

Tests de diagnostic rapide :  
Quelles conséquences pour la  
prise en charge ?

Hémocultures à Gram+

Raymond Ruimy  
CHU Nice, Laboratoire de Bactériologie  
Hôpital de l'Archet II

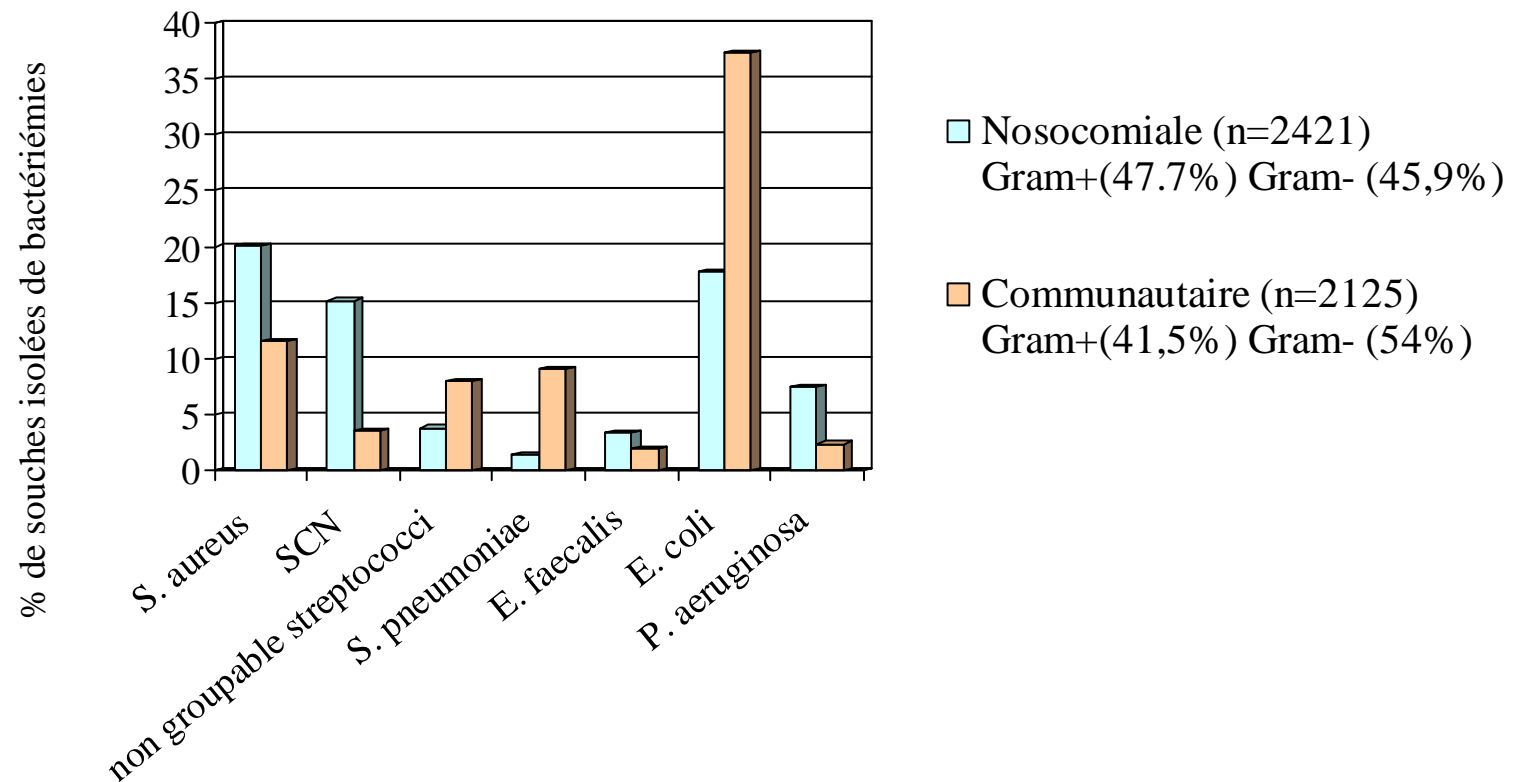
## Tests de diagnostic rapide

Hémocultures positives à GRAM positif

- Quel est la place des GRAM positif ?
- Pourquoi faut-il des tests rapides ?
- Quels sont les tests rapides ?
- Quel est l'indication de ces tests ?
- Quels en sont leurs intérêts médico-économiques ?

# Épidémiologie des bactériémies à GRAM +

-Position des GRAM + parmi les microorganismes de bacteremie<sup>1</sup>



- Taux de Mortalité associé aux bactériémies à *S. aureus*<sup>2</sup> : 12 to 46%

<sup>1</sup> Enquête bactériémie 2002 CCLIN Paris-Nord, Coordinateur: A. Carbonne, V. Jarlier

<sup>2</sup> Weinstein et al. 1997 Clin Infect Dis 584-602

# Place des GRAM positif dans les hémocultures positives

Pien et al., 2010, Amer J Med

**Table 2** Microorganisms Isolated from Positive Adult Blood Cultures at DUMC, DVAMC, and RWJUH, 2004

Microorganism	Total Isolates	True Bloodstream Infection		Contaminant		Unknown Clinical Significance	
	n	n	%	n	%	n	%
Coagulase-negative staphylococci	1005	105	10	828	82	72	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	339	315	93	4	1	20	6
<i>Enterococcus</i> spp.*	203	128	63	23	11	52	26
Viridans group streptococci	98	29	30	54	55	15	15
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	26	26	100	0	0	0	0
$\beta$ -hemolytic streptococci†	32	31	97	0	0	1	3
<i>Corynebacterium</i> spp.	86	7	8	76	88	3	3
<i>Bacillus</i> spp.	33	0	0	33	100	0	0
<i>Micrococcus</i> spp.	14	0	0	14	100	0	0
<i>Lactobacillus</i> spp.	10	4	40	6	60	0	0
Other Gram-positive bacteria‡	13	3	23	9	69	1	8
<i>Escherichia coli</i>	175	170	97	1	1	4	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	118	112	95	1	1	5	4
<i>Enterobacter cloacae</i>	46	0	0	0	0	3	7
<i>Serratia marcescens</i>	42	0	0	0	0	3	7
<i>Proteus mirabilis</i>	25	0	0	0	0	0	0
Other Enterobacteriaceae	62	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52	2	4	2	4	0	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11	8	73	0	0	3	27
<i>Acinetobacter baumannii</i>	15	10	67	0	0	5	33
Other Gram-negative bacteria§	22	12	55	5	23	5	23
<i>Clostridium</i> spp.	25	16	64	6	24	3	12
<i>Propionibacterium</i> spp.	35	1	3	33	94	1	3
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	13	5	38	4	31	4	31
Other Gram-positive anaerobic bacteria	4	3	75	1	25	0	0
<i>Bacteroides</i> spp.	35	34	97	0	0	1	3
Other Gram-negative anaerobic bacteria¶	8	7	88	0	0	1	13
<i>Candida albicans</i>	46	45	98	0	0	1	2
<i>Candida glabrata</i>	32	32	100	0	0	0	0
Other <i>Candida</i> spp.**	30	30	100	0	0	0	0
Other fungi††	7	5	71	1	14	1	14
<i>Mycobacterium</i> spp.‡‡	7	7	100	0	0	0	0
All microorganisms	2669	1364	51	1101	41	204	8

72,5%  
GRAM +

49,3%  
GRAM +

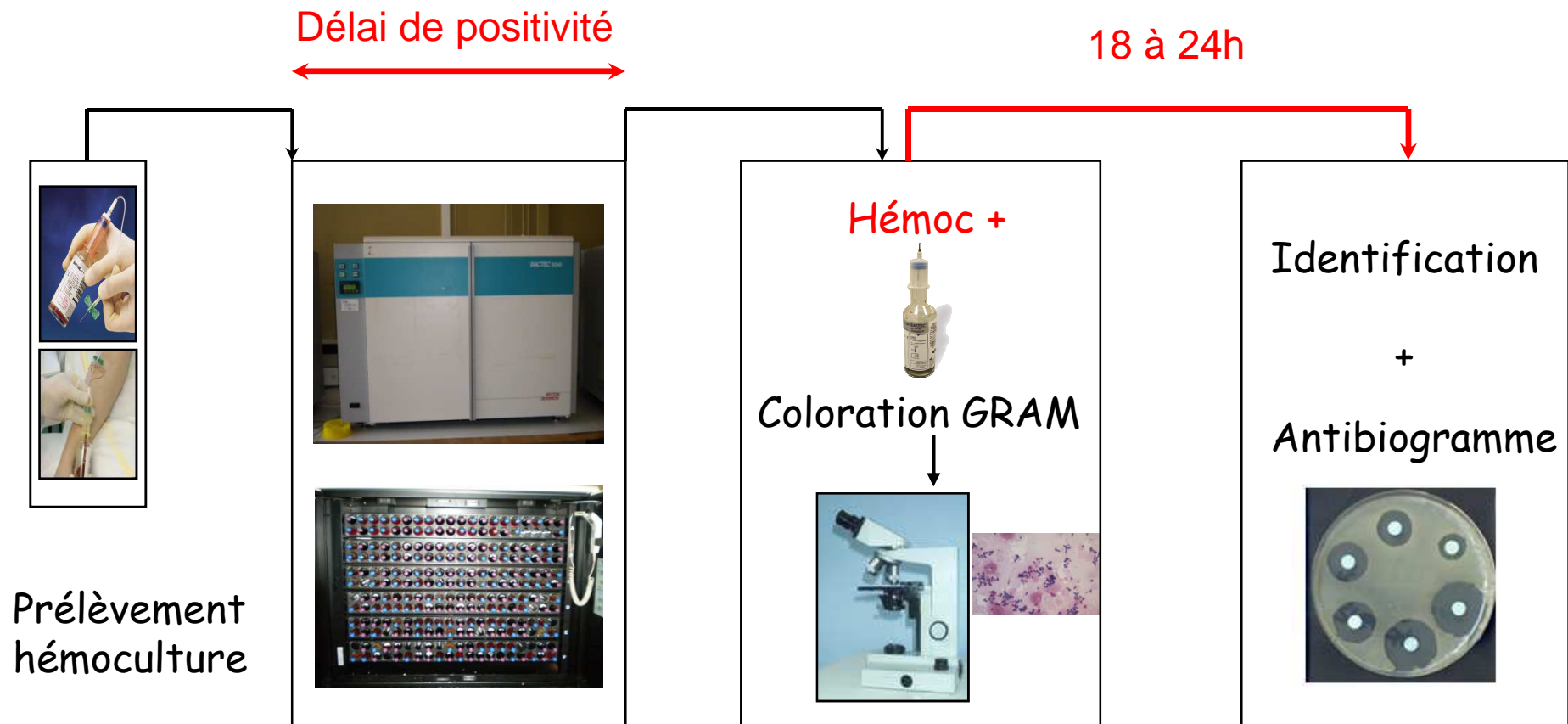
DUMC = Duke University Medical Center; DVAMC = Durham Veteran Affairs Medical Center; RWJUH = Robert Wood Johnson University Hospital.

\*Includes 101 *E. faecalis*, 80 *E. faecium*, 2 *E. gallinarum*, 1 *E. avium*, 19 *Enterococcus* spp.

†Includes 17 *Streptococcus agalactiae*, 6 group G streptococci, 5 *S. pyogenes*, 3 group F streptococci, and 1 *S. equinus*.

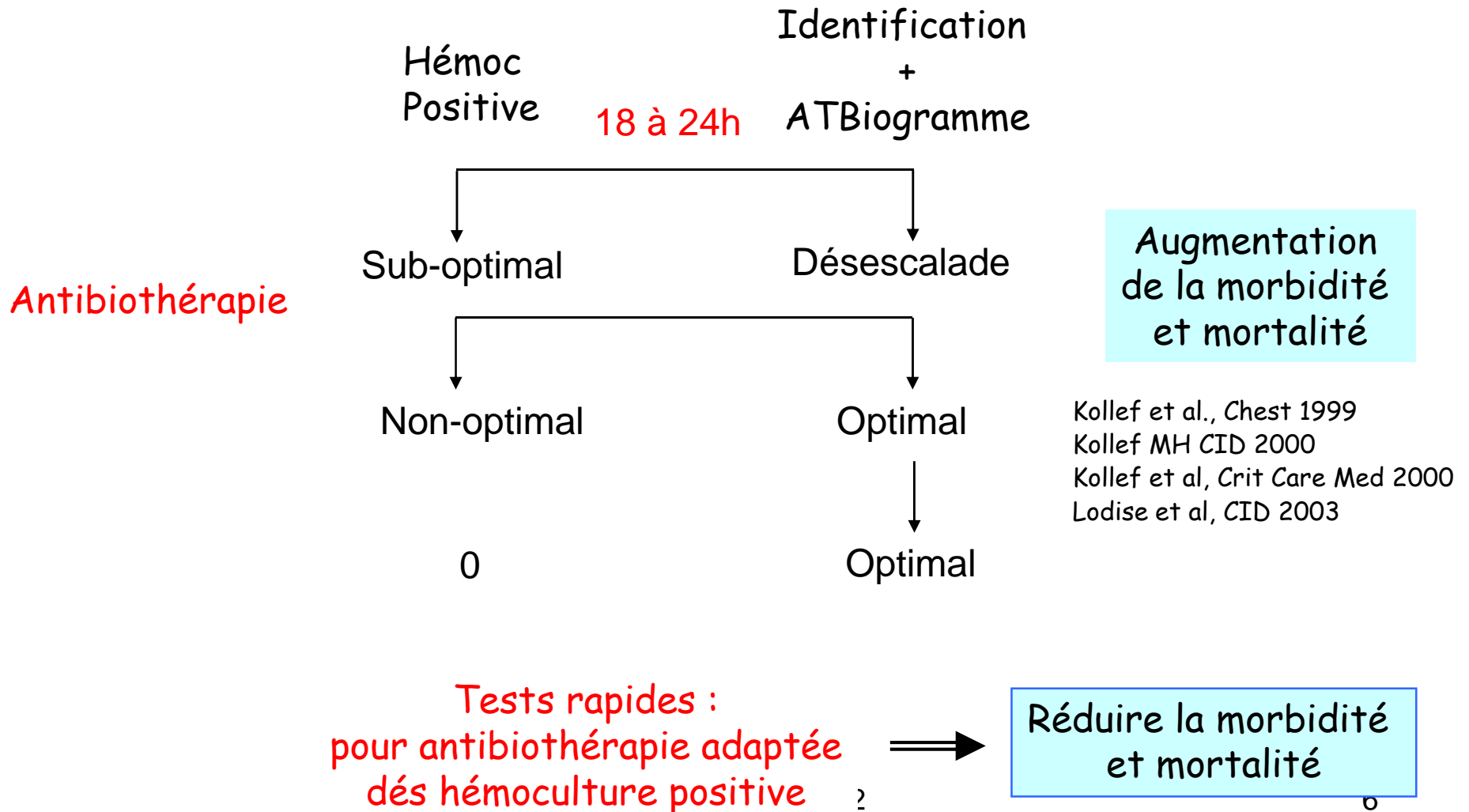
‡Includes 3 *Listeria monocytogenes*, 3 *Abiotrophia* spp., 2 *Aerococcus* spp., 2 *Rothia* spp., 2 *Gemella* spp., and 1 *Dermabacter hominis*.

# Etapes de prise en charge d'une hémoculture au laboratoire de bactériologie

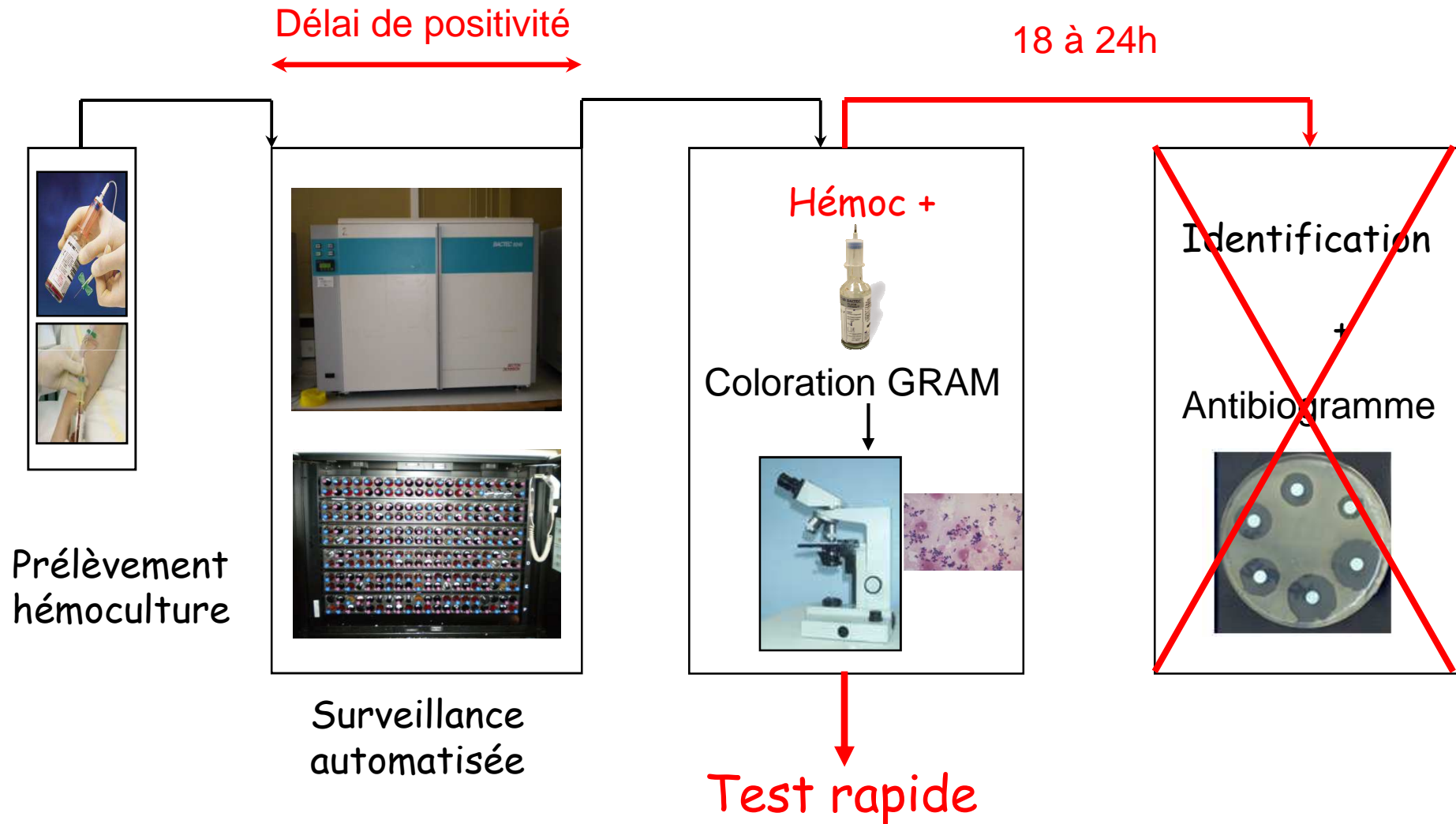


Surveillance automatisée

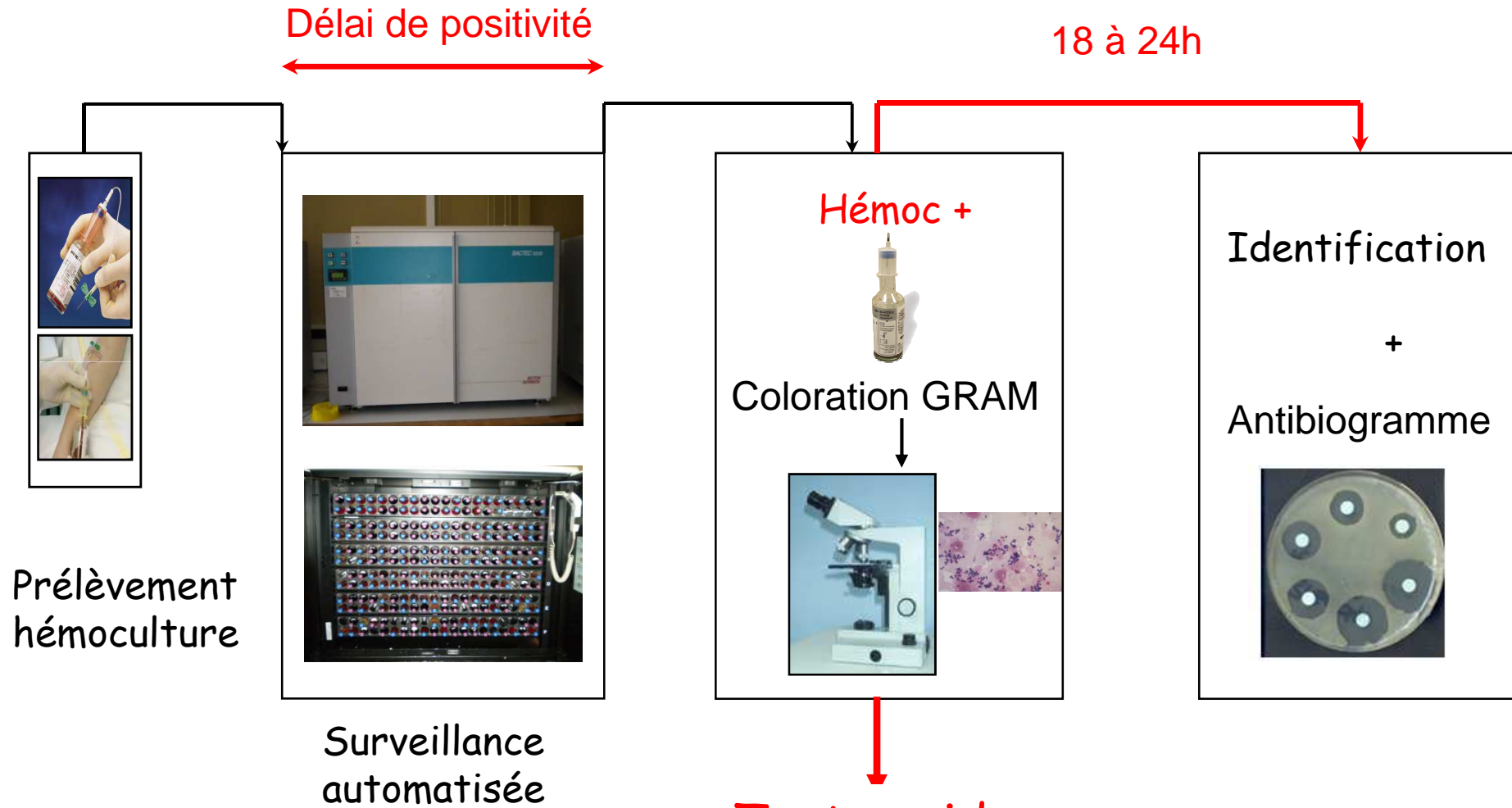
Objectif des tests rapides pour Hémoculture positive réduire le délai de 18 à 24h après hémoculture détectée positive



# Place des tests rapides pour une hémoculture positive



# Place des tests rapides pour une hémoculture positive



J. Clau **Test rapide =  
Test supplémentaire et ciblé** 8



# Place des GRAM positif dans les hémocultures positives

Pien et al., 2010, Amer J Med

**Table 2** Microorganisms Isolated from Positive Adult Blood Cultures at DUMC, DVAMC, and RWJUH, 2004

Microorganism	Total Isolates	True Bloodstream Infection		Contaminant		Unknown Clinical Significance	
	n	n	%	n	%	n	%
Coagulase-negative staphylococci	1005	105	10	828	82	72	7
<i>Staphylococcus aureus</i>	339	315	93	4	1	20	6
<i>Enterococcus</i> spp.*	203	128	63	23	11	52	26
Viridans group streptococci	98	29	30	54	55	15	15
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	26	26	100	0	0	0	0
$\beta$ -hemolytic streptococci†	32	31	97	0	0	1	3
<i>Corynebacterium</i> spp.	86	7	8	76	88	3	3
<i>Bacillus</i> spp.	33	0	0	33	100	0	0
<i>Micrococcus</i> spp.	14	0	0	14	100	0	0
<i>Lactobacillus</i> spp.	10	4	40	6	60	0	0
Other Gram-positive bacteria‡	13	3	23	9	69	1	8
<i>Escherichia coli</i>	175	170	97	1	1	4	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	118	112	95	1	1	5	4
<i>Enterobacter cloacae</i>	46	0	0	0	0	3	7
<i>Serratia marcescens</i>	42	0	0	0	0	3	7
<i>Proteus mirabilis</i>	25	0	0	0	0	0	0
Other Enterobacteriaceae	62	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52	2	4	2	4	0	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11	8	73	0	0	3	27
<i>Acinetobacter baumannii</i>	15	10	67	0	0	5	33
Other Gram-negative bacteria§	22	12	55	5	23	5	23
<i>Clostridium</i> spp.	25	16	64	6	24	3	12
<i>Propionibacterium</i> spp.	35	1	3	33	94	1	3
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	13	5	38	4	31	4	31
Other Gram-positive anaerobic bacteria	4	3	75	1	25	0	0
<i>Bacteroides</i> spp.	35	34	97	0	0	1	3
Other Gram-negative anaerobic bacteria¶	8	7	88	0	0	1	13
<i>Candida albicans</i>	46	45	98	0	0	1	2
<i>Candida glabrata</i>	32	32	100	0	0	0	0
Other <i>Candida</i> spp.**	30	30	100	0	0	0	0
Other fungi††	7	5	71	1	14	1	14
<i>Mycobacterium</i> spp.‡‡	7	7	100	0	0	0	0
All microorganisms	2669	1364	51	1101	41	204	8

72,5%  
GRAM +

49,3%  
GRAM +

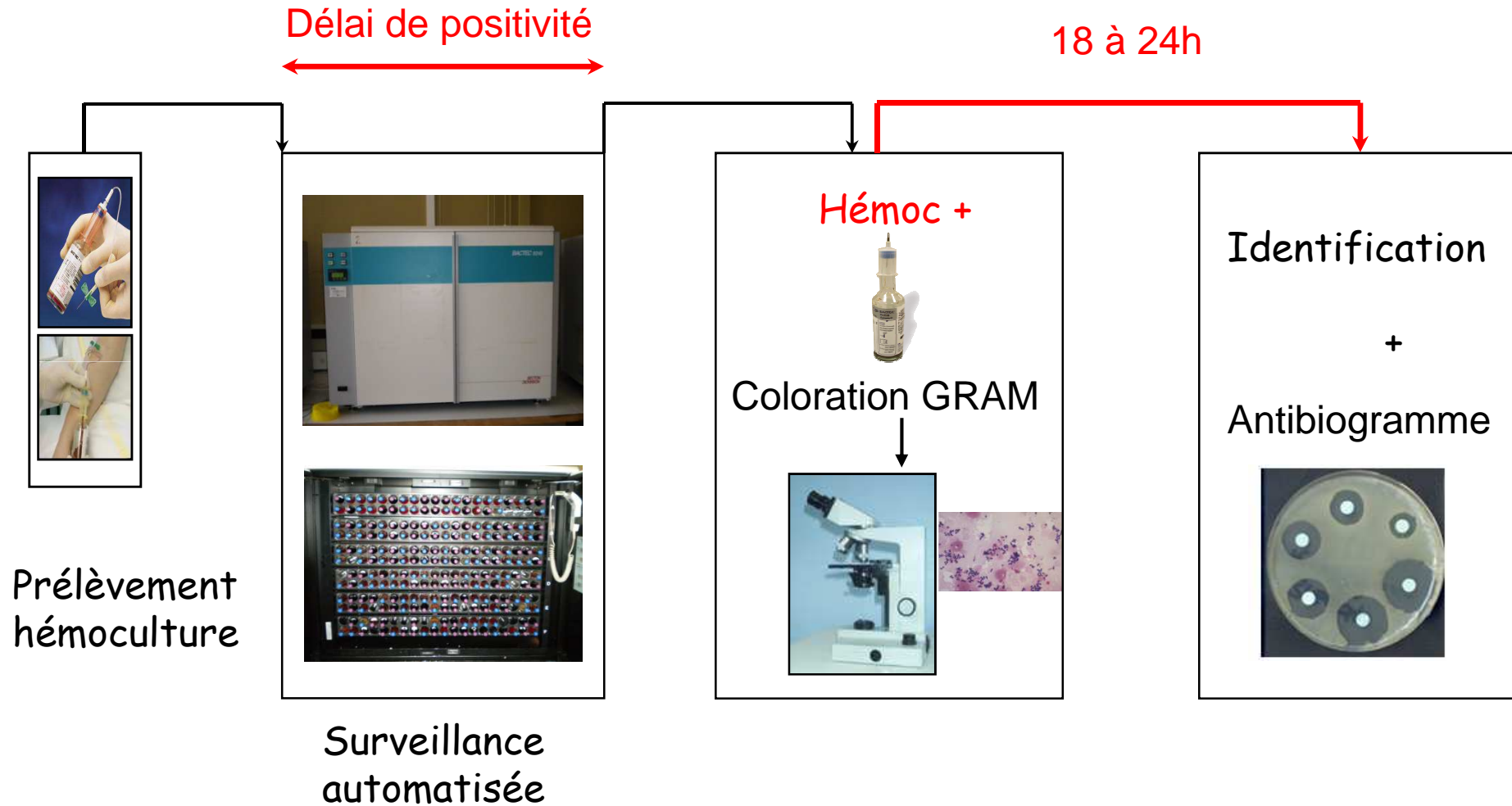
DUMC = Duke University Medical Center; DVAMC = Durham Veteran Affairs Medical Center; RWJUH = Robert Wood Johnson University Hospital.

\*Includes 101 *E. faecalis*, 80 *E. faecium*, 2 *E. gallinarum*, 1 *E. avium*, 19 *Enterococcus* spp.

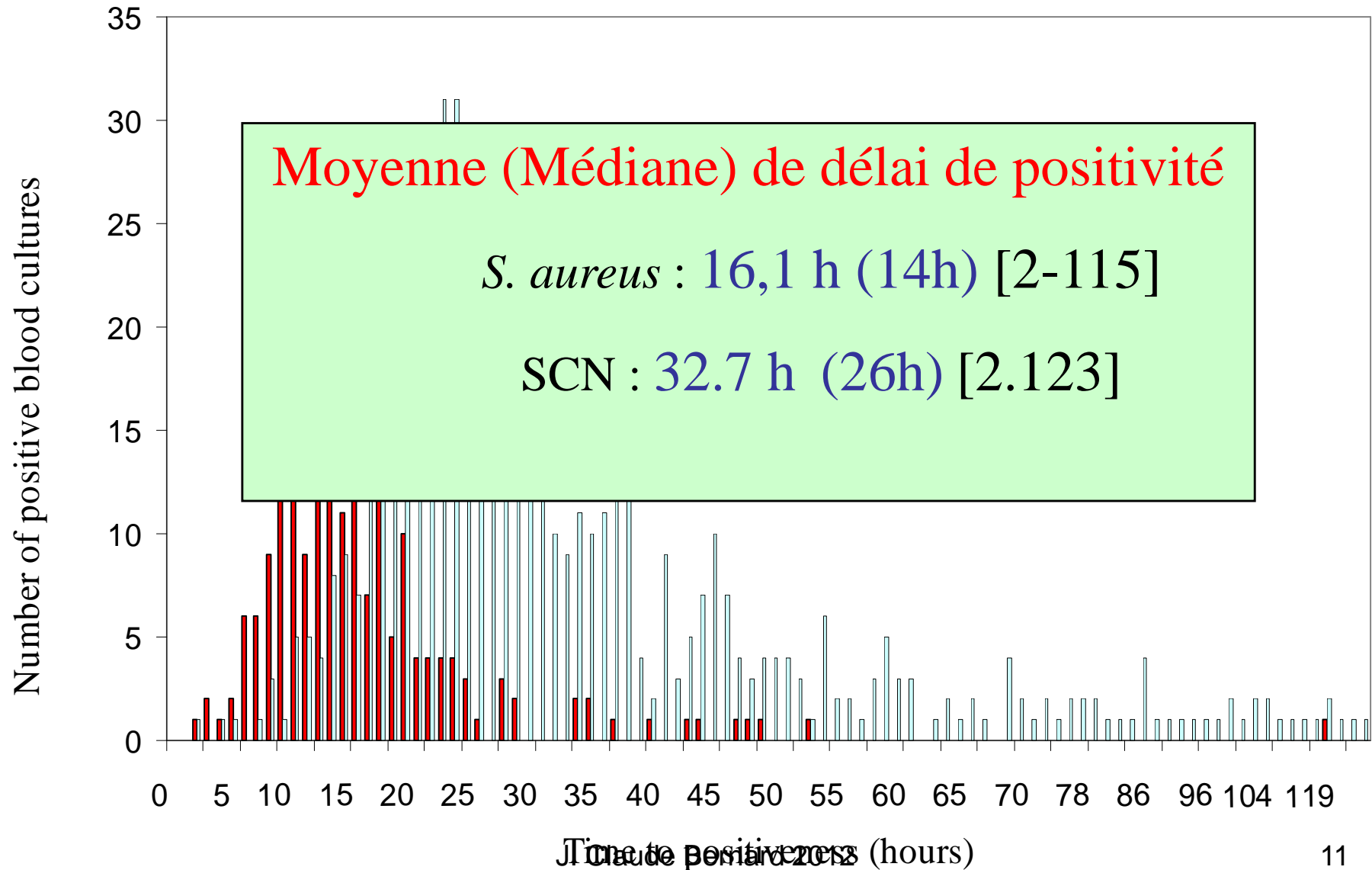
†Includes 17 *Streptococcus agalactiae*, 6 group G streptococci, 5 *S. pyogenes*, 3 group F streptococci, and 1 *S. equinus*.

‡Includes 3 *Listeria monocytogenes*, 3 *Abiotrophia* spp., 2 *Aerococcus* spp., 2 *Rothia* spp., 2 *Gemella* spp., and 1 *Dermabacter hominis*.

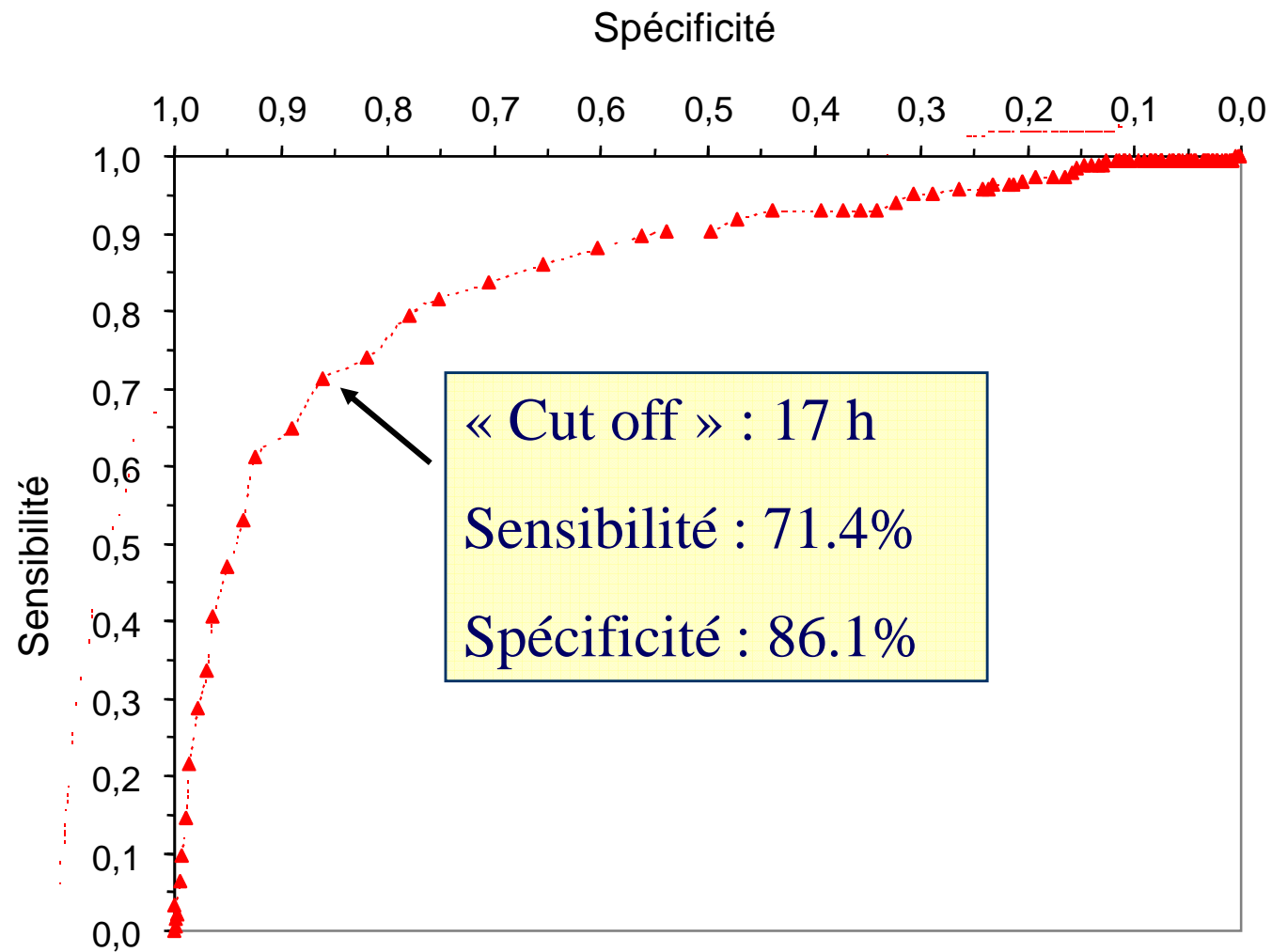
# Place des tests rapides pour une hémoculture positive



Délai de positivité de la 1ère Hémoculture à CGPA  
De 790 patients consécutifs (2ans).



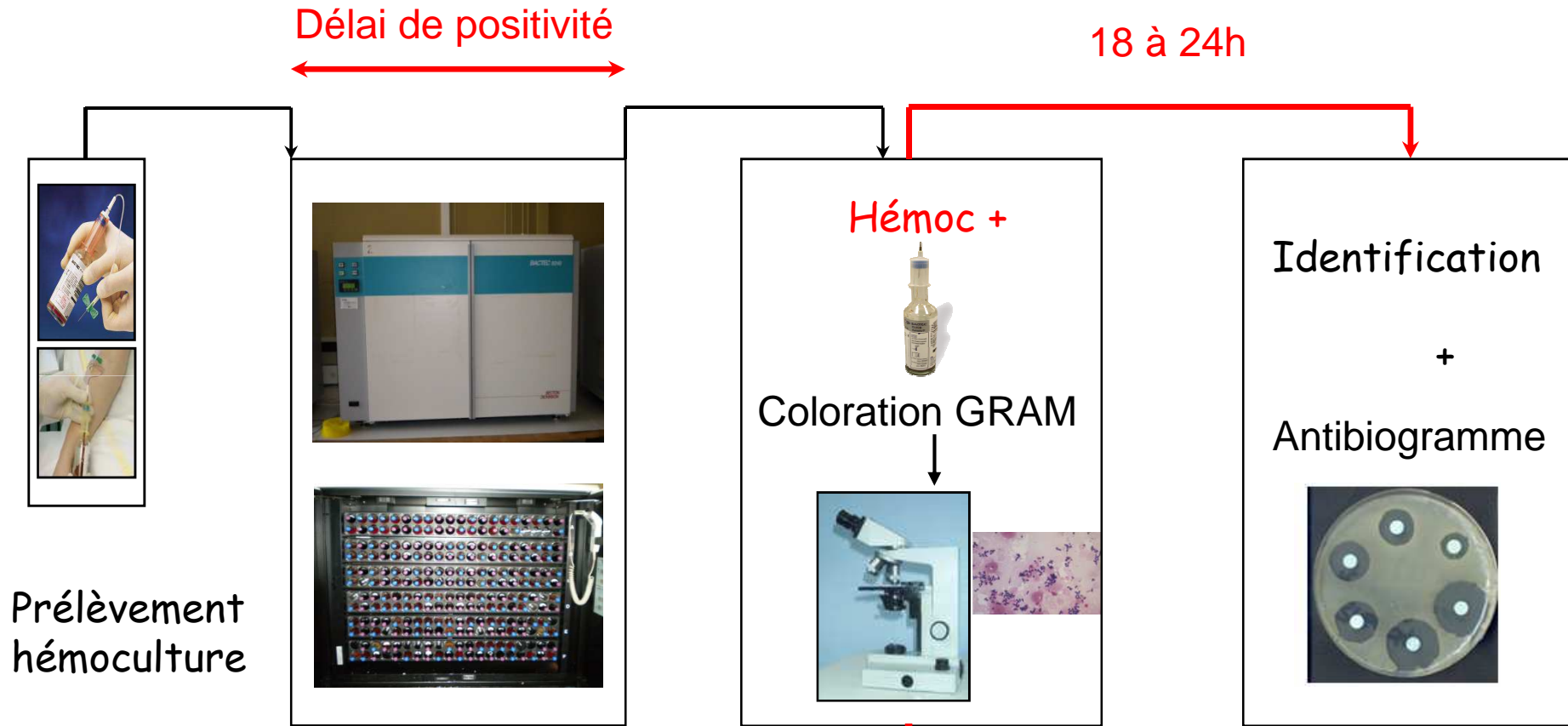
## Courbe ROC de la présence de *S. aureus* dans les hémocultures à CGPA



Valeur prédictive à différents intervalles de délai de positivité pour la présence de *S. aureus* or de SCN dans la 1ère Hémoculture positive à cocci gram positif en amas

Intervalles de délai de positivité (h)	Nombre (%) de patients		Predictive Value (Likelihood Ratios) for	
	Avec la 1ère hémoc +		<i>S. aureus</i>	CNS
	<i>S. aureus</i>	CNS		
2-9	40 (21.6)	8 (1.3)	83.3 (16.4)	16.7 (0.06)
10-13	47 (25.4)	22 (3.7)	68.1 (7)	31.9 (0.14)
14-17	45 (24.3)	54 (8.9)	45.5 (2.7)	54.5 (0.37)
>18	53 (18.9)	521 (32.2)	9.2 (0.3)	90.8 (3.01)

# Place des tests rapides pour une hémoculture positive



Test rapide =

J. Clau Test supplémentaire et ciblé 4

# Tests rapides à partir du flacon hémoculture positif à GRAM positif

- Sur PCR en temps réel
  - Multiplex
  - niché et multiplex

Ciblé

sur une ou plusieurs espèces  
Et sur des gènes de résistance

- Sur spectrophotométrie  
de masse

Universelle

sur l'identification  
Mais pas sur résistance

# Tests rapides à partir du flacon hémoculture positif à GRAM positif

• Sur PCR en temps réel

- Multiplex

- niché et multiplex

Maison ou commercialisée

Commercialisée et  
en cours d'évaluation

Ciblé

sur une ou plusieurs espèces

Et sur des gènes de résistance



## Étapes pour l'identification de *S. aureus* et de la détection de *mecA* dans les hémoc + à CGPA par PCR triplex en temps réel

### - Lysats d'ADN sur hémoculture

Lavage/centrifugation et lyse mécanique  
par billes

➔ *Temps pour l'extraction : 10 min*

### - PCR triplex en temps réel( Taqman, Applied Biosystems):

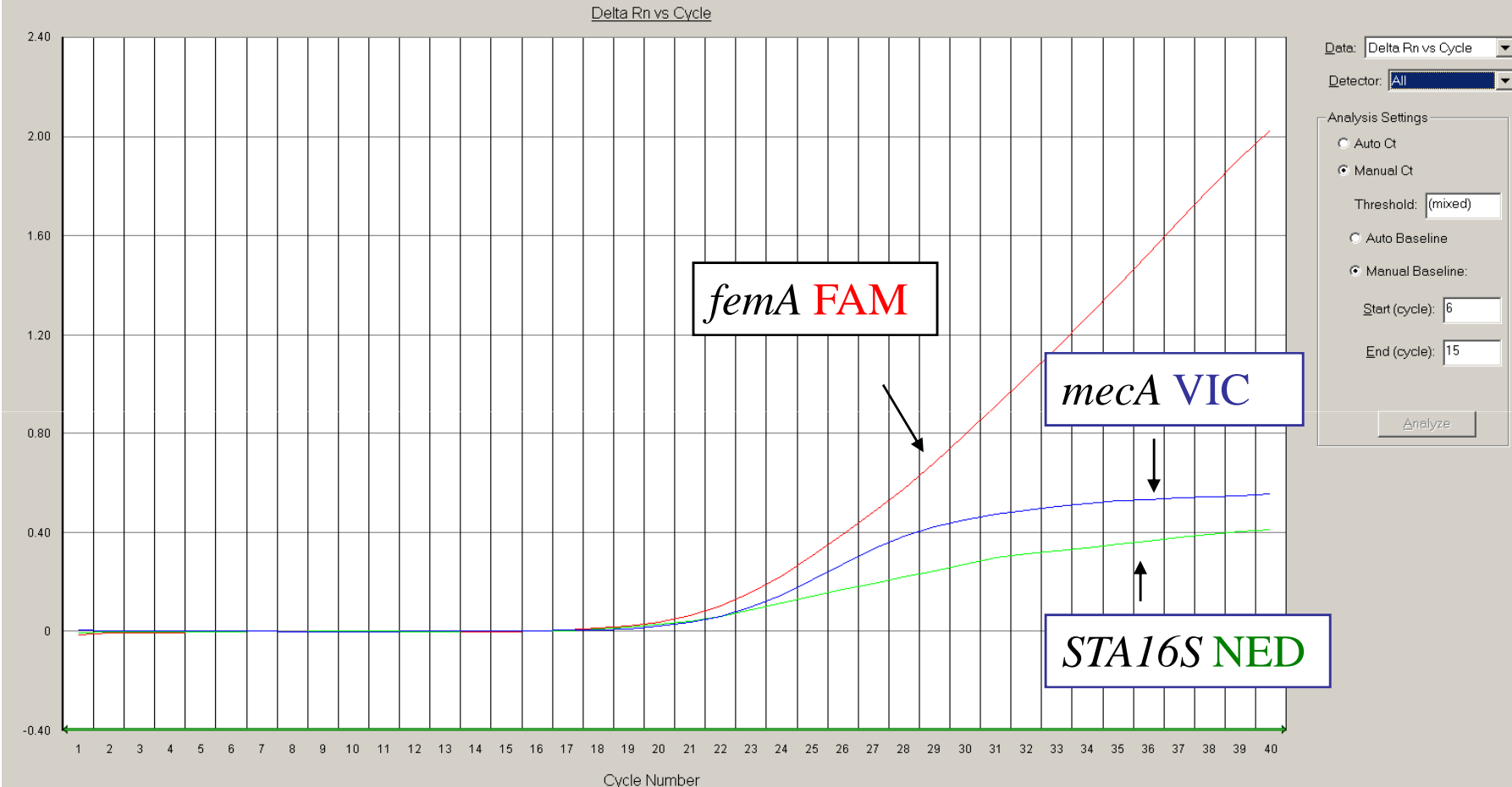
- *femA* est spécifique de *S. aureus*
- *mecA* est présent chez SCN et SARM,
- STA 16S est spécifique de staphylocoque

➔ *Temps technique pour l'amplification : 1h 15*

Résultat :  
- de 1 h 30

# Détection de *femA*, *mecA*, et STA16S dans une hémoculture contenant un SARM

Prism 7000 SDS Soft  
View Tools Instrum  
Instrument Result  
Spectra Compon



Data: Delta Rn vs Cycle  
Detector: All  
Analysis Settings:  
 Auto Ct  
 Manual Ct  
Threshold: (mixed)  
 Auto Baseline  
 Manual Baseline:  
Start (cycle): 6  
End (cycle): 15  
Analyze

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
U	U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U
U	U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U
U	U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U
U	U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U
U	U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U	U U U

TABLE 2. Comparison of the results of triplex RT-PCR and phenotypic identification with the results for methicillin susceptibility tests for the various types of bacteria present in bottles containing BCs from 410 patients with gram-positive cocci on DSE

Bacteria detected by phenotypic methods (no. of positive BCs)	No. of BCs positive for the indicated bacteria detected by RT-PCR <sup>a</sup>				
	MSSA	MRSA	MS-CoNS	MR-CoNS	Species other than staphylococci
MSSA (66)	66	0	0	0	0
MRSA (31)	0	31	0	0	0
MS-CoNS (113)	0	0	109	4	0
MR-CoNS (188)	0	0	0	188	0
<i>Micrococcus</i> spp. (7)	0	0	0	0	7
MRSA + MSSA (1)	0	1	0	0	0
MR-CoNS + MS-CoNS (4)	0	0	0	4	0

<sup>a</sup> Determined by the amplification of *mecA*, *femA*, and the *rrs* signature of staphylococci, respectively, as follows: negative, positive, and positive for MSSA; positive, positive, and positive for MRSA; negative, negative, and positive for MS-CoNS; positive, negative, and positive for MR-CoNS; and negative, negative, and negative for species other than staphylococci.

TABLE 3. Characteristics of antibiotic treatments received after disclosure of DSE results for 39 patients with true BBSI who might have benefited from the fast availability of triplex RT-PCR results

Antibiotic treatment	No. of patients treated for indicated BBSI			
	MSSA (n = 26)	MRSA (n = 5)	MS-CoNS (n = 7)	MR-CoNS (n = 1)
Suboptimal Vancomycin	21		5	
Nonoptimal Oxacillin		3		
Cefotaxime		1		
Piperacillin-tazobactam				1
Amoxicillin	1			
None	4	1	2	
	36% (31/86 <i>S. aureus</i> )		23% (8/35 SCN)	

© Claude Bernard 2012

... La « PCR en temps réel avec extraction intégré » ...

*Extraction*

SA/SARM BC

GeneXpert.

BCR-ABL Assay

35 40 Cycle

**Tout intégré** 12

# Facilité de mise en oeuvre

Pus, liquides  
articulaires

Muscles, os,  
synoviale

## Inconvénient :

- Prix élevé de l'automate
- Prix consommable 40 à 50 Euros/test



# Evaluation médico-économique du Kit GeneXpert MRSA/ SA blood

**Table 2. Demographic and Clinical Characteristics of Patients in the Study Groups**

Characteristic	Pre-rPCR period (n = 74)	Post-rPCR period (n = 82)	P <sup>a</sup>
Age, mean years ± SD	57 ± 16.7	56 ± 16.0	.51
Male sex	43 (58)	40 (49)	.26
Penicillin allergy	9 (12)	10 (12)	.60
Surgical service	24 (32)	10 (12)	.003
ICU <sup>b</sup>	49 (66)	55 (67)	>.99
MRSA infection	44 (59)	37 (45)	.08
ID consult	41 (55)	49 (60)	.63
Time to ID consult, mean days ± SD (n = 90)	9 ± 16.4	3 ± 2.4	.05
Hospital mortality	19 (26)	15 (18)	.33
Hospital costs by department			
Pharmacy, mean USD ± SD	10,375 ± 21,221	7457 ± 13,250	.08
Microbiology laboratory, mean USD ± SD	6806 ± 10,290	5081 ± 6677	.13
Room and board			
ICU, mean USD ± SD	27,667 ± 35,777	17,737 ± 21,464	.03
Non-ICU, mean USD ± SD	12,210 ± 13,741	10,117 ± 10,932	.32
Other <sup>c</sup> , mean USD ± SD	25,464 ± 36,633	16,400 ± 20,031	.02
<b>Total hospital costs, mean USD ± SD (n = 154)</b>	<b>69,737 ± 96,050</b>	<b>48,350 ± 55,196</b>	<b>.03</b>

**NOTE.**Data are no. (%) of patients, unless otherwise indicated. Reported hospital costs are representative of total pharmacy, microbiology laboratory, and room and board cost. ICU, intensive care unit; ID, infectious diseases; rPCR, methicillin-resistant *S. aureus*/*S. aureus* blood culture test; SD, standard deviation; USD, United States dollars.

<sup>a</sup> P values were determined by Fisher's exact test or Wilcoxon rank-sum test as appropriate.

<sup>b</sup> ICU stay at anytime during hospitalization.

<sup>c</sup> Includes all hospital costs not previously described, including operating room services, imaging services, and medical and surgical supplies.



# Tests rapides à partir du flacon hémoculture positif à GRAM positif

• Sur PCR en temps réel

- Multiplex

- niché et multiplex

Maison ou commercialisée

Commercialisée et  
en cours d'évaluation

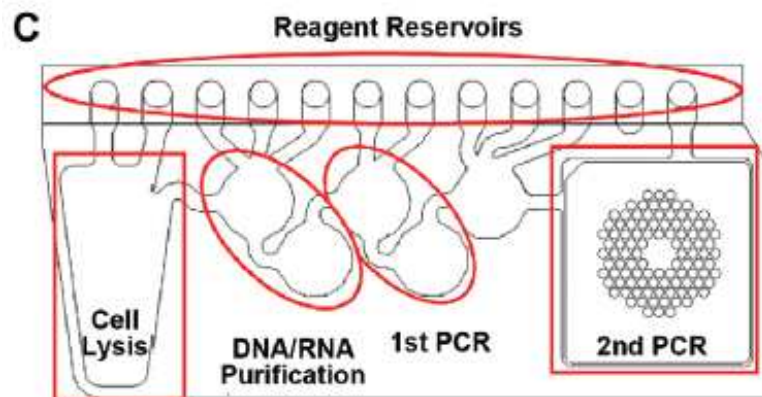
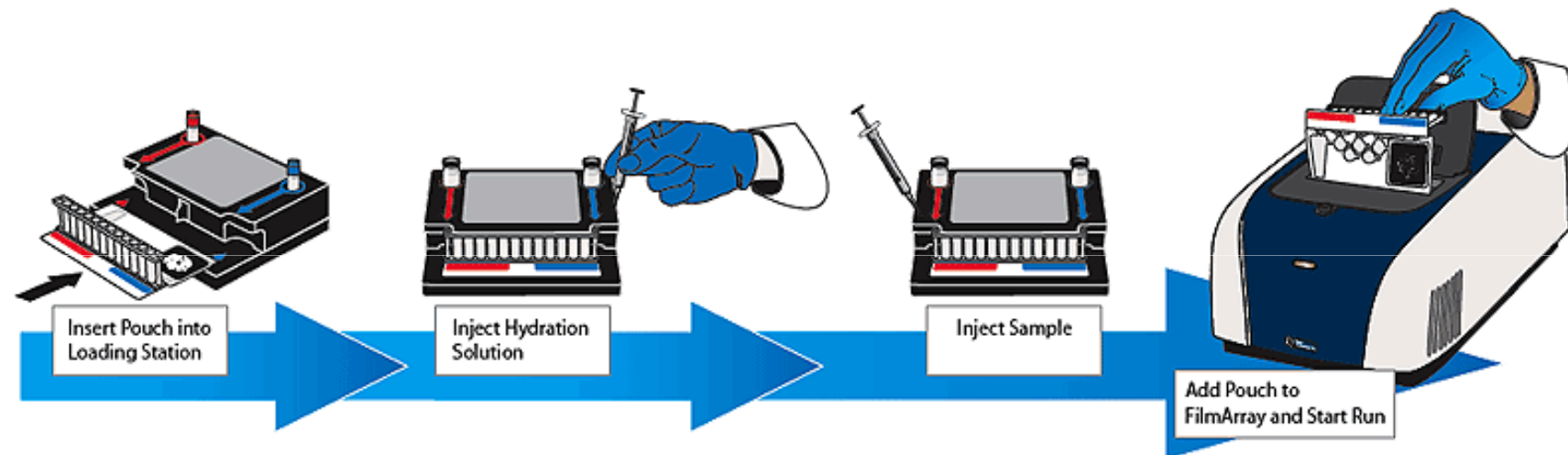
Ciblé

sur une ou plusieurs espèces

Et sur des gènes de résistance



# « Film array » PCR niché et multiplex automatisé intégrant l'extraction : test en 1 h



Poritz et al, PLoS One, 2011  
21 virus et bactéries respiratoires

Blascke et al, Diag Microbiol Infect Dis, 2012

Jude Bernard 2012

25

# Détection de plus 25 espèces et 4 gènes de résistance

**Table 1**  
Organisms contained within the developmental FilmArray BC panel.

Organism	Gene 1	Gene 2
Gram positive		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	lytA	rpoB
<i>Streptococcus agalactiae</i>	sip	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	speB	
<i>Streptococcus</i> spp. <sup>a</sup>	rpoB	
<i>Staphylococcus aureus</i>	nuc	rpoB
Coagulase-negative staphylococci <sup>b</sup>	rpoB	
<i>Enterococcus</i> spp. <sup>c</sup>	rpoB	
<i>Listeria monocytogenes</i>	rpoB	
Gram negative		
<i>Escherichia coli</i>	gyrB	ompA
<i>Klebsiella oxytoca</i>	gyrB	ompA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	gyrB	ompA
<i>Enterobacter cloacae</i>	gyrB	ompA
<i>Serratia marcescens</i>	gyrB	ompA
Enterobacteriaceae <sup>d</sup>	ompA	
<i>Neisseria meningitidis</i>	ctrA	
<i>Haemophilus influenzae</i>	rpoB	bexA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	gyrB	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	tusA	rpoB
Yeast		
<i>Candida albicans</i>	ACT	
<i>Candida non-albicans</i> <sup>e</sup>	RPB-1	
Antibiotic resistance		
Methicillin	mecA	
Vancomycin <sup>*</sup>	vanA	vanB
Carbapenem	bla <sub>KPC</sub>	

\* *vanC* gene included in panel used for the validation study, but subsequently removed.

<sup>a</sup> Streptococcal species included for primer design were as follows: *S. pneumoniae*, *S. parasanguinis*, *S. anginosus*, *S. salivarius*, *S. pyogenes*, *S. uberis*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. equinus*, *S. gordonii*, and *S. gallolyticus*.

<sup>b</sup> Coagulase-negative staphylococci included for primer design were as follows: *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. koosii*, *S. sacrolyticus*, *S. nepalensis*, *S. microti*, *S. simiae*, and *S. lugdunensis*.

<sup>c</sup> Enterococcal species included for primer design were as follows: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, and *E. gallinarum*.

<sup>d</sup> Enterobacteriaceae included for primer design were as follows: *E. coli*, *E. hermannii*, *E. fergusonii*, *Shigella sonnei*, *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *C. freundii*, *Salmonella enterica*, *S. typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. sakazaki*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, and *Serratia marcescens*.

<sup>e</sup> Non-albicans candida included were as follows: *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*.

# Sensibilité et spécificité sur Hémoculture positive

Table 3

Prospectively

Organism	Sensitivity (95% CI)
Total	90)
<i>S. pneumoniae</i>	100)
<i>S. agalactiae</i>	100)
<i>S. pyogenes</i>	100)
<i>Streptococcus</i>	100)
<i>S. aureus</i>	100)
CONS	100)
<i>Enterococcus</i>	100)
<i>E. coli</i>	100)
<i>K. oxytoca</i>	100)
<i>K. pneumoniae</i>	100)
<i>S. marcescens</i>	100)
Enterobacte	100)
<i>P. aeruginos</i>	100)
<i>A. baumannii</i>	100)
<i>C. albicans</i>	100)
Candida non	100)
Not in panel	
Negative	
AhxR	
mecA (MRS)	100)
vanA/B (VR)	100)

Avantages :

Test : multiparamétrique

intégrant l'extraction, résultat en 1h

Bonne sensibilité et spécificité

Inconvénient :

coût = 100 euros/test

Évaluation médico-économique non réalisée

\* Not count

\*\* In 2 cases,

missed organi

<sup>5</sup> Less than

<sup>a</sup> Identified

<sup>b</sup> Not ident

<sup>c</sup> Culture po

<sup>d</sup> Two episc

<sup>e</sup> Gram stai

<sup>f</sup> *S. aureus* c

<sup>g</sup> Culture ne

<sup>h</sup> Cross-read

<sup>i</sup> Confirmed by standard PCR and sequencing as *S. mitis/oralis*.

<sup>†</sup> Missed organism in a dual-positive culture.

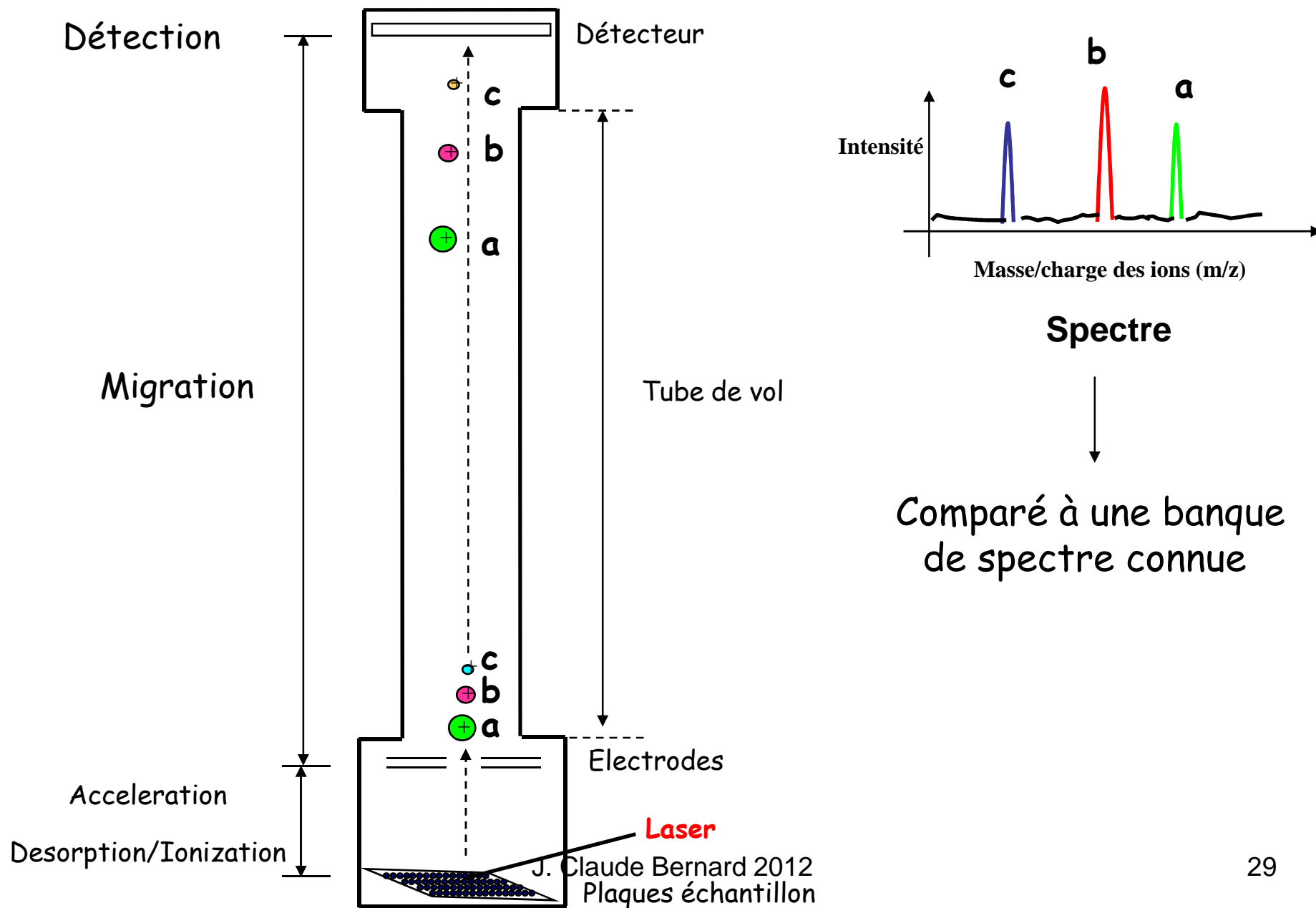
t counted as a

# Tests rapides à partir du flacon hémoculture positif à GRAM positif

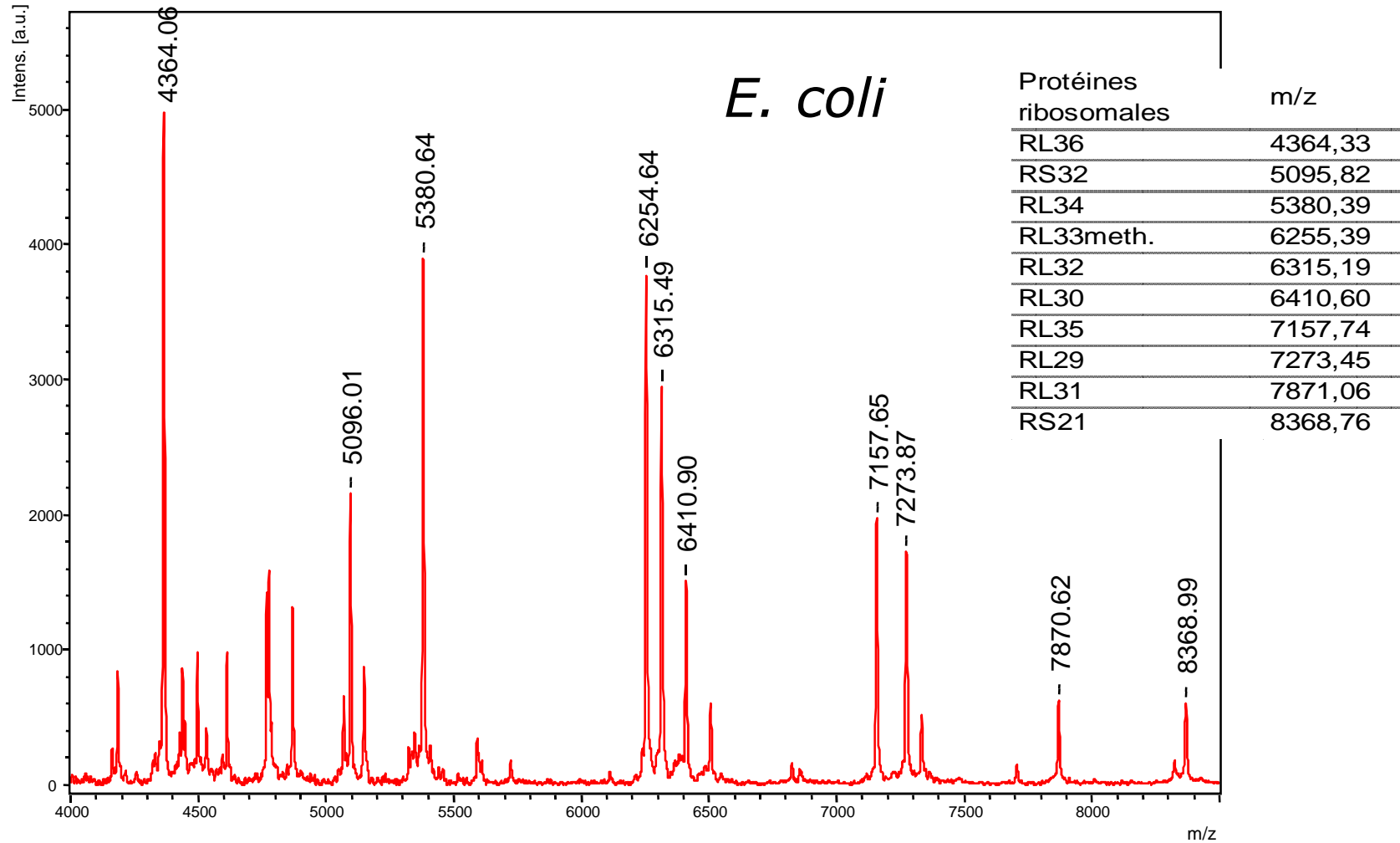
- 
- ```
graph TD; A[Tests rapides à partir du flacon hémoculture positif à GRAM positif] --> B[• Sur spectrophotométrie de masse]; B --> C[Universelle sur l'identification Mais pas sur résistance];
```
- Sur spectrophotométrie de masse

Universelle  
sur l'identification  
Mais pas sur résistance

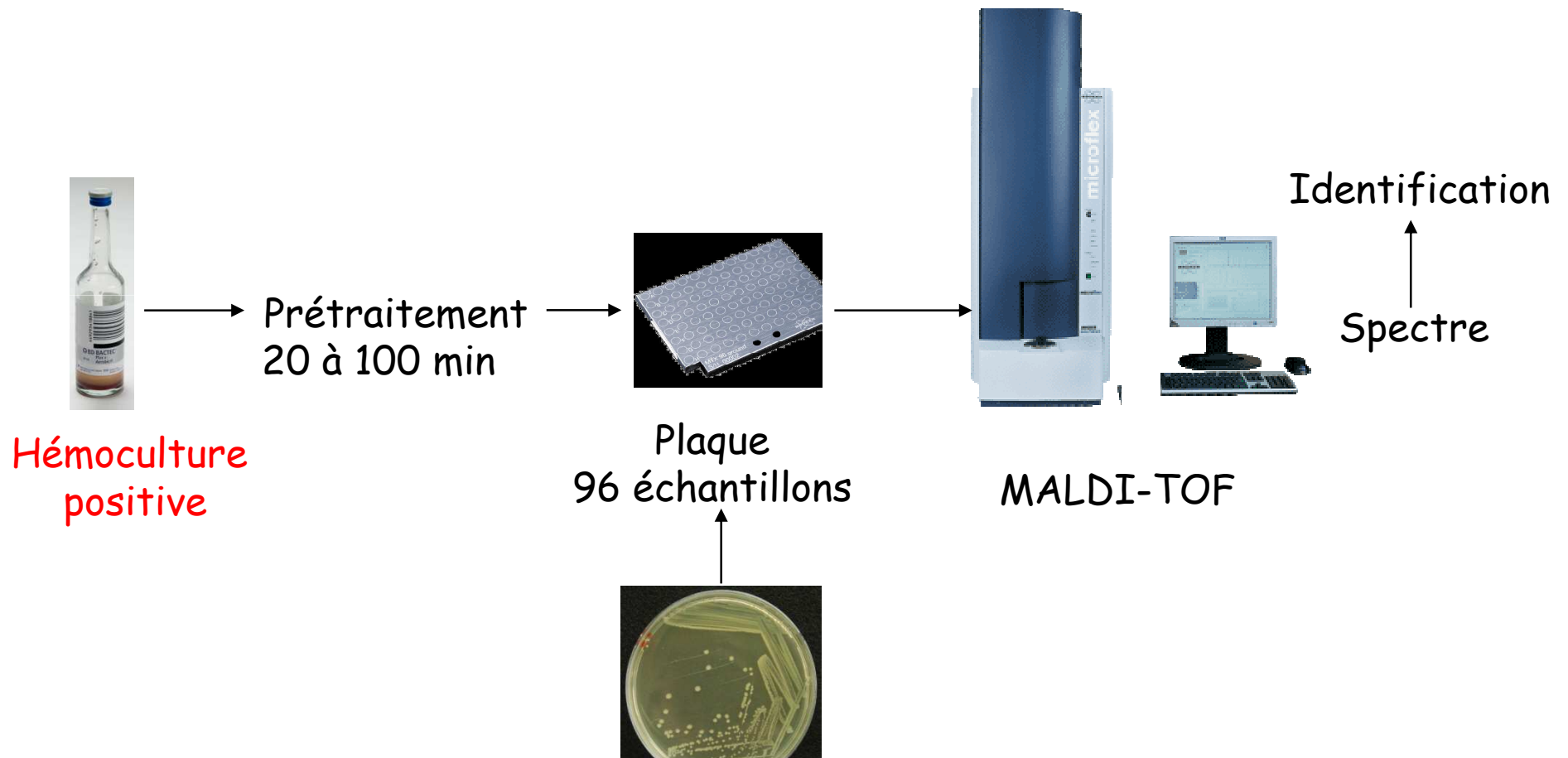
# Principe de la spectrophotométrie de masse type MALDI-TOF



# Exemple d'un spectre de *Escherichia coli*



# Application du MALDI-TOF pour les hémocultures positives



# Etudes de performances du MALDI-TOF sur Hémocultures positives à GRAM positif

## Identification

au niveau du genre : 64,8% à 95%

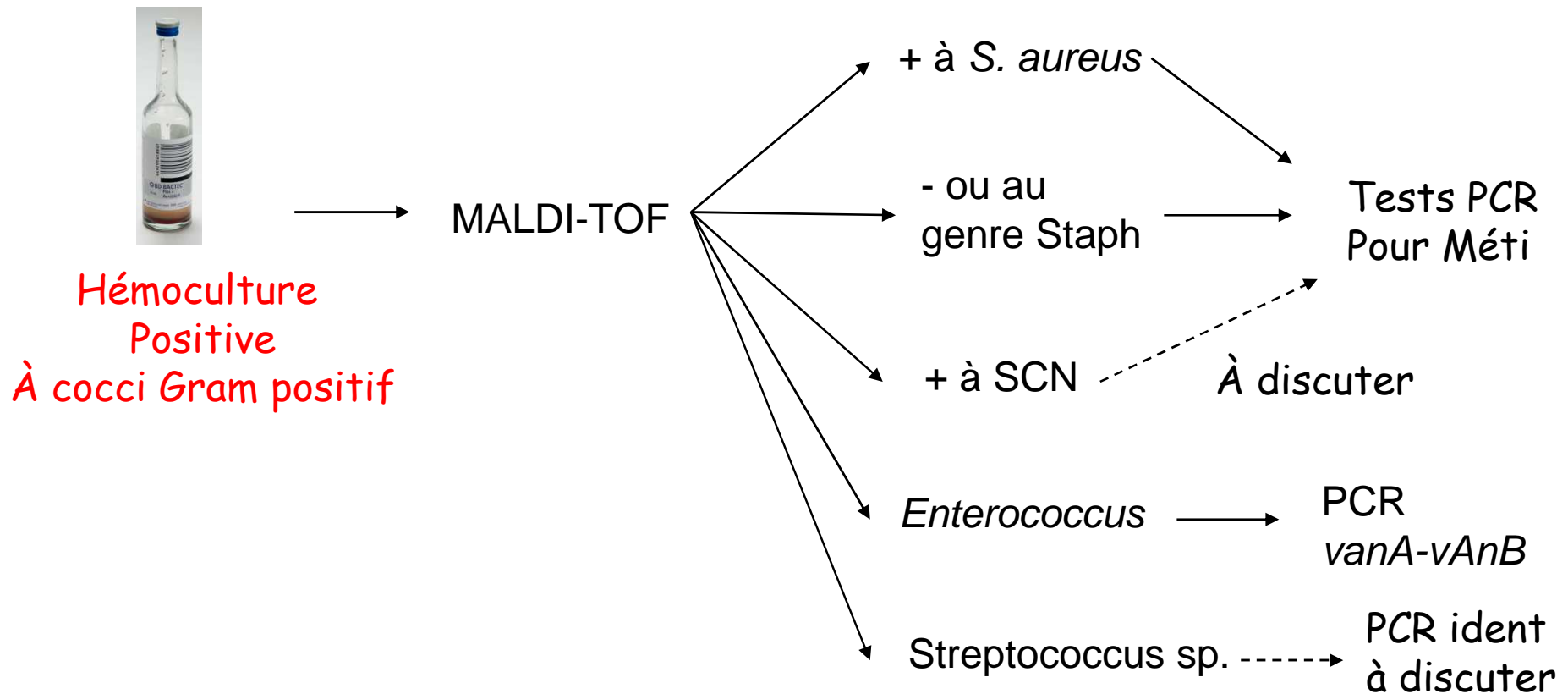
au niveau de l'espèce : 31,8% à 94%

Mauvaise identification pour les streptocoques,  
ne fait pas à ce jour de différence entre  
*Streptococcus pneumoniae* et autres Streptocoques

- Ferroni et al, J Clin Microbiol. 2010; Prod'hom et al, J Clin Microbiol. 2010
- Stevenson et al, J Clin Microbiol. 2010; Christner et al, J Clin Microbiol. 2010
- Ferreira et al, Clin Microbiol Infect. 2011; La Scola et al, PLoS One. 2009



# Schéma de prise en charge d'une hémoculture positive



# Conclusions

- Hémocultures positives à GRAM positif représente presque 70% des hémocultures dû à des contaminants de SCN
- Les tests diagnostic rapides sont nécessaires pour mettre une antibiothérapie adaptée plus précoce
- Identification par MALDI-TOF a sa place pour éviter le surcôt de tests moléculaires
- La place des tests multiparamétriques reste à définir par des études médico-économiques