

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 13/10/2020  
Par M. Guillaume CHARLET**

**conformément aux dispositions réglementaires en vigueur  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Réalisation de l'antibiogramme direct en milieu liquide automatisé Vitek® 2 à partir des  
bouillons d'hémocultures positifs : étude multicentrique**

---

**Membres du jury :**

**Présidente :** Madame le Professeur Anne GOFFARD

**Assesseurs :** Monsieur le Professeur Boualem SENDID  
Madame le Docteur Anne-Cécile HOCHART  
Monsieur le Docteur Frédéric WALLET

**Directeur de thèse :** Monsieur le Docteur Christian CATTOEN





## Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDE

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL

M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique

M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

### Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique

Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique

M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOThIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle

Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

### ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

## ***Faculté de Pharmacie de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



A ma présidente de thèse :

**Madame le Professeur Anne GOFFARD**

*Je vous remercie de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse et d'évaluer mon travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.*



A mon directeur de thèse :

## **Monsieur le Docteur Christian CATTOEN**

*Pour m'avoir accueilli dans de votre laboratoire et avoir accepté de diriger cette thèse. Pour votre encadrement, vos directives et votre pédagogie. Je tiens à vous témoigner mon profond respect et ma gratitude. Merci !*



Aux membres de mon jury :

## **Monsieur le Professeur Boualem SENDID**

*Pour avoir accepté de juger ce travail. Je suis sensible à l'attention que vous porterez à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.*



## **Madame le Docteur Anne-Cécile HOCHART**

*Pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Pour ta gentillesse, ta bienveillance et ton accompagnement lors de mon semestre à Armentières. Merci beaucoup.*



## **Monsieur le Docteur Frédéric WALLET**

*Vous me faites l'honneur de vous intéresser à ce travail et d'accepter de le juger.  
Je vous exprime ma plus sincère considération et vous prie d'accepter mes sincères  
remerciements.*



A ceux qui ont participé à ce travail :

*L'équipe de biologistes et techniciens du laboratoire de Valenciennes.*

*Au Dr N Wilhelm et l'équipe de techniciens du laboratoire de Cahors.*

*Au Dr H Poupet, Dr A Doloy et l'équipe de techniciens du laboratoire de Cochin.*

*Au Dr S Hendricx et l'équipe de techniciens du laboratoire de Douai*

*Au Dr A Carricajo, Dr M Lleres-Vadeboin et l'équipe de techniciens du laboratoire de  
St Etienne.*

*Au Dr L Prots et l'équipe de techniciens du laboratoire Cerballiance Côte d'Azur.*

*Au Dr E Chanard et l'équipe de techniciens du laboratoire Cerballiance Lyon.*

*La société BIOFORTIS qui a réalisé l'analyse statistique de cette thèse.*

*Agnès, Béatrice et Marion pour la relecture et les corrections apportées.*



*A mes parents qui m'ont toujours soutenue dans les études et la vie, pour leurs précieux conseils et leur joie de vivre.*

*A ma famille, mes grand-mères exceptionnelles, mes oncles et tantes, les tontons flingueurs, parrain, marraine, cousins et cousines, mon frère et ma sœur, pour nos moments partagés et les nombreux à venir.*

*A mes amis de la faculté de Pharmacie et compagnons de galère, Adrien, Aurélien, Guilhem, Harold, Dimitri, Béranger, Bérangère, Tom, Anthony, Olivier etc etc etc.*

*Aux amis Pharma de toute la France pour les nombreux moments de rigolade.*

*A Arnaud et Sarah qui m'ont fait découvrir la biologie médicale et sans qui je ne serai pas là.*

*A tous mes co-internes et collègues qui ont égaillés chaque stage, chaque garde, Rémy, Julien, Valentin, Malo, Morgan, Nicolas, Vicky, Romane, Laëtitia, Daniela, Camille, Victoria, Adélaïde, Isabelle, Gauthier, Imelda, Julien, Alan, Doriane, Shanti, Ryane, Amélie, Sophie, Alex, Geoffrey, Jeanne, Léa, Quentin, Laurine, Amandine, Claire, Caroline, Marie, Félix, Scott, Arthur, Benjamin, etc.*

*A tous les techniciens et biologistes avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui m'ont appris mon métier et m'ont énormément apportés.*

*Aux compagnons de musique, Josephine, Vivien, Germain, Seb, Maxime, Puyol, Quentin, Marin, Manu, Arthur, Ari.*

*A Flowowo, pour ton aide inconditionnelle et nos nombreuses discussions.*

*Aux plus bonnes de mes copines, la coloc et famille créole, Louis, Laura, Pierre, Anouchka, Martine.*

*Aux amis de grimpette, au fameux pousse-tire-pousse.*

*Au besties, Geoffrey, Louis, Yohann, Margot, Flora.*

*A toute la clique d'El Grupo et aux Cancer, vous êtes des personnes formidables, c'est un régal de vous avoir au quotidien.*

*A Moumoune.*

*A Agnès, la femme formidable qui partage ma vie, merci pour ton soutien, les moments de bonheur partagés et les nombreux à venir.*

*« Sans musique, la vie serait une erreur »  
- Friedrich Nietzsche*



# SOMMAIRE

SOMMAIRE .....	27
LISTE DES ABREVIATIONS .....	31
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX .....	33
INTRODUCTION .....	35
GENERALITES .....	37
I.  Bactériémies .....	37
1.  Aspects cliniques .....	37
a.  Définition .....	37
b.  Physiopathologie .....	38
c.  Portes d'entrée .....	43
d.  Définitions cliniques .....	44
e.  Epidémiologie .....	48
f.  Traitements .....	55
2.  Aspects diagnostiques – hémocultures .....	58
a.  Prélèvement .....	58
b.  Milieu de culture .....	59
c.  Automate – Incubateur .....	60
d.  Prise en charge des flacons d'hémocultures positifs .....	62
e.  Interprétation des hémocultures positives .....	63
f.  Stratégies permettant d'augmenter la rapidité de la documentation .....	64
II.  Antibiogramme .....	71
1.  Méthodes .....	71
a.  Diffusion en milieu solide .....	72
b.  Antibiogramme automatisé .....	73
c.  Mesure de la CMI .....	75
2.  Référentiels : EUCAST – CASFM/EUCAST .....	79
a.  Aspects normatifs .....	79
b.  Référentiels et recommandations .....	79
3.  « Adaptations techniques » pour les hémocultures .....	86
a.  Ensemencement direct du bouillon d'hémoculture .....	87
b.  Méthode DRSA du CASFM/EUCAST ou RAST de l'EUCAST .....	88
c.  Antibiogramme à partir du bouillon centrifugé .....	89
d.  Milieu rapide Mueller-Hinton Rapid-SIR .....	89
4.  Qualité en microbiologie médicale .....	90

III.	Objectifs de ce travail.....	93
MATERIELS ET METHODE .....		95
I.	Cadre de l'étude .....	95
II.	Matériels .....	95
III.	Méthode.....	97
1.	Définition.....	97
2.	Aspects techniques.....	98
3.	Logiciel de saisie .....	100
4.	Exploitation .....	100
a.	Eléments comparés .....	100
b.	Modalités d'exploitation .....	104
RESULTATS.....		105
I.	Description de la population .....	105
II.	Résultats globaux .....	107
1.	Concordance catégorielle.....	107
2.	Résultats par automate .....	107
3.	Résultats par centre .....	109
4.	Résultats AES : mécanisme de résistance identifié .....	109
III.	Résultats par type de carte .....	110
1.	Entérobactérales (Carte AST-N233 + AST-XN 05).....	110
2.	Staphylocoques (Carte AST-P631).....	112
3.	Entérocoques (Carte AST-P606) .....	115
DISCUSSION .....		117
I.	Résultats principaux et leurs implications.....	117
1.	Globalement.....	117
2.	Analyse selon la norme ISO 20776 .....	117
II.	Analyse des discordances.....	118
1.	Molécules « d'intérêt » .....	118
2.	Discordance en lien avec un écart d'une seule dilution de CMI .....	119
3.	Discordances et évolution des recommandations.....	119
4.	Discordances en lien avec des sous populations.....	120
III.	Forces du travail .....	120
1.	Robustesse .....	121
2.	Intégration en routine .....	121
3.	Impact clinique .....	121
IV.	Limites de l'étude .....	122

1. Méthodologie .....	122
2. Effet centre.....	122
3. Effectifs.....	123
4. Exploitation complémentaire.....	123
V. Hypothèses et perspectives .....	124
CONCLUSIONS .....	125
BIBLIOGRAPHIE.....	127
ANNEXES.....	135



## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique  
BGN : Bacille gram négatif  
BLSE : Béta-Lactamase à Spectre Etendu  
BMR : Bactérie multi résistante  
 $\beta$ -NAD :  $\beta$ -nicotinamide adénine dinucléotide  
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie  
CH : Centre hospitalier  
CHU : Centre hospitalo-universitaire  
CMI : Concentration minimal inhibitrice  
COFRAC : Comité français d'accréditation  
COL-BVH : Collège de Bactériologie, de Virologie et d'Hygiène des hôpitaux  
CIQ : Contrôle de qualité interne  
Dm : Discordance mineure  
DM : Discordance majeure  
DMSA : Dispositif de mesure de sensibilité antimicrobienne  
DIV : Dispositif intra-vasculaire  
DRSA : Détermination rapide de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques  
DTM : Discordance Très Majeure  
E-COFF : Epidemiological cut-off values / Concentrations critiques épidémiologiques  
ECDC : European Center for Disease Prevention and Control  
EEQ : Contrôle de qualité externe  
EMA : European Medicines Agency  
ESCMID : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases  
EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing  
FDA : Food and Drug Administration  
FISH : Fluorescence *in situ* hybridization  
I : Intermédiaire  
ISO : Infection du site opératoire  
KT : Cathéter  
KTVC : Cathéter veineux centrale  
KTVP : Cathéter veineux périphérique  
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight  
MH : Mueller-Hinton  
MH-F : Mueller-Hinton au sang de cheval défibriné et additionnée de  $\beta$ -NAD  
MHR-SIR : Mueller-Hinton Rapid-SIR  
ONERBA : Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques  
PCR : Polymerase chain reaction  
PD : Pharmacodynamie  
PK : Pharmacocinétique  
PTM : Peau et tissus mous  
R : Résistant  
S : Sensible

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la métiline  
SASM : *Staphylococcus aureus* sensible à la métiline  
SCN : Staphylocoques à coagulase négative  
SERM : *Staphylococcus epidermidis* résistant à la métiline  
SFM : Société Française de Microbiologie  
SRIS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique  
TRM : Absence de croissance (pas de résultat S, I ou R par l'automate)  
UFC : Unité formant colonie  
ZIT : Zone d'incertitude technique

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Physiopathologie des bactériémies d'origine thromboembolique .....	41
Figure 2 : Origines des bactériémies. ENP, France, Juin 2017 (19) .....	44
Figure 3 : Distribution des 20 principaux micro-organismes isolés des bactériémies. ENP, France, Juin 2017 (n=745) (19).....	50
Figure 4 : Résistance de certains micro-organismes isolés des bactériémies nosocomiales. ENP, France, Juin 2017 (19) .....	51
Figure 5 : Evolution de la sensibilité (%) au céfotaxime de 4 espèces d'entérobactérales responsables de bactériémies. ONERBA, Novembre 2018 (30) .....	51
Figure 6 : Evolution de la sensibilité (%) à la ciprofloxacine de 4 espèces d'entérobactérales responsables de bactériémies. ONERBA, Novembre 2018 (30) .....	52
Figure 7 : Evolution du pourcentage de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline (SARM). ONERBA, Novembre 2018 (30).....	52
Figure 8 : Incidence des bactériémies à entérobactérales productrices de BLSE diagnostiquées à l'hôpital par lieu d'acquisition. ONERBA, Novembre 2018 (30).....	53
Figure 9 : Evolution de la répartition (%) des espèces d'entérobactérales productrices de BLSE. ONERBA, Novembre 2018 (30).....	53
Figure 10 : Résistance aux antibiotiques de <i>E. coli</i> dans les bactériémies communautaires et non communautaires, île de France, 2007 (17).....	54
Figure 11 : Résistance aux antibiotiques de <i>S. aureus</i> dans les bactériémies communautaires et non communautaires île de France, 2007 (17).....	54
Figure 12 : Plan de rentabilité pour selon les stratégies, étude Américaine, Pliakos et al., 2018 (33).....	57
Figure 13 : Principe de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse d'après Croxatto et al. (55).....	65
Figure 14: Gradient d'inhibition autour d'un disque d'antibiotique sur gélose (65) .....	73
Figure 15 : Carte Vitek® dédiée à l'antibiogramme en milieu liquide.....	74
Figure 16 : Détermination d'une CMI en milieu liquide.....	76
Figure 17 : Détermination d'une CMI par méthode de gradient en gélose.....	77
Figure 18 : Photo de plaque de microdilution ou microplaque Sensitire® à 96 puits .....	78
Figure 19 : Photo de barrette de microdilution Umic®.....	78
Figure 20 : Représentation d'une Concentration Critique Epidémiologique ou E-COFF ou cut-off épidémiologique .....	80
Figure 21 : E-Coff de la levofloxacine pour <i>Escherichia coli</i> (source : <a href="https://mic.eucast.org/Eucast2/">https://mic.eucast.org/Eucast2/</a> ) .....	81
Figure 22 : E-Coff de la Daptomycine pour <i>Enterococcus faecium</i> (source : <a href="https://mic.eucast.org/Eucast2/">https://mic.eucast.org/Eucast2/</a> ) .....	81
Figure 23 : Les principaux paramètres PK / PD utilisés pour les antibiotiques (75) .....	83
Figure 24: Corrélation des paramètres PK-PD du ceftobiprole avec l'efficacité contre <i>S. aureus</i> ATCC 33591 chez la souris (76).....	84
Figure 25 : Index PK/PD et seuils proposés pour le suivi et l'adaptation posologique des principaux antibiotiques, d'après Wong et al. (77) .....	85
Figure 26 : Flacons d'hémocultures Bact/ALERT® (à gauche) et Bactec® (à droite).....	95
Figure 27 : Incubateur Bactec FX® (à gauche), Bact/ALERT 3D® (au centre) et Bact/ALERT VIRTUO® (à droite).....	96

Figure 28 : Automate VITEK® 2.....	96
Figure 29 : Exemple de référentiel pour l'appréciation de l'inoculum des antibiogrammes réalisés à partir du bouillon d'hémoculture positif pour les bacilles Gram négatifs.....	98
Figure 30 : Exemple de référentiel pour l'appréciation de l'inoculum des antibiogrammes réalisés à partir du bouillon d'hémoculture positif pour les staphylocoques .....	99
Figure 31 : Exemple de référentiel pour l'appréciation de l'inoculum des antibiogrammes réalisés à partir du bouillon d'hémoculture positif pour les streptocoques .....	99
Tableau 1 : Classification de la pathogénicité des micro-organismes retrouvés dans des flacons d'hémocultures positives.....	37
Tableau 2 : Exemples de micro-organismes responsables d'infections en fonction du site infectieux.....	39
Tableau 3 : Sources des bactériémies et fongémies, The American journal of medicine, 2010 (16).....	43
Tableau 4 : Calcul du score de SOFA (22).....	46
Tableau 5 : Comparaison des incubateurs.....	61
Tableau 6 : Tableau comparatif des capacités des techniques commerciales disponibles pour l'identification/antibiogramme rapide à partir des bouillons d'hémocultures positifs (25). .....	71
Tableau 7 : Dilutions à mettre en œuvre pour l'antibiogramme direct à partir de flacons d'hémocultures positives (9).....	88
Tableau 8 : Validation des performances de la méthode en portée B - Critères à évaluer pour valider la méthode (99).....	92
Tableau 9 : Liste du matériel utilisé en fonction du centre.....	97
Tableau 10 : Tableau de répartition des résultats pour un antibiotique donnée.....	101
Tableau 11 : Nombre d'essais par centre.....	105
Tableau 12 : Nombre d'essais par automates .....	105
Tableau 13 : Nombre d'essais par cartes Vitek.....	105
Tableau 14 : Nombre d'essais par groupes de bactéries.....	106
Tableau 15 : Nombre d'essais par type de flacons .....	106
Tableau 16 : Population étudiée tout centre confondu .....	106
Tableau 17 : Taux de concordance S/I/R des résultats globaux .....	107
Tableau 18 : Résultats du Bactec FX® sur 8769 couples testés.....	107
Tableau 19 : Résultats du Virtuo® sur 3818 couples testés.....	108
Tableau 20 : Résultats du BactAlert 3D® sur 5421 couples testés.....	108
Tableau 21 : Résultats par centre.....	109
Tableau 22 : Concordance pour les entérobactérales.....	110
Tableau 23 : Résultats par famille d'antibiotiques pour les entérobactérales.....	110
Tableau 24 : Concordance pour les staphylocoques.....	112
Tableau 25 : Résultats par famille d'antibiotiques pour les staphylocoques.....	113
Tableau 26 : Résultats par espèce bactérienne .....	113
Tableau 27 : Concordance pour les entérocoques .....	115
Tableau 28 : Résultats par famille d'antibiotiques pour les entérocoques .....	115

# INTRODUCTION

Le sang est un milieu physiologiquement stérile. La persistance de micro-organismes dans celui-ci témoigne d'une infection systémique en cours, souvent associée à un retentissement clinique.

Une bactériémie résulte de la diffusion hématogène de micro-organismes provenant d'un foyer infectieux appelé aussi « porte d'entrée ». Les bactériémies sont responsables de 40% des chocs septiques (1) et leur incidence est estimée à 166-189 cas pour 100 000 habitants en Europe avec un taux de mortalité important (33-35%)(2,3).

C'est pourquoi leur prise en charge rapide et sans délai est primordiale. Un retard d'instauration d'un traitement adapté met en jeu la survie du patient (4,5). L'instauration d'un traitement probabiliste à large spectre est efficace dans la majorité des cas (6) mais des échecs thérapeutiques surviennent dus aux résistances des bactéries. Ces résistances demeurent imprévisibles en l'absence de documentation. L'identification de l'agent pathogène et la détermination de son profil de résistance apparaissent donc comme des étapes cruciales (7).

Le prélèvement d'échantillon sanguin mis en bouillon de culture appelé « hémoculture » est l'examen clef permettant d'isoler le micro-organisme pathogène. L'hémoculture est la méthode de référence au diagnostic des bactériémies (8). Elle permet l'identification et la détermination du profil de sensibilité aux anti-infectieux à partir du bouillon d'hémoculture positif.

Au cours des années, de nombreuses innovations ont permis au laboratoire d'obtenir un rendu de résultat pour les cliniciens de plus en plus rapide et performant en jouant sur diverses étapes du processus microbiologique (1,5). Récemment le CA-SFM a émis des recommandations concernant la réalisation de l'antibiogramme en milieu solide à partir du bouillon d'hémoculture positif (9). Le but de ce travail est d'adapter cette technique au milieu liquide automatisé Vitek® 2.



# GENERALITES

## I. Bactériémies

### 1. Aspects cliniques

#### a. Définition

Une bactériémie ou fungémie se traduit par la présence d'un micro-organisme viable dans le sang, milieu normalement stérile. Le terme « septicémie » ne doit plus être utilisé car il est trop imprécis : Il est remplacé par le terme "bactériémie associée à un sepsis". On définit une bactériémie par la positivité d'au moins une hémoculture positive (justifiée par des signes cliniques) pour les micro-organismes ayant un pouvoir pathogène incontestable, sauf pour les micro-organismes à potentiel pathogène discutable, pour lesquels deux hémocultures positives au même micro-organisme, prélevées lors de ponctions différentes, à des moments différents, et dans un intervalle rapproché (un délai maximal de 48h est habituellement utilisé) sont exigées (10).

**Tableau 1 : Classification de la pathogénicité des micro-organismes retrouvés dans des flacons d'hémocultures positives**

Type de micro-organisme	Nombre de flacon d'hémoculture positif	Exemples de micro-organismes
Bactéries ayant un pouvoir pathogène incontestable	1 seule	Entérobactérales, <i>Staphylococcus aureus</i> , Entérocoques, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>
Bactéries ayant un pouvoir pathogène discutable : flore commensale, micro-organisme environnemental	Au moins 2	Staphylocoques à coagulase négative, <i>Bacillus</i> spp. (sauf <i>B. anthracis</i> ), <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Cutibacterium</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp. (11)

Habituellement, une bactériémie transitoire, en particulier si elle apparaît au cours d'activités ordinaires, ne provoque pas d'infection car les bactéries sont généralement présentes uniquement en faible quantité et sont rapidement éliminées de la circulation sanguine par le système immunitaire. Cependant, si les bactéries sont présentes assez longtemps et en assez grande quantité, en particulier chez les patients ayant un système immunitaire déficient, la bactériémie peut provoquer des infections secondaires et parfois déclencher une réponse généralisée grave (3).

Les bactériémies (et fongémies), au sens pathologique du terme, sont généralement associées à un syndrome infectieux (fièvre, frissons, sueurs, syndrome inflammatoire biologique).

Il est nécessaire de déterminer la cause de la bactériémie chez un patient, aussi appelée « porte d'entrée », afin de traiter le foyer de départ de l'infection.

Les bactériémies peuvent être secondaires à un foyer infectieux focal urinaire (pylonéphrite, prostatite), pulmonaire (pneumopathie), digestif (lésion de la paroi colique), cutané (dermite, hypodermite, fasciite). Elles peuvent être en rapport avec un foyer lymphatique (typhoïde, brucellose) ou endovasculaire (endocardite, thrombophlébite infectée, infection de prothèse vasculaire). Elles peuvent être dues à des foyers dits « secondaires » (ostéite, spondylodiscite) (12).

## **b. Physiopathologie**

Une infection présente d'abord une phase d'implantation et de multiplication au niveau de la porte d'entrée, éventuellement suivie d'une phase secondaire de diffusion tissulaire pour les bactéries invasives.

Après implantation des bactéries au niveau du site primaire, marquant la porte d'entrée dans l'organisme, la suite du processus infectieux est très variable selon les facteurs de virulence mis en œuvre par différentes espèces pathogènes.

Certaines bactéries (toxino-gènes) n'ont pas la capacité d'envahir les tissus en dehors de la porte d'entrée et restent confinées au revêtement cutané-muqueux. Les signes cliniques de la maladie sont alors liés à la production de toxines qui agissent localement sur l'épithélium (*Vibrio cholerae*, *E.coli* entéro-pathogènes...) ou qui diffusent dans le sang et se fixent sur des tissus à distance du foyer infectieux (*Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, Exfoliatine de *Staphylococcus aureus*...). D'autres bactéries envahissent les tissus au niveau de la porte d'entrée (bactéries invasives) en induisant leur propre phagocytose par les cellules épithéliales après interaction avec des récepteurs spécifiques localisés sur la membrane de ces cellules. Certaines les traversent pour aller se multiplier dans la sous muqueuse (*Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*). D'autres se multiplient dans les cellules épithéliales, réalisant une première phase d'amplification du nombre de particules infectieuses à l'abri des défenses immunitaires de l'organisme (*Shigella*, *Escherichia coli* entéro-invasives).

Après franchissement de l'épithélium, les bactéries invasives qui se multiplient dans les tissus peuvent soit rester confinées à la muqueuse (*Shigella*, souches d'*E.coli* entéro-invasives), soit disséminer dans l'organisme par voie lymphatique ou sanguine. Cette dissémination dépend de multiples facteurs de virulence agissant dans le micro-environnement des bactéries, leur permettant de détruire les tissus (enzymes, exotoxines cytolitiques, lipopolysaccharides) ou de résister au complément et à la phagocytose (capsules, lipopolysaccharides, protéines d'enveloppe, acides mycoliques, exotoxines...) Certaines bactéries invasives sont capables de se multiplier à l'intérieur même des phagocytes ou de cellules apparentées, échappant ainsi pour un temps au système immunitaire.(13)

En infectiologie, on associe de manière plus fréquente certains micro-organismes à des portes d'entrée spécifiques, liés d'une part à leur proximité en termes de localisation, et d'autre part à leurs potentiels infectieux (Tableau 2).

**Tableau 2 : Exemples de micro-organismes responsables d'infections en fonction du site infectieux**

Origine du foyer infectieux	Exemples de micro-organismes en cause
Urinaire	Entérobactérales ( <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> ), Enterocoques, Bacilles Gram négatif non fermentaires ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> ), <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , etc
Digestif	Entérobactérales ( <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> , etc), Enterocoques, Bacilles Gram négatif non fermentaires ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> ), micro-organismes anaérobies, etc
Pleuropulmonaire	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S.aureus</i> , Entérobactérales ( <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> , etc), Enterocoques, Bacilles Gram négatif non fermentaires ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> ),
Cutanée	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S.aureus</i>
Méningé	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>

#### i. Caractéristiques des bactéries causant des bactériémies

Relativement peu d'agents pathogènes peuvent provoquer une bactériémie. Pour provoquer une bactériémie, les bactéries doivent posséder certaines caractéristiques qui assurent leur survie, leur prolifération et leur dissémination dans le corps humain.

Les bactéries Gram positif sont mieux adaptées pour envahir les tissus par rapport aux bactéries Gram négatif. L'absence d'endotoxine dans la paroi cellulaire externe est compensée par la présence de peptidoglycane exposé et d'une gamme d'enzymes toxiques sécrétées.

La majorité des bactéries responsables de bactériémies sont des anaérobies facultatifs. Ce type de respiration est le plus flexible et facilite la survie, la prolifération et la dissémination des agents pathogènes dans diverses conditions environnementales. Les agents pathogènes qui ne sont pas des anaérobies facultatifs peuvent exprimer des mécanismes respiratoires supplémentaires qui rendent leur respiration proche des anaérobies facultatifs.

Toutes les bactéries responsables de bactériémies produisent une superoxyde dismutase, une catalase et une glutathion peroxydase, qui les protègent contre le stress oxydatif causé par les espèces réactives de l'oxygène. La principale source de stress oxydatif pour les bactéries responsables de bactériémies est l'attaque par les cellules phagocytaires de l'hôte. Les phagocytes utilisent les effets cytotoxiques des espèces réactives de l'oxygène, comme le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle hautement toxique. Les bactéries responsables de bactériémies ont développé des systèmes efficaces de défense contre le stress oxydatif : des voies enzymatiques d'inactivation des oxydants, y compris celles catalysées par la

superoxyde dismutase, la catalase / peroxydase, et le glutathion en combinaison avec la glutathion peroxydase et la glutathion réductase. Les mêmes voies enzymatiques protègent les bactéries de l'oxydation et de leur destruction à la surface des érythrocytes.

Certains caractères biochimiques sont indispensables à la bactérie pour provoquer une bactériémie. Toutes les bactéries responsables de bactériémies ont une couche de surface cristalline, une couche visqueuse et produisent des capsules et un biofilm. Ces structures protègent les bactéries dans les tissus contre la phagocytose, le stress oxydatif, les enzymes lytiques, les complexes immuns, etc., tandis que la production d'une capsule et de substances polymérisées extracellulaires protègent la bactérie des fluctuations ioniques, de l'attraction et la fixation à la surface des érythrocytes, de l'oxydation et leur destruction par l'oxygène libéré des érythrocytes. Les bactéries responsables de bactériémies produisent des hémolysines. Les érythrocytes sont les principales cellules bactéricides de la circulation sanguine et les hémolysines sont nécessaires à la survie bactérienne dans la circulation sanguine. Si la vitesse de croissance bactérienne dans le tissu est limitée par les réactions immunitaires de l'hôte, les bactéries se protègent grâce à leur capsule, leur couche visqueuse et leur biofilm. La motilité n'est en revanche pas un facteur crucial pour provoquer une bactériémie (3).

## ii. Origine Lymphatique

Les bactériémies d'origine lymphatique sont rares. La porte d'entrée est souvent digestive. Les bactéries traversent la peau ou la muqueuse puis gagnent les ganglions lymphatiques par les vaisseaux lymphatiques afférents. Certains micro-organismes y résistent à la destruction par les macrophages et bien au contraire s'y multiplient. Ils quittent ensuite le ganglion par le vaisseau lymphatique efférent et rejoignent la circulation générale par le canal thoracique. La décharge bactérienne est continue, la fièvre plutôt régulière. Les bactéries restées au niveau des ganglions mésentériques sont souvent lysées ce qui libère leur endotoxine dans le sang. Le risque de choc endotoxinique est fréquent.

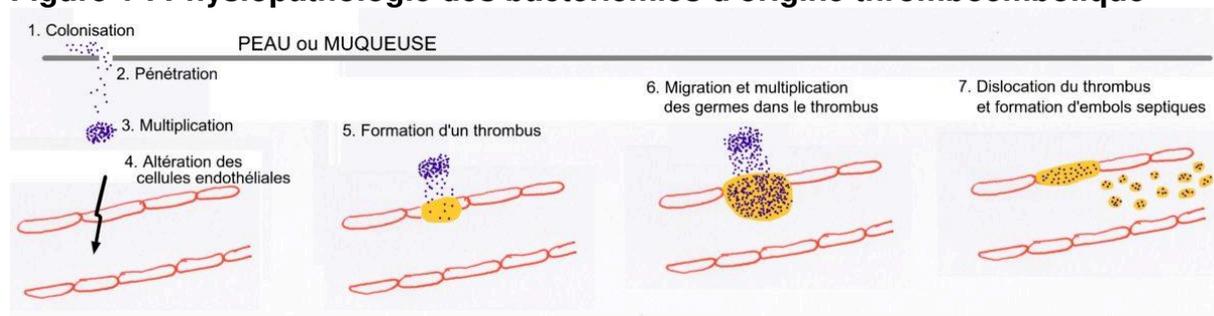
Nous pouvons donner plusieurs exemples de micro-organismes responsables de ce schéma pathogénique : d'une part dans la typhoïde (*Salmonella Typhi*, *S.paratyphi A*, *B*) et dans la brucellose (*Brucella* spp responsable de la fièvre de Malte) ; et d'autre part dans la Listériose où *Listeria monocytogenes* traverse l'intestin par les plaques de Peyer pour gagner les ganglions lymphatiques et la circulation sanguine. L'organe-cible principal est le foie où les bactéries se multiplient à l'intérieur des hépatocytes. La lyse des hépatocytes, induite par le recrutement précoce des polynucléaires, entraîne une libération des bactéries intracellulaires et une bactériémie prolongée qui expose le placenta et le système nerveux central. Le pronostic de la listériose est lié à la gravité des méningoencéphalites dues à ce pathogène, du fait en particulier de la localisation de l'infection au tronc cérébral (rhombencéphalite) (14).

La peste bubonique (*Yersinia Pestis*) est également une bactériémie d'origine lymphatique. Les rongeurs constituent le réservoir de cette maladie. La maladie se transmet à l'homme par la piqûre d'une puce infectée.

### iii. Origine thromboembolique

Les bactériémies d'origine thromboembolique se développent à partir d'un foyer initial cutané ou muqueux où se produit localement une réaction inflammatoire à l'origine d'une thrombophlébite (inflammation d'une veine accompagnée d'un caillot sanguin au siège de l'inflammation). Les micro-organismes migrent à l'intérieur du caillot et s'y multiplient à l'abri de la phagocytose. Sous l'action d'enzymes microbiennes protéolytiques comme les fibrinolysines, le caillot se dissocie en petit fragments (embols septiques) qui suivent le courant sanguin. Ces embols sont suffisamment petits pour être rapidement phagocytés mais quelquefois certains y échappent et développent des foyers infectieux secondaires (pulmonaires, ostéoarticulaires, endocarditiques).

**Figure 1 : Physiopathologie des bactériémies d'origine thromboembolique**



### iv. Endocardite

La survenue d'une endocardite sur une valve pathologique ou un matériel étranger est à l'origine d'interactions complexes entre le micro-organisme, l'endothélium valvulaire et les réactions immunitaires de l'hôte. L'endothélium valvulaire normal est résistant à l'infection, mais son altération en raison d'une valvulopathie native expose les composants thrombogènes de la matrice extracellulaire du sous-endothélium. Cela déclenche une adhésion et une activation des plaquettes formant un dépôt fibrinoplaquettaire initialement stérile. Il s'ensuit d'une colonisation rapide par les micro-organismes circulants qui adhèrent à l'endocarde valvulaire ou mural lésé, ou sur une prothèse valvulaire. Les micro-organismes infectent ensuite les cellules endothéliales et s'y multiplient.

Il existe des différences d'affinité des micro-organismes pour l'endothélium valvulaire et le thrombus qui dépendent de molécules d'adhésion. Des protéines d'adhésion se liant au fibrinogène ou à la fibronectine sont présentes à la surface des micro-organismes, en particulier des cocci Gram positif ce qui explique leur prédominance en tant que micro-organismes responsables d'endocardites.

Certains micro-organismes comme le staphylocoque doré peuvent également se lier directement aux cellules endothéliales. Les capacités particulières d'adhésion du staphylocoque doré peuvent être rapportées à leur fréquence prédominante dans les endocardites survenant en l'absence de valvulopathie préexistante. L'adhésion des micro-organismes est également favorisée par l'expression des intégrines par les cellules endothéliales en réponse à l'inflammation. Après la phase d'adhésion, les micro-organismes peuvent être internalisés par les cellules endothéliales où ils peuvent proliférer et diffuser ou persister en échappant aux antibiotiques et au système immunitaire. Les mécanismes de colonisation de l'endothélium valvulaire diffèrent et sont mal connus en ce qui concerne les micro-organismes à développement intracellulaire exclusif, comme *Coxiella burnetii* et *Bartonella*.

Certains micro-organismes, en particulier le staphylocoque doré, accompagnent leur prolifération de la formation d'un biofilm conduisant à un agrégat plaquettaire enchâssé dans un réseau de polysaccharides et de protéines. La formation d'un biofilm favorise la virulence de l'infection, notamment en protégeant les micro-organismes des défenses immunitaires et des traitements antimicrobiens. Le biofilm semble jouer un rôle particulièrement important dans les endocardites sur prothèse et sur matériel de stimulation, alors que son rôle n'est pas prouvé dans les endocardites sur valves natives. Le staphylocoque est le micro-organisme désormais le plus souvent à l'origine de l'endocardite infectieuse, suivi par les streptocoques d'origine bucco-dentaire, puis les entérocoques.

La colonisation du thrombus fibrino-plaquettaire par les micro-organismes circulants déclenche une réaction immunitaire activant les monocytes circulants qui sécrètent du facteur tissulaire et des cytokines. L'invasion du tissu valvulaire par les micro-organismes et les cellules inflammatoires est à l'origine des principales lésions et complications de l'endocardite infectieuse.

Les végétations correspondent au thrombus septique constitué d'amas de fibrine, de plaquettes et de micro-organismes. Sa croissance est favorisée par l'activation de l'hémostase par les cytokines. Les micro-organismes qui ont colonisé les végétations sont d'accès difficile aux antibiotiques et aux défenses immunitaires. Les végétations sont susceptibles d'emboliser dans la circulation sanguine et d'entraîner des foyers infectieux à distance ou des accidents ischémiques. Au niveau des artères, les végétations présentent un risque d'anévrysme « mycotique ». Les végétations de volumes variables, s'effritent et libèrent des bactéries. Ce phénomène est responsable de la dissémination secondaire du micro-organisme en cause.

Les lésions prolifératives valvulaires (perforations ou déchirures) et péri-valvulaires (abcès) sont les conséquences de la destruction de la matrice extracellulaire par les enzymes protéolytiques libérés par les micro-organismes et les cellules inflammatoires. Ces infections ont pour conséquences l'apparition ou l'aggravation d'une insuffisance valvulaire, d'un souffle, avec risque de défaillance cardiaque.

L'activation du système immunitaire entraîne la formation de complexes immuns circulants qui peuvent entraîner ensuite des lésions auto-immunes comme la

glomérulonéphrite, les taches de Roth au fond d'œil et les nodosités d'Osler. La présence du facteur rhumatoïde est un critère mineur de la classification de Duke. Des anticorps dirigés contre le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) sont détectés dans l'endocardite infectieuse chez près d'un quart des patients (15).

### c. Portes d'entrée

Une étude américaine sur 1225 cas présente des résultats sur l'origine des bactériémies (Tableau 3). Les portes d'entrée de ces bactériémies ont pu être identifiées dans 71% des cas : les cathéters représentent la source principale des bactériémies (16).

**Tableau 3 : Sources des bactériémies et fongémies, The American journal of medicine, 2010 (16)**

Sources	Nombres total d'épisodes	%
Cathéters	282	23
Uro-génitale	143	12
Respiratoire	97	8
Ostéo-articulaire	51	4
Abcès intra-abdominal	51	4
Peau	51	4
Intestins et péritoines	49	4
Biliaire	50	4
Plaie chirurgical	37	3
Autres	51	4
inconnus	358	29
Total	1225	100

Dans l'étude Française de Porcheret et al. les portes d'entrée étaient renseignées pour 90 % des épisodes bactériémiques communautaires et nosocomiaux. Elles étaient représentées essentiellement par les sites suivants : urinaire (28.3%), foyer infectieux digestif (19.6%), pleuropulmonaire (13.1%), cutané (6,0%) et autres (6.5%). Les foyers infectieux ORL, les endocardites, les méningites étaient classés dans le site « autres » (17).

L'étude de Robineau et al. en 2018 sur 1952 bactériémies précise que la porte d'entrée la plus fréquente des bactériémies communautaires est urinaire (27%) et que la porte d'entrée la plus fréquente des bactériémies nosocomiales est liée à un cathéter intraveineux (33%) (4).

Une étude Canadienne rapporte que la moitié des bactériémies sont communautaires (50,5%), le reste a été contracté à l'hôpital et le plus souvent en soins intensifs. La pneumonie (38,1%), les voies urinaires (20,3%) et les infections par cathéter vasculaire (19,8%) étaient les trois sources d'infection les plus courantes ; la source d'infection était inconnue chez 15,4% des patients (6).

L'étude Française de Alfandari et al. sur 23 hôpitaux du Nord de France montre que les cas de bactériémies sont principalement d'origine communautaire avec 55,9% des cas ( $n = 276$ ). L'origine hospitalière représentait 35,8% des cas ( $n = 177$ ) et les bactériémies associés aux soins de santé 8,3% des cas ( $n = 41$ )(18).

En France, selon l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé durant la période mai-juin 2017, les bactériémies ont pour origine les cathéters confirmées microbiologiquement dans 36,81 % (IC95% [32,28-41,59]) des cas et une origine secondaire à une infection suspectée sur cathéter non confirmée microbiologiquement dans 15,97 % (IC95% [12,26-20,53]) des cas. Lorsque les bactériémies ne sont pas liées à un cathéter (pour 31,94 % (IC95% [27,77-36,42]) des bactériémies), les portes d'entrée urinaires et digestives sont alors les plus fréquentes. Enfin, l'origine de la bactériémie n'est pas documentée pour 15,28 % (IC95% [12,29-18,84]) des bactériémies (Figure 2) (4,19).

A l'hôpital, un patient sur trois est porteur d'au moins un dispositif invasif (cathéter, assistance respiratoire ou sonde urinaire). Par type de dispositifs invasifs, les cathéters sont majoritaires avec 29.67% (IC<sub>95%</sub> [27,80-31,60]) des patients porteurs d'au moins un cathéter (19).

**Figure 2 : Origines des bactériémies. ENP, France, Juin 2017 (19)**

Origine	Bactériémies		
	n	Part rel.	
		%	IC95%
<b>Bactériémies liées à un cathéter confirmées microbiologiquement</b>	244	36,81	[32,28-41,59]
<i>dont bactériémie liées à KTVC</i>	208	31,74	[27,54-36,26]
<i>dont bactériémie liées à KTVP</i>	36	5,07	[3,12-8,13]
<b>Bactériémies secondaires à une infection suspectée sur KT sans confirmation microbiologique</b>	90	15,97	[12,26-20,53]
<i>dont bactériémie secondaire à une infection suspectée sur KTVC</i>	69	12,56	[9,26-16,81]
<i>dont bactériémie secondaire à une infection suspectée sur KTVP</i>	21	3,41	[2,00-5,74]
<b>Bactériémies non liées à un cathéter</b>	204	31,94	[27,77-36,42]
<i>dont secondaire à une inf. urinaire</i>	74	11,48	[8,57-15,23]
<i>dont secondaire à une inf. digestive</i>	21	3,94	[2,38-6,46]
<i>dont secondaire à une ISO</i>	22	4,04	[2,39-6,75]
<i>dont secondaire à une inf. pulmonaire</i>	36	5,48	[3,76-7,92]
<i>dont secondaire à une inf. PTM</i>	15	1,63	[0,92-2,89]
<i>dont secondaire à une autre infection</i>	11	1,49	[0,78-2,83]
<i>dont non 2aire à une inf. et non liée à KT</i>	25	3,88	[2,25-6,62]
<b>Bactériémies d'origine inconnue</b>	112	15,28	[12,29-18,84]
TOTAL	650	100	-

#### d. Définitions cliniques

Le Syndrome de réponse inflammatoire systémique, ou SRIS, est une réponse de l'organisme à certaines agressions cliniques graves comme un état infectieux, un état de choc ou un traumatisme.

Cette définition remonte à la classification des états septiques adoptée en 1992 et basée sur l'intensité de la réponse de l'organisme à l'infection.

Cette classification est basée sur 4 éléments cliniques très simples et caractérisant le SRIS : fièvre, tachycardie, tachypnée et hyperleucocytose. La simplicité de cette classification ayant justement pour but de permettre la reconnaissance précoce des états septiques, permettant de commencer rapidement une prise en charge thérapeutique adaptée.

Ce syndrome est caractérisé par la présence d'au moins deux des signes suivants :

- Une température corporelle  $> 38,3$  °C ou  $< 36$  °C,
- Une fréquence cardiaque  $> 90$  battements par minute,
- Une fréquence respiratoire  $> 20$ /min ou hyperventilation se traduisant par une  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg ( $< 4,3$  kPa) en air ambiant,
- Une leucocytose  $> 12.000/\text{mm}^3$  ou  $< 4.000/\text{mm}^3$  ou  $> 10$  % de cellules immatures. (20)

Cependant, la définition du SRIS s'avère ne pas être assez spécifique pour le dépistage initial des patients, dont environ 50% répondront à 2 des 4 critères durant leur séjour hospitalier et pour lequel le diagnostic est retardé du au délai d'obtention des résultats, de plus perturbé par les fluctuations physiologiques au cours de maladie aiguë (21).

En 2016, de nouvelles définitions du sepsis sont issues d'un groupe de travail de la « Society of Critical Care Medicine » et de la « European Society of Intensive Care Medicine ». Elles sont dorénavant basées sur la dysfonction d'organe et le niveau de mortalité observé.

Le sepsis est défini comme une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital et causé par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection. Une dysfonction d'organe peut être identifiée par un score SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) d'au moins 2 points et liée à une infection. La mortalité hospitalière est estimée autour de 10%, justifiant d'une prise en charge adaptée rapide. Le SOFA basal est supposé être à zéro en l'absence de dysfonction d'organe, aiguë ou chronique, préexistante.

**Tableau 4 : Calcul du score de SOFA (22)**

Calcul	0 point	1 point	2 points	3 points	4 points
PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	>400	301-400	201-300	101-200 et VA	≤100 et VA
Plaquettes X10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	>150	101-150	51-100	21-50	≤20
Bilirubine, mg/L (mmol/L)	<12 (<20)	12-19 (20-32)	20-59 (33-101)	60-119 (102-204)	>120 (>204)
Hypotension	PAM ≥70mmHG	PAM <70mmHG	Dopamine ≤ 5 ou dobutamine (toute dose)	Dopa >5 ou adrénaline ≤0.1 ou noradré ≤0.1	Dopamine >15 ou adr >0.1 ou noradré >0.1
Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
Créatinine, mg/L (μmol/L) ou diurèse	<12 (<110)	12-19 (110-170)	20-34 (171-299)	35-49 (300-440) ou <500mL/j	>50 (>440) ou <200mL/j

VA : ventilation assistée. PAM : pression artérielle moyenne [estimée par (PAS+2xPAD)/3]. Amines : dose en γ/kg/mn

Des critères simplifiés, utilisables hors réanimation, sont proposés en dépistage de patients pouvant avoir un sepsis :

- Pression artérielle systolique ≤ 100 mm Hg
- Fréquence respiratoire ≥ 22/mn
- Confusion

La présence de 2 critères quick SOFA (qSOFA) identifie des patients risquant d'avoir un mauvais pronostic et justifiant d'un monitoring accru, et/ou d'un traitement spécifique et/ou de prendre un avis en réanimation.

Le choc septique est un sous-groupe de sepsis avec anomalies importantes circulatoires et métaboliques et une mortalité d'environ 40%. Il est défini par l'association de :

- Sepsis
- Besoin de drogues vasopressives pour maintenir une PAM ≥ 65 mm Hg
- Lactates > 2 mmol/l (18mg/dl) malgré un remplissage adéquat (22)

Une hypoperfusion tissulaire induite par une bactériémie associée à un sepsis ou un choc septique peut se manifester par un dysfonctionnement aigu des organes et / ou une diminution de la pression artérielle et une augmentation du lactate sérique. Une stabilisation des constantes hémodynamiques efficaces et précoces, est cruciale pour la stabilisation de l'hypoperfusion tissulaire (23)

La prévalence des patients infectés augmente chez les patients présentant certains facteurs de risques d'infection : le fait d'être atteint d'une affection maligne, d'être opéré depuis l'admission et d'avoir un dispositif invasif à demeure, en particulier un cathéter (19).

Certains facteurs de comorbidité sont des facteurs de risques associés à une augmentation de la mortalité à 10 jours liée à une bactériémie tel que : une bactériémie associée à un sepsis sévère, un choc septique, une allergie au bêta-lactamines, un âge supérieur à 72 ans, une porte d'entrée autre que les voies urinaires et l'initiation d'un traitement efficace au-delà des 48 premières heures. D'autres facteurs sont associés à une diminution de la mortalité tel que : une insuffisance rénale chronique (les auteurs suggèrent que cela peut-être en lien avec une augmentation des concentrations sanguines d'antibiotiques dont la dose n'est pas ajustée), une intervention de référents infectieux et une bactériémie due à *E. coli*, un autre Enterobacteriaceae ou un cocci Gram positif autre que *S. aureus*.

Parmi le groupe des bactériémies liées à une infection nosocomiale, les facteurs de risques associés à une augmentation de la mortalité sont : une bactériémie associée à un sepsis sévère, un choc septique, une infection du tube digestif, une porte d'entrée inconnue, une pneumonie, un âge supérieur à 72 ans et le début du traitement efficace après 48 heures (4). Au niveau du micro-organisme en cause, son caractère multi-résistant ajoute un risque supplémentaire d'échec thérapeutique (7).

L'âge moyen des patients pour lesquels une bactériémie a été diagnostiquée est de 65 ans. Les personnes aux âges extrêmes de la vie, qu'il s'agisse de jeunes enfants ou de personnes âgées, présentent un risque accru de développer cette infection (24).

Au cours d'une bactériémie, les bactéries qui ne sont pas éliminées par le système immunitaire peuvent s'accumuler dans différents sites de l'organisme. Formant un foyer infectieux dit « secondaire » provoquant des infections au niveau : des tissus qui recouvrent le cerveau (méningite), de l'enveloppe extérieure du cœur (péricardite), des cellules tapissant les valves cardiaques et le cœur (endocardite), des os (ostéomyélite), des articulations (arthrite infectieuse). Elles ont tendance à se déposer et à s'accumuler contre certaines structures de l'organisme, comme les valves cardiaques anormales et sont particulièrement susceptibles de s'accumuler sur tout matériel artificiel présent dans l'organisme, comme les cathéters intraveineux ainsi que les articulations (prothèses) et valves cardiaques artificielles. Ces amas (colonies) de bactéries peuvent rester attachés aux sites et libérer en continu ou de façon périodique des bactéries dans la circulation sanguine.

La formation de thrombus intravasculaire, contenant des micro-organismes, risque d'entraîner un embol septique : la fragmentation de ces thrombus par turbulences sanguines entraîne la migration dans les petites artères provoquant une ischémie locale, associé à la libération de toxines dans le parenchyme se manifestant par un infarctus ou une hémorragie parenchymateuse par nécrose.

Les complications neurologiques des endocardites infectieuses sont fréquentes et ont une importance particulière car elles sont souvent inaugurales. Elles peuvent mettre en jeu le pronostic vital et modifier sensiblement la prise en charge. Elles doivent être recherchées devant tout signe neurologique focal ou trouble de

conscience inexpliqué. Les accidents vasculaires ischémiques par embolie d'une végétation constituent la principale complication neurologique des endocardites. Ils sont plus fréquents en cas d'endocardite à *Staphylococcus aureus* et de grosses végétations mobiles de taille supérieures à 10 mm (25).

La dysfonction d'organe est associée à un risque plus élevé de décès. Le taux de létalité des sepsis augmente avec l'augmentation du score SOFA. Les taux de létalité les plus élevés sont observés chez les patients présentant une dysfonction cardiovasculaire, respiratoire et du système nerveux central (26).

## e. Epidémiologie

### i. Prévalence

Les sepsis et chocs septiques ont pour cause une bactériémie (d'origine communautaire et nosocomiale) dans 40% des cas et environ 20% des cas sont acquis en unité de soins intensifs (1). Les bactériémies sont associées à une morbidité et une mortalité hospitalière importantes dans le monde. L'incidence de cette infection est estimée à 174-204 cas pour 100 000 habitants aux Etats-Unis et 166-189 cas pour 100 000 habitants en Europe. Le taux de mortalité de cette infection est estimé à 23.5–27.5% aux Etats-Unis et 21.6–37.8% en Europe (2).

En France, selon l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé durant la période mai-juin 2017, Les bactériémies représentent 11,43 % [10,01-13,03] des infections nosocomiales. La prévalence des patients présentant une bactériémie est égale à 0,59 % (IC95% [0,49-0,71]) (19).

D'après l'institut Pasteur, on dénombre annuellement dans les pays industrialisés 95 cas de sepsis pour 100 000 habitants pour les moins de 65 ans, et 1220 cas pour les plus de 65 ans. Dans les pays en développement, le sepsis puerpéral demeure une cause de mortalité importante des femmes après leur accouchement (18 000 décès par an). Quant au sepsis néonatal, on estime qu'il est à l'origine de plus de 350 000 décès parmi les nouveau-nés dans le monde. En France, la mortalité des patients atteints d'un sepsis est de 27%, mais la mortalité liée au choc septique peut atteindre 50%. On estime à 30 000 le nombre de décès consécutifs au sepsis par an en France. Les projections dans l'avenir suggèrent un doublement du nombre de cas d'ici cinquante ans, s'expliquant notamment par le vieillissement de la population.

### ii. Micro-organismes en causes

Le programme de surveillance antimicrobienne SENTRY a publié en 2019 une étude rétrospective sur les organismes isolés de bactériémies dans plus de 200 centres médicaux dans 45 pays entre 1997 et 2016. Parmi les 264 901 isolats de bactériémies étudiés, les micro-organismes les plus fréquemment retrouvés sont

*Staphylococcus aureus* (20.7%), *Escherichia coli* (20.5%), *Klebsiella pneumoniae* (7.7%), *Pseudomonas aeruginosa* (5.3%), *Enterococcus faecalis* (5.2%), *Staphylococcus epidermidis* (3.8%), *Enterobacter cloacae* (2.9%), *Enterococcus faecium* (2.8%) et *Acinetobacter baumannii* (2.0%) (27).

L'observatoire des résistances du Collège de Bactériologie, de Virologie et d'Hygiène des hôpitaux (COL-BVH), qui participe avec le réseau de l'ONERBA à la surveillance nationale de l'évolution des résistances, apporte des données concernant les principales espèces isolées d'hémocultures avec une répartition en pourcentage sensiblement identique selon les espèces (28). D'autres études viennent appuyer ces données (1,4,5,16–18,29).

L'étude Française de Porcheret et al. sur 2013 bactériémies met en évidence que les micro-organismes les plus fréquemment isolés dans les bactériémies d'origine communautaires sont les entérobactérales, essentiellement *E. coli* ( $n = 477$ ), puis *S. aureus* ( $n = 132$ ), *S. pneumoniae* ( $n = 137$ ) et les autres *Streptococcus* spp ( $n = 145$ ) (17).

Une large enquête française de prévalence des infections nosocomiales en établissement de santé suit également cette tendance avec : *Staphylococcus aureus* (15.94%), *Escherichia coli* (14.49%), *Enterococcus* spp. (7.65%), *Klebsiella pneumoniae* (4.87%), Staphylocoques coagulase-négative (21.61%) indépendamment du caractère vrai ou non de la bactériémie, *Pseudomonas aeruginosa* (4.78%), *Candida albicans* (2.90%), *Enterobacter cloacae* (4.24%), *Serratia marcescens* (1.38%), et *Bacteroides fragilis*. (1.29%) (19) (Figure 3).

**Figure 3 : Distribution des 20 principaux micro-organismes isolés des bactériémies. ENP, France, Juin 2017 (n=745) (19)**

Micro-organisme	ENP 2017		
	n	Part rel. (%)	IC95%
<i>Staphylococcus aureus</i>	131	15,94	[13,04-19,34]
<i>Escherichia coli</i>	94	14,49	[11,70-17,81]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	101	13,90	[10,40-18,34]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	55	4,87	[3,59-6,59]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39	4,78	[3,13-7,21]
<i>Enterococcus faecalis</i>	39	4,63	[3,24-6,56]
<i>Enterobacter cloacae</i>	38	4,24	[2,76-6,46]
Staphylocoque coagulase négative, autre	31	3,86	[2,24-6,57]
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	29	3,24	[1,85-5,62]
<i>Candida albicans</i>	22	2,90	[1,67-5,01]
<i>Enterococcus faecium</i>	18	2,61	[1,58-4,29]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	10	2,33	[0,76-6,96]
Streptocoques, autre espèce	12	2,24	[1,11-4,45]
<i>Serratia marcescens</i>	10	1,38	[0,53-3,54]
Autre <i>Pseudomonas</i> spp. et apparentés	6	1,31	[0,50-3,37]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8	1,30	[0,46-3,59]
<i>Bacteroides fragilis</i>	5	1,29	[0,43-3,84]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	7	1,19	[0,47-2,94]
<i>Citrobacter koseri</i> (ex. <i>diversus</i> )	7	1,19	[0,52-2,71]
<i>Candida parapsilosis</i>	7	1,06	[0,48-2,31]

Parmi les 131 souches de *S. aureus* isolées de bactériémies et testées, 18,74 % (IC95% [12,75- 26,68]) sont des SARM. La prévalence des patients avec bactériémie à SARM, liée à un dispositif intra vasculaire, confirmée microbiologiquement est égale à 0,0054 % (IC95% [0,0019-0,0155]) et représente 6 souches de SARM isolées dans l'échantillon.

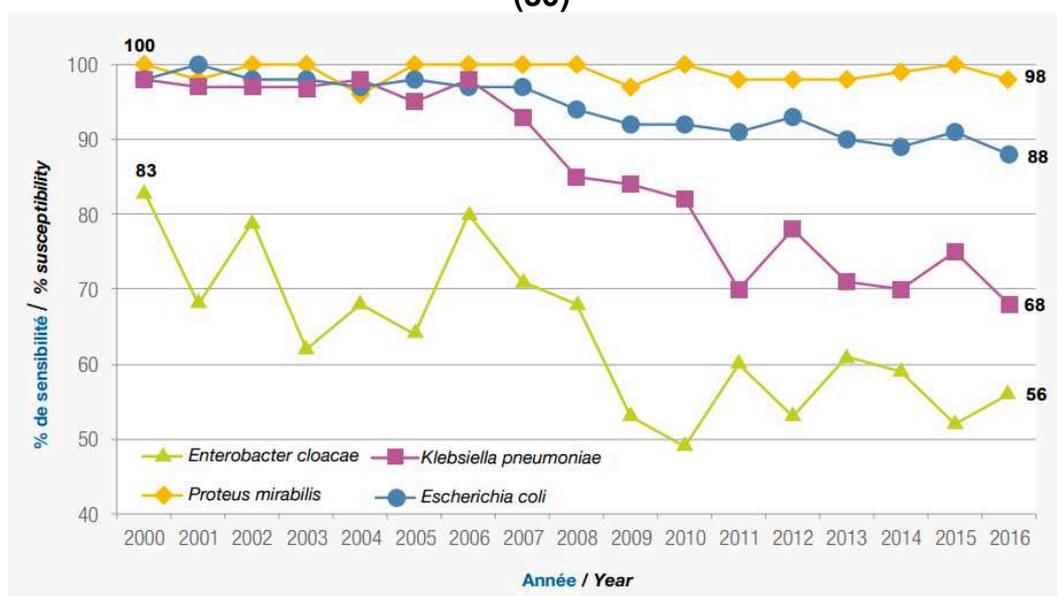
Les 94 souches d'*E.coli* isolées de bactériémies et testées et les 55 souches de *K. pneumoniae*, sont plus fréquemment productrices de BLSE (20,91 % [15,48-27,63] d'*E. coli* et 39,59 % [23,71-58,02] de *K. pneumoniae*) que l'ensemble des souches isolées d'infections nosocomiales autres (14,87 % [12,26-17,94] d'*E. coli* et 31,59% [23,94-40,38] de *K. pneumoniae*).

**Figure 4 : Résistance de certains micro-organismes isolés des bactériémies nosocomiales. ENP, France, Juin 2017 (19)**

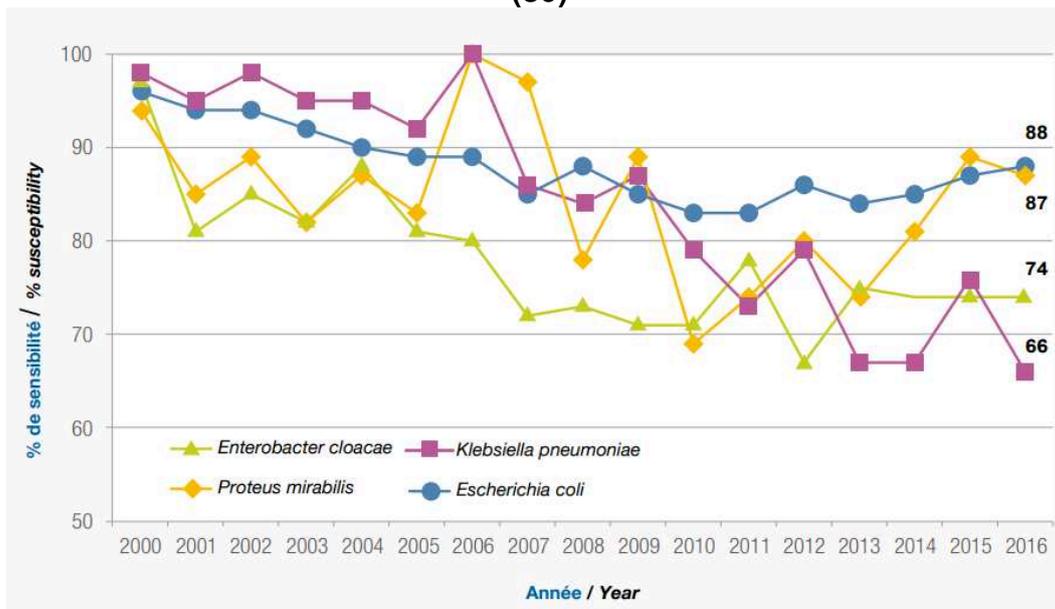
Micro-organisme et résistance	MO Isolés		MO Testés	
	n	n	Part rel. (%)	IC95%
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	131	127		-
Méticilline-R et Vancomycine-S		17	18,74	[12,75-26,68]
Méticilline-R et Vancomycine-R		0	0	-
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	39	39		
Ceftazidim e-R		8	20,89	[12,63-32,55]
Carbapénèmes-R		5	10,72	[4,20-24,75]
<b><i>Escherichia coli</i></b>	94	92		
C3G-R		21	22,10	[16,48-28,99]
C3G-R et BLSE		19	20,91	[15,48-27,63]
Carbapénèmes-R		0	0	-
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	55	55		
C3G-R		21	39,59	[23,71-58,02]
C3G-R et BLSE		21	39,59	[23,71-58,02]
Carbapénèmes-R		2	2,18	[0,51-8,84]

Concernant les enquêtes épidémiologiques des résistances en lien avec les bactériémies, l'observatoire national de l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques (ONERBA), fondé en 1997, rassemble les informations disponibles concernant l'évolution des résistances bactériennes aux antibiotiques en France chez l'Homme et l'animal. L'évolution de la sensibilité au cefotaxime et à la ciprofloxacine d'entérobactérales responsables de bactériémies de 2000 à 2016 est présentée respectivement dans les Figure 5 et Figure 6.

**Figure 5 : Evolution de la sensibilité (%) au céfotaxime de 4 espèces d'entérobactérales responsables de bactériémies. ONERBA, Novembre 2018 (30)**

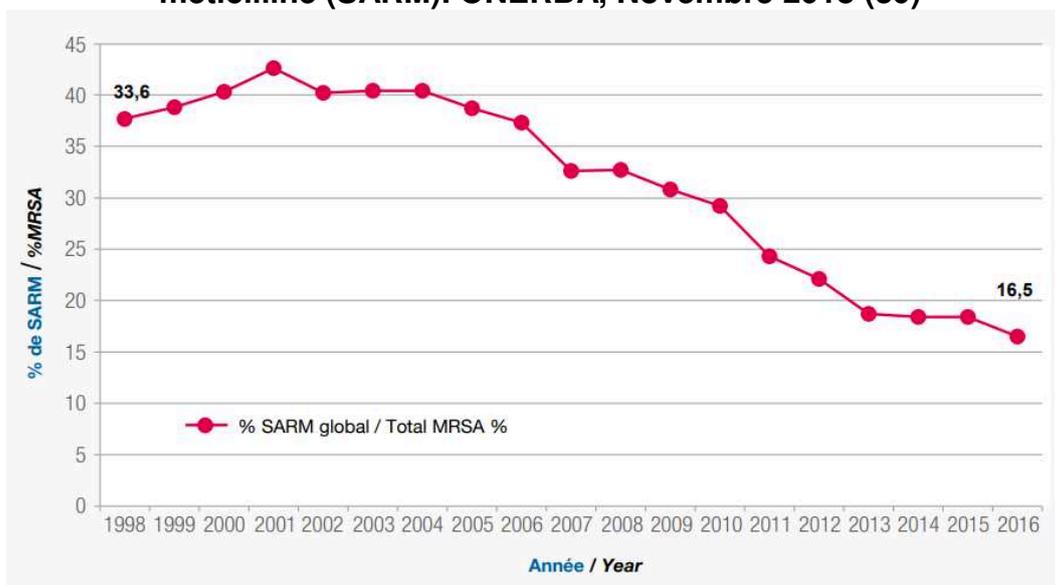


**Figure 6 : Evolution de la sensibilité (%) à la ciprofloxacine de 4 espèces d'entérobactérales responsables de bactériémies. ONERBA, Novembre 2018 (30)**

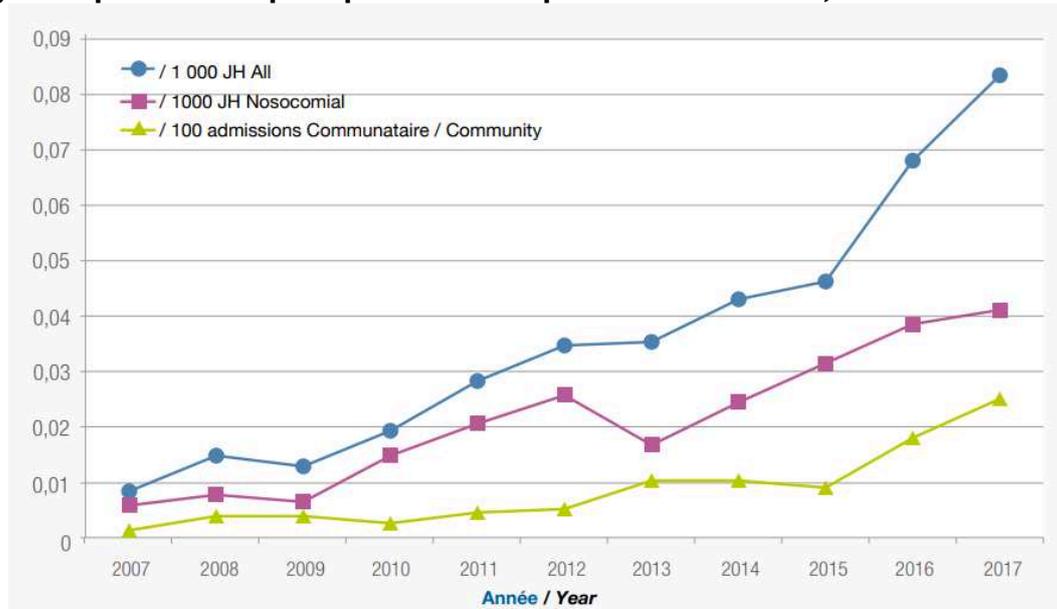


L'étude de l'évolution des résistances des micro-organismes principalement en cause dans les bactériémies permet d'observer une diminution du pourcentage de SARM, toute origine confondue (Figure 7), une augmentation de l'incidence de bactériémies à entérobactérales productrices de BLSE (Figure 8) et une évolution dans la répartition des espèces d'entérobactérales productrices de BLSE (Figure 9).

**Figure 7 : Evolution du pourcentage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). ONERBA, Novembre 2018 (30)**

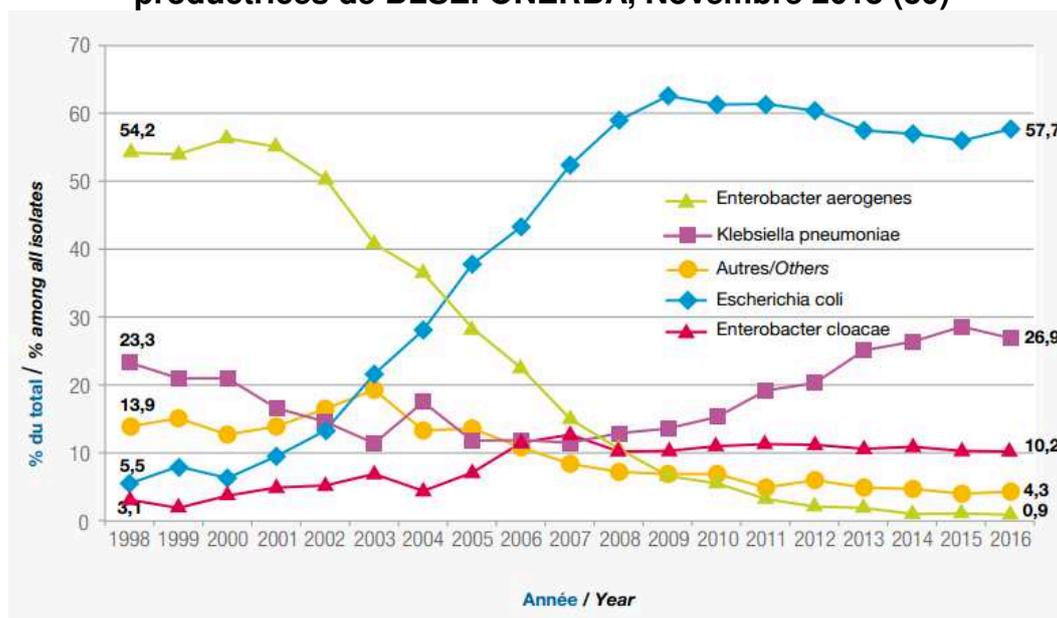


**Figure 8 : Incidence des bactériémies à entérobactérales productrices de BLSE diagnostiquées à l'hôpital par lieu d'acquisition. ONERBA, Novembre 2018 (30)**



JH : Journée d'hospitalisation

**Figure 9 : Evolution de la répartition (%) des espèces d'entérobactérales productrices de BLSE. ONERBA, Novembre 2018 (30)**

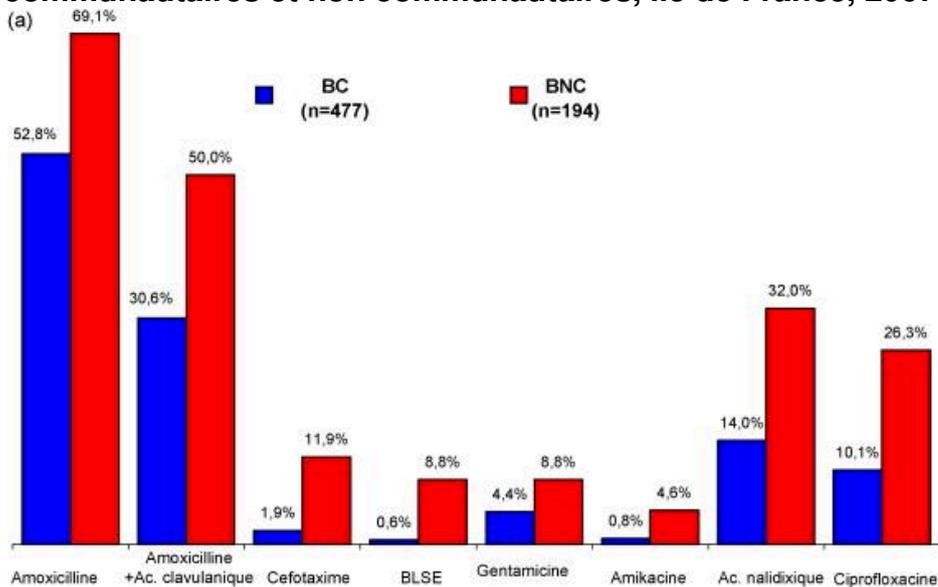


La diffusion mondiale des bactéries multirésistantes (BMR) a réduit le nombre de médicaments efficaces, augmenté la mortalité attribuable aux infections, augmente la durée du séjour et les frais d'hospitalisation (7).

Les bactériémies d'origine communautaire chez les adultes immunocompétents impliquent généralement des bactéries sensibles aux médicaments, tandis que les bactériémies associées aux soins de santé sont souvent dues à des souches multirésistantes (BMR) (1), comme le démontre l'étude Française de 2007 en île de France (17), illustré dans les Figure 10 et Figure 11, qui compare les résistances aux

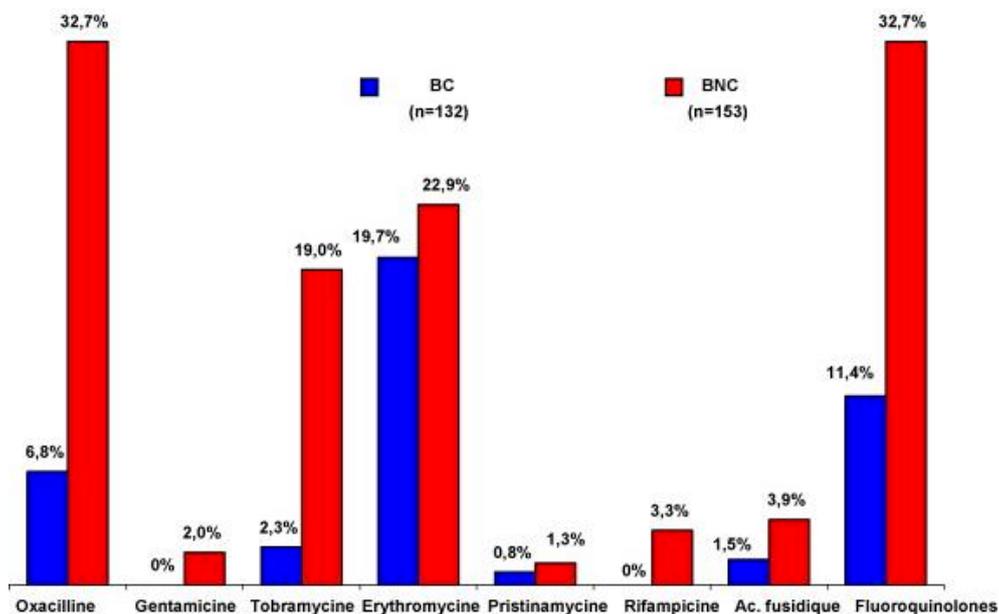
antibiotiques des bactériémies d'origine communautaire et nosocomiale à *E.coli* et *S.aureus*.

**Figure 10 : Résistance aux antibiotiques de *E. coli* dans les bactériémies communautaires et non communautaires, île de France, 2007 (17)**



BC : Bactériémie communautaire, BNC : Bactériémie non communautaire

**Figure 11 : Résistance aux antibiotiques de *S. aureus* dans les bactériémies communautaires et non communautaires île de France, 2007 (17)**



BC : Bactériémie communautaire, BNC : Bactériémie non communautaire

## f. Traitements

Lors d'un sepsis ou choc septique, la prise en charge du patient doit être la plus précoce possible, de par le risque d'évolution du sepsis en choc septique, d'évolution en syndrome de défaillance multiviscérale et en décès. Elle passe par la surveillance de paramètres physiologiques tels que, la saturation du sang en oxygène (SaO<sub>2</sub>), la pression artérielle, la diurèse, la lactatémie (signe d'hypoperfusion) ou tout signe de dysfonction d'organes. Une prise en charge hémodynamique est réalisée par administration d'une expansion volémique d'au moins 30 mL/kg de cristalloïdes dans les 3 premières heures, à renouveler ; par l'administration de vasopresseurs, tels que la noradrénaline (effet  $\alpha$ 1 vasoconstricteur), en cas d'hypotension persistante malgré l'expansion volémique initiale ; et enfin par l'administration de inotropes, tels que la Dobutamine (effet  $\beta$ 1 cardiaque), en cas de défaillance myocardique.

Des thérapeutiques adjuvantes telles que l'assistance respiratoire, la corticothérapie substitutive pour pallier l'insuffisance surrénalienne relative liée au choc, le maintien de la glycémie ou l'hémodilution en cas de défaillance rénale font également partie de la prise en charge (23).

Une antibiothérapie empirique à large spectre avec une ou plusieurs molécules doit couvrir tous les agents pathogènes probables (couverture bactérienne et potentiellement fongique ou virale). Le traitement antibiotique est bactéricide et intraveineux. L'antibiothérapie est débutée si possible après les prélèvements microbiologiques. Le choix de l'antibiothérapie dépend de la porte d'entrée, du terrain, du caractère communautaire ou associé aux soins (risque de BMR) de la bactériémie. Chaque retard d'une heure dans l'administration d'antibiotiques appropriés est associé à une augmentation mesurable de la mortalité et du risque d'atteinte secondaire d'organes (23,31–33).

Le choix du traitement antibiotique est le plus souvent probabiliste et repose sur l'identification d'un foyer infectieux, l'évocation d'un agent pathogène et la connaissance des données épidémiologiques de la résistance. Le traitement antibiotique empirique est défini comme une antibiothérapie à large spectre initiée avant la disponibilité de l'examen direct de l'hémoculture positive (observation microscopique après coloration au Gram). L'antibiothérapie ciblée/efficace/appropriée se définit comme le traitement instauré secondairement, adapté aux résultats microbiologiques. Une désescalade thérapeutique utilisant un antibiotique à spectre plus étroit (adapté à l'antibiogramme) est possible et recommandée en cas de stabilisation clinique du patient et après identification du pathogène et de sa sensibilité. (23,32)

L'étude de Savage et al. (6) incluant 1190 patients, met en évidence que parmi les bactériémies, 22.4% des patients ont reçu un traitement initial inapproprié. Parmi eux, un tiers (37.1%) sont admis en réanimation en choc septique. Les patients ayant reçu un traitement empirique inadéquat étaient également plus susceptibles d'avoir contracté leur infection aux soins intensifs et d'avoir été infectés par *Enterococcus* spp ou *Candida* spp., par rapport à ceux bénéficiant d'un traitement adéquat.

Une autre étude réalisée dans les hôpitaux d'île de France, concernant 2013 épisodes bactériémiques, met en évidence que le traitement anti-infectieux,

administré avant la transmission au clinicien du premier résultat positif de l'hémoculture, était adapté pour 1286 épisodes (63,9 %) et inadapté pour 266 épisodes (13,2 %). Aucun anti-infectieux n'avait été administré pour 461 épisodes (22,9 %). Le taux d'adaptation était supérieur lorsque la bactériémie était d'origine communautaire (71,7 % versus 52,9 %) ( $p < 0,01$ ) (17).

L'étude de Kumar et al. (31) en 2006 met en évidence l'existence de retards importants dans l'administration d'antibiotiques efficaces chez les patients en choc septique. Parmi les patients qui n'étaient pas déjà sous traitement efficace, le délai médian avant l'administration d'un traitement antimicrobien efficace après le début initial d'une hypotension récurrente ou persistante était de 6 heures. Seuls 14,5% de tous les patients qui n'avaient pas reçu d'antibiothérapie efficace avant le choc les ont reçus dans la première heure suivant la documentation de l'apparition d'une hypotension récurrente ou persistante. Seuls 32,5% les avaient reçus 3 heures après le début de l'hypotension et 51,4% à 6 heures. Même 12 heures après la première occurrence d'hypotension récurrente ou prolongée, 29,8% des patients n'avaient pas reçu de traitement antimicrobien efficace.

Une étude rétrospective de 2154 cas menée sur 14 unités de soins intensifs aux Etats-Unis et au Canada mettait en évidence que la durée de l'hypotension avant la mise en place d'une antibiothérapie efficace est corrélée à la mortalité (RR à 1.12 par heure de délai ;  $p < 0.001$ ). Dans les 6 heures suivant la survenue de l'hypotension, chaque heure est associée à une diminution de la survie de 7.6% (32). Dans l'étude de Robineau et al. (4) en 2018 portant sur 121 hôpitaux français, l'antibiothérapie empirique est appropriée pour 61% des individus présentant une bactériémie. L'antibiothérapie ciblée est démarrée dans les 24 heures pour 45% des individus et dans les 48 heures pour 82% des individus. Une antibiothérapie initiale inappropriée lors de chocs septiques représente 20% des patients et est associée à une diminution de la survie d'un facteur 5 (32,34).

Dans l'étude de Alfandari et al. sur 493 patients présentant une bactériémie dans les hôpitaux du nord de la France, Une antibiothérapie efficace a été observée dans 74 % des cas en probabiliste et 96 % en documenté. Le délai médian entre la positivité de l'hémoculture et l'instauration d'un antibiotique actif était de 14 heures et 38 minutes. L'antibiothérapie probabiliste était conforme au référentiel local dans 77 % des cas. Seules 4 % des contaminations ont été traitées. La mortalité à j10 était de 12,1 %, plus élevée en cas de sepsis grave ou de choc septique (22,5 %) que pour les bactériémies simples (7,1 % ;  $p < 0,0001$ ) (18).

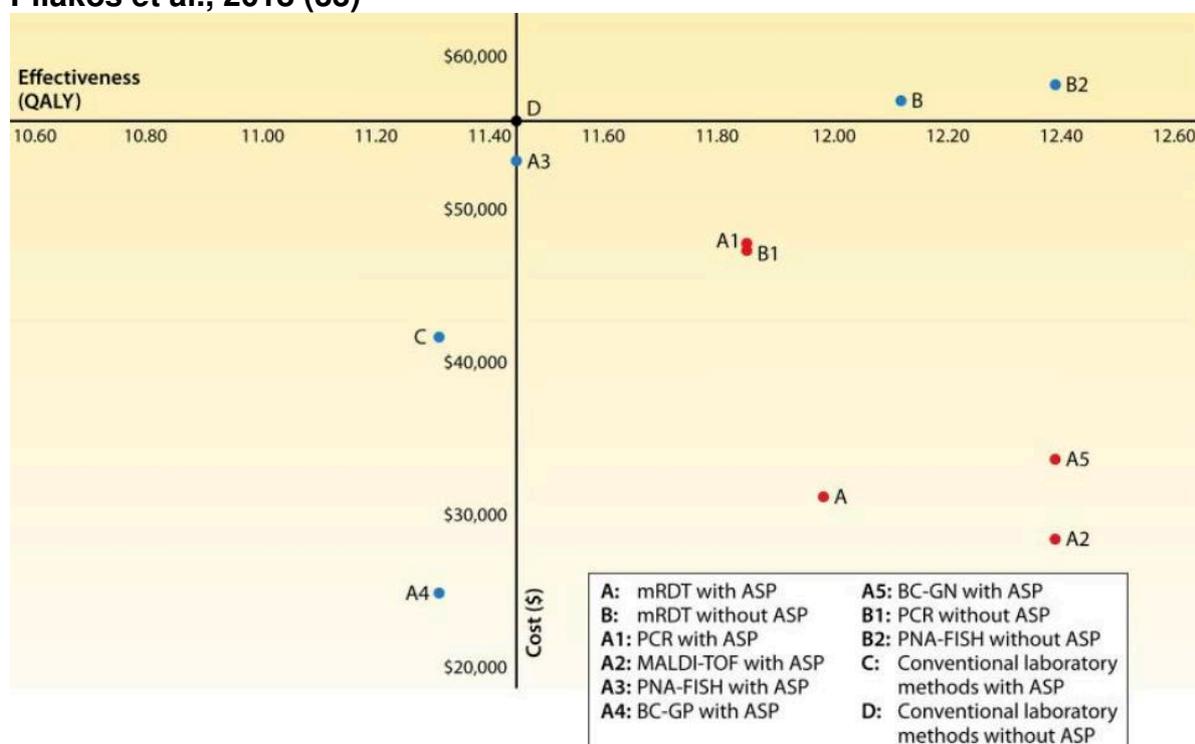
L'identification rapide des agents pathogènes et sa communication permet de passer rapidement d'une antibiothérapie à large spectre à une thérapie ciblée (35), réduisant potentiellement la toxicité des médicaments, la résistance aux antimicrobiens et les coûts des soins de santé. La communication du résultat de l'examen direct ou « Gram » permet de réduire significativement la mortalité (36,37).

L'implication d'une équipe référente infectieuse est associée à une diminution de la mortalité. Cela s'explique par une gestion spécialisée : du choix de l'anti-infectieux (diminution des larges spectres et du coût des traitements), de son dosage, des

effets indésirables, des interactions médicamenteuses et d'un suivi personnalisé du patient. L'association d'une identification rapide par méthode moléculaire associée à l'implication d'une équipe référente infectieuse réduit le temps nécessaire à l'adaptation thérapeutique vers une thérapie ciblée, améliore la survie des patients et diminue l'émergence de la résistance aux antimicrobiens (1,4,33,37,38).

L'étude de Pliakos et al. en 2018 compare les différentes approches stratégiques, en fonction de leurs coûts et leur efficacité, associées ou non à l'implication d'une équipe référente infectieuse dans la prise en charge thérapeutique. Dans la Figure 12 issue de cette étude l'axe des y représente le coût moyen d'une stratégie, tandis que l'axe des x représente l'efficacité moyenne d'une stratégie. Les stratégies rentables sont représentées avec des marqueurs rouges, la stratégie de base est représentée avec un marqueur noir et les stratégies restantes qui ne sont pas optimales ou non rentables sont indiquées avec des marqueurs bleus (33).

**Figure 12 : Plan de rentabilité pour selon les stratégies, étude Américaine, Pliakos et al., 2018 (33)**



ASP : implication d'une équipe de referent infectieux, mRDT : test moléculaire rapide, PNA-FISH : hybridation in situ en fluorescence d'acide nucléique peptidique, BC-GP : Puce à ADN détectant les bactéries Gram positifs des hémocultures, BC-GN : Puce à ADN détectant les bactéries Gram négatifs des hémocultures, Conventional laboratory méthodes : Méthode conventionnelle de laboratoire.

Chez les patients atteints de bactériémie associée à un sepsis sévère ou de choc septique, l'augmentation du volume de distribution conduit de nombreuses équipes de soins intensifs à utiliser des doses élevées d'antibiotique. Cela pourrait également être utile pour les patients présentant un tableau clinique moins sévère mais possédant des facteurs de risques associés à une mortalité plus élevée (4).

## 2. Aspects diagnostiques – hémocultures

### a. Prélèvement

L'examen « hémoculture » est défini par la culture bactériologique et/ou mycologique de sang. En cas de suspicion de bactériémie associée à un sepsis ou d'endocardite, il consiste à prélever, de préférence avant l'initiation d'un traitement antibiotique pour ne pas fausser le résultat microbiologique, aseptiquement 40 à 60 mL de sang dans 4 à 6 flacons d'hémocultures pour un adulte. Ces flacons contiennent des milieux riches pour la culture des micro-organismes aérobies et anaérobies. Chez l'enfant, la concentration bactérienne dans le sang est plus élevée que chez l'adulte ce qui permet chez le nouveau-né de limiter la quantité de sang à quelques millilitres. Le volume de sang à mettre en culture est fonction du poids de l'enfant (de 0 à 40Kg). Le prélèvement est réalisé par ponction d'une veine superficielle, habituellement au pli du coude, appelé « prélèvement périphérique » ou à partir de dispositif implantable type cathéter veineux ou central (artériel).

L'antisepsie de la peau doit être rigoureuse afin d'éviter une positivité de l'examen faussée par une contamination de l'échantillon avec des bactéries de la flore cutanée telles que les staphylocoques à coagulase négative, *Corynebacterium* spp., ou encore *Cutibacterium acnes*. Le prélèvement sur cathéter augmente le risque de contamination et doit donc être réservé à des indications particulières.

Après un lavage antiseptique des mains de l'opérateur, la déterision de la peau est réalisée avec de l'alcool à 70 ° et sa désinfection par un produit iodé (habituellement la polyvidone iodée) par une application soigneuse, large et prolongée (au moins une minute). La désinfection du capuchon du flacon d'hémoculture doit être réalisée avec de l'alcool à 70 ° car l'iode peut détériorer les matériaux. La déterision et la désinfection peuvent se faire avec de la polyvidone iodée alcoolique. L'opérateur doit également respecter l'ordre de prélèvement des flacons c'est-à-dire de toujours commencer par un flacon aérobie afin de ne pas amener d'air dans les flacons anaérobie et veiller à ce que les flacons soit correctement remplis. Il est recommandé de prélever 10mL de sang par flacon et de répéter le nombre de flacons afin de garder une bonne sensibilité au test pour détecter une bactériémie en cours.

Pour une bactériémie, la qualité du diagnostic est équivalente quel que soit l'intervalle entre deux prélèvements : le prélèvement « unique » optimise la spécificité de l'hémoculture en réduisant le risque de contamination. Pour une suspicion d'endocardite, il est recommandé de pratiquer des prélèvements multiples du fait du caractère transitoire de la bactériémie dans ce contexte (5,39–41).

Les bouillons d'hémoculture peuvent également servir de milieu d'enrichissement pour d'autres liquides corporels habituellement stériles tels que les liquides de dialyse péritonéale, d'ascites, péricardique, synovial, pleuraux ainsi que les prothèses articulaires pour détecter plus efficacement et plus rapidement des potentiels pathogènes (42,43).

Les modalités de prélèvement des hémocultures influençant les performances de l'analyse (volume de remplissage des flacons et nombre de paires) peuvent être améliorées dans les services de soins par une intervention de formation des médecins prescripteurs et des infirmiers/ères des services (44). Une prise en charge immédiate des hémocultures permet de réduire en moyenne de 20 heures l'adaptation des antibiotiques (45).

## b. Milieu de culture

Quel que soit le flacon, le milieu de culture est un milieu supplémenté en facteurs de croissance, anticoagulants et parfois d'inhibiteurs d'antibiotiques.

Le sang des patients contient de nombreuses substances antibactériennes. La dilution du sang dans le milieu de culture permettrait de diminuer l'effet de ces substances inhibitrices présentes dans le sang (complément, lysosyme, cellules phagocytaires, antibiotiques) de façon satisfaisante. Le ratio sang-bouillon de culture est habituellement compris entre 1/5 et 1/10 (vol/vol) mais peut atteindre des ratios plus faibles (1/2.5 à 1/5) pour certains flacons de systèmes automatisés.

Le flacon aérobie contient un bouillon type Trypticase soja. Le flacon anaérobie contient un bouillon Wilkins Chalgren. Le chlorhydrate de cystéine présent dans ce bouillon permet de réduire l'oxygène selon la réaction suivante :



Le flacon aérobie présente une atmosphère aérobie enrichie en CO<sub>2</sub> pour favoriser la croissance de nombreux micro-organismes tels que les bactéries appartenant au genre *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Campylobacter* et *Brucella*. Le flacon anaérobie contient une atmosphère anaérobie composée de CO<sub>2</sub> et de N<sub>2</sub>. Dans le flacon anaérobie, le milieu doit être suffisamment réducteur pour « piéger l'oxygène ».

Ces milieux sont enrichis en facteurs de croissance pour permettre la culture de presque tous les micro-organismes. Ils contiennent des facteurs X et V indispensables aux *Haemophilus influenzae* et favorisant également la culture de bactéries plus rares comme *Cardiobacterium* et *Actinobacillus*. Ils contiennent de la vitamine B6 (Pyridoxal) ou de la L-cystéine afin de faciliter la détection des bactéries de culture lente ou difficile, comme certaines espèces de streptocoques (*Streptococcus adjacens*, *S. defectivus*), les bactéries du groupe HACEK (*Haemophilus* spp., *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens*, *Kingella kingae*) ou encore *Brucella* spp.

Un anticoagulant est ajouté au milieu de base pour éviter la formation d'amas de fibrine qui gêneraient le traitement des bouillons mais surtout qui, en emprisonnant les bactéries dans leur réseau, constitueraient une entrave à leur isolement. En règle

générale, l'anticoagulant utilisé est le SPS (polyanéthol sulfonate de sodium), de concentration comprise entre 0.0125% et 0.05% selon les fabricants, qui a aussi de nombreuses activités inhibitrices vis-à-vis de la phagocytose cellulaire, du système du complément, du lysosyme et même de certains antibiotiques comme les aminosides. Mais le SPS pourrait avoir un effet inhibiteur sur la croissance de certaines espèces de *Neisseria* spp, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptobacillus moniliformis*, *Capnocytophaga* spp., ou *Gardnarella vaginalis*.

Certains flacons contiennent des additifs : des résines ou du charbon actif capables d'après les fabricants de neutraliser l'action des antibiotiques. Les résines à échange de cations établissent des liaisons ioniques avec les antibiotiques chargés positivement, tels que les aminosides. Les résines polymériques absorbantes se lient aux régions hydrophobes de la quasi-totalité des antibiotiques.

Cependant leurs mécanismes restent insuffisamment documentés tant pour en affirmer la nature que pour en préciser l'incidence. Il est surtout conseillé de pratiquer le prélèvement à distance de l'administration d'antibiotiques. (40,47,48)

### **c. Automate – Incubateur**

La détection de croissance automatique en incubateur a permis d'améliorer les performances de l'hémoculture en diminuant les délais de réponse grâce à une surveillance automatique et continue de la croissance microbienne : chaque flacon dans l'incubateur dispose de sa propre cellule de lecture, chaque position de flacon assure ainsi une double fonction d'incubation et de mesure. L'incubateur augmente la vitesse de croissance des micro-organismes grâce à l'agitation automatique des flacons : l'agitation renouvelle les éléments nutritifs dans l'environnement des bactéries et augmente la concentration d'oxygène dissout dans le flacon aérobie.

L'offre en France est principalement constituée de trois appareils aux performances proches : BacT/ALERT®3D (BTA3D) ou Bact/ALERT® VIRTUO™ chez bioMérieux® et BACTEC™ FX chez Becton-Dickinson® (41,49).

Le principe général de détection de la croissance microbienne repose en une mesure indirecte du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dégagé par les bactéries soit par colorimétrie (BacT/ALERT®) soit par fluorimétrie (BACTEC®) (5,50). Une alarme visuelle et/ou sonore avertit de tout résultat positif.

**Tableau 5 : Comparaison des incubateurs**

	BACT/ALERT® ou VIRTUO® (BioMérieux®)	BACTEC™ (Becton-Dickinson®)
<b>Principe de détection</b>	Mesure du CO <sub>2</sub> par colorimétrie	Mesure du CO <sub>2</sub> par fluorimétrie
	<p>Si des micro-organismes sont présents dans l'échantillon testé, ils se multiplient en métabolisant les substrats du bouillon de culture et produisent du CO<sub>2</sub></p> <p>Le CO<sub>2</sub> entraîne une diminution de pH détectée par un « sensor » fixé au fond de chaque flacon. Ce « sensor » qui contient un indicateur de pH change alors de couleur : il passe du bleu-vert au jaune.</p> <p>Le sensor est séparé du bouillon par une membrane semi-perméable qui ne laisse passer que le CO<sub>2</sub>. Toutes les 10 minutes une diode électroluminescente (LED) projette de la lumière sur le détecteur. La lumière réfléchiée est mesurée par un photodétecteur.</p> <p>La quantité de lumière réfléchiée est proportionnelle à la quantité de CO<sub>2</sub> produite. Cette mesure est ensuite comparée à la mesure au moment du dépôt du flacon.</p> <p>Un flacon sera détecté positif si la production de CO<sub>2</sub> augmente de façon exponentielle. (40,50,51)</p>	<p>Le système FX utilise aussi un sensor couplé à une membrane semi-perméable.</p> <p>Le CO<sub>2</sub> généré par la croissance microbienne entraîne l'émission de fluorescence mesurée par une photodiode toutes les 10 minutes.</p>
<b>Fréquence de mesure</b>	Toutes les 10 minutes	Toutes les 10 minutes
<b>Type de flacons</b>	Plusieurs flacons sont disponibles : flacons aérobie, anaérobie, pour les levures et champignons, et flacons pédiatriques (nécessitant un faible volume de sang).	
	Flacons avec charbon pouvant gêner la lecture des examens microscopiques	Flacons avec résine qui ne gêne pas pour la lecture des examens microscopiques

L'incubation des flacons à 35°C qui était classiquement de 7 jours sans automate peut être réduite à 120h (5 jours) avec les automates, y compris pour les bactéries historiquement à croissance lente (groupe HACCEK, *Brucella* spp. par exemple). Au-delà de ce délai, les micro-organismes détectés sont généralement des contaminants. En cas de suspicion de candidémie, il est recommandé de prolonger l'incubation jusqu'à idéalement 14 jours. En cas de suspicion d'endocardite, une durée d'incubation de 10 à 15 jours est conseillée. (5,40)

#### **d. Prise en charge des flacons d'hémocultures positifs**

Tous les flacons détectés positifs par l'automate doivent faire l'objet, le plus rapidement possible, d'un examen microscopique direct et d'une subculture sur gélose quel que soit le résultat de cet examen.

Les lames pour examens microscopiques et les subcultures sont réalisées à partir du bouillon d'hémoculture sous un poste de sécurité microbiologique de type NSB-2. Les lames pour examens microscopiques se font par coloration de Gram. Les subcultures sont incubées à 35°C en atmosphères aérobie, anaérobie, et CO<sub>2</sub>, sur, au minimum des milieux supplémentés en sang et des milieux adaptés à la morphologie de la bactérie et au contexte clinique, en prenant soin d'identifier les géloses.

En fonction du micro-organisme observé à la coloration de Gram, il est possible d'ensemencer des milieux plus appropriés si nécessaire. En cas de suspicion de bactérie anaérobie (aspect au Gram, flacon anaérobie exclusivement positif), des milieux spécifiques anaérobie sont ensemencés (un rosenow anaérobie est ensemencé et une gélose sang Schaedler incubée en anaérobiose).

Dans certaines situations lorsqu'un Bacille Gram négatif est observé, un état frais permet de voir la mobilité de certaines bactéries comme *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp. notamment.

En l'absence de micro-organisme au Gram : un état frais peut être réalisé afin d'augmenter la sensibilité de lecture et ne pas « manquer » la présence de levures. En plus des milieux habituels, des milieux spécifiques sont ensemencés afin d'augmenter la sensibilité de détection des micro-organismes exigeants (par exemple, un bouillon cœur-cervelle incubé 5j). Le bouillon d'hémoculture est ré-incubé dans l'automate conformément aux recommandations du fournisseur.

Les résultats de l'examen direct sont communiqués aux services, ce qui permet un échange clinico-biologique permettant au biologiste d'obtenir des informations cliniques sur l'état du patient et son évolution depuis le prélèvement des hémocultures, de corréler la positivité des flacons avec d'éventuels autres résultats biologiques et microbiologiques et d'apporter une aide à l'adaptation thérapeutique ciblée.

L'identification du micro-organisme isolé dans le bouillon peut se faire par diverses méthodes tels que l'étude de ses caractères biochimiques (identification Vitek®/Galerie Api®), par spectrométrie de masse (MALDI-TOF), par agglutination (principalement pour les staphylocoques et streptocoques) ou encore par biologie moléculaire (PCR)(5,41).

## e. Interprétation des hémocultures positives

Des exemples d'interprétations des résultats d'hémocultures avec prélèvement multiple sont apportés par le REMIC, référentiel en microbiologie médicale, rédigé par la Société Française de Microbiologie.

La contamination de ces prélèvements représente jusqu'à un tiers des flacons d'hémocultures positifs. Cette contamination s'effectue au moment de l'effraction cutanée nécessaire au prélèvement. Elle comprend des micro-organismes dont la pathogénicité est discutable. Les micro-organismes principalement retrouvés parmi ces contaminations font partie de l'environnement ou de la flore cutanée tel que les staphylocoques à coagulase négative et d'autres micro-organismes possédant une faible ou absence de virulence tel que *Micrococcus* spp., *Cutibacterium acnes*, *Bacillus* spp. et *Corynebacterium* spp. (5,11). Parmi les staphylocoques à coagulase négative isolés depuis les hémocultures, 77% d'entre eux sont des contaminants avérés (52). La multiplication des prélèvements est une aide à la détermination des contaminants. Son interprétation se fait d'après l'espèce isolée et le nombre de prélèvements positifs.

Malgré ces règles d'interprétation, les conclusions sont délicates en cas de bactériémies liées à un dispositif intra-vasculaire. Des investigations peuvent être réalisées sur les hémocultures prélevées sur le dispositif et en périphérie (hémocultures différentielles) afin d'incriminer ou non un dispositif intra-vasculaire comme porte d'entrée.

Une évaluation de la sensibilité aux agents antimicrobiens doit être réalisée pour tout micro-organisme isolé potentiellement pathogène. En cas de prélèvements positifs multiples montrant des isolats de la même espèce, l'étude de la sensibilité aux anti-infectieux pourra ne pas être répétée sur chaque isolat tout en tenant compte de l'évolution de la sensibilité sous pression thérapeutique. L'évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux peut être renouvelée en cas de suspicion d'échec thérapeutique.

Les staphylocoques à coagulase négative constituent un cas particulier, notamment en raison de la difficulté à établir le caractère monomicrobien des subcultures. En l'absence de recommandation et d'étude sur le sujet, il est prudent de réaliser une identification et un antibiogramme sur au moins deux flacons provenant de la même série ou de deux paires différentes afin d'affirmer le caractère monomicrobien des isolats (40).

Aux suites de l'identification et en connaissance de données cliniques, le biologiste peut dans certaines situations pertinentes approfondir l'investigation en recherchant des mécanismes de résistances précis par des tests rapides supplémentaires (par méthode phénotypique ou génotypique).

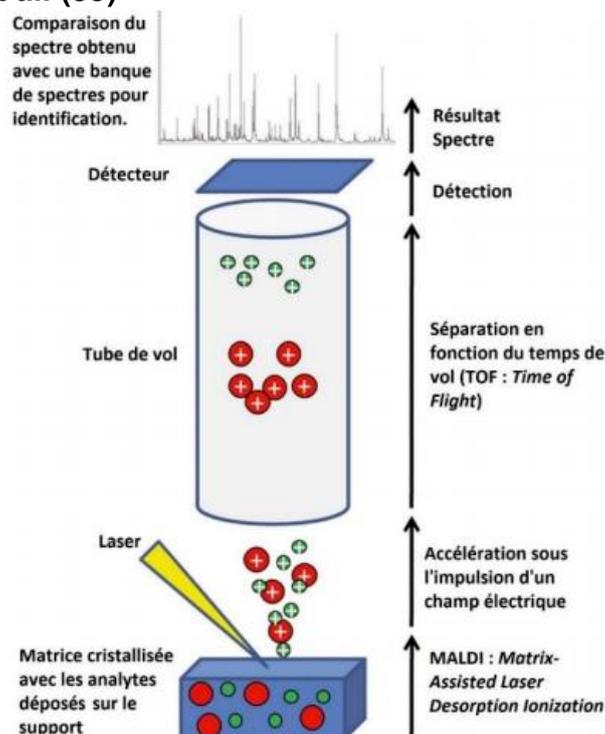
## **f. Stratégies permettant d'augmenter la rapidité de la documentation**

Les méthodes basées sur la culture restent la méthode de référence pour identifier le micro-organisme responsable de bactériémie associée à un sepsis. Pourtant, le rythme imposé par les exigences de temps de croissance de ce dernier est peu compatible avec le « besoin de vitesse » dans un contexte de bactériémie associée à un sepsis. Des méthodes rapides d'identification et de mise en évidence de résistances aux antibiotiques contribuent à réduire les délais de production de résultats et apportent une réelle plus-value dans la prise en charge thérapeutique, améliorant la survie des patients et diminuant la durée d'hospitalisation (4,37,53). Leur intégration dans la routine des laboratoires résulte de choix propres à chaque site. Elles peuvent être effectuées directement à partir du bouillon d'hémoculture positif ou après une courte période d'incubation sur gélose (5h, par exemple). Cela permet de réduire pour certains micro-organismes le délai d'identification et d'antibiogramme d'environ 20h, avec une surcharge de travail technique très faible et dans le respect des bonnes pratiques (40).

### **i. Méthode phénotypique par spectrométrie de masse**

L'identification par MALDI-TOF MS est basée sur la comparaison des profils protéiques obtenus par spectrométrie de masse à partir d'un échantillon bactérien ou fongique, avec une base de données de profils obtenus à partir de micro-organismes caractérisés (Figure 13). MALDI-TOF MS est un outil précis et rapide dont les performances dépendent largement de la pureté et de la quantité du micro-organisme étudié (5,54). C'est une technique classique et accessible pour l'identification bactérienne en laboratoire.

**Figure 13 : Principe de l'identification bactérienne par spectrométrie de masse d'après Croxatto et al. (55)**



L'applicabilité générale de cette technique pour l'identification bactérienne est réalisable à partir de colonies bactériennes obtenues après  $20 \pm 4$ h de culture sur gélose, mais également sur culture dites « précoces » sur gélose, et directement à partir du bouillon d'hémoculture positif avec 95% de concordance avec la méthode de référence (54).

- Identification sur cultures « précoces »

La performance de MALDI-TOF-MS pour l'identification directe de micro-organismes issus d'hémocultures positives après 5h d'incubation sur gélose obtient de bons résultats avec une concordance avec les méthodes conventionnelles proche de 90% au genre et >85% au niveau de l'espèce (56).

- Identification à partir du bouillon positif

Les spectres de masse générés à partir d'échantillons d'hémocultures avec une charge bactérienne élevée ( $> 10^8$  UFC/ml) ressemblent étroitement à ceux obtenus à partir de colonies prélevées sur gélose. À des inoculums inférieurs, les pics de fond non bactériens deviennent plus importants et influencent l'adéquation du spectre. Les scores d'identification des échantillons enrichis de  $10^7$  UFC/ml sont significativement inférieurs à ceux des subcultures, mais la meilleure correspondance dans la base de données représente de manière cohérente l'identification d'espèce correcte. À  $10^6$  UFC / ml, les spectres deviennent indiscernables de ceux des hémocultures stériles et donnent des identifications incorrectes à faible score en raison de l'appariement arbitraire des pics non bactériens (54). Par conséquent, l'enrichissement bactérien et les procédures de purification sont nécessaires pour les hémocultures positives, qui

contiennent des concentrations élevées de matériel non-microbien pouvant interférer avec l'identification.

Plusieurs méthodes internes et commerciales ont été développées pour isoler et concentrer les micro-organismes des hémocultures positives. Elles comprennent des méthodes de centrifugation par lyse, utilisant la saponine ou autres méthodes équivalentes de détergent doux, la méthode du séparateur de sérum ou encore le kit commercial MALDI Sepsityper® (Bruker Daltonics®). Ces protocoles de préparation de culots peuvent non seulement être utilisés pour l'identification de MALDI-TOF MS mais fournissent également suffisamment de matériel de départ pour d'autres applications en aval, y compris la coloration de Gram, la réalisation d'un antibiogramme et des tests rapides basés sur la PCR. L'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF réalisée directement à partir de flacons signalés positifs par l'automate a été validée avec des performances satisfaisantes, bien qu'opérateur dépendant, pour de nombreux protocoles. Les performances de l'identification varient en fonction de la méthode d'enrichissement et de purification. De mauvaises identifications de MALDI-TOF MS à partir de préparations d'hémoculture sont principalement observées avec des bactéries difficiles à lyser (par exemple *Klebsiella pneumoniae*), des espèces bactériennes étroitement liées (*Streptococcus* du groupe mitis) et des bacilles tels que les anaérobies qui sont mal représentés dans la base de données du MALDI TOF MS (5). La mise en œuvre de ces méthodes commerciales ou non nécessite un temps technique variant de 15 minutes à 2 heures selon le protocole et permet de gagner 24 heures dans le délai de rendu de l'identification, mais doit tenir compte des contraintes d'intégration dans le flux du travail de routine (40).

Le kit commercial MBT STAR®-Carba IVD assay (Bruker Daltonics®) en association avec le MALDI TOF MS permet l'identification rapide des micro-organismes (obtenues par culture ou à partir du bouillon positif) et simultanément la détection de l'activité carbapénèmase de la souche. Ce kit est performant pour la détection des entérobactérales et *Pseudomonas* spp. productrices de carbapénémases mais manque de sensibilité pour les souches de *Acinetobacter* spp.. C'est une méthode fiable mais les étapes fastidieuses de préparation des échantillons (incubation en solution pendant 30 à 60min) et les coûts des réactifs doivent être pris en compte avant leur mise en œuvre (5,57).

## ii. Méthode génotypique par PCR

Les méthodes moléculaires sont généralement plus rapides que les approches phénotypiques car elles sont indépendantes de la culture. Cependant, l'utilisation de méthodes basées sur l'amplification d'acides nucléiques telles que la PCR doit faire face à plusieurs limites associées à un échantillon de sang : la présence d'inhibiteurs de PCR, la présence d'une grande quantité d'acides nucléiques non microbiens, la présence d'ADN contaminant, et la persistance de l'ADN des micro-organismes morts.

Des tests rapides basés sur la PCR qui permettent la détection et l'identification de *S. aureus* sensible à la méticilline (SASM) et de *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) ont été développés pour les hémocultures en raison de l'impact clinique et épidémiologique préoccupant de ce pathogène. Les systèmes de détection rapide basés sur la PCR SASM / SARM tels que GeneXpert® MRSA / SA BC (Cepheid®) et le StaphSR assay® (BD GeneOhm®) sont basés sur la PCR multiplex en temps réel pour détecter *S. aureus* et la présence du gène *mecA*. Les résultats sont obtenus en environ 1,5 h (5,37,58). Sa simplicité d'utilisation et de mise en place dans un laboratoire en fait un atout dans la prise en charge microbiologique.

Le Filmarray® de BioMérieux® utilise également la PCR pour amplifier des gènes d'intérêts. Cet automate s'inscrit dans une démarche de diagnostic syndromique détaillé ci-après.

Des méthodes d'amplification moléculaire peuvent être nécessaires pour la détection de certains organismes (par exemple, *Tropheryma whipplei*). Dans de rares cas d'endocardite à culture négative, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour amplifier le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S et le séquençage de l'ADN du tissu valvulaire, peuvent aider à déterminer un agent étiologique (39).

### iii. Méthode génotypique par hybridation

L'hybridation des sondes et les puces à ADN (ou « microarrays ») ne sont pas des méthodes basées sur l'amplification d'acides nucléiques. Elles sont moins influencées par la présence d'inhibiteurs et moins sujets à la contamination mais nécessitent une charge bactérienne ou fongique élevée. Par conséquent, ces méthodes sont utilisées sur hémocultures positives dans lesquelles la charge bactérienne peut atteindre jusqu'à  $10^6$  à  $10^9$  UFC/ml.

Le principe d'une puce à ADN réside dans l'hybridation entre deux molécules d'ADN simples brins complémentaires. L'échantillon amplifié (ADN ou ARN), marqué de manière fluorescente, est mis en contact avec la puce portant une multitude de sondes qui sont des fragments d'ADN ou des oligonucléotides de séquence connue. Après lavage du matériel fixé de manière non spécifique, le signal est quantifié au niveau de chaque sonde. Les puces à ADN permettent de détecter un nombre limité d'espèces qui couvrent 90 à 95% de tous les agents pathogènes responsables de bactériémies. Le délai d'exécution est d'environ 2,5 à 4 heures avec une sensibilité variant de  $10$  à  $10^5$  UFC / ml. Contrairement à l'hybridation *in situ* en fluorescence, les puces à ADN contiennent généralement des sondes pour la détection des gènes de résistance tels que *mecA*, *vanA* / *vanB* et *blaKPC*. Par exemple, le Verigene® (Luminex®) comprend deux kits distincts pour la détection de 12 bactéries Gram positif et 9 Gram négatif et leurs marqueurs de résistance avec une sensibilité allant de 81 à 100% et une spécificité supérieure à 98%. Le test Prove-it Sepsis® (Mobidiag®, Esbo, Finlande) combine une PCR avec une puce à ADN pour un temps de réalisation de 3h30, et a une sensibilité de 95% et spécificité de 99% (5,37,58).

L'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), qui comprend la liaison spécifique de sondes fluorescentes d'acides nucléiques d'identités connues sur des séquences d'ADN complémentaires faisant parties du génome du micro-organisme inconnu à identifier (ARNr 16S pour les bactéries et l'ARNr 18S pour les champignons), peut être effectuée directement à partir des hémocultures positives. La liaison spécifique est observée à l'aide d'un microscope à fluorescence. Le choix de la sonde dépend de la coloration de Gram : sondes staphylocoques (*S. aureus* / staphylocoques à coagulase négative), sondes entérocoques (*Enterococcus faecalis* / *Enterococcus faecium*), sondes bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli* / *Pseudomonas aeruginosa* / *Klebsiella pneumoniae*), sondes de levures (*Candida albicans* / *Candida glabrata* / *Candida parapsilosis* / *Candida krusei*) par exemple. Les solutions commerciales PNA-FISH® et Quick-FISH® (AdvanDx®, Woburn, MA, USA) affichent un temps de résultat d'environ 1,5 à 3 h avec une sensibilité et spécificité de 97–100% et 90–100%, respectivement. Le système AccuProbe® (Gen-Probe®, San Diego, CA, USA) est basé sur une sonde ADN capable de détecter *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus* spp. et les streptocoques du groupe A et B. La sensibilité et la spécificité sont supérieures à 97%, avec à l'exception des sondes *Staphylococcus aureus* qui démontrent une sensibilité de 99,8% et spécificité de 80,8%. Le système Accelerate Pheno® (Accelerate Diagnostics®, Inc. Tucson, AZ, USA) présente des résultats d'antibiogramme à partir des bouillons positifs dans 58.1% des cas, avec une sensibilité de 94.7% et une spécificité de 98.9%. Ce système rend une identification, réalisé grâce à la méthode FISH, en 1,4 heures. La sensibilité aux antimicrobiens est mesurée grâce à l'utilisation de l'imagerie microscopique. L'inoculum est mis en croissance avec une seule concentration de différents antibiotiques, et les différents profils et cinétiques de croissance capturés sont analysés et comparés à une base de données, permettant au module de déterminer les CMI en 6.6 heures.

Bien que la technologie FISH permette d'identifier les bactéries et les levures les plus courantes dans le sang, certaines bactéries ne peuvent être identifiées qu'au niveau du genre en raison du nombre limité de sondes spécifiques aux espèces disponibles (5,37,58,59).

#### iv. Approche syndromique

L'approche syndromique pour le diagnostic de maladie infectieuse est une approche diagnostique probabiliste qui cible un large éventail d'étiologies différentes sur un échantillon qui vient d'un prélèvement réalisé sur un organe ciblé (pulmonaire, méningé, sanguin).

Le principe repose sur l'utilisation d'une méthode génotypique par PCR. Les techniques qui en découlent testent plusieurs possibilités étiologiques (bactéries, virus, champignons) dans le but de mettre en évidence la présence du pathogène responsable de l'infection ainsi que des mécanismes de résistance ciblés. Elles se présentent sous la forme d'un kit qui contient un panel de gènes à analyser. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet un rendu très rapide de résultats en prenant en compte les pathogènes les plus fréquemment rencontrés dans une

infection donnée, permettant ainsi au clinicien d'engager une antibiothérapie orientée ou du moins très ciblée. Les limites de cette méthode sont d'une part, l'absence de détection d'un organisme absent du panel et d'autre part, du point de vue du laboratoire, l'approche syndromique peut déresponsabiliser le clinicien qui limite les recherches de diagnostics et se contente de demander un diagnostic rapide pour l'échantillon à tester.

Parmi les grands fabricants proposant des panneaux syndromiques, on peut citer : le FilmArray® de bioMérieux®, qui utilise la PCR imbriquée dans des microréservoirs séquentiels, avec détection de fluorescence en aval. C'est un système multiplex basé sur la PCR conçu pour détecter 25 micro-organismes (90 à 95% des agents pathogènes impliqués dans les hémocultures) et les gènes de résistance *mecA*, *vanA* et *vanB* et *blaKPC* (5,58). L'effet clinique et économique du FilmArray® sur les patients est associé à des réductions significatives de la mortalité, des jours et des coûts d'hospitalisation en soins intensifs et des coûts totaux. Les résultats du panel FilmArray® ont également un effet significatif sur le traitement à la vancomycine. Son utilisation favorise la mise en place d'un traitement ciblé plus précoce pour les entérocoques résistants à la vancomycine et entraîne une moindre utilisation de la vancomycine pour traiter les bactériémies à *Staphylococcus aureus* ou staphylocoques à coagulase négative sensibles à la méticilline (37) ;

Le système ePlex® de GenMark®, pour qui la détection de pathogènes implique des sondes oligonucléotidiques marquées au ferrocène, qui s'associent à des électrodes via des événements d'hybridation amplicon-sonde, modifiant l'impédance de manière mesurable ;

Le Verigene® de Luminex®, qui détecte les amplicons grâce à des sondes oligonucléotidiques conjuguées or / argent et un phénomène de champ évanescent ;

Les systèmes de cytométrie en flux xTAG® et NxTAG®, également de Luminex®, qui utilisent des microbilles à code à barres fluorescentes pour cibler les amplicons ;

Le système BD MAX® de BD®, une plate-forme qPCR qui permet le multiplexage grâce à la robotique automatisée ;

Et la plate-forme T2Dx® de T2 Biosystems®, qui utilise la relaxométrie RMN pour détecter l'agglomération médiée par amplicon des sondes de capture (60–63).

#### v. Méthodes sur sang direct

Les analyses moléculaires sont de plus en plus utilisées dans les laboratoires de bactériologie comme alternatives rapides aux méthodes basées sur la culture. Des tentatives ont été faites pour détecter directement des agents pathogènes et des marqueurs de résistance par PCR sur des échantillons de sang sans incubation préalable (Roche® LightCycler® SeptiFast, Seegene® MagicPlex® Sepsis test, Abbott® Iridica®). Cependant, ces tests n'ont pas rencontré un large succès en raison de leur sensibilité et spécificité moyennes et le manque d'automatisation complète. De plus, ces tests ne recherchent qu'un nombre limité de gènes de résistance aux antibiotiques de sorte que le schéma probabiliste ne peut être adapté qu'en fonction des espèces bactériennes (1).

Plus récemment, un test basé sur la résonance magnétique (T2Bacteria® Panel, T2Biosystems®) a été rendu disponible et a montré une sensibilité plus élevée (90%) que les méthodes précédentes avec un temps de rotation plus court (3h30 contre 5 à 8 heures) (1). Le principe de cette méthode réside dans l'amplification d'ADN des bactéries en utilisant une polymérase thermostable et des amorces spécifiques à la cible puis la détection des signaux d'agglomération des amplicons de particules par résonance magnétique. Ce test permet d'identifier 5 bactéries courantes responsables de bactériémies (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *E. Coli*) (37,64).

#### vi. Autres méthodes et conclusion

Pour la plupart des agents étiologiques d'endocardite infectieuse, les méthodes conventionnelles d'hémoculture suffiront. Cependant, certains agents étiologiques moins courants ne peuvent pas être détectés avec les méthodes actuelles d'hémoculture. Les agents étiologiques les plus courants de l'endocardite à culture négative, *Bartonella* spp et *Coxiella burnetii*, peuvent souvent être détectés par des tests sérologiques conventionnels (39).

Chaque technique présente des avantages et des inconvénients, liés aussi bien à des aspects pratiques, qu'économiques. Bien que l'hybridation *in situ* soit la technique la plus rapide et la plus performante, les techniques commerciales qui en découle reste néanmoins coûteuses. Les laboratoires d'analyse médicale peuvent être amenés à privilégier des techniques de PCR moins coûteuse que l'hybridation *in situ* qui reste pourtant très efficace avec un bénéfice important pour la prise en charge des patients.

Le choix de la technique utilisée dépend de sa performance, son coût, son gain de temps sur le rendu des résultats et sa praticabilité. La réalisation d'une analyse faisant appel à une technique de PCR est fonction du contexte clinique : son utilisation peut apporter un bénéfice pour une infection grave en soin intensif mais est peu contribuable et trop coûteuse pour une infection communautaire non grave. Dans le cas des bactériémies, les méthodes phénotypiques sont tout aussi efficaces et performantes que les méthodes génotypiques pour apporter une information cliniquement pertinente dans la prise en charge thérapeutique et à moindre coût.

**Tableau 6 : Tableau comparatif des capacités des techniques commerciales disponibles pour l'identification/antibiogramme rapide à partir des bouillons d'hémocultures positifs (25).**

Technologie	Identification	Détection de résistance	Antibiogramme	Temps d'obtention des résultats
PCR	Oui	Non	Non	1-3 heures
PCR Multiplex	Oui	Oui*	Non	1-2 heures
Puce à ADN	Oui	Oui	Non	2.5 heures
MALDI-TOF	Oui	Non	Non	5-24 heures
FISH	Oui	Non	Non	1 heure
FISH et cinétique de croissance	Oui	Oui	Oui	1.25 heures pour l'identification et 5 heures pour l'antibiogramme

\*Spécifique à certaines techniques qui ciblent les gènes responsables de résistances

Différentes modalités méthodologiques de réalisation d'antibiogramme permettent un rendu rapide des résultats tels que sa réalisation à partir de cultures précoces, à partir d'un culot de centrifugation du bouillon d'hémoculture ou directement par dilution à partir du bouillon. Dans les recommandations du CA-SFM/EUCAST, l'antibiogramme direct à partir des flacons positifs par méthode de diffusion est validé (40).

## II. Antibiogramme

L'antibiogramme est un examen complexe dont le paramètre principal est la souche bactérienne qui est un organisme vivant dont la variabilité est impossible à maîtriser, connaître ou prédire. L'antibiogramme permet de mesurer la sensibilité aux antibiotiques d'une souche bactérienne.

Les données de l'antibiogramme sont essentielles puisqu'elles guident le choix thérapeutique du clinicien et permettent le traitement adapté des infections documentées. Collectivement, elles permettent de surveiller l'évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques et contribuent ainsi à définir le traitement empirique des infections non documentées. Des mises à jour régulières des stratégies de traitements empiriques sont nécessaires pour ajuster la thérapeutique à l'environnement microbiologique local (4).

### 1. Méthodes

L'antibiogramme se réalise selon les recommandations apportées par l'EUCAST et le CA-SFM/EUCAST. Dans certaines situations et pour certaines souches, il existe des marqueurs pour une famille d'antibiotiques (il n'est bien sûr pas possible de tester toutes les bêta-lactamines par exemple) qui permettent d'obtenir un phénotype de résistance « observé » et de déduire toutes les résistances croisées pour un

panel de molécules (65). L'interprétation phénotypique du biologiste reste essentielle à l'observation des erreurs analytiques inhérentes aux techniques utilisées et au caractère aléatoire de l'étude du vivant.

Un antibiogramme, quelle que soit la méthode utilisée, se réalise à partir d'un inoculum qui correspond à une suspension bactérienne en solution salée, atteignant une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland. L'inoculum se réalise le plus souvent à partir de colonies bactériennes, prélevées à l'aide d'une cèse ou écouvillon stérile, après un temps de pousse suffisant sur gélose pour être isolé afin de pouvoir prélever les colonies ayant le même aspect. L'inoculum peut également se réaliser à partir d'un milieu de culture, supposé monomicrobien, tel que l'hémoculture (9,66).

La méthode de référence reconnue au niveau international consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque molécule antibiotique. En pratique courante, plusieurs méthodes ont été développées et standardisées pour exécuter ces antibiogrammes, les unes utilisant des tests de diffusion (méthode des disques ou méthode par bandelettes), les autres des tests de dilution en bouillon (microdilution) tels que ceux utilisés dans certains automates (Vitek<sup>®</sup> 2, Phoenix<sup>®</sup>, Microscan<sup>®</sup>), comprenant souvent un logiciel expert.

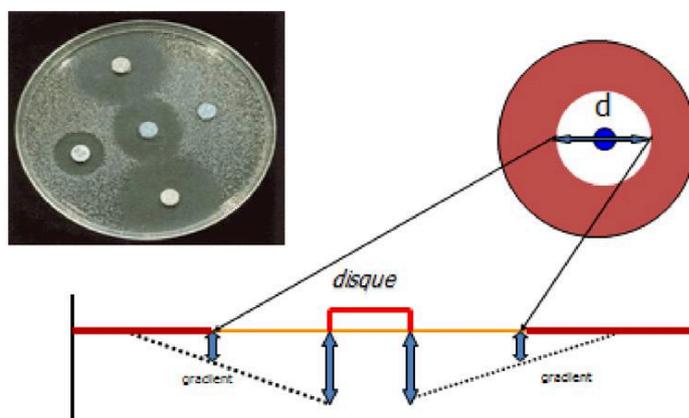
#### **a. Diffusion en milieu solide**

L'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé est une technique utilisée depuis de nombreuses années et la plus largement utilisée en biologie médicale. Elle permet de tester la majorité des bactéries pathogènes y compris les micro-organismes exigeants.

La réalisation de cette méthode effectuée à partir d'une suspension bactérienne de 0.5 McFarland et doit être ensemencée de préférence dans les 15 minutes suivant sa préparation sur des milieux gélosés (MH ou MH-F) standardisés choisis en fonction du micro-organisme à analyser. L'ensemencement s'effectue de manière à recouvrir l'intégralité de la gélose en utilisant un rotateur automatique de plaque ou par technique de stries sur 3 directions, en s'assurant qu'il n'y ait pas d'espace entre ces stries. Le dépôt des disques d'antibiotiques, calibrés en taille et en concentration d'antibiotique, doit s'effectuer dans les 15 minutes qui suivent l'ensemencement de la gélose à partir de la suspension. Un dépôt effectué au-delà de ce temps risque de rendre le disque inefficace du fait d'une pousse précoce des micro-organismes et donc de fausser l'interprétation du diamètre d'inhibition. Quelques secondes après le dépôt des disques, l'antibiotique diffuse du papier vers la gélose selon deux directions, l'une verticale (vers le fond de la gélose), l'autre horizontale, de façon supposée homogène autour du disque. Cette double diffusion crée ainsi un gradient de concentration homogène décroissant du bord de la pastille vers l'extérieur. Après ensemencement de la gélose par la bactérie à tester, la croissance de celle-ci se fait tout autour du disque, en s'arrêtant pour former un halo d'inhibition de la croissance

à l'endroit où la concentration du gradient dans la gélose est égale à la concentration minimale inhibitrice (65).

**Figure 14: Gradient d'inhibition autour d'un disque d'antibiotique sur gélose (65)**



Le nombre de disques (6 à 12) ainsi que l'espace entre ces disques sont standardisés sur la gélose afin d'éviter un chevauchement des diamètres d'inhibition, qui empêcherait sa lecture, et de permettre la mise en évidence de certains mécanismes de résistances observable par synergie ou induction. L'incubation de ces milieux de culture s'effectue généralement à  $35\pm 1^\circ\text{C}$  pendant une période de  $18\pm 2$  heures dans une atmosphère propice au développement propre au micro-organisme étudié (9,66).

La lecture du diamètre d'inhibition se fait visuellement, de manière manuelle à l'aide d'un instrument de mesure ou automatisée grâce à des instruments tels que SRIScan<sup>®</sup> 2000 Automatic (i2a<sup>®</sup>), Adagio<sup>®</sup> (BioRad<sup>®</sup>) ou BIOMIC<sup>®</sup> V3 (Giles Scientific<sup>®</sup>) pouvant inclure l'incubation aérobie des plaques et utilisant des caméras basse résolution pour lire les diamètres d'inhibition avec des niveaux de performance acceptables pour les micro-organismes couramment isolés en routine (67).

## **b. Antibiogramme automatisé**

De nombreux automates existent (Vitek<sup>®</sup> 2, Phoenix<sup>®</sup>, Microscan<sup>®</sup>), parmi eux, l'automate Vitek<sup>®</sup> 2 utilise une technique en milieu liquide avec une lecture spectrophotométrique de micropuits contenant des dilutions d'antibiotiques choisies pour encadrer les concentrations critiques de chaque molécule et un contrôle de culture. L'automate Vitek<sup>®</sup> 2 est un système entièrement automatisé, qui gère l'incubation, la décision de lecture et la lecture elle-même.

Sa technique de détection est basée sur un principe de calcul des CMI à partir d'un algorithme appliqué à la vitesse de croissance en l'absence et en présence d'antibiotique sur une incubation de 6 à 8 h (68)

L'appareil utilise des cartes en plastique comprenant 64 micro-puits dédiés à l'antibiogramme qui contiennent les antibiotiques sous forme déshydratée. Un nombre limité de concentrations d'antibiotiques (1 à 6 concentrations d'épreuve de 9 à 20 antibiotiques) est utilisé pour couvrir les concentrations d'intérêt thérapeutique.

**Figure 15 : Carte Vitek® dédiée à l'antibiogramme en milieu liquide**



L'appareil est équipé d'une « Smart Carrier Station » qui comprend une unité de base avec microprocesseur, une cassette d'une capacité de 15 cartes et un lecteur de codes-barres. L'inoculum est préparé manuellement. Aucun réactif n'est à ajouter. Les cartes sont placées dans la cassette, des puces électroniques permettent le transfert de l'information numérisée à l'incubateur-lecteur. Une fois la cassette mise dans le poste de chargement du Vitek® 2, elle est automatiquement déplacée au travers des postes : de lecture des codes-barres, de dilution de l'inoculum, d'inoculation puis de fermeture de la carte. Le système de transport place alors les cartes sur un carrousel pour l'incubation. Chaque carte est déplacée vers le poste de lecture toutes les 15 minutes pour une mesure de la transmission de la lumière proportionnelle à la croissance bactérienne. Une analyse par régression linéaire calcule les CMI à l'aide d'un algorithme et les résultats sont disponibles en 4 à 16 h (68,69).

Les résultats produits sont interprétés en 3 catégories cliniques : sensible (S), intermédiaire (I) ou résistant (R) avec détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) calculée. Lorsque la pousse est insuffisante, le résultat indiqué est indéterminé (TRM).

Les résultats sont interprétés par un logiciel expert : Advanced Expert System™ (AES), qui fournit par ailleurs des renseignements sur la cohérence des résultats obtenus et les mécanismes de résistance éventuellement identifiés : Penicillinase acquise, SHV1 hyperproduction, Extended spectrum Beta-Lactamase, ESBL (CTX-M LIKE), BLSE + Impermeability (cephamycins), High level cephalosporinase (AmpC), Impermeability Carba (+BLSE or +AmpC HN), ou autre mécanisme. Un module de contrôle qualité est intégré au logiciel.

L'automatisation de l'antibiogramme a considérablement réduit le temps de travail, augmenté la sécurité pour le personnel en diminuant les contacts avec les échantillons et, pour les systèmes rapides, accéléré la réponse au clinicien. De plus, l'automatisation a significativement amélioré la fiabilité des résultats grâce à la

standardisation des réactifs et de la procédure et à l'informatisation qui évite les erreurs de catégorisation et de transcription (68).

### **c. Mesure de la CMI**

La CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber toute croissance visible de la souche bactérienne étudiée (bactériostase) exprimée en mg/L ou µg/mL. La CMI du couple antibiotique/bactérie est à comparer aux concentrations critiques des référentiels de microbiologie (CA-SFM/EUCAST). Les concentrations critiques correspondent aux concentrations sériques ou tissulaires à atteindre en fonction des voies d'administration et des posologies recommandées (de quelques milligrammes à plusieurs grammes par jour). La concentration critique haute définit la résistance et la concentration critique basse définit la sensibilité de la bactérie.

Dans certaines situations critiques, la catégorisation S/I/R d'une bactérie pour un antibiotique ne suffit pas. La mesure des CMI représente un complément d'information décisif à celles obtenues par l'antibiogramme réalisé par diffusion en milieu gélosé. Il importe cependant de connaître les limites et les incertitudes pesant sur chacune de ces deux approches. L'antibiogramme par diffusion reste incontournable dans l'appréciation visuelle de certains mécanismes de résistance grâce aux interactions entre antibiotiques (synergie d'effet, induction de résistance) et est suffisant dans l'étude de la sensibilité des bactéries impliquées dans les infections peu sévères ou pour des sites facilement accessibles pour l'antibiotique. Les méthodes automatisées ont également recours à des techniques pour déterminer certaines caractéristiques phénotypiques de résistances bactériennes. La détermination des CMI permet une meilleure évaluation du niveau de sensibilité de la souche à certains antibiotiques par nécessité de résultats plus précis que ceux apportés par la méthode en diffusion, comme dans les situations suivantes : dans les bactériémies, les infections sévères, les infections ostéo-articulaires, pour les patients en réanimation et les situations où il est important de savoir si les objectifs thérapeutiques sont atteints (rapport concentration/CMI par exemple) (70).

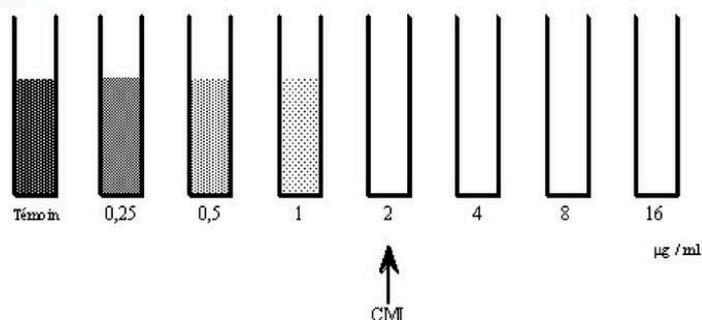
La réalisation des CMI des antibiotiques utilisés en thérapeutique est nécessaire dans les infections graves, notamment dans un contexte de réanimation où les infections sont plus sévères, sur des terrains souvent débilisés. Dans ces cas d'infections sévères, la/les bactérie(s) en cause(s) doit/doivent être traitée(s) en fonction des objectifs de pharmacocinétique et pharmacodynamie de l'antibiotique : la concentration en antibiotique doit être ajustée en fonction de la CMI (par exemple, lors d'une infection sévère à bacille Gram négatif, la concentration d'antibiotique au site de l'infection doit être à 100% du temps entre 4 et 8 fois la CMI) (71,72). La réalisation des CMI couplées aux dosages d'antibiotiques permet de mieux prévoir l'efficacité du traitement. C'est le cas aussi en cas d'inefficacité du traitement alors que la souche apparaît sensible à l'antibiogramme, en l'absence de cause évidente d'inefficacité (abcès non drainé, posologie inadéquate, etc.) (70).

### i. Technique de référence

La mesure des CMI en microdilution en bouillon de Mueller Hinton ou en milieu liquide est le standard de référence internationale pour les bactéries aérobies non exigeantes (ISO 20776-1). Elle consiste à mesurer des concentrations minimales inhibitrices d'un couple bactérie/antibiotique et à les rapporter aux concentrations critiques de ce couple.

L'inoculum bactérien standardisé est placé dans des tubes contenant un bouillon de Mueller-Hinton chargé par des dilutions au demi de concentration d'antibiotique à tester. La CMI correspond à la concentration de l'antibiotique contenue dans le premier tube dont la pousse a été inhibée par l'antibiotique après 24 h d'incubation avec la bactérie. L'observation de la pousse de la souche bactérienne s'effectue par l'observation d'un trouble dans le milieu. Cette méthode ne permet de tester qu'un antibiotique par gamme.

**Figure 16 : Détermination d'une CMI en milieu liquide**



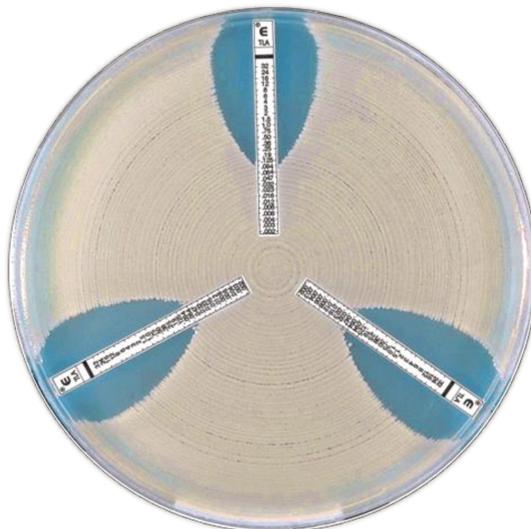
Peu praticable en routine, elle reste une méthode de référence. Elle est très utilisée pour l'étude des souches bactériennes destinées à la publication scientifique. Son principe fonde la base de la technique automatisée couplée à des logiciels dits experts permettant une utilisation en routine (65,69).

### ii. Technique commercialisée de gradient en gélose

Dans la plupart des laboratoires, et pour certaines molécules, notamment quand la détermination des CMI est recommandée par le CA-SFM/EUCAST, peuvent être utilisées des bandelettes commerciales (E-Test®, M.I.C.E®, MIC Test Strip® etc...) permettant de déterminer de manière précise la CMI en milieu gélosé. Le principe de cette méthode repose sur l'établissement d'un gradient de concentration d'antibiotique dans un milieu gélosé pour déterminer la sensibilité du micro-organisme testé. Ces bandelettes en plastiques sont imprégnées au niveau de la partie en contact avec la gélose d'antibiotique déshydraté avec un gradient de concentration tout le long de la bandelette. Après incubation de  $20 \pm 4$  heures, une ellipse d'inhibition de culture se dessine autour de la bandelette et la CMI correspond à la valeur lue à l'intersection de la culture bactérienne et de la bandelette (Figure 17). La lecture s'effectue à 100% d'inhibition pour les antibiotiques bactéricides et à 80% d'inhibition pour les antibiotiques bactériostatiques. Cette méthode peut servir au diagnostic de certains mécanismes de résistance comme la mise en évidence de

métallo-carbapénèmase. La mesure de CMI par méthode de gradient en gélose est validée par le comité français de l'antibiogramme pour certaines molécules. Le CA-SFM émet aussi des contre-indications d'utilisation pour d'autres (par exemple, les glycopeptides avec les staphylocoques ou la colistine avec les bacilles Gram négatif) (9,40,69,73).

**Figure 17 : Détermination d'une CMI par méthode de gradient en gélose**



### iii. Techniques commercialisée en milieu liquide

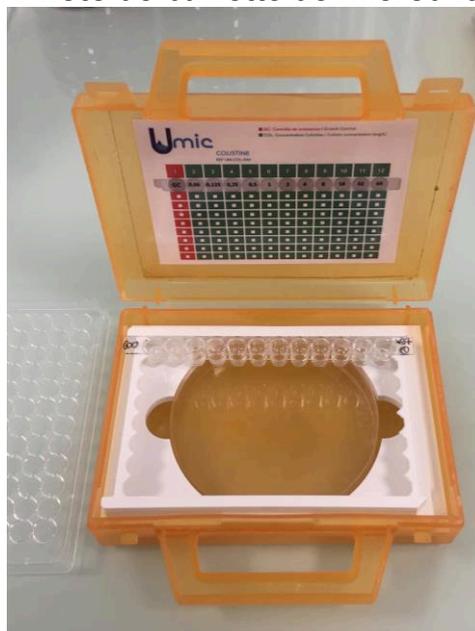
La miniaturisation et la mécanisation de la technique de référence en milieu liquide à l'aide de petites plaques de microdilution ou microplaques en plastique jetables (Figure 18) ont rendu le test de dilution du bouillon pratique. La technique commercialisée Sensititre® de ThermoFisher® contient des microplaques de 96 puits, chacun contenant un volume de 0,1 ml qui permet de tester environ 12 antibiotiques dans une gamme de 8 dilutions doubles dans une seule plaque (Figure 18). Ces microplaques sont préparées à l'aide d'instruments de distribution qui aliquotent, dans les puits individuels, des volumes précis d'antibiotiques pré-pesés et dilués dans le bouillon. Les plaques peuvent être inoculées avec une suspension bactérienne normalisée à  $5 \times 10^5$  UFC/mL à l'aide d'un dispositif jetable qui transfère 0,01 à 0,05 mL de suspension dans chaque puits de la plaque de microdilution ou à l'aide d'un distributeur mécanisé. Après l'incubation, les CMI sont déterminées à l'aide d'un dispositif de visualisation manuelle ou automatisée pour l'inspection de chacun des puits (69).

**Figure 18 : Photo de plaque de microdilution ou microplaque Sensitire® à 96 puits**



Cette microméthode en milieu liquide est aussi commercialisée en barrette unitaire. Le test Umic® de Biocentric® (Figure 19) contient des barrettes unitaires de 12 puits dont un pour le contrôle de croissance. Chaque barrette contient 1 à 2 antibiotiques et permet de tester de 5 à 11 concentrations d'un antibiotique. Cette technique permet de déterminer la CMI en milieu liquide d'un antibiotique pour une entité bactérienne, par microdilution selon la méthode de référence. La lecture est visuelle uniquement et les résultats sont obtenus en 18-24h. Les antibiotiques disponibles sont : Colistine, Daptomycine, Linézolide, Pipéraciline-Tazobactam, Vancomycine et Teicoplanine.

**Figure 19 : Photo de barrette de microdilution Umic®**



## 2. Référentiels : EUCAST – CASFM/EUCAST

### a. Aspects normatifs

Dans un laboratoire, le système d'essais et de diagnostic *in vitro* qui permet de déterminer la sensibilité *in vitro* des agents infectieux et l'évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes est régi par la norme ISO 20776 qui décrit une méthode de référence pour déterminer la CMI et établit des critères de performances acceptables et les exigences pour les dispositifs de mesure de sensibilité antimicrobienne.

### b. Référentiels et recommandations

Les règles à respecter sur le plan méthodologique pour la réalisation d'un antibiogramme et les règles d'interprétation font l'objet depuis 2002 d'une réflexion visant à une harmonisation européenne sous la conduite de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). L'EUCAST est un comité dépendant conjointement de la société européenne de microbiologie clinique et maladies infectieuses (ESCMID) et de l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). Il fonctionne en tant que comité des concentrations critiques de l'European Medicines Agency (EMA) et de l'ECDC.

L'EUCAST recommande des méthodes standardisées pour tester la sensibilité aux agents antimicrobiens, ainsi que des procédures de contrôle de qualité internes, c'est-à-dire recommande de tester des antibiotiques spécifiques en fonction des espèces et l'utilisation des milieux pour tester les bactéries. L'EUCAST définit également les concentrations critiques cliniques pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

Au niveau français, les recommandations qu'il convient de respecter sont publiées chaque année par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM/EUCAST).

Le CA-SFM/EUCAST établit les recommandations sur la réalisation des différentes techniques de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques (diffusion, dilution, etc), sur les valeurs à donner aux concentrations critiques des antibiotiques, sur les règles d'interprétation phénotypiques, sur les algorithmes décisionnels dans certaines situations « difficiles ». Il veille sur l'évolution des résistances grâce au réseau ONERBA, sur l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance et émet un avis sur les nouveaux tests de détection.

Les concentrations critiques cliniques de l'antibiogramme sont sujettes à des révisions régulières et déterminées en fonction des données scientifiques. La démarche actuelle pour établir les concentrations critiques cliniques comprend 3

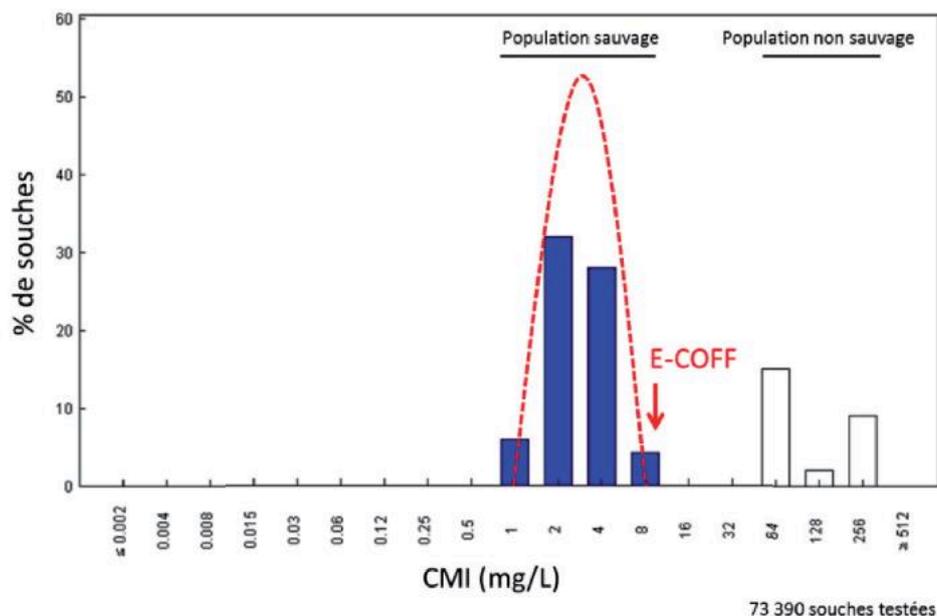
notions : la détermination de l'E-coff des bactéries, la connaissance en PK/PD de l'antibiotique et l'étude clinique qui valide la concentration critique clinique.

### i. E-coff des bactéries

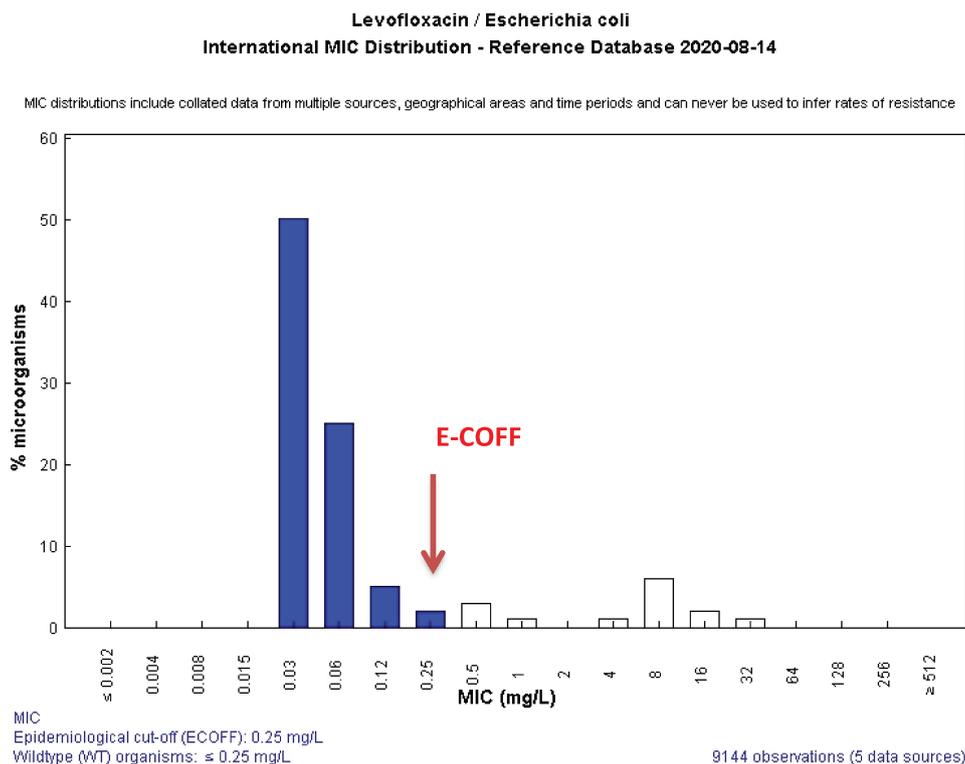
L'étude des breakpoints épidémiologiques met en relation un antibiotique avec la distribution de toutes les CMI d'une espèce bactérienne. Elle permet de définir les « concentrations critiques épidémiologiques » (e-coff : « epidemiological cut-off values » des anglosaxons) des souches n'exprimant pas de mécanisme de résistance : c'est la CMI la plus élevée pour une molécule vis-à-vis de l'ensemble des souches présentant un phénotype sauvage. Ces études mesurent la distribution des CMI sur un collectif important de souches. Plus la population servant à les définir est grande, plus les résultats sont précis. L'étude des E-coff des souches bactériennes responsables d'infection permet de construire des histogrammes de distribution des CMI des antibiotiques vis-à-vis de ces espèces bactériennes (Figure 20). L'E-coff est la valeur qui sépare les populations sauvages sensibles de celles ayant acquis des mécanismes de résistance. Cela permet d'évaluer la variabilité de résultats obtenu par les méthodes de détermination des CMI des souches sauvages. Ces études permettent d'harmoniser les « cut off » en fonction de l'évolution des sensibilités des souches circulantes. Les données sont colligées par l'EUCAST (9).

Le principe de la détermination d'un E-COFF est illustré Figure 20. Les Figure 21 et Figure 22 sont des exemples des histogrammes des breakpoints épidémiologiques.

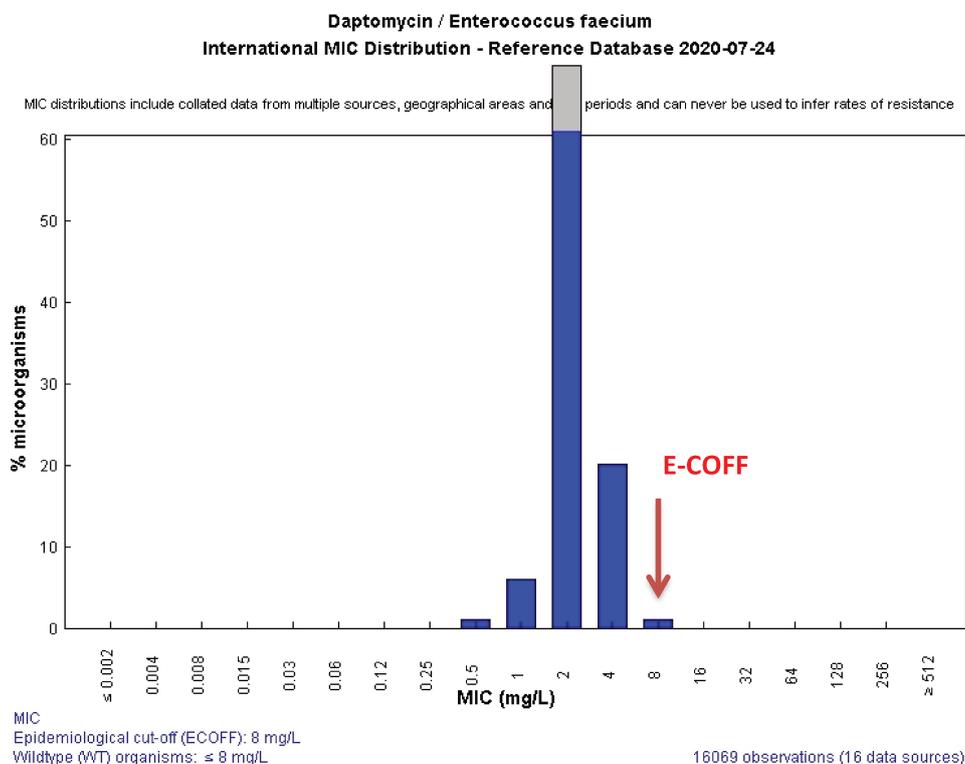
**Figure 20 : Représentation d'une Concentration Critique Epidémiologique ou E-COFF ou cut-off épidémiologique**



**Figure 21 : E-Coff de la levofloxacine pour *Escherichia coli* (source : <https://mic.eucast.org/Eucast2/>)**



**Figure 22 : E-Coff de la Daptomycine pour *Enterococcus faecium* (source : <https://mic.eucast.org/Eucast2/>)**



## ii. PK/PD

Le résultat de l'antibiogramme fait appel à une approche clinique qui prend en compte la pharmacocinétique (PK) et la pharmacodynamie (PD).

La pharmacocinétique étudie le devenir du médicament dans l'organisme et la concentration du médicament au niveau de l'organe cible. Elle s'intéresse notamment à l'évolution de la concentration du médicament dans la circulation générale. En effet, le sang irriguant tous les organes, dont les organes cibles du médicament, cette concentration constitue souvent une information pertinente pour estimer la concentration de médicament autour des sites d'action et donc prédire les effets du médicament. Les principaux paramètres pharmacocinétiques sont :

- La biodisponibilité (F) du médicament définie comme la fraction de la dose administrée ou du principe actif libéré par la forme pharmaceutique qui parvient sous forme inchangée dans la circulation sanguine systémique et la vitesse à laquelle se réalise ce processus. Elle pourra être modifiée par des facteurs affectant l'absorption digestive ou l'effet de premier passage hépatique.
- Le volume de distribution (Vd) : volume fictif théorique, qui représente le volume dans lequel devrait se distribuer le médicament pour être à l'équilibre à la même concentration que dans le plasma. Il représente la capacité d'un médicament à diffuser dans l'organisme.
- La clairance (Cl) représentant le volume sanguin ou le volume plasmatique totalement épuré du médicament par unité de temps. Cela correspond à la capacité de l'organisme à éliminer le médicament. La clairance pourra être modifiée par toute cause affectant l'élimination rénale ou hépatique du médicament.
- La demi-vie d'élimination ( $t_{1/2}$ ) définie comme le temps nécessaire à la diminution de 50% de la concentration plasmatique. C'est un indicateur de la durée de persistance du médicament dans l'organisme. Elle pourra être affectée par des modifications de clairance ou de volume de distribution.

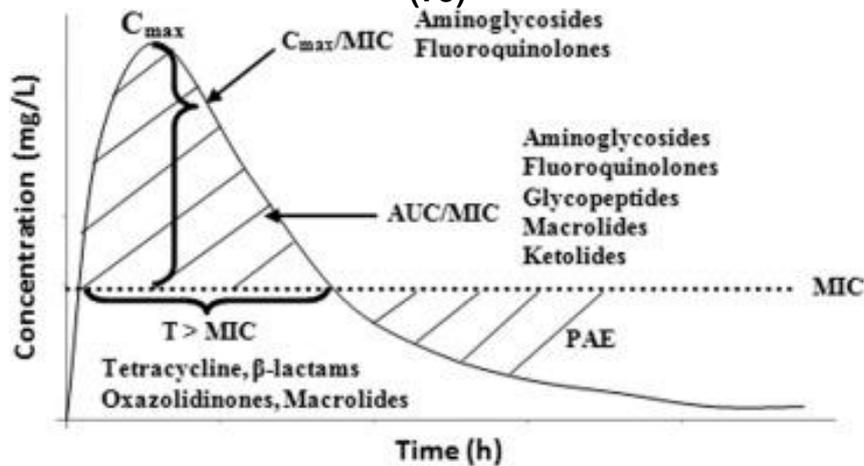
L'exposition de l'antibiotique varie selon les patients en raison de la variabilité inter-individuelle des paramètres pharmacocinétiques tels que la clairance et le volume de distribution. Ces facteurs doivent être pris en compte lors de l'effort de prédiction des résultats du traitement sur la base de la cible pharmacodynamique (72,74).

La pharmacodynamie étudie le comportement de la molécule antibiotique vis-à-vis de l'agent infectieux (effets thérapeutiques). Elle étudie le mécanisme d'action de la molécule et son niveau d'activité permettant une réponse adéquate au traitement (caractère bactéricide ou bactériostatique)(75).

Pour illustrer ces comportements, il est important de comprendre les 3 paramètres de PK/PD les plus utilisés (Figure 23) :

- $fT > CMI$ , où  $fT$  indique le temps pendant lequel la concentration d'antimicrobien libre (non lié) reste au-dessus de la concentration minimale inhibitrice du micro-organisme,
- $C_{max} / CMI$ , le rapport entre la concentration maximale de médicament libre et la CMI,
- $AUC_{0-24} / CMI$ , le rapport entre la surface totale sous la courbe concentration-temps (AUC) sur une période de 24 heures et la CMI (74).

**Figure 23 : Les principaux paramètres PK / PD utilisés pour les antibiotiques (75)**

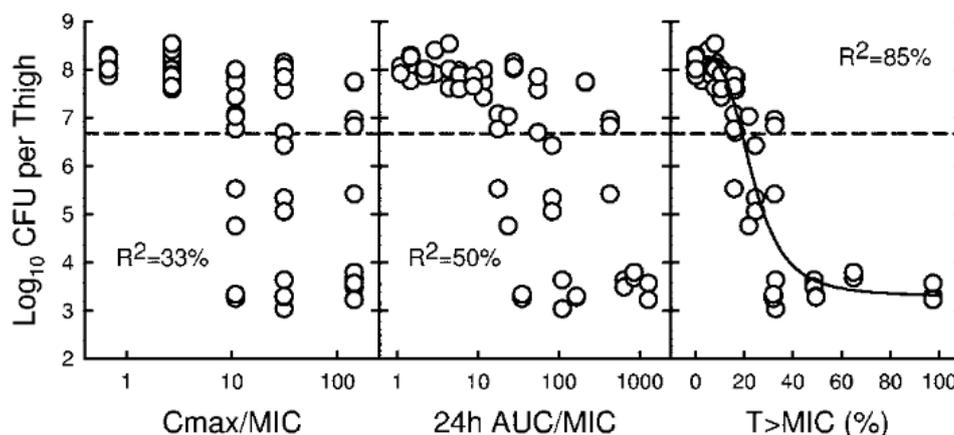


*PAE : Effet post antibiotique ; MIC : Concentration minimale inhibitrice*

Des études utilisant des modèles *in vitro* et animaux ont joué un rôle essentiel pour parvenir à une compréhension plus détaillée du comportement des molécules vis à vis des agents antibactériens.

Par exemple, l'étude de Craig et al. (76) a permis de mettre en évidence que le ceftobiprole est bactéricide en fonction du temps durant lequel sa concentration est supérieure à la CMI de la bactérie. On observe dans cette étude une diminution de la masse bactérienne en fonction du temps où l'antibiotique est présent en quantité supérieure à la CMI de l'espèce bactérienne (Figure 24).

**Figure 24: Corrélation des paramètres PK-PD du ceftobiprole avec l'efficacité contre *S. aureus* ATCC 33591 chez la souris (76)**



Pour chaque couple bactérie/antibiotique, il est recherché le paramètre PK/PD d'intérêt. Le paramètre retenu est celui présentant la plus étroite corrélation avec le critère d'efficacité. En fonction du paramètre retenu, la probabilité d'atteindre la cible est définie. Elle va permettre de prédire l'efficacité de l'antibiotique.

Les paramètres PK/PD incluent la probabilité de l'antibiotique à atteindre une concentration efficace dans le tissu cible. Un traitement est efficace s'il est actif sur la bactérie étudiée, avec des effets secondaires limités sur l'individu, et si sa concentration est suffisante sur le site d'infection pour avoir un effet pharmacologique. Les patients sont plus susceptibles d'avoir des résultats positifs lorsque les cibles PK / PD associées à l'efficacité sont atteintes.

Les études PK et/ou PD au cours des essais précliniques et cliniques jouent un rôle important car elles permettent de déterminer de façon rationnelle un schéma posologique : voie, dose et fréquences d'administration.

**Figure 25 : Index PK/PD et seuils proposés pour le suivi et l'adaptation posologique des principaux antibiotiques, d'après Wong et al. (77)**

	Index PK/PD	Antibiotiques	Seuil de PK/PD associée à une bactéricidie optimale et/ou pronostic clinique
<b>Temps dépendants</b>	$f T > CMI$	β-lactamine	100 % $f T > CMI$
		Pénicilline	30 % $f T > CMI$ (bactériostatique) 50 % $f T > CMI$ (bactéricidie, animal et patient hors réanimation)
		Céphalosporine	40-70 % $f T > CMI$ pour le modèle animal 100 % $f T > CMI$ à 100% $f T > 4-5 \times CMI$ (céfépime, ceftazidime)
		Carbapénème	20 % $f T > CMI$ (bactériostatique) 40 % $f T > CMI$ (bactéricide) 100 % $f T > CMI$ (méro-pénem)
		Monobactame	50 % $f T > CMI$
		Linézolide	85 % de $T > CMI$
<b>Concentration et temps dépendant</b>	SSC/CMI (SSCI)	Vancomycine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SSCI &gt; 400 (15-20 mg.l<sup>-1</sup> en dose intermittente et 20-25 mg.l<sup>-1</sup> en dose continue)</li> <li>• Résiduelle &gt; 10 mg.l<sup>-1</sup> (éviter le développement de résistances)</li> </ul>
		Linézolide	SSCI > 80-120 (résiduelles > 2 mg.l <sup>-1</sup> )
		Fluoroquinolones	SSCI > 125 pour les Gram négatifs
		Daptomycine	SSCI > 666
<b>Concentration dépendant</b>	$C_{max}/CMI$	Fluoroquinolones	$C_{max}/CMI > 10$ (prévention de l'émergence de mutant résistant in vivo et in vitro)
		Aminosides	$C_{max}/CMI$ 8-10
		Daptomycine	$C_{max}/CMI$ 59-94

Au quotidien, les cliniciens sont confrontés au défi de personnaliser les schémas posologiques d'antibiotiques pour les patients gravement malades dans le but d'optimiser l'antibiothérapie. De nombreux facteurs physiologiques peuvent influencer la pharmacocinétique (par exemple : une insuffisance rénale, une insuffisance hépatique).

Par conséquent, l'utilisation de stratégies de maximisation des données, telles que la simulation de Monte Carlo, doit être considérée comme une technique très précieuse pour guider la pratique clinique là où des données pharmacocinétiques descriptives solides existent. La simulation de Monte Carlo est une technique mathématique qui repose sur un échantillonnage aléatoire répété pour comprendre l'impact de l'incertitude. Elle se caractérise par l'utilisation du hasard pour résoudre des problèmes centrés sur le calcul d'une valeur numérique. La réponse fournie est une réponse statistique. Elle utilise des logiciels informatiques via des plates-formes de simulation afin de fournir des prédictions sur le résultat probable de différentes approches thérapeutiques telles que la modification de la dose ou de la fréquence d'administration du médicament.

Dans les simulations de Monte Carlo, la variabilité inter-patient des paramètres PK, ainsi que de la PD (en termes de CMI), est prise en compte et la probabilité d'atteindre l'objectif est déterminée sur la base de ces simulations stochastiques du modèle (78–80).

A titre d'exemple, l'objectif thérapeutique d'une bêta-Lactamine est 100% du temps supérieur à la CMI pour une infection non sévère. En revanche dans les infections sévères de réanimation, ce paramètre devient  $T > 8 \text{ CMI}$  et la valeur cible est de 100 %. L'objectif est donc :  $T > 8 \text{ CMI} = 100 \%$ , ce qui est équivalent à un quotient inhibiteur sérique résiduel égal à 8. En terme de suivi thérapeutique des bêta-lactamines, cela revient à cibler une concentration résiduelle égale à 8 CMI (71).

### iii. Etudes cliniques

Les concentrations critiques cliniques sont validées par l'expérience clinique, c'est-à-dire par la confrontation des CMI et du taux de succès ou d'échec thérapeutique. C'est la confrontation des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* lors d'essais cliniques, en tenant compte de l'E-Coff (la concentration critique clinique inférieure ne doit jamais être inférieure à l'E-Coff) et des paramètres PK/PD, qui permettent de valider les concentrations critiques pour établir les concentrations critiques cliniques (81). Elles définissent les schémas posologiques en fonction des pré-requis PK/PD tout en cherchant à harmoniser les posologies.

A titre d'exemple : l'étude de Paterson et al. (82) met en évidence que les patients infectés par des bactéries pour lesquels la CMI de la céphalosporine utilisée était  $< 2 \text{ mg/L}$  avait un taux d'échec thérapeutique plus faible et que des CMI  $\geq 2 \text{ mg/L}$  pour le cefpodoxime, la ceftazidime, l'aztréonam, le céfotaxime ou la ceftriaxone doivent être considérées comme pouvant indiquer une production de BLSE ; L'étude de Lee et al. (83) met en évidence que les taux de mortalité liés aux bactériémies causées par une entérobactérielle productrice de BLSE mais sensible à la céfépime, à 30 jours et bruts, étaient plus faible chez les individus traités par céfépime dans les isolats causatifs avec une CMI  $\leq 1 \text{ mg/L}$  que ceux des isolats avec une CMI plus élevée ; L'étude de Patel et al. (84) traite de l'utilisation des carbapénèmes contre les infections aux entérobactérielles et met en évidence que la mortalité à 30 jours est significativement plus basse chez les individus traités pour des infections à des entérobactérielles dont la CMI  $\leq 1 \text{ mg/L}$  pour les carbapénèmes ; L'étude de Rybak et al. (85) met en évidence que les doses maximales de vancomycine administrable pour un patient ayant une fonction rénale normale, pour traiter une infection à *S.aureus*, correspondent à une CMI  $> 2 \text{ mg/L}$  pour cette molécule.

## 3. « Adaptations techniques » pour les hémocultures

Dans un contexte de bactériémie, l'impact clinique d'un rendu précoce de résultat d'antibiogramme est majeur en termes de prise en charge thérapeutique (adaptation de l'antibiogramme). Lors du rendu de l'antibiogramme, l'adaptation thérapeutique vis-à-vis du traitement empirique est recommandée dans 25% des cas (dé-escalade dans 17% et escalade dans 8% des cas) (86).

Une étude observationnelle prospective menée chez des patients en soins intensifs admis dans un hôpital en Espagne pour sepsis sévère et choc septique a évalué l'impact de la désescalade des antimicrobiens chez 628 patients. Le schéma antimicrobien initial a été réduit chez 35% des patients, avec des taux de mortalité hospitalière de 27% chez les patients avec désescalade thérapeutique, 33% sans changement de traitement et 43% avec escalade de traitement ( $P = 0,006$ ). La désescalade thérapeutique s'est en fait révélée protectrice vis-à-vis de la mortalité hospitalière dans l'analyse de régression multivariée ajustée par score de propension (OR, 0,55). Lorsque la gravité de la maladie et d'autres facteurs de confusion potentiellement associés au taux de mortalité à l'hôpital étaient contrôlés, la désescalade des antimicrobiens était non seulement sûre, mais également bénéfique pour les patients (87).

De plus, raccourcir le temps nécessaire au rendu de l'antibiogramme permet aux cliniciens d'adapter le traitement plus tôt, de diminuer le risque de décès et de diminuer les effets indésirables des traitements inappropriés (1,4,5).

La réalisation d'un antibiogramme directement à partir d'un flacon d'hémoculture positif permet de gagner 12 à 24 heures (9). Pour cela différentes modalités méthodologiques de réalisation d'antibiogramme ont été mises en place.

#### **a. Ensemencement direct du bouillon d'hémoculture**

La réalisation d'un antibiogramme rapide par ensemencement direct du bouillon d'hémoculture est une technique ayant fait ses preuves. Cette technique possède un atout majeur en permettant de gagner 24 heures sur le rendu de l'antibiogramme comparée aux techniques conventionnelles. Elle nécessite néanmoins d'avoir une bonne maîtrise de la technique et notamment du contrôle de l'inoculum. Une étude multicentrique représentative des principaux systèmes d'hémoculture implantés en France, menée par le CA-SFM, a montré une corrélation conforme aux exigences de la FDA, pour les bacilles à Gram négatif (entérobactériales et *P.aeruginosa*), les cocci à Gram positif (staphylocoques, streptocoques et entérocoques) : concordance de catégorisation globale > 99 % sur plus de 9000 couples bactéries/antibiotiques pour l'antibiogramme direct à partir d'une hémoculture positive. Ce qui permet d'« accréditer » cette technique en porté A.

Le principe repose sur l'ensemencement de gélose MH ou MH-F à partir d'une dilution du bouillon d'hémoculture faisant correspondre l'inoculum à une suspension de turbidité équivalente à celle de l'étalon 0.5 de la gamme de McFarland de la technique conventionnelle de réalisation d'un antibiogramme (9)

**Tableau 7 : Dilutions à mettre en œuvre pour l'antibiogramme direct à partir de flacons d'hémocultures positives (9)**

Dilution	BGN	Staphylocoques	Streptocoques
Dilution	1/50 <sup>e</sup>	1/50 <sup>e</sup>	1/5 <sup>e</sup>
Equivalent en gouttes*	15 gouttes / 9mL NaCl 0.9%	15 gouttes / 9mL NaCl 0.9%	15 gouttes / 1 mL NaCl 0.9%

\* Les dispositifs de subculture proposés par les différents fabricants sont susceptibles de produire des gouttes de volume variable, il convient à chaque laboratoire de vérifier le rapport de volume.

La lecture des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotique s'effectue après 16 à 24 heures d'incubation à 35±2°C selon les recommandations en vigueur apportées par le CA-SFM.

### **b. Méthode DRSA du CASFM/EUCAST ou RAST de l'EUCAST**

La méthode de détermination rapide de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques directement à partir des flacons d'hémocultures positifs (DRSA) du CASFM/EUCAST ou méthode RAST de l'EUCAST permet un rendu d'antibiogramme rapide en 4 à 8h directement à partir du bouillon d'hémoculture positif uniquement pour certains couples molécules-bactéries. Grâce aux recommandations de l'EUCAST et du CASFM/EUCAST cette technique est « accréditable » en porté A. La méthode a été validée avec des flacons de plusieurs automates BACTEC® (Becton Dickinson®) BacT/ALERT® (bioMérieux®) et VersaTREK® (ThermoFisher®).

Le principe consiste en l'inoculation directe de gélose MH ou MH-F en utilisant 100 à 150 µL du bouillon d'hémoculture positif sans étape de centrifugation ou de dilution préalable de l'inoculum. L'ensemencement de la gélose se réalise dans les mêmes conditions que la méthode de diffusion en gélose c'est-à-dire en étalant le bouillon doucement et dans trois directions sur la surface de la gélose à l'aide d'un écouvillon ou d'un étaleur automatique puis le dépôt des disques se fait comme pour la méthode standard.

L'incubation des milieux est réduite à 4, 6 et 8 heures pour la lecture, à ±5 minutes au temps indiqué, des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques. Les diamètres critiques sont propres à chaque temps d'incubation et chaque espèce, ce qui par conséquent nécessite d'avoir identifié l'espèce pour l'interprétation des résultats. Cette méthode est validée pour *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *E. faecium*, *Acinetobacter baumannii* uniquement pour certaines molécules.

A noter que la croissance sur gélose Mueller-Hinton apparaîtra souvent moins nette comparativement à une incubation standard de (16-20 heures). Les zones d'inhibition ne seront lues que si la culture est confluyente et si les bordures de la zone d'inhibition sont clairement distinguables. Toutes les zones d'inhibition ne peuvent pas être lues à 4 heures, il est donc important de lire les diamètres d'inhibition à 6 et 8 heures également. Il n'est pas toujours possible de lire les zones

d'inhibition pour tous les antibiotiques testés. L'interprétation des diamètres d'inhibitions en fonction des souches se fait grâce aux recommandations spécifiques de cette technique publiée par le CA-SFM/EUCAST. L'appréhension de l'incertitude de mesure de cette technique se fait par la présence de zone d'incertitude technique (ZIT) représentée par une zone (valeur de diamètre) où la séparation entre les catégories cliniques est difficile. La catégorisation des souches n'est pas recommandée dans cette zone (9,88). Il est nécessaire de réaliser en parallèle un antibiogramme par une méthode référente pour disposer du rendu complet de toutes les molécules de l'antibiogramme.

L'amélioration de l'automatisation de la lecture des diamètres d'inhibition avec incubation des géloses en aérobie associée à une intelligence artificielle permettrait, dans certaines situations, de simplifier les contraintes techniques de cette méthode (67).

### **c. Antibiogramme à partir du bouillon centrifugé**

La réalisation de l'antibiogramme à partir du bouillon centrifugé ou culot à l'avantage de permettre une bonne maîtrise de l'inoculum mais l'inconvénient d'être longue et de comporter plusieurs étapes techniques. Cette technique nécessite une validation de méthode en portée B.

Le principe de cette technique repose sur la préparation du bouillon d'hémoculture positif avec un tampon de lyse, vortexé et centrifugé, le surnageant est retiré à l'aide d'une pipette. Le culot est mis en suspension dans du tampon de nettoyage, recentrifugé et le surnageant retiré à la pipette. Le culot est ensuite mis en suspension de turbidité équivalente à celle de l'étalon 0.5 de la gamme de McFarland et utilisé pour la réalisation de l'antibiogramme en gélose ou en milieu liquide (89–91).

La détermination de CMI par méthode de gradient en gélose peut également s'effectuer par ensemencement à partir du bouillon d'hémoculture centrifugé et lecture précoce en 4 à 6h. Dans l'étude de Bianco et al. la comparaison entre l'E-test direct rapide et l'E-test de référence a montré une concordance catégorielle allant de 95,1% à 100% pour les entérobactérales et de 88,2 à 100% pour les bacilles non fermentaires. L'E-test direct rapide a montré une concordance globale de 80,1%, révélant des taux de concordances de catégorisation différents selon les antibiotiques testés (92).

### **d. Milieu rapide Mueller-Hinton Rapid-SIR**

Le milieu rapide Mueller-Hinton Rapid-SIR™ (MHR-SIR™) (i2a®) est un milieu spécifique dont le principe repose sur la lecture précoce des diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques au lecteur SIRscan® pour un rendu des résultats d'antibiogrammes en 5 à 7 heures sur une majorité de bactéries à croissance rapide.

Sur l'automate SIRscan® 2000 Automatic, la lecture est continue toutes les 1/2 heures jusqu'à l'obtention du résultat final. En cas de croissance faible ou de résultats particuliers, une lecture à 18 heures est conseillée (effectuée automatiquement avec SIRscan® 2000 Automatic).

L'utilisation du milieu MHR-SIR™ est une méthode rapide permettant de prédire la sensibilité aux antibiotiques des entérobactérales et de *S. aureus*. Elle permet un gain de temps d'environ 17h sur le rendu de l'antibiogramme et ainsi de réduire la mortalité et les coûts médicaux. Cette technique nécessite une validation de méthode en portée B.

Il apparaît cependant que les résultats donnés pour cette technique ne sont pas fiables pour déterminer la sensibilité à la céfalexine des entérobactérales du groupe 3, sans impact en clinique. Cette méthode d'antibiogramme rapide a 97.7% de concordance, 1.4% d'erreurs mineures, 0.4% d'erreurs majeures et 0.5% d'erreurs très majeures par rapport à la méthode de référence. De plus, la résistance à la méticilline des *S. aureus* n'est pas systématiquement prédictible en MHR-SIR™. (93–95)

#### **4. Qualité en microbiologie médicale**

En France, la réglementation des laboratoires de biologie médicale s'appuie sur le Code de la Santé Publique : Art. L 6221-1 «Un laboratoire de biologie médicale ne peut réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation ». Cette accréditation est délivrée par le comité français d'accréditation (COFRAC) selon la Norme NF EN ISO 15 189 et NF EN ISO 22870.

L'objectif de l'accréditation en biologie médicale est de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale réalisés et la qualité de la prestation médicale offerte par un laboratoire de biologie médicale (96).

L'hémoculture est une analyse remarquable dont les particularités impactent inévitablement la gestion de l'analyse, la maîtrise des risques et l'évaluation des performances d'une méthode relevant d'un processus complexe. La méthode mise en œuvre dans les laboratoires de biologie médicale présente des performances variables selon les couples bactérie-antibiotique ou les mécanismes de résistance. Pour remédier à ces limites identifiées, des tests complémentaires ou méthodes alternatives sont mises en places.

Le résultat rendu au clinicien n'est pas un résultat brut issu d'une lecture individuelle de molécules mais consiste également à mettre en évidence des mécanismes de résistance ou des mécanismes conférant au micro-organisme une sensibilité diminuée, et à interpréter de manière globale l'ensemble des résultats (97).

Pour maîtriser ce processus original, la Société Française de Microbiologie met en avant cinq approches fondamentales pour répondre aux exigences de la maîtrise des techniques : les référentiels et la bibliographie, la formation, les compétences et expertises, la maîtrise de l'inoculum, les stratégies de CIQ et d'EEQ (97). La qualité

au laboratoire garantit le contrôle de toutes les variables qui ont besoin d'être surveillées pour évaluer la sensibilité et la spécificité au niveau de l'instrument (96)

Le QUAMIC est le référentiel de qualité en microbiologie. Il énonce des recommandations sur les parties pré-analytiques, analytiques et post-analytiques des examens de microbiologie (comme par exemple la mise en place des contrôles internes et externes, les hémocultures, l'examen cytot bactériologique des urines, l'antibiogramme en diffusion et automatisé, la réalisation des CMI, l'identification par spectrométrie de masse, la biologie moléculaire etc...). De façon plus générale, il précise les indications pour les validations de méthodes sur les grandes étapes de l'analyse microbiologique en fonction des portées définies par le document Cofrac SH INF 50 (Portées types d'accréditation) : examen microscopique avant et après coloration, culture, identification et antibiogramme. Le QUAMIC est destiné à aider les biologistes dans leur démarche d'accréditation et ainsi contribuer à harmoniser la mise en place du système de management de la qualité (SMQ) au sein des laboratoires de microbiologie, ceci en totale collaboration et transparence avec les experts du COFRAC. Le QUAMIC est appelé à vivre et à évoluer dans le temps, il est donc régulièrement revu au fil des évolutions des exigences, des évolutions des techniques et des besoins (98).

Dans un laboratoire de biologie médicale, chaque examen accrédité doit répondre aux exigences des dossiers de vérification si la méthode est reconnue, ou de validation si la méthode est non reconnue. La grande majorité des laboratoires adoptent des méthodes reconnues (portée flexible standard A). Dans ce cas, la «validation» correspond à une vérification des performances du système analytique (analyseur et réactif), lors de la mise en application dans le laboratoire. Cette vérification permet de confirmer la fiabilité des résultats obtenus («aptitude à l'emploi»), en fonction des objectifs définis pour satisfaire les besoins cliniques. Les laboratoires peuvent également employer des méthodes adaptées ou développées en interne (portée flexible étendue B). Dans ce cas, le laboratoire évalue, pour sa validation, l'ensemble des critères de qualité de la méthode susceptibles d'en démontrer la maîtrise.

Afin d'apporter une aide à la validation des performances de la méthode : des vérifications sont préconisées par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) par le document Cofrac SH GTA 04 pour une méthode adaptée de la méthode de référence, dite « de portée B » afin d'apporter la preuve de la maîtrise de la méthode (99).

D'après le SH GTA 04, la vérification comprend 3 étapes : Une étude bibliographique approfondie de la méthode dont les documents de l'EUCAST constituent une bonne base ; la détermination des critères de performance et leurs limites d'acceptabilité (maîtrise des risques, fidélité, approche de la justesse, interférence) ; la vérification expérimentale avec l'exploitation des résultats et la conclusion sur la validité de la méthode (97).

L'accréditation de l'antibiogramme en diffusion sur gélose à partir du bouillon d'hémoculture positif se réalise en portée A. En revanche l'accréditation de l'antibiogramme en milieu liquide à partir du bouillon d'hémoculture positif se réalise

en portée B dans l'attente de recommandations apportées par la communauté scientifique. Le Tableau 8 est tiré du SH GTA 04 et du QUAMIC et détermine les critères à évaluer pour valider les performances de la méthode en portée d'accréditation du type B.

**Tableau 8 : Validation des performances de la méthode en portée B - Critères à évaluer pour valider la méthode (99)**

<b>Critères à évaluer</b>	<b>Exigences relatives à la validation d'une méthode quantitative en portée B</b>	<b>Modalité d'évaluation</b>	<b>Justification</b>
<b>Fidélité</b> (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	
<b>Justesse/exactitude</b> (approche)	Essai	Essai	
<b>Incertitudes/facteurs de variabilité</b> et évaluation	Maitrise des facteurs de variabilité	Analyse des risques	
<b>Comparaison</b> avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir, EBMD) et analyse des discordances	Essai	Essai	
Intervalle de mesure ( <b>Limite de quantification et limites de linéarité</b> )	Essai	Donnés bibliographique	
<b>Interférences</b> (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Essai	Non applicable	
<b>Contamination</b> entre échantillons (s'il y a lieu)	Essai	Vérifié au moment de la lecture de l'antibiogramme	Visible sur la méthode de référence
<b>Robustesse</b>	Essai	Essai	
<b>stabilité réactifs</b> (après ouverture, embarqués)	Essai	Donnés bibliographique	
<b>Intervalle de référence</b> (valeurs usuelles)	Essai	Donnés bibliographiques	Recommandations CASFM/EUCAST pour les CMI des antibiotiques

### III. Objectifs de ce travail

Une étude multicentrique a permis de valider la méthode de la réalisation des antibiogrammes directement à partir des flacons d'hémocultures positifs par la méthode de diffusion en gélose (9). L'objectif de la présente étude est de réaliser un travail similaire en milieu liquide sur l'automate VITEK® 2 (BioMérieux®).

La méthode à mettre en place est comparée à la technique référente dont l'antibiogramme se réalise à partir de colonies obtenues sur gélose à J1. Ce qui permet d'analyser la concordance des résultats d'antibiogrammes VITEK® 2 (BioMérieux®) réalisés à partir du bouillon d'hémoculture à J0 et à partir de colonies à J1.

Afin d'obtenir des données les plus robustes possibles, un grand nombre d'analyses sont nécessaires. Pour cela il est donc utile de faire intervenir plusieurs laboratoires pour, d'une part multiplier le nombre d'essais, et d'autre part prouver la robustesse de la technique et ce quel que soit le site de réalisation et le type de flacon et d'incubateur utilisé.

La plus-value de cette étude réside dans la possibilité de réalisation d'un antibiogramme avec un gain de temps considérable en faveur de la prise en charge thérapeutique et du devenir du patient en termes de morbi-mortalité.

Enfin, l'ensemble des données collectées doit permettre de conclure à la validité technique et d'apporter la preuve de la maîtrise de la méthode pour que chaque laboratoire puisse à son tour s'appuyer sur ces données et utiliser cette technique à la suite d'une vérification de méthode.



# MATERIELS ET METHODE

## I. Cadre de l'étude

Il s'agit d'une étude prospective, observationnelle, multicentrique. Chaque laboratoire participant a utilisé les automates et flacons dont ils disposent. Ensemble, ils permettent de constituer un panel étendu et représentatif d'automates et de flacons qui sont destinés à étayer les données obtenues et limiter les biais de sélection géographique. Les données sont recueillies dans cinq hôpitaux français (CH de Valenciennes, CH de Cahors, CH de Douai, APHP CHU Cochin - Paris, CHU St Etienne) et deux laboratoires d'analyses médicales (Laboratoire Cerballiance Lyon, Laboratoire Cerballiance Nice).

## II. Matériels

Dans cette étude, des flacons d'hémocultures Bact/ALERT® de BioMerieux® et Bactec® de Becton-Dickinson® sont utilisés (Figure 26).

**Figure 26 : Flacons d'hémocultures Bact/ALERT® (à gauche) et Bactec® (à droite)**



Ces flacons d'hémocultures sont incubés à 35°C pendant une durée maximale de 5 jours. Les flacons Bactec® sont incubés dans l'automate Bactec FX® et les flacons Bact/ALERT® sont incubés dans l'automate Bact/ALERT 3D® ou VIRTUO® (Figure 27).

**Figure 27 : Incubateur Bactec FX® (à gauche), Bact/ALERT 3D® (au centre) et Bact/ALERT VIRTUO® (à droite)**



L'automate utilisé pour la réalisation des antibiogrammes en milieu liquide est l'automate Vitek® 2 commercialisé par la société Biomérieux® (Figure 28).

**Figure 28 : Automate VITEK® 2**



La cohorte d'espèces bactériennes étudiée comprend les micro-organismes les plus souvent rencontrés dans les infections responsables de bactériémie (16,24,27,86). Ce qui constitue un panel complet de bactéries étudiées, réunis en groupes, qui comprend, pour les bacilles Gram négatif, des entérobactérales : *E. coli*, *Klebsiella spp*, *P. mirabilis*, *Enterobacter spp* et autres ; pour les cocci Gram positif : *S. aureus*, *S. épidermidis* et autres ; pour les entérocoques (cocci Gram positif en chainettes) : *E. faecalis*, *E. faecium*. Les bacilles Gram négatif non fermentaires ne sont pas testés dans cette étude. L'étude est menée de manière indifférente selon le type de flacon aérobie, anaérobie ou pédiatrique.

Les résultats incohérents ou inadapés ne sont pas retenus : hémocultures plurimicrobiennes, contaminations, densité de culture de la boîte test trop faible, genres bactériens ou espèces inhabituelles.

Trois cartes unitaires d'identification d'antibiogramme pour l'automate Vitek® 2 sont utilisées dans cette étude. Chacune des cartes testées permettent d'évaluer différentes bactéries :

- AST-N233 + AST-XN05 (64 puits) pour les entérobactérales (Bacilles Gram négatif) (cartes étendues)
- AST-P631 (64 puits) pour les staphylocoques
- AST-P606 (64 puits) pour les entérocoques

La carte OPUS bacilles Gram (-) (128 puits) pour les entérobactérales avait été initialement prévue dans l'étude mais n'a pas pu être testée faute de commercialisation.

### III. Méthode

#### 1. Définition

Cette étude multicentrique compare les résultats obtenus entre un antibiogramme réalisé de manière traditionnelle selon les recommandations du fabricant (avec un inoculum proche de 0,5 McFarland réalisé à partir de colonies sur gélose) et l'antibiogramme direct réalisé à J0 à partir des bouillons d'hémocultures positifs.

Elle fait intervenir différents centres et différents automates utilisés, représentés sur le Tableau 9.

**Tableau 9 : Liste du matériel utilisé en fonction du centre**

Centre	Matériel
APHP CHU Cochin – Paris	BactAlert 3D® Biomérieux®
Laboratoire Cerballiance Lyon	BactAlert 3D® Biomérieux®
Laboratoire Cerballiance Nice	BactAlert 3D® Biomérieux®
CH de Cahors	Virtuo® Biomérieux®
CH de Douai	Virtuo® Biomérieux®
CHU de St Etienne	Bactec FX® BD®
CH de Valenciennes	Bactec FX® BD®

La norme ISO 20776 permet de déterminer la sensibilité *in vitro* des agents infectieux et l'évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes. La première partie établit les méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité *in vitro* aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses.

La seconde partie de l'ISO 20776 établit des critères de performances acceptables pour les dispositifs de mesure de sensibilité antimicrobienne (DMSA), qui sont utilisés pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices et/ou déterminer des catégories de bactéries sensibles, intermédiaires ou résistantes (SIR) dans des laboratoires médicaux. Elle indique les exigences pour les DMSA (incluant les systèmes de diffusion), ainsi que les modes opératoires permettant d'estimer la performance de ces dispositifs. Elle définit comment une évaluation des

performances d'un DMSA doit être effectuée. Elle a été développée afin de guider les fabricants dans la réalisation des études d'évaluation des performances.

## 2. Aspects techniques

En cas de suspicion de bactériémie chez un patient, un flacon d'hémoculture est prélevé. Les hémocultures sont incubées dans des systèmes automatisés (différent selon les centres) afin de détecter la croissance bactérienne.

Pour réaliser l'inoculum nécessaire à l'ensemencement des cartes Vitek®, il a été décidé de reprendre les mêmes dilutions à partir du bouillon positif que celles préconisées dans le CA-SFM car l'inoculum nécessaire à l'ensemencement du milieu solide et d'une carte Vitek® est sensiblement identique.

Une étude préliminaire réalisée au Centre Hospitalier de Valenciennes a permis de mettre en évidence une bonne corrélation entre les dilutions appliquées au bouillon d'hémoculture positif et la constitution d'un inoculum à partir de colonies pour la réalisation d'un antibiogramme en milieu liquide.

L'antibiogramme en milieu liquide Vitek® est réalisé à J0 à partir d'une dilution du bouillon d'hémoculture positif (9) :

- Entérobactérales et staphylocoques : dilution au 1/50
- Entérocoque : dilution au 1/5

La dilution obtenue est ensemencée en parallèle à J0 sur des milieux de cultures supplémentés en sang et placés sous différentes atmosphères (aérobie et anaérobie) avec une öse de 10 microlitres permettant de vérifier à J1 la pureté de l'inoculum et la densité suffisante de la culture (boite test) (Figure 29 à Figure 31).

**Figure 29 : Exemple de référentiel pour l'appréciation de l'inoculum des antibiogrammes réalisés à partir du bouillon d'hémoculture positif pour les bacilles Gram négatifs**



$10^9$  UFC/mL

$10^8$  UFC/mL

$10^7$  UFC/mL

**Figure 30 : Exemple de référentiel pour l'appréciation de l'inoculum des antibiogrammes réalisés à partir du bouillon d'hémoculture positif pour les staphylocoques**



$10^9$  UFC/mL

$10^8$  UFC/mL

$10^7$  UFC/mL

**Figure 31 : Exemple de référentiel pour l'appréciation de l'inoculum des antibiogrammes réalisés à partir du bouillon d'hémoculture positif pour les streptocoques**



$10^9$  UFC/mL

$10^8$  UFC/mL

$10^7$  UFC/mL

L'inoculum est placé dans la cassette Vitek® 2 de la station Smart Carrier Station™ dans laquelle la carte Vitek® 2 et l'échantillon sont reliés virtuellement. Une fois la cassette chargée dans l'automate, le système gère l'incubation et la lecture de chaque carte sans aucune autre intervention.

La méthode « référente » se base sur un antibiogramme en milieu liquide Vitek® effectué à partir de colonies à J1 sur un inoculum contrôlé et ajusté selon les recommandations de Biomérieux® (0.5 McFarland). Cette étude est une comparaison de méthode dans laquelle la méthode « référente » n'est pas la méthode de référence. La méthode « référente » peut donc présenter des biais analytiques. Les discordances entre les méthodes ne sont pas réanalysées par la méthode de référence.

L'interprétation en termes de catégorisation clinique est évaluée en 3 catégories : Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistant (R) avec détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en mg/L. Lorsque la pousse est insuffisante, le résultat indiqué est indéterminé (TRM).

Le mécanisme de résistance est également proposé par le logiciel expert de l'automate (AES) : Penicilinase acquired, SHV1 hyperproduction, Extended spectrum Beta-Lactamase, ESBL (CTX-M LIKE), BLSE + Impermeability (cephamycins), High

level cephalosporinase (AmpC), Impermeability Carba (+BLSE or +AmpC HN), ou autre mécanisme.

Les résultats retenus (S/I/R) pour chaque antibiogramme (direct et colonies) sont les résultats interprétés par le logiciel de l'automate (AES) et non pas le résultat brut. Ce qui signifie qu'un résultat brut concordant peut présenter une discordance de catégorisation. Il peut suffire d'un écart d'une dilution de CMI (incertitude technique) pour rendre l'interprétation catégorielle discordante. L'interprétation du Vitek® 2 s'effectue sur les valeurs de concentrations critiques des recommandations de la version de 2018 du CASFM/EUCAST. Il s'agit de la version implémentée sur les automates Vitek® 2 au moment de l'étude. La mise à jour de la version du logiciel pour suivre les recommandations dépend du délai de leur développement par le fournisseur.

### 3. Logiciel de saisie

La saisie des données est réalisée par le centre qui réalise les essais. Chaque centre a accès à un logiciel de saisie via internet avec un login et un mot de passe. Les informations sont renseignées à partir d'une grille de saisie reprenant toutes les informations de l'essai. Les informations rapportées sont : le centre, le numéro du test, le type d'incubateur, la carte Vitek® utilisée, le type de flacon, l'identification de la bactérie étudiée, la catégorisation clinique rendue par le logiciel expert (AES), la CMI rendu par l'automate (résultat brut), ainsi que le mécanisme de résistance proposé par l'AES.

L'exploitation statistique est réalisée par le logiciel de la société spécialisée BIOFORTIS, en fonction du cahier des charges qui leur est fourni.

## 4. Exploitation

### a. Eléments comparés

- i. Exploitation en termes de concordance et de discordances  
« globales »

#### ➤ Concordance et discordance catégorielle du caractère S/I/R

Les définitions suivantes sont basées sur les recommandations 2019 du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM / EUCAST) et la guidance 2009 de la FDA (Guidance for Industry and FDA - Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems).

Les taux de concordance sont reportés avec leur intervalle de confiance à 95% selon la méthode exacte de Clopper-Pearson.

**Tableau 10 : Tableau de répartition des résultats pour un antibiotique donnée**

Méthode référente (VITEK® 2 colonie à J1) Bouillon d'hémoculture (VITEK® 2 à J0)	TRM	S	I	R
TRM	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
S	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>h</i>
I	<i>j</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>m</i>
R	<i>n</i>	<i>o</i>	<i>p</i>	<i>q</i>

**Résultats évaluable**

Les résultats TRM pour l'une des méthodes (cases a, b, c, d, e, j, n) ne sont pas évaluable en termes de concordance. Seuls les résultats catégoriels évaluable (S/I/R) en double le permettent.

Nombre de résultats évaluable =  $(f+g+h+k+l+m+o+p+q)$

**Concordance catégorielle (CA)**

Concordance entre les résultats interprétable (S, I ou R) entre la nouvelle méthode évaluée et la méthode référente.

$$CA = 100 \times \frac{(cases\ f + l + q)}{\text{nombre de résultats catégoriels évaluable en double}}$$

Pour les antibiotiques où seul un résultat positif/négatif est disponible (BLSE, Cefoxitin screening, inductible résistance clindamycin), il est considéré qu'il y a une concordance catégorielle entre les deux méthodes si les résultats sont similaires (positif/positif ou négatif/négatif).

**Discordance catégorielle mineure (Dm)**

Une discordance mineure (Dm) est un résultat évaluable, qui diffère « d'une catégorie » : la méthode référente indique une résistance (R) ou une sensibilité (S) et la nouvelle méthode évaluée indique intermédiaire (I) ; ou le résultat de la méthode référente est (I) et celui de la nouvelle méthode évaluée est (R) ou (S).

Le taux de discordances mineures (CA min) se calcule de la façon suivante :

$$Dm = \frac{\text{Nombre de test donnant une erreur mineure}}{\text{Nombre de bactéries testés par la méthode référente}}$$

$$Dm = 100 \times \frac{(cases\ k + m + g + p)}{\text{nombre de résultats évaluable en double}}$$

Pour les antibiotiques où seul un résultat positif/négatif est disponible (BLSE, Cefoxitin screening, inductible résistance clindamycin), le taux de discordances mineures n'a pas été calculé.

### **Discordance catégorielle majeure (DM)**

Une discordance majeure (DM) correspond à une sensibilité (S) pour la méthode référente et une résistance (R) pour la méthode évaluée. Le patient ne sera pas traité de manière inappropriée mais le résultat catégoriel est faux.

Le taux de discordances majeures (DM) se calcule de la façon suivante :

$$DM = 100 \times \frac{\text{nombre de discordances majeures}}{\text{nombre d'organisme de la méthode référente}}$$
$$DM = 100 \times \frac{\text{(case } o \text{)}}{\text{nombre de résultats évaluables en double}}$$

Pour les antibiotiques où seul un résultat positif/négatif est disponible (BLSE, Cefoxitin screening, inductible résistance clindamycin), le taux de discordances majeures n'a pas été calculé.

### **Discordance catégorielle très majeure (DTM)**

Une discordance très majeure (DTM) correspond à une résistance (R) pour la méthode référente et une sensibilité (S) pour la méthode évaluée. Le patient pourrait être traité de manière inappropriée.

Le taux de discordances très majeures (DTM) se calcule de la façon suivante :

$$DTM = 100 \times \frac{\text{nombre de discordances très majeures}}{\text{nombre d'organismes résistants selon la méthode référente}}$$
$$DTM = 100 \times \frac{\text{(case } h \text{)}}{\text{(cases } d + h + m + q \text{)}}$$

Pour les antibiotiques où seul un résultat positif/négatif est disponible (BLSE, Cefoxitin screening, inductible résistance clindamycin), le taux de discordances très majeures n'a pas été calculé.

#### ➤ Concordance essentielle (+/- 1 dilution) en termes de CMI

La corrélation de la mesure de la CMI est réalisée par rapport au groupe bactérien et par famille d'antibiotiques. Parmi les discordances de résultat S/I/R est calculé le pourcentage de discordances en lien avec une différence de +/- une dilution de CMI. La différence de +/- une dilution de CMI n'est pas liée à une erreur mais correspond à la marge d'incertitude technique de l'analyse (par exemple, quand le résultat de CMI est égal à 1mg/L il est possible que la véritable CMI de la bactérie étudiée soit de 0.5 ou 2 mg/L).

➤ Concordance des mécanismes de résistance proposés par les automates

L'objectif est de comparer la concordance du mécanisme de résistance à partir des résultats du bouillon d'hémoculture à J0 et des colonies à J1.

Pour tous les essais pour lesquels un mécanisme de résistance est renseigné, la corrélation des mécanismes de résistance est appréciée par le % de cas pour lequel le mécanisme proposé est identique.

Deux concordances sont calculées : Pour la première, (1) celle-ci tient compte des hémocultures avec résultats de mécanisme disponibles sur bouillon et/ou colonie. Pour la seconde, (2) celle-ci tient compte des hémocultures avec résultats de mécanisme disponible en double (colonie et bouillon). Il est considéré qu'il y a :

- Concordance des mécanismes de résistance entre les deux méthodes si les deux résultats sont disponibles et similaires,
- Discordance des mécanismes de résistances entre les deux méthodes si les deux résultats sont disponibles et différents,
- Concordance non définie si l'un des résultats est manquant.

Le taux de concordance des mécanismes de résistance se calcule de la façon suivante :

$$(1) \text{Taux de concordance du mécanisme de résistance pour tout les résultats (\%)} \\ = 100 \times \frac{\text{nombre de résultats bouillon et colonie concordants}}{\text{nombre d'hémocultures avec mécanisme de résistance renseigné sur bouillon et/ou colonie}}$$

$$(2) \text{Taux de concordance du mécanisme de résistance les résultats en double (\%)} \\ = 100 \times \frac{\text{nombre de résultats bouillon et colonie concordants}}{\text{nombre d'hémocultures avec mécanisme de résistance renseigné en double}}$$

Les taux de concordance sont reportés avec leur intervalle de confiance à 95% selon la méthode exacte de Clopper-Pearson.

ii. **Exploitation selon les critères de la norme ISO 20776**

Bien que n'ayant pas, à proprement parlé, utilisé de méthode de référence pour analyser les discordances, il nous a paru intéressant de recalculer les discordances selon les critères de la norme en assimilant la méthode « référente » (par colonie) à la méthode de référence.

Les taux de discordances sont recalculés selon les critères de la norme :

**Taux de discordances très majeures parmi les résultats résistants sur colonie (DTM majR)**

Le taux de discordances très majeures est également calculé parmi les résultats résistants sur colonie comme le rapport du nombre de tests sensibles (S) pour la méthode évaluée sur le nombre de tests résistants (R) pour la méthode référente.

Le taux de discordances majeures (DTM majR) se calcule de la façon suivante :

$$DTM\ majR = 100 \times \frac{(case\ h)}{(cases\ d + h + m + q)}$$

Pour les antibiotiques où seul un résultat positif/négatif est disponible (BLSE, Cefoxitin screening, inductible resistance clindamycin), le taux de discordances majeures parmi les résultats sensibles sur colonie n'a pas été calculé.

### **Taux de discordances majeures parmi les résultats sensibles sur colonie (DM majS)**

Le taux de discordances majeures est également calculé parmi les résultats sensibles sur colonie comme le rapport du nombre de tests résistants (R) pour la méthode évaluée sur le nombre de tests sensibles (S) pour la méthode référente.

Le taux de discordances majeures (DM majS) se calcule de la façon suivante :

$$DM\ majS = 100 \times \frac{(case\ o)}{(cases\ b + f + k + o)}$$

Pour les antibiotiques où seul un résultat positif/négatif est disponible (BLSE, Cefoxitin screening, inductible resistance clindamycin), le taux de discordances majeures parmi les résultats sensibles sur colonie n'a pas été calculé.

## **b. Modalités d'exploitation**

Les concordances catégorielles (globale, mineure, majeure et très majeure) sont présentées à différents niveaux d'analyses et reportées dans un tableau.

- Pour toutes les bactéries :
  - o tous les antibiotiques
  - o par regroupement de molécules d'antibiotiques
- Par groupe de bactéries
  - o tous les antibiotiques
  - o par regroupement de molécules d'antibiotiques

Les critères de concordance des résultats attendus sont ceux de la FDA (100) :

- Concordance de catégorisation >90%
- Taux d'erreurs très majeures (DTM) <1.5%
- Taux d'erreurs majeures (DM) <3%
- Taux d'erreurs mineures (Dm) <10%

Les données des tests réalisés sont évalués comparativement en accord avec la norme ISO 20776 et les recommandations des systèmes expert EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) et CLSI (clinical and laboratory standards institute).

# RESULTATS

## I. Description de la population

Le nombre d'essais réalisés par centre est rapporté dans le Tableau 11. Un essai correspond à la réalisation d'un antibiogramme en double, à J0 à partir du bouillon et à J1 à partir de colonies, pour un flacon d'hémoculture positif. Le nombre d'essai de chaque centre est proportionnel au recrutement en hémocultures positives ainsi qu'à la durée de la période étudiée. Au total, ce sont 784 essais qui ont été analysés au cours de cette étude.

**Tableau 11 : Nombre d'essais par centre**

Centre	Nombre d'essais réalisés en double
Hôpital Cochin Paris	109
Cerballiance Lyon	104
Cerballiance Nice	39
CH Cahors	99
CH Douai	47
CHU St Etienne	242
CH Valenciennes	144
Total	784

Le Tableau 12 permet d'apprécier l'implication de chaque automate dans les résultats obtenus.

**Tableau 12 : Nombre d'essais par automates**

Automate	Nombre d'essais réalisés en double
BactAlert 3D Biomérieux	247
Virtuo Biomérieux	146
Bactec FX BD	391
Total	784

On peut observer au travers des Tableau 13 et Tableau 14 que 428 souches d'entérobactérales ont été testés par les cartes Vitek AST-N233 et AST XN05, 314 souches de staphylocoques ont été testés avec la carte Vitek AST-P631, 42 souches d'entérocoques ont été testés avec la carte Vitek ASP-P606.

**Tableau 13 : Nombre d'essais par cartes Vitek**

Carte Vitek	Nombre d'essais réalisés en double
AST-N233 + AST XN05	428
AST-P631	314
AST-P606	42
Total	784

**Tableau 14 : Nombre d'essais par groupes de bactéries**

Groupe de bactérie	Nombre d'essais réalisés en double
Entérobactérales	428
Staphylocoques	314
Entérocoques / streptocoques	42
Total	784

On peut noter dans le Tableau 15, une répartition équivalente entre les flacons aérobie et anaérobie. 13 flacons pédiatriques ont été utilisés dans cette étude.

**Tableau 15 : Nombre d'essais par type de flacons**

Type de flacon	Nombre d'essais réalisés en double
Aérobie	425
Anaérobie	346
Pédiatrique	13
Total	784

Le tableau ci-dessous nous indique la répartition des espèces bactériennes étudiées. Parmi les 428 souches d'entérobactérales il y a : 242 *E.coli*, 51 *Klebsiella* spp., 26 *P.mirabilis*, 26 *Enterobacter* spp. ainsi que 83 autres souches d'entérobactérales. Parmi les 314 souches de staphylocoques il y a : 118 *S.aureus*, 124 *S.epidermidis* ainsi que 72 autres souches de staphylocoques à coagulase négative. Parmi les 42 souches d'entérocoques étudiées il y a : 36 *E.faecalis* et 6 *E.faecium*.

Il est important de disposer d'un panel de souches représentatif et incluant des souches résistantes. Il est donc intéressant d'avoir un recrutement conséquent de souches dites « hospitalières » (entérobactérales autres que *E.coli*) qui présentent une proportion plus importante de résistances aux antibiotiques.

**Tableau 16 : Population étudiée tout centre confondu**

Population d'étude	Absolue (N)	Relative (%)
<b>Entérobactérales</b>	428	54,6
<b>Dont</b>		
<i>E. coli</i>	242	30,9
<i>Klebsiella</i> spp.	51	6,5
<i>P. mirabilis</i>	26	3,3
<i>Enterobacter</i> spp.	26	3,3
Autres	83	10,6
<b>Staphylocoques</b>	314	40,1
<b>dont</b>		
<i>S. aureus</i>	118	15,1
<i>S. epidermidis</i>	124	15,8
Autres	72	9,2
<b>Entérocoques</b>	42	5,4
<b>dont</b>		
<i>E. faecalis</i>	36	4,6
<i>E. faecium</i>	6	0,8
<b>Total</b>	784	

Au total, cette étude a testé 18008 couples molécules / bactéries. Il est inclus des souches présentant divers mécanismes de résistance : pénicillinase acquise, céphalosporinase, BLSE, carbapénèmase, résistance à la méticilline.

## II. Résultats globaux

### 1. Concordance catégorielle

**Tableau 17 : Taux de concordance S/I/R des résultats globaux**

Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
96.8%	95.8%	1.1%	1.4%	0.67%	3.4%	1.8%

Les résultats globaux montrent 96,8% de concordance catégorielle entre les deux méthodes. Si on prend en compte l'incertitude de mesure technique en évaluant la concordance catégorielle avec les résultats à +/- 1 dilution de CMI, on obtient 95,8% de concordance. Parmi les 3,2% de discordances recensées : 1,1% correspondent à des discordances mineures, 1,4% à des discordances majeures et 0,67% à des discordances très majeures. Le taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie est de 3,4%. Le taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie est de 1,8%.

### 2. Résultats par automate

**Tableau 18 : Résultats du Bactec FX® sur 8769 couples testés**

Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
98%	97.5%	0.7%	0.7%	0.6%	3%	0.8%

Les résultats du Bactec FX® sur 8769 couples antibiotique/bactérie testés montrent 98% de concordance catégorielle entre les deux méthodes. Si on prend en compte

l'incertitude de mesure technique en évaluant la concordance catégorielle avec les résultats à +/- 1 dilution de CMI, on obtient 97,5% de concordance. Parmi les 2% de discordances recensées : 0,7% correspondent à des discordances mineures, 0,7% à des discordances majeures et 0,6% à des discordances très majeures. Le taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie est de 3%. Le taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie est de 0,8%.

**Tableau 19 : Résultats du Virtuo® sur 3818 couples testés**

Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
98%	96.5%	0.8%	0.4%	0.78%	4.4%	0.6%

Les résultats du Virtuo® sur 3818 couples antibiotique/bactérie testés montrent 98% de concordance catégorielle entre les deux méthodes. Si on prend en compte l'incertitude de mesure technique en évaluant la concordance catégorielle avec les résultats à +/- 1 dilution de CMI, on obtient 96,5% de concordance. Parmi les 2% de discordances recensées : 0,8% correspondent à des discordances mineures, 0,4% à des discordances majeures et 0,78% à des discordances très majeures. Le taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie est de 4,4%. Le taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie est de 0,6%.

**Tableau 20 : Résultats du BactAlert 3D® sur 5421 couples testés**

Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
94.2%	92.4%	1.8%	3.3%	0.7%	3.5%	4.1%

Les résultats du BactAlert 3D® sur 5421 couples antibiotique/bactérie testés montrent 94,2% de concordance catégorielle entre les deux méthodes. Si on prend en compte l'incertitude de mesure technique en évaluant la concordance catégorielle avec les résultats à +/- 1 dilution de CMI, on obtient 92,4% de concordance. Parmi les 5,8% de discordances recensées : 1,8% correspondent à des discordances mineures, 3,3% à des discordances majeures et 0,7% à des discordances très majeures. Le taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie est de

3,5%. Le taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie est de 4,1%.

### 3. Résultats par centre

**Tableau 21 : Résultats par centre**

Centre	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
1	97.2%	96.1%	1.1%	1%	0.7%	3.6%	1.3%
2	96.7%	95%	1.1%	1.4%	0.79%	4.8%	1.7%
3	79.3%	75.5%	5.4%	14.9%	0.45%	1.8%	20.6%
4	98%	96.4%	0.8%	0.4%	0.85%	5.3%	0.5%
5	98%	96.6%	0.7%	0.6%	0.62%	2.9%	0.8%
6	98%	97.7%	1%	0.4%	0.55%	2.8%	0.5%
7	98.1%	97.5%	0.5%	0.8%	0.63%	3%	1%

Les résultats de concordance présentés par centre nous montrent ici la cohésion des résultats des différents paramètres calculés selon les centres. Sauf pour le centre numéro 3 qui présente des résultats qui diffèrent des autres centres.

### 4. Résultats AES : mécanisme de résistance identifié

La concordance globale du mécanisme de résistance identifié est de 96.5%. Néanmoins, la concordance varie selon l'automate utilisé. La concordance du mécanisme de résistance identifié est de 100% pour le Bactec FX<sup>®</sup>, de 87.1% pour le BactAlert 3D<sup>®</sup> et de 93,5% pour le Virtuo<sup>®</sup>.

### III. Résultats par type de carte

#### 1. Entérobactérales (Carte AST-N233 + AST-XN 05)

**Tableau 22 : Concordance pour les entérobactérales**

Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
97.3%	96.5%	1.2%	1%	0.47%	2.7%	1.3%

Les résultats pour les entérobactérales (toutes les espèces confondues) montrent 97,3% de concordance catégorielle entre les deux méthodes. Si on prend en compte l'incertitude de mesure technique en évaluant la concordance catégorielle avec les résultats à +/- 1 dilution de CMI, on obtient 96,5% de concordance. Parmi les 2,7% de discordances recensées : 1,2% correspondent à des discordances mineures, 1% à des discordances majeures et 0,47% à des discordances très majeures. Le taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie est de 2,7%. Le taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie est de 1,3%.

Le Tableau 23 reprend les résultats des différents paramètres étudiés et classés par famille d'antibiotiques pour l'ensemble des 428 souches d'entérobactérales étudiées.

**Tableau 23 : Résultats par famille d'antibiotiques pour les entérobactérales**

P E N I C I L L I N E S	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
		96.2%	94.5%	1.4%	1.7%	0.7%	1.8%

<b>C E P H A L O S P O R I N E S</b>	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
	97.2%	95.9%	1.4%	1%	0.4%	2.3%	1.2%

<b>P E N E M E S</b>	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
	98.7%	96.6%	1.2%	0.1%	0.08%	9%*	0.1%

\* 1 seule discordance très majeure

<b>A M I N O S I D E S</b>	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
	99.2%	98.7%	0.4%	0.1%	0.3%	4.9%	0.1%

<b>Q U I N O L O N E S</b>	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
	98.1%	98.2%	1.1%	0.7%	0.1%	1.2%	0.8%

<b>A U T R E S</b>	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
	96.6%	96.7%	1.2%	1.4%	0.8%	5.2%	1.6%

## 2. Staphylocoques (Carte AST-P631)

**Tableau 24 : Concordance pour les staphylocoques**

Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
96.4%	94.7%	0.6%	2%	1.03%	3.9%	2.7%

Les résultats pour les staphylocoques (toutes les espèces confondues) montrent 96,4% de concordance catégorielle entre les deux méthodes. Si on prend en compte l'incertitude de mesure technique en évaluant la concordance catégorielle avec les résultats à +/- 1 dilution de CMI, on obtient 94,7% de concordance. Parmi les 3,6% de discordances recensées : 0,6% correspondent à des discordances mineures, 2% à des discordances majeures et 1,03% à des discordances très majeures. Le taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie est de 3,9%. Le taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie est de 2,7%.

Le Tableau 25 reprend les résultats des différents paramètres étudiés et classés par famille d'antibiotiques pour l'ensemble des 314 souches de staphylocoques étudiées.

**Tableau 25 : Résultats par famille d'antibiotiques pour les staphylocoques**

Famille	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
Peni	97.8%	93.3%	0%	1.5%	0.68%	1.1%	4.3%
Amino	98.5%	94.3%	0%	0.6%	0.89%	2.9%	0.8%
Macro	94.2%	93.4%	2.6%	2.8%	0.45%	1.4%	4.1%
Quinol	97%	95.9%	0%	2.7%	0.33%	1%	4.1%
Autres	96%	95.5%	0.4%	2.2%	1.45%	10.9%	2.5%

Le Tableau 26 nous présente les résultats des différents paramètres étudiés et classés par famille d'antibiotiques pour les 118 souches de *S.aureus* étudiées, les 124 souches de *S.epidermidis* étudiées, ainsi que les 72 autres souches de staphylocoques à coagulase négative étudiées.

**Tableau 26 : Résultats par espèce bactérienne**

<b><i>S.aureus</i></b>							
Famille	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
Global	97.1%	96.7%	0.7%	2%	0.14%	1.9%	2.2%
Peni	97%	92.8%	0%	3%	0%	0%	4.6%
Amino	100%	99.4%	0%	0%	0%	0%	0%
Macro	94.8%	95.4%	2.3%	2.9%	0%	0%	3.4%
Quinol	98.3%	98.2%	0%	1.7%	0%	0%	1.9%
Autres	96.8%	96.9%	0.7%	2.2%	0.28%	50%	2.2%

<b>S.epidermidis</b>							
Famille	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
Global	95.8%	93.8%	0.5%	1.9%	1.8%	4.2%	3.3%
Peni	99.2%	97.5%	0%	0%	0.8%	0.9%	0%
Amino	98.4%	90.3%	0%	0.5%	1%	1.9%	1.2%
Macro	93.2%	91.1%	2.4%	3.5%	0.8%	1.8%	6.7%
Quinol	96%	94.4%	0%	3.2%	0.8%	1.4%	7.7%
Autres	94.9%	95.2%	0.2%	2.1%	2.8%	12.4%	2.7%

<b>Autres espèces de SCN</b>							
Famille	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
Global	96.1%	92.3%	0.6%	2%	0.12%	4%	3%
Peni	96.4%	84.8%	0%	1.8%	0.18%	2.5%	6.7%
Amino	95.9%	92.4%	0%	1.8%	0.23%	6.3%	2.8%
Macro	94.8%	94.2%	3.5%	1.2%	0.58%	2%	1.7%
Quinol	96.5%	94.7%	0%	3.5%	0%	0%	5.6%
Autres	96.6%	92.9%	0%	2.2%	1.2%	5.5%	2.9%

### 3. Entérocoques (Carte AST-P606)

**Tableau 27 : Concordance pour les entérocoques**

Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
89.3%	86.1%	2.6%	6%	2.1%	11.4%	8.6%

Les résultats pour les entérocoques (toutes les espèces confondues) montrent 89,3% de concordance catégorielle entre les deux méthodes. Si on prend en compte l'incertitude de mesure technique en évaluant la concordance catégorielle avec les résultats à +/- 1 dilution de CMI, on obtient 86,1% de concordance. Parmi les 10,7% de discordances recensées : 2,6% correspondent à des discordances mineures, 6% à des discordances majeures et 2,1% à des discordances très majeures. Le taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie est de 11,4%. Le taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie est de 8,6%.

Le Tableau 28 reprend les résultats des différents paramètres étudiés et classés par famille d'antibiotiques pour l'ensemble des 42 souches d'entérocoques étudiées.

**Tableau 28 : Résultats par famille d'antibiotiques pour les entérocoques**

Famille	Concordance catégorielle	Concordance à +/- 1 dilution CMI	Taux d'erreurs mineures	Taux d'erreurs majeures	Taux d'erreurs très majeures	Taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie	Taux d'erreurs majeures ramené au nombre de résultats S sur colonie
Peni	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%
Amino	85.1%	N/A*	N/A*	4.3%	10.6%	45.5%	5.6%
Macro	90.6%	87.5%	9.4%	0%	0%	0%	0%
Quinol	84.6%	64.1%	10.3%	5.1%	0%	0%	12.2%
Autres	89.6%	87.4%	0.9%	9.5%	0%	0%	12.2%

\*Non Applicable



# DISCUSSION

## I. Résultats principaux et leurs implications

### 1. Globalement

Cette étude établie sur 784 essais montre une concordance globale de 96,8% par rapport à la méthode référente, une concordance de 97,3% pour les entérobactériales, une concordance de 97,1% pour le *staphylococcus aureus*, une concordance de 95,8% pour *S.epidermidis*, une concordance de 96,1% pour les staphylocoques à coagulase négative et une concordance de 89,3% pour les entérocoques.

Globalement, la concordance catégorielle et la concordance à +/- 1 dilution de CMI est supérieure à 95% ce qui est conforme aux critères de la FDA (>90%). Les taux d'erreurs calculés globalement sont conformes aux critères pour les discordances mineures (1,1% versus <10%), les discordances majeures (1,4% versus <3%) et conformes pour les discordances très majeures (0,67% versus <1,5%).

Si on regarde les résultats par automates, on note que les résultats sur Bactec FX® et sur Virtuo® sont meilleurs que ceux réalisés sur BactAlert 3D®. L'analyse de ces données est détaillée dans les limites de l'étude ci-après.

L'étude des résultats obtenus par type de carte et de bactéries montre que les résultats obtenus avec les entérobactériales et les staphylocoques sont meilleurs que ceux obtenus avec les entérocoques.

Lorsqu'on observe plus attentivement les résultats par famille d'antibiotiques, les aminosides ont une concordance faible à 85,1% pour les entérocoques. Cependant, la détection de la résistance à haut niveau aux aminosides est difficilement reproductible. Ce phénomène s'observe sur les résultats des contrôles de qualité externe des laboratoires. Ce point sera discuté ci-après.

### 2. Analyse selon la norme ISO 20776

Globalement, les taux de discordances très majeures (DTM) et de discordances majeures (DM) ont été recalculés selon la norme ISO 20776. Les DTM sont supérieurs aux critères exigés au regard de la norme (DTM 3.4% versus 1.5%). Les DM sont conformes aux critères exigés de la norme (1.8% versus 3%). De prime abord ces résultats sont non conformes aux exigences de la norme. Il est néanmoins important de prendre en compte que la norme ISO 20776 se réfère à la comparaison d'une technique à la méthode de référence (CMI par microdilution en milieu liquide). Dans ce protocole la technique sur colonie a été choisie comme méthode « référente » mais il ne s'agit pas d'une méthode de référence au sens de la norme.

Ainsi, les antibiogrammes répétés sur colonie peuvent présenter des variations. Par conséquent, les données peuvent présenter un biais d'interprétation vis-à-vis des critères de la norme. De plus, un certains nombres de discordances nécessitent une analyse plus fine.

## II. Analyse des discordances

Bien que les discordances apparaissent élevées, les résultats ne doivent pas être pris en compte tels quels. Elles doivent être réanalysées au regard de certaines considérations.

### 1. Molécules « d'intérêt »

Il y a une absence de discordances sur un certain nombre de molécules ayant un intérêt thérapeutique, dans l'antibiogramme rendu, au regard de la bactérie considérée dans un contexte de bactériémie, ainsi :

- Pour les entérobactérales, il n'y a pas de DTM sur le céfotaxime, la ceftriaxone, l'imipénème, la ciprofloxacine et l'amikacine ;
- Pour les staphylocoques, le « cefoxitin screening » permettant de mettre en évidence la présence de SARM et de SERM possède 99,4% de concordance, de plus il n'y a pas de DTM sur la vancomycine, la teicoplanine, ni le linezolide ;
- Pour le *S.aureus*, il n'y a pas de DTM pour les pénicillines, les aminosides, les macrolides, ainsi que les quinolones ;
- Pour les entérocoques, il y a 100% de concordance pour l'ampicilline et 0% de DTM sur le linezolide.

Certaines molécules de l'antibiogramme, n'ayant aucun intérêt en thérapeutique et/ou dans le traitement des bactériémies, possèdent des pourcentages de discordances élevées. C'est le cas du chloramphénicol qui obtient globalement 80,6% de concordance catégorielle et 19,2% de DTM. Autre exemple avec la nitrofurantoïne qui obtient 92,1% de concordance catégorielle globale.

Pour la famille des entérobactérales (AST-N233 + AST-XN05), 21% des DM et 29,3% des DTM sont liées à deux molécules qui ne sont pas utilisées pour traiter les bactériémies : le chloramphénicol et la nitrofurantoïne.

Pour la famille des entérocoques, 46,4% des DM sont liées à la nitrofurantoïne qui n'a aucun intérêt dans le traitement d'une bactériémie. Dans cette analyse, les antibiotiques sans intérêt clinique (nitrofurantoïne, aminosides sauf gentamicine) représentent un biais dans la concordance globale pour cette famille de bactérie.

Dans une étude sur les performances du Vitek® 2, la plupart des discordances observées concernaient des antibiotiques qui ne sont pas utilisés dans le traitement des infections à entérocoques (101). Concernant les entérocoques et les

aminosides, la concordance est satisfaisante pour la gentamicine (96,6%), seule molécule d'intérêt dans ce contexte. La concordance est respectivement de 71,4% et de 82,8% pour la kanamycine et la streptomycine.

On observe un taux d'erreurs très majeures ramené au nombre de résultats R sur colonie (ISO 20776) élevé à 9% pour les entérobactérales vis-à-vis des carbapénèmes (Tableau 23). Ce taux élevé s'explique par la présence d'une seule discordance très majeure et la faible représentation d'entérobactérales présentant une carbapénèmase.

La famille d'antibiotiques dit « autres » est un regroupement de famille d'antibiotiques ayant une reproductibilité très variable. Certaines molécules analysées de cette famille n'ont aucun intérêt dans le traitement d'une bactériémie, à ce jour. Ainsi, le taux élevé de discordance retrouvé dans cette « famille » est discutable.

## **2. Discordance en lien avec un écart d'une seule dilution de CMI**

Certains pourcentages de discordances (y compris DM et DTM) sont liés à l'incertitude technique. En effet, l'analyse des discordances est réalisé à partir des résultats interprétés par l'AES de l'automate et non pas à partir des résultats bruts. Il existe donc beaucoup d'exemples où un écart d'une dilution de CMI entraîne une discordance catégorielle. Par exemple, la ticarcilline obtient globalement 93,6% de concordance catégorielle. En revanche lorsqu'on analyse la concordance de CMI pour la ticarcilline, on obtient 96% de concordance. On peut citer un autre exemple avec la tetracycline qui obtient 85,2% de concordance catégorielle et 98% de concordance de CMI.

Pour la famille des staphylocoques (AST-631), 21,6% des DM et 38,9% des DTM sont liées à la tetracycline, or ces discordances correspondent à des différences de CMI égales à une seule dilution. Elles sont donc non significatives car liées à l'incertitude technique.

## **3. Discordances et évolution des recommandations**

Les données sont traitées ici avec les recommandations du CASFM de 2018. Lorsqu'on affine les données avec l'avancée des dernières recommandations (CASFM 2020), on met en évidence que certains pourcentages de discordances sont en liens avec des molécules pour lesquelles il y a désormais une zone d'incertitude technique (ZIT). Par exemple, pour l'amoxicilline - acide clavulanique, 5% des DTM font désormais partie de la ZIT. Pour le piperacilline-tazobactam, ce sont 7,3% des DTM qui font désormais parties de la ZIT.

#### 4. Discordances en lien avec des sous populations

Les staphylocoques à coagulase négative font également partie des micro-organismes les plus fréquemment rencontrés dans les flacons d'hémoculture positif (16,24,27,86). Il est intéressant de les tester avec la méthode en milieu liquide mais les résultats sont à prendre avec précaution de par le caractère spécial de ce groupe de bactérie. Un staphylocoque à coagulase négative peut en cacher un autre. En effet, une même souche peut avoir deux aspects macroscopiques différents sur une gélose, et potentiellement des profils de sensibilités aux antibiotiques différents, ce qui nécessite en pratique la réalisation d'un antibiogramme pour chaque aspect. Ce phénomène est visible sur la réalisation des antibiogrammes précoce en diffusion mais ne l'est pas lors de la réalisation d'un antibiogramme en milieu liquide. D'où la nécessité d'être attentif sur le témoin de pureté, en particulier dans ces cas-là.

On observe par ailleurs une différence de performance entre les staphylocoques. On retrouve une concordance à +/- une dilution de CMI de 96,7% pour le *Staphylococcus aureus*, de 93,8% pour le *Staphylococcus epidermidis* (SCN), et de 92,3% pour les autres espèces de SCN. Ce qui illustre bien la possibilité de présence de sous population parmi les souches de staphylocoques à coagulase négative comparativement au *S.aureus* qui se comporte comme une souche unique.

La méthode référente est représentative d'une colonie prélevée alors que l'antibiogramme sur bouillon est représentatif des bactéries présentes dans le flacon (possibilité d'avoir plusieurs souches en particulier pour les staphylocoques), ou plusieurs variantes de la même souche exprimant des niveaux de résistance légèrement différents. A titre d'exemple, chez les entérobactérales du groupe 3, on observe dans certains cas 2 diamètres d'inhibition autour des disques d'antibiotiques sur l'antibiogramme en diffusion. Ceci s'explique par la présence d'une sous population exprimant un niveau de dérépression différent de la céphalosporinase chromosomique. Ce phénomène rend la réalisation de l'antibiogramme en milieu liquide directement à partir du bouillon d'hémoculture positif intéressant car il permet de s'affranchir du risque de ne pas travailler un variant potentiellement présent dans la culture. Néanmoins, des biais dans l'analyse des résultats peuvent naître de la méthode dite « référente » dus notamment à la réalisation de l'antibiogramme à partir d'une colonie, et non d'un mélange de colonies.

### III. Forces du travail

La réduction de 24 heures du délai de rendu de l'antibiogramme est rendue possible grâce à la mise au point d'une méthode en diffusion permettant sa réalisation directement à partir du flacon d'hémoculture positif (9). Une étude préliminaire réalisée au Centre Hospitalier de Valenciennes a démontré une bonne concordance générale sur les micro-organismes étudiés pour la réalisation de l'antibiogramme en milieu liquide à partir du bouillon d'hémoculture positif.

## 1. Robustesse

Le grand nombre de micro-organismes étudiés permet d'obtenir une bonne représentativité des résultats. De plus, l'étude de micro-organismes provenant du milieu hospitalier permet d'augmenter la proportion de micro-organismes ayant acquis différents mécanismes de résistance, ce qui est intéressant pour constituer un panel représentatif.

L'étude sur différents systèmes d'automates sur des sites géographiquement éloignés permet d'obtenir des résultats robustes. La multiplication des sites d'étude met en avant la robustesse de la méthode utilisée avec différentes organisations de travail. En effet, les laboratoires n'étant pas organisés de la même manière, le J0 à la sortie de l'automate ne correspond pas au même moment pour chaque laboratoire. Pour certains laboratoires cela peut être juste après la positivité du flacon, pour d'autres cela peut être bien plus tard. Les données obtenues et analysées prennent en compte l'ensemble des couples bactérie/antibiotique. Bien que certains couples présentent un intérêt limité dans l'étude de par une absence d'utilisation de molécules en thérapie anti-infectieuse, leur prise en compte permet de montrer la transparence des résultats obtenus liés à la technique. Au total, cette étude démontre la performance de cette méthode.

## 2. Intégration en routine

Nous avons souhaité adapter cette méthode en milieu liquide pour ses nombreux avantages liés à l'automatisation du processus : réduction du temps de travail technique, réduction du risque biologique lié à la méthode, simplification du procédé, résultats rendus en donnée précise de CMI et valorisation de l'interprétation du logiciel expert (68).

Sur le plan organisationnel, dans certaines pratiques de laboratoire il est choisi de réaliser les antibiogrammes uniquement en milieu liquide. Le manque de possibilité de réalisation de l'antibiogramme en diffusion à partir du bouillon d'hémoculture positif entrave l'amélioration du délai de rendu des résultats. Le but de cette étude est d'être publiée afin d'étayer les données scientifiques. Les laboratoires pourront ainsi utiliser cette technique et l'accréditer en portée A.

## 3. Impact clinique

La réduction de 24 heures du délai de rendu des résultats microbiologiques au clinicien améliore considérablement la prise en charge du patient (4,37,53). En particulier pour les patients sévères pour lesquels la documentation microbiologique de l'infection en cours est un avantage considérable dans l'amélioration de leur survie. Il est donc intéressant pour la clinique, qu'un laboratoire de biologie médicale puisse mettre en place une méthode lui permettant de rendre rapidement des

résultats, surtout pour l'hémoculture qui est un prélèvement en 1<sup>ère</sup> ligne pour la documentation des infections systémiques graves pouvant être rapidement létales.

Cette méthode a également l'avantage d'étudier le profil de sensibilité aux antibiotiques d'une éventuelle sous population de la même espèce, présente dans le bouillon et qui pourrait avoir un profil différent de sensibilité aux antibiotiques, comparé aux méthodes « conventionnelles » qui n'utilisent qu'une ou deux colonies pour la réalisation de la suspension de 0.5 McFarland nécessaire à la réalisation de l'antibiogramme.

## **IV. Limites de l'étude**

### **1. Méthodologie**

Il s'agit d'une étude prospective, elle comporte donc des risques limités liés aux recueils des données. Les informations récoltées sont dépendantes des informations saisies dans les tableurs, ce qui n'exclue pas l'erreur humaine. Néanmoins, pour pallier à cela les données ont été vérifiées par une double saisie.

Les risques liés à cette méthode sont ceux inhérents aux éléments de maîtrise et notamment à la gestion des flacons d'hémocultures positifs et à la réalisation d'antibiogramme en milieu liquide. Le risque lié à la préparation de l'inoculum est limité car la concentration bactérienne dans les flacons d'hémocultures positifs est sensiblement identique (102).

L'antibiogramme en milieu liquide directement à partir du bouillon d'hémoculture positif est réalisable en partant du postulat que le bouillon est monomicrobien. En pratique seule la culture sur gélose permet de révéler le caractère monomicrobien du bouillon positif. Il est donc essentiel, que l'identification soit réalisée à partir du bouillon ou non, de réaliser une culture sur gélose à partir de l'inoculum afin de révéler le ou les micro-organisme(s) présent et ainsi d'avoir une base fiable pour la réalisation de l'antibiogramme en milieu liquide. Il est nécessaire d'invalider l'antibiogramme en cas de subcultures polymicrobiennes, car il est impossible de savoir quel micro-organisme a cultivé dans tel ou tel puit des cartes Vitek<sup>®</sup> incubées dans l'automate d'antibiogramme en milieu liquide.

### **2. Effet centre**

Concernant les résultats par automates, en regardant plus attentivement les résultats par centre (Tableau 21), on observe que le centre 3 présente des résultats nettement moins bons. Les raisons de ces résultats différents par rapport aux autres centres restent inconnus à ce jour et peuvent être nombreuses (souci méthodologique par exemple). A noter que le centre 3 est équipé d'un BactAlert 3D<sup>®</sup>, ce qui peut entraîner un biais dans l'interprétation des résultats en fonction des automates.

### 3. Effectifs

Les résultats décrivant la population étudiée, notamment le Tableau 14 qui fait référence des effectifs des familles bactériennes, mettent en valeur des effectifs importants pour les staphylocoques et les entérobactérales. On y retrouve les entérocoques très faiblement représentés dans cette étude (42 essais). Le manque d'essais pour cette famille bactérienne est une cause des résultats obtenus.

Les bacilles Gram négatifs non fermentant et les streptocoques n'ont pas été inclus dans cette étude. Ce qui souligne un manque de représentativité des familles bactériennes responsables de bactériémies.

### 4. Exploitation complémentaire

Cette étude manque encore de données à ce jour. Cela est lié au manque de temps nécessaire à l'exploitation complète des résultats, en cette période particulière.

L'exploitation des résultats obtenus dans cette étude montre que la base de données nécessite un complément d'exploitation. Notamment en recalculant les concordances et discordances catégorielles, en considérant celles induites par la marge d'incertitude technique de l'analyse correspondant à la différence de +/- une dilution de CMI. L'analyse approfondie nécessite le retrait des discordances inférieures ou égale à +/- une dilution de CMI.

Lorsqu'on prend en compte dans le pourcentage de discordance les différents antibiotiques n'ayant aucun intérêt dans le traitement d'une bactériémie, on retrouve des pourcentages de discordances très importants. Ce sont ces molécules qui contiennent d'ailleurs le plus de discordances. Comme c'est le cas pour le chloramphénicol et la nitrofurantoïne avec les entérobactérales, les molécules sans intérêts dans le traitement des bactériémies viennent perturber l'analyse des résultats. Vis-à-vis de cette observation il est judicieux d'aller plus loin dans l'analyse des données et de chercher les concordances et discordances des souches bactériennes par rapport aux molécules d'intérêts en thérapeutique. C'est-à-dire de réanalyser les données en retirant les molécules sans intérêts dans le traitement des bactériémies. Les données sont actuellement retravaillées et feront l'objet d'une publication ultérieure.

L'analyse du pourcentage de résultats non rendus dit « TRM » et du délai d'obtention des résultats avaient initialement été prévus mais ne sont pas disponibles à ce jour. L'observation des données brutes permet néanmoins d'apprécier que peu de couples étudiés ont rendus un résultat TRM.

## V. Hypothèses et prospectives

Au regard des résultats rendus pour *E.coli*, *Klebsiella* spp, *P.mirabilis* et *Enterobacter* spp., cette méthode pourrait être généralisée à tous les bacilles Gram négatifs de la famille des entérobactérales. Elle pourrait également l'être pour les staphylocoques et les entérocoques.

Nous avons choisi de ne pas tester ici les bacilles Gram négatifs non fermentant tel que *P.aeromonas*, *A. baumannii* qui mériteraient d'être étudiés pour cette méthode compte tenu de leur fréquence dans les bactériémies et leurs nombreuses résistances pouvant compliquer la prise en charge thérapeutique.

Les avancées techniques permettant de rendre des résultats phénotypiques rapidement concurrencent sérieusement les avantages liés au gain de temps apporté par les méthodes génotypiques. D'autant plus que les méthodes génotypiques sont généralement coûteuses, liées aux principes de ces méthodes. Il peut être nettement plus judicieux et pratique pour un laboratoire d'axer la mise en place des méthodes phénotypiques rapides et moins coûteuses que des méthodes génotypiques.

Cette étude axe son travail d'amélioration du délai de rendu de résultat sur l'étape entre la positivité du flacon d'hémoculture dans l'automate et la réalisation de l'antibiogramme de l'espèce bactérienne. De nombreuses autres étapes tout au long de la prise en charge du patient peuvent également être optimisées en terme organisationnel telles qu'une amélioration du transport du prélèvement au laboratoire et de sa mise en place dans l'automate, une prise en charge précoce dans les délais de pousse des micro-organismes sur gélose, une coloration de Gram et une communication du résultat rapide, une identification rapide du pathogène en cause, ainsi que l'adaptation clinique du traitement dès l'obtention du résultat. La prise en charge du patient y gagne à chaque optimisation des différentes étapes du parcours du prélèvement de l'hémoculture jusqu'au rendu de résultat.

L'antibiogramme consiste à caractériser un micro-organisme donné pour un antibiotique donné en plusieurs catégories : Sensible / Intermédiaire / Résistant. Depuis peu le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie a apporté une précision sur le caractère « Intermédiaire » en le modifiant par « Sensible forte exposition » d'une part et « Zone d'incertitude technique » (ZIT) d'autre part, lorsque les données actuelles de la science le permettent (9). Les concentrations critiques étant affinées dans les dernières recommandations, il serait intéressant de réanalyser les données brutes des CMI obtenues et de simuler le rendu catégoriel du logiciel expert du Vitek® 2 avec les recommandations récentes.

## CONCLUSIONS

Les bactériémies présenteront toujours un risque important de décès pour les patients, en particulier chez les sujets âgés et atteints de maladies chroniques. Les micro-organismes principalement responsables de ces infections diffèrent en fonction du contexte communautaire ou nosocomial. Le succès thérapeutique dépend de la précocité de sa prise en charge mais également du délai de documentation de la bactériémie. La réalisation de l'antibiogramme en milieu liquide à partir du bouillon d'hémoculture positif permet au laboratoire d'analyse médicale de réduire le rendu du résultat d'antibiogramme des bactéries responsables de bactériémies. Permettant aux cliniciens de pouvoir adapter l'antibiothérapie de manière précoce et d'améliorer la prise en charge et la survie des patients présentant une bactériémie.

La réalisation de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé à partir des bouillons positifs a été possible grâce aux études menées par le CA-SFM. Dans son mode opératoire, la standardisation de l'inoculum nécessaire à la réalisation de l'antibiogramme a permis de partir de la même méthode de préparation de l'inoculum pour la réalisation de l'antibiogramme en milieu liquide sur l'automate Vitek® 2.

Cette étude apporte des données et complète les études préliminaires sur le sujet. Les résultats de la réalisation de l'antibiogramme en milieu liquide à partir du bouillon d'hémoculture positif, en comparaison avec la méthode « référente » réalisée à partir de colonies montrent globalement une bonne concordance catégorielle (96,8%), y compris à +/- 1 dilution de CMI (95,8%), ce qui est conforme aux critères de la FDA (>90%).

En somme, cette étude démontre que l'antibiogramme précoce en milieu liquide à partir du bouillon d'hémoculture positif est réalisable pour les espèces principalement rencontrées dans les bactériémies. Elle alimente les données sur le sujet et permettra l'accréditation de la méthode en portée A dans les laboratoires d'analyses médicales.



# BIBLIOGRAPHIE

1. Timsit J-F, Ruppé E, Barbier F, Tabah A, Bassetti M. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. *Intensive Care Med.* 2020;46(2):266- 84.
2. Goto M, Al-Hasan MN. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect.* 1 juin 2013;19(6):501- 9.
3. Minasyan H. Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives. *J Crit Care.* 1 août 2017;40:229- 42.
4. 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). *Infect Drug Resist.* 31 août 2018;11:1359- 68.
5. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect.* 1 avr 2015;21(4):313- 22.
6. Savage RD, Fowler RA, Rishu AH, Bagshaw SM, Cook D, Dodek P, et al. The Effect of Inadequate Initial Empiric Antimicrobial Treatment on Mortality in Critically Ill Patients with Bloodstream Infections: A Multi-Centre Retrospective Cohort Study. *PLoS ONE.* 6 mai 2016;11(5).
7. Nelson RE, Slayton RB, Stevens VW, Jones MM, Khader K, Rubin MA, et al. Attributable Mortality of Healthcare-Associated Infections Due to Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* juill 2017;38(7):848- 56.
8. Sherwin R, Winters ME, Vilke GM, Wardi G. Does Early and Appropriate Antibiotic Administration Improve Mortality in Emergency Department Patients with Severe Sepsis or Septic Shock? *J Emerg Med.* oct 2017;53(4):588- 95.
9. CA-SFM / EUCAST. Recommandations 2020 [Internet]. 2020 [cited 2020 April 4]. Available from : [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020\\_Avril2020\\_V1.1.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf).
10. Comité technique des infections nosocomiales et des infections liées aux soins. Définition des infections associées aux soins. Ministère de la santé, de la jeunesse et des sports; 2007.
11. Beekmann SE, Diekema DJ, Doern GV. Determining the Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From Blood Cultures. *Infect Control Hosp Epidemiol.* juin 2005;26(6):559- 66.
12. ECN PILLY 2018, Maladies infectieuses et tropicales, Editions ALINEA plus, 5ème édition.
13. Berche P, Gaillard J, Simonet M. Bactériologie, Bactéries des infections humaines. 1ère édition. Flammarion Médecines-sciences.
14. Berche P. Physiopathologie des infections à *Listeria monocytogenes*. *Médecine Mal Infect.* 1 févr 1995;25:197- 209.
15. Iung B. Endocardite infectieuse. Épidémiologie, physiopathologie et anatomopathologie. *Presse Médicale.* mai 2019;48(5):513- 21.

16. Pien BC, Sundaram P, Raouf N, Costa SF, Mirrett S, Woods CW, et al. The Clinical and Prognostic Importance of Positive Blood Cultures in Adults. *Am J Med.* sept 2010;123(9):819- 28.
17. Porcheret H, Barraud D, Bingen M, Rabenja T, Costa Y, Estève V, et al. Anti-infectieux empiriques dans les 24–48 premières heures des bactériémies des patients hospitalisés dans les hôpitaux du groupe des microbiologistes d’Île-de-France en 2007. *Pathol Biol.* 1 avr 2010;58(2):e7- 14.
18. 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 Mal Infect.* 1 juin 2016;46(4):194- 9.
19. Santé publique France, Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2017.
20. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *CHEST.* 1 juin 1992;101(6):1644- 55.
21. Churpek MM, Zadavec FJ, Winslow C, Howell MD, Edelson DP. Incidence and Prognostic Value of the Systemic Inflammatory Response Syndrome and Organ Dysfunctions in Ward Patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 9 juill 2015;192(8):958- 64.
22. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 23 févr 2016;315(8):801.
23. 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.* 1 mars 2017;43(3):304- 77.
24. Anderson DJ, Moehring RW, Sloane R, Schmader KE, Weber DJ, Fowler VG, et al. Bloodstream Infections in Community Hospitals in the 21st Century: A Multicenter Cohort Study. *Planet PJ*, éditeur. *PLoS ONE.* 18 mars 2014;9(3):e91713.
25. Sonnevile R, Klein I, Bouadma L, Mourvillier B, Regnier B, Wolff M. Complications neurologiques des endocardites infectieuses. *Réanimation.* oct 2009;18(7):547- 55.
26. Dat VQ, Long NT, Hieu VN, Phuc NDH, Kinh NV, Trung NV, et al. Clinical characteristics, organ failure, inflammatory markers and prediction of mortality in patients with community acquired bloodstream infection. *BMC Infect Dis [Internet].* 26 oct 2018 [cité 6 juin 2020];18. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6204014/>
27. Diekema DJ, Hsueh P-R, Mendes RE, Pfaller MA, Rolston KV, Sader HS, et al. The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother [Internet].* 24 juin 2019 [cité 22 juin 2020];63(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6591610/>
28. Olivier G, Hubert C, Richard S, Jean-Marie D, Christian C, Patrick P. Surveillance de la résistance des bactéries isolées d’hémocultures dans les hôpitaux non universitaires français : les données de l’Observatoire des résistances du COL-BVH de 2000 à 2015. :1.
29. Laupland KB. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clin Microbiol Infect.* 1 juin 2013;19(6):492- 500.
30. ONERBA, Observatoire National de l’Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques, 2017 Rapport d’activité, Edition Novembre 2018.

31. 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\*: *Crit Care Med*. juin 2006;34(6):1589- 96.
32. Edmiston CE, Garcia R, Barnden M, DeBaun B, Johnson HB. Rapid diagnostics for bloodstream infections: A primer for infection preventionists. *Am J Infect Control*. sept 2018;46(9):1060- 8.
33. Pliakos EE, Andreatos N, Shehadeh F, Ziakas PD, Mylonakis E. The Cost-Effectiveness of Rapid Diagnostic Testing for the Diagnosis of Bloodstream Infections with or without Antimicrobial Stewardship. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 30 mai 2018 [cité 1 juin 2020];31(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6056844/>
34. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of Inappropriate Antimicrobial Therapy Results in a Fivefold Reduction of Survival in Human Septic Shock. *Chest*. nov 2009;136(5):1237- 48.
35. Velden LB van der, Vos FJ, Mouton JW, Sturm PD. Clinical Impact of Preincubation of Blood Cultures at 37°C. *J Clin Microbiol*. 1 janv 2011;49(1):275- 80.
36. Barenfanger J, Graham DR, Kolluri L, Sangwan G, Lawhorn J, Drake CA, et al. Decreased Mortality Associated With Prompt Gram Staining of Blood Cultures. *Am J Clin Pathol*. déc 2008;130(6):870- 6.
37. Wolk DM, Johnson JK. Rapid Diagnostics for Blood Cultures: Supporting Decisions for Antimicrobial Therapy and Value-Based Care. *J Appl Lab Med*. 1 janv 2019;3(4):686- 97.
38. del Pozo JL. Stewardship in sepsis. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32(Suppl 2):42- 6.
39. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB, et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)a. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 août 2013;57(4):e22- 121.
40. REMIC, Référentiel en microbiologie médicale, 6ème édition 2018, Société Française de Microbiologie. Disponible sur [www.sfm-microbiologie.org](http://www.sfm-microbiologie.org).
41. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti J-J, Tattevin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Front Microbiol* [Internet]. 12 mai 2016 [cité 20 avr 2020];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4863885/>
42. Bourbeau P, Riley J, Heiter BJ, Master R, Young C, Pierson C. Use of the BacT/Alert Blood Culture System for Culture of Sterile Body Fluids Other than Blood. *J Clin Microbiol*. nov 1998;36(11):3273- 7.
43. Sanabria A, Røkeberg MEO, Johannessen M, Sollid JE, Simonsen GS, Hanssen A-M. Culturing periprosthetic tissue in BacT/Alert® Virtuo blood culture system leads to improved and faster detection of prosthetic joint infections. *BMC Infect Dis* [Internet]. 10 juill 2019 [cité 20 avr 2020];19. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6621959/>
44. Villanova O, Dubois D, Sapin F, Lang S, Debard A, Lelièvre L, et al. Amélioration des modalités de prélèvement des hémocultures aéro-anaérobies au sein d'un service de maladies infectieuses. *Médecine Mal Infect*. 1 juin 2017;47(4, Supplement):S154.

45. Kerremans JJ, van der Bij AK, Goessens W, Verbrugh HA, Vos MC. Immediate Incubation of Blood Cultures Outside Routine Laboratory Hours of Operation Accelerates Antibiotic Switching. *J Clin Microbiol.* nov 2009;47(11):3520- 3.
46. Sjöberg B. Oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène: l'importance de l'environnement protéique. :168.
47. Koeck J-L, Trueba F, Chakour M. Les hémocultures en 2001. *Rev Fr Lab.* sept 2001;Volume 2001(Issue 335):43- 7.
48. Flayhart D, Borek AP, Wakefield T, Dick J, Carroll KC. Comparison of BACTEC PLUS Blood Culture Media to BacT/Alert FA Blood Culture Media for Detection of Bacterial Pathogens in Samples Containing Therapeutic Levels of Antibiotics. *J Clin Microbiol.* mars 2007;45(3):816- 21.
49. Menchinelli G, Liotti FM, Fiori B, De Angelis G, D'Inzeo T, Giordano L, et al. In vitro Evaluation of BACT/ALERT® VIRTUO®, BACT/ALERT 3D®, and BACTEC™ FX Automated Blood Culture Systems for Detection of Microbial Pathogens Using Simulated Human Blood Samples. *Front Microbiol.* 19 févr 2019;10:221.
50. Thorpe TC, Wilson ML, Turner JE, DiGuseppi JL, Willert M, Mirrett S, et al. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J Clin Microbiol.* 1990;28(7):1608- 12.
51. Jacobs MR, Mazzulli T, Hazen KC, Good CE, Abdelhamed AM, Lo P, et al. Multicenter Clinical Evaluation of BacT/Alert Virtuo Blood Culture System. Bourbeau P, éditeur. *J Clin Microbiol.* août 2017;55(8):2413- 21.
52. Hitzenbichler F, Simon M, Salzberger B, Hanses F. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis* blood stream isolates at a tertiary care hospital. *Infection.* avr 2017;45(2):179- 86.
53. Beekmann SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern GV. Effects of Rapid Detection of Bloodstream Infections on Length of Hospitalization and Hospital Charges. *J Clin Microbiol.* juill 2003;41(7):3119- 25.
54. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1 mai 2010;48(5):1584- 91.
55. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 1 mars 2012;36(2):380- 407.
56. Curtoni A, Cipriani R, Marra ES, Barbui AM, Cavallo R, Costa C. Rapid Identification of Microorganisms from Positive Blood Culture by MALDI-TOF MS After Short-Term Incubation on Solid Medium. *Curr Microbiol.* janv 2017;74(1):97- 102.
57. Anantharajah A, Tossens B, Olive N, Kabamba-Mukadi B, Rodriguez-Villalobos H, Verroken A. Performance Evaluation of the MBT STAR®-Carba IVD Assay for the Detection of Carbapenemases With MALDI-TOF MS. *Front Microbiol* [Internet]. 20 juin 2019 [cité 16 juin 2020];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6596351/>
58. Peker N, Couto N, Sinha B, Rossen JW. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clin Microbiol Infect.* 1 sept 2018;24(9):944- 55.

59. Lutgring JD, Bittencourt C, McElvania TeKippe E, Cavuoti D, Hollaway R, Burd EM. Evaluation of the Accelerate Pheno System: Results from Two Academic Medical Centers. *J Clin Microbiol* [Internet]. 26 mars 2018 [cité 11 juin 2020];56(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869849/>
60. Schmitz JE, Tang Y-W. The GenMark ePlex®: another weapon in the syndromic arsenal for infection diagnosis. *Future Microbiol.* déc 2018;13(16):1697- 708.
61. Nijhuis RHT, Guerendiain D, Claas ECJ, Templeton KE. Comparison of ePlex Respiratory Pathogen Panel with Laboratory-Developed Real-Time PCR Assays for Detection of Respiratory Pathogens. *J Clin Microbiol.* 1 juin 2017;55(6):1938- 45.
62. Bhatti MM, Boonlayangoor S, Beavis KG, Tesic V. Evaluation of FilmArray and Verigene Systems for Rapid Identification of Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* sept 2014;52(9):3433- 6.
63. De Angelis G, Posteraro B, De Carolis E, Menchinelli G, Franceschi F, Tumbarello M, et al. T2Bacteria magnetic resonance assay for the rapid detection of ESKAPEc pathogens directly in whole blood. *J Antimicrob Chemother.* 1 mars 2018;73(suppl\_4):iv20- 6.
64. Nguyen MH, Clancy CJ, Pasculle AW, Pappas PG, Alangaden G, Pankey GA, et al. Performance of the T2Bacteria Panel for Diagnosing Bloodstream Infections. *Ann Intern Med.* 14 mai 2019;170(12):845- 52.
65. Jehl F, Chabaud A, Grillon A. L'antibiogramme : diamètres ou CMI ? *J Anti-Infect.* déc 2015;17(4):125- 39.
66. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing, Version 8.0 (January 2020). Disponible sur [www.eucast.org](http://www.eucast.org).
67. Dauwalder O, Vandenesch F. Disc diffusion AST automation: one of the last pieces missing for full microbiology laboratory automation. *Clin Microbiol Infect.* janv 2020;S1198743X2030046X.
68. Quentin-Noury C. Automatisation de l'antibiogramme au laboratoire de bactériologie. *Rev Francoph Lab.* mai 2016;2016(482):49- 59.
69. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin Infect Dis.* 1 déc 2009;49(11):1749- 55.
70. Jehl F, Chomar M, Tankovic J, Gérard A. De l'antibiogramme à la prescription. Edition Biomérieux. 3ème édition, Octobre 2012.
71. Jehl F, Levêque D. Perfusion continue des bêta-lactamines : intérêts, inconvénients, modalités pratiques. *Réanimation.* juin 2009;18(4):343- 52.
72. Mouton JW, Brown DFJ, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clin Microbiol Infect.* 1 mars 2012;18(3):E37- 45.
73. Jolyguillou M. Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation.* juin 2006;15(3):237- 40.
74. Phe K, Heil EL, Tam VH. Optimizing Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of Antimicrobial Management in Patients with Sepsis: A Review. *J Infect Dis.* 21 juill 2020;222(Supplement\_2):S132- 41.

75. Yılmaz Ç, Özcengiz G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochem Pharmacol.* 1 juin 2017;133:43- 62.
76. Craig WA, Andes DR. In Vivo Pharmacodynamics of Ceftobiprole against Multiple Bacterial Pathogens in Murine Thigh and Lung Infection Models. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2008;52(10):3492- 6.
77. Wong G, Sime FB, Lipman J, Roberts JA. How do we use therapeutic drug monitoring to improve outcomes from severe infections in critically ill patients? *BMC Infect Dis.* déc 2014;14(1):288.
78. Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Indices of Antibiotics Predicted by a Semimechanistic PKPD Model: a Step toward Model-Based Dose Optimization<sup>▽</sup>. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2011;55(10):4619- 30.
79. Roberts JA, Kirkpatrick CMJ, Lipman J. Monte Carlo simulations: maximizing antibiotic pharmacokinetic data to optimize clinical practice for critically ill patients. *J Antimicrob Chemother.* 1 févr 2011;66(2):227- 31.
80. Trang M, Dudley MN, Bhavnani SM. Use of Monte Carlo simulation and considerations for PK-PD targets to support antibacterial dose selection. *Curr Opin Pharmacol.* 1 oct 2017;36:107- 13.
81. Cavallo J-D, Mérens A. Spectre d'activité antibactérien d'un antibiotique et catégorisation clinique. *Pathol Biol.* juill 2008;56(5):300- 4.
82. Paterson DL, Ko W-C, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, et al. Outcome of Cephalosporin Treatment for Serious Infections Due to Apparently Susceptible Organisms Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol.* juin 2001;39(6):2206- 12.
83. Lee N-Y, Lee C-C, Huang W-H, Tsui K-C, Hsueh P-R, Ko W-C. Cefepime Therapy for Monomicrobial Bacteremia Caused by Cefepime-Susceptible Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: MIC Matters. *Clin Infect Dis.* 15 févr 2013;56(4):488- 95.
84. Patel TS, Nagel JL. Clinical Outcomes of Enterobacteriaceae Infections Stratified by Carbapenem MICs. *J Clin Microbiol.* janv 2015;53(1):201- 5.
85. Rybak MJ, Lomaestro BM, Rotschahfer JC, Moellering RC, Craig WA, Billeter M, et al. Vancomycin Therapeutic Guidelines: A Summary of Consensus Recommendations from the Infectious Diseases Society of America, the American Society of Health-System Pharmacists, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Clin Infect Dis.* 1 août 2009;49(3):325- 7.
86. Cattoir L, Coorevits L, Leroux-Roels I, Claeys G, Verhasselt B, Boelens J. Improving timelines in reporting results from positive blood cultures: simulation of impact of rapid identification on therapy on a real-life cohort. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* déc 2018;37(12):2253- 60.
87. Garnacho-Montero J, Gutiérrez-Pizarra A, Escosca-Ortega A, Corcia-Palomo Y, Fernández-Delgado E, Herrera-Melero I, et al. De-escalation of empirical therapy is associated with lower mortality in patients with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 1 janv 2014;40(1):32- 40.
88. Jonasson E, Matuschek E, Kahlmeter G. The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. *J Antimicrob Chemother.* 1 avr 2020;75(4):968- 78.

89. Campigotto A, Goneau L, Matukas LM. Direct identification and antimicrobial susceptibility testing of microorganisms from positive blood cultures following isolation by lysis-centrifugation. *Diagn Microbiol Infect Dis.* nov 2018;92(3):189- 93.
90. Hogan C, Watz N, Budvytiene I, Banaei N. Rapid antimicrobial susceptibility testing by VITEK®2 directly from blood cultures in patients with Gram-negative rod bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* juin 2019;94(2):116- 21.
91. Porte L, Gattini F, Varela C, Weitzel T. Evaluation of antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood cultures using the Vitek 2 system: comparison of two rapid protocols. *Rev Chil Infectol.* avr 2017;34(2):190- 1.
92. Bianco G, Iannaccone M, Boattini M, Cavallo R, Costa C. Assessment of rapid direct E-test on positive blood culture for same-day antimicrobial susceptibility. *Braz J Microbiol.* oct 2019;50(4):953- 9.
93. 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. *J Antimicrob Chemother.* 1 oct 2019;74(10):3063- 8.
94. 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. *Diagn Microbiol Infect Dis.* janv 2019;93(1):14- 21.
95. Perillaud C, Pilmis B, Diep J, Perreau S, Ruffier d'Epenoux L, Reissier S, et al. Antibiogramme rapide en milieu solide sur milieu MHR (i2a) à partir du flacon d'hémoculture. *Médecine Mal Infect.* juin 2017;47(4):S53- 4.
96. Lamy B, Ferroni A, Henning C, Cattoen C, Laudat P. How to: accreditation of blood cultures' proceedings. A clinical microbiology approach for adding value to patient care. *Clin Microbiol Infect.* 1 sept 2018;24(9):956- 63.
97. QUAMIC, Qualité en microbiologie médicale, 2ème édition 2019, Société Française de Microbiologie. Disponible sur [www.sfm-microbiologie.org](http://www.sfm-microbiologie.org).
98. Laudat P, Galinier J-L, Cattoen C, Ferroni A, Lamy B, Courcol R. L'accréditation en bactériologie : enjeux, difficultés et particularités. *Rev Francoph Lab.* 1 avr 2014;2014(461):25- 30.
99. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE Document SH GTA 04 Révision 01.
100. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th Edition. CLSI document M100-S23. CLSI, 2013.
101. Bobenchik AM, Hindler JA, Giltner CL, Saeki S, Humphries RM. Performance of Vitek 2 for Antimicrobial Susceptibility Testing of Staphylococcus spp. and Enterococcus spp. *J Clin Microbiol.* févr 2014;52(2):392- 7.
102. Noussair L, Nicolas-Chanoine M-H. Mesure de la sensibilité aux antibiotiques selon les conditions standards directement à partir de liquides biologiques infectés et d'hémocultures positives. *Pathol Biol.* 1 avr 2007;55(3):143- 8.



# ANNEXES

## Annexe 1 : Contenu des cartes AST-N233

Antibiotique	Concentration*	Plage couverte	
		≤	≥
Amikacine	8, 16, 64	2	64
Amoxicilline/Acide clavulanique	4/2, 16/8, 32/16	2/1	32/16
Ampicilline	4, 8, 32	2	32
Céfalotine	2, 8, 32	2	64
Céfotaxime	1, 4, 16, 32	1	64
Céfoxitine	8, 16, 32	4	64
Ceftazidime	1, 2, 8, 32	0.25	4
Ciprofloxacine	0.5, 1, 6	0.5	8
Gentamicine	4, 16, 32	1	16
Imipénème	1, 2, 6, 12	0.25	16
Acide nalidixique	8, 16, 32	2	32
Nitrofurantoïne	16, 32, 64	16	512
Ofloxacine	0.5, 1, 4	0.25	8
Pipéracilline/Tazobactam	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8	4/4	128/4
Ticarcilline	16, 32, 64	8	128
Tobramycine	8, 16, 64	1	16
Triméthoprime/sulfaméthoxazole	1/19, 4/76, 16/304	20 (1/19)	320 (16/304)

\*Concentration de méthode standard équivalente par efficacité.

## Annexe 2 : Contenu des cartes AST-XN05

Antibiotique	Concentration*	Plage couverte	
		≤	≥
Ampicilline/Sulbactam	4, 16, 32	2	32
Aztréonam	2, 8, 32	1	64
Céfépime	2, 8, 16, 32	1	64
Céfixime	0.25, 1, 2	0.25	4
Ceftriaxone	1, 2, 8, 32	1	64
Céfuroxime	2, 8, 32	1	64
Chloramphénicol	4, 16, 32	2	64
Colistine	4, 16, 32	0.5	16
BLSE	FEP 1, CTX 0.5, CAZ 0.5, FEP/CA 1/10, CTX/CA 0.5/4, CAZ/CA 0.5/4	NEG	POS
Lévofloxacine	0.25, 0.5, 2, 8	0.12	8
Méropénème	0.5, 2, 6, 12	0.25	16
Minocycline	2, 4, 8	1	16
Moxifloxacine	0.25, 1, 4	0.25	8
Pipéracilline	4, 16, 32, 64	4	128

<b>Antibiotique</b>	<b>Concentration*</b>	<b>Plage couverte ≤</b>	<b>Plage couverte ≥</b>
Tétracycline	2, 4, 8	1	16
Ticarcilline/Acide clavulanique	8/2, 32/2, 64/2	8/2	128/2
Tigécycline	0.75, 2, 4	0.5	8
Triméthoprim	0.5, 2, 8	0.5	16

\*Concentration de méthode standard équivalente par efficacité.

### Annexe 3 : Contenu des cartes AST-P631

<b>Antibiotique</b>	<b>Concentration*</b>	<b>Plage couverte ≤</b>	<b>Plage couverte ≥</b>
Benzylpénicilline	0.125, 0.25, 1	0.03	0.5
Céfoxitine (dépistage)	6	NEG	POS
Erythromycine	1, 2, 4, 8	0.25	8
Fosfomycine	8, 32	8	128
Acide fusidique	0.5, 1, 4	0.5	32
Gentamicine	8, 16, 64	0.5	16
Résistance inductible à la clindamycine	CM 0.5, CM/E 0.25/0.5	NEG	POS
Kanamycine	32, 64, 128	4	64
Lincomycine	2, 4, 16	1	16
Linézolide	0.5, 1, 2	0.5	8
Nitrofurantoïne	16, 32, 64	16	512
Ofloxacine	0.5, 2, 4	0.5	8
Oxacilline	0.5, 1, 2	0.25	4
Pristinamycine	0.25, 1, 2	0.5	8
Rifampicine	0.015, 0.03, 0.125, 0.5	0.03	4
Teicoplanine	1, 4, 8, 16	0.5	32
Tétracycline	0.5, 1, 2	1	16
Tobramycine	16, 32, 64	1	16
Triméthoprim/Sulfaméthoxazole	2/38, 8/152, 16/304	10(0.5/9.5)	320(16/304)
Vancomycine	1, 2, 4, 8, 16	0.5	32

\*Concentration de méthode standard équivalente par efficacité.

**Annexe 4 : Contenu des cartes AST-P606**

Antibiotique	Concentration*	Plage couverte	
		≤	≥
Ampicilline <i>Enterococcus</i> spp. <i>S. agalactiae</i>	0.5, 4, 8, 32	- 2 0.25	- 32 16
Benzylpénicilline	0.125, 0.25, 1, 2, 8, 64	0.12	64
Chloramphénicol	0.125, 0.25, 1, 2, 8, 64	0.12	64
Clindamycine	0.5, 1, 2	0.25	8
Erythromycine	1, 2, 4, 8	0.25	8
Gentamicine à forte concentration (synergie)	500	S	R
Kanamycine à forte concentration (synergie)	200	S	R
Lévoﬂoxacine	0.25, 2, 8	0.12	8
Linézolide	0.5, 1, 2	0.5	8
Moxiﬂoxacine	0.25, 2, 8	0.25	8
Nitrofurantoïne	0.25, 2, 8	16	512
Quinupristine/Dalfopristine	0.25, 0.5, 2	0.25	16
Streptomycine à forte concentration (synergie)	1000	S	R
Teicoplanine	1, 4, 8, 16	0.5	32
Tétracycline	0.5, 1, 2	1	16
Triméthoprime/Sulfaméthoxazole	8/152, 16/304, 32/608	10(0.5/9.5)	320(16/304)
Vancomycine	1, 2, 4, 8, 16	0.5	32

\*Concentration de méthode standard équivalente par efficacité.



**DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE**

Nom et Prénom de l'étudiant : CHARLEY Guillaume INE : 09020062200

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 13 / 10 / 2020 à 18 h 15 Amphithéâtre ou salle : Pauling

Engagement de l'étudiant - Charte de non-plagiat

J'atteste sur l'honneur que tout contenu qui n'est pas explicitement présenté comme une citation est un contenu personnel et original.

Signature de l'étudiant :

Avis du directeur de thèse

Nom : CATTOLIN

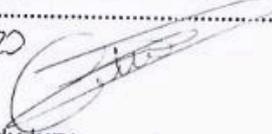
Prénom : Christian

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable : .....

Date : 13/08/2020

Signature: 

Avis du président du jury

Nom : Anne GOFFARD

Prénom : .....

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable : .....

Date : 17/09/2020

Signature: 

Décision du Doyen

Favorable

Défavorable



18/09/2020

Le Doyen

  
B. DÉCAUDIN

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.



Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)  
Année Universitaire 2019/2020

**Nom : CHARLET**  
**Prénom : Guillaume**

**Titre du mémoire / thèse :**

**Réalisation de l'antibiogramme direct en milieu liquide automatisé Vitek® 2 à partir des bouillons d'hémocultures positifs : étude multicentrique**

**Mots-clés :**

Bactériémies, Hémocultures, Antibiogramme direct, Antibiogramme en milieu liquide, Vitek® 2

---

**Résumé :**

Une bactériémie résulte de la diffusion hémotogène de micro-organismes. Les bactériémies sont responsables de 40% des chocs septiques et leur incidence est estimée à 166-189 cas pour 100 000 habitants en Europe avec un taux de mortalité important (33-35%). Leur prise en charge rapide et sans délai est primordiale. Un retard d'instauration d'un traitement adapté met en jeu la survie du patient. Le prélèvement d'échantillon sanguin mis en bouillon de culture appelé « hémoculture » est l'examen clef permettant d'isoler le micro-organisme pathogène. L'hémoculture permet l'identification et la détermination du profil de sensibilité aux anti-infectieux à partir du bouillon positif.

Le but de ce travail est d'adapter la réalisation de l'antibiogramme à partir du bouillon d'hémoculture positif au milieu liquide automatisé Vitek® 2. Cette étude apporte des données et complète les études préliminaires sur le sujet. Les résultats de la technique à tester réalisée à partir du bouillon, en comparaison avec la méthode « référente » réalisée à partir de colonies montrent globalement une bonne concordance catégorielle (96,8%), y compris à +/- 1 dilution de CMI (95,8%), ce qui est conforme aux critères de la FDA (>90%).

---

**Membres du jury :**

**Présidente :** Madame le Professeur Anne GOFFARD

**Assesseurs :** Monsieur le Professeur Boualem SENDID  
Madame le Docteur Anne-Cécile HOCHART  
Monsieur le Docteur Frédéric WALLET

**Directeur de thèse :** Monsieur le Docteur Christian CATTOEN