>0.99		0.73		
Teicoplanin	≥17	<i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i>	Mean diameter manual technique	33	18.8±1.4		6.0±0.0	NS	
			Mean diameter PREVI® Isola		19.5±1.6		6.0±0.0		
			Student's test: <i>p</i> -value		0.25	0.07	>0.99		
	8–17	<i>E. faecalis</i> ; <i>E. faecium</i>	Mean diameter manual technique	26	5	28		NS	
			Mean diameter PREVI® Isola		12	13	1		
			Student's test: <i>p</i> -value		>0.99		0.79		
Erythromycin	24–26	<i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. pyogenes</i> ; <i>S. agalactiae</i>	Mean diameter manual technique	37	17.6±0.8		16.2±0.5	NS	
			Mean diameter PREVI® Isola		18.1±1.1		16.5±0.3		
			Student's test: <i>p</i> -value		0.19	0.08			
	21–23	<i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. pyogenes</i> ; <i>S. agalactiae</i>	Mean diameter manual technique	37	20	2	14	NS	
			Mean diameter PREVI® Isola		29.9±3.1		24.4±0.6		18.9±6.0
			Student's test: <i>p</i> -value		29.4±2.5		24.3±0.5		18.7±6.1
Doxycycline	21–23	<i>S. pneumoniae</i> ; <i>S. pyogenes</i> ; <i>S. agalactiae</i>	Mean diameter manual technique	37	27.4±3.5		14.3±1.3	NS	
			Mean diameter PREVI® Isola		27.9±3.0		14.5±1.5		
			Student's test: <i>p</i> -value		0.63		0.68		
	17–21	<i>E. faecalis</i> ; <i>E. faecium</i>	Mean diameter manual technique	26	1	1	24	NS	
			Mean diameter PREVI® Isola		7.8±2.0		7.5±1.8		
			Student's test: <i>p</i> -value		0.59				
Nitrofurantoin	≥15	<i>E. faecalis</i> ; <i>E. faecium</i>	Mean diameter manual technique	26	19.0±1.9		12.8±3.0	NS	
			Mean diameter PREVI® Isola		20.2±2.2		12.1±2.8		
			Student's test: <i>p</i> -value		0.07		0.59		
	≥23	<i>H. influenzae</i>	Mean diameter manual technique	6	29.2±4.3			NS	
			Mean diameter PREVI® Isola		29.2±4.2				
			Student's test: <i>p</i> -value		>0.99				
Rifampicin	≥18	<i>H. influenzae</i>	Mean diameter manual technique	6	23.8±3.1			NS	
			Mean diameter PREVI® Isola		24.1±3.6				
			Student's test: <i>p</i> -value		0.88				

S sensitive, I intermediate, R resistant, NS no significant difference between the two methods

not change the interpretation of resistance to the antibiotic. In order to clarify whether this phenomenon could affect the overall interpretation, we calculated the *p*-value for all 294 clinical isolates presented in Table 3. No statistical difference was observed. One possible explanation for such a difference could be that the volume of inoculum seeded by PREVI® Isola was lower in comparison with the manual technique. In addition, the streaking protocol was also usable for MIC determination by the Etest® but had to be placed on the sides of the agar. The center of the agar is the localization of the deposits and represents the most significant concentration in bacteria. Implementation of this protocol on any PREVI® Isola instrument is very easy because it requires a single software update, and the new protocol can be used in addition to the standard inoculation protocol, resulting in increased flexibility when using the instrument in clinical microbiology laboratories. The results obtained in this study are entirely in line with the manual reference DD method, and the EUCAST expert rules could, therefore, be applied without changes [9]. Thus, this new protocol could be considered a new element in the automation of clinical microbiology laboratories, and should accelerate inoculation, identification, and AST by DD, which are key factors in the reduction of mortality, hospital stay, and healthcare costs [10, 11].

Conclusion

Our study demonstrated that the PREVI® Isola instrument was highly concordant with the manual method for disk diffusion (DD), thus renewing interest for microbiologists wishing to continue using this method as a reference, and could be easily implemented in PREVI® Isola instruments worldwide.

Acknowledgments We are very grateful to Fanny Languasco and Linda Hadjadj for their technical assistance. This work was partly funded by IHU Méditerranée Infection.

Conflict of interest Alex van Belkum, Corine Fulchiron, and Rachel Huguet are employees of bioMérieux, the company which manufactures and sells the PREVI® Isola instrument.

References

1. Greub G, Prod'homme G (2011) Automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect* 17(5): 655–660
2. van Belkum A, Durand G, Peyret M, Chatellier S, Zambardi G, Schrenzel J, Shortridge D, Engelhardt A, Dunne WM Jr (2013) Rapid clinical bacteriology and its future impact. *Ann Lab Med* 33(1):14–27
3. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49(4):543–551
4. Mischnik A, Mieth M, Busch CJ, Hofer S, Zimmermann S (2012) First evaluation of automated specimen inoculation for wound swab samples by use of the Previ Isola system compared to manual inoculation in a routine laboratory: finding a cost-effective and accurate approach. *J Clin Microbiol* 50(8):2732–2736
5. Jorgensen JH, Ferraro MJ (2009) Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 49(11):1749–1755
6. Winstanley T, Courvalin P (2011) Expert systems in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 24(3):515–556
7. Renaud FN, Bergeron E, Tigaud S, Fuhrmann C, Gravagna B, Freney J (2005) Evaluation of the new Vitek 2 GN card for the identification of gram-negative bacilli frequently encountered in clinical laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24(10):671–676
8. Glasson JH, Guthrie LH, Nielsen DJ, Bethell FA (2008) Evaluation of an automated instrument for inoculating and spreading samples onto agar plates. *J Clin Microbiol* 46(4): 1281–1284
9. Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy C-J, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G (2013) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 19(2):141–160
10. Galar A, Yuste JR, Espinosa M, Guillén-Grima F, Hernáez-Crespo S, Leiva J (2012) Clinical and economic impact of rapid reporting of bacterial identification and antimicrobial susceptibility results of the most frequently processed specimen types. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(9):2445–2452
11. Galar A, Leiva J, Espinosa M, Guillén-Grima F, Hernáez S, Yuste JR (2012) Clinical and economic evaluation of the impact of rapid microbiological diagnostic testing. *J Infect* 65(4):302–309

2. Real-time video imaging as a new and rapid tool for antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion method: A paradigm for evaluating resistance to imipenem and identifying extended-spectrum – lactamases, published in International Journal of Antimicrobial Agents [52] (IF: 4.097)

L'incubateur Advencis Bio-system (Advencis, Mutzig, France) est entièrement automatisé et a été racheté par bioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Il est capable d'incuber 6 géloses rondes (90 mm), de réaliser l'acquisition des images en temps réel et grâce à un logiciel spécifique dédié à l'analyse d'images, de réaliser des vidéos de ces géloses en temps réel. Ce système peut être utilisé pour détecter et compter des colonies avant que la lecture à l'œil ne soit possible.

Ici, nous avons utilisé cet instrument pour la surveillance en temps réel de la sensibilité à l'imipénème et la détection du phénotype BLSE chez les Entérobactéries. En effet, nous avons étudié 15 bactéries résistantes à l'imipénème (confirmées préalablement par PCR) dont 10 d'entre elles avaient une résistance aux carbapénèmes bien caractérisée d'origine enzymatique et 5 souches d'Entérobactéries présentant une BLSE (3 souches d'*E. coli* et 2 souches de *K. pneumoniae*). Nous avons utilisé comme témoins 5 souches bactériennes de phénotype sauvage. Les diamètres des zones d'inhibition des souches résistantes à l'imipénème et des souches sauvages étaient lus toutes les 30 minutes. Ces images possédaient une résolution de 100 millions de pixels, chaque photo ayant une taille d'environ 200 Mo.

La sensibilité des bactéries à Gram-négatif de type sauvage à l'imipénème déterminée par la lecture des diamètres d'inhibition, était détectable dès 3,5 h (temps moyen 3,7 +/- 0,45 h), alors que les bactéries productrices de carbapénémases d'origine enzymatique pouvaient être correctement catégorisées en souches résistantes à l'imipénème dès 3h (temps moyen 4,2 +/- 0,8 h). Ce temps est rallongé pour les carbapénémases d'origine chromosomique. Pour les bactéries productrices de BLSE, la sensibilité et la spécificité étaient de 100% dès 4h30 d'incubation.

Ce système s'il était utilisé en routine, permettrait de diminuer le temps de détection de phénomènes particuliers comme la présence de carbapénémases ou encore de bactéries productrices de BLSE en moins de 6 heures. Ce système est très concurrentiel, il permet d'une part de diminuer les coûts d'hospitalisation (par gain de temps et l'amélioration de la prise en charge du patient) mais aussi de limiter la diffusion des bactéries multi-résistantes (BMR) par

sa rapidité de détection, permettant ainsi de pouvoir isoler précocement les patients porteurs de ces BMR. Néanmoins, la capacité de chargement de l'appareil étant restreinte à seulement 6 géloses de 90 mm au maximum, cela représente un élément limitant pour l'utilisation en routine. L'évolution vers un automate ayant une plus grande capacité et possédant une connexion bidirectionnelle avec le système de gestion de laboratoire pourrait permettre son intégration au flux du laboratoire de microbiologie à l'hôpital.



Short Communication

Real-time video imaging as a new and rapid tool for antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion method: A paradigm for evaluating resistance to imipenem and identifying extended-spectrum β -lactamases



Stéphanie Le Page, Didier Raoult, Jean-Marc Rolain*

URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2014

Accepted 27 August 2014

Keywords:

Video imaging

Carbapenemase

Antibiotic resistance

Antibiotic susceptibility testing

ABSTRACT

The disc diffusion method has long been considered the standard technique for antibiotic susceptibility testing (AST) in clinical microbiology laboratories because of its simplicity, reproducibility and low cost compared with commercial automated microdilution systems that are usually more rapid but less sensitive for detecting important mechanisms of resistance. Here we measured reading zone diameters around antibiotics in a series of 25 well-characterised Gram-negative bacteria by the disc diffusion technique in real-time using an Advencis Bio-System instrument consisting of a real-time high-resolution video imager in a dedicated incubator. The susceptibility of wild-type Gram-negative bacteria to imipenem, determined by reading the diameter of inhibition, was detectable as early as 3.5 h (mean time 3.7 ± 0.45 h), whereas carbapenemase-producing Gram-negative bacteria could be correctly categorised as early as 3 h (mean time 4.2 ± 0.8 h) of incubation. Similarly, the characteristic champagne cork aspect of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) could be detected by the system as early as 3.5 h. Moreover, we present here for the first time video movies of the appearance of the diameter of inhibition by disc diffusion in real-time. This preliminary study using a new and innovative technology provides for a renewed interest for microbiologists who wish to continue to use the disc diffusion method as a reference method for AST. New video imaging technology presents a proof of concept that could improve the real-time management of patients with AST within a very rapid turnaround time and can provide a large financial saving for hospitals.

© 2014 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Rapid species-level identification of clinically relevant bacteria along with rapid antibiotic susceptibility testing (AST) may have a potential influence on the clinical use of antibiotic therapy in infectious diseases. It is well known that adjustment of antimicrobial treatment, especially for bloodstream infections, based on bacterial species identification is beneficial to the patient and improves clinical outcome if bacterial identification is available within the first 24 h from the diagnosis of severe sepsis [1,2]. Rapid microbiological diagnostic testing also has economic importance for hospitals [3,4]. At least two important goals must be achieved to administer early appropriate antibiotic treatment critical for cost savings

and to avoid the spread of antibiotic resistance. The first objective is to correctly identify the bacteria to species level, which is now feasible owing to matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) analysis within hours, including identification directly from blood culture bottles [5,6]. Use of MALDI-TOF analysis for identification of bacteria directly from positive blood cultures using automated systems has resulted in a 24–30 h time gain compared with conventional methods [6,7]. It has been demonstrated that early microbial identification by MALDI-TOF even without AST may lead to antimicrobial therapy adjustment in 12% of patients with positive blood culture [7]. The second objective is to decrease the time required for AST of bacteria, which usually requires an additional overnight subculture of the isolated bacterium. In certain circumstances, there is a need to quickly obtain AST results to detect particular resistance mechanisms, to precisely adjust the antimicrobial therapy, or to isolate patients, especially for patients with multidrug-resistant bacteria and/or for

* Corresponding author. Tel.: +33 4 921 32 43 75; fax: +33 4 91 38 77 72.
E-mail address: jean-marc.rolain@univ-amu.fr (J.-M. Rolain).

bacteria that could be responsible for an outbreak in an intensive care unit. Currently, AST in clinical microbiology laboratories is performed either manually by the disc diffusion method, which is the most popular technique because of its simplicity, reproducibility and low cost, or by using automated liquid microdilution instrument systems such as the Phoenix™ (Becton Dickinson), VITEK® 2 (bioMérieux) or MicroScan® WalkAway® (Siemens) systems that use turbidimetric and/or colorimetric growth detection [8]. However, the latter techniques can be used to evaluate the susceptibility to antibiotics for clinical isolates usually within 18–24 h after bacterial identification and are costly. Thus, there is a need for the development of innovative automated instruments that provide faster AST results at a lower cost while minimising equipment requirements. The advantages of the disc diffusion method are that bacteria can be observed on agar plates and that the selection and number of antibiotics to be tested can be adapted to any clinical microbiology laboratory using an in-house strategy. However, with the exception of the Sirscan instrument (i2A), plate reading is usually performed manually, and AST results are obtained only after 18–24 h of incubation. The Sirscan instrument is an automatic reader of inhibition diameters that lacks sensitivity because of the low quality of the CCD camera (300 pixels); thus, AST results are often delayed. Although automation of AST had already been developed, this step has not been revolutionised using innovative technologies compared with bacterial inoculation and identification. In this context, the rapid emergence and wide spread of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and carbapenemases in Gram-negative bacteria represent a real challenge and a model for the development of innovative methods for the rapid detection of these organisms in the routine laboratory. Here we report as a proof of concept the use of real-time video imaging in a dedicated incubator, the Advencis Bio-System Incubator, as a new and rapid tool for the early detection of ESBLs as well as resistance to imipenem in a series of well-defined ESBL-producing bacteria and imipenem-resistant clinical isolates.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial isolates

A total of 35 clinical isolates were used in this study, including 5 ESBL-producing Enterobacteriaceae, 20 carbapenemase-producing bacteria, 5 non-enzymatic carbapenem-resistant bacteria and 5 wild-type carbapenem-susceptible Gram-negative bacteria as controls (details regarding these isolates are provided in Supplementary Tables S1 and S2). Molecular evidence in support of the resistance to carbapenems for the carbapenemase-producing bacteria was obtained by PCR and sequencing as previously reported [9,10].

2.2. Antibiotic susceptibility testing

AST was performed by the disc diffusion method on Mueller–Hinton agar (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), and minimum inhibitory concentrations (MICs) for imipenem were determined using the Etest method (bioMérieux) as previously reported [10]. Isolates with an imipenem MIC of $>8 \mu\text{g/mL}$ and an inhibition zone diameter $<17 \text{ mm}$ were considered as imipenem-resistant, whereas a diameter $\geq 24 \text{ mm}$ was considered indicative of imipenem susceptibility according to the Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [11]. Detection of a characteristic champagne cork aspect for the ESBL phenotype was performed using two discs containing ceftriaxone and amoxicillin/clavulanic acid as recommended by CA-SFM.

2.3. Real-time video imaging for susceptibility testing in an Advencis Bio-System Incubator

The Advencis Bio-System Incubator (Advencis, Mutzig, France) is an integrated and fully automated instrument capable of incubating Petri dishes and directly obtaining images of the dishes using dedicated software for image analysis and video imaging in real-time. This system can be used to detect and count colonies before reading by eye is possible. In this study, this instrument was used for real-time monitoring of susceptibility to imipenem and for detection of the ESBL phenotype for a collection of clinical isolates that were tested by the standard disc diffusion method as described above. The Advencis system is a software application for real-time monitoring, and various alerts can be set. The device can simultaneously incubate and analyse six 90-mm agar plates in real-time between 18 °C and 44 °C. Here the instrument was configured to collect high-resolution images every 30 min from the beginning to 24 h of incubation. The Advencis system uses the full potential of digital imaging technology and generates one 100 million-pixel image for each agar plate at each time interval. For each image, the system is able to identify an area of 20 pixels that corresponds to a microcolony that is 45 μm in diameter. The size of each image for one 90-mm agar plate is ca. 200 Mo. Finally, Biomovie software (Advencis) was used to generate a video clip of the bacterial growth and to obtain a measurement of the diameter of inhibition from images collected by the incubator during the incubation period.

3. Results

Among the 25 imipenem-resistant bacteria, 20 had a well-characterised enzymatic support for resistance including class A (*bla_{KPC}*), class B (*bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* and *bla_{IMP}*) and class D (*bla_{OXA}*) carbapenemase-encoding genes, and 5 had evidence of non-enzymatic imipenem resistance (see Supplementary Table S1). All except one isolate (*bla_{OXA-48}* in *Klebsiella pneumoniae*) had an imipenem MIC $>8 \mu\text{g/mL}$ and a zone diameter $<17 \text{ mm}$ as determined using Etest and standard disc diffusion methods, respectively (see Supplementary Table S1).

The inhibition zone diameters for imipenem determined every 30 min using the Advencis Bio-System Incubator for a representative wild-type isolate are presented in Fig. 1A. The diameter was readable using the instrument as early as 3.5 h with a mean time of $3.7 \pm 0.45 \text{ h}$ (range 3.5–4.5 h). Interestingly, the mean diameter at this time period ($25.2 \pm 1.61 \text{ mm}$) did not differ significantly from the mean diameter measured at the endpoint at 24 h ($26.3 \pm 1.70 \text{ mm}$) ($P > 0.05$) [12]. This diameter was completely stabilised after 6–7 h of incubation (see Supplementary Table S1). Thus, it was possible to predict the susceptibility to imipenem for the wild-type strains as early as 3.5 h of incubation in real-time owing to the display boxes of the instrument, which is observable in real-time. A sensitivity and specificity of 100% for the detection of susceptibility to imipenem was attained as early as 4.5 h. For carbapenemase-producing bacteria, the diameter was readable using the instrument as early as 3 h (*K. pneumoniae* isolate with NDM-1; see Supplementary Table S1) with a mean time of $4.2 \pm 0.8 \text{ h}$ (range 3–7 h). This diameter was completely stabilised after 6–16 h of incubation (see Supplementary Table S1; Fig. 1B). Although the mean diameter after stabilisation ($14.3 \pm 2.6 \text{ mm}$) decreased significantly at the endpoint at 24 h ($9.3 \pm 4.6 \text{ mm}$) ($P < 0.05$), this change did not affect the interpretation of the results except for one isolate (*bla_{OXA-48}* in *K. pneumoniae*). The *K. pneumoniae* isolate harbouring a *bla_{OXA-48}* carbapenemase-encoding gene had an imipenem MIC of $2 \mu\text{g/mL}$ based on the Etest (susceptible category) but had a zone diameter of 16.9 mm at the endpoint (resistant category) and a zone diameter between 16.9 mm and

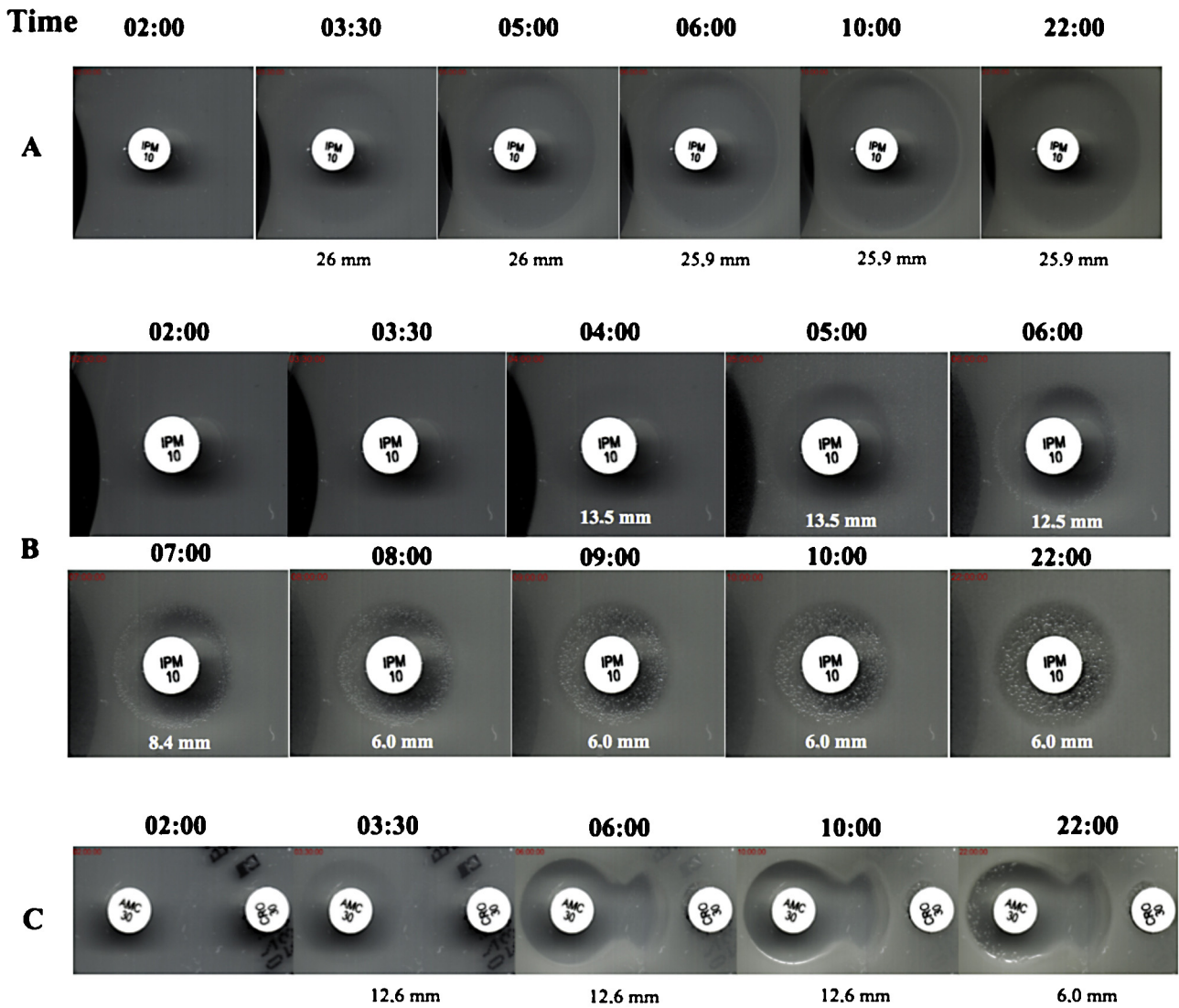


Fig. 1. Kinetics of the appearance of the zone diameter: (A) *Klebsiella pneumoniae* isolate susceptible to imipenem and (B) *K. pneumoniae* isolate with *bla*_{KPC-2}, a carbapenemase-encoding gene. (C) Kinetics of the appearance of the champagne cork aspect of an extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*.

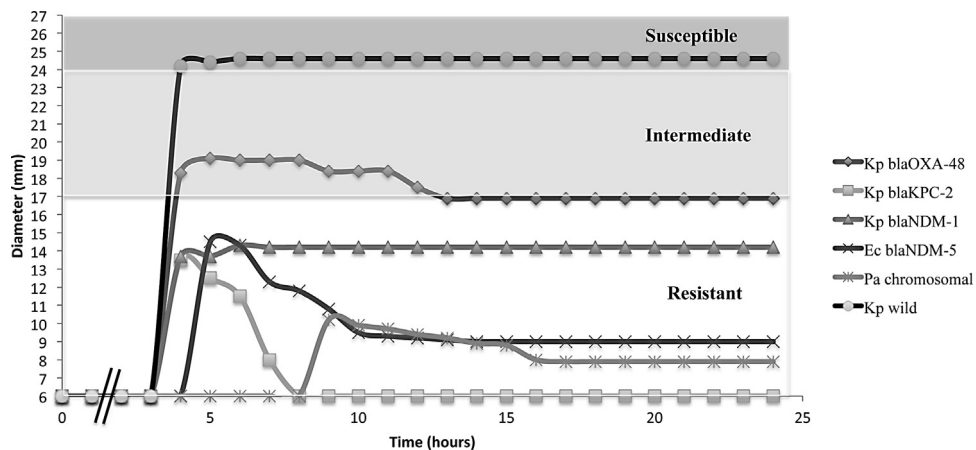


Fig. 2. Representative zone diameters of the inhibition of imipenem-resistant isolates read by the Advencis Bio-System instrument over time. Kp, *Klebsiella pneumoniae*; Ec, *Escherichia coli*; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*.

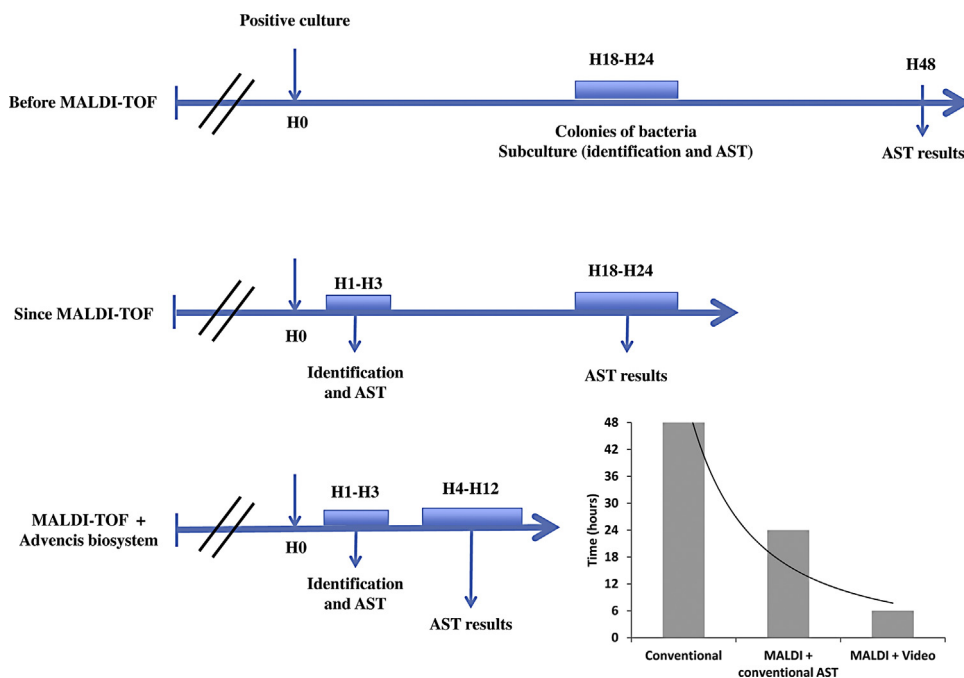


Fig. 3. Overall evolution of the turnaround time in the workflow from culture to identification and antibiotic susceptibility testing results (AST) in clinical microbiology laboratories. MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight.

19 mm from 4 h to 6.5 h of incubation (intermediate category). This phenomenon can probably be explained by the fact that *bla*_{OXA-48} carbapenemase possesses a weaker carbapenemase activity that is difficult to detect in the clinical microbiology laboratory. The kinetics in Fig. 2 shows that this strain from the beginning to the end of the experiment always has a diameter within the intermediate breakpoint demonstrating the atypical phenotype. Moreover, it was possible to view in real-time heteroresistant phenotypes with a larger diameter appearing first followed after 6–10 h by the appearance of pinpoint colonies within the circle and in contact with the disc (data not shown). The sensitivity and specificity for the detection of resistance to imipenem was 100% as early as 5.5 h. Finally, for the five isolates resistant to imipenem without carbapenemase activity, the zone diameter was readable after 9.3 ± 0.58 h (range 9–11 h) and was characteristic of imipenem resistance (diameter <17 mm) (see Supplementary Table S1). Fig. 1 represents screenshots of the diameter zones collected at different time intervals for a wild-type isolate (Fig. 1A) and a carbapenemase-producing isolate (Fig. 1B). For the ESBL-producing bacteria, the characteristic champagne cork aspect could be detected by the system as early as 3.5 h (see Supplementary Table S2), and the kinetics of the appearance of the champagne cork aspect is presented in Fig. 1C. The sensitivity and specificity of the detection of the champagne cork aspect reached 100% as early as 4.5 h. Fig. 2 represents the evolution of the zone diameter around the imipenem disc over time for the main imipenem-resistant isolates that were tested. Finally, all pictures captured every 30 min from 0 to 24 h were used to create a video using Biomovie software to show the dynamic appearance of the diameter zone around the imipenem disc for *bla*_{KPC} *K. pneumoniae* and an ESBL-producing *Escherichia coli* isolate in real-time (Supplementary videos 1 and 2).

4. Discussion

Here we present the first report of a new instrument capable of real-time monitoring of the appearance of diameter zones for AST using the disc diffusion method. Although commercial instruments are already available for reading zones of inhibition, to the

best of our knowledge such visualisation in real-time using high-resolution imaging has not been previously described and may represent a major advance in this field. In 1998, Korgenski and Daly used the BIOMIC video reader system to interpret the susceptibility to antibiotics based on disc diffusion susceptibility results with automated reading and data interpretation; however, this system was tested only after 18–24 h of incubation [13]. Subsequently, another instrument, the OSIRIS video-assisted reading system for disc diffusion susceptibility testing, was compared with conventional manual reading [14]. Again, this system only provided an image analysis-based technique for the automated reading of inhibition zone diameters of disc diffusion at an endpoint, i.e. after 18–24 h of incubation. In 2000, the Sirscan automated zone reader, which measures zone diameters using an automated image analyser, was evaluated with a series of 368 clinical isolates and was compared with the standard manual technique [15]. Although the instrument was reliable for reading zone diameters with good correlation with the manual technique, the evaluation was performed at an endpoint after 18–24 h of incubation. Here, using a real-time high-resolution imaging system, we demonstrate that the overall turnaround time necessary to interpret AST results from the disc diffusion method could be dramatically reduced using high-resolution imaging. Conventional methods using the disc diffusion method usually require 18–24 h to obtain AST results when using isolated colonies or positive blood cultures compared with <6 h required here using the proposed video imaging technique. This turnaround time is also reduced compared with automated liquid microdilution methods that usually require 10–18 h. Fig. 3 represents the overall evolution of the turnaround time for identification and AST before and after the implementation of MALDI-TOF for bacterial identification and the current possible evolution using new instruments including the new Advencis Bio-System instrument. Although the current instrument has the capacity to incubate and analyse only six agar plates, we believe that the use of such technology in a clinical microbiology setting would benefit by getting an instrument with a higher capacity. Finally, this rapid method using the disc diffusion method for AST also allows for the detection of certain important resistance mechanisms such as the ESBL

phenotype that cannot be detected using the liquid microdilution method. Moreover, automated liquid microdilution systems have other disadvantages, including the cost of the instruments and the absence of visual control of the growth of colonies on agar plates to detect potential contamination. Finally, this new method is highly competitive because it could also replace molecular methods for the rapid detection of carbapenemases.

In conclusion, this seminal study demonstrates for the first time that AST used to screen for resistance to imipenem or to detect ESBL-producing Gram-negative bacteria could be obtained by the disc diffusion method within a very rapid turnaround time using a powerful digital imaging technology. To the best of our knowledge, this is the first report of the detection and real-time visualisation of resistance to imipenem in a *bla*_{NDM-1} *K. pneumoniae* isolate by the disc diffusion method within only 3 h. This new technology has renewed the interest of microbiologists who wish to continue to use the disc diffusion method as a reference method for AST. Further ongoing tests are being performed to assess the reliability of this technique in a large series of bacteria and antibiotics and to optimise the software to provide automatic alerts for antibiotic resistance. Video imaging provides a proof of concept that this new technology could improve the management of patients using AST results available in real-time and will also have a great impact in terms of financial costs for hospitals. It is now well established that a faster reporting of the identification and AST of clinical isolates is associated with a significant reduction both of hospital stay and hospital costs [3,4]. This new method could allow for the design of personalised AST-based assays for clinical units matched to bacterial species.

Funding: This study was partly funded by IHU Méditerranée Infection (Marseille, France).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.08.014>.

References

- [1] Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med* 2003;115:529–35.
- [2] Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1306–11.
- [3] Galar A, Yuste JR, Espinosa M, Guillén-Grima F, Hernández-Crespo S, Leiva J. Clinical and economic impact of rapid reporting of bacterial identification and antimicrobial susceptibility results of the most frequently processed specimen types. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:2445–52.
- [4] Galar A, Leiva J, Espinosa M, Guillén-Grima F, Hernández S, Yuste JR. Clinical and economic evaluation of the impact of rapid microbiological diagnostic testing. *J Infect* 2012;65:302–9.
- [5] Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. On-going revolution in bacteriology: routine identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009;49:543–51.
- [6] La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 2009;4:e8041.
- [7] Mutters NT, Hodiament CJ, de Jong MD, Overmeijer HP, van den Boogaard M, Visser CE. Performance of Kiestra Total Laboratory Automation combined with MS in clinical microbiology practice. *Ann Lab Med* 2014;34:111–17.
- [8] Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 2009;49:1749–55.
- [9] Bakour S, Touati A, Sahli F, Ameer AA, Haouchine D, Rolain JM. Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76:529–31.
- [10] Sefraoui I, Berrazeg M, Drissi M, Rolain JM. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microb Drug Resist* 2014;20:156–61.
- [11] Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:141–60.
- [12] Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45:493–6.
- [13] Korgenski EK, Daly JA. Evaluation of the BIOMIC video reader system for determining interpretive categories of isolates on the basis of disk diffusion susceptibility results. *J Clin Microbiol* 1998;36:302–4.
- [14] Sánchez MA, Sánchez del SB, Loza E, Baquero F, Cantón R. Evaluation of the OSIRIS video reader system for disk diffusion susceptibility test reading. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:352–7.
- [15] Medeiros AA, Crellin J. Evaluation of the Sirscan automated zone reader in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2000;38:1688–93.

3. Evaluation of the Scan[®] 1200 as a rapid tool for reading antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion technique, published in Journal of Antimicrobial Chemotherapy [55] (IF: 4.919)

En microbiologie clinique, certains instruments sont capables de lire et d'interpréter automatiquement les diamètres des zones d'inhibition pour les tests de sensibilité aux antibiotiques réalisés par la méthode de diffusion par disque (DD). La résolution réelle des systèmes de lecture commerciaux est faible et des scanners de haute résolution d'images ont été développés pour la microbiologie.

Nous avons évalué et comparé la lecture et l'interprétation des antibiogrammes par la méthode de DD en utilisant le Scan[®] 1200 (Interscience, Saint Nom, France) par rapport au système Sirscan[®] (i2a, Montpellier, France) sur 211 souches cliniques isolées au laboratoire de bactériologie de la Timone, afin de réaliser la validation de méthode en vue de son utilisation au laboratoire de routine. De plus, nous avons évalué la possibilité de lire les antibiogrammes plus tôt dès 6 ou 8 h d'incubation (contre 24 h habituellement) sur 121 souches de bactéries à Gram-négatif, 76 souches de bactéries à Gram-positif ou Gram-négatif non fermentantes.

La validation de la technique a été évaluée sur trois souches de référence comme demandé par l'EUCAST pour l'analyse de la répétabilité et de la reproductibilité de la méthode.

La corrélation entre les deux méthodes, évaluée à l'aide des 211 isolats cliniques (n= 2 439 zones d'inhibition de croissance mesurées), était excellente avec un coefficient de corrélation de 0,97 et seulement 1,3% de résultats discordants.

Concernant la lecture plus précoce, les résultats préliminaires démontrent la possibilité de pouvoir lire les antibiogrammes pour des combinaisons antibiotiques-espèces après 6 et 8 h d'incubation pour des bactéries à Gram-négatif à croissance rapide. En effet, le coefficient de corrélation obtenu à 6 h d'incubation était de 0,96 avec 3% de résultats discordants et à 8 h de 0,98 avec seulement 1% de résultats discordants. Néanmoins, si l'on regarde les bactéries à Gram-positif ou les bactéries à Gram-négatif non-fermentantes on se rend compte que ce temps est allongé à 10h d'incubation pour les bactéries à Gram-positif et 11-12 h pour les bactéries non-fermentantes.

Le Scan[®] 1200 présente de nombreux avantages grâce à sa petite taille, sa rapidité d'utilisation

et son imagerie haute résolution permettant d'améliorer le temps de rendu des résultats d'antibiogrammes après seulement 6 à 8 h d'incubation mais ceci seulement pour les bactéries à Gram-négatif à croissance rapide. Ce système de lecture d'antibiogramme représente un très bon outil robuste alternatif pour une utilisation de routine dans les laboratoires de microbiologie clinique.

Evaluation of the Scan[®] 1200 as a rapid tool for reading antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion technique

Stéphanie Le Page, Gregory Dubourg and Jean-Marc Rolain*

URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France

*Corresponding author. Tel: +33-4-91-32-43-75; Fax: +33-4-91-38-77-72; E-mail: jean-marc.rolain@univ-amu.fr

Received 26 February 2016; returned 9 May 2016; revised 15 July 2016; accepted 17 July 2016

Objectives: In clinical microbiology, some instruments are able to automatically read inhibition zone diameters for antibiotic susceptibility testing (AST) performed by the disc diffusion (DD) method. The actual resolution of commercial reader systems is low and high-resolution scanners have been developed for microbiology. Here, we evaluated and compared the reading and interpretation of AST by the DD method using the Scan[®] 1200 instrument as compared with the Sirscan[®] system on 211 clinical strains and the possibility to read AST after 6 or 8 h of incubation as compared with 24 h on 121 additional Gram-negative strains and 76 non-fermenter Gram-negative and Gram-positive strains.

Methods: Validation of the technique was assessed on three reference strains as requested by EUCAST for analysis of the repeatability and reproducibility of the method.

Results: Correlation between the two methods, assessed using 211 clinical isolates ($n=2439$ zones of growth inhibition measured), was excellent with a correlation coefficient of 0.97. For the earlier reading experiments, preliminary results demonstrate the possibility of reading AST for drug-species combinations after 6 and 8 h for Gram-negative bacteria with rapid growth (correlation coefficient at 6 h=0.96 and at 8 h=0.98) and at 8 or 10 h for Gram-positive bacteria.

Conclusions: The Scan[®] 1200 has many advantages thanks to its small size, rapidity of use and high-resolution imaging allowing the possibility to improve AST results after only 6–8 h of incubation. This AST reader system represents a robust alternative tool for routine use in clinical microbiology laboratories.

Introduction

In clinical microbiology laboratories, two strategies are recommended by EUCAST for antibiotic susceptibility testing (AST).¹ The liquid medium technique, using automated liquid microdilution instrument systems such as Vitek 2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) with turbidimetric growth detection, represents the first possibility, though the high cost of the instrument and its lack of sensitivity are a disadvantage.² Conversely, the disc diffusion method on solid media, with its lower cost, simplicity of use, visualization of the bacterial growth on agar plates allowing the detection of atypical phenotypes and visibility of contamination, represents a good alternative for microbiologists. Some instruments, such as the Sirscan[®] system, are able to automatically read zone diameters.³ However, this system does present disadvantages including its expensive cost, low-resolution imaging and, after semi-automatic validation, requirement for verification and adjustment of zone diameters on-screen by the reader. Recently, high-resolution scanners

have been developed for microbiology such as the Advencis Bio-System Incubator (Advencis, Mutzig, France) or the Scan[®] 1200 (Interscience, Saint Nom, France),^{4,5} offering an improvement in reading quality. However, such instruments have not yet been validated for AST according to EUCAST recommendations. Actually, the time of incubation before reading AST is 16–20 h as recommended by the EUCAST disc diffusion test methodology.⁶ This time is too long for clinicians to change an empirical treatment during the time of care and thus it is necessary to reduce the delay in obtaining AST results from the clinical microbiology laboratory. We have previously shown using real-time video imaging that it was possible to obtain AST results very quickly.⁴ These strategies permit an improvement of antibiotic stewardship. The aim of our study was to evaluate and compare the reading and interpretation of AST by disc diffusion by the Scan[®] 1200 to validate this new instrument for its implementation in the routine of clinical microbiology laboratories. Furthermore, we evaluated the performance of the scanner for reading AST earlier.

Materials and methods

Collection strains

The reference strains used in this study to validate the technique included *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, as recommended by EUCAST.¹ In addition, 211 clinical strains routinely collected by the clinical microbiology laboratory of Timone Hospital (Marseille, France) were tested and compared to validate this new instrument. For the earlier reading, we used 121 fresh isolates from the clinical microbiology laboratory that were identified as rapidly growing Gram-negative bacteria, 35 non-fermenter Gram-negative bacteria and 41 Gram-positive bacteria. A list of strains used in this study is given in Table 1.

AST

The disc diffusion method was performed on solid medium (90 mm) as recommended by EUCAST.⁷ A suspension with a turbidity equivalent to that of a 0.5 McFarland standard ($\sim 10^8$ cfu/mL) was prepared from fresh and pure cultures after 18–24 h of incubation for each sample and seeded onto Mueller–Hinton agar (bioMérieux) by flooding or by swabbing in three directions. For each bacterial species, we used a panel of 12 or 6 specific antibiotics divided into one or two different panels as presented in Table 1.

Reading and interpretation are realized by the Scan[®] 1200 after 6, 8 and 16–24 h of incubation.

Validation of the technique

AST for each reference strain was repeated three times per day at different times with three different McFarland suspensions and over 5 days with new fresh subcultures ($n=15$); readings were performed using the Scan[®] 1200 and compared with manual and Sirscan readings. The inhibition zone diameters of each tested antibiotic were measured and the mean diameters and standard deviations were calculated and compared with the results of the expected diameter documented in the EUCAST guidelines and with the visual observation.

AST reading

Diameters were read with the Scan[®] 1200, a semi-automatic, high-definition colony counter capable of reading the zone of growth inhibition on agar plates with a measurement precision of 0.1 mm for AST and 0.05 mm for colony detection (Interscience, Saint Nom, France). Pictures were acquired under the same conditions, from the same distance, on a black background and with a resolution of 1.2 megapixels. The resolution is similar to other systems (e.g. Sirscan 2000 automatic system), but the quality of the photos presented by the scanner allows the possibility to

Table 1. Presentation of strains with the different panels of antibiotics tested per species

Bacteria	Number of strains	Agar used for culture	Agar used for AST	Antibiotics tested panel 1						Antibiotics tested panel 2					
				AMX	AMC	CEF	CRO	FEP	CIP	AMK	GEN	SXT	NIT	ETP	IPM
Validation of the method															
<i>E. coli</i> ($n=70$), <i>P. mirabilis</i> ($n=6$)	76	TSA	MH2	AMX	AMC	CEF	CRO	FEP	CIP	AMK	GEN	SXT	NIT	ETP	IPM
<i>K. pneumoniae</i> ($n=30$)	30	TSA	MH2	TZP	CEF	CRO	FEP	CIP	ATM	AMK	GEN	SXT	NIT	ETP	IPM
<i>E. cloacae</i>	6	TSA	MH2	TIC	TZP	CEF	CRO	FEP	ATM	AMK	GEN	SXT	CIP	ETP	IPM
<i>P. aeruginosa</i>	19	TSA	MH2	TIC	TIM	TZP	CAZ	FEP	ATM	AMK	GEN	TOB	CIP	IPM	CST
<i>S. aureus</i> ($n=42$), <i>S. epidermidis</i> ($n=19$)	61	TSA	MH2	OXA	FOX	PRI	GEN	SXT	CLI	CIP	RIF	TEC	VAN	LZD	FUS
<i>S. agalactiae</i>	7	COS	MH2b	AMX	ERY	DOX	VAN	GEN	CLI	OXA	RIF	CRO			
<i>E. faecalis</i>	12	COS	MH2b	AMX	GEN	LZD	NIT	VAN	TEC						
Total	211														
Proof of concept of the earlier reading of AST after 6 and 8 h of incubation															
<i>E. coli</i> ($n=42$), <i>P. mirabilis</i> ($n=16$)	58	TSA	MH2	AMX	AMC	TIM	CRO	FEP	IPM						
<i>K. pneumoniae</i> ($n=38$), <i>E. aerogenes</i> ($n=11$), <i>E. cloacae</i> ($n=8$), <i>K. oxytoca</i> ($n=6$)	63	TSA	MH2	AMC	TZP	CRO	FEP	IPM	CST						
<i>P. aeruginosa</i> ($n=35$)	35	TSA	MH2	TIC	TIM	TZP	FEP	CAZ	IPM						
<i>S. aureus</i>	24	TSA	MH2	FOX	CLI	SXT	GEN	VAN	TEC						
<i>E. faecalis</i>	17	TSA	MH2	AMX	GEN	LIN	NIT	VAN	TEC						
Total	197														

TSA, trypticase soy agar (bioMérieux).

COS, Columbia agar + 5% sheep blood (bioMérieux).

MH2, Mueller–Hinton agar (bioMérieux).

MH2b, Mueller–Hinton agar with blood (bioMérieux).

OXA, oxacillin; AMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin/clavulanate; TIC, ticarcillin; TIM, ticarcillin/clavulanate; TZP, piperacillin/tazobactam; CEF, cefalotin; FEP, cefepime; CRO, ceftriaxone; CAZ, ceftazidime; FOX, ceftazidime; CLI, clindamycin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; IPM, imipenem; ETP, ertapenem; ATM, aztreonam; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; CST, colistin; ERY, erythromycin; RIF, rifampicin; VAN, vancomycin; TEC, teicoplanin; NIT, nitrofurantoin; PRI, pristinamycin; CLI, clindamycin; LZD, linezolid; DOX, doxycycline; LIN, lincomycin; FUS, fusidic acid.

readjust the diameter measurement or to visualize the name of antibiotic on the disc. For AST reading, specific antibiotic panels for the bacteria tested were implemented. The six antibiotics for each panel were placed in the same position for all the pictures to allow exact measurement of the zone of growth inhibition for each antibiotic tested in the same order. The graphical user interface of the Scan[®] 1200 is presented in Figure S1 (available as Supplementary data at JAC Online).

For evaluation and validation of the Scan[®] 1200 system, the AST results were first compared by visual observation and then with the results from the Sirscan 2000 automatic system (i2a, Montpellier, France) currently used in our laboratory after 16–24 h of incubation.

With the two systems, the AST results were interpreted according to EUCAST guidelines. The scanner software interprets the inhibition diameter automatically using these rules,⁸ previously integrated according to the bacterial species. For each antibiotic, the software classified the antibiotic tested, according to the measured inhibition zone, as susceptible, intermediate or resistant. On-screen adjustment by the reader is possible and recommended by the manufacturer for the two systems.

Analysis of results for validation of the method

The correlation coefficient and a concordance curve were determined for the 211 strains ($n=2439$ inhibition zones) between the two reading systems after validation of the reading by the Scan[®] 1200, visual observation and measurement of the diameter by the operator (gold standard). The mean and standard deviation were calculated for all inhibition zones of all antibiotics tested by the two techniques and the comparison of the mean was analysed using a Student's *t*-test after verification of the equality of covariance. Discrepant results were classified as follows: very major error (VME) when the isolates were interpreted as susceptible by the Sirscan and resistant by the gold standard; major error (ME) when the isolates were interpreted as resistant by the Sirscan and susceptible by the gold standard; and minor error (mE) when the isolates were interpreted as intermediate by the gold standard and susceptible/resistant with the Sirscan and vice versa.

Timing study and medico-economic analysis

For both methods, we measured the overall time required to obtain all appropriate data for the complete interpretation of AST results. This time included loading into the machine, reading, verification and automatic reading adjustment.

A medico-economic analysis was conducted to calculate the net income based on the cost of the machine and technician time saved by the Scan[®] 1200 as compared with the Sirscan system.

Analysis of results at 6 and 8 h

An additional set of 121 Gram-negative bacteria, 35 non-fermenter Gram-negative bacteria and 41 Gram-positive bacteria (total=197 strains) was used to evaluate AST results at 6 and 8 h as compared with 24 h. Interpretation of the results was done using the same criteria as described above using EUCAST guidelines. Discrepant results at 6 and 8 h were analysed and MICs in triplicate were determined by the Etest method when necessary.

Real-time video imaging

For exact determination of the incubation time necessary to read AST, we used the Advencis Bio-System Incubator (Advencis, Mutzig, France) to allow video imaging for real-time observation of the kinetics of bacterial growth, as previously described.⁴ In a panel of eight strains (four reference strains and four clinical isolates), we determined the time of incubation necessary for stabilization of the inhibition diameters as compared with 16–24 h of incubation.

Results

Validation of the technique

All zone diameters measured with the Scan[®] 1200 were repeatedly within the expected ranges for the three quality control strains as recommended by EUCAST and validated by visual observation (100% overall agreement), except for vancomycin but this did not change the interpretation of the results. These results validate the possibility of using the Scan[®] 1200 for AST reading and interpretation. Table 2 shows the AST reading validation results for the Scan[®] 1200.

Analysis of results

Overall, we analysed 2439 inhibition zone diameters for 211 clinical strains with the visual observation and we obtained a correlation of 100%.

Figure 1(a) presents pictures of AST obtained with the Scan[®] 1200 and Sirscan systems for an ESBL-producing clinical isolate. The reading shown on-screen is adjusted in 20% of cases and for the Sirscan in 80%. For statistical analysis, we measured a specific correlation coefficient for all antibiotics tested and all species. The raw concordance curve obtained with the global analysis of all inhibition zones displayed a correlation coefficient of 0.97 (Figure 2). Details of the correlation coefficients for all antibiotics are given in Table S1. No significant difference was observed between the instruments for all tests ($P>0.05$) (Table S1).

Among all tests analysed, we obtained 33 discrepant results (1.3%) for an organism–antimicrobial agent combination including 23 mE (0.9%), 1 ME (0.04%) and 9 VME (0.4%). Analysis of these discrepant results shows that the errors were all due to a reading error with the Sirscan system due to low-resolution imaging (Table S2). In Figure 1(b), we show the lack of resolution of the Sirscan with a VME for the reading of inhibition zones of the trimethoprim/sulfamethoxazole disc.

Timing study and medico-economic analysis

The delay for reading 44 agar plates with the Sirscan was 43 min (13 min to load the instrument and 30 min for verification and adjustment of inhibition zone diameters) versus only 18 min for the global reading and interpretation of AST with the Scan[®] 1200 instrument. Thus, the time to read one plate was 21.8 s for the Scan[®] 1200 and 58.6 s for the Sirscan system; the difference represented 36.8 s per plate. The purchase of the Sirscan system from Marseille in France, with associated maintenance, costs 17 668 €/year (85 k€ for the price and 5 k€ for maintenance), whereas the Scan[®] 1200 costs 2800 €/year (14 k€ for the price of the machine and without maintenance). In our laboratory, we performed 200 agar plates for AST per day. Thus, the technician time saved by the machine was $200 \times 36.8 \text{ s} = 2 \text{ h}$ and 3 min/day, i.e. 747 h/year. Considering the legal time worked per year in France (1607 h), the machine allowed a saving of 47% of a full-time technician, solely through the improvement in AST reading. The consolidated cost of a full-time technician in France in our university is 43 000 €/year, giving a net income of ~20 210 €/year for technician time and 14 668 €/year with depreciation over 5 years for the price of the machine.^{9,10}

Table 2. Evaluation of the reference strains according to EUCAST guidelines for the validation of the Scan® 1200 reader system after validation by visual observation

Antibiotic	<i>S. aureus</i> CIP 7625, inhibition zone diameters (mm)		<i>E. coli</i> CIP 7624, inhibition zone diameters (mm)		<i>P. aeruginosa</i> CIP 76110, inhibition zone diameters (mm)	
	mean ± SD	acceptable limits	mean ± SD	acceptable limits	mean ± SD	acceptable limits
Amikacin			21.4±22.2	19.0–26.0	19.4±21.4	18.0–26.0
Amoxicillin			23.8±25.6	22.0–26.5		
Amoxicillin/clavulanate			21.5±24.5	18.0–24.0		
Cefotaxime			36.2±37.4	32.5–37.5		
Cefoxitin	33.7±35.1	28.0–35.0				
Ceftazidime					29.1±30.7	25.5–31.5
Ciprofloxacin			35.6±37.0	30.0–40.0	33.7±34.9	29.0–36.5
Colistin					19.8±20.8	17.0–22.0
Erythromycin	31.0±31.4	26.5–31.5				
Fosfomicin	28.3±30.7	24.0–35.0				
Gentamicin	27.0±28.2	24.0–28.5	21.8±23.0	22.0–26.5	18.1±19.1	17.0–23.0
Imipenem					27.2±28.2	20.0–28.0
Lincomycin	28.6±29.2	24.5–29.5				
Nalidixic acid			24.8±26.4	22.0–28.0		
Pefloxacin			32.4±34.6	29.0–35.5		
Penicillin G	32.7±35.1	31.0–38.5				
Piperacillin					28.1±28.7	27.5–32.5
Ticarcillin					28.1±29.3	25.0–30.5
Tobramycin					20.5±21.7	20.5–26.5
Trimethoprim/sulfamethoxazole	29.4±29.8	28.0–32.5	26.1±26.7	23.0–29.0		
Rifampicin	37.6±37.6	34.0–39.0				
Vancomycin	20.1±21.3	17.5–20.5				

SD, 2-fold-SD: standard deviation.

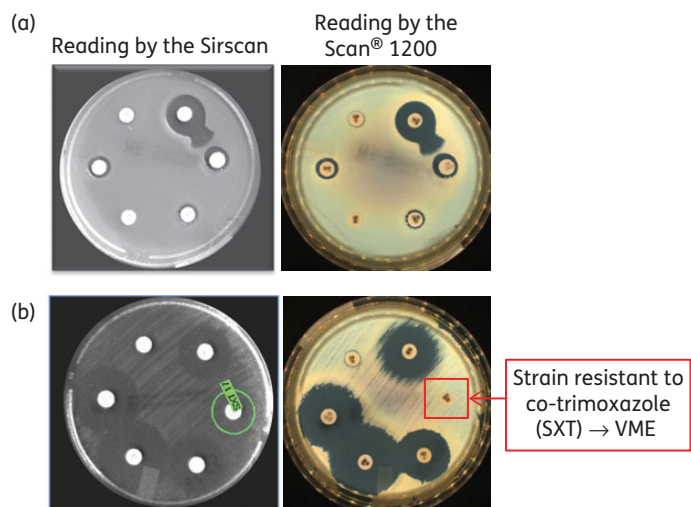


Figure 1. Example of AST picture with the interpretation obtained using the Sirscan versus Scan® 1200. (a) Isolate of ESBL-producing *E. coli* with good concordance between the readings of the two systems. (b) *E. coli* isolate with a VME for the reading of trimethoprim/sulfamethoxazole (co-trimoxazole; SXT) by the Sirscan system (17 mm: susceptible to SXT) compared with Scan® 1200 (6 mm: resistant to SXT). Note that antibiotic name abbreviations are visible in the Scan® 1200 pictures. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

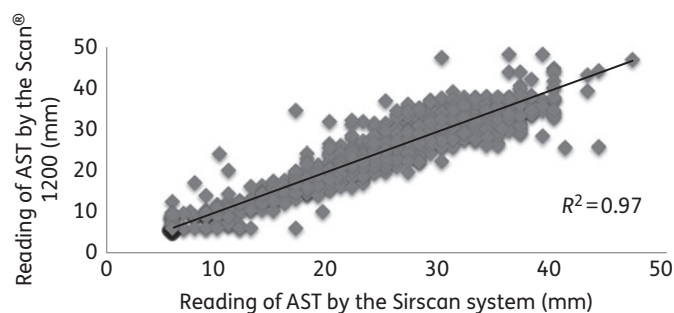


Figure 2. Study of the correlation of reading AST between the Sirscan system and the Scan® 1200 for the validation of the method on 211 clinical strains with the analysis of 2439 inhibition zone diameters.

Possibility of earlier reading

Statistical analyses were performed on the inhibition diameter with the mean and standard deviation obtained after 6 or 8 h of incubation compared with 24 h of incubation for rapidly growing Gram-negative bacteria (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* and *K. oxytoca*) and no significant difference was noted, with all *P* values >0.05 except for six results. Figure 3 shows examples of good concordance of reading at 6, 8 and 24 h.

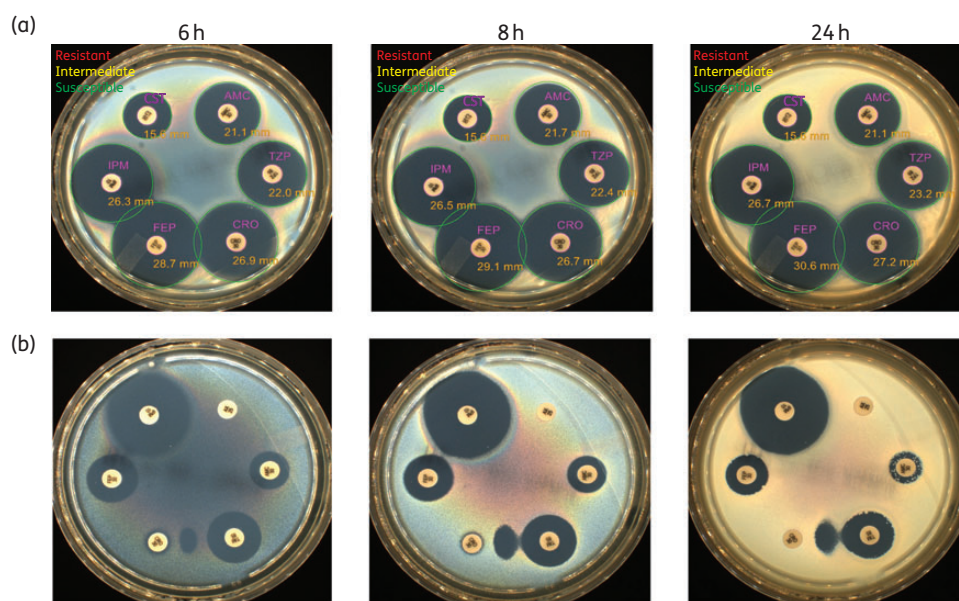


Figure 3. Example of AST picture with the interpretation obtained using the Scan[®] 1200 after 6, 8 and 24 h of incubation. (a) Isolate of *K. pneumoniae* with good concordance between the different incubations. (b) *E. coli* isolate producing ESBL with good concordance between the different incubations. AMC, amoxicillin/clavulanate; TZP, piperacillin/tazobactam; CRO, ceftriaxone; FEP, cefepime; IPM, imipenem; CST, colistin. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

The results are presented in Table 3. Furthermore, the correlation coefficient for the reading after 6 h of incubation compared with 24 h of incubation was 0.96 (Figure 4a). The percentage of discrepant results represents 3% of all diameter readings (20/726) and was composed of 0.4% VME (3/726), 0.4% ME (3/726) and 1.9% mE (14/726). For the reading after 8 h of incubation, the correlation coefficient was 0.98 (Figure 4b) with only 1% discrepant results (7/726) [0.3% VME (2/726) and 0.7% mE (5/726)]. A complete analysis of the discrepant results is presented in Table S3. For the VMEs, MIC values were determined and in practice these discrepancies disappear and were most likely due to intermethod variability (Table S4).

The results obtained for Gram-positive bacteria and non-fermenter Gram-negative bacteria do not offer the possibility for earlier reading at 6 and 8 h in all cases, because growth of the bacteria was detected only after 8 or 10 h of growth (Figure S2). The correlation coefficient at 8 h was 0.82, 0.80 and 0.77 for *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E. faecalis*, respectively. In fact, the delay in reading the AST results for these species was dependent both on the growth kinetics of the strain and the antibiotic tested, i.e. the drug-species combination. This phenomenon was clearly shown by real-time video imaging of representative strains and antibiotics (Table 4 and Supplementary Videos). For *P. aeruginosa*, the delay to accurately read AST results was between 11 and 12 h; it was 10 h for Gram-positive bacteria (Supplementary Videos and Table 4).

Discussion

Herein, we report the use of the Scan[®] 1200 for reading and interpretation of AST by the disc diffusion method as recommended by EUCAST for a series of reference and clinical strains.

The use of rules of harmonized interpretation by EUCAST and the reading and interpretation of inhibition zone diameters by the Scan[®] 1200 software validates the method as an alternative instrument in the clinical microbiology laboratory.¹¹

The overall frequency of discrepant results represented 1.3% (33/2439) of all diameters measured by the Scan[®] 1200 for an organism-antimicrobial combination with 0.4% VME, 0.04% ME and 0.9% mE. The acceptable accuracy of a susceptibility test method according to current US FDA guidelines is defined as overall agreement of >90% of all results, a VME percentage strictly <1.5% and an ME percentage that does not exceed 3%, as was the case in our study (correlation coefficient of 0.97).^{12,13}

Automation, along with the time saved to read inhibition zone diameters for AST by the Scan[®] 1200 as well as its cost, represents a considerable advantage. Indeed, the cost of the purchase and maintenance of the Scan[®] 1200 was much lower than the Sirscan system (2800 versus 17 668 €/year) and the technician time saved by the Scan[®] 1200 represented 20 210 €/year. The net income is ~34 878 €/year for using the Scan[®] 1200 in the routine laboratory with the machine price depreciated over 5 years.^{9,10} These prices have been calculated for Marseille, France, but are believed to be representative at least for other countries in the EU. The AST reading time was also lower for the Scan[®] 1200 (21.8 versus 58.6 s/plate). In addition to reading speed, there was also a significant difference in the quality of photos, allowing rapid verification of AST and absence of errors in disc distribution. In fact, the image quality enabled antibiotic name abbreviations to be read directly from the picture, avoiding misreading and the need to check results.

With their high-resolution AST reading, new-generation scanners such as the Scan[®] 1200 or Advencis Bio-System offer the possibility of earlier reading of AST.⁴ In fact, AST results should be obtained as rapidly as possible to improve patient care.¹⁴ The

Table 3. Statistical analysis of AST of 121 Gram-negative clinical strains including 42 strains of *E. coli*, 16 strains of *P. mirabilis*, 38 strains of *K. pneumoniae*, 11 strains of *E. aerogenes*, 8 strains of *E. cloacae* and 6 strains of *K. oxytoca*

Antibiotic	EUCAST (mm)	Isolates	No. tested	Statistical analysis	Concordant results 6 h				Statistical analysis	Concordant results 8 h			
					S	I	R	P		S	I	R	P
Amoxicillin	≥19	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i>	58	MD 6 h	21	22.8±2.2	37	7.7±3.9	MD 8 h	21	23.7±3.0	37	7.7±3.9
				MD 24 h	23.3±3.7	6.9±3.5	MD 24 h	23.3±3.7	6.9±3.5				
				P	0.59	0.35	P	0.70	0.35				
				comments	NS	NS	comments	NS	NS				
Amoxicillin/ clavulanate	≥19	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i>	121	MD 6 h	46	21.8±2.1	75	10.6±4.8	MD 8 h	46	21.8±2.1	75	10.6±5.0
				MD 24 h	22.2±2.3	9.5±4.6	MD 24 h	22.2±2.3	9.5±4.6				
				P	0.39	0.15	P	>0.99	0.16				
				comments	NS	NS	comments	NS	NS				
Ticarcillin/ clavulanate	≥23	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i>	58	MD 6 h	28	25.7±1.6	30	17.0±5.8	MD 8 h	28	27.1±2.3	30	18.1±5.2
				MD 24 h	28.2±2.7	17.9±6.1	MD 24 h	28.2±2.7	17.9±6.1				
				P	0.00009	0.56	P	0.11	0.89				
				comments	DS	NS	comments	NS	NS				
Piperacillin/ tazobactam	20–23	<i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i>	63	MD 6 h	35	22.8±2.9	22	11.5±4.0	MD 8 h	35	22.8±2.9	22	11.5±4.0
				MD 24 h	23.8±3.9	18.2±0.8	MD 24 h	23.8±3.9	18.2±0.8				
				P	0.23	0.35	P	0.39	0.23				
				comments	NS	NS	comments	NS	NS				
Cefepime	17–20	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i>	121	MD 6 h	86	25.7±1.6	32	13.1±4.5	MD 8 h	86	29.1±3.2	32	12.6±5.0
				MD 24 h	28.2±2.7	21.5±0.4	MD 24 h	28.2±2.7	21.5±0.4				
				P	0.00007	0.08	P	0.14	0.07				
				comments	DS	NS	comments	NS	NS				
Ceftriaxone	21–24	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i>	121	MD 6 h	80	27.3±2.4	38	10.9±4.5	MD 8 h	80	28.7±3.1	38	9.9±4.8
				MD 24 h	29.3±3.8	20.8±0.7	MD 24 h	29.3±3.8	20.8±0.7				
				P	0.00001	0.58	P	0.28	0.10				
				comments	DS	NS	comments	NS	NS				
Imipenem	16–22	<i>E. coli</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i>	121	MD 6 h	105	26.2±3.5	11	13.2±4.9	MD 8 h	105	26.3±3.7	11	12.7±3.8
				MD 24 h	26.4±3.9	18.6±2.4	MD 24 h	26.4±3.9	18.6±2.4				
				P	0.70	0.87	P	0.85	0.08				
				comments	NS	NS	comments	NS	NS				
Colistin	≥15	<i>K. pneumoniae</i> ; <i>K. oxytoca</i> ; <i>E. aerogenes</i> ; <i>E. cloacae</i>	63	MD 6 h	55	16.5±1.3	8	14.7±2.7	MD 8 h	55	16.5±1.4	8	14.7±2.8
				MD 24 h	16.4±1.3	14.4±3.1	MD 24 h	16.4±1.3	14.4±3.1				
				P	0.69	0.84	P	0.70	0.84				
				comments	NS	NS	comments	NS	NS				

S, susceptible; I, intermediate; R, resistant (interpreted with EUCAST guidelines for a drug–species combination).
 NS, no significant difference between the hours of reading AST.
 DS, significant difference between the hours of reading AST.
 MD, mean ± standard deviation.

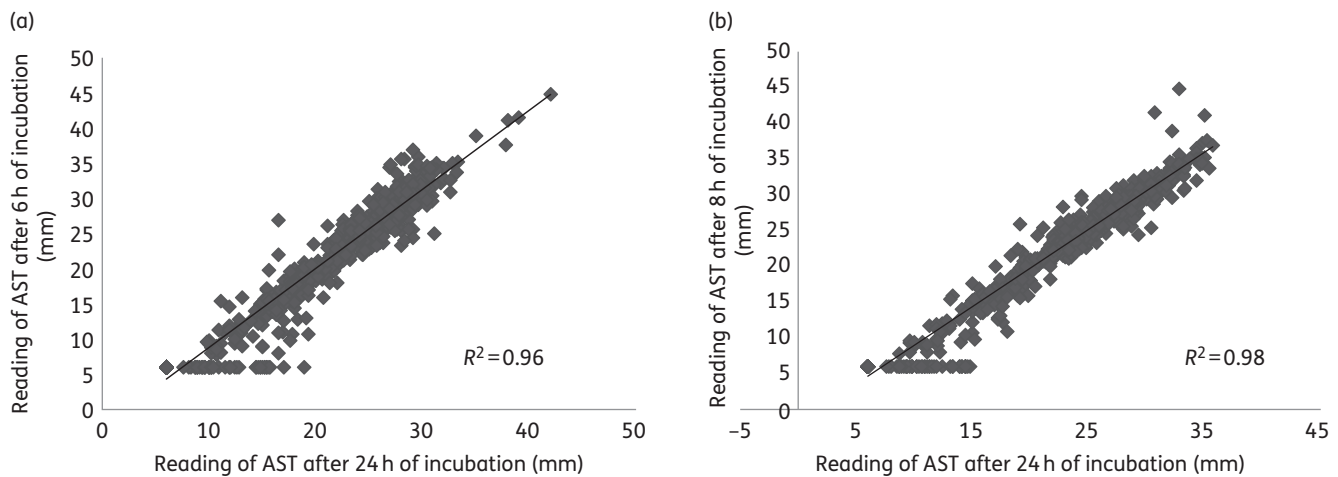


Figure 4. Study of the correlation on the 121 strains ($n=726$) for each antibiotic tested between the inhibition zone diameter obtained. (a) After 6 h of incubation versus 24 h of incubation and (b) after 8 h of incubation versus 24 h of incubation.

Table 4. Determination by video imaging (Advencis Bio-System) of the time of incubation necessary for reading AST

		Time of incubation for reading AST					
Gram-negative bacteria	antibiotic tested	amoxicillin	amoxicillin/ clavulanate	ticarcillin/ clavulanate	ceftriaxone	cefepime	imipenem
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	6h30	6h30 ^a	7h00	6h30	7h00	5h30
	antibiotic tested	amoxicillin/ clavulanate	piperacillin/ tazobactam	ceftriaxone	cefepime	imipenem	colistin
	<i>K. pneumoniae</i> 15153456	5h30 ^a	8h00 ^a	6h00	6h00	6h00	6h30
	antibiotic tested	ticarcillin	ticarcillin/ clavulanate	piperacillin/ tazobactam	cefepime	ceftazidime	imipenem
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11h00 ^a	9h30	9h30	9h00	12h00	10h00
<i>P. aeruginosa</i> 15152177	11h00	10h00	9h00	11h00	9h00	9h00	
Gram-positive bacteria	antibiotic tested	teicoplanin	vancomycin	gentamicin	trimethoprim/ sulfamethoxazole	clindamycin	cefoxitin
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8h30	6h00	8h30	9h00	9h00	10h00 ^a
	<i>S. aureus</i> 13150069	7h00	7h00	7h00	8h00	8h00	10h00
	<i>S. aureus</i> 13151475	8h00	8h00	8h00	10h00	9h00	13h00
	antibiotic tested	amoxicillin	gentamicin	fosfomycin	nitrofurantoin	vancomycin	teicoplanin
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	8h30	8h30	9h00	9h00	7h30	8h00

^aSupplementary Video files.

revolution of MALDI-TOF for bacterial identification represents the first step but the earlier reading of AST should be the second step.¹⁵ We have demonstrated in this study no significant difference between the interpretation of AST after 6 and 8 h as compared with 24 h of incubation in Gram-negative bacteria with rapid growth. Interestingly, the delay for slow-growing non-fermenter Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria was longer and was dependent on the drug-species combination.

Earlier reading was possible at a specific time depending on the bacterial species and drug-species combination only when growth of the control bacteria on agar could be visually observed. This is an interesting point that could help microbiologists and clinicians obtain a specific drug-species combination result earlier in a critical situation that needs a rapid decision during care, e.g. in the presence of ESBLs, carbapenemases, methicillin resistance and imipenem resistance. This strategy can improve antibiotic stewardship by allowing earlier modification of the

empirical treatment or isolation of an MDR carrier during their time of care.

The Scan[®] 1200 is a small, semi-automated instrument, thus offering flexibility of use. Our work is a proof of concept that AST reading could be done earlier for specific drug–species combinations and could be implemented easily in a core laboratory that is working 365 days/year. This could help improve management and workflow in the laboratory. Indeed, the small size of the Scan[®] 1200 and its price allow implementation of multiple scanners in the laboratory and to separate the reading of AST-based workstations and sample types. Thus, even though AST reading remains manual, the flexibility of the Scan[®] 1200 is an advantage for use in clinical laboratories. In fact, for complete integration in the routine laboratory, the Scan[®] 1200 must have a bidirectional connection with the laboratory information system (LIS). This interface with the LIS is currently under development.

Conclusions

The Scan[®] 1200, with complete validation of the technique, represents an alternative reader system for AST. Owing to its small size, camera resolution, rapidity of use and cost, this AST reader system represents a robust and alternative tool for routine use in clinical microbiology laboratories. The Scan[®] 1200 is proof of concept that this technology could improve earlier results of AST during care from a personalized medicine viewpoint (earlier drug–species combination result) with a very rapid turnaround time due to the high-resolution imaging.

Acknowledgements

We are very grateful to IHU Méditerranée Infection and the society Tradonline for English corrections.

Funding

This work was supported by IHU Méditerranée Infection.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Figures S1 and S2, Tables S1 to S4 and Supplementary Videos are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- 1 Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ *et al.* EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2013; **19**: 141–60.
- 2 Renaud F, Bergeron E, Tigaud S *et al.* Evaluation of the new Vitek 2 GN card for the identification of gram-negative bacilli frequently encountered in clinical laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; **24**: 671–6.
- 3 Medeiros AA, Crellin J. Evaluation of the Sirscan automated zone reader in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 1688–93.
- 4 Le Page S, Raoult D, Rolain JM. Real-time video imaging as a new and rapid tool for antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion method: a paradigm for evaluating resistance to imipenem and identifying extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **45**: 61–5.
- 5 Verhoeven PO, Noyel P, Bonneau J *et al.* Evaluation of the new brilliance GBS chromogenic medium for screening of *Streptococcus agalactiae* vaginal colonization in pregnant women. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 991–3.
- 6 EUCAST. *EUCAST Disk Diffusion Method, Version 5.0, January 2015*. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Manual_v_5.0_EUCAST_Disk_Test.pdf.
- 7 Hombach M, Zbinden R, Böttger EC. Standardisation of disk diffusion results for antibiotic susceptibility testing using the Sirscan automated zone reader. *BMC Microbiol* 2013; **3**: 225.
- 8 EUCAST. *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters, Version 5.0, 2015*. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf.
- 9 Galar A, Leiva J, Espinosa M *et al.* Clinical and economic evaluation of the impact of rapid microbiological diagnostic testing. *J Infect* 2012; **65**: 302–9.
- 10 Galar A, Yuste JR, Espinosa M *et al.* Clinical and economic impact of rapid reporting of bacterial identification and antimicrobial susceptibility results of the most frequently processed specimen types. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; **31**: 2445–52.
- 11 Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: 0255–66.
- 12 Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 2009; **49**: 1749–55.
- 13 FDA. *Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems: Guidance for Industry and FDA*. Rockville, MD: FDA, 2007.
- 14 Doern GV, Vautour R, Gaudet M *et al.* Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1757–62.
- 15 Seng P, Drancourt M, Gouriet F *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009; **49**: 543–51.

IV- Interprétation automatique des antibiogrammes : le logiciel Anti-Logic

Ce travail représente une grosse partie du travail réalisé pendant mon internat et correspond véritablement à ma spécialité d'innovation pharmaceutique et recherche car il s'agit de mettre au point et de développer un outil innovant : un logiciel de reconnaissance et d'interprétation automatique des antibiogrammes basé sur la reconnaissance d'images. Le but de ce logiciel est de pouvoir interpréter de façon automatique les phénotypes des 15 bactéries les plus fréquemment isolées à l'hôpital et de ne s'intéresser qu'aux phénotypes les plus fréquents de chaque bactérie afin d'arriver à environ 80% d'interprétation automatisée des antibiogrammes réalisés en routine à l'hôpital. La reconnaissance d'images existe déjà dans certains domaines : on peut citer la reconnaissance de plantes [56], de pièces d'avions mais aussi dans le domaine de la santé. Une application comme Looktel (<http://www.looktel.com>) disponible sur mobiles existe pour aider les patients présentant des déficits visuels à se repérer dans la rue, à reconnaître des objets du quotidien comme le sucre ou la farine mais aussi l'argent que ce soit les billets ou les pièces. La reconnaissance d'images s'est développée aussi pour les patients atteints d'Alzheimer afin de les aider à reconnaître leurs proches par des systèmes de reconnaissance faciale [57].

Ce travail s'est déroulé en 2 parties : la première consistait à réaliser la preuve de concept que l'on pouvait utiliser la reconnaissance d'images pour interpréter les antibiogrammes à partir d'outils déjà existants. Ceci a abouti à la rédaction d'un brevet pour protéger cette nouvelle technique d'interprétation des antibiogrammes. Une deuxième partie qui porte sur le développement et la mise au point d'un logiciel définitif en vue d'une industrialisation correspondant à nos critères a été développé par des informaticiens appartenant à la société Anéo dont le siège est à Paris.

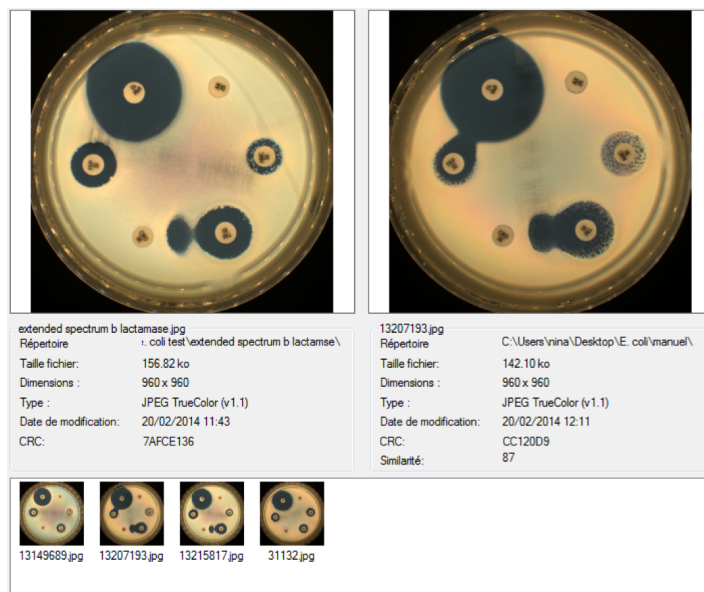
1. Preuve de concept

La première étape pour réaliser cette preuve de concept est de créer une banque de données d'images qui va être notre base pour tester d'éventuels logiciels. Nous avons sélectionné 3 espèces bactériennes pour lesquelles nous avons des photos d'antibiogrammes des phénotypes les plus fréquents. Il s'agit d'*E. coli* (42 photos), *K. pneumoniae* (38 photos) et *S. aureus* (25 photos). Pour chaque espèce, nous avons déterminé leurs différents phénotypes. En analysant ces différentes images, nous nous sommes rendu compte qu'il y avait une très bonne reproductibilité des photos au sein de chaque phénotype.

Pour l'étape suivante nous avons essayé de tester des logiciels déjà existants pouvant être capable de faire de la reconnaissance d'images. A l'aide de mots clés, nous avons cherché des logiciels de reconnaissance d'images gratuits disponibles sur internet capables de reconnaître les photos d'antibiogrammes comme par exemple Google Image (gratuit sur internet), Looktel (payant sur Iphone) ou encore Xnview (téléchargement gratuit depuis internet).

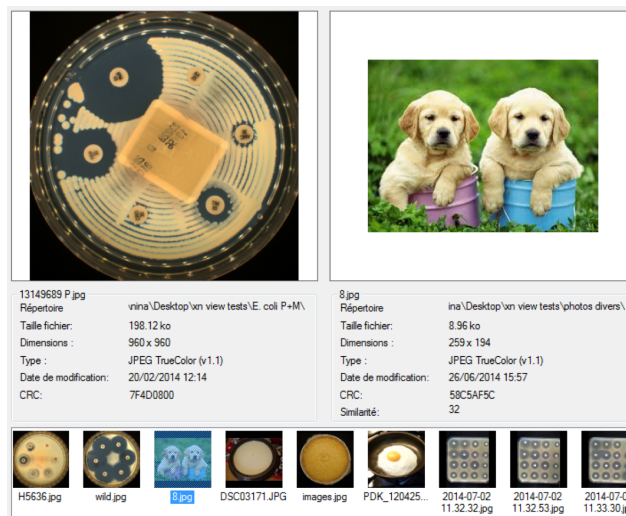
Le logiciel qui allait être sélectionné devait-être capable de pouvoir comparer une photo d'un antibiogramme avec notre base de données de photos préalablement créée, indispensable à la reconnaissance d'images. Nous avons essayé à partir de nos photos ces différents logiciels et l'inconvénient majeur rencontré était l'impossibilité de créer un répertoire d'images spécifique de photos d'antibiogrammes. En effet, ils possédaient tous des répertoires d'images fermés ne pouvant pas être modifiés ce qui nous a donné des résultats aberrants et non concluants. Un seul logiciel correspondait à nos attentes : le logiciel Xnview (<http://www.xnview.com/fr/>). Ce logiciel est capable de réaliser de la reconnaissance d'images à partir du répertoire que nous avons créé. Nous avons donc pu le tester sur notre base de données de photos et ainsi savoir s'il était capable à partir d'une photo dont on connaît le phénotype de reconnaître d'autres photos avec ce même phénotype présent dans notre base de données.

Figure 14. Exemple logiciel Xnview capable à partir d'un phénotype déterminé de reconnaître des photos d'antibiogrammes présentant le même phénotype avec une similarité de 87%. Avec une similarité de 80%, il reconnaît 4 antibiogrammes différents présentant le même phénotype.



Cependant, ce logiciel reste imparfait et possède de nombreuses limites. En effet, il est incapable de reconnaître nos antibiogrammes à partir d'un certain seuil de similarité (pourcentage de reconnaissance de la photo). Nous nous sommes aperçus que ce logiciel fonctionne par reconnaissance des couleurs puis des formes. C'est pour cela qu'il est capable d'assimiler la photo de chiots (même couleur) avec celle d'un antibiogramme. Ce logiciel compare une photo avec notre répertoire mais de façon complètement anarchique.

Figure 15. Exemple de limitation du logiciel Xnview qui confond une photo d'antibiogrammes avec la photo de deux chiots présentant la même couleur.



Néanmoins, avec ces tests nous avons eu la preuve de concept qu'il était possible de réaliser l'interprétation des phénotypes basés sur la reconnaissance des photos des antibiogrammes.

Tout ce travail nous a permis la rédaction d'un brevet dont je suis co-inventeur.

Le Page S, Buffet S, Raoult D and Rolain JM. Méthode d'analyse et d'interprétation automatisée d'un antibiogramme. Il a été déposé le 01.10.2014. Number: 14 59559.

Une fois le brevet déposé, nous avons décidé de faire développer ce logiciel par la société Anéo pour qu'elle nous crée un logiciel dédié spécifiquement à notre étude et correspondant à nos attentes.

2. Développement du logiciel

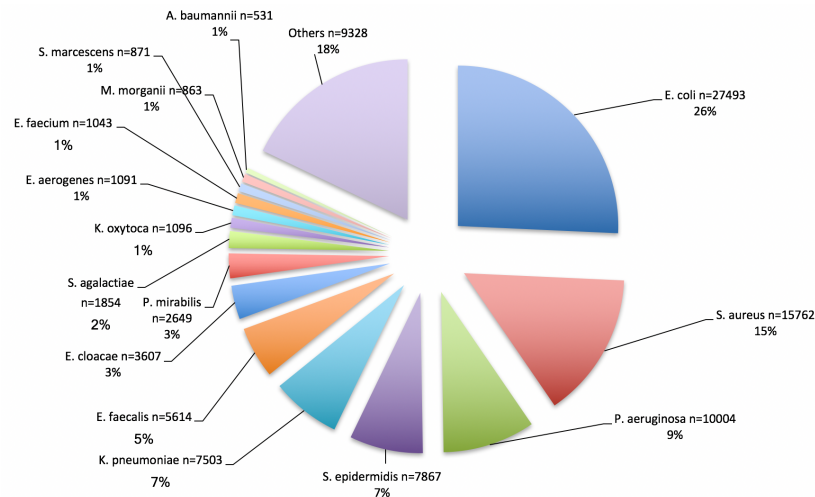
Ce logiciel devra être capable de reconnaître 80% des phénotypes les plus fréquents de la routine appartenant au top 15 des bactéries les plus couramment isolées à l'hôpital.

Il sera capable de réaliser cette analyse sur géloses rondes et carrées. Pour assurer la fiabilité de nos résultats, nous avons développé une « Keybiotic ». Elle permet la reconnaissance des caractères présents sur les disques d'antibiotiques afin de s'assurer que chaque disque d'antibiotique correspond bien à celui attendu et qu'il se trouve à la bonne place sur la gélose. Nous souhaiterions également développer le logiciel sous forme d'une application pour smartphone avec la base de données déportée sur internet.

1-Création de la base d'apprentissage :

L'étape de la création de la base d'apprentissage est cruciale car c'est à partir d'elle que le logiciel peut fonctionner. Elle doit comporter les phénotypes qui nous intéressent et posséder un nombre assez conséquent de photos de différentes souches présentant ce phénotype. Le but est de tester le logiciel sur le top 15 des bactéries les plus fréquemment isolées à l'hôpital. Le top 15 représente 82,1% de toutes les bactéries isolées à l'hôpital.

Figure 16. Présentation du Top 15 des bactéries les plus fréquemment isolés à l'hôpital entre 2014 et 2016.



Pour ce faire, nous avons récupéré les antibiogrammes réalisés à la routine de l'hôpital de la Timone à Marseille. Au début du projet les antibiogrammes étaient composés de 2 boîtes rondes contenant 6 antibiotiques chacune (total de 12 antibiotiques testés).

Table 6. Présentation des différents panels d'antibiotiques testés sur le top 15.

Souches bactériennes	Antibiotiques testés ^a											
	Panel 1						Panel 2					
<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i>	AMX	AMC	CF	CRO	FEP	CIP	AMK	GEN	SXT	NIT	ERT	IPM
<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>	TZP	CF	CRO	FEP	CIP	ATM	AMK	GEN	SXT	NIT	ERT	IPM
<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i>	TCC	TZP	CF	CRO	FEP	ATM	AMK	GEN	SXT	CIP	ERT	IPM
<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	TIC	TIM	TZP	CAZ	FEP	ATM	AMK	GEN	TOB	CIP	IPM	CS
<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	OX	FOX	PT	GEN	SXT	CLI	CIP	RA	TEC	VAN	LZD	FA
<i>S. agalactiae</i>	AX	ERY	DOX	VA	GEN	CLI	OX	RA	CRO			
<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	AX	GEN	LZD	NIT	VAN	TEC						

^aOXA, Oxacilline; AMX, amoxicilline; AMC, Amoxicilline acide clavulanique; TIC, Ticarcilline; TCC, Ticarcilline acide clavulanique; TZP, Pipéracilline-Tazobactam; CF, Céfaloïne; FEP, Céfepime; CRO, Ceftriaxone; CAZ, Ceftazidime; FOX, Cefoxitine; IMP, Imipénème; ERT, Ertapénème; ATM, Aztreonam; GEN, gentamicine; AK, amikacine; TOB, Tobramycine; CIP, ciprofloxacine; SXT, Triméthoprime-sulfaméthoxazole; CS, Colistine; ERY, Erythromycine; RIF, Rifampicine; VAN, Vancomycine; TEC, Tétracycline; NIT, Nitrofurantoiné, PT, Pristinamycine; CLI, Clindamycine; LZD, Linezolid; DOX, Doxycycline; L, Lincomycine.

Nous avons à l'aide du scan® 1200 effectué des photos de bonne qualité et récupéré la mesure des diamètres d'inhibition pour les 2 panels d'antibiotiques testés. Chaque souche bactérienne a ensuite été souchée pour être conservée à -80°C.

Nous avons récupéré environ 1000 photos d'antibiogrammes pour *E. coli* pour les 2 panels. La moitié des photos a été interprétée et triée en fonction des phénotypes pour constituer la base d'apprentissage et l'autre moitié servira pour les tests sur le prototype du logiciel.

2-Fonctionnement général du logiciel anti-logic :

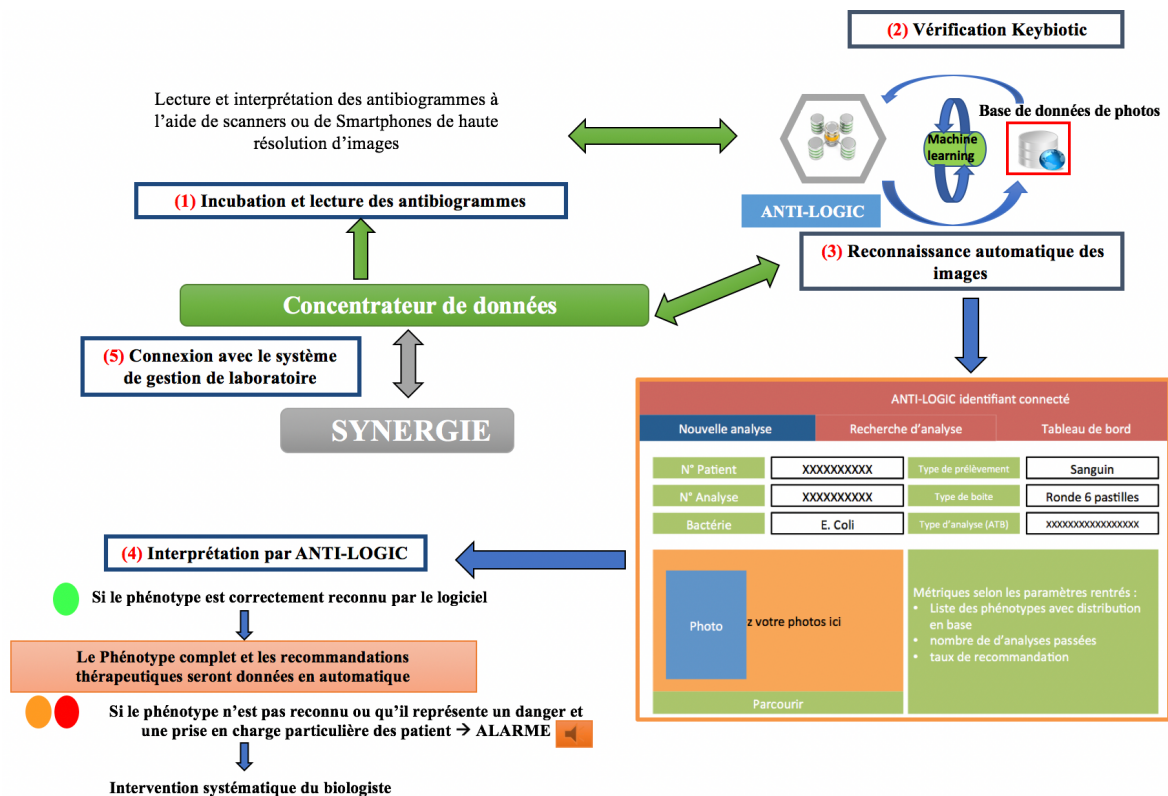
Le logiciel Anti-logic est un logiciel d'interprétation automatisé des antibiogrammes basé sur la reconnaissance des photos dans leur intégralité. La première étape consiste à prendre une photo avec un système d'acquisition d'images que ce soit un scanner dédié à la microbiologie réalisant des photos toujours dans les mêmes conditions (même hauteur, fond noir...) ou par le biais d'un Smartphone (Iphone...). Cette photo va être présentée au logiciel pour la reconnaissance automatique d'images mais au préalable il va falloir qu'il reconnaisse la « Keybiotic », à savoir une clé de contrôle qui permet de vérifier que les antibiotiques présents sur la photo sont bien les bons et à la bonne place afin d'éviter toute erreur d'interprétation.

Puis si cette « keybiotic » est bien reconnue, il va lancer le processus de reconnaissance d'images. Ce logiciel fonctionne en « machine learning » ce qui signifie que toutes les photos qui seront bien reconnues vont venir implémenter la base d'apprentissage automatiquement afin d'améliorer la précision de reconnaissance du logiciel. En effet, plus le logiciel contient de photos plus il sera précis. Si le logiciel reconnaît la photo avec un score de reconnaissance supérieur ou égal à 80% alors l'antibiogramme sera interprété de façon automatique et les recommandations thérapeutiques pourront être délivrées.

Néanmoins, si le logiciel ne reconnaît pas le phénotype, s'il manque un antibiotique sur la boîte ou si le phénotype présente un risque pour le patient (par exemple présence de carbapénémases) alors une alarme sera déclenchée et l'intervention du biologiste sera obligatoire.

Le but de ce logiciel n'est pas d'interpréter tous les antibiogrammes du laboratoire de façon automatique mais seulement ceux dont le phénotype ne nécessite pas de prise en charge particulière pour le patient. En effet, la prévalence des souches d'*E. coli* retrouvées dans les urines présentant un phénotype sauvage représente 40% de tous les *E. coli*. Ainsi, si ce phénotype très fréquent pouvait-être interprété automatiquement cela permettrait aux internes et biologistes de se focaliser sur les phénotypes atypiques plus compliqués à interpréter.

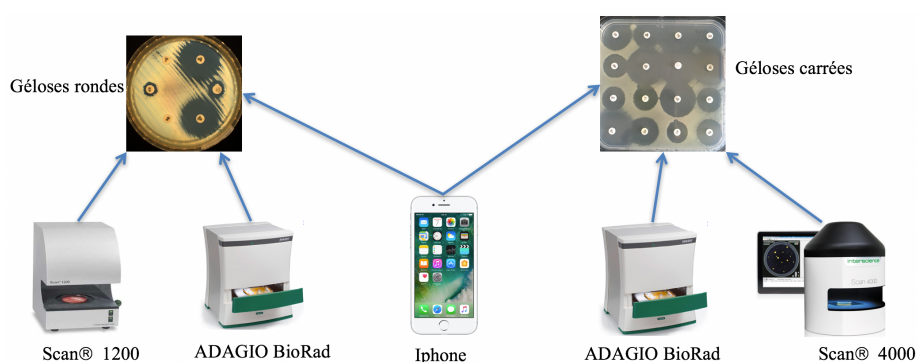
Figure 17. Présentation générale du fonctionnement du logiciel anti-logic.



3-Création de la base de données de photos et de souches

Actuellement, 2 bases de données de photos sont en cours de développement : 1 constituée de boîtes rondes comportant 2 panels de 6 antibiotiques et la 2^{ème} constituée de boîtes carrées contenant 16 antibiotiques différents. Différents systèmes d'acquisition d'images ont été utilisés et sont présentés sur la Figure 18.

Figure 18. Présentation des différents systèmes d'acquisition d'images.



Actuellement, 1479 souches ont été conservées à -80°C . Cette base de données de photos contient actuellement 2235 photos de gélouses rondes et 1450 photos de gélouses carrées prises avec différents systèmes d'acquisition d'images. La table 7 présente le détail de ces différentes photos.

Table 7. Tableau récapitulatif des photos réalisées lors de ce travail.

Souches bactériennes		Souches conservées	Nb de photos de gélouses rondes pour les 2 panels		Nb de photos de gélouses carrées	
			Photos scanners	Iphone	Photos scanners	Iphone
1	<i>E. coli</i>	736	1208	100	400	474
2	<i>S. aureus</i>	278	330		135	207
3	<i>S. epidermidis</i>	55	114			2
4	<i>P. aeruginosa</i>	140	184		10	51
5	<i>K. pneumoniae</i>	170	232		70	92
6	<i>E. faecalis</i>	42	51			9
7	<i>S. agalactiae</i>	16	32			
8	<i>P. mirabilis</i>	18	36			
9	<i>E. cloacae</i>	16	32			
10	<i>E. aerogenes</i>	5	10			
11	<i>K. oxytoca</i>	3	6			
12	<i>M. morgani</i>	En cours				
13	<i>S. marcescens</i>	En cours				

14	<i>E. faecium</i>	En cours				
15	<i>A. baumannii</i>	En cours				
	Total	1479	2235		1450	

Ces photos sont ensuite triées, interprétées et classées par phénotypes pour la moitié d'entre elles. L'autre moitié servira à tester le logiciel en aveugle. Certaines seront sélectionnées pour constituer la base d'apprentissage.

4-Validation de la base d'apprentissage :

La première étape est de vérifier que le logiciel reconnaît parfaitement les photos la constituant afin d'éviter toute erreur dès le départ. Pour ce faire, nous présentons les photos composant la base d'apprentissage comme si c'était de nouvelles photos et on regarde si l'interprétation et le score de reconnaissance est bon.

Si on prend l'exemple du panel n°1, nous avons constitué 2 bases d'apprentissage : la première contient 100 photos classées en 6 phénotypes différents et la deuxième contient 274 photos. Chaque nouvelle base d'apprentissage est constituée des photos de la précédente base auxquelles on ajoute de nouvelles photos. Par exemple, la 2^{ème} base d'apprentissage est constituée des 100 photos de la première base d'apprentissage à laquelle on a ajouté 174 nouvelles photos.

Table 8. Résultats des tests réalisés sur la base d'apprentissage.

		Panel 1	Panel 2
1 ^{er} test	Composition base d'apprentissage	100 photos	60 photos
	Reconnaissance des photos de la base d'apprentissage (photos existantes)	100/100 → 100% de bonne reconnaissance	3/60 → 95% de bonne reconnaissance
2 ^{ème} test	Composition base d'apprentissage	Wild ^a : 102 photos LLP ^b : 51 photos LLP-RFQ ^c : 15 photos HLP ^d : 71 photos HLP-RFQ ^e : 15 photos BLSE ^f : 20 photos Total: 274 photos	Wild: 101 photos SXT R ^g : 50 photos GENR-SXTR ^h : 12 photos Aminosides I: 6 photos Total: 169 photos
	Reconnaissance des photos de la base d'apprentissage (photos existantes)	100/100 → 100% de bonne reconnaissance	100/100 → 100% de bonne reconnaissance

^a Wild, souches sauvages ; ^b LLP, Low Level Penicillinase = Pénicillines de bas niveau ; ^c LLP+ RFQ, Pénicillines de bas niveau + résistance au Fluoroquinolones ; ^d HLP, High Level Penicillinase = Pénicillines de haut niveau ; ^e HLP+ RFQ : Pénicilline de haut niveau+ résistance aux fluoroquinolones ; ^f BLSE, Béta-Lactamase à spectre Étendu ; ^g SXT R, résistance au cotrimoxazole ; ^h GENR –SXT R, résistance à la gentamicine et Résistance au cotrimoxazole.

Si l'on regarde le panel 1, le logiciel reconnaît 100% des photos de sa base d'apprentissage que ce soit pour les 100 ou les 274 photos.

Pour le panel 2, Le score de reconnaissance n'est que de 95% : en effet, il n'a pas reconnu 3 photos donc nous les avons enlevés de la base d'apprentissage afin de s'assurer que 100% des photos de notre base d'apprentissage soient bien reconnues.

5-Tests du logiciel :

Nous allons tester 3 bases d'apprentissage par panel afin de voir si le « machine learning » fonctionne. Nous allons essayer de voir si le score de reconnaissance et le pourcentage de reconnaissance augmente avec le nombre de photos présentes dans la base. Normalement, plus le logiciel contient de photos plus celui-ci doit-être précis et donc le nombre de photos reconnues doit augmenter ainsi que le score de reconnaissance.

Pour ce faire nous avons effectué 3 tests : un 1^{er} test comparant 75 nouvelles photos à notre base d'apprentissage de 100 photos ; le 2nd test comparant 173 nouvelles photos à la base d'apprentissage de 274 photos et le 3^{ième} test comparant 105 nouvelles photos avec une base d'apprentissage contenant 342 photos.

Table 9. Présentation des résultats obtenus.

	Test 1	Test 2	Test 3
Composition base d'apprentissage	100 photos	Wild: 102 photos LLP: 51 photos LLP-RFQ: 15 photos HLP : 71 photos HLP-RFQ : 15 photos ESBL : 20 photos Total : 274 photos	Wild: 131 photos LLP: 66 photos LLP-RFQ: 17 photos HLP : 80 photos HLP-RFQ : 15 photos ESBL : 33 photos Total : 342 photos
Nouvelles photos tests	75 photos testées 20/75 → <u>74%</u> de bonne reconnaissance	173 photos testées 36/173 → <u>80%</u> de bonne reconnaissance	105 photos testées → <u>82%</u> de bonne reconnaissance
Score de reconnaissance		0,54	0,69



Fonctionnement du « Machine Learning »

Cette série de tests prouve que le logiciel devient de plus en plus précis et que le score de reconnaissance augmente avec le nombre de photos présentes dans la base d'apprentissage.

C'est donc la preuve que le « machine learning » fonctionne et que le logiciel est capable de reconnaître les phénotypes de façon automatique dans 82% des cas (résultats du test 3). Ces résultats s'expliquent notamment par la faible différence existante entre certains phénotypes : si on prend l'exemple des pénicillinases, une différence de 1 ou 2 mm au niveau des diamètres d'inhibition change le phénotype (HLP et LLP). L'élément important à déterminer est le nombre de souches minimum que doit contenir la base d'apprentissage pour que le logiciel fonctionne parfaitement avec un score de reconnaissance supérieur à 90%.

Figure 19. Exemple de bonne reconnaissance de phénotypes par le logiciel

Nouvelle analyse Charger photos Recherche d'analyse Tableau de bord

N° Analyse
YYY

N° Patient
XXX

Type de prélèvement
blood

Bactérie
ecoli

Type de boîte
round_box_with_6_pastilles

Type d'analyse (ATB)
ZZZZZZZZZZZZZZZZ

Phénotypes des 20 images les plus proches:

esbl (35.00%)	27 images dans la base
hlp_rfq (25.00%)	14 images dans la base
hlp (25.00%)	72 images dans la base
llp_rfq (5.00%)	15 images dans la base
LLP (5.00%)	54 images dans la base
(5.00%)	0 images dans la base

Statistiques du phénotype:
Score de reconnaissance 0.62263846

Manuel Valider

6- Améliorations nécessaires du logiciel :

Ce logiciel est encore au stade de prototype et une nouvelle version va nous être livrée prochainement. Ce nouveau prototype aura la capacité de reconnaître les boîtes carrées, l'algorithme sera consolidé et il pourra prendre en charge n'importe quel type de photos provenant de différents systèmes d'acquisition d'images que ce soit des scanners commerciaux ou des photos d'Iphone. Il va être capable à l'aide d'un traitement informatique de recadrer les photos afin d'obtenir une photo reproductible quel que soit le système d'acquisition d'images utilisé (angle de la photo, hauteur de la prise...).

L'interface graphique sera plus fonctionnelle et adaptée à un usage en microbiologie clinique. Par exemple, un tableau de bord permettant la traçabilité des résultats sera disponible ainsi qu'une connexion bidirectionnelle avec le système de gestion du laboratoire nécessaire en vue d'une validation biologique des résultats.

Afin d'évaluer la performance du logiciel au laboratoire de routine, nous allons comparer pour chaque antibiogramme les résultats rendus avec l'automate de routine (le Sirscan 2000 (i2a)) par les biologistes avec les résultats obtenus en utilisant notre logiciel.

Cette analyse s'effectuera sur une période de 2 à 3 mois afin de tester la fiabilité du logiciel sur les espèces d'intérêts.

En vue d'une commercialisation, le logiciel et sa base d'apprentissage vont être déposés chez un huissier afin d'en assurer la protection. La reconnaissance des caractères avec une « Keybionic » sera nécessaire en vue de l'obtention d'un marquage CE.

L'intégralité de ce travail est en cours de rédaction en vue de sa publication dans un journal international.

V- Nouvelles technologies permettant la détection des BMR

Contemporary challenges and opportunities in the diagnosis and outbreak detection of multidrug-resistant infectious disease, published in Expert review of molecular diagnostics [58] (IF: 3.333).

La détection des bactéries multi-résistantes représente un enjeu majeur en santé publique de par les problèmes de disséminations de ces bactéries devenus importants, des coûts de prise en charge et de la difficulté des traitements. Un travail collaboratif avec une étudiante en Thèse de Science nous a amené à rédiger une revue bibliographique sur les défis et les opportunités contemporains pour détecter ces bactéries multi-résistantes.

Nous nous sommes intéressés à la surveillance épidémiologique, aux moyens de détections et d'identifications des mécanismes de résistances au niveau moléculaire et génomique à travers le « Whole Genome Sequencing » qui sont ou qui pourraient être utilisés au laboratoire de microbiologie clinique.

REVIEW

Contemporary challenges and opportunities in the diagnosis and outbreak detection of multidrug-resistant infectious disease

Teresa Cimmino*, Stéphanie Le Page*, Didier Raoult and Jean-Marc Rolain

URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille University, Marseille, France

ABSTRACT

Introduction: The dissemination of multi-drug resistant bacteria (MDRB) has become a major public health concern worldwide because of the increase in infections caused by MDRB, the difficulty in treating them, and expenditures in patient care.

Areas covered: We have reviewed challenges and contemporary opportunities for rapidly confronting infections caused by MDRB in the 21st century, including surveillance, detection, identification of resistance mechanisms, and action steps.

Expert commentary: In this context, the first critical point for clinical microbiologists is to be able to rapidly detect an abnormal event, an outbreak and/or the spread of a MDRB with surveillance tools so that healthcare policies and therapies adapted to a new stochastic event that will certainly occur again in the future can be implemented.

ARTICLE HISTORY

Received 26 June 2016

Accepted 29 September 2016

2016

Published online 13 October 2016

2016

KEYWORDS

Multi-drug resistant bacteria; challenges; epidemiological surveillance; decreased delay of detection; molecular biology; point-of-care; whole genome sequencing

1. Introduction

Dissemination of multidrug-resistant bacteria (MDRB) has become a major public health concern worldwide because of the increase in infections caused by MDRB, the difficulty in treating them, and expenditures in patient care [1]. MDRB has not been clearly defined, but generally concerns Gram-positive and Gram-negative bacteria resistant to three or more antimicrobial classes [2]. With the increase in MDRB and the appearance of new resistance mechanisms, developing and implementing active surveillance for detection of MDRB are critical, so that we rapidly identify new clones or new sources responsible for outbreaks at the molecular level.

Over the last 10 years, several unpredictable new resistance mechanisms have emerged worldwide, such as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) [3], New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) [4], and more recently, *mcr-1* [5] and *mcr-2* [6] plasmid-mediated colistin resistance in Gram-negative bacteria. These new resistance mechanisms (NDM-1, *mcr-1*, and *mcr-2*) spread insidiously because they were initially unknown, and active surveillance of abnormal events was not available to detect and to identify them quickly in order to isolate patients. So among the current challenges for MDRB management, there is a need to coordinate efforts for surveillance, detection, and identification of abnormal events in order to rapidly implement policies for action. One example of rapid management of an outbreak of MDRB using the combined approach of surveillance, detection, identification, and action was demonstrated during the outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 in Germany and France in 2011. The outbreak emerged in Germany in May 2011, and was

identified quickly, since the first cases of hemolytic-uremic syndrome were reported around May 21-22 [7]. Following these first cases, the bacterial clone responsible for this outbreak was identified using whole genome sequencing (WGS) within 10 days. Investigation into the source of this clone was completed after only 8 days [8]. Although this outbreak was responsible for the death of more than 50 people, both the causative agent and the source of the outbreak were determined rapidly, thanks to a coordinated effort and the use of new technologies. This type of outbreak will happen again because of globalization, human circulation, the ability of bacteria to transfer resistance genes, and the unpredictable occurrence of new resistance mechanisms [9].

Currently, two types of epidemic have emerged: epidemic genes (a gene transmitted between different bacteria) and epidemic clones (a new clone of a bacterial species with a specific phenotype), with different appearance and dissemination mechanisms. Epidemic genes appear as a result of antibiotic selective pressure (human or environmental), and only one specific gene is able to diffuse between bacteria and endemically, such as NDM, KPC, or *mcr-1*. Epidemic clones are different; they seem to be another species with a new specific profile (resistant or not), without selective pressure and with local dissemination [10].

In the twenty-first century, the challenges in the management of MDRB are the need for faster provision of care, active surveillance of circulating bacteria, rapid detection of an abnormal event (new or emerging phenotype), development of rapid tests for the detection of new cases (phenotypic tests and real-time PCR assays based on whole genome sequence

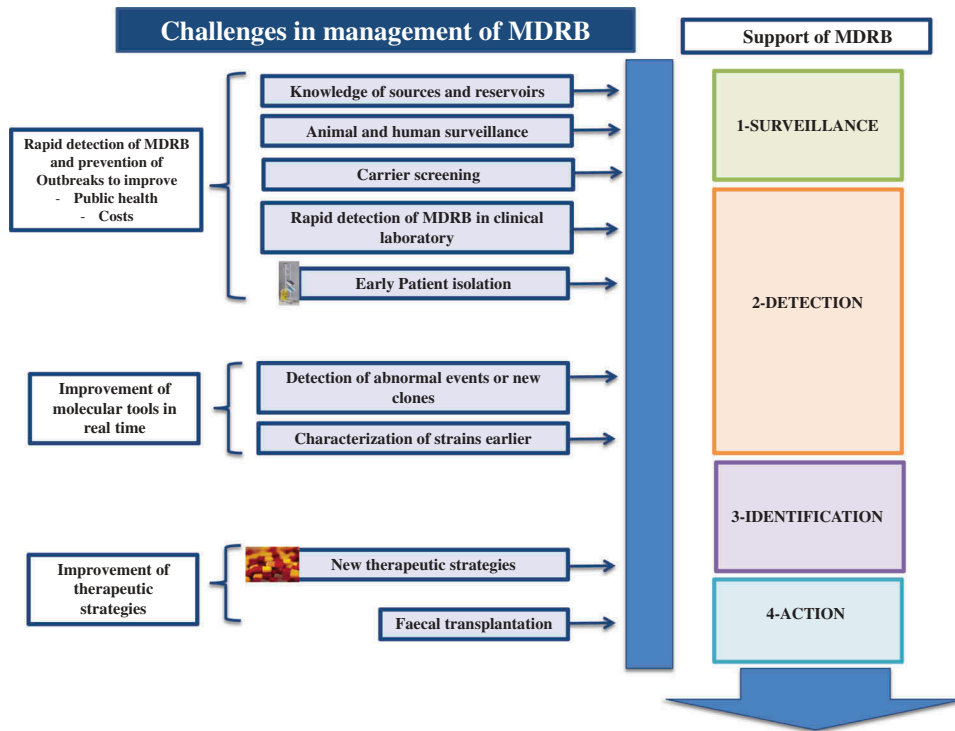


Figure 1. Presentation of challenges in the management of MDRB in the clinical laboratory.

analysis of the clone) to prevent the outbreak, and the need for rapid action to avoid dissemination of the disease.

Here, we have reviewed the challenges and contemporary opportunities in rapidly confronting infections caused by MDRB, including surveillance, detection, identification of the resistance mechanism, and action steps (Figures 1 and 2).

2. New opportunities for surveillance and detection of MDRB

Surveillance of MDRB represents the first step. Efficient and active surveillance of MDRB with automatic systems is critical to avoid the occurrence of epidemics. Furthermore, this

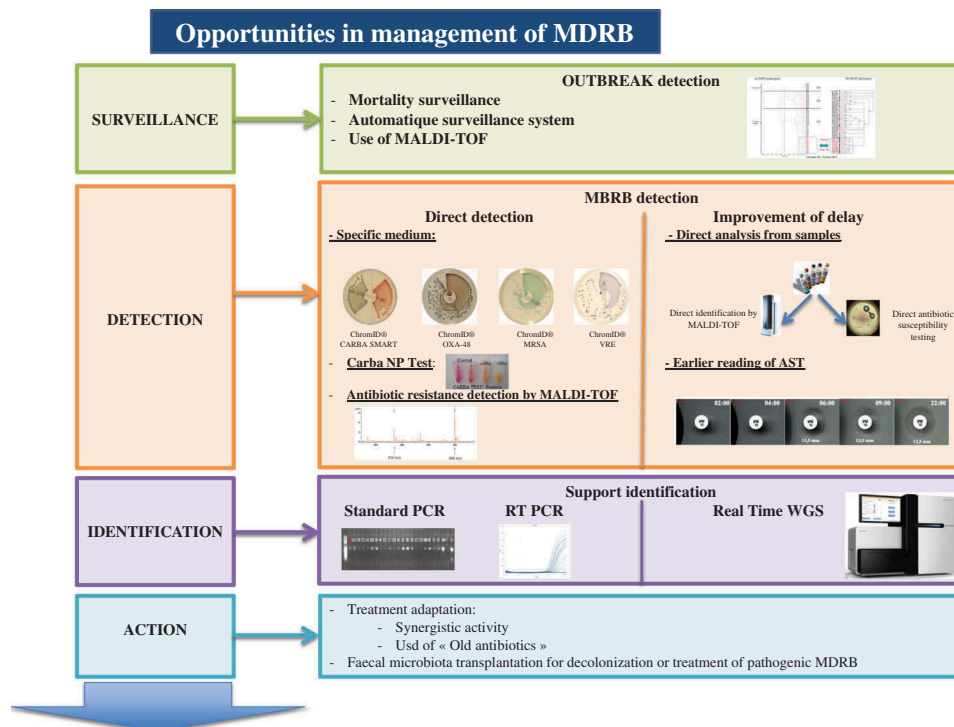


Figure 2. Opportunities for improvement in the management of MDRB in the clinical microbiology laboratory.

surveillance should be employed, including for environmental sources, with improved knowledge of potential sources and reservoirs, especially animal sources. In the past, it was believed that antibiotic resistance emerged only because of misuse of antibiotics in humans, but environmental selection pressure in animals now represents a major step toward selection of new bacterial clones, with diffusion and transmission of MDRB [11].

2.1. Outbreak detection

Surveillance represents the first step for the detection of MDRB, or an outbreak of MDRB. At present, two tools offer new possibilities for detecting this phenomenon: an epidemiological surveillance system, and analysis of bacterial clusters by MALDI-TOF.

2.1.1. Epidemiological surveillance system tools

Surveillance of infectious disease plays an important role in improving diagnosis, prevention, and treatment for patients, and in public health [12,13]. For Enterobacteriaceae, asymptomatic carriers and expansion of carbapenemases around the world warrant adequate implementation of measures, including active surveillance, to contain the spread of these pathogens. Table 1 presents the recent expansion of specific MDRB, with some outbreak descriptions. There was no specific real-time surveillance system available for any of them, only retrospective analyses of clinical and laboratory data. Epidemiological surveillance systems can detect outbreaks and anticipate events [14,15], but only if the system has access to data in real time. For detection of abnormal phenotypes or clusters of strains for example, some software tools have been developed based on laboratory data analysis of antibiotic susceptibility testing (AST) [16]. For example, these systems detected an outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (*bla_{OXA-48}*) in a Marseille hospital. Such a system allows only retrospective analysis of events, but rapid real-time surveillance of resistance is being developed [16]. This outbreak was detected by MARSS (Marseille Antibiotic Resistance Surveillance System) a software capable to detect and generate an alarm for β -lactam resistance phenotype such as carbapenem resistance in *K. pneumoniae* based on historical database. This database focused on 15 selected bacterial species with 12,062 results of AST. The system calculated the mean \pm 2 standard deviations using statistical analysis to obtain the prevalence of the resistance and detect a possible outbreak. Statistical tools have been developed to provide automated data analysis, to automatically detect outbreaks in real time, based on syndromic surveillance of abnormal infectious disease events, emerging infections, or specific bacteria with abnormal resistance phenotypes [17,18]. Currently, more than 250 surveillance systems have been described around the world for infectious disease [17], and some are specifically dedicated to mass-gathering surveillance [19]. Surveillance system or surveillance tools represent software capable based on historical hospital data (result of AST or prevalence of bacterial species) to detect abnormal events with statistical analysis. These systems can become more efficient, with improvement of

automatic data collection without human resources in real time and with new approaches using the Internet, automatic bibliography analysis, cell phone applications, and wireless sensor networks [19].

2.1.2. MALDI-TOF

Bacteria were previously identified with conventional phenotypic techniques, such as carbohydrate metabolism analysis, biochemical properties, and Gram-staining, but the use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) has recently revolutionized identification of bacteria at the species level in clinical microbiology [37]. In modern clinical diagnostic laboratories, MALDI-TOF is used routinely for precise identification of bacteria at the species level [38,39]. Some small laboratories share it in common use arrangements [40] because of the cost of the machine. For rapid detection or prevention of MDRB, MALDI-TOF offers the possibility of identifying bacteria at the species and subspecies level, with a rapid turnaround time [41], and also classifying and analyzing spectra in clusters, to detect unusual or uncommon types of strains. MALDI-TOF is an efficient tool for typing strains and analyzing spectra to obtain a main spectrum dendrogram. MALDI-TOF clustering allows the detection, for example, of nosocomial outbreaks of MDRB such as *Enterobacter cloacae* [42], *Serratia marcescens* in Algeria [43], or typing of *Staphylococcus aureus* strains [44].

2.2. Detection of MDRB in the clinical microbiology laboratory

To detect MDRB in the laboratory more quickly, we must develop more effective tools. Earlier detection can improve the course of patient care. In clinical microbiology laboratories, the current challenges are the evolution of technologies and techniques such as bacterial identification by MALDI-TOF MS [41], rapid detection of MDRB by phenotypic tests [45], and AST being read more quickly [46].

In recent years, many other technologies have been developed: direct PCR, DNA microarrays, Luminex x MAP assays; fluorescence *in situ* hybridization (FISH), minisequencing, multiplex PCR, mass spectrometry-based comparative sequence analysis (MSCSA), and line-probe assays. These have been reviewed previously and are not included in this review [47].

2.2.1. Direct detection

2.2.1.1. Specific medium for resistance detection. For Enterobacteriaceae, some specific agar media have been developed to detect extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and carbapenemase-producing strains sooner in the clinical laboratory, with agar supplemented with antibiotics [48,49]. Agar media supplemented with carbapenem (Ertapenem, Meropenem) allow the detection of Gram-negative bacteria with carbapenemase activity. With the increase in asymptomatic carriers of MDRB strains, convenient tools have been developed for rapid screening, including selective chromogenic mediums: chromID CARBA (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France), chromID OXA-48, and Oxoid Brilliance CRE (Besington, Hants, United Kingdom) [50–52]. However, with the

Table 1. Presentation of outbreaks with epidemic genes and clones.

Type of epidemic genes ^a	Support of resistance	First isolation	First outbreak	Surveillance	System of detection	First RT-PCR	First genome description	Reservoir	Pathogenicity	Dissemination
<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemas: KPC	1996 in <i>K. pneumoniae</i> (with plasmid) in North Carolina [3]	2001-2002 in New York and New Jersey hospitals [20]	Retrospective analysis of laboratory data	Standard PCR with sequencing	RT-PCR in 2009 [21]	2012 [22]	Colonized patient	Asymptomatic carriers +++ ¹⁰⁰ Sick patients	Worldwide with endemic in Greece and Italy	
New Delhi Metallo-beta-lactamase: NDM	2009 in <i>K. pneumoniae</i> in Sweden after coming back from New Delhi [4]	Spread in UK	Retrospective analysis of laboratory data	Standard PCR with sequencing	RT-PCR in 2011 [23]	Carriers Tap water bacteria	Asymptomatic carriers +++	Worldwide in low noise		
<i>mcr-1</i> plasmid-mediated colistin resistance	December 2015 in China [5]	-	Retrospective	Whole plasmid sequencing	RT-PCR in June 2016 [24]	Animals probably	Asymptomatic carriers +++	China, France, Thailand, Laos, Algeria		
<i>E. coli</i> CTX-M15 (plasmid)	1990 [25]	Global dissemination [26] with outbreaks South America, Canada, Poland, Spain	Retrospective	PCR	RT-PCR in 2007 [27]	Antibiotic use and environmental	Urinary tract infections	Pandemic [29]		
<i>E. coli</i> ST131 H30-Rx a single highly pathogenic subclone	2010-2011 USA [30]	Global dissemination	Retrospective	PFGE, Multilocus sequence typing	-	2013 [31]	Environmental	Multidrug-resistant bladder, kidney, and bloodstream infections	Worldwide [29]	
Shiga-toxin-producing <i>E. coli</i> 0104:H4	HUSEC ₀₄₁ in Germany 2001	2011 in Germany July	First case of hemolytic-uremic syndrome	Rapid multiplex PCR [32]	Rapid RT multiplex PCR [32]	2012 [33]	Fenugreek sprouts	Sick patients	Germany, Netherland, France [34]	
<i>E. coli</i> O15:H2:H1 strain resistant to Trimethoprim-Sulfamethoxazol	South London in 1987-1988 and in Barcelona [35]	South London [36]	Retrospective	PCR Fingerprinting [35]	-	-	Product contaminated	Urinary tract infection, Pyelonephritis	California, London, Europa	

^aEpidemic genes: one gene transmitted between different bacteria.

^bEpidemic clones: one new clone of one bacterial species with a specific phenotype.

+++ correspond to the most prevalent type of pathogenicity.

emergence of new resistance mechanisms, such as the *mcr-1* gene [5] in Enterobacteriaceae conferring resistance to colistin, there is a need to regularly develop new media with high specificity [53]. Thus, developing new media is an opportunity for the culture to improve detection of MDRB.

2.2.1.2. Carba NP test. Biochemical tests have also been developed for the detection of carbapenemase producers in Gram-negative bacteria: the carbapenemase Nordmann-Poirel test (Carba NP test) [54] for Enterobacteriaceae, and after improvement of the protocol, the modified Carba NP test for Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* [45]. These techniques allow rapid detection of carbapenemases KPC, MBL, and more recently OXA types, in less than 2 h [45].

2.2.1.3. Detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF.

MALDI-TOF can also help detect antibiotic resistance, especially β -lactamase activity, in Gram-negative bacteria [55]. Detection of carbapenemase-producing bacteria is possible, with spectral analysis of carbapenem compounds after hydrolysis of the compound, with high sensitivity and specificity [56]. MALDI-TOF offers the possibility of detecting carbapenemase activity sooner (0.5–4 h) [57]; for example, the carbapenemase type and variant in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* [58,59]. This technique has been performed with culture isolates and is possible directly on positive blood culture vials [60,61]. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [62] (MRSA) and vancomycin-intermediate *S. aureus* [63] can be detected by MALDI-TOF as well.

2.2.2. Decreased delay

2.2.2.1. Direct identification from samples. Direct analysis of samples for microbial identification and realization of AST can decrease the delay for detecting MDRB. MALDI-TOF can be used for direct bacterial identification from samples with specific treatment. Bacterial identification is possible directly in positive blood culture bottles [64–66] after the sample receives a specific treatment (centrifugations and then lysis by trifluoroacetic acid or formic acid) with good identification and is routinely used.

For urine samples, MALDI-TOF can correctly identify the bacterial species after centrifugation and a washing step if the sample is monomicrobial and with a minimum of 5×10^6 bacteria/mL in 1 h, as compared to 24 h with conventional methods [67–69].

After direct identification, AST should be done as soon as possible for improvement of antibiotic stewardship [70]. Direct susceptibility testing by disk diffusion from urine [69,70] seems to be an alternative with monomicrobial infection and interpreted with a European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoint [71] and also in blood [72]. This technique, combined with direct identification by MALDI-TOF of the sample, reduces the turnaround time to 24 h. Performing susceptibility testing by MALDI-TOF or direct disk diffusion necessitates monomicrobial infection and

sufficient bacteria and is currently only done in urine, blood, and respiratory samples.

2.2.2.2. Earlier reading of AST. AST by disk diffusion remains the reference technique for detection of antibiotic resistance, with the interpretation of inhibition zone diameters with breakpoint values or directly with the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), as recommended by expert groups such as EUCAST [73]. To save time, the AST reading can be improved by using a new generation of scanners. With high-resolution, real-time imaging, the Advencis Biosystem scan (Advencis, Mutzig, France) is capable of detecting resistance to carbapenems as soon as 3.5 h (mean time 3.7 ± 0.45 h) [46]. This technology represents the future, with earlier AST readings and a rapid turnaround time for patient management.

3. Real-time PCR

3.1. RT PCR

At present, real-time PCR (RT-PCR) is the fastest molecular technique for detecting and quantifying the presence of known antibiotic resistance genes or pathogens [74]. This technique has the capacity to determine the gene responsible for a particular phenotype in less than 5 h, if it is already known. RT-PCR development needs to obtain the sequence of interest for a given bacterium beforehand in order to design primers and probes. The rapid development of RT-PCR is necessary after the discovery of new resistance genes, in order to screen for the presence and dissemination of genes of interest [23]. Such molecular tools are well designed for MDRB and allow rapid detection of antibiotic resistance genes at the same time [75].

Until now, using standard PCR and sequencing has only had an epidemiological benefit in the case of an outbreak, verifying the possible occurrence of a new variant of genes or for typing bacteria by multiple loci sequence typing (MLST) of MDRB [76,77] retrospectively.

3.2. Point-of-care

Development of point-of-care (POC) tests with immunochromatographic and agglutination assays and automated DNA extraction and real-time PCR represents an opportunity and a challenge for reducing the time to treat MDRB [78].

POC laboratories with real-time molecular facilities are now being developed. They can deliver results after 3 to 4 h of patient care. PCR-based methods and real-time PCR are the two molecular techniques available for POC testing [47,78]. For RT-PCR in POC, simplified protocols have been developed, with automated DNA extraction and RT-PCR with prefilled strips. The Cepheid Xpert-Carba-R (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) GeneXpert cartridge is the most recent PCR-based method for detecting five gene targets, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}*, and *bla_{VIM-1}*. One cartridge can extract the DNA, amplify it, and detect resistant genes [79–81]. These

techniques with a rapid turnaround time can improve the MDRB screening.

4. Whole genome sequencing

4.1. Challenge of using WGS in microbiology

Molecular biology solutions for detection of MDRB include resistance mechanisms being identified using quantitative real-time PCR assays or next-generation sequencing (NGS) [47]. Molecular methods have shortened the time for detecting resistance genes in MDRB, and advances in NGS technology and bioinformatics user-friendly software facilitate identification of genes involved in antibiotic resistance.

This new sequencing technology has changed microbiology. In the past, it was a major accomplishment to sequence a genome, but now, sequencing is so fast and cheap that populations can be characterized. This is important, not only in understanding how microbial populations infect humans and are recognized by the immune system, but also in designing effective vaccines and personalized antibiotic therapies.

Surveys of microorganisms in the environment and in samples of ancient permafrost have revealed that the antibiotic resistome (AR) gene pool is genetically diverse, widespread across all environmental niches, and predates the modern antibiotic era by millennia [82].

The widespread dissemination of AR elements predates the modern selective pressure from clinical antibiotic use [83] and is inconsistent with a hypothesis of contemporary emergence; instead, this suggests a richer natural history of resistance. Following this hypothesis, the mechanisms of an intrinsic or 'natural AR' are complex [10]. Over the past 20 years, amazing strides have been made in our understanding of the mechanisms and genomics of microbial natural-product biosynthesis [11].

4.2. WGS for improving prevention

A winning strategy is knowledge of the 'enemy,' but developing technological solutions for any successful therapeutic agent is compromised by the potential development of tolerance or resistance to that compound from the time it is first employed [84]. The rapid detection of resistance mechanisms has an important epidemiological role [11]. Using the correct antibiotic makes it possible to avoid the emergence of resistant bacteria, including the so-called superbugs, pathogenic bacteria harmful to humans that do not respond to treatment.

This information is critical for clinicians so that they choose the best antimicrobial treatment that will reduce the burden of hospital-acquired infection caused by MDR pathogens [85]. Resistance to antibiotics may arise in a population of susceptible bacteria from rapid evolution of the bacterial genome under selective antibiotic pressure and by the selective pressure of the environment [86], and/or by dissemination of resistant microorganisms through healthy individuals, who may constitute a mobilizable antibiotic resistance gene (ARG)

reservoir from dormant pathogens inhabiting the human microbiome [87].

4.3. WGS for detection of antimicrobial resistance genes

Through the advances in genome sequencing and bioinformatics tools, we can identify pathogens and their resistance profiles very rapidly [82]. Bioinformatics tools provide better understanding of the molecular basis of antimicrobial resistance [88–90].

The availability of genome sequences has revolutionized the field of microbiology [91]. The challenge is no longer data acquisition, but data analysis [92]. In the absence of a robust pipeline of new drugs coming to market, understanding the genomic basis of resistance and how it moves through bacterial and patient communities is essential for judicious management of increasingly scarce antibiotics [93]. Equally important, we are on the cusp of an age where these technologies and research methods can translate to improved clinical outcomes, with rapid detection of drug resistance genes in infectious pathogens.

During the ECCMID 2016 in Amsterdam, members of EUCAST introduced the possibility of using WGS as a routine tool in predicting antibiotic susceptibility patterns and discussed how these technologies could be used in clinical microbiology laboratories. In the last few years, an increasing number of publications have become available that confirm concordance between genotypic results *in silico* and phenotypic antimicrobial susceptibility testing *in vitro* [94–96]. A large number of clinical samples are tested in these studies, obtaining a concordance of approximately 90% between AST and WGS.

At present, WGS can detect pathogen resistance very rapidly and may help in responding efficiently to clinical questions [97]. It is now assumed that a bacterial genome can be completed in less than 2 days with acceptable costs (below \$500). The increasing use of next-generation WGS and whole community sequencing (WCS; a.k.a. metagenomics) is revolutionizing medical microbiology, resulting in a paradigm shift from phenotype to genotype-based diagnosis of resistance [98].

WGS offers a potential solution to the problem of routine laboratory diagnosis once sequence analysis has become fully automated. Sequencing is a common process regardless of the organism. Multiple rare (as well as common) pathogens may be sequenced simultaneously in a single sequencing run [99]. This means that WGS could allow economies of scale at local or regional laboratories, providing unique access to the full genetic repertoire of a strain [100]. WGS methods may be useful for slow-growing organisms, organisms that are unable to be cultured, or where phenotypic susceptibility testing is unreliable [101]. A transition to WGS will not make reference laboratories obsolete but instead will provide the capacity to monitor the spread of pathogens in real time and to take action in a timely manner.

Comprehensive databases are warranted to respond to the increase of new bioinformatics tools, to decipher bacterial resistome, and to monitor the dissemination and identification

Table 2. Characteristics of the most popular bioinformatic database of antibiotic resistance genes available.

Database	AR gene spectrum	No. °AMR sequences	Example outbreak detected	Data created	Last update	Website	Typology blast sequences	Cited	Publications
ARDB	All AR genes	249	<i>Shigella dysenteriae</i> [102]	2009	July 2009	http://ardb.cbc.umd.edu/	DNA sequence	324	[103]
ResFinder	Variation in housekeeping genes	2115	<i>Escherichia coli</i> O157 [104]	2012	March 2016	https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/	Full Genome	219	[105]
CARD	All AR genes	2237	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KP ST11 [106]	2013	March 2016	https://card.mcmaster.ca/download	DNA sequence	153	[107]
ARG-ANNOT	All AR genes	1752	<i>Salmonella typhi</i> [108]	2014	Dec 2015	http://en.mediterranee-infection.com/article.php?laref=283%26titre=arg-annot	Full Genome	70	[109]

of antibiotic resistance genes and new antibiotic resistance genes.

4.4. Databases

Currently, microbiologists use different databases to explore the bacterial population resistome. The most popular bioinformatics tools related to antibiotic resistance include ARDB, CARD, ResFinder, and ARG-ANNOT, presented in Table 2.

The Antibiotic Resistance Genes Database (ARDB) was the first database created that unites most of the publicly available information on antibiotic resistance genes and related information. Resistance genes are categorized by resistance type from their resistance profiles and similarity sequences. Each gene and resistance type is annotated, including the resistance profile, mechanism of action, and ontology [103].

The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) is a rigorously curated collection of known resistance determinants and associated antibiotics, organized by the Antibiotic Resistance Ontology (ARO). This database also includes a predictive tool, the Resistance Gene Identifier (RGI), which predicts known antibiotic resistance elements from genome sequence data [93]. The ResFinder tool, version 2.1 (online since January 2014), focuses on the identification of acquired antibiotic resistance genes in WGS bacterial data [110]. It was compiled from existing databases; e.g. the ARDB (<http://ardb.cbc.umd.edu/>), and a thorough literature search. Therefore, the database is considered to be reasonably complete, and new genes are continuously being added following their description in the literature. As input, the method can use both preassembled, complete, and partial genomes and short sequence reads from four different sequencing platforms. All genes from the ResFinder database were BLASTed against the assembled genome, and the best-matching genes were given as output. For a gene to be reported, it has to cover at least two-fifth of the length of the resistance gene in the database with an identity $\geq 50\%$ [105].

ARG-ANNOT is the most recent database, created in 2014 [109]. Originally, the number of sequences included in the database for AR genes was 1689; currently, that has been updated to 1752 (http://www.mediterraneeinfection.com/arkotheque/client/ihumed/_depot_arko/articles/690/arganot-aa_doc.fasta). ARG-ANNOT is an updated database attempting to respond to the evolving needs of an increasing number of bacterial genome sequences. A recent example is the description of the *mcr-1* gene, the recent AR plasmid-

mediated gene responsible for colistin resistance, discovered in December 2015 [5]. ARG-ANNOT is a rapid and easy-to-use method for deciphering the resistome of a bacterial genome, retrieving an exhaustive list of results in less than 4 min [111]. In May 2015, Wang et al. used ARG-ANNOT to screen a global collection of 1832 sequenced *S. typhi* genomes [108], demonstrating the first comprehensive global phylogenetic analysis of emerging MDR-associated *S. typhi*. Moreover, the studies deciphering the resistome using the ARG-ANNOT system recognized antibiotic resistance genes with high specificity, while in a second step, a very low specificity (percentage of identity and length of coverage) can be used to detect more distant AR gene sequences; i.e. putative new genes [112].

Current limitations for these databases include the need for continual updating with the new resistance genes, predicting only known antibiotic resistance genes, and detection with low percentages of similarity [109]. The accuracy of the estimate quality of sequence of WGS and of database analysis is important for clinical microbiology, particularly for organism identification, typing, and resistance detection and estimate the quality of sequence of WGS.

The reliability of the genotype–phenotype prediction is dependent not only on good correlation data but also on good database resources to allow easy access to such data [113] because the poor quality of read and/or if the not update database be missed the identification of resistance genes.

4.5. Opportunities using WGS to detect MDR pathogens

Nowadays, keeping turnaround time low (72 h or less) in an outbreak investigation using real-time pathogen surveillance is theoretically possible. When it will be feasible to use sequencing directly on the clinical sample, this could further reduce time and improve diagnosis.

Retrospective analysis using WGS also has potential. We could ‘stop’ or understand the mechanism of dissemination of an MDR outbreak in a short time. This replacement for traditional bacterial typing has revealed its potential as a powerful tool for epidemiological surveillance of bacterial pathogens, one of the cornerstones of infection control, describing the evolution and epidemiology of important infections such as the emergence of ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* [114], the increasing prevalence in hospitals of the MDR bacterium *P. aeruginosa* in the UK [115], and *K. pneumoniae* in Italy [116]. Suspected outbreaks

can be confirmed and contained. Within an hour of receiving results, clinicians could tailor treatment of hospitalized patients, providing the right drug at the right dose and the right route of administration. This precision will help more people in addition to the patient, as infections that are cured quickly are less likely to spread. It also means using fewer ineffective drugs, reducing the selective pressure for resistance, and leading to fewer pointlessly disrupted gut microbiomes [117].

Through the synergy between surveillance and next-generation technologies such as PCR and WGS analysis, a different method of outbreak identification and dissemination of pathogens and their reservoir is possible. For example, we can cite the outbreak caused by *E. coli* of the epidemic clone O104:H4 with rapid spread in Germany and northern Europe during May–July 2011 [7]. The recent discovery of the plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* by Yi-Yun Liu et al. in China allows international scientific communities to investigate and screen for the diffusion of this mechanism by setting up specific primers for PCR [5].

Early in 2014, Oxford Nanopore Technologies (ONT) released MinION™, the first DNA sequencing device based on biological nanopores, and it constitutes the first portable high-throughput sequencer. MinION technology has potential for such applications to infectious disease, it is highly accessible, comparable in size to a USB flash drive, and requires only a basic laptop, easily supported by the bioinformatics community [118]. Both the draft sequencing protocol presented for the MiSeq and the real-time evaluation of nanopore sequencing demonstrate that these approaches have utility in generating data in less than one day in case of an outbreak [119].

4.6. Challenges and potential for metagenomics in the clinic

Our view of the microbial world and its impact on human health is changing radically, with the ability to sequence uncultured or unculturable microbes sampled directly in their habitats, an ability made possible by fast and cheap NGS technologies. Such recent developments represent a paradigm shift in the analysis of habitat biodiversity in the human, soil, or ocean microbiome [120].

The term ‘metagenomics’ was first coined in 1998. It refers to the genomic analysis of microbial DNA that is extracted directly from communities in environmental samples [121].

In quantitative metagenomics, variable regions of bacterial 16S rRNA genes are usually amplified by PCR and then subjected to library construction, followed by sequencing using next-generation technologies. The 16S rRNA gene is thus a good marker for exploring the phylogenetic composition of a given sample, in identifying new species, and even unknown phylogenetic groups [120].

Many projects have been funded in recent years that aim to characterize the human microbiome and uncover its impact in human health and disease. The Human Microbiome Project (HMP) is a major project funded by the NIH. Its main goal is to characterize the microbial communities found at several different sites in the human body [122].

The potential of the human microbiome as an early detection biomarker for diagnostic and prognostic purposes is a very active area of research. Oral and fecal microbial samples can be obtained very easily and used immediately as diagnostic tools. Some results already indicate how metagenomics and the microbiome can be used to improve our health [123]. Therapeutic drugs can be designed to directly interact with the microbiome and modulate its different functions to change its state, and thus transform the diseased phenotype to a healthy state [124,125]. Using a metagenomics approach, we can investigate the functional role of the host microbiome on the carriage and transmission of antibiotic resistant organisms (AROs). In patients who are asymptomatic carriers or actively infected with AROs, what is the state of their gut microbiome relative to noncarriers? Can we identify specific communities and functions that provide colonization resistance against some or all AROs [126] (Figure 3)?

WGS and metagenomic sequencing, combined with computational and phenotypic analysis, have revealed that 50–60% of the bacterial population from the intestinal microbiota of a healthy individual produce resilient spores, specialized for host-to-host transmission [127], and that diet and nutritional status influence the composition and dynamic operations of our gut microbial communities and the innate and adaptive arms of our immune system [128,129].

Finally, over the last 20 years, thanks to NGS technologies, we have discovered that the individual’s microbiota represents a unique fingerprint, and that bacteria play a major role in our life.

4.7. Limitations of NGS

Despite the fact that NGS studies have demonstrated high concordance between *in silico*-predicted and phenotypic antimicrobial susceptibility, we add a note of caution, since the genome sequence does not as yet allow accurate prediction of the potentially conditional expression of particular genes, or their expression level.

Adopting whole-pathogen sequencing would require major skills in terms of organization, costs, infrastructure, and sufficient competence in bioinformatics. Pathogens are not static: they move around the world, they adapt to the environment, their lifestyles change, and so the need to create systematic computational methods, a unique, easily accessible, and exhaustive antibiotic resistance genes database and a common web-based database network will be necessary in the future in order to exchange scientific information for global surveillance.

4.8. Future perspectives

WGS could replace AST for MDR bacteria isolated from hospitalized patients if the bacterium in question has already been sequenced. Clinical applications of bacterial WGS-based information will be crucial for global efforts to identify, prevent, and treat infectious diseases.

We can hope that in the future, using NGS will help to personalize therapies for individual treatment of infectious diseases and to improve food protection strategies.

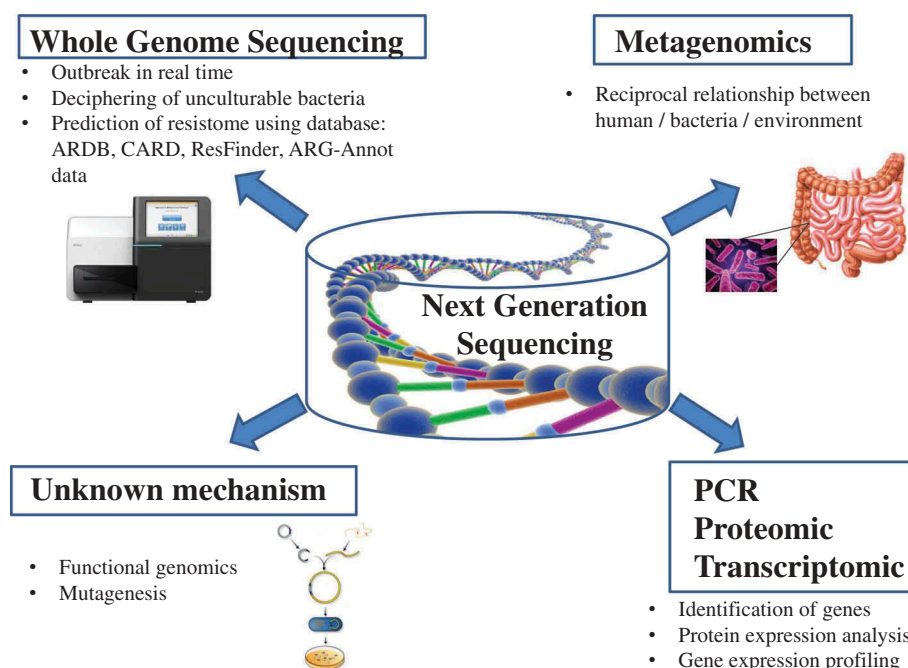


Figure 3. New opportunities for whole genome sequencing.

International projects such as MetaHIT and HMP have already released a wealth of data on ecosystems, along with the corresponding reference catalogues and their available functional and phylogenetic annotations. Making data and bioinformatics/biostatistics freely available to the public is critical to help scientists share their data for better detection and comprehension of infectious diseases, especially in the context of antibiotic resistance.

5. Action and new therapeutic strategies

Although new technologies, including rapid phenotypic detection (new clone, new resistance phenotype) and genomic techniques are available, isolating patients at risk of MDRB represents the first action step for clinicians after identification, to reduce the possibility of transmission [130]. This should be done as quickly as possible. Treatment can be modified or new strategies developed for patient treatment now, with the use of 'old antibiotics' [131], new combinations of antibiotics [132], or treatment by fecal microbiota transplantation for colonized or sick patients [133].

6. Conclusion – current strategies

Problems of resistance to antimicrobials are a common and ongoing phenomenon that is unstoppable because of the high diversity and capacity of microbes to adapt to their environments. In this context, the first critical point for clinical microbiologists is to be able to rapidly detect an abnormal event, an uncommon strain, an outbreak, and/or the spread of a MDRB in the clinical microbiology laboratory, using surveillance tools. For this, we need to develop and continue to survey phenotypes of bacteria in real-time to be able to detect (MALDI-TOF, Carba NP Test, Video imaging) and rapidly

develop new detection tools, either for a new gene or for a bacterial clone, in order to implement health-care policies and therapies adapted to a new stochastic event that will certainly occur again in the future.

7. Expert commentary

At present, we know that the emergence and spread of resistance are linked mainly to two processes: emergence and spread of an antibiotic resistance gene (the selfish gene theory) [134], because of selection pressure in the environment or in humans (carbapenemase or *mcr-1* colistin-mediated resistance, e.g.), or emergence and spread of an epidemic clone, whether this clone has acquired resistance to antimicrobials or not; i.e. an abnormal event in MDRB could be due to the spread of a new AR gene in the bacterial community or an epidemic bacterial clone that is resistant, even if that resistance is independent from the spread of the clone. Because the bacterial community is a complex and rapid evolving system, it is impossible to predict what the next outbreak or emergence of MDRB in the world could be, because of an arms race among bacteria to survive; the Red Queen hypothesis [135]. Moreover, the massive use of antibiotics in human medicine and in animals, combined with the possibility of the emergence at any time of a new bacterial clone with high fitness and virulence, even if it is not linked to selection pressure, may also create a stochastic event associated with an MDRB; Alice's living croquet theory [9].

Syndromic analysis of samples and development of POC tests with an effective real-time surveillance system can improve MDRB detection. Process optimization and rapidity of phenotypic and genotypic tests with real-time video imaging and MALDI-TOF for bacterial identification and typing of

strains in a core laboratory represent the future of microbiology laboratories. We also use such strategy in networked groups of small laboratories to identify bacteria by MALDI-TOF in a single laboratory. The use of WGS in routine laboratory work to decipher the resistome on bacterial strains or directly in the sample will be possible as costs fall, as the WGS becomes smaller and as databases improve.

These innovative technologies are able to detect MDRB at POC to allow patient isolation, prevent nosocomial infections and the spread of bacteria, and adapt the therapeutic strategy as quickly as possible.

8. Five-year view

New technologies, including rapid phenotypic detection with epidemiological surveillance systems in real-time and video imaging (new clone, new resistance phenotype) and genomic techniques (NGS) represent the keys for the management of MDRB. We can hope that in the future, using NGS with lower cost and rapid phenotypic analysis can help to personalize therapies for individual treatment of infectious diseases, to improve food protection strategies, and to develop gene therapy.

Key issues

- With the increase in MDRB and the appearance of new mechanisms of resistance, developing and implementing active surveillance for detection of MDRB is critical, in order to rapidly identify new clones or new sources responsible for outbreaks at the molecular level.
- Efficient and active surveillance of MDRB with automatic systems is critical to prevent epidemics
- The ability to detect MDRB in the laboratory as quickly as possible requires the development of more effective tools like direct identification by MALDI-TOF or AST in samples.
- Identifying resistance mechanisms by molecular biology using quantitative real-time PCR assays or next-generation sequencing (NGS) are solutions for detection of MDR.
- The development of POC laboratories with real-time molecular facilities is now a reality, and brings the ability to obtain results after 3–4 h of patient care. Molecular methods have shortened the time for detecting resistance genes in MDRB, and advances in next-generation sequencing technology and user-friendly bioinformatic software facilitate the identification of genes involved in antibiotic resistance.
- WGS could replace AST for MDR bacteria isolated from hospitalized patients if the bacterium in question has already been sequenced. Clinical application of bacterial WGS-based information will be crucial for global efforts to identify, prevent and treat infectious diseases.

Funding

This paper was funded by IHU Méditerranée Infection.

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with

the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

English language editing was provided by TradOnline and funded by IHU Méditerranée Infection.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (***) to readers.

1. Chang -H-H, Cohen T, Grad YH, et al. Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiol Mol Bio Rev.* 2015;79(1):101–116.
2. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268–281.
3. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151–1161.
4. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046–5054.
5. Liu -Y-Y, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161–168.
6. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 2016;21(27).
7. King LA, Nogareda F, Weill F-X, et al. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 associated with organic fenu-greek sprouts, France, June 2011. *Clin Infect Dis.* 2012;54(11):1588–1594.
8. Frank C, Werber D, Cramer JP, et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med.* 2011;365(19):1771–1780.
9. Raoult D. Alice's living croquet theory. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47(4):249.
- **New theory about emergence of stochastic events.**
10. Rolain J-M. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Front Microbiol.* 2013;4:173.
11. Roca I, Akova M, Baquero F, et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes New Infect.* 2015;6:22–29.
12. Kman NE, Bachmann DJ. Biosurveillance: a review and update. *Adv Prev Med.* 2012;301408.
13. Thacker SB, Berkelman RL, Stroup DF. The science of public health surveillance. *J Public Health Policy.* 1989;10(2):187–203.
14. Texier G, Buisson Y. From outbreak detection to anticipation. *Rev D'épidémiologie Santé Publique.* 2010;58(6):425–433.
15. Colson P, Rolain J-M, Abat C, et al. EPIMIC: A simple homemade computer program for real-time EPIdemiological surveillance and alert based on MICrobiological data. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144178.
16. Abat C, Chaudet H, Colson P, et al. Real-time microbiology laboratory surveillance system to detect abnormal events and emerging infections, Marseille, France. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(8):1302–1310.
17. Abat C, Chaudet H, Rolain J-M, et al. Traditional and syndromic surveillance of infectious diseases and pathogens. *Int J Infect Dis.* 2016;48:22–28.
18. Salmon M, Schumacher D, Burmann H, et al. A system for automated outbreak detection of communicable diseases in Germany. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2016;21:13.

19. Nsoesie EO, Kluberg SA, Mekaru SR, et al. New digital technologies for the surveillance of infectious diseases at mass gathering events. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(2):134–140.
20. Bratu S, Landman D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med.* 2005;165(12):1430–1435.
21. Cole JM, Schuetz AN, Hill CE, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *J Clin Microbiol.* 2009;47(2):322–326.
22. Liu P, Li P, Jiang X, et al. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum. *J Bacteriol.* 2012;194(7):1841–1842.
23. Diene SM, Bruder N, Raoult D, et al. Real-time PCR assay allows detection of the New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)-encoding gene in France. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(6):544–546.
24. Nijhuis RHT, Veldman KT, Schelfaut J, et al. Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-1* in clinical isolates and stool specimens obtained from hospitalized patients using a newly developed real-time PCR assay: Table 1. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:2344–2346; pii: dkw192.
25. Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection.* 1990;18(5):294–298.
26. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol.* 2012;3:110.
27. Naas T, Oxacelay C, Nordmann P. Identification of CTX-M-type extended-spectrum-beta-lactamase genes using real-time PCR and pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(1):223–230.
28. Boyd DA, Tyler S, Christianson S, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(10):3758–3764.
29. Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, et al. Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. *MBio.* 2016;7(2):e02162–15.
30. Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, et al. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 2013;207(6):919–928.
31. Andersen PS, Stegger M, Aziz M, et al. Complete genome sequence of the epidemic and highly virulent CTX-M-15-producing H30-Rx subclone of *Escherichia coli* ST131. *Genome Announc.* 2013;1(6):e00988–13.
32. Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(9):671–676.
33. Ahmed SA, Awosika J, Baldwin C, et al. Genomic comparison of *Escherichia coli* O104: H4 isolates from 2009 and 2011 reveals plasmid, and prophage heterogeneity, including shiga toxin encoding phage *stx2*. *PLoS One.* 2012;7(11):e48228.
34. Hauswaldt S, Nitschke M, Sayk F, et al. Lessons learned from outbreaks of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Curr Infect Dis Rep.* 2013;15(1):4–9.
35. Manges AR, Johnson JR, Foxman B, et al. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *N Engl J Med.* 2001;345(14):1007–1013.
36. Phillips I, Eykyn S, King A, et al. Epidemic multiresistant *Escherichia coli* infection in West Lambeth Health District. *Lancet (London, England).* 1988;331(8593):1038–1041.
37. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(11):1614–1619.
38. Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(2):380–407.
39. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009;49(4):543–551.
40. Martiny D, Cremagnani P, Gaillard A, et al. Feasibility of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) networking in university hospitals in Brussels. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(5):745–754.
41. Lavigne J-P, Espinal P, Dunyach-Remy C, et al. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(2):257–270.
42. Khenouchi NC, El H, Loucif L, et al. MALDI-TOF MS as a tool to detect a nosocomial outbreak of extended-spectrum- β -lactamase- and ArmA methyltransferase-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolates in Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6477–6483.
43. Batah R, Loucif L, Olaitan AO, et al. Outbreak of *Serratia marcescens* coproducing ArmA and CTX-M-15 mediated high levels of resistance to aminoglycoside and extended-spectrum beta-lactamases, Algeria. *Microb Drug Resist.* 2015;21(4):470–476.
44. Ueda O, Tanaka S, Nagasawa Z, et al. Development of a novel matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)-based typing method to identify methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Hosp Infect.* 2015;90(2):147–155.
45. Bakour S, Garcia V, Loucif L, et al. Rapid identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New Microbes New Infect.* 2015;7:89–93.
46. Le Page S, Raoult D, Rolain J-M. Real-time video imaging as a new and rapid tool for antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion method: a paradigm for evaluating resistance to imipenem and identifying extended-spectrum β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(1):61–65.
47. Fournier P-E, Drancourt M, Colson P, et al. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(8):574–585.
- Presentation of new technologies for modern clinical laboratories.**
48. Calfee D, Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(10):966–968.
49. Landman D, Salvani JK, Bratu S, et al. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5639–5641.
50. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Christofidou M, et al. Performance of chromID[®] CARBA medium for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* detection during rectal screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(1):35–40.
51. Simner PJ, Gilmour MW, DeGagne P, et al. Evaluation of five chromogenic agar media and the Rosco Rapid Carb screen kit for detection and confirmation of carbapenemase production in Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2015;53(1):105–112.
52. Zarakolu P, Day KM, Sidjabat HE, et al. Evaluation of a new chromogenic medium, chromID OXA-48, for recovery of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from patients at a university hospital in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(3):519–525.
53. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. A universal culture medium for screening polymyxin-resistant gram negatives. *J Clin Microbiol.* 2016;54(5):1395–1399.
54. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503–1507.
55. Hooff GP, van Kampen JJA, Meesters RJW, et al. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2012;11(1):79–84.
56. Seng P, Rolain J-M, Fournier PE, et al. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* 2010;5(11):1733–1754.
57. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, et al. Efficient detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted

- laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol.* **2015**;53(7):2163–2171.
58. Wonmok L, Chunga H-S, Leea Y, et al. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aerug.* *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2013**;77(3):227–230.
 59. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* **2012**;7(2):e31676.
 60. Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, et al. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* **2016**;15:5.
 61. Hoyos-Mallecot Y, Riazco C, Miranda-Casas C, et al. Rapid detection and identification of strains carrying carbapenemases directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS. *J Microbiol Methods.* **2014**;105:98–101.
 62. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol.* **2000**;49(3):295–300.
 63. Mather CA, Werth BJ, Sivagnanam S, et al. Rapid detection of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* **2016**;54(4):883–890.
 64. Lagacé-Wiens P. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS)-based identification of pathogens from positive blood culture bottles. *Methods Mol Biol.* **2015**;1237:47–55.
 65. Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Karlowsky JA, et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol.* **2012**;50(10):3324–3328.
 66. La Scola B, Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One.* **2009**;4(11):e8041.
 67. Íñigo M, Coello A, Fernández-Rivas G, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples, combining urine screening methods and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* **2016**;54(4):988–993.
 68. Sánchez-Juanes F, Siller Ruiz M, Moreno Obregón F, et al. Pretreatment of urine samples with SDS improves direct identification of urinary tract pathogens with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* **2014**;52(1):335–338.
 69. Zboromyrska Y, Rubio E, Alejo I, et al. Development of a new protocol for rapid bacterial identification and susceptibility testing directly from urine samples. *Clin Microbiol Infect.* **2016**;22:S1198–743X(16)00105-1.
 70. Coorevits L, Boelens J, Claeys G. Direct susceptibility testing by disk diffusion on clinical samples: a rapid and accurate tool for antibiotic stewardship. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2015**;34(6):1207–1212.
 71. Undqvist M, Olafsson J, Matuschek E. EUCAST breakpoints can be used to interpret direct susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* from urine samples. *APMIS.* **2015**;123(2):152–155.
 72. Idelevich EA, Grünastel B, Peters G, et al. Direct blood culturing on solid medium outperforms an automated continuously monitored broth-based blood culture system in terms of time to identification and susceptibility testing. *New Microbes New Infect.* **2016**;10:19–24.
 73. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* **2013**;19(2):141–160.
 74. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **1996**;6(10):986–994.
 75. Nijhuis R, Samuelsen O, Savelkoul P, et al. Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2013**;77(4):316–320.
 76. Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, et al. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104: h4outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012**;109(8):3065–3070.
 77. Brañas P, Villa J, Viedma E, et al. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *Int J Antimicrob Agents.* **2015**;46(1):111–116.
 78. Drancourt M, Michel-Lepage A, Boyer S, et al. The point-of-care laboratory in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* **2016**;29(3):429–447.
 79. Van Schaik W. The human gut resistome. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* **2015**;370(1670):20140087.
 80. Tato M, Ruiz-Garbajosa P, Traczewski M, et al. Multisite evaluation of Cepheid Xpert-Carba-R Assay for the detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs. *J Clin Microbiol.* **2016**;54:1814–1819. pii: JCM.00341-16.
 81. Tenover FC, Canton R, Kop J, et al. Detection of colonization by carbapenemase-producing Gram-negative Bacilli in patients by use of the Xpert MDRO assay. *J Clin Microbiol.* **2013**;51(11):3780–3787.
 82. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature.* **2016**;529(7586):336–343.
 83. D’Costa VM, King CE, Kalan L, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature.* **2011**;477(7365):457–461.
 84. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2010**;74(3):417–433.
 85. Willmann M, El-Hadidi M, Huson DH, et al. Antibiotic selection pressure determination through sequence-based metagenomics. *Antimicrob Agents Chemother.* **2015**;59(12):7335–7345.
 86. Kolár M, Urbánek K, Látal T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Agents.* **2001**;17(5):357–363.
 87. Sommer MOA, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science.* **2009**;325(5944):1128–1131.
 88. Cimmino T, Rolain J-M. Whole genome sequencing for deciphering the resistome of *Chryseobacterium indologenes*, an emerging multidrug resistant bacterium isolated from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. *New Microbes New Infect.* **2016**;12:35–42.
 89. Cimmino T, Olaitan AO, Rolain J-M. Whole genome sequence to decipher the resistome of *Shewanella algae*, a multidrug-resistant bacterium responsible for pneumonia, Marseille, France. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **2016**;14(2):269–275.
 90. Biswas S, Raoult D, Rolain J-M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *Int J Antimicrob Agents.* **2008**;32(3):207–220.
 91. Fournier P, Raoult D. Prospects for the future using genomics and proteomics in clinical microbiology. *Annu Rev Microbiol.* **2011**;65:169–188.
- **Description of the use of genomics for clinical microbiology.**
92. Xavier BB, Das AJ, Cochrane G, et al. Consolidating and exploring antibiotic resistance gene data resources. *J Clin Microbiol.* **2016**;54(4):851–859.
 93. McArthur AG, Wright GD. Bioinformatics of antimicrobial resistance in the age of molecular epidemiology. *Curr Opin Microbiol.* **2015**;27:45–50.
 94. Kos VN, Déraspé M, McLaughlin RE, et al. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* **2015**;59(1):427–436.
 95. Köser CU, Ellington MJ, Peacock SJ. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet.* **2014**;30(9):401–407.
 96. Zankari E, Hasman H, Kaas RS, et al. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based

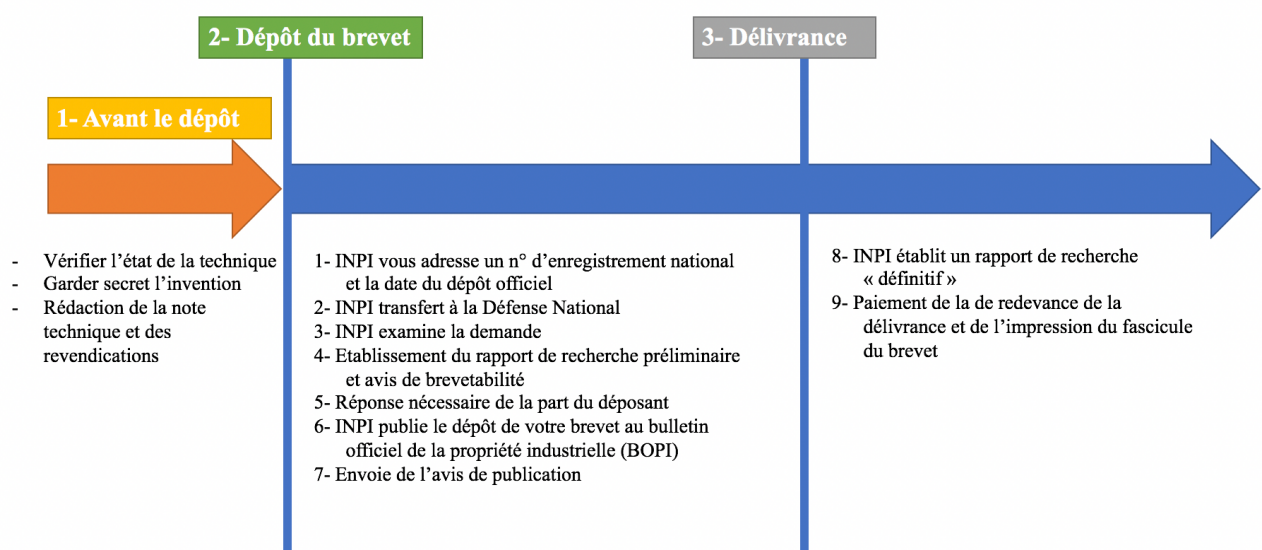
- on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(4):771–777.
97. Peacock S. Health care: bring microbial sequencing to hospitals. *Nature.* 2014;509(7502):557–559.
 98. Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, et al. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet.* 2012;13(9):601–612.
 99. Reuter S, Ellington MJ, Cartwright EJP, et al. Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. *JAMA Intern Med.* 2013;173(15):1397–1404.
 100. Bakour S, Sankar SA, Rathored J, et al. Identification of virulence factors and antibiotic resistance markers using bacterial genomics. *Future Microbiol.* 2016;11:455–466.
 101. Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, et al. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology.* 2015;47(3):199–210.
 102. Rohmer L, Jacobs MA, Brittnacher MJ, et al. Genomic analysis of the emergence of 20th century epidemic dysentery. *BMC Genomics.* 2014;15:355.
 103. Liu B, Pop M. ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D443–7.
 104. Holmes A, Allison L, Ward M, et al. Utility of whole-genome sequencing of *Escherichia coli* O157 for outbreak detection and epidemiological surveillance. *J Clin Microbiol.* 2015;53(11):3565–3573.
 105. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2640–2644.
 106. Villa J, Viedma E, Brañas P, et al. Draft whole-genome sequence of OXA-48-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* KP_ST11_OXA-48. *Genome Announc.* 2014;2(4):e00737-14.
 107. McArthur AG, Wagelchner N, Nizam F, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3348–3357.
 108. Wong VK, Baker S, Pickard DJ, et al. Phylogeographical analysis of the dominant multidrug-resistant H58 clade of *Salmonella* Typhi identifies inter- and intracontinental transmission events. *Nat Genet.* 2015;47(6):632–639.
 109. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):212–220.
 110. Kleinheinz KA, Joensen KG, Larsen MV. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage.* 2014;4(2):e27943.
 111. Zankari E. Comparison of the web tools ARG-ANNOT and ResFinder for detection of resistance genes in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4986–4986.
 112. Gupta SK, Rolain J-M. Reply to “Comparison of the web tools ARG-ANNOT and ResFinder for detection of resistance genes in bacteria”. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4987.
 113. Witney AA, Cosgrove CA, Arnold A, et al. Clinical use of whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Med.* 2016;14:46.
 114. Gong Z, Lai W, Liu M, et al. Novel genes related to ceftriaxone resistance found among ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(4):2043–2051.
 115. Turton JF, Wright L, Underwood A, et al. High-resolution analysis by whole-genome sequencing of an international lineage (Sequence Type 111) of *Pseudomonas aeruginosa* associated with metallo-carbapenemases in the United Kingdom. *J Clin Microbiol.* 2015;53(8):2622–2631.
 116. Onori R, Gaiarsa S, Comandatore F, et al. Tracking nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infections and outbreaks by whole-genome analysis: small-scale Italian scenario within a single hospital. *J Clin Microbiol.* 2015;53(9):2861–2868.
 117. Health care: bring microbial sequencing to hospitals. EBSCOhost [Internet]. [cited 2014 May 22]. Available from: <http://web.b.ebscohost.com.gate1.inist.fr/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=caae8e81-8655-4f5c-b172-f6b705419503%40sessionmgr115&vid=1&hid=116>
 118. Ashton PM, Nair S, Dallman T, et al. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nat Biotechnol.* 2015;33:296–300.
 119. Quick J, Ashton P, Calus S, et al. Rapid draft sequencing and real-time nanopore sequencing in a hospital outbreak of *Salmonella*. *Genome Biol.* 2015;16:115.
 120. Prifti E, Zucker J-D. Socio-ecological dimensions of infectious diseases in Southeast Asia [Internet]. Singapore: Springer Singapore. 2015. Available from: https://www.researchgate.net/publication/236683069_The_New_Science_of_Metagenomics_and_the_Challenges_of_Its_Use_in_Both_Developed_and_Developing_Countries.
 121. Hugenholtz P, Tyson GW. Microbiology: metagenomics. *Nature.* 2008;455(7212):481–483.
 122. Peterson J, Garges S, Giovanni M, et al. The NIH human microbiome project. *Genome Res.* 2009;19(12):2317–2323.
 123. Shanahan F. The gut microbiota in 2011: Translating the microbiota to medicine. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(2):72–74.
 124. Jia W, Li H, Zhao L, et al. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(2):123–129.
 125. Haiser HJ, Turnbaugh PJ. Is it time for a metagenomic basis of therapeutics? *Science.* 2012;336(6086):1253–1255.
 126. Mulcahy-O’Grady H, Workentine ML. The challenge and potential of metagenomics in the clinic. *Front Immunol.* 2016;7:29.
- **Presentation of the future with metagenomics.**
127. Browne HP, Forster SC, Anonye BO, et al. Culturing of “unculturable” human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature.* 2016 4;533(7604):543–546.
 128. Armougom F, Henry M, Vialettes B, et al. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One.* 2009;4(9):e7125.
 129. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, et al. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature.* 2011;474(7351):327–336.
 130. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(Suppl 1):1–55.
 131. Cassir N, Rolain J-M, Brouqui P. A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Front Microbiol.* 2014;5:551.
- **New strategies for the treatment of MDRB.**
132. Rolain J-M, Abat C, Jimeno M-T, et al. Do we need new antibiotics? *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(5):408–415.
 133. Lagier JC, Million M, Fournier PE, et al. Faecal microbiota transplantation for stool decolonization of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect.* 2015;90(2):173–174.
 134. Ogata H, Audic S, Barbe V, et al. Selfish DNA in protein-coding genes of *Rickettsia*. *Science.* 2000;290(5490):347–350.
 135. Van Valen LM. A new evolutionary law. *Evol Theory.* 1973;1:1–30.
- **Red Queen theory with the unpredictability of outbreaks.**

VI- Valorisation

Au cours de mon DES IPR, j'ai été amené à travailler sur un aspect important de la recherche : la protection de la propriété intellectuelle par la rédaction de brevets.

Mon premier travail dans le domaine a consisté à rédiger la note technique du brevet directement lié à mes travaux de recherche : à savoir l'interprétation automatique des antibiogrammes par un logiciel de reconnaissance de photos. Ce brevet contient tous les tests préliminaires ainsi que la preuve de concept que ce type de logiciel fonctionne. En effet, c'est un outil complètement innovant dans le domaine de la microbiologie clinique puisqu'on ne mesure plus les diamètres d'inhibition des antibiotiques un par un mais on fait une reconnaissance globale d'une photo d'un antibiogramme pour arriver au phénotype interprété dans son intégralité. Ce brevet a été déposé en octobre 2014. L'IHU travaille avec un cabinet privé : le Cabinet Beau de Loménie et plus principalement avec Maxime Domange qui est responsable des conseils en propriété industrielle et des conseils européens en Marques. Il est aussi mandataire en brevets européens dans le domaine de la santé. Il nous aide à retranscrire les notes techniques en revendications conformément à la réglementation sur l'écriture des brevets. J'ai donc assisté à de nombreuses réunions pour la rédaction de ces différents brevets.

Figure 20. Présentation schématique simplifiée des différentes étapes du dépôt du brevet à la délivrance.



INPI = Institut National de la Propriété Industrielle

Actuellement ce brevet dont je suis co-inventeur a passé l'étape du rapport de recherche préliminaire en 2015, actuellement il est en phase nationale et nous sommes en train de réaliser sa protection au niveau Européen, aux Etats-Unis, en Chine et au Japon. De plus, nous avons actuellement une possibilité de licence avec un industriel en cours.

Après la réalisation de ce brevet, on m'a laissé l'opportunité de pouvoir continuer à m'intéresser aux droits de propriété industrielle et à la rédaction des brevets en faisant partie de l'équipe Valorisation au sein de l'IHU.

De plus, je suis co-inventeur de 2 autres brevets en collaboration avec des étudiantes de notre équipe de recherche. Ces brevets portent sur leur sujet de recherche, j'ai apporté mon aide pour la rédaction, la structuration et la mise en forme des résultats. Avec Mr Domange et le Pr Rolain nous avons travaillé sur les différents brevets afin de trouver les bonnes applications et revendications afin de les rendre plus intéressants et valorisables.

Liste des différents brevets dont je suis inventeur :

1. **Le Page S**, Buffet S, Raoult D and Rolain JM. Méthode d'analyse et d'interprétation automatisée d'un antibiogramme. **01.10.2014**. Number: **14 59559**.
2. Okdah L, **Le Page S** and Rolain JM. Association de composés antibiotiques efficace contre des Enterobactéries. **13.10.2016**. Number: **16 59884**.
3. Bardet L, **Le Page S**, Rolain JM. Milieu de culture sélectif polyvalent pour l'isolement et la sélection de bactéries résistantes à la colistine et à la vancomycine. **18.01.2017**. Number : **17 50383**.

VII- Edition

Depuis août 2015, le Pr Jean-Marc Rolain est devenu Editeur en Chef d'un journal international « International Journal of Antimicrobial Agents » IF 4.097. A la suite de sa nomination, il m'a proposé d'être « Scientific Assistant » du journal pour que j'apprenne comment fonctionne l'édition dans les journaux internationaux et l'aider dans son travail.

Mon travail repose sur le choix et la classification des articles chaque mois (Traffic Book) qui seront présents dans chacun des numéros du journal, de répondre à des questions sur des papiers en cours d'Edition, de participer aux différents Boards du journal IJAA (environ 2 ou 3 par an) mais aussi de celui de JGAR « Journal of Global Antimicrobial Resistance » 1.087. Ces réunions permettent d'analyser les différents processus lors de la publication et d'essayer d'améliorer le système d'édition. J'ai également représenté le journal lors d'un congrès international : l'ASM Microbes 2016 à Boston.

Une grosse partie de mon travail consiste à aider le Pr Rolain à promouvoir le journal au travers de Theme issue qui sont des regroupements d'environ 5 mini revues sur un sujet d'actualité intéressant. Je m'occupe également de la gestion de ceux-ci en invitant des « Guests Editors » jusqu'à la finalisation du Thème issue. Nous faisons des réunions sur les sujets d'actualité dans la microbiologie au travers de l'analyse bibliographique des autres journaux afin de trouver des Themes issues intéressants en accord avec les avancées scientifiques dans le domaine de la microbiologie.

En plus de mon travail d'édition, je m'occupe aussi de la soumission de tous les papiers publiés par l'Equipe du Pr Rolain et de la gestion des différents travaux en cours de ses étudiants.

VIII- Conclusion

Ce travail a permis de démontrer qu'il était possible de détourner un automate d'inoculation de prélèvements pour avoir un ensemencement automatique des antibiogrammes.

La lecture plus précoce des antibiogrammes est possible si l'on utilise des scanners de haute résolution d'images. En effet, à l'aide d'outils innovants, nous avons la possibilité d'avoir une lecture des antibiogrammes pour les bactéries à Gram-négatif à pousse rapide dès 8 heures d'incubation. Ce temps est un peu rallongé pour les bactéries à Gram-positif de l'ordre de 10 heures d'incubation et pour les bactéries non fermentantes plutôt aux alentours de 11-12heures d'incubation. Nous pourrions imaginer mettre en place des systèmes en temps réel permettant de détecter la présence de carbapénémases ou BLSE dès 4 heures d'incubation à condition que l'automate soit développé au format industriel. Ceci couplé à toutes les techniques utilisées pour détecter (systèmes de surveillance) et identifier (« whole genome sequencing », biologie moléculaire en temps réel) les bactéries multi-résistantes de façon beaucoup plus rapide permettrait un gain de temps et d'argent considérable dans la prise en charge des patients.

Nous avons aussi pu démontrer que notre logiciel d'interprétation automatique des phénotypes basé sur la reconnaissance d'images fonctionne même s'il est encore à l'étape de recherche et développement. En effet, un certain nombre d'aspects vont être améliorés dans les prochains mois.

L'ensemble de ce travail permet de montrer un nouvel apport concernant l'automatisation en microbiologie clinique comprenant de nouvelles techniques innovantes pour améliorer principalement le temps d'interprétation des antibiogrammes.

Pour finir, mon travail sur la valorisation et l'édition m'a permis d'avoir une meilleure compréhension de ces différents domaines. J'ai pu compléter ma formation et m'ouvrir à de nouveaux champs dans le travail. C'est une expérience vraiment très enrichissante.

IX- Perspectives

La lecture plus précoce des antibiogrammes représente l'avenir de la méthode de diffusion par disques sur milieux gélosés. C'est avec l'utilisation de système d'acquisition d'images de haute résolution d'images que nous allons pouvoir améliorer le temps de rendu des résultats. Certains automates sont capables de voir la pousse bactérienne avant l'œil humain. Actuellement dans les CHU, la validation s'effectue 24 heures sur 24 donc on peut très bien imaginer une validation à la carte en fonction des espèces bactériennes toutes les 8-10 heures pour les Entérobactéries par exemple si l'on possède des automates suffisamment performant pour permettre l'incubation, la lecture et l'interprétation correcte des antibiogrammes. L'utilisation des plateformes entièrement automatisées permet un gain de temps considérable au niveau du temps technique mais aussi pour les cliniciens qui peuvent adapter l'antibiothérapie de façon beaucoup plus précoce. Mais ces systèmes sont très chers et peu de structure les possèdent. De plus, certains aspects doivent encore être améliorés comme la réalisation complète des antibiogrammes.

Un autre aspect a récemment émergé avec le séquençage des génomes bactériens pour l'analyse du phénotype à l'aide d'automates beaucoup plus rapide. Mais pour l'instant cette technique ne peut pas être utilisée en routine même si la prédiction basée sur l'analyse du génome est bon (99%), car ces techniques sont coûteuses, le temps d'analyse est encore trop long et les bases de données ne sont pas encore complètes. En effet, si un nouveau mécanisme de résistance émerge mais qu'il ne fait pas encore partie de ces bases de données alors il ne pourra pas être détecté. Il n'est pas possible pour le moment de remplacer l'analyse phénotypique par le séquençage mais ceci représente l'avenir de la microbiologie clinique.

X- Autres publications internationales réalisées lors du DES IPR DE 2013 à 2017

1-Dubourg G, Okdah Liliane, **Le Page S**, Rolain JM and Raoult D. In vitro activity of « old antibiotics » against highly resistant Gram-negative bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents. 2015 [59].

2-Cimmino T, Metidji S, Labas N, **Le Page S**, Musso D, Raoult D, Rolain JM. Genome sequence and description of *Actinomyces polynesiensis* str. MS2 sp. nov. isolated from the human gut. New Microbes and New Infections. 2016 [60].

3-Cimmino T, Traore SI, Valentini C, **Le Page S**, Sokhna C, Diallo A, Raoult D, Rolain JM. Noncontiguous finished genome sequence and description of *Bacillus testis* strain SIT10 sp. nov. New Microbes and New Infections. 2016 [61].

4-**Le Page S**, Cimmino T, Togo A, Million M, Michelle C, Khelaifia S, Lagier JC, Raoult D, Rolain JM. Noncontiguous finished genome sequence and description of *Enterococcus massiliensis* sp. nov. New Microbes and New Infections. 2016 [62].

5-Chabou S, Leangapichart T, Okdah L, **Le Page S**, Hadjadj L, Rolain JM. Real-time quantitative PCR assay with Taqman(®) probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. New Microbes and New Infections. 2016 [63].

6-Rolain JM, Kempf M, Leangapichart T, Chabou S, Olaitan AO, **Le Page S**, Morand S, Raoult D. Plasmid-mediated mcr-1 gene in colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in France and Laos. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016 [64].



Letters to the Editor

In vitro activity of 'old antibiotics' against highly resistant Gram-negative bacteria

Sir,

Infections by multidrug-resistant bacteria were identified as being responsible for 25 000 deaths in Europe in 2007 [1]. In fact, the incidence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae is continuously increasing worldwide, involving mostly carbapenemases such as NDM, VIM or KPC. Resistance to all β -lactams is frequent, and co-resistance to fluoroquinolones, trimethoprim/sulfamethoxazole and aminoglycosides is frequent, dramatically reducing the available anti-infective options. However, several studies have highlighted the usefulness of colistin and tigecycline as therapeutic agents against carbapenemase-producers, and fosfomycin has shown promising results against Enterobacteriaceae harbouring OXA-48. The main issue is that some of these antibiotics, such as colistin and fosfomycin, are available in fewer than 25 of 38 countries surveyed in Europe, the USA, Canada and Australia [2]. This antibiotic stock depletion raises the question as to whether the 25 000 deaths attributed to antibiotic resistance could ultimately be the consequence of our inability to offer appropriate agents. Following an outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Marseille, France (unpublished data), we tested the in vitro susceptibility to numerous antibiotics, including minocycline, doxycycline, tigecycline, spectinomycin, streptomycin, amikacin, aztreonam, temocillin, sulfadiazine, cefoperazone/sulbactam, colistin, fosfomycin, nitrofurantoin, rifampicin, trimethoprim/sulfamethoxazole and ciprofloxacin, of 52 multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Among the Enterobacteriaceae, NDM-, KPC- and OXA-48-producers were included ($n=6$, 11 and 24, respectively) as well as pan-drug-resistant *Enterobacter aerogenes* strain 1509. Among the ten other Gram-negative organisms, two *Pandoraea pulmonicola*, one colistin-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* strain, six OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* and one *Burkholderia cepacia* were included (Fig. 1).

Antibiotic susceptibility was determined by the disk diffusion method according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recommendations. Minimum inhibitory concentrations were determined for colistin, cefoperazone/sulbactam, tigecycline and temocillin by Etest (bioMérieux, Craponne, France). Breakpoints used were those of EUCAST 2015 v.5.0 (<http://eucastrg.org>), except for doxycycline/minocycline and sulfadiazine for which those of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2012 guidelines (<http://clsi.org/>) and of local guidelines (<http://www.sfm-microbiologie.org>) were used, respectively. In addition, in the absence of recommendation, the spectinomycin breakpoint used was the same as for *Neisseria*

gonorrhoeae, and recent publications were used for categorisation of cefoperazone/sulbactam and tigecycline [3,4].

No strain was pandrug-resistant. Overall, tigecycline and colistin were the most active agents, inhibiting 78.8% and 63.5% of the included strains, respectively, followed by minocycline (61.5% of strains inhibited). The latter was more active against Enterobacteriaceae producing KPC and OXA-48 compared with those harbouring NDM-1 (63.6% and 50.0% of strains inhibited, respectively, vs. 33.3%). Fosfomycin was also highly active against OXA-48-producers (75.0% of strains inhibited), although the other Gram-negatives were resistant. Cefoperazone/sulbactam and temocillin were poorly active against Enterobacteriaceae (9.5% of strains inhibited for both) but were the only efficient β -lactam for three strains (Fig. 1). In addition, cefoperazone/sulbactam was particularly active against *A. baumannii* producing OXA-23 (4/6 strains inhibited). More specifically, tigecycline and doxycycline yielded the best antimicrobial activity against non-fermenters (10/10 strains inhibited), whilst sulfadiazine yielded fairly good antimicrobial activity (6/10 strains inhibited). Temocillin was only active on one strain of *B. cepacia*, and rifampicin was effective against two *A. baumannii* strains (Fig. 1). Although amikacin was by far the best aminoglycoside included, three and four amikacin-resistant strains were susceptible to spectinomycin and streptomycin, respectively. In the same manner, four isolates were susceptible to minocycline but were resistant to tigecycline.

The present results confirm the frequent activity of colistin and tigecycline against highly-resistant Gram-negative organisms that was previously published. Moreover fosfomycin was active against up to 35% of the strains included. Interestingly, this concerns 75% of the OXA-48 strains, whereas none of the other Gram-negatives were inhibited by fosfomycin. This finding contrasts with the high susceptibility rate (93%) of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* previously reported. However, the main concern with fosfomycin is the availability of the intravenous formulation in several countries (5/38) [2]. Minocycline was surprisingly active against 61.5% of the study population as this antibiotic had previously been described as efficient against carbapenem-resistant enterobacteria [5] and multidrug-resistant *Acinetobacter*. In addition, several findings also highlight the need to improve antibiotic susceptibility testing when a microbiologist is faced with multiresistance patterns. Indeed, four strains were resistant to tigecycline and susceptible to minocycline, whilst four strains were resistant to amikacin but susceptible to streptomycin. These findings should lead to the testing of several agents in the same therapeutic class. In addition, and although their activity was sporadic, temocillin, cefoperazone/sulbactam and sulfadiazine should be considered alternative antibiotics. However, antimicrobial susceptibility testing should be standardised worldwide to enlarge the antibiotic panel for testing, as shown by the multiple breakpoints used here. There is also a need to improve the availability of these rescue antibiotics, which could be an

Genome sequence and description of *Actinomyces polynesiensis* str. MS2 sp. nov. isolated from the human gut

T. Cimmino¹, S. Metidji¹, N. Labas¹, S. Le Page¹, D. Musso², D. Raoult¹ and J.-M. Rolain¹

1) Aix-Marseille Univ., URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Marseille, France and 2) Institut Louis Malardé, Papeete, Tahiti, French Polynesia

Abstract

Actinomyces polynesiensis strain MS2 gen. nov., sp. nov. is a newly proposed genus within the family Actinomycetaceae, isolated from the stools of a healthy individual in Raiatea Island (French Polynesia, South Pacific). *Actinomyces massiliensis* is an anaerobic, Gram-positive organism. Here we describe the features of this organism, together with the complete genome sequence and annotation—2 943 271 bp with a 70.80% G+C content, assembled into 15 scaffolds and containing 2080 genes.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Keywords: *Actinomyces*, taxo-genomics, Culturomics

Original Submission: 4 February 2016; **Accepted:** 29 February 2016

Article published online: 23 March 2016

Corresponding author: J.-M. Rolain, Aix-Marseille Univ., URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Facultés de Médecine et de Pharmacie, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France
E-mail: jean-marc.rolain@univ-amu.fr

Introduction

The genus *Actinomyces* belongs to the domain Bacteria, Phylum Actinobacteria, Class Actinobacteria, Order Actinomycetales and Family Actinomycetaceae. The genus consists of a heterogeneous group of Gram-positive bacteria that have a high G+C content [1].

The genus *Actinomyces* consists of a heterogeneous group of Gram-positive bacilli, mainly facultatively anaerobic or micro-aerophilic rods with various degrees of branching [2]. *Actinomyces* species mainly belong to the human commensal flora of the oropharynx, gastrointestinal tract, and urogenital tract [3].

Actinomycosis is a very rare disease usually caused by one of a group of opportunistic but otherwise harmless commensals and may be complicated by one or more of another group of co-pathogens [4]. Actinomycetes are prominent among the

normal flora of the oral cavity but less prominent in the lower gastrointestinal tract and female genital tract. As these micro-organisms are not virulent, they require a break in the integrity of the mucous membranes and the presence of devitalized tissue to invade deeper body structures and cause human illness [4]. Many studies based on phenotypic identification of members of the genus *Actinomyces* have been performed. Several flowcharts have been proposed to enable accurate differentiation. However, during the past few years, *Actinomyces* taxonomy has undergone much improvement, primarily driven by 16S rRNA gene sequence analysis [5]. The study of *Actinomyces polynesiensis* str. MS2 is part of a project called ‘Culturomics’, the comprehensive determination of the microbial composition of the gut microbiota and the relationships with health and disease, which are major challenges in the twenty-first century. Metagenomic analysis of the human gut microbiota detects mostly uncultured bacteria as reported here [6].

Materials and Methods

Growth conditions and identification

Actinomyces polynesiensis sp. nov., strain MS2 (=CSURP658=DSMZ 27066).

Noncontiguous finished genome sequence and description of *Bacillus testis* strain SIT10 sp. nov.

T. Cimmino¹, S. I. Traore^{1,3}, C. Valentini¹, S. le Page¹, C. Sokhna^{2,4}, A. Diallo⁵, D. Raoult¹ and J. M. Rolain¹

1) Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM 63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm U1095, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, Faculté de médecine, 2) Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes IRD 198, CNRS 7278, Aix-Marseille Université, Marseille, France, 3) Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires, Faculté de médecine et de pharmacie de Bamako, Bamako, Mali, 4) Campus Commun UCAD-IRD of Hann and 5) URMITE, UMR CNRS 6236, IRD 198, Aix Marseille Université, Marseille, Joint Campus UCAD-IRD of Hann, BP 1386 CP 18524, Dakar, Senegal

Abstract

Bacillus testis strain SIT10 (= CSUR P1492 = DSMZ 101190) is the new type strain collected from stool from a 2-year-old boy from Senegal during a culturomics study. This Gram-positive bacterium is a facultative anaerobic rod and a member of the Bacillaceae family. We describe here the features of this bacterium, together with the complete genome sequence and annotation. The 3 987 349 bp long genome (one chromosome but no plasmid) with 42.8% GC content contains 4005 protein-coding and 171 sRNA genes, including 19 5S rRNA gene, 15 16S rRNA genes and ten 23S rRNA genes. © 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords: *Bacillus testis*, culturomics, taxonogenomics

Original Submission: 12 March 2016; **Accepted:** 22 March 2016

Article published online: 13 April 2016

Corresponding author: J. M. Rolain, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM 63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm U1095, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée-Infection, Faculté de médecine, Aix-Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France
E-mail: jean-marc.rolain@univ-amu.fr

Introduction

Culturomics was developed in 2012 in order to extend knowledge of the human gut repertoire [1]. A polyphasic approach that combines proteomic by matrix-assisted desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis, genomic data and phenotypic characterization is widely used to describe new bacterial species [2].

Bacillus testis strain SIT10 was isolated from a 2-year-old boy in Senegal as part of a culturomics study aiming to isolate all bacterial species present in the human gut [1]. The genus *Bacillus* currently comprises 268 species and seven subspecies, although a few of these have been assigned to other genera commonly found in the

environment and as laboratory contaminants; however, few species have been linked to infections in humans (<http://www.bacterio.net/>) [3]. Two *Bacillus* species are considered medically significant: *B. anthracis*, which causes anthrax, and *B. cereus*, which causes a foodborne illness [4]. This genus is one of the largest and most ubiquitous, and it has gained notoriety with taxonomists for its extreme phenotypic diversity and heterogeneity. Bacilli are ubiquitous bacteria that exploit a wide variety of organic and inorganic substrates as nutrient sources [3].

Herein we present a summary of the classification and set of features for *Bacillus testis* sp. nov. strain SIT10 (= CSUR P1492 = DSMZ 101190) together with the description of the complete genomic sequencing and annotation. These characteristics support the creation of this *Bacillus testis* species.

Organism Information

Classification and features

A stool sample was collected from a 2-year-old boy living in Senegal. The study was approved by the ethics committee of

Noncontiguous finished genome sequence and description of *Enterococcus massiliensis* sp. nov.

S. Le Page, T. Cimmino, A. Togo, M. Million, C. Michelle, S. Khelaifia, J.-C. Lagier, D. Raoult and J.-M. Rolain

Aix-Marseille Université, URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Marseille, France

Abstract

Enterococcus massiliensis strain sp. nov. (= CSUR P1927 = DSM 100308) is a new species within the genus *Enterococcus*. This strain was first isolated from a fresh stool sample of a man during culturomics study of intestinal microflora. *Enterococcus massiliensis* is a Gram-positive cocci, facultative anaerobic and motile. *E. massiliensis* is negative for mannitol and positive for β -galactosidase, contrary to *E. gallinarum*. The complete genome sequence is 2 712 841 bp in length with a GC content of 39.6% and contains 2617 protein-coding genes and 70 RNA genes, including nine rRNA genes.

© 2016 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Keywords: Culturomics, *Enterococcus massiliensis*, genome, new species, taxonogenomics

Original Submission: 4 February 2016; **Revised Submission:** 19 April 2016; **Accepted:** 28 April 2016

Article published online: 4 May 2016

Corresponding author: J.-M. Rolain, Aix-Marseille Université, URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Facultés de Médecine et de Pharmacie, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France
E-mail: jean-marc.rolain@univ-amu.fr

Introduction

Enterococcus massiliensis sp. nov. strain AMI^T (= CSUR P1927 = DSM 100308) belongs to the genus *Enterococcus*. This bacterium is a Gram-positive, facultative anaerobic, motile and unpigmented. It was isolated from a fresh stool sample of a human in Marseille as part of culturomics study [1]. Currently, a polyphasic approach that combines proteomic by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analysis [2], genomic data with 16S rRNA sequence identity and phylogeny [3], genomic G+C content diversity and DNA-DNA hybridization (DDH) and phenotypic characterization is used to describe new bacterial species [4].

Enterococcus were classified in the genus of *Streptococcus* because of the presence of the D antigen until 1984 [5]. But after analysis of the genome of *Streptococcus faecalis* and

S. faecium, these strains have been transferred to the genus *Enterococcus* [6]. Members of the genus *Enterococcus* are components of the intestinal flora of humans and animals. There are opportunistic pathogens with two principal strains: *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, responsible for nosocomial infections [7,8].

Here we present a summary classification and a set of features for *E. massiliensis* sp. nov. strain AMI^T together with the description of the complete genome sequence and annotation. These characteristics support the circumscription of the species *E. massiliensis*.

Organism Information

A stool sample was collected in 2015 from a voluntary patient as a negative control and isolated on Columbia agar supplemented with 5% sheep's blood (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) in aerobic and anaerobic condition using GasPak EZ Anaerobe Container System Sachets (Becton Dickinson (BD), San Diego, CA, USA) at 37°C. *Enterococcus massiliensis* was sequenced as part of a culturomics study aiming to isolate all bacterial species colonizing the human gut [9]. *Enterococcus massiliensis* strain AMI^T (GenBank accession no. LN833866) exhibited a 97% 16S

Real-time quantitative PCR assay with Taqman[®] probe for rapid detection of MCR-I plasmid-mediated colistin resistance

S. Chabou, T. Leangapichart, L. Okdah, S. Le Page, L. Hadjadj and J.-M. Rolain

URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, Marseille, France

Abstract

Here we report the development of two rapid real-time quantitative PCR assays with TaqMan[®] probes to detect the MCR-I plasmid-mediated colistin resistance gene from bacterial isolates and faecal samples from chickens. Specificity and sensitivity of the assay were 100% on bacterial isolates including 18 colistin-resistant isolates carrying the *mcr-I* gene (six *Klebsiella pneumoniae* and 12 *Escherichia coli*) with a calibration curve that was linear from 10¹ to 10⁸ DNA copies. Five out of 833 faecal samples from chickens from Algeria were positive, from which three *E. coli* strains were isolated and confirmed to harbour the *mcr-I* gene by standard PCR and sequencing.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Keywords: Antibiotic resistance surveillance, colistin resistance, *mcr-I* gene, PCR detection, Taqman probe

Original Submission: 4 May 2016; **Revised Submission:** 29 June 2016; **Accepted:** 30 June 2016

Article published online: 5 July 2016

Corresponding author: J.-M. Rolain, URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France
E-mail: jean-marc.rolain@univ-amu.fr

Introduction

The increasing prevalence of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria combined with few antimicrobial agents being in development has led to a resurgence in interest in colistin as a last-line therapy with the inevitable risk of emerging resistance [1–3]. MCR-I plasmid-mediated colistin resistance is a member of the phosphoethanolamine transferase enzyme family, with expression in *Escherichia coli* resulting in the addition of phosphoethanolamine to lipid A and resistance to colistin [4]. This plasmid-mediated colistin resistance is an emerging concern that has already spread worldwide [5] in *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* from pigs, chicken, retail meat (pork, chicken), humans [4]. In animal health, colistin is used to prevent infections from *E. coli* isolates that are known to cause serious adverse effects such as diarrhoea, sepsis and colibacillosis, which result in huge economic losses [6]. The extensive use of antibiotics in food-animal production has been shown to increase the risk of transferring resistant bacteria to humans [7].

There is a need to screen for colistin resistance even in patients without a history of colistin usage for the timely detection and isolation of patients harbouring such resistant strains to prevent clonal transmission [8]. For this reason the aim of this study was to develop rapid real-time quantitative PCR (qPCR) to detect the MCR-I plasmid-mediated colistin resistance and to evaluate its sensitivity and specificity both from strains and stool samples.

Materials and methods

Specific primers and probes design

Primers and probes design. We designed specific primers and probes to develop two real-time qPCR assays (PE1 and PE2) for the detection of MCR-I-encoding gene (Table 1). Specificity of the primers and probes were verified *in silico* by BLASTN analysis on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

Sample collection

Bacterial strains. A total of 100 strains from humans and animals were used in this study including 18 colistin-resistant isolates carrying the *mcr-I* gene (six *K. pneumoniae* and 12 *E. coli*).

1 **Title: Plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella***
2 ***pneumoniae* in France and Laos.**

3 **Jean-Marc Rolain^{1*}, Marie Kempf², Thongpan Leangapichart¹, Selma Chabou¹, Abiola**
4 **Olumuyiwa Olaitan¹, Stéphanie Le Page¹, Serge Morand³, and Didier Raoult¹**

5 ¹Aix-Marseille Université, URMITE, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France.

6 ²Laboratoire de Bactériologie, Institut de Biologie en santé – PBH, CHU, Angers, France.

7 ³ Institut des Sciences de l'Évolution, CNRS-IRD-UM2, CC065, Université Montpellier 2,
8 34095 Montpellier Cedex 05, France; CNRS-CIRAD, Centre d'Infectiologie Christophe
9 Mérieux du Laos, Vientiane, Lao Democratic People's Republic.

10 * Corresponding author

11 Phone: (33) 4 91 32 43 75. Fax: (33) 4 91 38 77 72

12 Email: jean-marc.rolain@univ-amu.fr

13 Word counts: 538

14 References: 7

15 Tables: 2

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 Sir,

27 Recently Yi-Yun Liu *et al* reported the emergence of plasmid-mediated colistin resistance
28 involving *mcr-1* gene from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from
29 animals, food and humans in China (1). Because of the plasmidic location of this new gene
30 that encodes a phosphoethanolamine transferase, it is transferable laterally between Gram
31 negative bacteria (1). We have recently reported isolation of *mcr-1* positive *E. coli* isolates
32 from animals and humans from Laos (pigs and asymptomatic humans), Thailand
33 (asymptomatic humans) and Algeria (chicken) (2). Although resistance to colistin in humans
34 was believed to be linked only to colistin consumption in humans, there are evidence of
35 independent emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage likely
36 suggesting that such bacteria may pre-exist in human gut and being selected upon colistin
37 therapy (3, 4). Here we have tested by real-time PCR (5) and confirmed by standard PCR
38 and sequencing the possible presence of *mcr-1* encoding gene in 32 colistin-resistant *K.*
39 *pneumoniae* isolates previously isolated in Laos (11 isolates), Thailand (14 isolates), France
40 (6 isolates), and Nigeria (1 isolate) (6). We found that 6 isolates harbored *mcr-1* gene
41 sequence including 4 isolates from humans in Laos as well as 2 isolates from France (one
42 from Marseille and one from Angers)(Table 1). MICs were determined by Etest and
43 interpreted with the EUCAST guidelines. Interestingly, two of the four isolates from Laos
44 had also either a stop codon (stop28cysteine, strain KP LH131) or a mutation (A14S, strain
45 KP LH61) in the *mgrB* gene sequence and had higher MICs as compared to the four other
46 isolates who only had *mcr-1* that is consistent with previous findings on colistin MICs for
47 isolates with only *mcr-1* (1, 2). These strains were isolated from stool samples from humans
48 collected in 2012 and 2013 either from healthy individuals (Laos) or from patients at the
49 University hospital La Timone (Marseille, 4 years girl) and University hospital Centre
50 (Angers, 83 years old male) who had never received colistin therapy. Interestingly although

XI- REFERENCES

1. Beuving J et al. Impact of same-day antibiotic susceptibility testing on time to appropriate antibiotic treatment of patients with bacteraemia: a randomised controlled trial. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; **34**, 831–838.
2. Galar A et al. Clinical and economic impact of rapid reporting of bacterial identification and antimicrobial susceptibility results of the most frequently processed specimen types. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; **31**, 2445–52.
3. Tumbarello M et al. Costs of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and influence of extended-spectrum-beta-lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; **54**, 4085–91.
4. Galar A et al. Clinical and economic evaluation of the impact of rapid microbiological diagnostic testing. *J. Infect.* 2012; **65**, 302–9.
5. Croxatto A, Prod'hom G, Faverjon F, Rochais Y & Greub G. Laboratory automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin. Microbiol. Infect.* 2016; **22**, 217–235.
6. Bourbeau PP & Ledebor NA. Automation in Clinical Microbiology. *J. Clin. Microbiol.* 2013; **51**, 1658–1665.
7. **Le Page S**, van Belkum A, Fulchiron C, Huguet R, Raoult D, Rolain JM. Evaluation of the PREVI® Isola automated seeder system compared to reference manual inoculation for antibiotic susceptibility testing by the disk diffusion method. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; **34**, 1859–69.
8. Nebbad-Lechani B et al. New procedure to reduce the time and cost of broncho-pulmonary specimen management using the Previ Isola® automated inoculation system. *J. Microbiol. Methods.* 2013; **95**, 384–388.
9. Mischnik A, Mieth M, Busch CJ, Hofer S & Zimmermann S. First Evaluation of Automated Specimen Inoculation for Wound Swab Samples by Use of the Previ Isola System Compared to Manual Inoculation in a Routine Laboratory: Finding a Cost-Effective and Accurate Approach. *J. Clin. Microbiol.* 2012; **50**, 2732–2736.
10. Seng Pet al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 2009; **49**, 543–51.
11. Renaud FNR et al. Evaluation of the new Vitek 2 GN card for the identification of gram-negative bacilli frequently encountered in clinical laboratories. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2005; **24**, 671–6.
12. La Scola B. & Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2009; **4**, e8041.

13. van Belkum A. et al. Rapid Clinical Bacteriology and Its Future Impact. *Ann. Lab. Med.* 2013; **33**, 14.
14. Jorgensen JH & Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.* 2009; **49**, 1749–55.
15. Quentin-Noury C. Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie. *Rev. Francoph. des Lab.* 2016; **482**.
16. Mutters NT et al. Performance of Kiestra total laboratory automation combined with MS in clinical microbiology practice. *Ann. Lab. Med.* 2014; **34**, 111–7.
17. Croxatto A, Dijkstra K, Prod'hom G & Greub G. Comparison of Inoculation with the Inoqula and WASP Automated Systems with Manual Inoculation. *J. Clin. Microbiol.* 2015; **53**, 2298–2307.
18. Quiblier C et al. Performance of Copan WASP for Routine Urine Microbiology. *J. Clin. Microbiol.* 2016; **54**, 585–592.
19. Bourbeau PP & Swartz BL. First evaluation of the WASP, a new automated microbiology plating instrument. *J. Clin. Microbiol.* 2009; **47**, 1101–6.
20. Froment P, Marchandin H, Vande Perre P & Lamy B. Automated versus manual sample inoculations in routine clinical microbiology: a performance evaluation of the fully automated Inoqula instrument. *J. Clin. Microbiol.* 2014; **52**, 796–802.
21. Beveridge TJ. Use of the gram stain in microbiology. *Biotech. Histochem.* 2001; **76**, 111–8.
22. Riegel P, De Briel D & Dauwalder O. Automatisation de l'identification bactérienne. *Rev. Francoph. des Lab.* 2016; **482**.
23. Lavigne JP & Riegel P. Mass spectrometry in bacteriology. *Ann. Biol. Clin.* **73**, 113–25
24. Jamal W, Albert MJ & Rotimi VO. Real-time comparative evaluation of bioMerieux VITEK MS versus Bruker Microflex MS, two matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry systems, for identification of clinically significant bacteria. *BMC Microbiol.* 2014; **14**, 289.
25. Martiny D. et al. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2012; **50**, 1313–25.
26. Deak E et al. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical microbiology laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; **81**, 27–33.
27. Croxatto A, Prod'hom G & Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry

- in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2012; **36**, 380–407.
28. Lagacé-Wiens PRS et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J. Clin. Microbiol.* 2012; **50**, 3324–8.
 29. Cassagne C, Normand AC, L'Ollivier C, Ranque S & Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses.* 2016; **59**, 678–690.
 30. Becker PT et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med. Mycol.* 2014; **52**, 826–834.
 31. L'Ollivier C & Ranque S. MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification. *Mycopathologia.* 2017; **182**, 183–192.
 32. Singhal N, Kumar M & Viridi JS. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects. *Parasitology.* 2016; **143**, 1491–1500.
 33. Laroche M. et al. MALDI-TOF MS as an innovative tool for detection of *Plasmodium* parasites in Anopheles mosquitoes. *Malar.* 2017; **J. 16**, 5.
 34. Tandina F. et al. Use of MALDI-TOF MS and culturomics to identify mosquitoes and their midgut microbiota. *Parasit.* 2016; *Vectors* **9**, 495.
 35. Khennouchi NC el H, Loucif L, Boutefnouchet N, Allag H & Rolain JM. MALDI-TOF MS as a Tool To Detect a Nosocomial Outbreak of Extended-Spectrum- β -Lactamase- and ArmA Methyltransferase-Producing *Enterobacter cloacae* Clinical Isolates in Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; **59**, 6477–83.
 36. Batah R et al. Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microb. Drug Resist.* 2015; **21**, 470–6.
 37. Kempf M. et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2012; **7**, e31676.
 38. Lasserre C et al. Efficient Detection of Carbapenemase Activity in *Enterobacteriaceae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J. Clin. Microbiol.* 2015; **53**, 2163–71.
 39. Loonen AJM et al. Comparative Study Using Phenotypic, Genotypic, and Proteomics Methods for Identification of Coagulase-Negative Staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 2012; **50**, 1437–1439.
 40. Leclercq R. et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; **19**, 141–60.

41. Matuschek E, Brown DFJ & Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; **20**, O255-66.
42. Winstanley T & Courvalin P. Expert systems in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; **24**, 515–56.
43. Kronvall G, Giske CG & Kahlmeter G. Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disk diffusion. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2011; **38**, 281–290.
44. McGregor A et al. The MicroScan WalkAway diagnostic microbiology system-an evaluation. *Pathology.* 1995; **27**, 172–6.
45. Chapin KC & Musgnug MC. Evaluation of Sensititre automated reading and incubation system for automated reading of Sensititre broth microdilution susceptibility plates. *J. Clin. Microbiol.* 2004; **42**, 909–11.
46. Giani T et al. Assessment of the Phoenix™ automated system and EUCAST breakpoints for antimicrobial susceptibility testing against isolates expressing clinically relevant resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; **18**, E452–E458.
47. Ling TKW, Tam PC, Liu ZK & Cheng AFB. Evaluation of VITEK 2 Rapid Identification and Susceptibility Testing System against Gram-Negative Clinical Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2001; **39**, 2964–2966.
48. Tan TY & Ng SY. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. *Clin. Microbiol. Infect.* 2007; **13**, 541–544.
49. Jang W, Park YJ, Park KG & Yu J. Evaluation of MicroScan WalkAway and Vitek 2 for determination of the susceptibility of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates to cefepime, cefotaxime and ceftazidime. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; **68**, 2282–5.
50. Hombach M, Maurer FP, Pfiffner T, Böttger EC & Furrer R. Standardization of Operator-Dependent Variables Affecting Precision and Accuracy of the Disk Diffusion Method for Antibiotic Susceptibility Testing. *J. Clin. Microbiol.* 2015; **53**, 3864–3869.
51. Medeiros AA & Crellin J. Evaluation of the Sirscan automated zone reader in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 2000; **38**, 1688–93.
52. **Le Page S**, Raoult D, Rolain JM. Real-time video imaging as a new and rapid tool for antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion method: a paradigm for evaluating resistance to imipenem and identifying extended-spectrum β -lactamases. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2015; **45**, 61–5.
53. Nijs A et al. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 2003; **41**, 3627–30.

54. Verhoeven PO et al. Evaluation of the new brilliance GBS chromogenic medium for screening of *Streptococcus agalactiae* vaginal colonization in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 2014; **52**, 991–3.
55. **Le Page S**, Dubourg G, Rolain JM. Evaluation of the Scan® 1200 as a rapid tool for reading antibiotic susceptibility testing by the disc diffusion technique. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 10.1093.
56. Novotn P & Suk TS. Author’s personal copy Leaf recognition of woody species in Central Europe. 2013; **182**.
57. Fardoun HM, Mashat AA & Ramirez Castillo J. Recognition of familiar people with a mobile cloud architecture for Alzheimer patients. *Disabil. Rehabil.* 2017; **39**, 398–402 .
58. Cimmino T, Le Page S, Raoult D & Rolain JM. Contemporary challenges and opportunities in the diagnosis and outbreak detection of multidrug-resistant infectious disease. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2016; **16**, 1163–1175.
59. Dubourg G, Okdah Liliane, **Le Page S**, Rolain JM and Raoult D. In vitro activity of ‘old antibiotics’ against highly resistant Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2015; **46**, 718–720.
60. Cimmino T, Metidji S, Labas N, **Le Page S**, Musso D, Raoult D, Rolain JM. Genome sequence and description of *Actinomyces polynesiensis* str. MS2 sp. nov. isolated from the human gut. *New Microbes New Infect.* 2016; **12**, 1–5.
61. Cimmino T, Traore SI, Valentini C, **Le Page S**, Sokhna C, Diallo A, Raoult D, Rolain JM.. Noncontiguous finished genome sequence and description of *Bacillus testis* strain SIT10 sp. nov. *New microbes new Infect.* 2016; **12**, 18–23.
62. **Le Page S**, Cimmino T, Togo A, Million M, Michelle C, Khelaihia S, Lagier JC, Raoult D, Rolain JM. Noncontiguous finished genome sequence and description of *Enterococcus massiliensis* sp. nov. *New Microbes New Infect.* 2016; **12**, 90–95.
63. Chabou S, Leangapichart T, Okdah L, **Le Page S**, Hadjadj L, Rolain JM. Real-time quantitative PCR assay with Taqman® probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. *New Microbes New Infect.* 2016; **13**, 71–74.
64. Rolain JM, Kempf M, Leangapichart T, Chabou S, Olaitan AO, **Le Page S**, Morand S, Raoult D. Plasmid-Mediated mcr-1 Gene in Colistin-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in France and Laos. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; **60**, 6994–6995.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.