



HAL
open science

Évaluation des performances d'un protocole automatisé de détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques (DRSA) à partir d'hémocultures positives

Lionnel Bulin

► To cite this version:

Lionnel Bulin. Évaluation des performances d'un protocole automatisé de détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques (DRSA) à partir d'hémocultures positives. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03898842

HAL Id: dumas-03898842

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03898842v1>

Submitted on 4 Jan 2023

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2021

**EVALUATION DES PERFORMANCES D'UN PROTOCOLE AUTOMATISÉ DE
DÉTERMINATION RAPIDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES (DRSA) À
PARTIR D'HÉMOCULTURES POSITIVES**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MÉDICALE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN MÉDECINE
DIPLÔME D'ÉTAT

Lionnel BULIN

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Le : 11/10/2021

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. Le Professeur Max MAURIN

Membres :

M. Le Docteur Yvan CASPAR (directeur de thèse)

M. Le Professeur Olivier EPAULARD

Mme. La Docteure Christine RECULE

M. Le Docteur Matthieu DARAGON

L'UFR de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen de la Faculté : Pr. Patrice MORAND

Année 2020-2021

ENSEIGNANTS DE L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENUM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH	APTEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
MCF Ass.MG	BENDAMENE Farouk	Médecine Générale
PU-PH	BENHAMOU Pierre-Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
PU-PH	BLAISE Sophie	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
PR Ass. Méd.	BOILLOT Bernard	
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Nutrition
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PR Ass.MG	BOUCHAUD Jacques	Médecine Générale
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
MCU-PH	BOUSSAT Bastien	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	BOUZAT Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH émérite	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH émérite	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique-médecine de la douleur ; Addictologie
PU-PH émérite	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH émérite	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PR Ass.MG	CARRILLO Yannick	Médecine Générale
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
MCF Ass.MG	CHAMBOREDON Benoît	Médecine Générale
PU-PH	CHARLES Julie	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	CHAUVET Marion	Médecine Générale
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTTON Charles	Génétique
PU-PH	COUTURIER Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH	DEBATY Guillaume	Médecine d'Urgence
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PR Ass. Méd.	DEFAYE Pascal	Cardiologie
PU-PH	DEGANO Bruno	Pneumologie ; addictologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PU-PH émérite	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
PU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Héliène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaëtan	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GIOT Jean-Philippe	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; Brûlologie
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH émérite	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Nutrition
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH émérite	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH émérite	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH émérite	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	LANTUEJOUL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
PR Ass. Méd.	LARAMAS Mathieu	Cancérologie ; radiothérapie
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU - PH	LE GOUELLEC LE PISSART Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	LEDoux Jean-Nicolas	Médecine Générale
PU-PH émérite	LETOUBLON Christian	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
MCU-PH	LUPO Julien	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	MAIGNAN Maxime	Médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie ; Transfusion
PR Ass. Méd.	MATHIEU Nicolas	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
MCU-PH	MC LEER Anne	Histologie, embryologie et cytogénétique
MCU-PH	MONDET Julie	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie ; addictologie
MCU-PH	MORTAMET Guillaume	Pédiatrie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie ; radiothérapie
PU-PH émérite	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCF Ass.MG	ODDOU Christel	Médecine Générale
PR Ass. Méd.	ORMEZZANO Olivier	Cardiologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PAILHE Régis	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PR Ass.MG	PAUMIER-DESBRIERES Françoise	Médecine Générale
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	PERNOD Gilles	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie ; Addictologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes ; Addictologie
PU-PH	RAMBEAUD Jean-Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PR Ass. Méd.	RECHE Fabian	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	RENDU John	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH émérite	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIETHMULLER Didier	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH émérite	ROMANET Jean Paul	Ophthalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
PU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie et biologie moléculaire
PR Ass.MG	ROYER DE VERICOURT Guillaume	Médecine Générale
PU-PH émérite	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL Carole	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH émérite	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	THEVENON Julien	Génétique
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie ; Addictologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VALMARY-DEGANO Séverine	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUI Philippe	Néphrologie
PU-PH émérite	ZARSKI Jean-Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

PU-PH : Professeur des Universités - Praticiens Hospitaliers
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers
 PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale
 MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale
 PR Ass. Méd. : Professeur des Universités Associé de Médecine
 PR Ass.MG : Professeur des Universités Associé de Médecine Générale
 MCF Ass.MG : Maître de Conférences Associé de Médecine Générale

REMERCIEMENTS

A chacun des membres de mon jury pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail.

Tout particulièrement à Monsieur le Docteur Yvan Caspar, pour son encadrement et sa bienveillance sans failles. Plus qu'un guide, il a été un modèle. Un grand merci pour sa considération et sa disponibilité et ce même pendant son congé paternité. Un grand merci également pour tout ce qui n'a pas trait à ce travail, plus de trois ans de Bactériologie et j'apprends encore à chaque échange que ce soit en routine ou en recherche.

A Monsieur le Professeur Max Maurin, pour son accueil à mon arrivée dans le service de Bactériologie. Pour son honnêteté et pour m'avoir proposé pas moins de trois projets différents, tous aussi intéressants les uns que les autres. Merci pour toutes ses opportunités.

A Madame la Docteur Christine Recule, pour ses nombreuses réponses à mes nombreuses questions. Pour ses questions auxquelles maintenant j'ai les réponses. Pour sa passion, tout simplement. Cela a été un plaisir de me former à vos côtés.

A Monsieur le Professeur Epaulard, pour son investissement dans le dialogue clinico-biologique. Pour sa participation aux staffs de Microbiologie et ses questions qui nous poussent à approfondir nos connaissances.

A Monsieur le Docteur Daragon, pour avoir débuté ce projet qui aujourd'hui aboutit à ma thèse sans pour autant être fini. Pour la personne et le biologiste qu'il est, le genre qu'on apprécie d'appeler pour un avis ou pour le plaisir.

A Iyad, pour sa collaboration sur ce projet mais surtout pour toutes les discussions avec ou sans café et l'ouverture sur le monde qu'il offre de par son expérience. Pour son amitié, tout simplement.

A Thomas, pour sa sympathie, sa compétence et sa disponibilité pour le télédépannage à toute heure de la nuit et du week-end (je passe sous silence cette seule fois où tu ne m'as pas répondu). Pour sa bonne humeur et pour le fait qu'il ne râle jamais quand on le sollicite ou alors toujours avec le sourire. Promis, le prochain appel ne sera pas professionnel.

A Sandrine, pour son encadrement quand je découvrais la recherche pendant mon Master. Pour sa patience alors que j'avais tant à apprendre. Pour tous ses enseignements que je prends plaisir à transmettre à mon tour.

A Isabelle, pour sa disponibilité, ses réponses et ses enseignements. Avec le regret de ne plus pouvoir bénéficier de tout cela, tout comme de sa gentillesse.

A l'avenir de la Bactério : Léa et Claire, pour leur professionnalisme, leur disponibilité et leur bonne humeur. Pour tout ce qu'elles apportent et apporteront.

A toute la team recherche du service de Bactério, une équipe formidable ! A Aurélie, pour sa gentillesse infinie et l'attention qu'elle porte aux autres. A Camille, pour les papotages et ses boutades sur les thèses d'exercice. A Julien, pour sa grande sympathie, ses conseils toujours avisés et ses petites astuces. A vous tous, pour cette belle expérience !

A toute l'équipe de Bactério, pour l'ambiance, les discussions, les rigolades... A ceux qui sont là depuis longtemps pour leur investissement. A ceux qui sont là depuis moins longtemps pour leur dynamisme. A vous tous, pour votre passion pour la Bactério, en espérant qu'elle dure longtemps.

Aux secrétaires du DAI, toutes si gentilles et prompt à donner un coup de main ou un sourire.

A tous mes ex co-internes et toujours amis. A ceux qui sont là depuis le début (voire même avant, plus que des meubles, des dinosaures) : Céline, Benjamin, VTH, Réza, Julliane, Caroline, Fanny, Aurélien et Alexandre. A ceux qui ont vite rejoint la partie et qui y ont apporté une saveur toute particulière : Quentin, Arthur, La Gomech, Julien M, VJP, Joris, Edouard, Laura et la petite Léa. Mention spéciale pour ceux que j'ai connu externes et qui sont désormais mes confrères.

Aux plus jeunes, pour leur fougue : Giang, Imad, Oriane, Morgan, Gabrielle, Vézizi, Lydie et Jeanne. Mention spéciale pour ceux toujours dispo pour un café ou une pause, ils se reconnaîtront.

A Julien, mon pote Marseillais. Quoi que je rajoute après ça, on va dire que j'exagère... Alors, je n'en dirai pas trop. Toujours là pour proposer un plan, toujours une plaisanterie. Le plus sérieux au boulot mais, uniquement au boulot ! Pour les Andreani spéciales et cette année qui est passée bien vite !

A Geoffroy, pour sa personnalité hors du commun, pour son sens de l'humour et du GIF. Pour ses expressions bien à lui « K-céphème » et « bactiurie ». Pour ce semestre en apothéose, j'arrête l'internat là, c'est sûr qu'on ne fera pas mieux.

Aux deux précédemment cités, pour les baby-foot et le « soleil dans ma bulle » !

A Madame ma Maman et Monsieur mon Papa, pour tout ! Votre amour, votre présence, votre soutien, votre confiance depuis 10 ans maintenant que je suis « loin là-bas » en Métropole. Pour les FaceTime quand j'ai le blues et les vacances en famille qui n'ont pas de prix ! Merci de m'avoir donné le goût de l'effort, de la chose bien faite et les moyens de mes ambitions tout en me rappelant que le bonheur est dans les choses simples.

A mes sœurs d'amour, pour ce lien sacré entre nous. Je compte bien avoir plus de temps maintenant pour les resserrer toujours plus et voir s'épanouir vos merveilleux enfants.

J'ai gardé la meilleure pour la fin : A ma moitié, ma fiancée, ma future femme, pour son soutien inconditionnel et son leitmotiv pas du tout intéressé durant ses quatre derniers mois « Va à l'essentiel ». Pour m'avoir apporté son regard extérieur et son aide si précieuse. Pour son Amour, sa patience, sa douceur et toutes ses autres innombrables qualités. Pour m'avoir aidé à souffler de temps en temps grâce à sa technique secrète pour m'apaiser : sa présence. Pour m'avoir tenu la main quand je brûlais la chandelle par les deux bouts. Finie la thèse, finies les gardes, on va en avoir plein, maintenant, des soirées et des week-end en amoureux ! Pour tout et surtout pour le meilleur, qui est à venir...

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	6
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	10
ABREVIATIONS	11
INTRODUCTION	14
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	15
1. BACTERIEMIE.....	15
1.1. Définitions.....	15
1.2. Épidémiologie.....	16
1.3. Prise en charge diagnostique.....	17
1.4. Prise en charge thérapeutique	22
1.5. Problématique de l'antibiorésistance	25
2. TECHNIQUES DE DETERMINATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES A PARTIR D'HEMOCULTURES POSITIVES.....	27
2.1. Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (Kirby-Bauer).....	27
2.2. Antibiogramme en milieu liquide automatisé.....	30
2.3. Techniques complémentaires.....	35
2.3.1. Bandelettes à gradient de concentration d'antibiotique	37
2.3.2. Micro-dilution en milieu liquide.....	38
2.4. Techniques de détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques et innovations technologiques	40
2.4.1. Vidéomicroscopie	40

2.4.2. Spectrométrie de masse.....	42
2.4.3. Immunochromatographie.....	42
2.4.4. Colorimétrie.....	45
2.4.5. Inactivation des carbapénèmes.....	45
2.4.6. Techniques de biologie moléculaire.....	46
2.4.7. Détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques en milieu gélosé (DRSA).	48
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	53
ARTICLE.....	54
CONCLUSION.....	83
BIBLIOGRAPHIE.....	85

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Répartitions des différents microorganismes responsables de bactériémies ou fongémies au CHU Grenoble Alpes en 2019	17
Figure 2. Étuve intelligente BACTEC™ FX et flacons d'hémocultures anaérobie et aérobie ...	18
Figure 3. Coloration de Gram de frottis sanguins issus de flacons positifs à CGP évoquant Staphylocoques (A) ou à BGN (B)	19
Figure 4. Culture sur gélose de CGP évoquant Staphylocoques	21
Tableau 1. Antibiothérapie probabiliste selon l'examen direct et le caractère communautaire ou associé aux soins	24
Figure 5. Mortalité hospitalière en fonction du délai avant le « forfait des 3h »	24
Figure 6. Évolution de la fréquence des résistances aux C3G chez <i>E. coli</i> entre 2009 et 2019 ..	26
Figure 7. Évolution de la fréquence des résistances aux C3G chez <i>K. pneumoniae</i> entre 2009 et 2019	26
Figure 8. Principe de la méthode de Kirby-Bauer	28
Figure 9. Becton Dickinson Phoenix™	31
Figure 10. bioMérieux VITEK® 2	32
Figure 11. TREK Diagnostic systems Sensititre™ ARIS 2	33
Figure 12. Beckman Coulter DxM MicroScan WalkAway™	33
Figure 13. Antibiogramme diffusion - images en bouchon de champagne ou à l'emporte-pièce signant une synergie entre un inhibiteur de β -lactamase et une C3G/C4G	36
Figure 14. Bandelette Etest® à gradient de concentration d'antibiotique	37
Figure 15. Détermination d'une CMI par micro-dilution en milieu liquide UMIC®	39
Figure 16. Système Pheno® de Accelerate Diagnostics	41
Figure 17. NG Biotech NG-Test® CARBA 5	43
Figure 18. i2a SIRscan 2000™	49
Figure 19. Chaîne automatisée BD Kiestra™ du CHUGA	52

ABREVIATIONS

AST	Antimicrobial susceptibility testing – Antibiogramme
BGN	Bacille à Gram négatif
BLSE/ESBL	Bêta-lactamase à spectre étendu
CA-SFM	Comité de l’antibiogramme – Société française de microbiologie
C3G	Céphalosporines de troisième génération
CGP	Cocci à Gram positif
CHU(GA)	Centre Hospitalo-Universitaire (Grenoble Alpes)
CQI	Contrôle de qualité interne
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DRSA/RAST	Détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques – Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing
EARS-Net	European antimicrobial resistance surveillance network
ERG/VRE	Entérocoques résistants aux glycopeptides (vancomycine) <i>/Vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i></i>
EUCAST	European committee on antimicrobial susceptibility testing
FDA	Food and Drug administration - agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation – time of flight
MH	Mueller-Hinton
mL	Millilitre
SM/MS	Spectrométrie de masse/Mass spectrometry
REMIC	Référentiel en microbiologie médicale
RPM	Rotations par minute

SAMS/MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline/Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>
SARM/MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline/Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
TAAN	Technique basée sur l'amplification d'acides nucléiques
UFC/CFU	Unité formant colonie/Colony forming unit

INTRODUCTION

Les bactériémies sont associées à une forte morbi-mortalité et ce malgré l'arsenal thérapeutique dont nous disposons à ce jour [Chandrasekaran *et al.* 2018]. Pour lutter contre cette mortalité, l'instauration la plus précoce d'une antibiothérapie adaptée est déterminante. Avant d'avoir documenté l'infection, c'est-à-dire de savoir quelle bactérie est responsable de ladite infection, un traitement antibiotique probabiliste est introduit [Jasuja *et al.* 2020]. Du fait de la fréquence croissante des résistances aux antibiotiques, il s'agit d'un traitement à large spectre couvrant les principaux germes fréquemment identifiés dans les bactériémies et leurs mécanismes de résistance les plus courants. Celui-ci ne tient au départ pas compte des résistances aux antibiotiques présentes chez la bactérie en cause mais de l'épidémiologie locale des germes suspectés en fonction du ou des points d'appels cliniques du patient et de son historique médicamenteux [Rhodes *et al.* 2016]. Différents éléments vont pouvoir orienter la thérapeutique médicamenteuse au fur et à mesure de l'avancée des analyses microbiologiques, dont voici la chronologie : l'examen direct, l'identification de l'espèce bactérienne et, enfin, le phénotype de sensibilité aux antibiotiques [Pilmis *et al.* 2019]. Cependant, l'antibiotique instauré peut lui aussi avoir un impact sur la morbidité et ce d'autant plus que son spectre est large. Plus un antibiotique possède un large spectre plus il va exercer une pression de sélection antibiotique sur les flores commensales, pression qui contribue à la sélection de germes résistants et à l'augmentation de la prévalence des résistances au niveau d'une population. Certains antibiotiques à large spectre exercent également une toxicité accrue pour le patient, d'autant plus que ce dernier est âgé et médicalisé. L'épargne de l'utilisation des antibiotiques, tout comme leur utilisation optimisée pour améliorer le pronostic des bactériémies sont des enjeux entremêlés de santé publique [Rhodes *et al.* 2016, Robineau *et al.* 2018]. Il a déjà été démontré que l'obtention rapide d'un phénotype de sensibilité aux antibiotiques et une adaptation thérapeutique précoce améliorent le pronostic clinique en cas de bactériémie ou de choc septique [Kumar *et al.* 2009]. Dans cette optique, en 2018 l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) a proposé une méthodologie afin de

raccourcir le délai d'obtention d'un antibiogramme à partir de flacons d'hémocultures positifs. Ce protocole, décrit sur le site internet de l'EUCAST [eucast.org] permet une détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques (DRSA) en 4, 6 ou 8h pour 7 espèces bactériennes fréquemment responsables de bactériémies et 1 espèce bactérienne très souvent multi-résistante. Aucune préparation particulière du bouillon d'hémoculture issu du flacon positif n'est nécessaire et le temps technique du protocole est court. En plus de pouvoir être à l'origine d'une désescalade précoce, cette méthode permet de pallier à l'augmentation de fréquence des résistances aux antibiotiques en les détectant rapidement [Pilmis *et al.* 2019]. En revanche, ce protocole est totalement manuel et fait intervenir des mesures de diamètres d'inhibition à des temps très précis, rendant son utilisation compliquée dans la pratique d'un laboratoire de biologie médicale [Jasuja *et al.* 2020]. Cette étude vise à automatiser ce protocole grâce à l'utilisation de la chaîne Kiestra™ (Becton Dickinson) et de son logiciel ReadA Browser™.

Les performances de la méthodologie DRSA de l'EUCAST selon un protocole automatisé ont été évaluées et deux méthodes d'ensemencement (manuelle et automatisée) ont été comparées dans cette thèse, dans l'objectif de se diriger vers une automatisation de plus en plus totale de cette méthodologie de détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries, directement à partir de flacons d'hémocultures positifs.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BACTERIEMIE

1.1. Définitions

Une bactériémie est définie par la circulation de bactéries dans les vaisseaux sanguins. Elle peut être permanente en cas d'infection endovasculaire, typiquement dans l'endocardite infectieuse. Elle peut aussi être intermittente du fait de relargages à partir de sites infectés, notamment dans les infections urinaires hautes, digestives, les pneumopathies et les infections sur cathéters vasculaires [Alfandari *et al.* 2016]. Enfin, elle peut être transitoire que ce soit physiologiquement (par exemple en période postprandiale) ou induite par une intervention (endoscopie, dentiste...). Les bactériémies primaires font référence aux infections intravasculaires alors que les bactériémies transitoires ou intermittentes sont dites secondaires. Dans ce cas, il convient de déterminer le foyer de l'infection.

Quelle que soit l'origine de la bactériémie, c'est la présence d'un sepsis qui fait son pronostic. Celui-ci est défini comme une dysfonction d'organe engageant le pronostic vital par une réponse inadaptée de l'hôte à un processus infectieux. Le choc septique est quant à lui défini comme un sepsis associé à des signes d'hypoperfusion périphérique (lactates > 2 mmol/L) malgré un remplissage adéquat, nécessitant l'utilisation de drogues pour que la pression artérielle moyenne soit supérieure à 65mmHg. Afin d'améliorer le pronostic du sepsis, une campagne a été lancée en 2004 appelée « Surviving sepsis », montrant l'enjeu de santé publique que cela représente à l'échelle mondiale [Howell *et al.* 2017]. L'introduction d'un traitement antibiotique efficace est un déterminant important de cette amélioration [Kumar *et al.* 2009].

1.2. Épidémiologie

L'incidence des bactériémies est estimée entre 113 et 204 pour 100 000 personnes en Europe et en Amérique du Nord [Kern *et al.* 2020]. Cette incidence est comparable à celle des accidents vasculaires cérébraux et est légèrement en deçà de celle de l'insuffisance cardiaque. Les bactériémies représentent la première cause de mortalité due à une infection. Cette mortalité est d'autant plus importante que la population est vieillissante [Yahav *et al.* 2016]. En fonction des études, on estime la part de bactériémies nosocomiales entre 30 et 50% qui semble, elle aussi, être en augmentation. D'après Kern *et al.* 2020, l'épidémiologie n'est pas parfaitement connue dans les pays en développement. Cependant, elle semble avoir été longtemps sous-estimée en Inde et en Afrique sub-saharienne notamment au Burkina Faso où l'incidence en population pédiatrique serait supérieure à celle des accès palustres. Dans la plupart des études européennes et Nord-américaines, la bactérie la plus souvent en cause est *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont, quant à eux, toujours dans le top 3 des pathogènes les plus mortels. En Europe, le nombre total d'épisode a été estimé à 1,2 millions/an avec une mortalité à 1 mois allant de 13 à 20% [Goto *et al.* 2013]. L'étude de l'épidémiologie française en 2016 faisait, elle aussi, état de la prédominance d'*E. coli* (36,1%) et de *S. aureus* (16,2%). Les staphylocoques à coagulase négative étaient également fréquemment identifiés (7,7%) [Alfandari *et al.* 2016]. Ces chiffres ont été confirmés par l'étude SPA-BACT (Surveillance de la Prescription des Antibiotiques - Bactériémies), étude observationnelle prospective réalisée dans 121 centres hospitaliers français sur 1952 patients, qui a de plus évalué la part d'infections nosocomiales à 39% et la part de sepsis à 22% [Robineau *et al.* 2018].

A l'échelle locale, au CHU Grenoble-Alpes en 2019, 1530 épisodes de bactériémie ont été recensés (Figure 1). *E. coli* était le pathogène le plus souvent en cause, présent dans 28% des cas, suivi par *S. aureus*, isolé dans 11% des cas et par *Staphylococcus epidermidis* (10%). Au total, 45% des épisodes étaient liés à des entérobactéries, dont 10,4% étaient productrices de

bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE, 77/738). Parmi les *S. aureus*, 6% étaient résistants à la méticilline (SARM, 11/182).

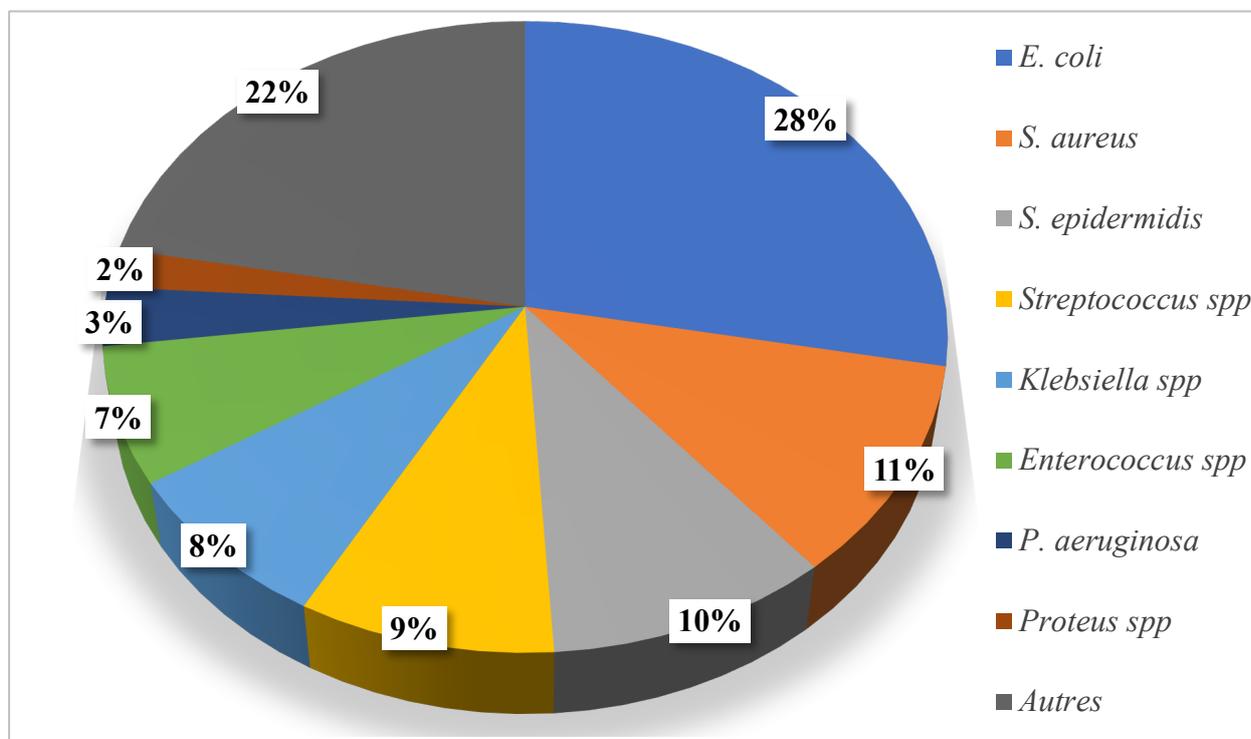


Figure 1. Répartitions des différents microorganismes responsables de bactériémies ou fongémies au CHU Grenoble Alpes en 2019 – Collaboration Bactériologie – Infectiologie – Hygiène hospitalière

1.3. Prise en charge diagnostique

Pour faire le diagnostic d'une bactériémie, la ou les bactéries en cause doivent être identifiées : il s'agit de la première partie de la documentation microbiologique. Pour cela, le gold standard est l'hémoculture. Le sang du patient suspect d'infection est prélevé, de préférence par ponction veineuse périphérique, puis injecté dans un flacon contenant un milieu de culture bactériologique. Les flacons sont incubés dans des automates à 35°C qui permettent la détection d'une croissance bactérienne au sein du flacon. Les milieux de culture des flacons sont de plus en plus complexes afin de permettre une détection toujours plus précoce des agents pathogènes.

Certains flacons contiennent des résines chélatrices d'antibiotiques afin de permettre la croissance des bactéries même si l'hémoculture est prélevée après traitement antimicrobien. Différents flacons d'hémoculture sont commercialisés et ont chacun leur automate d'incubation dédié. Les fournisseurs sont Becton Dickinson (BD) avec le BACTEC™ FX, ou bioMérieux avec le BacT/ALERT 3D. Un troisième fournisseur existe mais n'est pas disponible en France, TREK Diagnostics avec le versaTREK systems. Au CHU Grenoble Alpes, c'est le BACTEC™ FX et ses flacons qui sont utilisés (Figure 2).



Figure 2. Étuve intelligente BACTEC™ FX et flacons d'hémocultures anaérobie et aérobie –
[sources : <https://www.bd.com/fr-fr/offerings/microbiology-solutions/blood-culture/bd-bactec-fx> -
<https://www.bd.com/fr-fr/offerings/microbiology-solutions/blood-culture> consultées le 26/09/2021]

La détection des flacons positifs se fait par une augmentation de fluorescence dans le culot du flacon, liée à la production de CO₂ par les bactéries [legacy.bd.com]. La mise en évidence d'une bactérie n'est pas un critère suffisant. Celle-ci doit être pathogène pour l'Homme et toute potentielle contamination du flacon par une bactérie de la flore cutanée ou environnementale

doit être écartée. Une fois le flacon identifié comme positif par l'automate, un frottis est réalisé et coloré selon la méthode de Gram. Ce frottis est observé au microscope et son verdict donne la première orientation diagnostique (Figure 3).

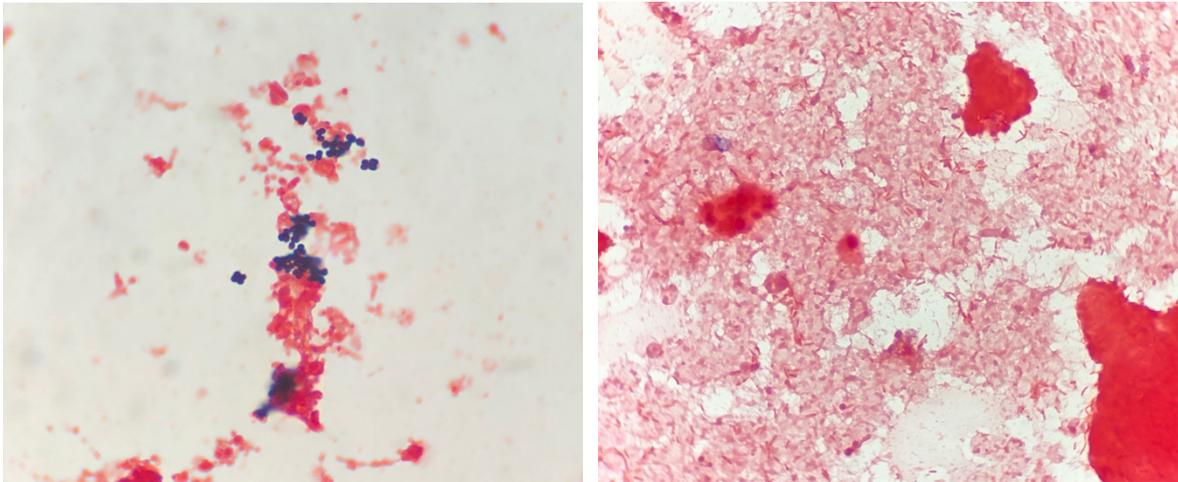


Figure 3. Coloration de Gram de frottis sanguins issus de flacons positifs à CGP évoquant *Staphylocoques* (A) ou à BGN (B) – source personnelle

Puis la bactérie est isolée sur milieu de culture solide afin d'être identifiée le jour suivant par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF sur colonie (Figure 4). Les principaux spectromètres de masse utilisés actuellement sont le Vitek® MS (bioMérieux) ou le Microflex (Bruker Daltonics, utilisé au CHUGA). Le principe de cette identification repose sur l'analyse du temps de vol des protéines bactériennes préalablement ionisées en présence d'une matrice à l'aide d'un laser permettant leur séparation en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) [Jang *et al.* 2018, Israr *et al.* 2020]. Le profil protéique obtenu est ensuite comparé à une base de données et un score de similarité est attribué, permettant d'identifier le spectre le plus proche dans la base de données et par conséquent l'espèce bactérienne présente. A ce jour, la base de données est validée pour le diagnostic *in vitro* de 3813 espèces de microorganisme [<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification-for-clinical-laboratories-ivd-ce/maldi-biotyper-library-ivd.html>]. Cependant, des

procédures existent désormais pour identifier la bactérie en cause directement à partir du flacon d'hémoculture positif, toujours avec l'utilisation du même spectromètre de masse. Elles sont souvent composées d'une étape de lyse cellulaire et toujours d'une étape de lavage du culot contenant des débris bactériens obtenu par centrifugation. Qu'elles utilisent un kit commercial ou un protocole « maison », ces procédures ont montré des performances comparables en termes d'identification du germe responsable de la bactériémie [Pondérand *et al.* 2020]. Celle-ci peut se faire à différents niveaux : au genre, au groupe ou à l'espèce. Par ailleurs, d'autres techniques rapides d'identification directement à partir d'échantillons biologiques existent. Elles sont basées sur l'amplification d'acides nucléiques, comme dans les PCR multiplexes. Par exemple, la PCR Cepheid® GeneXpert MRSA/SA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) permet la distinction entre le Staphylocoque doré et les autres staphylocoques avec une fiabilité supérieure à 98%, en plus de la détection de la résistance à la méticilline et ce, en seulement 1 heure [Parta *et al.* 2009]. La PCR multiplexe BioFire FilmArray™ explore la présence de 24 pathogènes et de 3 gènes de résistance aux antibiotiques. Elle permet l'identification d'au moins un pathogène dans 88,1% des hémocultures positives avec une concordance supérieure à 92,9% [Salimnia *et al.* 2016]. Quant à la PCR multiplexe GenMark ePlex®, 41 espèces bactériennes peuvent être identifiées avec une sensibilité de 96% et 100% pour les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, respectivement [Bryant *et al.* 2020]. Enfin une technique est en cours de développement directement sur sang total (avant incubation en flacon d'hémoculture). Il s'agit de la technologie T2MR, dans laquelle l'amplification d'acides nucléiques est associée à une détection par résonance magnétique nucléaire (RMN) pour permettre l'identification de 6 espèces bactériennes (*E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* et *E. faecium*) par mesure de la RMN due à la génération d'agglomérats de particules magnétiques par les amplicons [Clancy *et al.* 2018].

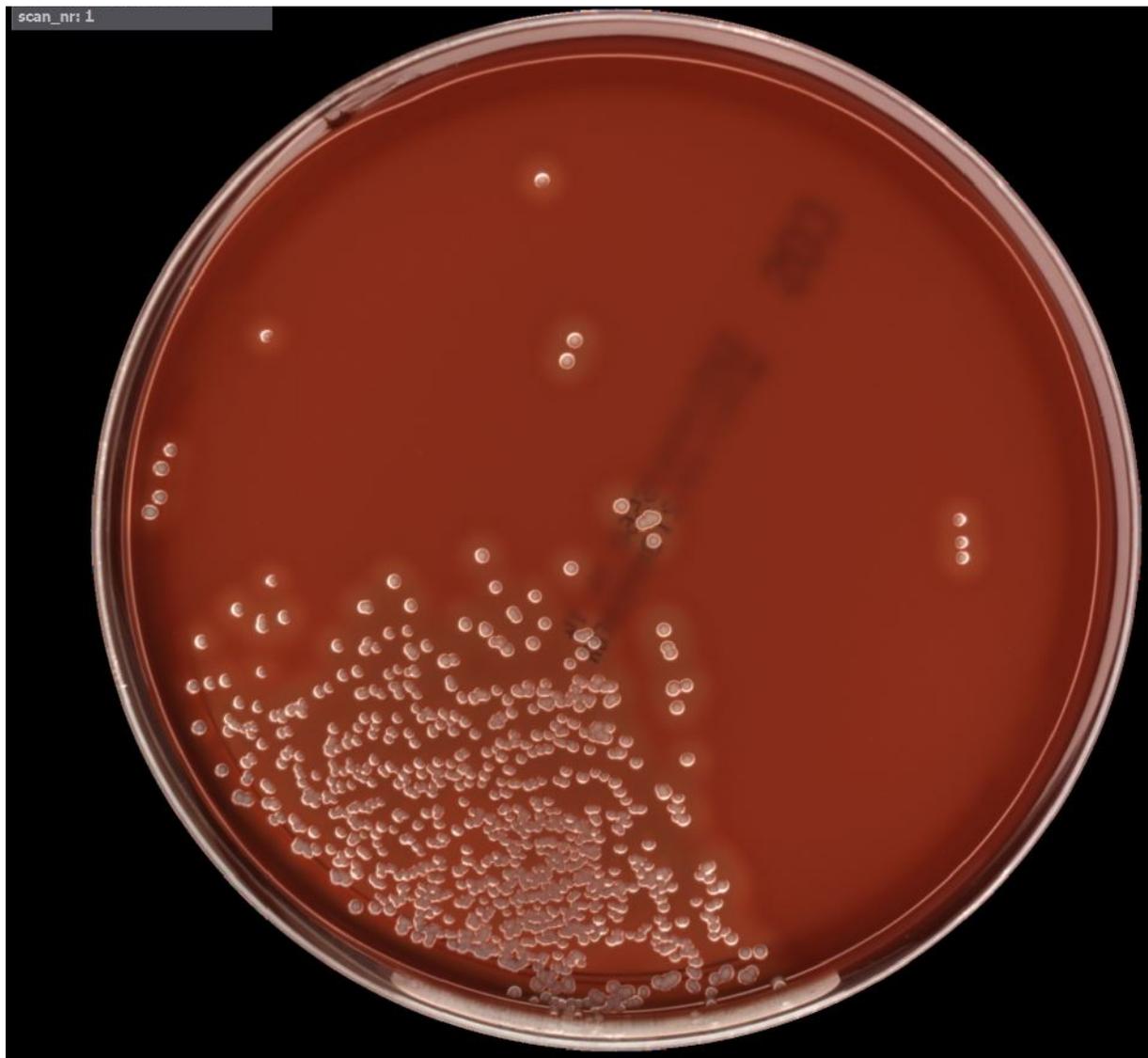


Figure 4. Culture sur gélose de CGP évoquant *Staphylocoques* (ici un *staphylocoque doré* avec sa bêta-hémolyse) – source personnelle

La spectrométrie de masse a supplanté la caractérisation biochimique et enzymatique, bien que celle-ci soit encore utilisée dans certains cas particuliers lorsque la spectrométrie de masse est prise en défaut. En plus d'une diminution du temps technique, l'absence d'une incubation supplémentaire permet de gagner 24h sur l'identification. Cependant, hormis pour la technologie T2MR, tout ceci n'est possible que si le flacon d'hémoculture est positif. Il faut donc prélever suffisamment de sang pour augmenter les chances de réussir à cultiver une bactérie. La bonne pratique est la réalisation d'au moins deux séries d'hémocultures, c'est-à-dire le prélèvement de deux paires de flacons (aérobie et anaérobie) pour un volume total d'au

moins 40mL de sang, pour un adulte [ECN.PILLY 2020, Miller *et al.* 2018]. Des abaques d'adaptation du volume à prélever existent pour les enfants en fonction de leur poids [REMIC]. Un volume de sang prélevé inférieur chez les enfants par rapport aux adultes est possible en raison d'une quantité de bactéries dans le sang (unité formant colonie par millilitre, UFC/mL) plus importante en pédiatrie que chez les adultes. En effet, les concentrations sont de l'ordre de moins de 1 à 10 UFC/mL en moyenne pour les adultes alors qu'elles peuvent atteindre 100 UFC/mL pour un enfant [Yagupsky *et al.* 1997]. En cas de suspicion d'infection de cathéter, en plus de la ponction de sang veineux périphérique, la ponction d'une série d'hémocultures sur le cathéter est recommandée. Un différentiel de délai de positivité supérieur à 2h en faveur de la voie est un des arguments pour retenir ce diagnostic.

1.4. Prise en charge thérapeutique

En cas de signes cliniques de sepsis, des séries d'hémocultures doivent être prélevées, de préférence avant tout traitement anti-infectieux mais sans le retarder. Ainsi, avant même qu'une bactériémie soit confirmée, le patient bénéficie déjà d'une prise en charge médicamenteuse intraveineuse appelée antibiothérapie probabiliste et ce idéalement dans l'heure [Burke *et al.* 2019]. Une fois le diagnostic posé, cela doit mener à l'adaptation de l'antibiothérapie afin de l'optimiser en termes d'efficacité, de toxicité et de réduction du spectre. Le diagnostic et l'identification de la porte d'entrée de la bactériémie peuvent également conduire à une indication de prise en charge chirurgicale.

L'antibiothérapie est influencée par les différentes étapes de la documentation microbiologique : du résultat de l'observation microscopique du flacon positif après coloration de Gram, à la détermination d'un phénotype de sensibilité aux traitements antibiotiques, l'antibiogramme (Tableau 1). Plus l'instauration d'un traitement efficace est précoce, meilleur est le pronostic (Figure 5). En particulier, dans le quart des cas où la bactériémie est associée à un sepsis voire à un choc septique, la mortalité augmente de plus de

7% toutes les heures en cas de traitement inefficace [ECN Pilly, Kumar *et al.* 2006]. L'accélération de la documentation microbiologique a un impact positif sur le pronostic mais aussi sur les coûts liés aux soins [Patel *et al.* 2016]. Le guide international pour la prise en charge du sepsis et du choc septique (2016) recommande l'initiation rapide d'un traitement à large spectre couvrant tous les pathogènes probables selon plusieurs critères mais aussi sa réévaluation la plus précoce possible [Rhodes *et al.* 2016]. Les critères comprennent le lieu de vie, les comorbidités, les allergies, l'historique médicamenteux, la notion de contact avec une bactérie multi-résistante ou de voyage, la porte d'entrée suspectée de l'infection, les signes de gravité et l'état immunitaire du patient, ainsi que les données épidémiologiques. La documentation des infections, outre son rôle immédiat dans la prise en charge du patient, est donc cruciale à plus large échelle pour connaître l'épidémiologie locale grâce au suivi de la fréquence des pathogènes et de leurs résistances afin de pouvoir définir les traitements probabilistes les plus adaptés. Malgré cette antibiothérapie empirique dans l'heure, la survie en cas de choc septique est inférieure à 80% [Kumar *et al.* 2006].

Une fois la bactériémie documentée, l'antibiothérapie doit être ciblée afin d'avoir le moins d'impact possible sur la santé du patient (toxicité) et sur l'écologie bactérienne de son microbiote et de son environnement. La désescalade, c'est-à-dire le changement de traitement anti-infectieux avec un rétrécissement de son spectre d'activité doit être encouragée [Plachouras *et al.* 2018], car celle-ci n'a pas montré d'infériorité par rapport à la poursuite du traitement empirique et qu'elle est de plus associée à une diminution logique des coûts ainsi que des complications liés au traitement [Lee *et al.* 2015].

Examen direct	Antibiothérapie de première ligne	Alternative
Bactériémies communautaires		
Coques à Gram positif en amas (type staphylocoque)	Pénicilline M ou céfazoline + Vancomycine ± Gentamicine	
Coques à Gram positif en chaînette (type streptocoque)	Amoxicilline ou C3G (céfotaxime ou ceftriaxone)	
Bacilles à Gram négatif	C3G (céfotaxime ou ceftriaxone) ± Gentamicine	Fluoroquinolone ± Gentamicine
Bactériémies associées aux soins		
Coques à Gram positif	Vancomycine ≈ Gentamicine	Daptomycine (sauf si pneumonie) + Gentamicine
Bacilles à Gram négatif	Uréidopénicilline + inhibiteur de bêtalactamase ou céfépime ou carbapénèmes + Amikacine	

Tableau 1. Antibiothérapie probabiliste selon l'examen direct et le caractère communautaire ou associé aux soins – selon le Collège des Enseignants de Médecine Intensive-Réanimation (CE-MIR) [Source : <http://www.ce-mir.fr/UserFiles/File/national/livre-referentiel/50-ch44-449-457-9782294755163-copie.pdf> consultée le 26/09/2021]

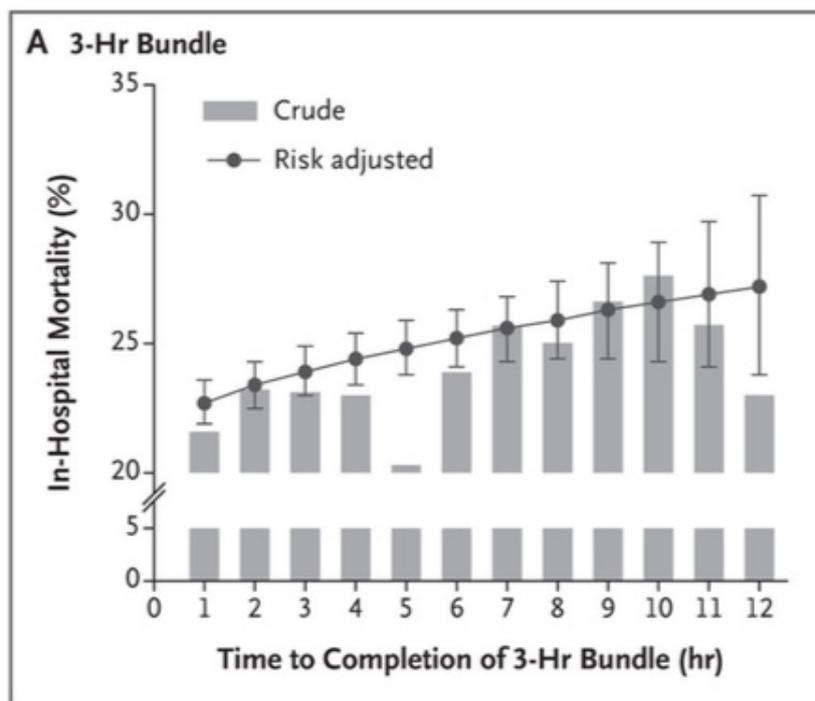


Figure 5. Mortalité hospitalière en fonction du délai avant le « forfait des 3h » - D'après Seymour et al. 2017

1.5. Problématique de l'antibiorésistance

L'utilisation massive des antibiotiques au cours des dernières décennies et l'augmentation concomitante de la pression de sélection par les antibiotiques a conduit à une augmentation de la prévalence des résistances bactériennes. Cela a notamment favorisé l'émergence du groupe ESKAPE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* sp.) décrit pour la première fois en 2008 comme des bactéries qui échappent aux thérapeutiques anti-infectieuses [Rice *et al.* 2008]. En plus d'être les pathogènes les plus souvent responsables d'infections nosocomiales, ces bactéries représentent des modèles d'études qui permettraient de comprendre les mécanismes de pathogenèse, de transmission et d'acquisition de résistances [Rice *et al.* 2008]. En 2019, ces pathogènes étaient responsables de plus de 40% des bactériémies avec, par rapport aux autres pathogènes, une augmentation médiane de durée de séjour d'1 jour, un coût de soin supplémentaire médian estimé à 2600 \$ et à une augmentation de 2,1% de la mortalité toutes causes confondues [Marturano *et al.* 2019].

L'évolution de la fréquence des résistances aux antibiotiques en Europe est actuellement plus hétérogène. Elle semble aller dans la bonne direction dans certains pays. Par exemple en France, sur la période 2016-2018, la fréquence de résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) chez *E. coli* était stable voire en très légère baisse, passant de 11,2% des 11313 infections à 9,6% des 12614 infections recensées de 2016 à 2018, respectivement. Malheureusement, la tendance générale est plutôt inversée à l'échelle européenne, comme en atteste les données EARS-Net (European antimicrobial surveillance – network) sur une période de 10 ans (Figure 6 et 7). Par exemple, la fréquence des *E. coli* présentant une résistance aux C3G est passée, entre 2009 et 2018 de 2,8% à 7,6% en Finlande, de 8,2 à 12,2% en Allemagne et de 10,1 à 19,3% en Grèce. Quant à la fréquence de la résistance à la Vancomycine parmi les *E. faecium* sur la même période est passée de 0,0% à 1,7%, de 6,1% à 23,8% et de 26,9% à 28,1% en Finlande, Allemagne et Grèce, respectivement.

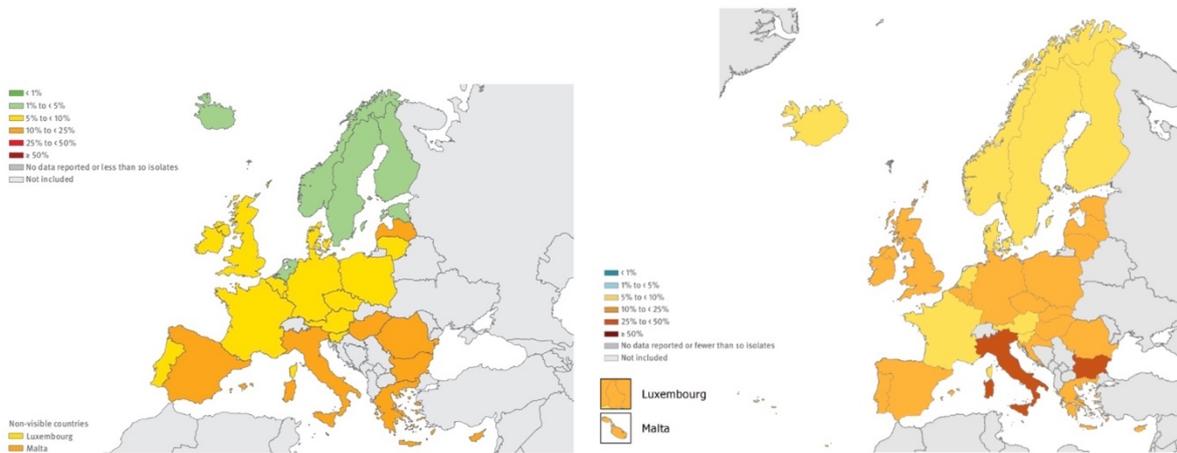


Figure 6. Évolution de la fréquence des résistances aux C3G chez *E. coli* entre 2009 et 2019.

Données EARS-Net [Sources :

https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/1011_SUR_annual_EARS_Net_2009.pdf - <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf> consultées le 26/09/2021]

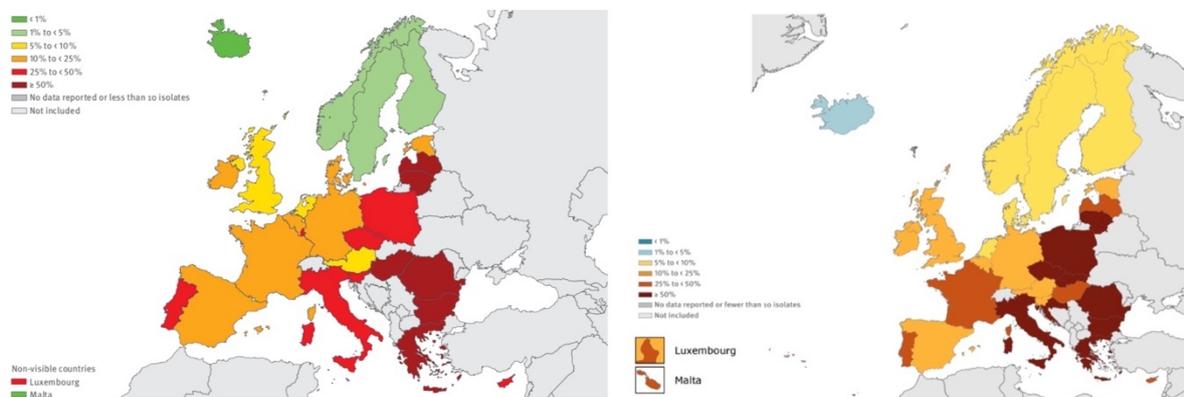


Figure 7. Évolution de la fréquence des résistances aux C3G chez *K. pneumoniae* entre 2009 et 2019.

Données

EARS-Net [Sources :

https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/1011_SUR_annual_EARS_Net_2009.pdf - <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf> consultées le 26/09/2021]

2. TECHNIQUES DE DETERMINATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES A PARTIR D'HEMOCULTURES POSITIVES

Sachant que le sepsis est une urgence thérapeutique et que l'évolution de la prévalence des résistances aux antibiotiques est loin d'être maîtrisée, il est important que la détermination de la sensibilité aux antibiotiques soit la plus fiable et la plus rapide possible.

2.1. Antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (Kirby-Bauer)

Bien qu'il ne s'agisse pas de la méthode de référence, c'est l'une des méthodes les plus répandues depuis qu'elle a été décrite au siècle dernier [Bauer *et al.* 1966]. Elle est basée sur la diffusion des antibiotiques en milieu gélosé à partir de disques contenant une quantité précise et standardisée d'antibiotique sur une gélose préalablementensemencée avec la souche à tester. La mesure de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne autour de ces disques est comparée aux diamètres dit critiques définis pour chaque couple antibiotique/espèce bactérienne (Figure 8). En fonction de ce résultat, la bactérie est déterminée comme sensible, sensible à forte posologie ou résistante à un antibiotique. Ceci présume de la réponse du pathogène à un traitement antibiotique en situation clinique. Au laboratoire de Bactériologie du CHUGA, comme dans tous les laboratoires d'analyses médicales en France, nous suivons la méthodologie du CASFM-EUCAST (Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - European committee on antimicrobial susceptibility testing). Celle-ci a l'avantage d'être standardisée et de fournir des contrôles de qualité. De plus, elle est éprouvée depuis 2009 avec des mises à jour annuelles.

Le milieu de base est le Mueller-Hinton (MH). Pour la détermination du phénotype des bactéries n'exigeant pas de conditions particulières pour leur croissance, le milieu utilisé est le MHE (E pour validé par l'EUCAST). Pour les bactéries fastidieuses (notamment les Streptocoques, les bactéries du groupe HACEK), ce milieu est supplémenté à 5% avec du sang

de cheval défibriné et à 20 mg/L de β -NAD (bêta-nicotinamide adénine dinucléotide), il est appelé MHF (F pour fastidious). Dans les deux cas, l'épaisseur de la gélose doit être de $4 \pm 0,5$ mm, puisque celle-ci a un impact sur la diffusion est donc sur le diamètre d'inhibition.

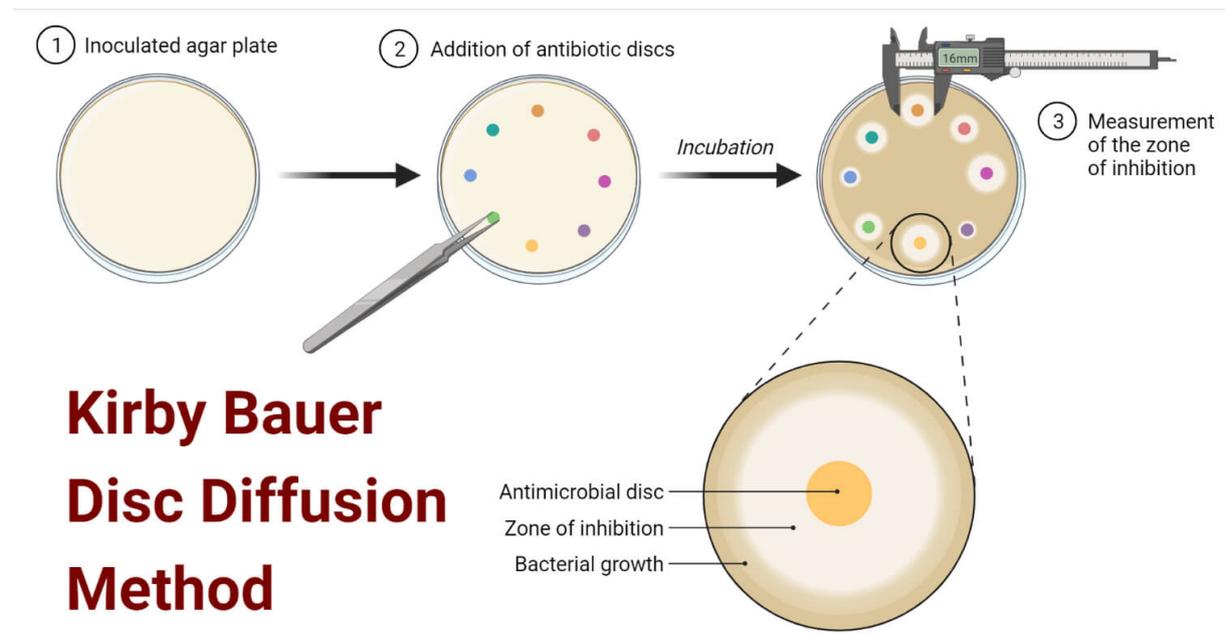


Figure 8. Principe de la méthode de Kirby-Bauer – [Source : <https://microbenotes.com/kirby-bauer-disc-diffusion> consultée le 26/09/2021]

Afin de pouvoir inoculer la gélose avec la bactérie d'intérêt, une suspension bactérienne calibrée à 0,5 Mc Farland (correspondant à environ $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) est préparée à partir d'une solution saline (eau stérile avec 0,85% NaCl). Cette suspension peut être utilisée dans l'heure pour inoculer la gélose MH mais l'idéal est de l'utiliser dans les 15 minutes. Un écouvillon sec stérile est trempé dans la solution puis pressé contre la paroi du tube pour éliminer l'excès de liquide. Il est ensuite utilisé pour étaler la suspension sur la surface de la gélose de façon homogène en suivant trois axes. Dans les 15 minutes suivantes, des disques imprégnés d'antibiotique sont ensuite appliqués grâce à un distributeur. Les panels d'antimicrobiens appropriés à tester sont définis par le CASFM-EUCAST en fonction des caractéristiques, de la famille, ou du genre de bactérie. Puis, la gélose est incubée à $35 \pm 2^\circ\text{C}$

en air ambiant ou additionné en CO₂ à 5%, s'il s'agit d'une MHE ou d'une MHF, respectivement [CASFM-EUCAST]. Une fois l'incubation terminée, la zone d'inhibition autour de chaque disque est mesurée. Des systèmes de lecture automatisée des géloses ont facilité l'interprétation des résultats de cette méthode en routine. Par exemple, le système ADAGIO™ (Biorad) qui réalise une photographie de la gélose, mesure les diamètres d'inhibition après reconnaissance des disques et les interprète en fonction de l'identification du germe renseignée par l'utilisateur, grâce à son système expert. Autre exemple, le SIRscan ORION™ (i2a) qui permet l'incubation de la gélose en plus des étapes de lecture et d'interprétation.

En cas d'hémoculture positive, la suspension bactérienne nécessaire à l'inoculation de la gélose MHE ou MHF peut être préparée de plusieurs façons [CASFM-EUCAST]. Soit après une étape de subculture en milieu solide, soit directement à partir du flacon d'hémoculture pour certaines bactéries. En fonction du résultat de la coloration de Gram, différentes dilutions du bouillon d'hémoculture sont pratiquées. S'il s'agit de bacilles à Gram négatif (BGN) ou de cocci à Gram positif (CGP) évoquant des Staphylocoques (en amas), une dilution au 1/50^{ème} du flacon est réalisée. S'il s'agit de CGP évoquant Streptocoques ou Entérocoques (en chaînettes), une dilution au 1/5^{ème} est faite dans de la solution saline. Cette dilution permet l'épargne de l'étape de subculture du flacon positif sur milieu gélose, soit entre 16 et 24h dans le processus d'obtention de l'antibiogramme. Cette méthode a été éprouvée par le CA-SFM et répond aux exigences de la FDA (food and drug administration, agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) en termes de catégorisation S/I/R globale avec des taux de concordance à 95,47%, un taux d'erreurs très majeures à 1,28% et un de taux combiné d'erreurs majeures et mineures de 3,42% sur 538 souches, toutes espèces confondues, par rapport aux résultats fournis par une technique standard [Stokkou *et al.* 2015].

Les erreurs très majeures (very major error, VME) correspondent à une fausse sensibilité et sont celles qui présentent la plus importante menace pour la prise en charge du patient. Les erreurs majeures (major error, ME) correspondent à une fausse résistance. Bien que bloquant une

potentielle désescalade et ayant donc un impact écologique, celle-ci n'a pas d'impact sur le succès thérapeutique. Toute discordance avec un résultat "I", quel qu'en soit le sens, est considérée comme une erreur mineure (minor error, mE).

2.2. Antibiogramme en milieu liquide automatisé

La méthode de référence pour la réalisation d'un antibiogramme est la méthode de dilution en milieu liquide. Celle-ci permet l'obtention de valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI), c'est-à-dire la quantité la plus faible d'antimicrobien par unité de volume à partir de laquelle la bactérie ne peut plus se multiplier. Elle se fait dans une plaque avec des puits contenant des concentrations connues d'ATB. Cette plaque est inoculée avec une suspension standardisée (5×10^5 UFC/mL) avant d'être incubée pendant 20 ± 4 h [EUCAST]. Si initialement les concentrations décroissantes étaient obtenues par dilution au demi en cascade, la miniaturisation parallèle au développement et à la commercialisation de plaques prêtes à l'emploi a simplifié l'utilisation de cette technique. Ceci a permis des gains de temps de préparation, des économies de réactifs et d'espace dans les incubateurs, tout en améliorant la reproductibilité de la méthode [Jorgensen *et al.* 2009]. En pratique, la CMI correspond au puits avec la plus petite concentration d'ATB dans lequel aucune croissance bactérienne n'est détectée. Initialement, on regardait à l'œil nu, maintenant, la lecture peut être automatisée pour une plus grande sensibilité grâce à l'utilisation de système optique de détection. Différents automates proposent à la fois la préparation de l'inoculum et la lecture de la croissance bactérienne dans des cartouches avec différents panels en fonction du Gram voire de l'espèce : les systèmes BD Phoenix™, VITEK® 2 Sensititre™ ARIS™ 2X et DxM MicroScan WalkAway™. Ces automates vont jusqu'à l'interprétation des résultats de CMI en fonction de

l'espèce grâce à des règles d'expertise capables d'analyser et de caractériser des phénotypes de résistance [Versalovic *et al.* 2011].

L'automate BD Phoenix™ (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Figure 9) possède son système semi-automatisé d'inoculation des cartouches : le Phoenix™ AP. Le BD Phoenix™ est une étuve intelligente détectant la croissance bactérienne en utilisant les principes de turbidimétrie associée à la colorimétrie (due à une réaction d'oxydo-réduction) dans des cartouches dédiées de 84 puits. Son volume d'activité est correct puisque deux modules peuvent être combinés afin de contenir 99 cartouches avec une lecture toutes les 20 minutes permettant un rendu entre 6 et 16h [Benkova *et al.* 2020]. Les résultats sont interprétés par BD Xpert™ dont les règles sont guidées par les recommandations du CLSI (clinical laboratory standard institute), de l'EUCAST et parfois par des publications scientifiques. Cet outil fournit un conseil expert à partir de l'identification et des résultats d'antibiogramme fournis par l'automate en suivant les règles de bonne pratique. Il peut ainsi modifier l'interprétation issue d'une CMI sans en modifier la valeur.



Figure 9. Becton Dickinson Phoenix™ – [Source : <https://www.bd.com/fr-fr/offerings/microbiology-solutions/identification-and-susceptibility-systems/automated-bd-phoenix-system-equipment> consultée le 26/09/2021]

L'automate VITEK® 2 (bioMérieux, Figure 10) est un système automatisé de lecture turbidimétrique, colorimétrique et fluorimétrique de croissance bactérienne dans des plaques de la taille d'une carte de crédit. Les améliorations par rapport à la version 1 sont l'augmentation du nombre de puits par panel (de 45 à 64) ainsi que la création d'un panel pour *S. pneumoniae*. Il est capable de lire jusqu'à 120 cartes à la fois et les résultats sont disponibles en 4 à 10h. Sa rapidité s'explique par l'exploitation d'un système optique amélioré et d'algorithmes basés sur l'analyse cinétique de la croissance. Son système expert, l'AES (Advanced expert system), contient plus de 2000 phénotypes de sensibilité aux ATB permettant de fournir une interprétation individuelle de chaque ATB qui soit cohérente avec un phénotype ainsi qu'avec les résistances intrinsèques de l'espèce identifiée [Winstanley *et al.* 2011].



Figure 10. bioMérieux VITEK® 2 – [Source : https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/18-vitek2-systembrochure_v2.pdf consultée le 26/09/2021]

Contrairement aux autres automates de micro-dilution en milieu liquide, le système Sensititre™ ARIS™ 2X (automated reading and incubation system, TREK Diagnostic systems, Thermo

Fischer Scientific, Figure 11) nécessite une incubation d'au moins 18h. Il a une capacité de 64 panels avec une détection basée sur de la fluorimétrie. Comme le MicroScan™, il utilise des plaques de format standard 96 puits. De plus, une solution d'inoculation des plaques est proposée par le fournisseur : le Sensititre™ Autoinoculator. L'autre avantage de ce système est la possibilité d'analyser des plaques Sensititre™ incubées en dehors d'une étuve automatisée. Une nouvelle version de cet automate est disponible depuis 2019, le Sensititre™ ARIS™ HiQ.



Figure 11. TREK Diagnostic systems Sensititre™ ARIS 2 – [Source: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SW4000GBL> consultée le 26/09/2021]

Le DxM MicroScan WalkAway™ (Beckman Coulter, Figure 12) est un incubateur capable de détecter une activité enzymatique bactérienne par utilisation combinée de substrats fluorogénique et d'un indicateur de pH. Il est capable d'assurer la lecture de plaques de 96 puits, de taille standard, jusqu'à 96 plaques à la fois. Ce système n'est actuellement pas disponible en France.

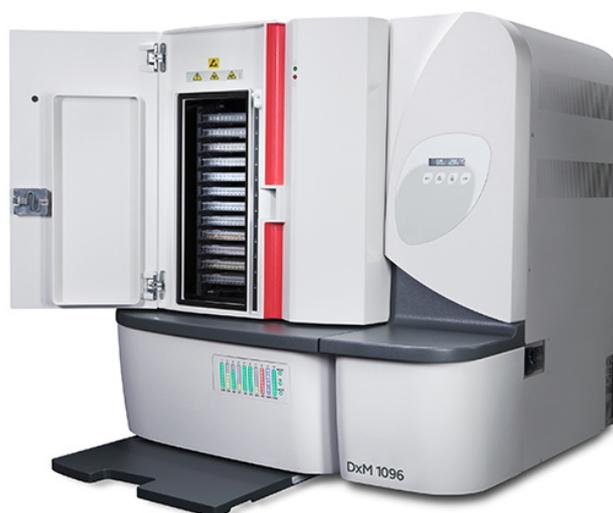


Figure 12. Beckman Coulter DxM MicroScan WalkAway™ – [Source: <https://www.beckmancoulter.com/fr/products/microbiology/dxm-microscan-walkaway-system> consultée le 26/09/2021]

Les performances de ces quatre méthodes automatisées sont comparables aux méthodes de référence et sont toutes approuvées par la FDA [Jorgensen *et al.* 2009]. Le système BD Phoenix™ a un très bon taux de concordance de catégorisation S/I/R de 97,3% par rapport à la méthode de référence du CLSI pour l'antibiogramme des BGN [Menozzi *et al.* 2006]. Ces méthodes automatisées sont aussi comparables entre elles, le taux de concordance de catégorisation S/I/R entre le MicroScan et le Phoenix étant de 93,2% pour l'antibiogramme des BGN [Snyder *et al.* 2008]. Au laboratoire de Bactériologie du CHUGA, c'est le système BD Phoenix™ qui est utilisé.

Ces systèmes automatisés ont été développés pour la réalisation d'antibiogramme à partir d'une subculture sur milieu gélosé, cependant ils commencent à être utilisés à partir des flacons d'hémoculture. Höring *et al.* 2019 ont comparé les performances du BD Phoenix™ et du VITEK® 2 à partir d'un culot bactérien du bouillon d'hémoculture positive par rapport à l'utilisation de ces méthodes sur colonie (standard). Deux protocoles de préparation du culot ont été évalués. Le premier est composé d'une double centrifugation (DC), l'une pour évincer les globules rouges, l'autre pour former le culot bactérien. Le deuxième protocole est composé d'une seule centrifugation (SC) grâce à l'utilisation d'un tube avec gel séparateur, celui-ci

épargnant donc le temps d'une centrifugation ainsi qu'une étape de décantage. Après élimination du surnageant, le culot est récupéré au-dessus du gel. Les taux de concordance avec la méthode standard après SC et DC étaient respectivement de 98,41% et 98,39% pour le VITEK® 2 et de 94,95% et 95,74% pour le BD Phoenix™. Ces taux concordent avec ceux de la littérature bien que celle-ci soit plus fournie pour le VITEK® 2 que pour le BD Phoenix™. Cependant, certaines études décrivent de meilleures performances pour le BD Phoenix™ vis-à-vis des bactéries à Gram négatif [Gherardi *et al.* 2012]. Néanmoins, ces deux automates ont montré des performances satisfaisantes pour l'application en routine d'un protocole d'inoculation directe. Le système MicroScan™ a également été comparé au VITEK® 2 selon un protocole d'inoculation à partir d'un culot bactérien issu d'une hémoculture. Les taux d'erreurs mineures, majeures et très majeures étaient respectivement de 1,3%, 0,04% et 0,08% pour le VITEK® 2, contre 0,9%, 0% et 0,14% pour le MicroScan™ [Quesada *et al.* 2009]. Un protocole d'inoculation à partir du culot bactérien d'hémoculture positive a également été évalué pour le système Sensititre™. Bien que le taux de concordance essentielle soit de 99%, celui-ci accusait des taux d'erreur très majeure insatisfaisants, mesurés à 1,7% pour les bactéries à Gram positif et 2,0% pour les bactéries à Gram négatif [Chapin *et Musgnug* 2003].

2.3. Techniques complémentaires

En cas de résultat incertain (résistance rare, phénotype improbable...), des techniques de contrôle sont disponibles. Par exemple, les tests de recherche de synergie entre les C3G/C4G et un inhibiteur de bêta-lactamase (technique des disques rapprochés ou espacés) signalent la présence d'un BLSE via l'observation de bouchons de champagne ou d'inhibition à l'emporte-pièce entre les disques en méthode de diffusion (Figure 13). Ou encore, la restauration des diamètres d'inhibition des C3G/C4G en présence de cloxacilline signalant la présence d'une céphalosporinase dérégulée (CDER).

Des techniques complémentaires peuvent également être utilisées pour déterminer des valeurs de CMI, qui peuvent être requises dans certaines situations cliniques. Par exemple, si la bactériémie est due à un Streptocoque et qu'il y a suspicion d'endocardite infectieuse, l'évaluation de la CMI d'amoxicilline est nécessaire pour le relai *per os*. Si c'est un *Haemophilus* spp qui est responsable de la bactériémie et qu'il est porteur d'une bêta-lactamase et résistant à l'amoxicilline/clavulanate, il faut évaluer la CMI des céphalosporines d'intérêt thérapeutique voire de la gentamicine (en cas de signes de gravité).

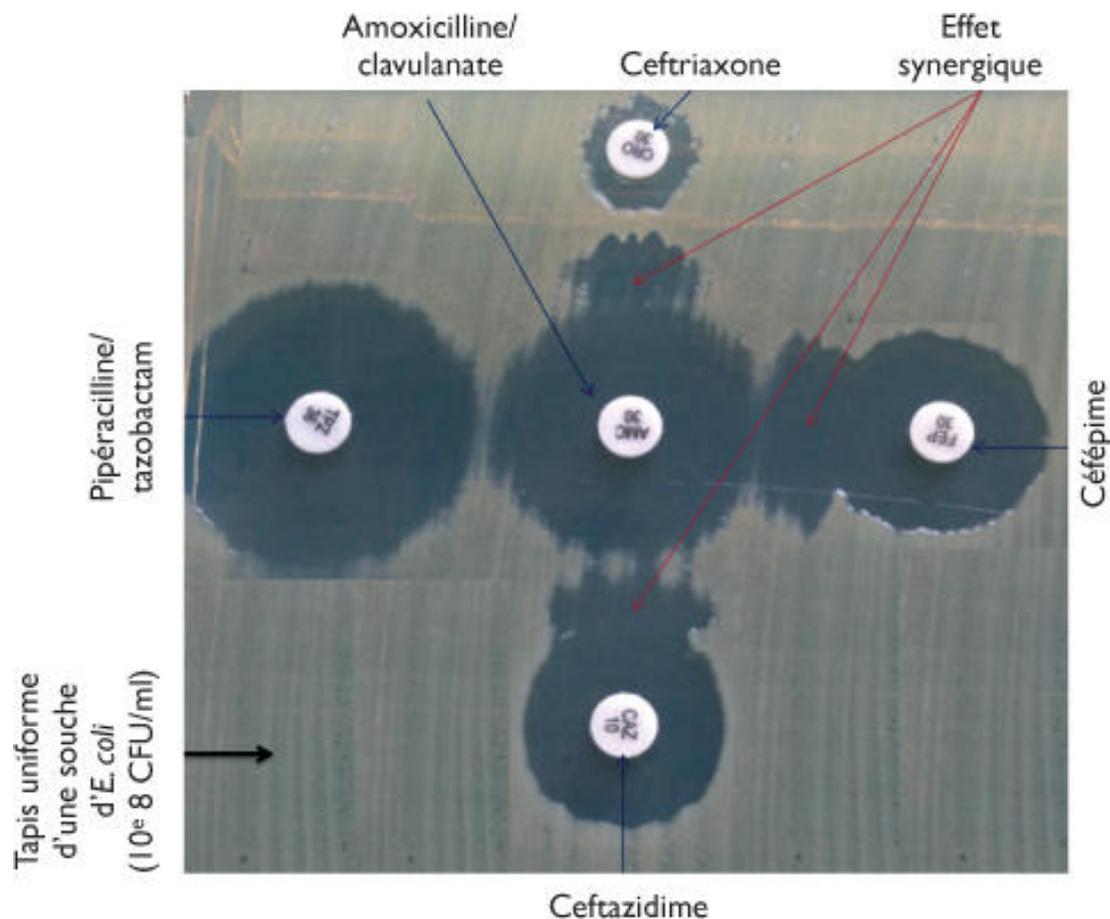


Figure 13. Antibiogramme diffusion - images en bouchon de champagne ou à l'emporte-pièce signant une synergie entre un inhibiteur de β -lactamase et une C3G/C4G – [Source : « Bêtalactamase à spectre étendu et carbapénémases chez les Enterobacteriaceae ». Revue Médicale Suisse, <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2014/revue-medicale-suisse-450/betalactamases-a-spectre-etendu-et-carbapenemases-chez-les-enterobacteriaceae> consultée le 26/09/2021]

2.3.1. Bandelettes à gradient de concentration d'antibiotique

L'une des techniques de détermination précise de la CMI est la bandelette imprégnée d'un gradient prédéfini et continu de concentrations d'ATB. Des bandelettes de plusieurs fournisseurs sont disponibles : les Etest® (bioMérieux, Figure 14) et les MTST™ (MIC test strip, Liofilchem). L'utilisation de ces bandelettes présente également un intérêt dans certaines autres situations :

- en cas de défaut de croissance en milieu liquide
- pour confirmer un phénotype de résistance spécifique (ex : les carbapénémase de classe B qui sont des métallo-bêta-lactamases avec les bandelettes Imipénème/Imipénème+EDTA)
- pour confirmer un résultat d'antibiogramme
- pour déterminer la valeur précise de la CMI afin de pouvoir ajuster la posologie d'un traitement (associé à un dosage plasmatique de l'antibiotique) chez les patients de soins critiques ou en cas d'infection sévère
- pour tester un antibiotique hors panels de routine (liste complémentaire, nouvel antibiotique).

Ces bandelettes ont fait leurs preuves surtout dans cette dernière indication [Wang *et al.* 2020 ; Koeth *et al.* 2019] aussi, leur résultat fait foi dans le rendu en routine au laboratoire.

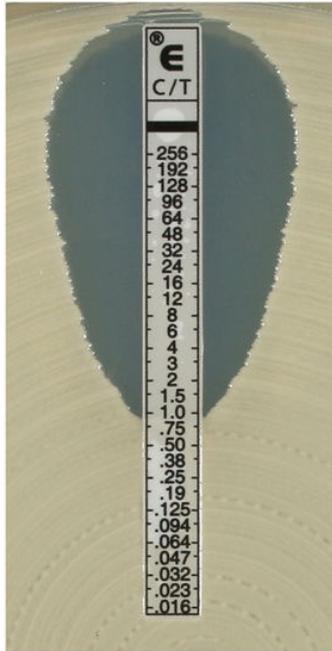


Figure 14. Bandelette Etest® à gradient de concentration d'antibiotique – [Source : <https://www.biomerieux-diagnostics.com/etest-ceftolozane-tazobactam> consultée le 26/09/2021]

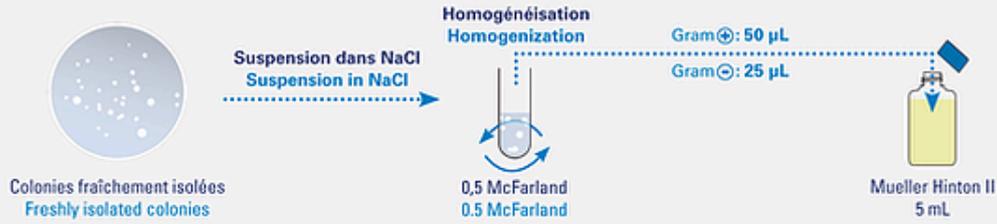
2.3.2. Micro-dilution en milieu liquide

L'autre technique de détermination de la CMI est la micro-dilution en milieu liquide (ex : UMIC™, Biocentric, Bandol, France). Il s'agit d'une technique rapide et pratique utilisant des réactifs lyophilisés dans une barrette avec des puits qu'il suffit d'inoculer avec une suspension bactérienne standardisée (Figure 15). Pour certains couples antibiotique/bactérie, les techniques de diffusion ou de gradient ont montré des performances inférieures, dans ces cas, il est préconisé d'utiliser des méthodes de micro-dilution, par exemple pour la détermination de la sensibilité des staphylocoques aux glycopeptides [Matuschek *et al.* 2017]. Les barrettes UMIC™ ont par ailleurs démontré une excellente corrélation avec la méthode de référence pour la détermination de la sensibilité à la colistine des BGN avec un coefficient de Pearson à 0,98 [Bardet *et al.* 2019].

Protocole simplifié / Short instructions

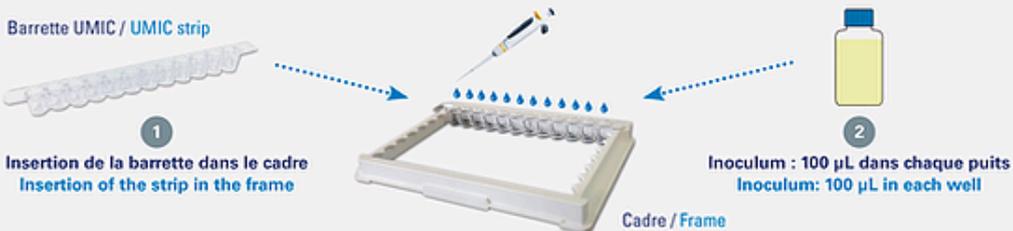
1

Préparation de l'inoculum / Inoculum preparation



2

Inoculation d'une barrette UMIC / UMIC strip inoculation



3

Incubation dans la UMIC Box / Incubation in the UMIC Box



4

Lecture du résultat / Result reading

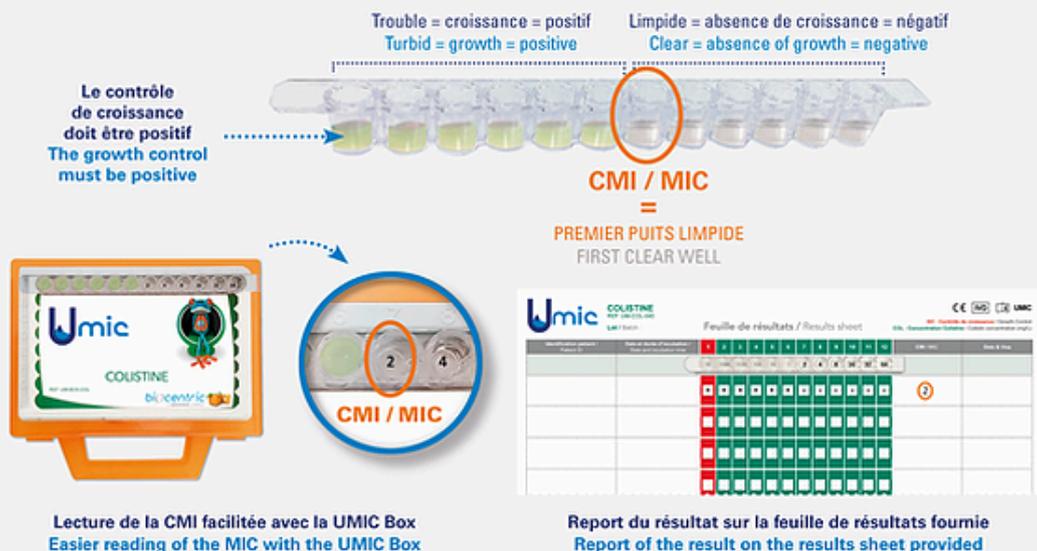


Figure 15. Détermination d'une CMI par micro-dilution en milieu liquide UMIC® - [Source : <https://www.biocentric.com/umic-fr> consultée le 26/09/2021]

2.4. Techniques de détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques et innovations technologiques

De nombreuses techniques se sont développées ces deux dernières décennies afin de pouvoir fournir des résultats plus précoces de sensibilités aux antibiotiques des bactéries responsables de bactériémie. Celles-ci impliquent l'utilisation de technologies variées (ex : microcalorimétrie, microarrays...), de plateformes micro-fluidiques, de spectrométrie de masse type MALDI-TOF, de PCR multiplexes ou de test colorimétriques. Elles répondent aux critères de rapidité et d'efficacité, cependant, elles restent pour la plupart chères et nécessitent parfois l'installation d'équipements spéciaux.

2.4.1. Vidéomicroscopie

L'une d'entre elles fournit de très bons résultats : le système Accelerate Pheno® Blood Culture kit (Accelerate Diagnostics, Figure 16). Cette technique basée sur la micro-dilution en milieu liquide associée à de la vidéo-microscopie sur cellule unique et de l'hybridation *in situ* fluorescente produit des résultats en environ 7h [Doern *et al.* 2018]. Elle permet la détection précoce de la croissance bactérienne et donc de la résistance aux antibiotiques avec 95,5% de concordance de catégorisation par rapport à une méthode standard sur 232 échantillons testés [Charnot-Katsikas *et al.* 2017]. Pancholi *et al.* rapportent également de bonnes performances suite à l'évaluation de la technique sur 4142 CGP et 6331 BGN. Les taux de concordance de catégorisation S/I/R sont de 97,9% et 94,3%, les taux de fausses sensibilités sont de 1,0% et 0,5% et de fausses résistances de 0,7% et 0,9% pour les CGP et les BGN, respectivement par rapport aux résultats du VITEK® 2 [Pancholi *et al.* 2018]. De plus, les sondes d'hybridation

étant spécifiques d'espèce ou de genre, le germe est identifié en environ 1,5h [Eubank *et al.* 2020]. Le PhenoTest® est capable d'identifier 8 BGN et 6 CGP, soit au genre soit à l'espèce parmi les germes les plus souvent incriminés dans les bactériémies. Un de ses avantages est le temps technique réduit grâce à l'automatisation de cette méthode. Il ne présente que deux limites mais celles-ci sont difficilement compatibles avec l'activité d'un CHU. La première est son nombre limité d'échantillon : 1 seul par module, pas plus de 4 modules par automate. La deuxième est son coût : 250€ par échantillon [Vasala *et al.* 2020]. Cependant, il s'agit de la seule méthode permettant actuellement de fournir une identification ainsi que des CMI en 7h [Briggs *et al.* 2020].



Figure 16. Système Pheno® de Accelerate Diagnostics -
<https://acceleratediagnostics.com/results/customer-stories/> consultée le 26/09/2021]

2.4.2. Spectrométrie de masse

Parmi les méthodes phénotypiques, Bruker Daltonics propose des modules complémentaires à leur spectromètre de masse (MALDI-TOF Biotyper). Les protocoles MBT STAR-Carba et MBT STAR-BL ont été développés et évalués pour la recherche de résistances directement à partir de culot bactérien de flacons d'hémoculture positifs. Ces méthodes sont basées sur l'évaluation par MALDI-TOF MS de l'hydrolyse d'un antibiotique après une courte période d'incubation (30 minutes à 2h). L'hydrolyse est mesurée par le calcul d'un logRQ qui correspond au ratio logarithmique entre la hauteur du pic de standard interne et de celle du pic d'antibiotique sur le chromatogramme. Le MBT STAR-Carba a montré lors d'une étude, une sensibilité de 100% (132/132) et une spécificité de 100% (275/275) grâce à l'utilisation de l'imipénème comme substrat et d'une valeur de logRQ seuil de 0,4 (soit 40% d'hydrolyse) pour la prédiction de la production d'une carbapénémase [Cordovana *et al.* 2019]. Le STAR-BL permet la détection d'une activité β -lactamase dirigée contre le céfotaxime (CTX). Une sensibilité de 68,8% et une spécificité de 91,5% ont été rapportés par Lee *et al.* Ces résultats ont été obtenus avec le seuil de logRQ de 0,4. Seuil que les auteurs suggèrent de baisser à 0,2 afin d'obtenir une sensibilité à 87,5% sans nuire à la spécificité. Cependant, la sensibilité de cette méthode semble altérée par l'administration d'antibiotiques préalable à la réalisation des hémocultures. L'un des avantages majeurs du MBT STAR-BL est sa capacité à détecter des résistances même en cas d'hémoculture polymicrobienne. De plus, ces méthodologies fournissent des résultats en à peine plus de 5h mais requièrent un temps technique important [Lee *et al.* 2018].

2.4.3. Immunochromatographie

Certaines techniques bien que non innovantes permettent la détection rapide de résistances d'intérêt majeur. C'est le cas de bandelettes immunochromatographiques comme le test

RESIST-4 (O.K.N.V., Coris) qui permet la détection des carbapénémases de type OXA-48-like (oxacillinase), KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase) et VIM (Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase). Cette technique repose sur l'immunochromatographie et a été testée directement sur culot issu d'hémoculture positive ou après une courte incubation (4h). Le RESIST-4 se montre très performant sans incubation avec 100% de sensibilité pour la détection de carbapénémase de type OXA-48-like (30/30) et KPC (17/17). Bien que moins performant en sensibilité directement sur hémoculture concernant les carbapénémases de type NDM et VIM, une courte incubation de 4h sur gélose PVX permet de corriger ce défaut et de détecter 100% des isolats résistants. Les avantages de cette méthode sont sa spécificité de 100% (98/98), son temps technique réduit avec production d'un résultat en moins de 30 minutes [Cointe *et al.* 2018]. Les carbapénémases majoritaires en France étant de type OXA-48-like (63,3%), NDM (20,1%) et VIM (9,2%), l'utilisation de RESIST-4 après une incubation de 4h sur PVX serait recommandée par Cointe *et al.* [Rapport d'activité 2020 du CNR de résistance aux antibiotiques]. Bianco *et al.* recommandent la réalisation concomitante d'une culture solide et ce même en cas d'utilisation du RESIST-5 (détectant en plus les OXA-163-like).

Le test immunochromatographique NG-Test Carba 5 (NG Biotech) ne requiert pas cette étape de culture supplémentaire afin d'obtenir 100% de sensibilité pour la détection de carbapénémase du panel du RESIST-4. De plus, il détecte également les carbapénémases de type IMP. Ces résultats ayant été obtenus sur 130 hémocultures inoculées artificiellement, ils restent à démontrer sur des prélèvements cliniques [Bianco *et al.* 2020].



Figure 17. NG Biotech NG-Test® CARBA 5 – [Source : <https://www.nsmmedicaldevices.com/news/72235/> consultée le 26/09/2021]

Autre exemple de détection de résistance d'intérêt majeur par technique immunochromatographique : la résistance à la méticilline chez *S. aureus*. L'EZ-Step MRSA (DiNonA) a été testé sur culot bactérien issu d'hémoculture positive mais ses performances étant insuffisante, Shin *et al.* suggèrent de l'utiliser après 4h d'incubation en milieu liquide. Ainsi, en moins de 5h et avec l'utilisation conjointe d'un test de coagulase, cette technique permet la détection de 94,4% des SARM avec une spécificité de 100% [Shin *et al.* 2010]. Kolesnik-Goldmann *et al.* retrouvent la même spécificité et une meilleure sensibilité (100%) dans une étude prospective sur 112 staphylocoques en utilisant le SACCT (*S. aureus* Culture Colony Test, Alere). Cependant, cette sensibilité a été obtenue dans une population avec une très faible prévalence de SARM. De plus, cette méthode ne permet pas la détection de la PLP2a encodée par *mecC* [Kolesnik-Goldmann *et al.* 2021]. Delpont *et al.* rapportent une VPP de 100% et une VPN de 94,3% pour le CCT d'Alere. Pour améliorer la VPN à 98,8%, ils proposent de prendre en compte une colonisation à SARM dans l'algorithme décisionnel, un patient bactériémique et colonisé à SARM ayant une plus forte probabilité d'avoir une bactériémie à SARM [Delpont *et al.* 2016].

2.4.4. Colorimétrie

Des méthodes biochimiques ont également été testées directement sur flacon d'hémoculture, par exemple le Rapidec Carba NP test (bioMérieux). Il s'agit d'un test colorimétrique dont la sensibilité est de 97,9% et la spécificité de 100% directement sur flacons d'hémoculture inoculés artificiellement avec 193 entérobactéries porteuses soit de OXA-48-like, de KPC, de NDM, de VIM ou de IMP [Dortet *et al.* 2013]. Plus récemment, une version spécifiquement adaptée par Meier *et al.* pour une utilisation directe sur culot d'hémoculture a montré des performances comparables sans étape additionnelle de culture permettant de rendre des résultats en moins de 3h (au lieu de 6h) avec 99% de sensibilité et 95,1% de spécificité sur 185 entérobactéries. Une autre méthode colorimétrique, le β -CARBA™ test permet la détection en 20 à 45 minutes d'une activité carbapénémase avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 95,1%. La spécificité de ces méthodes colorimétriques est mise en défaut par des souches de *K. oxytoca* non-porteuses de carbapénémase [Meier *et* Hamprecht 2019]. Les avantages des techniques colorimétriques sont leur coût et la détection phénotypique de résistance. Cependant, l'observation d'un changement de couleur est subjective et peut donc être opérateur dépendante.

2.4.5. Inactivation des carbapénèmes

De façon plus objective, la technique d'inactivation des carbapénèmes (TIC) permet la détection phénotypique d'une activité carbapénémase. La souche à tester est cultivée en milieu liquide dans lequel baigne un disque d'antibiotique (carbapénème). Après une courte incubation, ce disque est retiré du milieu puis appliqué sur une gélose inoculée par une souche de référence qui est sensible à l'antibiotique. Après une courte incubation, si le diamètre d'inhibition est réduit, ceci signifie que la souche testée a hydrolysé l'antibiotique. Habituellement utilisée sur colonie avec une lecture du diamètre d'inhibition à 18-24h, des

versions modifiées ont été proposées, notamment pour sa réalisation directement à partir du flacon d'hémoculture [Meier *et al.* 2019]. La version modifiée par Bianco *et al.* a été adaptée pour une lecture à 4h avec l'utilisation d'un disque de méropénème pour la détection d'une activité carbapénémase et d'un disque de céfotaxime pour la détection d'une activité céphalosporinase, qu'il s'agisse d'une BLSE ou d'une CDER bien que dans ce dernier cas, la sensibilité soit entre 80 et 100% en fonction de l'espèce contre 100% pour les BLSE. Quant à la détection d'une activité carbapénémase, la sensibilité de la technique est comprise entre 99 et 100% et ce même en cas de faible activité. Pour une raison encore inconnue, les performances sur flacon anaérobie BacT/Alert sont globalement plus en retrait [Bianco *et al.* 2020]. Le principal avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite pas d'acquisition de matériel ou de réactif. Son coût par test est donc faible (0,85\$) [Meier *et al.* 2019].

2.4.6. Techniques de biologie moléculaire

A partir d'un flacon d'hémoculture positif, il est également possible d'effectuer une PCR (polymerase chain reaction) permettant d'identifier les principaux pathogènes responsables de bactériémie ainsi que les principaux gènes de résistances associés. Leur principal avantage étant une adaptation thérapeutique plus précoce d'environ une dizaine d'heures, soit 5h contre 15h avec des méthodes conventionnelles [MacVane *et al.* 2016]. Parmi les techniques basées sur l'amplification d'acides nucléiques (TAAN), les plus décrites sont les PCR multiplexes de type FilmArray™, Verigene® ou ePlex®.

Le système BioFire FilmArray™ est un système automatisé réalisant des PCR multiplexes. Différents panels sont disponibles dont le BCID (blood culture identification) qui permet l'identification en 1h du ou des pathogènes présents dans une hémoculture positive. Le multiplexage permet la détection de 25 espèces ou genres bactériens et de 3 gènes de résistance aux antibiotiques. Sa limite principale est son prix par échantillon (129\$) bien que celui-ci soit <1% du coût de prise en charge d'un sepsis. Ses performances sont excellentes avec 96% de

sensibilité et 98,9% de spécificité pour la détection du gène *mecA*. Cependant, seuls 3 gènes de résistances sont détectables (*mecA*, *vanA/vanB* et *bla_{KPC}*) et, bien que rarement observé, l'automate peut rendre un résultat invalide (1,5% des tests) [Altun *et al.* 2013, Opota *et al.* 2015]. Ses performances sont excellentes avec 97,0% et 100% de sensibilité pour la détection de *mecA* (32/33) et de *vanA* (1/1), respectivement avec une spécificité de 100% [Oberhettinger *et al.* 2020].

Le système Luminex® Verigene® utilise des billes magnétiques pour l'extraction d'ADN bactérien et des sondes composées d'une nanoparticule d'or sur une puce à ADN. Cette puce permet la réalisation d'un PCR multiplexe et l'identification de 8 gènes de résistance aux antibiotiques : *bla_{CTX-M}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* et *bla_{OXA}* (-23, -40, -48, -58) pour le panel GN et *mecA*, *vanA/vanB* pour le panel GP, en plus de 22 espèces ou genres bactériens et ce, en 2h [Rivard *et al.* 2017, Vareechon *et al.* 2018, Briggs *et al.* 2020].

Le système ePlex® (GenMark) est une plateforme de diagnostic syndromique par PCR multiplexe. Comme pour le Verigene®, 2 panels (GP et GN) sont réalisables sur hémoculture avec une durée de test comparable, d'une heure et demi. Ses panels sont les plus larges puisqu'ils incluent la détection de *mecC* et différencient *vanA* et *vanB*. Une étude rapporte 100% de sensibilité et de spécificité pour la détection de *mecA* (17/17), de *bla_{CTX-M}* (17/17) et de *vanA* (1/1) pour 187 flacons testés [Bryant *et al.* 2020]. Une autre étude trouve également de bonnes performances mais encore une fois sur un nombre limité d'échantillons, avec 100% de sensibilité et de spécificité pour la détection de *mecA* (33/33), de *vanA* (1/1) et de *bla_{CTX-M}* (3/3) [Oberhettinger *et al.* 2020]

Ces TAAN, bien que permettant la détection rapide de marqueurs de résistance, sont généralement évalués sur leur capacité à identifier les pathogènes responsables de la bactériémie. De plus, sur le nombre d'hémocultures testées, une faible proportion contient des bactéries porteuses de gènes de résistance. Ainsi, leurs performances en termes de détection des résistances sont difficilement évaluables. Néanmoins elles ne semblent pas avoir été prises à défaut à ce jour avec des spécificités proches de 100% comme illustré précédemment. Pour ce

qui est de la sensibilité, certaines études ont recours à des hémocultures artificielles avec par exemple l'utilisation de souches de collections porteuses de *mecC* ou *vanB* et l'obtention d'une sensibilité de 100% sur 49 et 52 souches, respectivement pour l'ePlex® [Carroll *et al.* 2020].

2.4.7. Détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques en milieu gélosé (DRSA)

Alors même que la technique d'antibiogramme par diffusion commençait à être décrite, des diamètres de taille différente lors de temps d'incubation plus courts étaient déjà envisagés [Bauer *et al.* 1966]. Plusieurs méthodes ont été évaluées cette dernière décennie afin de proposer des résultats plus rapides.

L'une d'entre elles utilise des géloses particulières MHR-SIR dont la composition est maintenue secrète et a été adaptée pour permettre une lecture à des temps d'incubation raccourcis grâce à l'utilisation de l'automate du même fournisseur, le SIRscan 2000™ (Intelligence artificielle applications, i2a). Cette étuve intelligente gère l'incubation, la lecture et l'interprétation des diamètres de façon automatisée. A partir de 6h d'incubation et jusqu'à 8h d'incubation, des photographies sont prises toutes les 20 minutes jusqu'à l'obtention d'une interprétation pour chacun des disques. Bien que développée initialement pour la réalisation d'antibiogramme à partir d'urines, la technique a été adaptée aux hémocultures avec un taux de concordance de 97,7% pour 0,5% de VME, 0,4% de ME et 1,4% de mE par rapport à la méthode d'antibiogramme direct par diffusion à partir d'une dilution des flacons d'hémocultures positives pour les entérobactéries. Pour le staphylocoque doré, le taux de concordance observé lors de la même étude était de 97,8% avec 0,3% de VME, aucune ME et 1,9% de mE [Périllaud *et al.* 2018]. D'après Pilmis *et al.* 2019, l'utilisation de ces géloses a permis un gain de temps médian de 17h sur le rendu de l'antibiogramme après le signal de positivité de l'hémoculture. La médiane de délai d'adaptation thérapeutique étant à 7h (\pm 2h30) contre 24h pour la méthode conventionnelle. L'autre avantage de cette technique est son coût modéré de moins de 6\$ pour 16 antibiotiques testés. Cependant, cette méthode n'a pas réussi à montrer une amélioration

significative de la mortalité et ne fournit pas toujours de résultats à 8h, notamment pour *P. aeruginosa*. De plus, un taux de 21,7% d'incertitude a été rapporté quant à la catégorisation de *S. aureus* en tant que SAMS ou que SARM.



Figure 18. i2a SIRscan 2000™ - Intelligence artificielle applications [Source : <https://i2a-diagnostics.fr/nos-produits/instruments-solutions/incubateur-lecteur-dantibiogramme/sirscan-orion/> consultée le 26/09/2021]

D'autres méthodes de DRSA par diffusion ont été évaluées cette dernière décennie. Cependant, rares sont celles qui sont réalisables à partir du flacon d'hémoculture positive et qui produisent des résultats le même jour que le signal de positivité. L'une d'entre elles a été décrite par le CLSI [Chandrasekaran *et al.* 2018]. Elle évaluait notamment l'inoculation de gélose MH directement avec du bouillon d'hémoculture positive avec une incubation de seulement 6h. Au bout de cette incubation courte, 80,1% des géloses présentaient une pousse suffisante et 69,9% des résultats interprétables étaient en accord de catégorisation avec la méthode de référence.

Avec 2,3 et 11,8% de VME et ME, respectivement, les auteurs ont conclu à la nécessité de poursuivre l'adaptation et l'évaluation de cette méthode.

Enfin, une technique DRSA a été décrite par l'EUCAST (European Committee on antimicrobial susceptibility testing) en 2018, appelée RAST (rapid antibiotic susceptibility testing). Elle a été intégrée dans les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) en 2020. Elle est basée sur la méthode de diffusion en milieu gélosé de disques d'antibiotique, réalisé directement à partir du flacon d'hémoculture positif (entre 100 et 150µL sont étalés sur une ou plusieurs géloses). Des diamètres critiques ont été déterminés pour une lecture à des temps précoces (4, 6 et 8h) de panels restreints d'antibiotiques. Des panels sont disponibles pour 8 pathogènes. Sept d'entre eux sont habituellement isolés en cas de bactériémies : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et *Streptococcus pneumoniae*. Le dernier est un pathogène pour lequel des résistances sont régulièrement retrouvées : *Acinetobacter baumannii*. Ces panels sont limités avec entre 4 et 13 antibiotiques par espèce à ce jour mais ils ont déjà été réévalués et connaîtrons certainement de nouveaux ajouts dans les années futures. Ces temps ont été choisis afin de permettre un rendu de résultat précoce en soirée pour les hémocultures positives du matin et du début d'après-midi. La méthode a été développée et testée pour différents fournisseurs de flacons d'hémocultures, d'automates d'incubation, de disques d'ATB et de géloses. Une zone d'incertitude technique (ZIT) a été créée entre les diamètres interprétables comme sensible (S) ou sensible à forte exposition (I) et résistant (R). La ZIT (area of technical uncertainty, ATU) correspond à des valeurs pour lesquelles l'interprétation du résultat est impossible. Elle ne doit pas être confondue avec un résultat « I ».

Akerlund *et al.* ont évalué cette méthode dans une étude multicentrique dans 55 laboratoires européens sur plus de 1000 souches. Ils décrivent des taux de lecture de 88%, 96% et 99% à 4h, 6h et 8h, respectivement. Parmi les diamètres lisibles, 30%, 19% et 15% se situent dans la

ZIT, toujours selon les trois temps de lecture. Les taux d'erreur sont entre 2,4% et 4,9% à 4h, puis de 1,1% à 3,5% à 6h et enfin de 1,1% à 3,3% à 8h, avec des taux de VME inférieurs à 1,1% et des taux de ME inférieurs à 2,8% à chacun des temps [Akerlund *et al.* 2020]. Une étude allemande sur 894 souches n'a exploré qu'un seul temps de lecture mais rapporte des résultats comparables. En effet, les taux de ME et de VME sont de 1,4% et de 0,7%, respectivement [Jasuja *et al.* 2020].

En revanche cette méthodologie présente certains écueils rendant difficile son implémentation en routine dans les laboratoires de biologie médicale. Les difficultés du RAST sont liées à la fenêtre de lecture qui n'est que de +/- 5 min autour de chaque temps de lecture précoce (4h, 6h ou 8h). La positivité des hémocultures ayant lieu au fil de la journée, cette technique nécessite un suivi indépendant de chaque dossier ou une réalisation en série (retardant donc le rendu de certains résultats) dans le respect de cette fenêtre de lecture très courte. De plus, l'ouverture des étuves pendant l'incubation interfère avec la croissance bactérienne et doit être minimisée.

Au CHUGA, le département des agents infectieux est pourvu d'une chaîne automatisée BD Kiestra™ (Figure 19). Cette chaîne, composée de différents modules, offre de nombreuses possibilités. L'un des modules, l'inoqua™ est capable d'ensemencer des bouillons de culture et des géloses selon différents protocoles d'étalement. L'un d'entre eux correspond à la réalisation d'un tapis bactérien, idéal pour la réalisation d'un antibiogramme en diffusion. Le module ReadA™ compact est une étuve intelligente pouvant photographier les géloses de dessus avec différents éclairages, suivant une temporalité prédéfinie par l'opérateur avec une grande précision. Les géloses restent dans le circuit de la chaîne, sont photographiées et ré-incubées rapidement, ce qui limite l'impact sur la croissance bactérienne. De plus, il n'y a pas d'ouverture de l'étuve donc pas d'interférence sur les géloses incubées. Ces photographies sont ensuite accessibles via le logiciel dédié ReadABrowser™. Sur ce logiciel, les colonies peuvent être marquées, quantifiées et des diamètres d'inhibition peuvent être mesurés. De ce fait il nous

a semblé judicieux de mettre à profit la chaîne automatisée BD Kiestra™ afin de proposer une version automatisée du protocole RAST.



Figure 19. Chaîne automatisée BD Kiestra™ du CHUGA – source personnelle

TRAVAIL EXPERIMENTAL

L'objectif principal de cette thèse a été d'évaluer les performances d'une version automatisée de la méthodologie RAST de l'EUCAST. Cette méthodologie permet la détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques basé sur l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé directement à partir d'une hémoculture positive avec des temps d'incubation précoces de 4, 6 et 8h au lieu de 20 ± 4 h. Cependant, elle requiert de la rigueur quant au respect des temps de lecture. Pour pallier au côté astreignant de la méthode, nous avons tiré avantage de la chaîne BD Kiestra™ présente au laboratoire de bactériologie du CHUGA en créant un protocole d'incubation réalisant les photographies à heures précises sans la moindre intervention humaine. Dans l'optique d'automatiser autant que possible le processus de réalisation du RAST, nous avons évalué en parallèle les résultats générés après ensemencement manuel ou automatisé des géloses. L'ensemble du travail réalisé fait l'objet de l'article ci-dessous.

Automated reading of RAST results using laboratory automation and ReadABrowser™ software

Lionnel Bulin, Iyad Almahmoud, Thomas Girard, Matthieu Daragon, Yvan Caspar

Keywords: RAST, bloodstream infection, automation

Abstract

Introduction: Bloodstream infections (BSI) are the leading cause of sepsis, which is associated with an important morbi-mortality. Its prognosis is correlated with its rapid identification and introduction of appropriate antimicrobial therapy. The gold standard for BSI diagnostic is blood culture. Recently, EUCAST proposed the Rapid Antibiotic Susceptibility Testing (RAST) methodology from positive blood culture with zone diameter breakpoints defined after short incubation times (4h, 6h and 8h) for the rapid management of bloodstream infections. However, this protocol requires precise reading times (plus or minus 5 minutes) making it difficult to implement in a manual routine workflow. Solution can be brought by BD Kiestra™ laboratory automation and ReadACompact™ incubators. It allows automated reading of AST plates at precise time points and zone diameter measurement on the digital pictures of AST disk diffusion plates using ReadABrowser™ software.

Methods: We evaluated the performances of automated RAST compared to standard AST on all overnight positive blood cultures from July 2020 to February 2021. Species was identified by MALDI-TOF mass spectrometry performed on the pellet of 1 mL of positive blood culture using an in-house protocol. If the species identified was one of the eight species for which RAST breakpoints are defined, we performed manual and BD Inocula™ automated plating of Mueller-

Hinton agar medium and added antibiotic panels following RAST methodology. An automated picture of the plate was taken after 4h, 6h and 8h of incubation and inhibition diameters were adjusted manually using ReadABrowser™ software. If the inhibition zone was readable, the strains were categorized as S/ATU/R according to EUCAST RAST breakpoints (v2.1).

Results: RAST performances were evaluated for 158 clinical strains. Readability rates were 94.8%, 98.2% and 99.9% for *E. coli* strains (n = 65) with automated plating and 74.4%, 92.3% and 98.1% for *S. aureus* strains (n = 39) after 4h, 6h and 8h respectively using automated plating. Cefotaxime, ceftazidime, carbapenems, fluoroquinolones and cotrimoxazole displayed categorical agreement >95% after 6h of incubation for *E. coli*. while piperacillin-tazobactam and tobramycin were frequently classified in ATU. After 6h of incubation, error rates were >5% for ceftolozane-tazobactam (7.9%) and for piperacillin-tazobactam (15.0%). Regarding *S. aureus*, methicillin, gentamicin and fluoroquinolones displayed categorical agreement >95% also after 6h of incubation. Unacceptable ATU rate was evidenced for clindamycin (32.4%) even though no error were described.

Conclusion: Automated RAST evidenced promising performances after reduced incubation time (6h). Moreover, it could provide guidance to antimicrobial therapy during the same day of BC positivity.

Introduction

Bacteraemia represent a major public health issue worldwide. Their incidence is comprised between 113 and 204 per 100,000 inhabitants in Europe and Northern America [Kern *et al.* 2020] and are associated with an important morbi-mortality [Dantes *et al.* 2018, Rudd *et al.* 2020]. In most European and North American studies, *E. coli* is the most frequently isolated pathogen while *S. aureus* and *P. aeruginosa* are always in the top three with regard to mortality [Kern *et al.* 2020]. In North America, the annual number of sepsis cases is estimated about 1.7 million with 270,000 attributable deaths [Thomson *et al.* 2021] while in Europe, the total number of BSI episodes was

estimated about 1.2 million/year, with short-term (within 30 days) case-fatality rates of 13-20% [Goto *et al.* 2013]. Among those, more than 760,000 disability-adjusted life-years were allocated to infections with antibiotic-resistant bacteria in Europe during the year 2015, prompting to prioritise public health interventions for infectious diseases [Cassini *et al.* 2019]. In 2018, among *E. coli* invasive isolates, 15.1% showed resistance to third-generation cephalosporins with rates ranging from 6.8% in Norway to 38.7% in Bulgaria. Similarly, 16.4% of *S. aureus* invasive isolates evidenced methicillin-resistance with rates between 0.0% to 43.0%, from Iceland to Romania, respectively [ECDC]. While adequate and effective treatment of BSI is possible once the infection is documented, empirical treatment remains inappropriate in 10 to 40% of the patients [Alfandari *et al.* 2016]. In Netherlands, inappropriate empiric treatment was recently evidenced in 35.7% of BSI [Lambregts *et al.* 2020]. In a global retrospective cohort study concerning a neonatal and paediatric population, discordant empiric therapy occurred in 15,3% [Cook *et al.* 2021]. A French survey, SPA-BACT aiming at evaluating the impact of initial management of BSI estimated antibiotic therapy inadequate in 39% of the patients. This can be explained either by increasing antibiotic resistance rates, by insufficient spread of new treatment guidelines into clinical practice or by outbreaks of multidrug resistant bacteria in some regions or hospital settings [Martinez-Nadal *et al.* 2020; Plachouras *et al.* 2018].

While technologies have evolved, the gold standard for blood stream infection (BSI) diagnosis remains blood culture (BC). Thus, optimization of its management is one of the first action that can be taken to improve management of sepsis. One mean to reduce the detriment of sepsis is to reduce time to result of accurate antimicrobial susceptibility testing (AST), allowing shorter time to antibiotic adaptation that has been shown to improve prognosis, especially in septic shock [Weinberger *et al.* 2020]. In order to accelerate acquisition of phenotypic AST results in case of bacteraemia, EUCAST provided in 2018 a methodology for rapid antibiotic susceptibility testing (RAST) directly from positive blood cultures. The protocol is based on a disk diffusion method with breakpoints after reduced times of incubation (4, 6 or 8 hours) for 8 of the main relevant

pathogens responsible for BSI. This rapid methodology provides accurate susceptibility results as regards categorical agreement (CA) rates with an overall value evaluated to 97% [Jasuja *et al.* 2020]. However, it requires very precise reading times (plus or minus 5 minutes) and short re-incubation delays making it difficult to implement in a manual routine workflow. But solutions can now be brought by lab-automation.

We built an automated RAST protocol taking advantage of the BD Kiestra™ lab automation system allowing automated seeding and reading of AST agar plates at precise time points, along with digital zone diameter measurement using ReadABrowser™ software. Here, we present the performances of this automated RAST methodology.

Materials and methods

Sample selection

The study was conducted at Grenoble Alpes University Hospital (France) from July 2020 to April 2021. During this period, all isolates from patients with a positive blood culture (BC) overnight (from 23:00 to 8:00) showing a monomicrobial Gram stain indicating either Gram-negative bacilli or Gram-positive cocci were selected. Positive BC corresponded to anaerobic (BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F, BD), aerobic (BACTEC™ Plus Aerobic/F, BD) or paediatric (BACTEC™ Peds Plus/F, BD) BC bottles incubated in a BD BACTEC™ FX BC system (BD Life Sciences – Integrated Diagnostic Solutions, Sparks, MD, USA). As RAST is validated only for bloodstream infection, BC inoculated with other fluids than blood were excluded. RAST was performed only once per patient and per infectious episode. If anaerobic and aerobic bottles were positive for the same patient, an anaerobic bottle was used preferentially for practical reasons and because they were associated with better results regarding rapid identification [Ponderand *et al.* 2020]. After bacterial identification, only BC growing bacterial isolates for which RAST breakpoints are defined were further tested (*i.e.* *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,

Pseudomonas aeruginosa, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii*).

Contrived samples: quality control strains and ESBL-producing strains

Three different strains were used as quality controls (*E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *S. pneumoniae* ATCC 49619) for RAST methodology as recommended by EUCAST. QC were performed during the setup of the protocol. Thereafter, the same preservation material and conditions were used than for the routine protocol for which control were performed according to standard AST methodology. A 1/100,000 dilution of a 0.5 McFarland bacterial suspension was prepared and inoculated into a BC bottle (BACTEC™ Lytic/10 Anaerobic/F, BD), with 5mL of blood. To better evaluate the capacity of RAST method to detect resistance 3rd generation cephalosporin among *Enterobacteriaceae*, the same methodology was used to artificially spike a local collection of 47 ESBL-producing strains corresponding to ESBL-producing strains isolated from bacteraemia in 2018 at Grenoble University hospital. Spiked BC bottles were incubated in the BD BACTEC™ FX system until positivity and processed similarly to clinical positive blood cultures but without the identification step. We took advantages of 5-days remained negative patients' BC available at the laboratory for contrived samples, either ATCC controls or ESBL-carrying collection strains. These BC bottles were assumed as proper for this use as quality controls were consistent with EUCAST breakpoints. Bianco *et al.* [JHI 2020] also used clinical BC bottles that remained negative after 5 days of incubation and estimated that these bottles “*closely mirror clinical routine*”.

Bacterial identification

Rapid bacterial identification was obtained using a common *in-house* rapid identification protocol previously described [Jakovljević *et al.* 2015]. In brief, one mL of BC was put in a sterile Eppendorf and 200µL of 5% saponin solution were added before vortexing. A first centrifugation step was

performed for 2 minutes at 13,000 rpm. Supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in 1 mL of sterile water. A second centrifugation was run with the same settings and supernatant was discarded once again. Bacterial identification by matrix-assisted laser desorption ionisation – time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was performed on the bacterial pellet after addition of formic acid. Spectra were acquired on a Microflex LT instrument (Bruker Daltonics) and analysed using MALDI Biotyper™ Compass IVD 4.2 software (v.90) with IVD database (v9, 8326 MSPs). All identifications were confirmed the next day by MALDI-TOF MS performed on colonies after subculture of positive BC on Columbia agar media (bioMérieux) incubated 14h at 37°C under a 5%-CO₂ atmosphere into BD Kiestra™ ReadA Compact incubators (standard of care).

Automated RAST methodology

We compared performances of both manually versus automatically inoculated AST agar plates followed by automated digital reading of all the plates. We followed EUCAST's RAST methodology. In brief, an aliquot of the positive BC was transferred in a dry blood collection tube (BD Vacutainer) before inoculation of 90mm round Mueller-Hinton E or F agar plates (MHE or MH-F, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), depending on the identified species (MH-F for *Streptococcus pneumoniae*, MHE for the 7 other species). Manual inoculation was performed by plating 110 µL of BC broth followed by swabbing the plate in a 3-axis direction. Starting from the same vacutainer tube, automated inoculation was processed using the “fully automatic” mode of BD Kiestra™ Inoqula lab automation system that automatically spread 110 µL of BC broth over the agar surface using magnetic bead technology and a circular pattern available in the Inoqula system (pattern N°1). Antibiotic disks (Bio-Rad, France) were then dropped manually using dispensers on each AST agar plates according to the panel defined for each species by the RAST methodology (v2.1). Gentamicin was excluded of *E. coli* and *K. pneumoniae* panel. Ceftazidime-avibactam was not integrated into panels since we had no disk supplier at that time. Plates were

then incubated within Kiestra™ ReadA Compact incubators at 35°C under ambient atmosphere for MHE agar plates and with 5%CO₂ enrichment for MH-F agar plates with automatic imaging of the plates after 4, 6 and 8 hours. If inhibition diameters were readable, they were measured and adjusted manually on digital pictures of the plates using the Image Viewer and the Select Zone option of the Kiestra™ ReadA Browser.

AST reference method

Reference AST method consisted in disk diffusion method performed directly from positive BC following CASFM-EUCAST guidelines [CA-SFM/EUCAST 2020 v1.1]. Square MHE or MH-F agar plates were inoculated with positive BC broth diluted 1/50 for Gram-positive cocci in clusters (GPCC) and Gram-negative bacilli (GNB) and 1/5 for Gram-positive cocci in pairs or chains (GPPC). Antibiotic disks (BioRad) were applied in accordance with CASFM-EUCAST panels (Supplemental Table 1) for either *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* or *Streptococcus* based on Gram stain results. Agar plates were incubated in non-automated incubators at 35°C under ambient atmosphere for MHE agar plates and with 5%CO₂ enrichment for MH-F agar plates. Inhibition diameters were read after 20h +/- 4h of incubation using Adagio system (BioRad). If the identified bacterium was a *Staphylococcus* sp or if bacterial layer was not confluent or if confirmation of AST results were required, a second automated broth microdilution antibiogram could be run the next day on isolated colonies (BD Phoenix™, Becton Dickinson).

Data interpretation

The percentage of readable inhibition zone at 4,6 and 8h of incubation was determined for all species/agent combination. If readable, RAST diameters were interpreted according to RAST breakpoints (v2.1) and reference AST results according to CASFM-EUCAST breakpoints (2020 v1.1 from July 2020 to October 2020 then v1.2). Readable AST results were categorized as susceptible (S), susceptible to high exposure (I), resistant (R) or within the area of technical

uncertainty (ATU). RAST results were compared to routine AST reference method and expressed as % of categorical agreement. Discordant results were stratified as a very major error (VME) if the RAST result was categorised S but was R by reference method, as a major error (ME) if the RAST result was categorised R but was S by reference method and as minor errors (mE) for other discordances. Results in the ATU were excluded discordant results stratification since no categorization was performed. According to both FDA (Food and Drug Administration) and CLSI (Clinical laboratory standard institute) criteria of methodology validation, CA have to be $\geq 90\%$, and error rates have to be $\leq 3\%$ for ME and $\leq 1.5\%$ for VME.

Mc Nemar test (paired Chi² test) was used to compare reading rates after manual and automated plating (*p*-value cut-off of 0,05 for statistical significance).

Results

Study specimens overview

During the 10-month study period, positive BC which met the inclusion criteria underwent bacterial identification by rapid MS methodology. Those showing polymicrobial Gram stain or corresponding to other biological samples incubated in blood culture bottles or identified as species for which no RAST breakpoints were available, were consequently excluded from the study. Eventually, RAST was performed for 158 clinical strains (Table 1). *E. coli* was the predominant species (*n* = 66) while the lowest number of isolates tested corresponded to *S. pneumoniae* with only 5 isolates included during the study period. Overall, 89 Gram-negative bacterial isolates and 69 Gram-positive isolates were analysed. Among those 2/39 (5.1%) *S. aureus* isolates were resistant to methicillin. Among *Enterobacteriaceae* strains, only 3.0% were resistant to third generation cephalosporins (3GC), 2 by production of an ESBL and none by hyperproduction of constitutive or acquired cephalosporinase. To evaluate RAST performances regarding ESBL-producing strains and because ESBL-producing *Enterobacteriaceae* level is low in our hospital setting (*i.e.*: 10.6% in 2019), we enriched our study with spiked blood cultures for

47 ESBL-carrying strains corresponding to almost all ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains isolated from blood culture in our hospital in 2018 (with known resistance phenotypes and whole genome data available for all strains) (Table 1).

Reading rates

In total, the percentage and ranges between species of readable RAST inhibition zones after 4, 6 and 8 h of incubation was 90.9% (70.5%-100%), 97.2% (86.1%-100%) and 99.6% (96.3%-100%), respectively (Table 2). More than 90% of inhibition diameters could be read for *E. coli* after only 4h of incubation (94.8%) (Table 3). Reading rates >90% at 4h were also obtained after automated plating for *K. pneumoniae* (100%), *E. faecium* (100%) and *S. pneumoniae* (96%) but with a lower number of samples analysed. However, reading rates at 4h were lower after both automated and manual plating for *S. aureus* (74,4% vs. 70,5%) and *E. faecalis* (83.5% vs 79.7%). As regards readability, no obvious difference could be evidenced between automated and manual plating, except for *E. faecium* isolates for which automated plating provided a 100% readability thus showing a 22.2% ($p = 0.005$) higher reading rate than after manual plating. For *S. aureus*, automated plating showed a better readability rate after 4h of incubation (74.4% vs. 70.5%, $p = 0.014$) but a lower rate after 6h of incubation (92.3% vs. 94.9%, $p = 0.046$), compared to manual plating (Table 4). No other statistically significant difference was observed.

Analysis of RAST results compared to reference method

Categorical agreement of RAST with conventional AST method varied between 83,3% to 100% depending on reading times and species. They were usually over 95% except for *P. aeruginosa* and *E. faecalis* with a global trend to higher categorical agreement rates when reading time increased. When looking deeper into each bug/antibiotic combination, as regards *E. coli* strains, cefotaxime, ceftazidime, carbapenems, fluoroquinolones and cotrimoxazole displayed categorical agreement (CA) >95% after 4, 6 and 8h while piperacillin-tazobactam was below 95% categorical

agreement at 6 and 8h (Table 3). Moreover piperacillin-tazobactam, ceftolozane/tazobactam, tobramycin and amikacin were frequently classified in ATU (over 25% of the strains at 4, 6 and 8h). The higher error rates were observed for ceftolozane-tazobactam (7.9% at 4h), tobramycin (10% at 6h) and for piperacillin-tazobactam (15.0% at 6h; 12% at 8h) (Table 3). Similar trends were observed for ESBL-producing *E. coli* strains with high ATU rates for piperacillin-tazobactam, ceftolozane/tazobactam, tobramycin and amikacin but associated to a lower rate of categorical agreement for piperacillin-tazobactam, ceftazidime, ceftolozane/tazobactam and amikacin especially after automated inoculation, reaching unacceptable levels.

Regarding *S. aureus*, methicillin, gentamicin and fluoroquinolones displayed categorical agreement >95% also after 6h of incubation. Cefoxitin displayed major error rate at 4h of 6,7% after automated plating and 3,8% after manual plating, being over recommended limit to validate the method at 4h. Moreover, high ATU rates were evidenced for clindamycin and ATU rates unexpectedly increased over time for gentamicin.

Results for other species and for spiked ESBL-producing strains are available in supplementary data (Tables S3 to S9). Overall, results in the ATU were found in a stable proportion over time for clinical strains, 17.7%, 18.5% and 16.8% at 4h, 6h and 8h of incubation, respectively. As regards ESBL-carrying collection strains, ATU proportion decreased with 17.4%, 15.7% and 13.9% rates for the same incubation times.

Discussion

Antibiotic stewardship of positive blood culture has proved its efficacy to reduce time for effective and/or optimized antibiotic treatment of BSIs resulting in a reduced mortality [Patel *et al.* 2016]. Rapid testing methods that helps to reduce the delay for antibiotic adaptation are mainly innovative laboratory protocols or technologies that allow to provide quicker identification and/or AST results [Dubourg *et al.* 2018, Lamy *et al.* 2020]. Increasing antibiotic resistance represents a worldwide public health threat. If available, reduced time to report presence or absence of resistance

mechanism are today mainly provided by rapid multiplex PCR assays detecting known resistance genes with high clinical impact (*i.e.*: *mecA*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA-48}*, ...) and by rapid phenotypic assays performed on colonies after short incubation or on the bacterial pellet after rapid identification protocol by MALDI-TOF MS. For example, BioFire FilmArray™ multiplex PCR system is able to detect 25 bacterial genera or species and 3 antimicrobial resistance (AMR) related genes (*mecA*, *vanA/vanB* and *bla_{KPC}*) in only 1h with sensitivity and specificity over 97% [Oberhettinger *et al.* 2020]. GenMark ePlex® system provides 2 panels for identification of GP and GN bacteria in positive blood culture (BCID panels) performed after Gram stain. BCID-GN and BCID-GP are able to identify 21 and 20 bacterial genera or species with 6 (*bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* and *bla_{IMP}*) and 4 (*mecA*, *mecC*, *vanA* and *vanB*) AMR associated genes, respectively, in 1.5 hour and 100% sensibility and specificity [Oberhettinger *et al.* 2020, Huang *et al.* 2019, Bryant *et al.* 2020]. Similarly, rapid phenotypic assays are able to quickly detect AMR of major concern in BSI. For instance, PBP2a *S. aureus* culture colony test (SACCT, Alere) has shown 100% sensitivity and specificity after short incubation time of subculture for 4 to 6h [Kolesnik-Goldmann *et al.* 2021]. β-LACTA™ and β-CARBA™ tests (BioRad) require less incubation time (from 15 to 45 minutes) and exhibit similar performances regarding ESBL (96% sensitivity and 100% specificity) and carbapenemase (100% sensitivity and 95.1% specificity) activity detection directly from positive BC [Walewski *et al.* 2015, Meier *et* Hamprecht 2019].

Rapid determination of the susceptibility of the bacteria to precise antibiotic molecules has also been previously attempted by various methods such as video-microscopy (Accelerate Diagnostics PhenoTest®), AST performed on colonies after short incubation or on the bacterial pellet after rapid identification protocol by MALDI-TOF MS (MBT STAR-tests, Bruker Daltonics) or by reading of zone diameters after shorter incubation periods . One protocol that has some similarities with RAST methodology has been largely developed by i2a company using proprietary MHR-SIR specific plates and SIRscan 2000™ system for early detection of bacterial growth with CA compared to conventional method of 97.7%, 0.4%, 0.5% and 1.4% of VME, ME and mE,

respectively. However, with this approach, interpretation of zone diameters measured after 6h is performed using the general EUCAST breakpoints after 20h incubation [Périllaud *et al.* 2018]. Nevertheless, these techniques are either costly (multiplex PCR assays, PhenoTest®) and/or limited to the detection of a few resistance mechanisms (PCR, colorimetry, immunochromatography) and/or limited to genotypic characterisation and/or require important technical intervention, time and skills (MBT STAR-BL, modified carbapenem inactivation methods) and/or are restricted to proprietary reagents from only one supplier [Vasala *et al.* 2020, Lee *et al.* 2018, Meier *et al.* 2019].

As regards clinical and economic benefits rapid multiplex molecular test have been shown to encompass reduction in length of stay (LOS) and improvements regarding antimicrobial therapy leading to reduced mortality (Odds Ratio = 0,66; 95% confidence interval, 0.54-0.80) [Timbrook *et al.* 2016]. Their own cost seems a limitation, but is more than offset by the cost savings they generate when analysing the whole hospitalization costs of the patients [Pardo *et al.* 2016].

Thus, we can easily assume that a clinical and economic benefit could be obtained with RAST methodology even if the final report is more likely to be available within 8h than in only 2h as it will provide phenotypic results for specific antibiotics and not only detection of resistance mechanisms.

Indeed, development of rapid identification after short subcultures has shown that a visible biomass can be obtain in 4 to 8h for fast-growing bacteria representing the majority of pathogens identified in BSI. This led to the development of a low-cost phenotypic RAST protocol using the standardised, widely used and already available disk diffusion method for the determination of breakpoints after only 4, 6 or 8h of incubation, allowing to provide AST results the day of BC positivity. Herein, we took advantages of BD Kiestra™ lab automation system to evaluate the performances of an automated version of EUCAST RAST protocol in order to meet timeframe enforcement of only 10 minutes to evaluate inhibition areas at the given time points. In total, RAST was performed for 158 clinical strains. The readability proportion increased overtime to reach a

>90% readability for all species but one (*E. faecalis*: 86.1%) at 6h and almost a 100% readability for all species at 8h. These increasing reading rates reaching 99.9% readability have already been described [Akerlund *et al.* 2020]. More modest reading rates at 6h (about 86%) have also been reported [Thompson *et al.* 2021]. However, readability of an inhibition diameter does not always correspond to an interpretable result. Within the Area of Technical Uncertainty (ATU), EUCAST recommends not to attempt any interpretation. ATU results were frequent for piperacillin/tazobactam (PTZ) (20% to 68,8% between species and reading times) in GNB and for aminoglycosides (7,7% to 68,8%) in Enterobacterales. Concerning PTZ, ATU rates were up to 68.8%, 38.5% and 50.0% for *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, respectively, as it has already been described in an important multicentric study (from 37.2% to 43.3%) [Jasuja *et al.* 2020]. In general, ATU rates seemed to be lower after manual plating compared to automated plating. When analysing all antibiotics together for a particular species, very major errors were below the 1,5% threshold except for *E. faecium* (Table 2) while major errors were usually below 3% except for *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. faecium*. Similar VME and ME rates were found elsewhere [Akerlund *et al.* 2020]. Minor errors were only observed for *P. aeruginosa* strains. However, CA rates for each drug/bug combination did not meet the FDA criterion of being > 90% [Humphries *et al.* 2017]. It was globally over 98.7% at the 3 time points for *E. coli* strains but only > 90% for cefotaxime, ceftazidime, imipenem, meropenem, levofloxacin, amikacin and cotrimoxazole after 6h of incubation using automated plating. Overall, longer incubation times were correlated to lower error proportions with 3.7% at 4h, 3.1% at 6h and 2.0% at 8h. ME was the main type of error. The other two types of error, *i.e.* VME and mE being rare and stable over time.

Concerning ESBL-producing strains, performances were globally comparable to those of clinical strains in terms of reading rates and ATU proportion. Interestingly, RAST was able to detect all ESBL-producing strains (47/47) using the clinical breakpoints for cefotaxime. Strikingly, among the clinical strains, cefotaxime screening failed to identify one of the two ESBL-producing strains

after 4h of incubation. Nevertheless, this strain was categorized as resistant to cefotaxime after 6h and 8h of incubation. Conversely, using ceftazidime clinical breakpoints, RAST detected 95.7% (45/47) of ESBL-carrying strains, missing 1 *E. coli* and 1 *K. pneumoniae* even after 8h of incubation. The superiority of cefotaxime over ceftazidime for ESBL detection have also already been described but for another principle of detection [Lee *et al.* 2018]. For ESBL-producing strains and error rates, the same tendencies than with 3GC susceptible strains were observed with decreasing ME rates of 3.1%, 1.8% and 1.3% at 4h, 6h and 8h, respectively. However, when detailed by antibiotic, categorical agreement for piperacillin-tazobactam, ceftazidime, ceftolozane/tazobactam and amikacin especially after automated inoculation were reduced compared to 3GC susceptible strains, reaching unacceptable levels.

To summarize, although RAST protocol is unable to generate a report after 4h of incubation due to non-neglectable ATU and error rates, results are reliable after 6h of incubation and this time point still is within the span of a standard working day and allows EUCAST RAST to match the definition of a rapid AST (results available in ≤ 8 h) [Idelevich *et al.* 2019]. RAST protocol relies on BC positivity that can take hours to days. New strategies are emerging for usage directly on whole blood samples. According to definitions, nucleic acids amplification tests (NAATs) are ultra-rapid AST (results available in ≤ 4 h) [Idelevich *et al.* 2019]. Unfortunately, it often comes with pricey devices for data acquisition and/or handling, and sometimes require a certain level of expertise for interpretation. Although not being based on the most rapid and innovative technologies currently available for BSI diagnosis, RAST is the most accessible concerning affordability, availability of consumables and diversity of manufacturers while being potentially able to detect any phenotypic resistance. Besides, it is among the rare ones to provide a phenotypic AST for several antibiotics at the same time, hence reducing its acquisition from about 1 day to less than 8h using the 6h reading time point. An automated RAST protocol has previously been investigated by Jasuja *et al.* and Thompson *et al.* who also considered RAST limitations as

preventable with the use of TLA. In a not so far future, handling of a positive blood culture bottle could be fully automated.

Importantly, it is necessary to remind that an antimicrobial stewardship program (ASP) should be associated to this rapid diagnostic method to reach optimal clinical benefit. Each of the previously mentioned rapid methods have shown palpable improvement in BSI management but the benefit of such methods is more obvious when operated 24/7 with direct notification to physicians in addition to ASP advices [Timbrook *et al.* 2017, Perillaud *et al.* 2018]. ASP and rapid AST protocols benefits are expected to be clearer with a 24/7 functioning [Jonasson *et al.* 2020]. Unfortunately, among 209 laboratories in 25 European countries, only 4.7% report 24h/day identification and AST results of BSI [Idelevich *et al.* 2019]. Several studies evidenced inadequate empiric antibiotic treatment (IEAT) unfortunately associated with a rise in 1-month case fatality [Marquet *et al.* 2015]. Indeed, the SPA-BACT survey described IEAT rates of 39% [Robineau *et al.* 2018]. RAST methodology will help to accelerate antibiotic readaptation if inadequate. Comparably, i2a SIRscan2000™ with its MHR disk diffusion methodology provides AST results for 16 antibiotic drugs in about 7h with a cost of only \$6 (United-States Dollars) and a time gain of approximately 11h on AST report ($7\text{h} \pm 2\text{h}30$ vs. $18\text{h} \pm 3\text{h}40$) compared to direct disk diffusion AST from BC dilution [Pilmis *et al.* 2019]. More drug/bug associations in EUCAST RAST protocol are anticipated to allow faster escalation or de-escalation of antibiotic treatment and this ability to obtain phenotypic AST for several antibiotics at the same time is a real benefit over other rapid AST methods in that way.

Finally, our study had some limitations. Only 158 clinical strains were included and low number of included isolated for some species prevent us from drawing any conclusion as regards automated RAST performances for these species. Moreover, as results were not transmitted to clinicians, the gain in the delay for AST report, and in term of reduction of hospitalization costs were not evaluated. Nevertheless, numerous studies showed the benefits as regards clinical

outcome, time gain, cost savings and reduced time to results that rapid AST could generate through reduction of complementary analysis and shorter LOS [Jorgensen *et al.* 2009].

In conclusion, automated RAST evidenced promising performances starting from a reduced incubation time of 6h. Categorical agreement and error rates not being below VME and ME thresholds for all drug/bug combinations, we suggest to test in clinical practice only combinations that met the criteria so far and to try to reduce the ATU zone of the other ones and to further investigate and validate breakpoints for other species. Automated RAST protocol is able to provide guidance for antimicrobial therapy re-adaptation within the same day of BC positivity.

Table 1. Bacterial strain distribution and characteristics

Bacterial species (n, %)	Resistance mechanism
Clinical strains: 158	
- <i>E. coli</i> : 66 (41.8%)	- Penicillinase: 24 (36.4%); ESBL: 2 (3.0%)
- <i>K. pneumoniae</i> : 13 (8.2%)	- Penicillinase HL: 1 (7.7%); SHV-1 hyperproduction: 1 (7.7%); ESBL: 6 (46.2%)
- <i>P. aeruginosa</i> : 10 (6.3%)	- Impermeability-related carbapenem resistance: 1 (10%)
- <i>S. aureus</i> : 39 (24.7%)	- MRSA: 2 (5.1%)
- <i>E. faecalis</i> : 16 (10.1%)	
- <i>E. faecium</i> : 9 (5.7%)	
- <i>S. pneumoniae</i> : 5 (3.1%)	
Spiked strains: 47	
- <i>E. coli</i> : 27 (57%)	- CTX-M-15: 11 (40.7%); CTX-M-14: 5 (18.5%); CTX-M-14+TEM-104: 1 (3.7%); CTX-M-27: 5 (18.5%); CTX-M-1: 2 (7.4%); CTX-M-3: 1 (3.7%); CTX-M-9: 1 (3.7%); SHV-12: 1 (3.7%)
- <i>K. pneumoniae</i> : 20 (43%)	- CTX-M-15: 7 (35%); CTX-M-15+SHV-28: 7 (35%); CTX-M-15+SHV-27: 1 (5%); CTX-M-14+SHV-99: 1 (5%); CTX-M-3: 1 (5%); Inconclusive: 3 (15%)

Table 2. Proportions of readable and interpreted antibiograms on digital images at 4, 6 and 8 hours of incubation after automated (Auto) or manual plating with error rates by species and by timepoint for the clinical strains

	<i>E. coli</i> (n=66)		<i>K. pneumoniae</i> (n=13)		<i>P. aeruginosa</i> (n=10)		<i>S. aureus</i> (n=39)		<i>E. faecalis</i> (n=16)		<i>E. faecium</i> (n=9)		<i>S. pneumoniae</i> (n=5)	
	Auto	Manual	Auto	Manual	Auto	Manual	Auto	Manual	Auto	Manual	Auto	Manual	Auto	Manual
4h: (%) Readable	94.8	93.3	100	100	-	-	74.4	70.5	83.5	79.7	100	77.8	96.0	96.0
ATU	21.4	14.3	16.8	11.2	-	-	13.8	9.1	34.8	33.3	22.2	28.6	0.0	16.7
S	72.2	80.0	59.4	68.0	-	-	78.5	85.4	26.4	35.8	11.1	17.9	87.5	75.7
R	6.4	5.7	23.8	20.8	-	-	7.7	5.5	17.1	9.7	66.7	53.6	12.5	7.6
6h: (%) Readable	98.2	97.9	100	100	100	100	92.3	94.9	86.1	86.1	100	100	100	100
ATU	23.2	9.8	13.3	9.1	18.4	13.3	20.8	12.2	39.7	26.5	37.8	28.9	12.0	12.0
S	69.0	84.0	62.8	69.3	28.2	30.3	68.1	83.1	30.2	46.5	8.9	17.8	80.0	80.0
R	7.8	6.2	23.9	21.6	21.1	24.2	11.1	4.7	9.0	6.0	53.3	53.3	8.0	8.0
8h: (%) Readable	99.9	99.9	100	100	100	100	98.1	99.4	96.3	98.8	100	100	100	100
ATU	18.6	9.1	14.7	11.9	11.2	16.3	20.3	9.0	39.0	25.3	35.6	35.6	12.0	0.0
S	74.0	84.3	60.4	66.4	31.3	35.9	68.8	85.2	31.8	50.2	11.1	15.5	80.0	92.0
R	7.4	6.6	24.9	21.7	21.2	23.9	10.9	5.8	7.9	3.9	53.3	48.9	8.0	8.0
4h: (%) VME	0.1	0.1	0.0	0.7	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.2	0.0
ME	0.9	0.7	0.0	0.0	-	-	3.4	2.7	16.7	9.5	2.8	3.6	0.0	8.3
mE	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6h: (%) VME	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	4.0
ME	1.3	0.6	0.7	0.0	1.0	1.0	4.9	0.7	8.8	5.9	4.4	4.4	0.0	0.0
mE	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	7.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8h: (%) VME	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0	4.0
ME	1.0	0.7	1.4	0.0	0.0	1.0	3.9	1.9	6.5	2.5	4.4	0.0	0.0	0.0
mE	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Table 3. Automated RAST performances using automated (top) or manual (bottom) plating for *E. coli* clinical strains (n=66)

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Piperacillin-tazobactam	30-6	92,3	66,7	100,0		98,5	68,8	85,0	15,0	100	61,5	88,0	12,0
Cefotaxime	5	93,8	3,3	98,3	1,7	96,9	1,6	100,0		98,5	1,6	100,0	
Ceftazidime	10	95,4	22,6	100,0		98,5	3,1	100,0		100,0	1,5	100,0	
Ceftolozane-tazobactam	30-10	92,3	25,0	91,1	8,9	96,9	38,1	92,1	7,9	100,0	30,8	95,5	4,5
Imipenem	10	96,9	3,2	100,0		98,5		100,0		100,0		100,0	
Meropenem	10	96,9	4,8	100,0		98,5	1,6	100,0		100,0	1,5	100,0	
Ciprofloxacin	5	95,4	1,6	98,4	1,6	98,5	10,9	98,2	1,8	100,0	10,8	98,3	1,7
Levofloxacin	5	95,4	3,2	100,0		98,5	9,4	100,0		100,0	3,1	100,0	
Amikacin	30	95,4	62,9	95,7	4,3	98,5	53,1	100,0		100,0	29,2	100,0	
Tobramycin	10	95,4	43,5	100,0		98,5	68,8	90,0	10,0	100,0	64,6	95,7	4,3
Cotrimoxazole	1.25-23.75	95,4		100,0		98,5		100,0		100,0		100,0	

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Piperacillin-tazobactam	30-6	89,4	64,4	95,2	4,8	97,0	31,3	93,2	6,8	100,0	28,8	93,6	6,4
Cefotaxime	5	92,4	1,6	98,3	1,7	97,0		100,0		100,0		100,0	
Ceftazidime	10	92,4	11,5	100,0		97,0	1,6	100,0		100,0		100,0	
Ceftolozane-tazobactam	30-10	93,9	25,8	93,3	6,7	98,5	10,8	100,0		100,0	9,1	100,0	
Imipenem	10	93,9	1,6	100,0		97,0	1,6	100,0		100,0	1,5	100,0	
Meropenem	10	95,5	3,2	100,0		97,0		100,0		100,0		100,0	
Ciprofloxacin	5	93,9	1,6	98,4	1,6	98,5	6,2	98,4	1,6	100,0	6,1	98,4	1,6
Levofloxacin	5	93,9	3,2	100,0		98,5	4,6	100,0		100,0	3,0	100,0	
Amikacin	30	93,9	25,8	100,0		100,0	16,7	100,0		100,0	18,2	100,0	
Tobramycin	10	93,9	21,0	100,0		100,0	34,8	100,0		100,0	33,3	97,7	2,3
Cotrimoxazole	1.25-23.75	92,4		100,0		97,0		100,0		95,8		100,0	

Table 4. Automated RAST performances using automated (top) or manual (bottom) plating for *S. aureus* clinical strains (n=39)

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Cefoxitin (screen)	30	76,9		93,3	6,7	94,9	2,7	97,2	2,8	100,0	2,6	100,0	
Norfloxacin (screen)	10	66,7	23,1	100,0		89,7	5,7	87,5	12,5	100,0	7,7	88,6	11,4
Gentamicin	10	74,4	13,8	92,0	8,0	92,3	16,7	100,0		94,9	24,3	96,4	3,6
Clindamycin	2	79,5	19,4	100,0		92,3	58,3	86,7	13,3	97,4	47,4	95,0	5,0

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Cefoxitin (screen)	30	74,4	10,3	96,2	3,8	94,9	2,7	100,0		100,0		100,0	
Norfloxacin (screen)	10	64,1	16,0	100,0		94,9	5,4	100,0		97,4		94,7	5,3
Gentamicin	10	71,8	7,1	92,3	7,7	94,9	8,1	97,1	2,9	100,0	15,4	97,0	3,0
Clindamycin	2	71,8	3,6	100,0		94,9	32,4	100,0		100,0	20,5	100,0	

Supp table 1. AST panels per species for the disk diffusion reference method

<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
Ampicillin	Penicillin G	Oxacillin (screen)
Amoxicillin/Clav	Cefoxitine (screen)	Penicillin G (screen)
Ticarcillin	Ceftarolin	Gentamicin HL
Ticarcillin/Clav	Kanamycin	Tetracyclin
Piperacillin/Clav	Tobramycin	Erythromycin
Cefalexine	Gentamicin	Clindamycin
Cefoxitine	Tetracyclin	Pristinamycin
Cefotaxime	Tigecyclin	Vancomycin
Ceftazidime	Erythromycin	Rifampicin
Ceftriaxone	Clindamycin	Cotrimoxazole
Cefepime	Quinu/Dalfopristin	Linezolid
Temocillin	Rifampicin	Norfloxacin (screen)
Ertapenem	Cotrimoxazole	Moxifloxacin
Imipenem	Norfloxacin (screen)	Levofloxacin
Gentamicin	Ofloxacin	Nitrofurantoin
Tobramycin	Fusidic acid	
Amikacin		
Cotrimoxazole		
Nalidixic ac		
Norfloxacin		
Ciprofloxacin		
Fosfomycin		

Supp table 2. Proportions of readable and interpreted tests on digital images at 4, 6 and 8 hours of incubation after automated (Auto) or manual plating with error rates by species and by timepoint for the ESBL-producing strains

		<i>E. coli</i> (n=27)		<i>K. pneumoniae</i> (n=20)	
		Auto	Manual	Auto	Manual
4h: (%)	Readable	98.3	96.3	100.0	100.0
	ATU	19.2	17.1	18.6	14.5
	S	48.2	53.6	34.1	41.6
	R	32.6	29.3	47.3	43.9
6h: (%)	Readable	100.0	98.0	100.0	100.0
	ATU	22.9	10.7	18.2	10.0
	S	45.5	59.7	33.6	45
	R	31.6	29.6	48.2	45
8h: (%)	Readable	100.0	100.0	100.0	100.0
	ATU	19.5	7.7	16.8	11.4
	S	48.9	62.3	34.3	43.4
	R	31.6	30.0	48.9	45.2
4h: (%)	VME	0.3	1.4	0.0	0.5
	ME	5.1	2.1	2.7	2.3
	mE	0.3	0.0	0.9	1.4
6h: (%)	VME	0.3	0.7	0.0	1.4
	ME	2.4	1.0	2.3	1.8
	mE	0.7	0.0	0.9	1.8
8h: (%)	VME	0.7	1.0	0.0	0.9
	ME	2.4	1.3	0.5	0.5
	mE	0.7	0.3	1.8	1.8

Supp table 3. Automated RAST performances using automated (top) or manual (bottom) plating for *K. pneumoniae* clinical strains (n=13)

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Piperacillin-tazobactam	30-6	100	38,5	100,0		100	38,5	100,0		100	38,5	100,0	
Cefotaxime	5	100	7,7	100,0		100		92,3	7,7	100		92,3	7,7
Ceftazidime	10	100		100,0		100		100,0		100		100,0	
Ceftolozane-tazobactam	30-10	100	45,5	100,0		100	36,4	100,0		100	45,5	92,3	7,7
Imipenem	10	100		100,0		100		100,0		100		100,0	
Meropenem	10	100		100,0		100		100,0		100		100,0	
Ciprofloxacin	5	100	38,5	100,0		100	23,1	100,0		100	30,8	100,0	
Levofloxacin	5	100	23,1	100,0		100	30,8	100,0		100	23,1	100,0	
Amikacin	30	100	23,1	100,0		100	7,7	100,0		100	23,1	100,0	
Tobramycin	10	100	15,4	100,0		100	15,4	100,0		100	7,7	100,0	
Cotrimoxazole	1.25-23.75	100		100,0		100		100,0		100		100,0	

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Piperacillin-tazobactam	30-6	100	23,1	92,3	7,7	100	23,1	92,3	7,7	100	30,8	100,0	
Cefotaxime	5	100		100,0		100	7,7	100,0		100	7,7	100,0	
Ceftazidime	10	100	15,4	100,0		100		100,0		100		100,0	
Ceftolozane-tazobactam	30-10	100	10,0	100,0		100	10,0	100,0		100	20,0	100,0	
Imipenem	10	100		100,0		100		100,0		100		100,0	
Meropenem	10	100		100,0		100		100,0		100		100,0	
Ciprofloxacin	5	100	30,8	100,0		100	15,4	100,0		100	23,1	100,0	
Levofloxacin	5	100	30,8	100,0		100	30,8	100,0		100	30,8	100,0	
Amikacin	30	100	7,7	100,0		100	7,7	100,0		100	15,4	100,0	
Tobramycin	10	100	7,7	100,0		100	7,7	100,0		100	7,7	100,0	
Cotrimoxazole	1.25-23.75	100		100,0		100		100,0		100		100,0	

Supp table 4. Automated RAST performances using automated (top) or manual (bottom) plating for *E. faecalis* clinical strains (n=16)

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Ampicillin	2	87,5		100		87,5		100		100		100	
Imipenem	10	87,5		100		87,5		100		100		100	
Vancomycin	5	87,5	100,0			87,5	100,0			100	100,0		
Linezolid	10	68,8	63,6	75,0	25	81,3	76,9	100,0		87,5	64,3	100,0	
Gentamicin HL	30	81,3	23,1		100,0	81,3	30,8	33,3	66,7	93,8	40	44,4	55,6

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Ampicillin	2	87,5		100		87,5		100		100		100	
Imipenem	10	81,3		100		87,5		100		100		100	
Vancomycin	5	81,3	100,0			87,5	100,0			100	100,0		
Linezolid	10	68,8	36,4	100,0		81,3	30,8	100,0		100	12,5	100,0	
Gentamicin HL	30	75	41,7	14,3	85,7	81,3	7,7	61,5	30,8	93,8	20	83,3	16,7

Supp table 5. Automated RAST performances using automated (top) or manual (bottom) plating for *E. faecium* clinical strains (n=9)

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Ampicillin	2	100,0		100,0		100,0		9,0		100,0		100,0	
Imipenem	10	100,0		100,0		100,0	12,5	100,0		100,0	12,5	100,0	
Vancomycin	5	100,0	66,7	66,7	33,3	100,0	66,7	66,7	33,3	100,0	66,7	66,7	33,3
Linezolid	10	-	-	-	-	100,0	88,9		100,0	100,0	66,7	66,7	33,3
Gentamicin HL	30	100,0	22,2	100,0		100,0	22,2	100,0		100,0	33,3	100,0	

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Ampicillin	2	77,8		100,0		100,0		9,0		100,0		100,0	
Imipenem	10	77,8	16,7	100,0		100,0	12,5	100,0		100,0	12,5	100,0	
Vancomycin	5	77,8	85,7		100,0	100,0	55,6	50,0	50,0	100,0	77,8	100,0	
Linezolid	10	-	-	-	-	100,0	77,8	100,0		100,0	66,7	100,0	
Gentamicin HL	30	77,8	14,3	100,0		100,0		9,0		100,0	22,2	100,0	

Supp table 6. Automated RAST performances using automated (top) or manual (bottom) plating for *P. aeruginosa* clinical strains (n=10)

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Piperacillin-tazobactam	30-6	100,0	40,0	83,3	16,7	100,0	20,0	87,5	12,5
Cefepime	30	100,0	30,0	85,7	14,3	100,0	10,0	88,9	11,1
Ceftazidime	10	100,0	40,0	100,0		100,0	30,0	100,0	
Ceftolozane-tazobactam	30-10	100,0	22,2	71,4	28,6	100,0		88,9	11,1
Imipenem	10	100,0	10,0	100,0		100,0	10,0	100,0	
Meropenem	10	100,0	10,0	88,9	11,1	100,0	10,0	88,9	11,1
Ciprofloxacin	5	100,0	10,0	100,0		100,0		90,0	10,0
Levofloxacin	5	100,0	20,0	100,0		100,0	30,0	100,0	
Amikacin	30	100,0		100,0		100,0		100,0	
Tobramycin	10	100,0		100,0		100,0		100,0	

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Piperacillin-tazobactam	30-6	100,0	50,0	80,0	20,0	100,0	40,0	100,0	
Cefepime	30	100,0	20,0	62,5	37,5	100,0	10,0	88,9	11,1
Ceftazidime	10	100,0	20,0	100,0		100,0	40,0	100,0	
Ceftolozane-tazobactam	30-10	100,0		77,8	22,2	100,0	11,1	87,5	12,5
Imipenem	10	100,0	10,0	100,0		100,0		100,0	
Meropenem	10	100,0		80,0	20,0	100,0	10,0	88,9	11,1
Ciprofloxacin	5	100,0	10,0	100,0		100,0	10,0	100,0	
Levofloxacin	5	100,0	20,0	100,0		100,0	40,0	100,0	
Amikacin	30	100,0		100,0		100,0		100,0	
Tobramycin	10	100,0		100,0		100,0		100,0	

Supp table 7. Automated RAST performances using automated (top) or manual (bottom) plating for *S. pneumoniae* strains (n=5)

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Oxacillin (screen)	1	100,0		100,0		100,0		100,0		100,0		100,0	
Norfloxacin (screen)	10	100,0		100,0		100,0	20,0	100,0		100,0	20,0	100,0	
Erythromycin	15	100,0		100,0		100,0		100,0		100,0		100,0	
Clindamycin	2	100,0		80,0	20,0	100,0	20,0	75,0	25,0	100,0	20,0	75,0	25,0
Cotrimoxazole	1.25-23.75	80,0		100,0		100,0	33,3	66,7		100,0	33,3	100,0	

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Oxacillin (screen)	1	100,0		100,0		100,0	40,0	100,0		100,0		100,0	
Norfloxacin (screen)	10	80,0	25,0	100,0		100,0	20,0	100,0		100,0		100,0	
Erythromycin	15	100,0	20,0	50,0	50,0	100,0		100,0		100,0		100,0	
Clindamycin	2	100,0	20,0	100,0		100,0		80,0	20,0	100,0		80,0	20,0
Cotrimoxazole	1.25-23.75	100,0	50,0	100,0		100,0		100,0		100,0		100,0	

Supp table 8. Automated RAST performances using automated (top) or manual (bottom) plating for *E. coli* ESBL-producing strains (n=27)

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Piperacillin-tazobactam	30-6	100,0	63,0	70,0	30,0	100,0	59,3	72,7	27,3	100,0	63,0	70,0	30,0
Cefotaxime	5	100,0		100,0		100,0		100,0		100,0		100,0	
Ceftazidime	10	100,0	22,2	85,7	14,3	100,0	11,1	91,7	8,3	100,0	11,1	83,3	16,7
Ceftolozane-tazobactam	30-10	100,0	18,5	72,2	27,8	100,0	66,7	85,7	14,3	100,0	44,4	92,3	7,7
Imipenem	10	100,0	3,7	100,0		100,0		100,0		100,0		100,0	
Meropenem	10	100,0	3,7	100,0		100,0		100,0		100,0		100,0	
Ciprofloxacin	5	96,3	3,8	100,0		100,0	11,1	100,0		100,0	7,4	100,0	
Levofloxacin	5	96,3	7,7	94,7	5,3	100,0	11,1	100,0		100,0	3,7	95,2	4,8
Amikacin	30	96,3	57,7	63,6	36,4	100,0	55,6	83,3	16,7	100,0	40,7	93,8	6,3
Tobramycin	10	96,3	30,8	100,0		100,0	37,0	94,1	5,9	100,0	40,7	100,0	
Cotrimoxazole	1.25-23.75	96,3		96,2	3,8	100,0		96,3	3,7	100,0	3,7	96,2	3,8

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Piperacillin-tazobactam	30-6	96,3	65,4	77,8	22,2	96,3	42,3	86,7	13,3	100,0	33,3	83,3	16,7
Cefotaxime	5	96,3		100,0		96,3		100,0		100,0		100,0	
Ceftazidime	10	96,3	34,6	94,1	5,9	96,3	11,5	95,7	4,3	100,0	11,1	91,7	8,3
Ceftolozane-tazobactam	30-10	96,3	26,9	85,7	14,3	96,3	7,7	100,0		100,0	3,7	100,0	
Imipenem	10-janv	96,3		100,0		96,3		100,0		100,0		100,0	
Meropenem	10-janv	96,3		100,0		96,3		100,0		100,0		100,0	
Ciprofloxacin	05-janv	96,3		96,2	3,8	100,0		96,3	3,7	100,0	3,7	100,0	
Levofloxacin	05-janv	96,3		90,5	9,5	100,0	7,4	100,0		100,0		90,9	9,1
Amikacin	30-janv	96,3	50,0	100,0		100,0	22,2	100,0		100,0	11,1	100,0	
Tobramycin	10-janv	96,3	11,5	100,0		100,0	25,9	100,0		100,0	22,2	100,0	
Cotrimoxazole	1.25-23.75	96,3		92,3	7,7	100,0		96,3	3,7	100,0		96,3	3,7

Supp table 9. Automated RAST performances using automated (top) or manual (bottom) plating for *K. pneumoniae* ESBL strains (n=20)

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Piperacillin-tazobactam	30-6	100,0	50,0	80,0	20,0	100,0	65,0	85,7	14,3	100,0	55,0	100,0	
Cefotaxime	5	100,0	11,1	100,0		100,0		94,4	5,6	100,0		94,4	5,6
Ceftazidime	10	100,0	15,0	94,1	5,9	100,0	15,0	100,0		100,0	5,0	94,7	5,3
Ceftolozane-tazobactam	30-10	100,0	22,2	92,9	7,1	100,0	42,1	81,8	18,2	100,0	38,9	100,0	
Imipenem	10	100,0	5,0	100,0		100,0	5,0	100,0		100,0		100,0	
Meropenem	10	100,0		95,0	5,0	100,0		95,0	5,0	100,0		100,0	
Ciprofloxacin	5	100,0	15,0	100,0		100,0	15,0	100,0		100,0	10,0	100,0	
Levofloxacin	5	100,0	13,3	92,3	7,7	100,0	26,7	100,0		100,0	20,0	100,0	
Amikacin	30	100,0	70,0	100,0		100,0	25,0	93,3	6,7	100,0	50,0	80,0	20,0
Tobramycin	10	100,0	10,0	94,4	5,6	100,0	15,0	100,0		100,0	15,0	100,0	
Cotrimoxazole	1.25-23.75	100,0		95,0	5,0	100,0		95,0	5,0	100,0		95,0	5,0

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	4 hours				6 hours				8 hours			
		Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)	Read (%)	ATU (%)	CA (%)	Error (%)
Piperacillin-tazobactam	30-6	100,0	50,0	90,0	10,0	100,0	50,0	80,0	20,0	100,0	60,0	100,0	
Cefotaxime	5	100,0	5,6	94,1	5,9	100,0		94,4	5,6	100,0		94,4	5,6
Ceftazidime	10	100,0	10,0	88,9	11,1	100,0		90,0	10,0	100,0		90,0	10,0
Ceftolozane-tazobactam	30-10	100,0	5,6	88,2	11,8	100,0	5,6	94,1	5,9	100,0	9,0	100,0	
Imipenem	10	100,0	5,0	100,0		100,0	5,0	100,0		100,0		100,0	
Meropenem	10	100,0		95,0	5,0	100,0		95,0	5,0	100,0		100,0	
Ciprofloxacin	5	100,0	15,0	100,0		100,0	10,0	100,0		100,0	15,0	100,0	
Levofloxacin	5	100,0	29,4	100,0		100,0	25,0	100,0		100,0	20,0	100,0	
Amikacin	30	100,0	30,0	92,9	7,1	100,0	10,0	94,4	5,6	100,0	15,0	88,2	11,8
Tobramycin	10	100,0	10,0	94,4	5,6	100,0	15,0	100,0		100,0	15,0	94,1	5,9
Cotrimoxazole	1.25-23.75	100,0		95,0	5,0	100,0		95,0	5,0	100,0		95,0	5,0

CONCLUSION

THÈSE SOUTENUE PAR : Lionnel BULIN

TITRE : ÉVALUATION DES PERFORMANCES D'UN PROTOCOLE AUTOMATISÉ DE DETERMINATION RAPIDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES (DRSA) À PARTIR D'HEMOCULTURES POSITIVES

Les bactériémies représentent la première cause de sepsis et sont associées à une importante morbi-mortalité qui est corrélée au délai de mise en place d'une antibiothérapie adaptée. Toutefois, l'adaptation thérapeutique peut être compromise par la fréquence croissante des résistances aux antibiotiques. Récemment, une nouvelle méthodologie a été établie par l'EUCAST dans le but d'obtenir une détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques (DRSA) d'une bactérie directement à partir d'une hémoculture positive. Cette méthodologie propose un protocole de réalisation d'un antibiogramme diffusion ainsi que des diamètres critiques à des temps de lecture précoces (après 4, 6 et 8h au lieu de 20h d'incubation). Sa finalité est d'accélérer la réadaptation de l'antibiothérapie des patients bactériémiques. Cependant, cette méthodologie requiert un respect strict des temps de lecture avec une fenêtre de lecture très étroite autour de chaque échéance (+/- 5 minutes) et une réduction du temps de manipulation des géloses hors des étuves. Ces délais sont difficilement applicables dans la routine d'un laboratoire mais des solutions peuvent être fournies par l'automatisation récente des laboratoires de bactériologie. Nous avons mis à profit la chaîne automatisée BD Kiestra™ présente au laboratoire de bactériologie du CHUGA afin de proposer une version automatisée du protocole DRSA. En effet, ce système automatisé est capable de réaliser l'inoculation (Inoqua™), l'incubation ainsi que la prise de photos de géloses à des temps précis (ReadACompact™) et avec un délai très court hors des incubateurs minimisant ainsi l'impact sur la croissance bactérienne.

Nous avons évalué les performances, par rapport aux méthodes conventionnelles, d'un protocole DRSA automatisé réalisé sur la période de Juillet 2020 à Février 2021 sur toutes les hémocultures de la nuit (1 flacon/patient) positives à une des espèces pour lesquelles des diamètres critiques sont définis pour la technique DRSA. Deux méthodes d'ensemencement des géloses MHE ou MHF ont été évaluées, l'une manuelle et l'autre automatisée (Inoqua™). Les géloses ont été incubées dans la chaîne BD Kiestra™ et les images digitales obtenues à 4, 6 et 8h d'incubation ont été exploitées grâce au logiciel ReadABrowser™ grâce auquel les zones d'inhibition ont été mesurées avant d'être rapportées aux diamètres critiques précoces de l'EUCAST permettant la catégorisation S/I/R de chaque antibiotique. Au total, 158 souches cliniques ont été testées dont 66 *E.coli*, 13 *K. pneumoniae*, 10 *P. aeruginosa*, 39 *S. aureus*, 16 *E. faecalis*, 9 *E. faecium* et 5 *S. pneumoniae*. Parmi les principaux résultats obtenus, la lecture des diamètres d'inhibition des souches d'*E. coli* (n = 66) était possible dans 93,3%, 97,9% et 99,9% des cas à 4h, 6h et 8h, respectivement après ensemencement manuel.

Les taux de concordance de catégorisation des antibiotiques étaient supérieurs 95% pour la plupart des antibiotiques (céfotaxime, ceftazidime, carbapénèmes, fluoroquinolones et cotrimoxazole) dès 6h. En revanche, les associations bêta-lactamine / inhibiteurs de bêta-lactamase et les aminosides étaient fréquemment retrouvés dans la zone d'incertitude technique (ZIT) et des taux d'erreurs supérieurs à 5% ont été identifiés pour le ceftolozane-tazobactam (7,9%) et la piperacilline-tazobactam (15%) à 6h. Quant aux souches de *S. aureus* (n = 39), les taux de lecture avec la méthode d'ensemencement automatisé étaient de 74,4%, 92,3% et 98,1% après 4h, 6h et 8h, respectivement. La détermination de la sensibilité à la méticilline et aux fluoroquinolones était également fiable avec des taux de concordance supérieurs à 95% après 6h d'incubation. Bien qu'aucune erreur ne soit constatée, le taux de diamètres dans la ZIT s'est avéré très important pour la clindamycine (32,4%) à 6h. Un taux d'erreurs inférieurs à 3% et correspondant à des erreurs majeures a été observé pour la gentamicine à 6h.

En conclusion, le protocole DRSA automatisé montre des performances globales très prometteuses à partir de 6h d'incubation pour *E. coli* et pour *S. aureus*. Ceci pourrait permettre une réadaptation thérapeutique le même jour que celui de la positivité du flacon d'hémoculture. L'automatisation de cette méthodologie DRSA semble tout à fait réalisable et va dans le sens de l'évolution des pratiques de microbiologie.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le :

LE DOYEN

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Pr. Patrice MORAND

Pr. Max MAURIN



CHU de Grenoble
Pôle de Biologie et de Pathologie
UF Virologie
Pr Patrice MORAND
Tél 04 76 76 56 04



CHU de Grenoble
Pôle de Biologie et de Pathologie
UF Bactériologie et Hygiène Hospitalière
Pr Max MAURIN
Tél 04 76 76 54 79

BIBLIOGRAPHIE

- Åkerlund A, Jonasson E, Matuschek E, Serrander L, Sundqvist M, Kahlmeter G, et al. EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020 Nov 1;75(11):3230–8.
- Alfandari S, Cabaret P, Nguyen S, Descamps D, Vachée A, Cattoen C, et al. Evaluating the management of 493 patients presenting with bacteremia in 23 northern French hospitals. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2016 Jun;46(4):194–9.
- Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Ozenci V. Clinical Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel in Identification of Bacteria and Yeasts from Positive Blood Culture Bottles. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 Dec 1;51(12):4130–6.
- Bardet L, Okdah L, Le Page S, Baron SA, Rolain J-M. Comparative evaluation of the UMIC Colistine kit to assess MIC of colistin of gram-negative rods. *BMC Microbiol*. 2019 Dec;19(1):60.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966 Apr;45(4):493–6.
- Benkova M, Soukup O, Marek J. Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *J Appl Microbiol*. 2020 Oct;129(4):806–22.
- Berinson B, Olearo F, Both A, Brossmann N, Christner M, Aepfelbacher M, et al. EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST): analytical performance and impact on patient management. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021 Apr 13;76(5):1332–8.
- Bianco G, Boattini M, van Asten SAV, Iannaccone M, Zanutto E, Zaccaria T, et al. RESIST-5 O.O.K.N.V. and NG-Test Carba 5 assays for the rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacterales from positive blood cultures: a comparative study. *Journal of Hospital Infection*. 2020 Jun;105(2):162–6.
- Bianco G, Boattini M, Iannaccone M, Fossati L, Cavallo R, Costa C. Direct β -Lactam Inactivation Method: a New Low-Cost Assay for Rapid Detection of Carbapenemase- or Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacterales* Directly from Positive Blood Culture Bottles. Carroll KC, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2019 Dec 23 [cited 2021 Oct 1];58(1). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01178-19>
- Briggs N, Campbell S, Gupta S. Advances in rapid diagnostics for bloodstream infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2021 Jan;99(1):115219.
- Bruker accessed at : <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification-for-clinical-laboratories-us-ivd/maldi-biotyper-library-us-ivd.html>
- Bryant S, Almahmoud I, Pierre I, Bardet J, Touati S, Maubon D, et al. Evaluation of Microbiological Performance and the Potential Clinical Impact of the ePlex® Blood Culture Identification Panels for the Rapid Diagnosis of Bacteremia and Fungemia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Nov 26;10:594951.
- Burke J, Wood S, Hermon A, Szakmany T. Improving outcome of sepsis on the ward: introducing the ‘Sepsis Six’ bundle: Sepsis Six to improve outcome. *Nurs Crit Care*. 2019 Jan;24(1):33–9.

Carroll KC, Reid JL, Thornberg A, Whitfield NN, Trainor D, Lewis S, et al. Clinical Performance of the Novel GenMark Dx ePlex Blood Culture ID Gram-Positive Panel. Richter SS, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 Mar 25 [cited 2021 Oct 1];58(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01730-19>

Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019 Jan;19(1):56–66.

Chandrasekaran S, Abbott A, Campeau S, Zimmer BL, Weinstein M, Thrupp L, et al. Direct-from-Blood-Culture Disk Diffusion To Determine Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacteria: Preliminary Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute Methods Development and Standardization Working Group. Ledebauer NA, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Mar [cited 2021 Sep 30];56(3). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01678-17>

Chapin KC, Musgnug MC. Direct Susceptibility Testing of Positive Blood Cultures by Using Sensititre Broth Microdilution Plates. *J Clin Microbiol*. 2003 Oct;41(10):4751–4.

Charnot-Katsikas A, Tesic V, Love N, Hill B, Bethel C, Boonlayangoor S, et al. Use of the Accelerate Pheno System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Pathogens in Positive Blood Cultures and Impact on Time to Results and Workflow. Bourbeau P, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Jan [cited 2021 Oct 1];56(1). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01166-17>

Clancy CJ, Nguyen MH. T2 magnetic resonance for the diagnosis of bloodstream infections: charting a path forward. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018 Mar 1;73(suppl_4):iv2–5.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015) Verification of commercial microbial identification and antimicrobial susceptibility testing systems, 1st ed. CLSI guideline M52 (ISBN 1-56238-911-4)

Cointe A, Bonacorsi S, Truong J, Hobson C, Doit C, Monjault A, et al. Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Positive Blood Culture Using an Immunochromatographic RESIST-4 O.K.N.V. Assay. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2018 Dec [cited 2021 Oct 1];62(12). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01828-18>

Cook A, Hsia Y, Russell N, Sharland M, Cheung K, Grimwood K, et al. Association of Empiric Antibiotic Regimen Discordance With 30-Day Mortality in Neonatal and Pediatric Bloodstream Infection—A Global Retrospective Cohort Study. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2021 Feb;40(2):137–43.

Cordovana M, Abdalla M, Ambretti S. Evaluation of the MBT STAR-Carba Assay for the Detection of Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae* and *Hafniaceae* with a Large Collection of Routine Isolates from Plate Cultures and Patient-Derived Positive Blood Cultures. *Microbial Drug Resistance*. 2020 Nov 1;26(11):1298–306.

Dantes RB, Epstein L. Combatting Sepsis: A Public Health Perspective. *Clinical Infectious Diseases*. 2018 Sep 28;67(8):1300–2.

Delpont JA, Mohorovic I, Burn S, McCormick JK, Schaus D, Lannigan R, et al. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia using combined three-hour short-incubation matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS identification and

Alere Culture Colony PBP2a detection test. *Journal of Medical Microbiology*. 2016 Jul 1;65(7):626–31.

Doern CD. The Slow March toward Rapid Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing: Are We There Yet? Forbes BA, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Apr [cited 2021 Oct 1];56(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01999-17>

Dortet L, Brécharde L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Apr;20(4):340–4.

Dubourg G, Lamy B, Ruimy R. Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial bloodstream infections: meeting the challenge to reduce the time to result. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018 Sep;24(9):935–43.

ECN.PILLY accessed at: <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/ecn-pilly-2020/ecn-2020-ue6-154-nb.pdf>

Eubank TA, Long SW, Perez KK. Role of Rapid Diagnostics in Diagnosis and Management of Patients With Sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020 Jul 21;222(Supplement_2):S103–9.

European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019 – accessed at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/report>

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, ix-xv (2003)GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018 Nov 10;392(10159):1789-1858. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7. Epub 2018 Nov 8. Erratum in: *Lancet*. 2019 Jun 22;393(10190):e44. PMID: 30496104; PMCID: PMC6227754.

Gherardi G, Angeletti S, Panitti M, Pompilio A, Di Bonaventura G, Crea F, et al. Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012 Jan;72(1):20–31.

Goto M, Al-Hasan MN. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013 Jun;19(6):501–9.

Höring S, Massarani AS, Löffler B, Rödel J. Rapid antibiotic susceptibility testing in blood culture diagnostics performed by direct inoculation using the VITEK®-2 and BD Phoenix™ platforms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019 Mar;38(3):471–8.

Howell MD, Davis AM. Management of Sepsis and Septic Shock. 2017;2.

Huang T-D, Melnik E, Bogaerts P, Evrard S, Glupczynski Y. Evaluation of the ePlex Blood Culture Identification Panels for Detection of Pathogens in Bloodstream Infections. Patel R, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2019 Feb [cited 2021 Oct 1];57(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01597-18>

Idelevich EA, Becker K. How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019 Nov;25(11):1347–55.

- Israr MZ, Bernieh D, Salzano A, Cassambai S, Yazaki Y, Suzuki T. Matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI) mass spectrometry (MS): basics and clinical applications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2020 Jun 25;58(6):883–96.
- Jakovljević A, Bergh K. Development of a rapid and simplified protocol for direct bacterial identification from positive blood cultures by using matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *BMC Microbiol*. 2015 Dec;15(1):258.
- Jang K-S, Kim YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications. *J Microbiol*. 2018 Apr;56(4):209–16.
- Jasuja JK, Zimmermann S, Burckhardt I. Evaluation of EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) for positive blood cultures in clinical practice using a total lab automation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Jul;39(7):1305–13.
- Jonasson E, Matuschek E, Kahlmeter G. The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020 Apr 1;75(4):968–78.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis*. 2009 Dec;49(11):1749–55.
- Kern WV, Rieg S. Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020 Feb;26(2):151–7.
- Kolesnik-Goldmann N, Bodendoerfer E, Röthlin K, Herren S, Imkamp F, Marchesi M, et al. Rapid Detection of PBP2a in Staphylococci from Shortly Incubated Subcultures of Positive Blood Cultures by an Immunochromatographic Assay. Long SW, editor. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2021 Sep 3 [cited 2021 Oct 1];9(1). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/Spectrum.00462-21>
- Kumar A. Optimizing Antimicrobial Therapy in Sepsis and Septic Shock. *Critical Care Clinics*. 2009 Oct;25(4):733–51.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock*: *Critical Care Medicine*. 2006 Jun;34(6):1589–96.
- Lambregts MMC, Wijnakker R, Bernards AT, Visser LG, le Cessie S, de Boer MGJ. Mortality After Delay of Adequate Empiric Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infection. *JCM*. 2020 May 7;9(5):1378.
- Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA. Bloodstream infections – Standard and progress in pathogen diagnostics. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020 Feb;26(2):142–50.
- Lee AWT, Lam JKS, Lam RKW, Ng WH, Lee ENL, Lee VTY, et al. Comprehensive Evaluation of the MBT STAR-BL Module for Simultaneous Bacterial Identification and β -Lactamase-Mediated Resistance Detection in Gram-Negative Rods from Cultured Isolates and Positive Blood Cultures. *Front Microbiol*. 2018 Feb 23;9:334.
- Lee C-C, Lee N-Y, Chen P-L, Hong M-Y, Chan T-Y, Chi C-H, et al. Impact of antimicrobial strategies on clinical outcomes of adults with septic shock and community-onset Enterobacteriaceae bacteremia: de-escalation is beneficial. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Jun;82(2):158–64.

MacVane SH, Nolte FS. Benefits of Adding a Rapid PCR-Based Blood Culture Identification Panel to an Established Antimicrobial Stewardship Program. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54(10):9.

Marquet K, Liesenborgs A, Bergs J, Vleugels A, Claes N. Incidence and outcome of inappropriate in-hospital empiric antibiotics for severe infection: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*. 2015 Dec;19(1):63.

Martinez-Nadal G, Puerta-Alcalde P, Gudiol C, Cardozo C, Albasanz-Puig A, Marco F, et al. Inappropriate Empirical Antibiotic Treatment in High-risk Neutropenic Patients With Bacteremia in the Era of Multidrug Resistance. *Clinical Infectious Diseases*. 2019 Apr 25;ciz319.

Marturano JE, Lowery TJ. ESKAPE Pathogens in Bloodstream Infections Are Associated With Higher Cost and Mortality but Can Be Predicted Using Diagnoses Upon Admission. *Open Forum Infectious Diseases*. 2019 Dec 1;6(12):ofz503.

Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014 Apr;20(4):O255–66.

Meier M, Hamprecht A. Systematic Comparison of Four Methods for Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacterales* Directly from Blood Cultures. Carroll KC, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2019 Nov [cited 2021 Oct 1];57(11). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.00709-19>

Menozi MG, Eigner U, Covan S, Rossi S, Somenzi P, Dettori G, et al. Two-Center Collaborative Evaluation of Performance of the BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria. *J Clin Microbiol*. 2006 Nov;44(11):4085–94.

Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. 2018;94.

Oberhettinger P, Zieger J, Autenrieth I, Marschal M, Peter S. Evaluation of two rapid molecular test systems to establish an algorithm for fast identification of bacterial pathogens from positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Jun;39(6):1147–57.

- Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015 Apr;21(4):313–22.
- Pancholi P, Carroll KC, Buchan BW, Chan RC, Dhiman N, Ford B, et al. Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. Forbes BA, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Apr [cited 2021 Oct 1];56(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.01329-17>
- Pardo J, Klinker KP, Borgert SJ, Butler BM, Giglio PG, Rand KH. Clinical and economic impact of antimicrobial stewardship interventions with the FilmArray blood culture identification panel. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016 Feb;84(2):159–64.
- Parta M, Goebel M, Matloobi M, Stager C, Musher DM. Identification of Methicillin-Resistant or Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in Blood Cultures and Wound Swabs by GeneXpert. *J Clin Microbiol*. 2009 May;47(5):1609–10.
- Patel TS, Kaakeh R, Nagel JL, Newton DW, Stevenson JG. Cost Analysis of Implementing Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Plus Real-Time Antimicrobial Stewardship Intervention for Bloodstream Infections. Bourbeau P, editor. *J Clin Microbiol*. 2017 Jan;55(1):60–7.
- Périllaud C, Pilmis B, Diep J, Péan de Ponfilly G, Vidal B, Couzigou C, et al. Prospective evaluation of rapid antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion on Mueller-Hinton rapid-SIR directly on blood cultures. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2019 Jan;93(1):14–21.
- Pilmis B, Thy M, Diep J, Krob S, Périllaud C, Couzigou C, et al. Clinical impact of rapid susceptibility testing on MHR-SIR directly from blood cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019 Oct 1;74(10):3063–8.
- Plachouras D, Kärki T, Hansen S, Hopkins S, Lyytikäinen O, Moro ML, et al. Antimicrobial use in European acute care hospitals: results from the second point prevalence survey (PPS) of healthcare-associated infections and antimicrobial use, 2016 to 2017. *Eurosurveillance* [Internet]. 2018 Nov 15 [cited 2021 Sep 30];23(46). Available from: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.23.46.1800393>
- Ponderand L, Pavese P, Maubon D, Giraudon E, Girard T, Landelle C, et al. Evaluation of Rapid Sepsityper® protocol and specific MBT-Sepsityper module (Bruker Daltonics) for the

rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-TOF-MS. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2020 Dec;19(1):60.

Posteraro P, Gasparoli C, Errico FM, Massaria G, Sanguinetti M, Posteraro B. Off-site versus on-site clinical microbiology laboratory: a 2-year comparison study of blood culture result reporting. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019 Nov;25(11):1441–2.

Quesada MD, Giménez M, Molinos S, Fernández G, Sánchez MD, Ravelo R, et al. Performance of VITEK-2 Compact and overnight MicroScan panels for direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacilli from positive FAN BacT/ALERT blood culture bottles. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010 Feb;16(2):137–40.

Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. 2017 Mar;43(3):304–77.

Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008 Apr 15;197(8):1079–81.

Rivard KR, Athans V, Lam SW, Gordon SM, Procop GW, Richter SS, et al. Impact of antimicrobial stewardship and rapid microarray testing on patients with Gram-negative bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Oct;36(10):1879–87.

Robineau O, Robert J, Rabaud C, Bedos J-P, Varon E, Péan Y, et al. Management and outcome of bloodstream infections: a prospective survey in 121 French hospitals (SPA-BACT survey). *IDR*. 2018 Aug;Volume 11:1359–68.

Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 2020 Jan;395(10219):200–11.

Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR, Schreckenberger P, DesJarlais SM, Johnson JK, et al. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial. Richter SS, editor. *J Clin Microbiol*. 2016 Mar;54(3):687–98.

Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, et al. Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N Engl J Med*. 2017;376(23):2235–2244. doi:10.1056/NEJMoa1703058

Shin KS, Song HG, Kim H, Yoon S, Hong SB, Koo SH, et al. Direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from blood cultures using an immunochromatographic

immunoassay-based MRSA rapid kit for the detection of penicillin-binding protein 2a. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010 Jul;67(3):301–3.

Snyder JW, Munier GK, Johnson CL. Direct Comparison of the BD Phoenix System with the MicroScan WalkAway System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Enterobacteriaceae* and Nonfermentative Gram-Negative Organisms. *J Clin Microbiol*. 2008 Jul;46(7):2327–33.

Société Française de Microbiologie – AntibioGramme direct par dilution à partir de flacons d'hémocultures positives. In : CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie Ed ; 2020 : p.154.

Stokkou S, Geginat G, Schlüter D, Tammer I. Direct disk diffusion test using European Clinical Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoints provides reliable results compared with the standard method. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2015 Mar;5(1):103–11.

the JPIAMR AMR-RDT Working Group on Antimicrobial Resistance and Rapid Diagnostic Testing, van Belkum A, Bachmann TT, Lüdke G, Lisby JG, Kahlmeter G, et al. Developmental roadmap for antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Jan;17(1):51–62.

Thomson GK, Jamros K, Snyder JW, Thomson KS. Digital imaging for reading of direct rapid antibiotic susceptibility tests from positive blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021 Oct;40(10):2105–12.

Timbrook TT, Morton JB, McConeghy KW, Caffrey AR, Mylonakis E, LaPlante KL. The Effect of Molecular Rapid Diagnostic Testing on Clinical Outcomes in Bloodstream Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2017 Jan 1;64(1):15–23.

Vareechon C, Mestas J, Polanco CM, Dien Bard J. A 5-year study of the performance of the Verigene Gram-positive blood culture panel in a pediatric hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Nov;37(11):2091–6.

Vasala A, Hytönen VP, Laitinen OH. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jul 15;10:308.

Versalovic, Carroll, Funke, Jorgensen, Landry, Warnock, editors. Susceptibility Testing Instrumentation and Computerized Expert Systems for Data Analysis and Interpretation. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition [Internet]. American Society of Microbiology; 2011 [cited 2021 Oct 1]. p. 1144–54. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816728.chap69>

Walewski V, Podglajen I, Lefevre P, Dutasta F, Neuschwander A, Tilouche L, et al. Early detection with the β -LACTA™ test of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in blood cultures. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2015 Nov;83(3):216–8.

EUCAST recommendations accessed at: https://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures/

Weinberger J, Rhee C, Klompas M. A Critical Analysis of the Literature on Time-to-Antibiotics in Suspected Sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020 Jul 21;222(Supplement_2):S110–8.

Winstanley T, Courvalin P. Expert Systems in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jul;24(3):515–56.

Yagupsky P, Peled N, Press J, Abramson O, Abu-Rashid M. Comparison of BACTEC 9240 Peds Plus medium and isolator 1.5 microbial tube for detection of *Brucella melitensis* from blood cultures. *J Clin Microbiol*. 1997 Jun;35(6):1382–4.

Yahav D, Eliakim-Raz N, Leibovici L, Paul M. Bloodstream infections in older patients. *Virulence*. 2016 Apr 2;7(3):341–52.

*L*e serment d'Hippocrate

Texte revu par l'Ordre des médecins en 2012

“ Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

”

Introduction : Le sepsis est une importante cause de morbidité et de mortalité même dans les pays industrialisés. Celui-ci est principalement causé par les bactériémies et son pronostic est corrélé à l'initiation précoce d'une antibiothérapie adaptée. L'hémoculture reste à ce jour le gold standard pour le diagnostic de bactériémie. Pour accélérer la prise en charge thérapeutique des bactériémies, l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – comité de l'antibiogramme Européen) a établi un protocole de détermination rapide de la sensibilité aux antibiotiques (DRSA) appelé RAST (Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing) directement à partir d'un flacon positif d'hémoculture. Cette méthodologie est basée sur l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé avec des diamètres critiques adaptés à des temps de lecture précoces (4h, 6h et 8h au lieu de 20h d'incubation). Cependant, la méthodologie DRSA requiert de la rigueur quant au respect des temps de lecture avec une fenêtre étroite autour de chaque échéance (+/- 5 minutes). Ces délais sont difficilement applicables dans la routine d'un laboratoire mais l'automatisation apporte une solution à cet écueil. Grâce à son incubateur ReadACompact™ et son logiciel ReadABrowser™, la chaîne BD Kiestra™ permet la lecture automatisée de gélose d'antibiogramme à des temps précis avec la mesure de zones d'inhibition sur images digitales.

Méthode : Nous avons évalué les performances, par rapport aux méthodes conventionnelles, d'une version automatisée du protocole DRSA sur les hémocultures positives entre Juillet 2020 et Février 2021. Une identification rapide sur culot bactérien issu de l'hémoculture positive était réalisée préalablement grâce à un protocole maison basé sur la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Deux méthodes d'ensemencement de la gélose ont été évaluées, l'une manuelle, l'autre automatisée (BD Inoqula™) et les disques d'antibiotique étaient appliqués selon des panels spécifiques d'espèce. La gélose était incubée dans le ReadACompact™ et des photos étaient automatiquement prises à 4, 6 et 8h. Les zones d'inhibition lisibles étaient mesurées sur les images du ReadABrowser™ et la souche était catégorisée S/I/R ou ZIT selon les diamètres critiques de l'EUCAST (v2.1).

Résultats : Au total, 158 souches cliniques ont été testées. Pour les souches d'*E. coli* (n = 65) la lecture était possible dans 94,8%, 98,2% et 99,9% des cas à 4h, 6h et 8h, respectivement après encensement automatisé. Quant aux souches de *S. aureus* (n = 39), les taux de lecture avec la méthode d'ensemencement automatisée étaient de 74,4%, 92,3% et 98,1% après 4h, 6h et 8h, respectivement. Les taux de concordance de catégorisation pour *E. coli* étaient supérieurs à 95% vis-à-vis de plusieurs antibiotiques (céfotaxime, ceftazidime, carbapénèmes, fluoroquinolones et cotrimoxazole) et ce dès 6h. Pour *S. aureus*, la détermination de la sensibilité à la méticilline, à la gentamicine et aux fluoroquinolones était également fiable avec des taux de concordance supérieurs à 95% toujours à 6h.

Conclusion : le protocole DRSA automatisé montre des performances prometteuses pour des temps de lecture à 6h pour *E. coli* et pour *S. aureus*. Ceci pourrait permettre une adaptation thérapeutique le même jour que celui de la positivité du flacon d'hémoculture.