

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 18 juin 2025
Par Mme LUCAS Angèle**

**Améliorer le rendu des résultats des bactériémies et la prise en charge du
sepsis : quels outils en 2025 ?**

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur FOLIGNÉ Benoît
Professeur des Universités, Université de Lille

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur BLONDIAUX Nicolas
Pharmacien Praticien des hôpitaux, GHICL

Assesseurs : Monsieur le Docteur PATOZ Pierre
Pharmacien Praticien Hospitalier, CH de Tourcoing

Monsieur le Docteur WEYRICH Pierre
Médecin Praticien des hôpitaux, GHICL

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie Document transversal	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024 Page 3/13

Université de Lille

Président
 Premier Vice-président
 Vice-présidente Formation
 Vice-président Recherche
 Vice-président Ressources Humaine
 Directrice Générale des Services

Régis BORDET
 Bertrand DÉCAUDIN
 Corinne ROBACZEWSKI
 Olivier COLOT
 Jean-Philippe TRICOIT
 Anne-Valérie CHIRIS-FABRE

UFR35

Doyen
 Premier Vice-Doyen, Vice-Doyen RH, SI et Qualité
 Vice-Doyenne Recherche
 Vice-Doyen Finances et Patrimoine
 Vice-Doyen International
 Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
 Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
 Vice-Doyen Territoire-Partenariats
 Vice-Doyen Santé numérique et Communication
 Vice-Doyenne Vie de Campus
 Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
 Hervé HUBERT
 Karine FAURE
 Emmanuelle LIPKA
 Vincent DERAMECOURT
 Sébastien D'HARANCY
 Caroline LANIER
 Thomas MORGENROTH
 Vincent SOBANSKI
 Anne-Laure BARBOTIN
 Victor HELENA

Faculté de Pharmacie

Vice - Doyen
 Premier Assesseur et
 Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
 Assesseur à la Vie de la Faculté et
 Assesseur aux Ressources et Personnels
 Responsable de l'Administration et du Pilotage
 Représentant étudiant
 Chargé de mission 1er cycle
 Chargée de mission 2eme cycle
 Chargé de mission Accompagnement et Formation à la Recherche
 Chargé de mission Relations Internationales
 Chargée de Mission Qualité
 Chargé de mission dossier HCERES

Pascal ODOU

 Anne GARAT

 Emmanuelle LIPKA
 Cyrille PORTA
 Honoré GUISE
 Philippe GERVOIS
 Héloïse HENRY
 Nicolas WILLAND
 Christophe FURMAN
 Marie-Françoise ODOU
 Réjane LESTRELIN

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024
Document transversal		Page 4/13

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BERLARBI	Karim	Physiologie	86
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024
Document transversal		Page 5/13

M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bio inorganique	85
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024
Document transversal		Page 6/13

Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	GILLIOT	Sixtine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024
Document transversal		Page 7/13

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BEDART	Corentin	ICPAL	86
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
Mme	BOU KARROUM	Nour	Chimie bioinorganique	
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FRULEUX	Alexandre	Sciences végétales et fongiques	
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024
Document transversal		Page 8/13

M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	LIBERELLE	Maxime	Biophysique - RMN	
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
M.	MENETREY	Quentin	Bactériologie - Virologie	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024
Document transversal		Page 9/13

Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	ROGEL	Anne	Immunologie	
M.	ROSA	Mickaël	Hématologie	87
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mme	KUBIK	Laurence	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024
Document transversal		Page 10/13

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BAILLY	Christian	ICPAL	86
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M	AYED	Elya	Pharmacie officinale	
M.	COUSEIN	Etienne	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
Mme	DANICOURT	Frédérique	Pharmacie officinale	
Mme	DUPIRE	Fanny	Pharmacie officinale	
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
Mme	GEILER	Isabelle	Pharmacie officinale	
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M	POTHIER	Jean-Claude	Pharmacie officinale	
Mme	ROGNON	Carole	Pharmacie officinale	

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024
Document transversal		Page 11/13

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BOUDRY	Augustin	Biomathématiques	
Mme	DERAMOUDT	Laure	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	GISH	Alexandr	Toxicologie et Santé publique	
Mme	NEGRIER	Laura	Chimie analytique	

Hospitalo-Universitaire (PHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DESVAGES	Maximilien	Hématologie	
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	BERNARD	Lucie	Physiologie	
Mme	BARBIER	Emeline	Toxicologie	
Mme	COMPAGNE	Nina	Chimie Organique	
Mme	COULON	Audrey	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	DUFOSSEZ	Robin	Chimie physique	
Mme	FERRY	Lise	Biochimie	
M	HASYEOUI	Mohamed	Chimie Organique	

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024
Document transversal		Page 12/13

Mme	HENRY	Doriane	Biochimie	
Mme	KOUAGOU	Yolène	Sciences végétales et fongiques	
M	LAURENT	Arthur	Chimie-Physique	
M.	MACKIN MOHAMOUR	Synthia	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	RAAB	Sadia	Physiologie	

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	DELOBEAU	Iris	Pharmacie officinale
M	RIVART	Simon	Pharmacie officinale
Mme	SERGEANT	Sophie	Pharmacie officinale
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

LRU / MAST

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FRAPPE	Jade	Pharmacie officinale
M	LATRON-FREMEAU	Pierre-Manuel	Pharmacie officinale
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique

	LISTE GEREE	LG/FAC/001
Département Pharmacie Document transversal	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2024-2025	Version 2.3 Applicable au 02/12/2024 Page 13/13

CYCLE DE VIE DU DOCUMENT

Version	Modifié par	Date	Principales modifications
1.0		20/02/2020	Création
2.0		02/01/2022	Mise à jour
2.1		21/06/2022	Mise à jour
2.2		01/02/2024	Mise à jour
2.3		15/11/2024	Mise à jour
2.4		18/02/2025	Mise à jour



UFR3S-Pharmacie

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

Remerciements

A mon président de jury,

Monsieur le Professeur Benoit FOLIGNÉ,
*Professeur des Universités
Laboratoire de Bactériologie, Faculté de pharmacie de l'Université de Lille*

Je souhaite vous exprimer ma profonde gratitude pour avoir accepté la présidence de mon jury de thèse et pour l'attention que vous portez à l'évaluation de ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A mes assesseurs,

Monsieur le Docteur Pierre PATOZ,
*Praticien Hospitalier – Biologiste médical
Centre hospitalier de Tourcoing*

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de faire partie de ce jury, d'évaluer mon travail et de partager votre expertise de microbiologiste. Votre accompagnement durant mon tout premier stage d'internat a été une étape clé dans mon parcours. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Pierre WEYRICH,
*Praticien des Hôpitaux – Equipe transversale d'infectiologie
Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille*

Je tiens à vous adresser mes plus sincères remerciements pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'évaluer mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Nicolas BLONDIAUX,
*Praticien des Hôpitaux – Biologiste médical
Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille*

Je suis très honorée que tu aies accepté d'encadrer mon travail de thèse, et ce sans trop d'hésitations. Tes cours à la faculté de pharmacie, puis ton accompagnement lors de mon stage de bactériologie à Tourcoing ont grandement éveillé mon intérêt, et mon amour, pour la microbiologie. Tes conseils avisés, ta bienveillance et ta disponibilité m'ont permis d'avancer avec confiance tout au long de ce travail. J'espère un jour exercer mon métier avec autant de passion et d'intelligence que toi.

Je tiens à dire un grand merci à **tous les biologistes** avec lesquels j'ai travaillé au fil des stages. J'ai tiré des apprentissages de vous tous. **Pauline**, merci pour ta bienveillance à toute épreuve. Ta conscienciosité est un exemple pour moi. **Aurélie**, merci pour tes précieux enseignements qualité. Tous les biologistes de Parasito-Myco, merci pour votre encadrement au quotidien, j'apprends beaucoup à vos côtés. Un mot particulier pour **Camille**, merci pour tes compliments sur mes chaussettes et mes pâtisseries. C'est trop cool de partager ton bureau.

Je remercie aussi énormément **les techniciens** que j'ai croisé sur mon chemin. **L'équipe de Seclin**, vous m'avez accueilli avec bienveillance alors que je n'étais encore qu'un bébé interne. La **fine équipe de BM**, merci pour la rigolade et la multitude de blind-test au soleil, je vous adore et j'espère qu'on ne se perdra pas de vue. La **team myco/parasito** merci pour la bonne ambiance au travail, Angelita (à lire avec l'accent hispanique) est super reconnaissante de travailler avec des techniciens aussi investis et bienveillants que vous.

" Apprendre, partager, tant qu'y a de l'échange, y'a de l'espoir "
Grand Corps Malade

Je dédie ce travail,

A ma famille,

A mes parents, merci pour votre amour et votre soutien indéfectible depuis toujours et pendant ces longues années d'études. Cette réussite est avant tout la vôtre. **Maman**, juste merci pour tout. Tu es mon modèle. Merci pour l'amour du grand air, de la cuisine et des concerts. Merci pour les innombrables cartes postales, qui me rappelle que tu n'es jamais loin. **Papa**, merci pour cet amour des sciences, du bricolage et de la musique. Je peux toujours compter sur toi, depuis mes "compte est bon" à l'école primaire jusqu'à mon plan de salle de bain trop petite, t'as toujours été là... un peu comme un super-héros, mais avec un mètre ruban et une calculatrice. Je vous aime.

A mon grand frère Hugo, merci pour nos si nombreux souvenirs heureux. Je nous en souhaite encore plein, que ce soit autour du monde ou bien planqués sous un plaid à hurler sur Bowser (ps : je l'écris ici pour ne plus avoir le choix, un jour on court un semi-marathon ensemble).

A mes papi/mamie, parrain/marraine, tonton/tata, cousin/cousine, merci pour tous nos moments de vie, les fêtes de famille et les vacances. Vous m'avez construite. **Papi titi**, j'aurai aimé avoir ton traditionnel sms « t'es la plus forte, bisous câlins ma chérie, papi qui T'aime ». J'espère te rendre fier.

Aux copains pharma, ces années n'auraient pas été les mêmes sans vous.

À **Emma**, mon binôme tout au long de ces études. Le hasard du tutorat nous a liées, et depuis, on ne s'est plus quittées... Merci de m'avoir toujours suivie (et surtout soutenue) dans mes bêtises. De nos longues heures à la BU (et à la BU virtuelle, alias Messenger), à l'organisation d'une Revue Pharma (et pas des moindres !), en passant par nos lubies créatives et nos voyages... On termine enfin bientôt cette aventure des études. Merci infiniment d'avoir relu ces longues pages. Je te souhaite un avenir radieux ; je n'ai aucun doute que tu sauras trouver ta place dans ce grand monde.

A **Eléonore**, tu m'as initié aux longues soirées rue Masséna, à la corpo et à la fal' (meilleure marraine <3). Je me souviendrai toujours des soirées en amoureux chez toi, à cuisiner des pokebowl et à refaire le monde autour d'une bouteille de vin. On en a fait du chemin depuis, des voyages, des courses, des musées, des randonnées. Merci d'avoir toujours été là, j'espère que l'on vieillira ensemble, avec nos amoureux et nos chats (smiley petit singe non imprimable).

A **Eva**, merci pour ton écoute, tu es toujours là quand il le faut. Tu fais cohabiter une âme d'enfant que j'adore avec une maturité d'adulte que j'admire. Je suis contente de me cultiver

à tes côtés grâce à nos innombrables séances de cinéma (plus ou moins rigolotes) et expos. Je suis heureuse d'avoir découvert avec **Quentin** et toi qu'un film le samedi matin, avec un entracte et un café, ça ne faisait pas de nous des quadragénaires. J'espère qu'on découvrira encore plein de choses ensemble !

A **Juliette**, merci pour ton soutien tout au long de ces années de fac. Tes petits biscuits et gâteaux faits maison tombaient toujours à pic. Ton amitié m'est très précieuse. J'espère qu'on continuera à se partager nos patrons et nos recettes toute la vie.

Et à toutes les chouettes personnes que j'ai rencontré dans les couloirs de la fac, surtout grâce à la corpo, merci <3

Aux copains de l'internat,

A **la team du PTI**, on a beaucoup ri enfermés entre ces 4 murs. A **Emeline**, on en a fait du chemin depuis nos premiers TP en pharma, nos séances à Basic Fit et nos covoiturages. Je me souviendrai toujours avec le sourire des moments passés ensemble. A **Fabien**, tu es ma rencontre préférée de l'internat. Merci pour ton écoute toujours sans jugement. Tu m'as beaucoup aidé, fait réfléchir et avancer. J'espère que l'on continuera encore longtemps à se partager de la musique et à faire des concerts ensemble !

A **l'équipe Valenciennoise, Khalil, Manon, Maeva, Julien, Pauline et Mehdi**, merci d'avoir rendu nos 6 mois dans les contrées du Hainaut plus doux avec votre humour et votre sagesse.

A la team de choc, **Pauline, Charlotte, Anne-Claire et Sophie**, j'ai découvert avec vous qu'on pouvait travailler en passant nos journées à se raconter les derniers potins. Les stages avec vous ont été super chouette, je vous souhaite le meilleur.

Julien, Pauline J, Chloé, Thomas, Clara et Mehdi je suis heureuse de vous avoir croisé au fil des stages de microbiologie. On aura bien appris et bien ri.

A tous les internes avec qui je n'ai pas eu la chance de partager un stage, mais que j'ai croisé en garde, avec qui j'ai rigolé au self ou au soleil le midi ou passé des super soirées... merci à tous pour cet internat plus que chouette.

A mon amour, **Thomas**, merci pour ta patience, la tendresse et surtout les fous rires que je ne compte plus. Avec toi, j'ai appris qu'on peut avoir les neurones qui vont à mille à l'heure et quand même appuyer sur pause de temps en temps, sans que le monde s'écroule. Merci de m'apprendre à respirer un peu. Je suis fan de notre vie avec nos 2 amours de chat <3. Je nous souhaite plein de problèmes et de soucis à venir (private joke pour les curieux). Je t'aime.

Et enfin et plus que tout à mon étoile, **ma petite sœur Anouk**, quand t'étais petite tu t'amusais tout le temps avec les insectes dans le jardin, finalement c'est peut-être toi qui m'as donné le goût des petites bêtes. Maintenant je traque les microbes en blouse blanche au lieu des scarabées dans la montagne. Si tu savais comme j'aimerais que ta petite bouille soit là, dans l'amphi ce soir. J'essaie de profiter à fond de cette vie, pour toi. Tu me manques tant.

" *Hakuna Matata* "
Timon et Pumba

Tables des matières

Remerciements	17
Tables des matières	21
Table des figures	23
Table des tableaux	24
Liste des abréviations	25
I. Généralités sur le sepsis.....	26
A. Définitions et physiopathologie.....	26
B. Épidémiologie.....	28
B.1. Sepsis.....	28
B.1.a. A l'échelle mondiale.....	28
B.1.b. A l'échelle nationale.....	31
B.2. Bactériémies.....	32
B.3. Agents pathogènes et portes d'entrée	33
C. Diagnostic	35
C.1. Clinique.....	35
C.2. Biologique.....	38
C.2.a. Biomarqueurs	38
C.2.b. Microbiologie	39
C.2.b.i. Pré-analytique	39
C.2.b.ii. Analytique.....	44
C.2.b.iii. Post-analytique	48
D. Prise en charge thérapeutique	50
D.1. Prise en charge du choc.....	50
D.2. Traitement anti-infectieux	51
D.2.a. Recommandations générales.....	51
D.2.b. Choix de l'antibiothérapie	53
D.2.c. Traitement de la porte d'entrée.....	55
II. Approches actuelles permettant d'accélérer le rendu de résultats des bactériémies	56
A. Préambule : critères d'évaluation	56
B. Tests phénotypiques	57
B.1. Spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	57
B.1.a. Identification sur culture jeune.....	57
B.1.b. Identification directe sur flacon d'hémoculture.....	58
B.1.c. Sensibilité aux antibiotiques	60

B.2.	Antibiogramme direct par dilution	62
B.3.	Microscopie en temps réel	63
B.3.a.	Accelerate Pheno®	63
B.3.b.	Autres automates	67
B.4.	Détection de composés organiques volatils.....	68
B.5.	Cytométrie en flux.....	71
B.6.	Diffusion de la lumière laser	72
B.7.	Adaptation des tests immunochromatographiques de détection de la résistance.....	74
C.	Tests génotypiques	75
C.1.	PCR multiplex.....	75
C.1.a.	BioFire® Blood Culture Identification 2 (BCID2).....	76
C.1.b.	Verigene®	78
C.1.c.	Cobas® eplex	79
C.2.	Résonance magnétique T2MR®	81
C.3.	Métagénomique	83
C.3.a.	Description générale.....	84
C.3.b.	Sepsitest™ (Molzym)	86
C.3.c.	Karius® Test.....	87
III.	Discussion	89
A.	Impacts techniques	89
B.	Impacts cliniques et organisationnels.....	92
C.	Impacts économiques	95
IV.	Conclusion et perspectives	98
	Références	99

Table des figures

Figure 1 : Physiopathologie du sepsis (4).....	27
Figure 2 : Incidence et décès liés au sepsis (10).....	29
Figure 3 : Algorithme diagnostique à conduire devant une suspicion d'infection (1)....	37
Figure 4 : Facteurs de risque de sepsis à rechercher chez les patients en amont des urgences (26)	37
Figure 5 : Flacons d'hémoculture largement utilisés en France.....	40
Figure 6 : Bonnes pratiques de prélèvement des hémocultures (Infographie bioMérieux®).....	41
Figure 7 : Systèmes analytiques d'incubation des hémocultures.....	45
Figure 8 : Aspect en coloration de Gram des bactéries principalement retrouvées dans les hémocultures (52)	46
Figure 9 : Prise en charge des hémocultures : du prélèvement au rendu complet ..	48
Figure 10 : Algorithmes d'interprétation des résultats d'hémocultures en cas de bactéries environnementales (2)	49
Figure 11 : Instauration cumulative efficace des antibiotiques après l'apparition d'une hypotension associée à un choc septique et survie associée (59)	52
Figure 12 : Recommandations sur le délai d'instauration de l'antibiothérapie (57) ..	53
Figure 13 : Protocoles techniques du Rapid Sepsityper® (a) et du Standard Sepsityper® (b) (71)	60
Figure 14 : Détection des souches d'Enterobacterales productrices de BLSE ou d'AmpC par mesure de l'hydrolyse enzymatique du céfotaxime (CTX) par spectrométrie de masse MALDI-TOF (72).....	62
Figure 15 : Panel de micro-organismes identifiés par le système Accelerate Pheno® et antibiotiques disponibles.....	64
Figure 16 : Workflow schématique du système Accelerate Pheno® pour l'identification et l'antibiogramme à partir d'hémocultures positives (77).....	65
Figure 17 : Manipulation et détermination de la CMI par le VITEK® REVEAL™ (88)68	
Figure 18 : Représentation des courbes de croissance analysées par le système Alfred 60 AST™(98)	73
Figure 19 : Panel de micro-organismes et de gènes de résistance détectés par le BioFire® BCID2	76
Figure 20 : Panel de bactéries et de gènes de résistance détectés par le Verigene®	78
Figure 21 : Panel de micro-organismes et de gènes de résistance détectés par le cobas ePlex® BCID.....	80
Figure 22 : Principe de la détection d'acides nucléiques par le système T2MR® (117)	82
Figure 23 : Principe général des techniques de métagénomique shotgun (121)	86
Figure 24 : Différentes étapes du Sepsitest™ du prélèvement au résultat d'identification (124)	87
Figure 25 : Délais de rendu des résultats des différentes techniques.....	92

Table des tableaux

Tableau 1 : Incidence du sepsis à l'hôpital : résultats d'une revue systématique de la littérature (12,13)	31
Tableau 2 : Genres et espèces bactériennes retrouvés dans les bactériémies par ordre de fréquence et mortalité associée à 30 jours (21)	34
Tableau 3 : Principales portes d'entrée et agents infectieux associés (2).....	35
Tableau 4 : Calcul du score SOFA (25)	36
Tableau 5 : Stratégies de prélèvement des hémocultures, avantages et inconvénients.....	42
Tableau 6 : Volume de sang à prélever en fonction du poids de l'enfant (43)	43
Tableau 7 : Antibiothérapie probabiliste en présence de signes de gravité (sepsis ou choc septique) (61)	54
Tableau 8 : Exemples d'antibiothérapies ciblées (61,62).....	54
Tableau 9 : Performances du rendu d'antibiogramme par le VITEK® REVEAL™ (88–91)	70
Tableau 10 : Résumé des principales caractéristiques des différentes techniques .	90

Liste des abréviations

BGN	Bacille à Gram négatif
BGP	Bacille à Gram positif
BLSE	Bêta-lactamase à spectre étendu
CGN	Cocci à Gram négatif
CGP	Cocci à Gram positif
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRP	Protéine C-réactive
CTX-M	Céfotaximase de Munich
C3G	Céphalosporine de 3 ^{ème} génération
DIV	Dispositif intravasculaire
ECBC	Examen cytbactériologique des crachats
ECBU	Examen cytbactériologique des urines
HACCEK	<i>Haemophilus</i> spp., <i>Actinobacillus</i> spp., <i>Cardiobacterium</i> spp., <i>Capnocytophaga</i> spp., <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Kingella</i> spp.
IMP	Imipénèmase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapénèmase
NDM	New Delhi métallo-β-lactamase
OXA-48	Oxacillinase-48
PAM	Pression artérielle moyenne
PCT	Procalcitonine
SCN	Staphylocoque à coagulase négative
SDI	Index socio-démographique
SSC	<i>Surviving Sepsis Campaign</i>
TDR	Test de diagnostic rapide
UFC	Unité formant colonie
USI	Unité de soins intensifs
VIM	Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase

I. Généralités sur le sepsis

A. Définitions et physiopathologie

Le sepsis est défini comme une réponse inappropriée de l'hôte envers une infection entraînant une dysfonction d'organe(s) (1). On retrouve dans cette définition deux entités, l'hôte et l'agent pathogène, qui interagissent au cours d'une infection.

L'agent pathogène peut provenir de la flore endogène de l'hôte. Il existe chez l'humain, comme chez la plupart des animaux, différentes flores, appelées plus communément microbiotes. Ils sont retrouvés au niveau des voies aériennes, du tube digestif, ou encore des voies génito-urinaires. Ces flores sont composées en majorité de bactéries, bien que l'on retrouve d'autres organismes comme des virus et des champignons. Ces germes sont peu pathogènes chez un sujet sain. A l'occasion d'un traumatisme, d'une chirurgie, d'un sondage ou encore d'une perforation d'organe, les bactéries de la flore endogène peuvent franchir les barrières naturelles de l'organisme et former un foyer infectieux.

Les agents infectieux peuvent également appartenir à la flore exogène telle que la peau, à l'environnement ou encore un matériel contaminé. De la même façon, en cas de traumatisme ou de chirurgie, il peut y avoir une effraction menant à la formation d'un foyer infectieux. Ce foyer va être le lit de la multiplication bactérienne, d'autant plus importante que l'état d'immunité du patient est faible (2).

L'hôte possède différents systèmes de réponses afin de lutter contre le foyer infectieux, limiter la dissémination du pathogène et organiser la réparation tissulaire. Les principales lignes de défense sont les barrières anatomiques, l'immunité innée ou non spécifique et l'immunité adaptative dite spécifique.

En ce qui concerne la réponse innée antibactérienne, les bactéries possèdent des motifs PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) reconnus par des récepteurs très conservés dans l'évolution, les PRR (*pattern recognition receptors*). Cette interaction entraîne une réaction inflammatoire en cascade impliquant le recrutement de cellules phagocytaires, la production de cytokines, ou encore le système du complément (Figure 1)(3). L'immunité antibactérienne repose aussi sur l'immunité adaptative qui est activée par certains motifs antigéniques reconnus par les différentes populations de lymphocytes T. Pour compenser ces mécanismes, une réponse anti-

inflammatoire se met également en place précocement. Elle est à l'origine d'une immunosuppression pouvant conduire à des infections opportunistes.

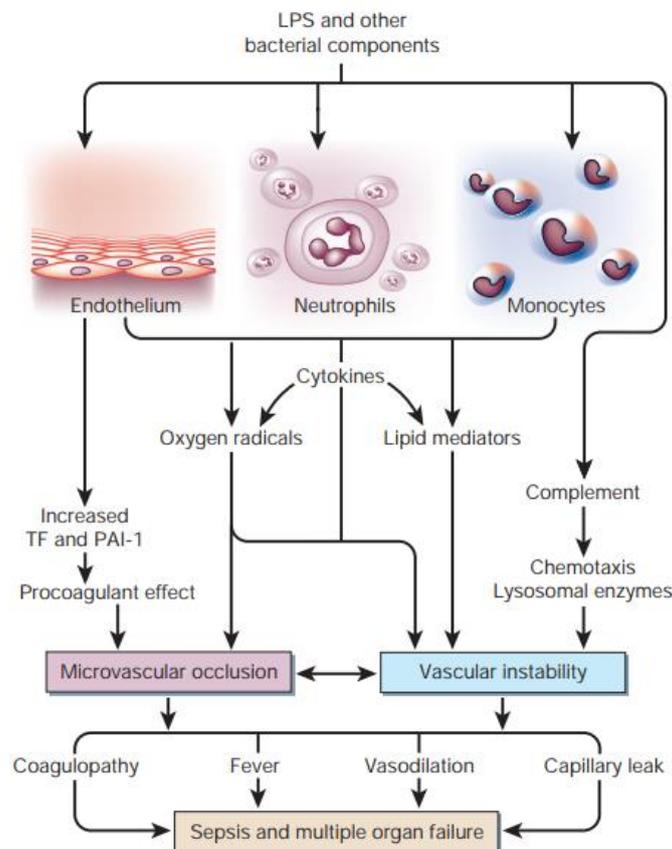


Figure 1 : Physiopathologie du sepsis (4)

Le lipopolysaccharide (LPS) et d'autres motifs microbiens activent simultanément plusieurs cascades parallèles qui contribuent à la physiopathologie du choc septique. L'association d'une mauvaise contractilité myocardique, d'un tonus vasculaire périphérique altéré et d'une occlusion microvasculaire entraîne une hypoperfusion tissulaire et une oxygénation insuffisante, conduisant ainsi aux défaillances d'organes.

Le développement des dysfonctionnements d'organes pendant le sepsis est le résultat de l'interaction complexe et évolutive entre les multiples médiateurs pro-inflammatoires et les diverses populations cellulaires (monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles), activées en réponse à l'agression initiale (5). On parle de réaction de l'hôte inappropriée ou délétère parce qu'elle est excessive, systémique, avec une perte de l'équilibre des réponses physiologiques. Le défaut d'oxygénation des tissus joue un rôle central dans l'apparition de la défaillance d'organes. Il est dû à une défaillance de la macro et de la microcirculation. Une hypovolémie relative, due à la vasoplégie majeure médiée par les cytokines, est associée à une hypovolémie vraie, due à l'hyperperméabilité capillaire et donc la fuite du plasma vers l'espace interstitiel.

Cette hypovolémie mixte entraîne une réduction du débit cardiaque. Pour pallier à cette baisse, sont mises en place une tachycardie réflexe et une redistribution des flux sanguins vers les organes jugés vitaux (cœur, cerveau) grâce à la vasoconstriction des circulations locales. Cette redistribution se fait au détriment d'autres zones, notamment cutanée (marbrure) et rénale (oligo-anurie). En outre, la dysfonction mitochondriale due au stress oxydatif perturbe la respiration cellulaire (Figure 1)(6,7).

Le choc septique est un sous ensemble du sepsis. Il a été redéfini en 2016 de sorte qu'il reflète un état grave pour lequel la mortalité est significativement augmentée (8). En pratique, il associe la présence d'un sepsis, le besoin d'amines vasopressives pour maintenir une pression artérielle moyenne (PAM) minimale de 65 mmHg, et un taux de lactates sériques supérieur à 2 mmol/L, malgré la correction d'une hypovolémie.

B. Épidémiologie

B.1. Sepsis

B.1.a. A l'échelle mondiale

Le sepsis est un enjeu majeur de santé au niveau mondial. Cependant, les études épidémiologiques concernant le sepsis sont difficilement comparables du fait de l'hétérogénéité des définitions utilisées, dans le temps et selon le lieu. La plupart des estimations reposent sur des données administratives hospitalières des pays à revenu élevé (9).

L'IHME (*Institute for Health Metrics and Evaluation*) a publié en 2020 des données basées sur les chiffres du GBD (*Global Burden Disease*) sur l'incidence et la mortalité du sepsis entre 1990 et 2017. En 2017, 48,9 millions de cas de sepsis ont été rapportés, et 11 millions de décès attribués à un sepsis, représentant près de 20 % du total des décès annuels (10). L'incidence varie considérablement d'une région à l'autre de la planète (Figure 2). En effet, 85 % des sepsis surviennent dans les pays d'index socio-démographique (SDI) moyen ou faible. Concernant l'âge, un pic est observé dans la petite enfance, puis un second chez les adultes plus âgés. Sur l'ensemble des cas, environ 70 % sont survenus chez des patients ayant une pathologie infectieuse sous-jacente.

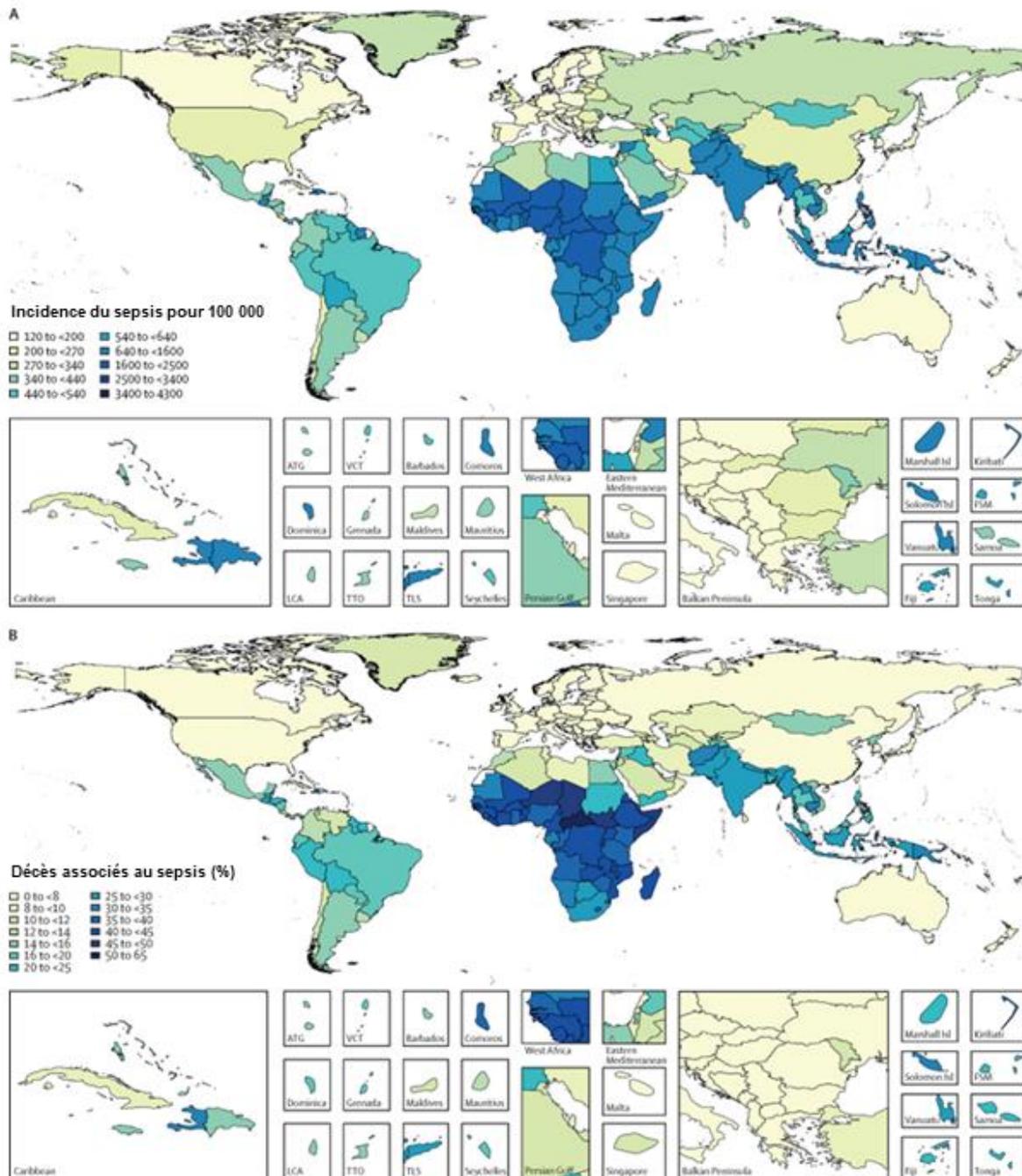


Figure 2 : Incidence et décès liés au sepsis (10)

A : Incidence du sepsis pour 100 000 habitants (normalisée selon l'âge, pour les deux sexes) en 2017) B : Pourcentage de tous les décès liés au sepsis (normalisé selon l'âge, pour les deux sexes) en 2017

La maladie diarrhéique était la cause sous-jacente au sepsis la plus fréquente, indépendamment de la région, de la période et de l'âge. Parmi les infections sous-jacentes, les infections des voies respiratoires inférieures ont le plus contribué à la mortalité par sepsis dans tous les groupes d'âge. Sur l'ensemble des décès par sepsis

en 2017, près de 50 % sont survenus chez des patients ayant une cause sous-jacente de décès non infectieuse, les plus fréquentes étant les accidents de la route et les maladies néonatales. La mortalité liée au sepsis était la plus élevée dans les régions où le SDI était le plus faible. Cette relation inversement proportionnelle avec le SDI était plus forte pour la mortalité que pour l'incidence, soulignant d'autres disparités dans la mortalité liée au sepsis (10).

Ces chiffres estimés d'incidence de l'IHME sont plus du double de ceux issus des études statistiques mondiales précédentes publiées par Fleischmann *et al.* en 2016 (11). Cette méta-analyse basée sur 27 études provenant de 7 pays suggérait des chiffres annuels de 19,4 millions de sepsis et 5,3 millions de décès attribués au sepsis. Cette différence significative est probablement due à l'intégration d'un grand nombre de données issues de pays à faible SDI où le taux d'incidence et la mortalité liée au sepsis sont nettement plus élevés, et pour lesquels les informations sont largement sous-représentées. De plus, les données d'état civil utilisées plutôt que les registres hospitaliers permettent de ne pas limiter les estimations aux patients admis à l'hôpital.

Fleischmann *et al.* ont actualisé leurs données en 2020. Fondée sur 51 études, provenant pour la plupart de pays à revenu élevé, l'incidence annuelle globale est estimée à 189 cas de sepsis chez l'adulte pour 100 000 personnes et la mortalité à 26,7 % (12). La forte variabilité de ces données (Tableau 1) peut être attribuée à des différences dans les définitions, les modèles d'études et stratégies d'inclusion, et le contexte des études. Les périodes étudiées n'étant pas toujours les mêmes, des variations dans les taux d'incidence et de mortalité au fil du temps conduisent à une disparité entre les différentes études. De plus, les estimations sont à interpréter avec prudence compte tenu de la représentation faible, voire nulle, de certaines régions.

Tableau 1 : Incidence du sepsis à l'hôpital : résultats d'une revue systématique de la littérature (12,13)

Régions de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (nombre d'études sur l'incidence du sepsis/la mortalité)	Incidence pour 100 000 habitants	Mortalité (%)
Sepsis à l'hôpital		
Toutes régions (28/22)	189 (133 – 267)	26,7 (22,9 – 30,7)
AMR (9/6)	124 (78 – 197)	30,1 (25,1 – 35,6)
EUR (13/12)	289 (166 – 504)	22,1 (16,7 – 28,7)
WPR (6/4)	245 (124 – 485)	24,3 (17,2 – 33,1)
Sepsis en unités de soins intensifs		
Toutes régions (34/19)	58 (42 – 81)	41,9 (36,2 – 47,7)
AFR (1/1)	52 (39 – 71)	40,4 (34,9 – 46,2)
AMR (5/4)	2 (0 – 6)	76,0 (58,5 – 87,7)
EUR (21/11)	139 (75 – 256)	42,7 (33,7 – 52,2)
WPR (7/3)	72 (43 – 120)	34,6 (25,4 – 45,2)

Les chiffres entre parenthèses représentent les intervalles de confiance à 95 %. AFR : Afrique, AMR : Amériques, EUR : Europe, WPR : Pacifique occidental.

B.1.b. A l'échelle nationale

Les études intéressant la situation nationale sont, quant à elles, rares et concernent principalement les infections nosocomiales. Les chiffres sont difficilement comparables d'une étude à l'autre, en raison des modifications assez récentes des définitions du sepsis et du choc septique.

Une enquête rétrospective nationale a recensé les cas de sepsis en France métropolitaine entre 2015 et 2019. Depuis la base nationale des sorties d'hôpital, 1 224 433 situations ont été identifiées comme sepsis d'étiologie bactérienne présumée. L'incidence a augmenté progressivement entre 2015 et 2019, avec une incidence de 357 et 403 pour 100 000 habitants, respectivement (14). Cette incidence est significativement plus élevée que celle observée dans l'étude réalisée en France entre 2010 et 2015 (15), mais selon les auteurs, leurs critères de sélection semblaient inclure des cas moins graves. L'incidence était significativement supérieure pour les

populations < 1 an et > 75 ans. Le taux global de mortalité était de 23,6 % en 2019, avec une tendance significative à la diminution depuis 2015. Sans surprise, le taux de mortalité était plus élevé chez les patients présentant un choc septique (49,5 % avec choc septique vs. 16,8 % sans choc septique en 2019) ou transférés en unités de soins intensifs (USI). À l'instar d'autres études, il a été noté une progression de l'incidence du sepsis au fil du temps. Cela pourrait être attribué à une hausse véritable ou à des modifications dans les méthodes hospitalières de codage.

Au total, les données françaises récentes correspondent aux données d'autres pays, avec une tendance à l'augmentation de l'incidence du sepsis et une baisse de la mortalité (11,16–18).

B.2. Bactériémies

Le terme de bactériémie correspond à la présence de bactéries viables dans le sang. Leur circulation peut être transitoire, asymptomatique et sans conséquence. Cela peut se produire lors de gestes banals du quotidien tel que le brossage de dent ou suite à certaines interventions comme les procédures endoscopiques digestives (19). Mais elle est aussi responsable d'infections sévères, voire mortelles. En effet, la bactériémie peut entraîner une infection généralisée lorsque les agents pathogènes se propagent dans tout l'organisme. Lorsque cette bactériémie déclenche une réponse inflammatoire systémique, elle peut évoluer en sepsis. Ainsi, bien que la bactériémie puisse être présente sans entraîner de sepsis, elle représente un facteur clé dans le développement de ce dernier.

Il est difficile d'obtenir des estimations précises sur les bactériémies en raison du nombre limité d'études. Une méta-analyse de 2013 a recensé les données de bactériémies dans quelques pays d'Amérique du Nord et d'Europe. Plus de 1,2 millions d'épisodes de bactériémies et 157 000 décès par an ont été déclarés en Europe en utilisant les estimations d'une étude basée sur la population au Danemark, en Finlande et en Angleterre (20). L'incidence annuelle est estimée à environ 170 cas pour 100 000 habitants en Europe, les chiffres sont sensiblement les mêmes pour l'Amérique du Nord. Le taux de mortalité varie entre 20,4 et 37,8 par an pour 100 000 habitants selon les régions. Les bactériémies figurent parmi les sept premières causes de décès pour tous les pays inclus dans cette revue.

Une autre étude conséquente (n = 252 343 épisodes) et plus récente, menée dans la province d'Ontario au Canada, a rapporté des chiffres similaires (21). Cette étude est intéressante car les données viennent de l'ensemble de la population, ce qui permet de recenser les infections communautaires en plus des infections hospitalières. L'incidence annuelle des bactériémies était estimée à 150 cas pour 100 000 habitants. La mortalité à 30 jours suite à une hémoculture positive était estimée à 17 % (21).

En France, des réseaux de surveillance des bactériémies existent. Cependant les données ne sont jamais exhaustives. En effet, les enquêtes nationales de prévalence ne recensent que les infections nosocomiales, la mission SPIADI concerne la surveillance et prévention des infections associées aux dispositifs invasifs, l'enquête EPIBAC ne s'intéresse quant à elle qu'à certains germes donnés. De plus, il n'y a pas de surveillance spécifique des bactériémies communautaires en France.

B.3. Agents pathogènes et portes d'entrée

Les principaux agents pathogènes recensés dans les études réalisées dans les pays à revenu élevé sont *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase négative (SCN), *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, les entérocoques et les streptocoques (Tableau 2). Autrefois, *S. aureus* occupait la première place parmi les infections bactériennes les plus courantes, mais cette tendance a évolué au fil du temps (22), au profit de *E. coli* qui est le premier pathogène dans de nombreuses études récentes (19).

La répartition est différente en fonction des infections communautaires ou nosocomiales. La plupart des études considèrent une infection comme communautaire si elle est identifiée hors de l'hôpital ou dans les 48 premières heures d'hospitalisation. On parle alors d'infection nosocomiale lorsqu'elle est contractée après 48h d'hospitalisation. Dans les infections communautaires, on retrouve plus volontiers les streptocoques, en particulier *Streptococcus pneumoniae*, et *E. coli*, alors que *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* sont plutôt associés aux soins. Dans les pays à faibles ressources, la répartition est différente. Selon certaines études, *Salmonella enterica* est responsable de plus de 50 % des bactériémies dans ces régions (23,24).

Le plus grand nombre de décès à 30 jours a été observé après des épisodes de bactériémie à *S. aureus*, *E. coli* et SCN. Mais si l'on s'intéresse au taux de mortalité brut à 30 jours, sans tenir compte de la fréquence, *Clostridium* spp., *Candida* spp. et *Bacteroides* du groupe *fragilis* ont présenté les taux les plus élevés avec respectivement 41,7 %, 31,9 % et 25,3 % (Tableau 2).

Tableau 2 : Genres et espèces bactériennes retrouvés dans les bactériémies par ordre de fréquence et mortalité associée à 30 jours (21)

	Fréquence (%)	Mortalité à 30 jours (%)
<i>Escherichia coli</i>	26,9	12,1
<i>Staphylococcus</i> spp., dont	25,1	
<i>S. aureus</i>	15,9	22,8
SCN	8,8	19,7
<i>Streptococcus</i> spp.	15,7	15
<i>Klebsiella</i> spp.	8,2	17,6
<i>Enterococcus</i> spp.	5,8	23,6
<i>Pseudomonas</i> spp.	3,4	24,7
<i>Enterobacter</i> spp.	2,6	19,8
<i>Candida</i> spp.	2,6	32,0
<i>Proteus</i> spp.	1,8	20,7
<i>Bacterioides</i> du groupe <i>fragilis</i>	1,3	25,3
<i>Serratia</i> spp.	1,0	20,7
Autres micro-organismes	10,9	-

La porte d'entrée de la bactériémie doit être systématiquement recherchée. Si elle est identifiée, la bactériémie est qualifiée de secondaire, en comprenant les infections liées aux dispositifs intravasculaires (Tableau 3). Dans le cas contraire, on parle alors de bactériémie primaire. Malgré la diversité de foyers infectieux pouvant être à l'origine d'états septiques, les infections respiratoires, intra-abdominales et urinaires sont prédominantes. On retrouve ensuite les infections de la peau et tissus mous (14).

Tableau 3 : Principales portes d'entrée et agents infectieux associés (2)

Porte d'entrée	Agents infectieux
Urinaire	<i>Enterobacterales</i> , entérocoques
Digestive	Streptocoques du groupe D, entérocoques, <i>Enterobacterales</i> , anaérobies, levures
Pulmonaire	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterobacterales</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Peau et plaie cutanée	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , SCN, levures
Bucco-dentaire	Streptocoques oraux, anaérobies
Matériel endovasculaire	Staphylocoques, levures

C. Diagnostic

Le diagnostic du sepsis repose sur plusieurs volets : l'évaluation clinique et la recherche de signes de gravité, la documentation microbiologique, la recherche de la porte d'entrée ainsi que des localisations secondaires. Les décisions concernant le début ou l'arrêt d'un traitement antibiotique reposent sur l'examen de l'ensemble des critères cliniques et diagnostiques disponibles, y compris une évaluation détaillée du patient et de la gravité du tableau.

C.1. Clinique

Le tableau clinique peut être très variable d'un sepsis à l'autre car il dépend de plusieurs facteurs tels que le foyer initial, l'agent infectieux, les pathologies sous-jacentes et l'état d'immunité du patient. Certains signes cliniques doivent cependant faire évoquer l'hypothèse d'un sepsis. La présence de marbrures, d'extrémités froides (signes d'hypoperfusion), d'une polypnée, d'une insuffisance rénale aiguë inexplicquée et tout signe de confusion en font partie. Il n'existe aucun signe clinique qui soit propre au sepsis, et d'autres pathologies peuvent provoquer une présentation similaire.

En pratique, le sepsis est apprécié par le score SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*). Ce score repose sur l'évaluation de six systèmes physiologiques que sont la coagulation et les fonctions respiratoire, neurologique, cardiovasculaire, hépatique et rénale (Tableau 4). Le diagnostic de sepsis est retenu devant un score

SOFA ≥ 2 ou une augmentation du score d'au moins 2 points en cas de dysfonctionnement d'organe préexistant.

Tableau 4 : Calcul du score SOFA (25)

Fonctions	0 point	1 point	2 points	3 points	4 points
Respiratoire PaO ₂ /FiO ₂	≥ 400	< 400	< 300	< 200 et VA	< 100 et VA
Coagulation Plaquettes, x10 ³ /mm ³	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Hépatique Bilirubine, mg/L ($\mu\text{mol/L}$)	< 12 (< 20)	12-19 (20-32)	20-59 (33-101)	60-119 (102-204)	> 12 (> 204)
Cardiovasculaire PAM, mmHg Besoin d'amines	≥ 70	< 70	Dp ≤ 5 Db (toute dose)	Dp 5,1-15 A/NA $\leq 0,1$	Dp > 15 A/NA $> 0,1$
Système nerveux central Score de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Rénale Créatinine, mg/L ($\mu\text{mol/L}$) Ou Diurèse	< 12 (< 110)	12-19 (110-170)	20-34 (171-299)	35-49 (300-440) $< 500\text{mL/j}$	> 50 (> 440) $< 200\text{mL/j}$

VA = ventilation assistée, PAM = pression artérielle moyenne (estimée par (pression artérielle systolique + 2 x pression artérielle diastolique) /3), Dp = dopamine, Db = dobutamine, A = adrénaline, NA = noradrénaline. Les doses de catécholamines sont exprimées en $\mu\text{g/kg/min}$ pendant au moins une heure.

Pour permettre un dépistage précoce des patients pouvant présenter un sepsis, hors réanimation notamment, le *quick* SOFA (qSOFA) est un calcul simplifié du SOFA qui en reprend certains paramètres : fréquence respiratoire $\geq 22/\text{min}$, trouble des fonctions supérieures (confusion, désorientation, Glasgow < 15) et pression artérielle systolique $\leq 100\text{mmHg}$. En cas de qSOFA ≥ 2 , il convient d'obtenir les variables du SOFA (Figure 3).

Ces scores sont particulièrement adaptés à la pratique hospitalière. Cependant, une grande partie des sepsis sont d'origine communautaire. C'est pour cela que la HAS recommande de considérer comme particulièrement à risque de développer un sepsis,

les patients en ambulatoire ayant une infection suspectée ou documentée et présentant un ou plusieurs facteurs de risque (Figure 4).

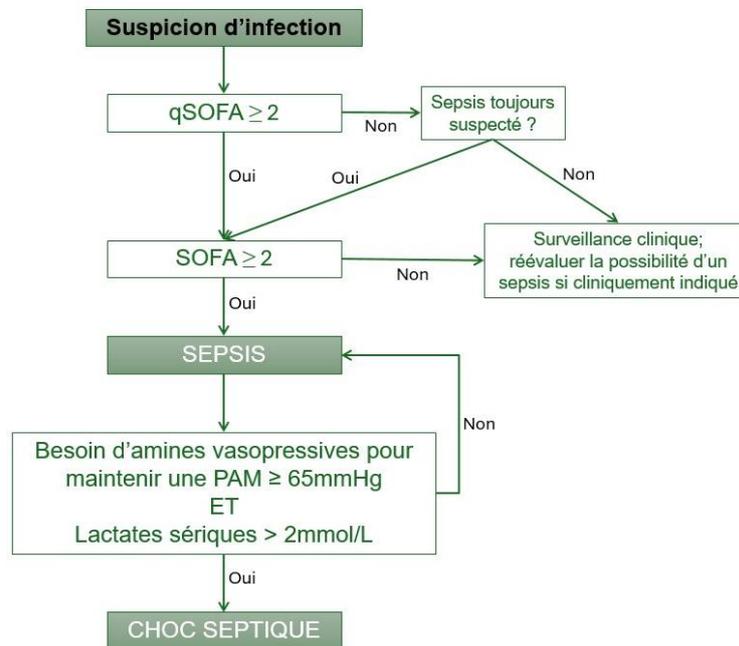


Figure 3 : Algorithme diagnostique à conduire devant une suspicion d'infection (1)

Age Fragilité clinique	Pathologies immunes		Pathologies non-immunes	
	Déficit immunitaire héréditaire	Déficit immunitaire acquis		
		Situations cliniques		Traitements Immunosuppresseurs
<ul style="list-style-type: none"> - Age < 1 an ou > 65 ans - Fragilité sévère (Clinical Frailty Scale ≥ 5) - Grossesse, post-partum - Handicaps cognitif ou moteur - Porteurs de dispositif médical implantable, - Chirurgie récente 	<ul style="list-style-type: none"> - Cancer (tumeur solide/hémopathie maligne) - Transplantation d'organes solides - Maladies de système - Infection par le VIH - Asplénie anatomique ou fonctionnelle (dont drépanocytose) 	<ul style="list-style-type: none"> - Corticothérapie au long cours - Chimiothérapie - Biothérapies - Radiothérapie - Autres immunosuppresseurs 	<ul style="list-style-type: none"> - Cirrhose - Insuffisance rénale chronique - Insuffisance cardiaque - Insuffisance respiratoire chronique - Diabète (compliqué ou non équilibré) - Dénutrition - Antécédent de sepsis 	

Figure 4 : Facteurs de risque de sepsis à rechercher chez les patients en amont des urgences (26)

C.2. Biologique

C.2.a. Biomarqueurs

Les marqueurs les plus utilisés en routine sont la protéine C-réactive (CRP) et la procalcitonine (PCT).

La CRP est un marqueur positif de l'inflammation. Cette protéine est synthétisée principalement par les hépatocytes. Elle est depuis longtemps utilisée comme marqueur d'infection car elle joue un rôle majeur dans les processus de réponses de l'hôte face à une agression (apoptose, phagocytose, production de cytokines, ...). Elle tient d'ailleurs son nom du polysaccharide capsulaire (C) de *Streptococcus pneumoniae* car elle a été découverte pour la première fois en 1930 dans le sérum de patients souffrant d'une infection aiguë par le pneumocoque (27). Le taux sérique moyen chez une personne caucasienne en bonne santé est d'environ 0,8 mg/L mais il est influencé par de nombreuses variables physiologiques comme l'âge, le sexe, le tabagisme ou encore des polymorphismes dans le gène codant (28). La CRP s'élève au cours du sepsis avec une sensibilité de 80 % et une spécificité de 61 % (29).

La PCT, de découverte plus récente, est une glycoprotéine précurseur de la calcitonine. En 1993, Assicot *et al.* décrivait des taux de PCT très élevés chez des patients atteints de sepsis et une décroissance rapide après instauration d'une antibiothérapie (30). Depuis, de nombreuses études et méta-analyses ont évalué son intérêt dans le diagnostic et le suivi des infections, majoritairement dans les infections pulmonaires et le sepsis (31). Elle est plus spécifique des infections bactériennes que la CRP, avec une spécificité estimée de 77 % pour le sepsis (29). Son taux semble aussi être associé à une mortalité plus élevée dans le sepsis (32). Diverses sociétés d'experts de différents pays ont souligné son intérêt, non seulement pour diagnostiquer les infections bactériennes graves, mais aussi pour l'optimisation de l'antibiothérapie (33). En effet, plusieurs grands essais multicentriques ont montré que la PCT permettait de réduire l'exposition aux antibiotiques (34). La plupart des essais ont interrompu le traitement antibiotique lorsque la PCT diminuait de ≥ 80 % par rapport à sa valeur maximale ; ou jusqu'à un niveau $\leq 0,5$ $\mu\text{g/L}$.

Ces marqueurs ont une bonne valeur prédictive négative. En effet, certaines études tendent à montrer qu'ils seraient plus utiles pour exclure le sepsis en cas de négativité que pour le diagnostiquer, et que l'association des deux peut améliorer cette capacité (35). La cinétique de ces biomarqueurs est également utile pour évaluer la réponse au traitement, notamment pour évaluer l'antibiothérapie dans les 48 premières heures (36).

Les biomarqueurs utilisés actuellement renseignent donc sur une réponse inflammatoire générale mais aucun n'est spécifique du sepsis, ni d'infection bactérienne par ailleurs. La cinétique associée des deux marqueurs semble plus pertinente qu'une unique détermination. Ces tests doivent s'intégrer dans l'évaluation globale d'un patient.

C.2.b. Microbiologie

Selon le contexte clinique du patient et le foyer infectieux suspecté, des prélèvements à visée de documentation microbiologique peuvent être effectués (ECBU, ECBC, ...). Le prélèvement de choix est l'hémoculture, analyse microbiologique permettant de détecter la présence d'une bactériémie. Elle correspond à la mise en culture de sang dans un flacon contenant un bouillon de culture (Figure 5). Il existe différents types de flacon : aérobie, anaérobie (correspondant aux atmosphères d'incubation des cultures bactériennes), pédiatrique (destiné aux volumes sanguins plus faibles) et fongique. Les flacons contiennent en général des composants additionnels (anticoagulants, facteurs de croissance et parfois résines chélatrices d'antibiotiques ou charbon). Cette étape de pré-culture du sang est primordiale car, même lors d'un choc septique, il n'y a que très peu de bactéries circulantes (37).

C.2.b.i. Pré-analytique

La formation du personnel est très importante afin d'optimiser la sensibilité et de minimiser les contaminations. Certaines recommandations générales sont universelles : prélèvement avant le traitement antibiotique si possible, volume de sang prélevé adéquat, protocole d'asepsie.



Figure 5 : Flacons d'hémoculture largement utilisés en France

A : Gamme BD BACTEC® (Becton Dickinson) B : Gamme BACT/ALERT®VIRTUO® (bioMérieux)

Le laboratoire doit fournir un protocole de prélèvement des hémocultures, ce protocole doit être suivi rigoureusement par les préleveurs (Figure 6). L'asepsie passe par la fermeture de la porte, le lavage ou la désinfection des mains du préleveur, le port de gants, la désinfection de l'opercule des flacons et l'asepsie cutanée au point de ponction de façon circulaire et large avec un antiseptique alcoolique (38). Il est impératif de respecter le temps de séchage de l'antiseptique. Les hémocultures doivent toujours être prélevées sur voie veineuse périphérique, sauf en cas de suspicion d'infection liée à un cathéter (voir paragraphe dédié). Un prélèvement correspond chez un adulte à une paire d'hémoculture, composée d'un flacon aérobie et d'un flacon anaérobie. Le prélèvement commence toujours par le flacon aérobie afin de ne pas introduire d'oxygène dans le flacon anaérobie. Le contrôle du bon remplissage des flacons est un élément essentiel.

Ces bonnes pratiques permettent de diminuer le risque de contamination, qui peut compliquer l'interprétation des résultats, mais aussi conduire à l'instauration d'un traitement antibiotique non justifié (pression de sélection, effets indésirables potentiels). La présence de micro-organismes contaminants peut également inhiber la croissance d'un véritable pathogène et ainsi retarder le diagnostic de bactériémie. Le prélèvement unique permet de limiter ce risque de contamination (39).



Figure 6 : Bonnes pratiques de prélèvement des hémocultures (Infographie bioMérieux®)

Il existe deux grandes stratégies de prélèvement des hémocultures : les prélèvements multiples et le prélèvement unique (Tableau 5). Les deux ont fait leur preuve en termes de sensibilité, le critère déterminant étant le volume de sang prélevé car la densité de bactéries présentes dans le sang est généralement très faible, de l'ordre de 1 à 10 UFC/mL (37). La quantité de sang prélevée présente un intérêt supérieur à celui du nombre de flacons prélevés. Il est recommandé de recueillir 40 à 60 mL de sang par épisode chez l'adulte, soit environ 10 mL par flacon. Enfin pour augmenter la sensibilité, les hémocultures doivent, dans la mesure du possible, être prélevées avant mise en place de l'antibiothérapie.

En pratique, devant une suspicion de bactériémie, les patients se voient parfois prélever une seule paire d'hémoculture, c'est ce qu'on appelle une hémoculture solitaire. Selon les études, cela concernerait environ 25 % des prélèvements (40,41). Cela peut s'expliquer par différentes raisons : disparition de la fièvre, patients sortis des urgences ou transférés dans un autre service, omission de prélèvement des séries ultérieures, ... Si l'on combine cette pratique à des flacons insuffisamment remplis, la sensibilité diagnostique des hémocultures est considérablement réduite.

Tableau 5 : Stratégies de prélèvement des hémocultures, avantages et inconvénients

	Prélèvements multiples	Prélèvement unique
Nombre de ponctions	2 à 3	1
Nombre de flacons	4 à 6	4 à 6
Sensibilité	Equivalente à nombre de flacons et remplissage égal	
Avantages	<ul style="list-style-type: none">• Flacons mieux remplis	<ul style="list-style-type: none">• Taux de contamination faible• Confort du patient
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none">• Taux de contamination élevée• Risque d'hémoculture solitaire	<ul style="list-style-type: none">• Moins adapté pour le diagnostic des endocardites• Nécessite des automates suffisamment grand

Cas particuliers :

- Dans la population pédiatrique, le volume de sang à prélever dépend du poids de l'enfant, et non de l'âge (Tableau 6). La densité bactérienne est plus importante que chez l'adulte, notamment chez le jeune enfant, ce qui permet de limiter la quantité de sang prélevée chez le nouveau-né. Lorsqu'un seul flacon est prélevé, il peut être aérobie ou anaérobie. En pratique, les flacons pédiatriques sont en général utilisés, ce qui correspond à un flacon aérobie.
- Dans le cadre d'une suspicion d'infection liée à un dispositif intravasculaire (DIV), le diagnostic peut se faire via la méthode des hémocultures différentielles. Cette méthode permet d'éviter le retrait systématique du DIV afin de le mettre en culture. Il s'agit de prélever en parallèle, simultanément (dans les 10 minutes), des flacons en périphérie et via le DIV suspect (sans purge). Ces flacons doivent être correctement identifiés (périphérique/DIV) et incubés concomitamment, le différentiel de temps de pousse étant le critère diagnostic. Cette méthode repose sur le fait que la même bactérie est présente dans les deux prélèvements, mais en plus grande quantité dans le flacon prélevé sur le DIV. Le DIV est considéré comme à l'origine de l'infection si la différence de temps de pousse est au moins supérieure à 2h comparé à celui de la périphérie. Toutefois, il faut garder à l'esprit que certaines variables sont difficiles à

maitriser (délai d'acheminement et d'incubation, volume prélevé identique dans chaque flacon, problème dans l'étiquetage, ...) et peuvent compliquer l'interprétation des résultats.

- Les hémocultures font aussi partie du diagnostic des endocardites puisqu'elles appartiennent aux critères modifiés de Duke (42). Dans ce contexte, le prélèvement par ponctions multiples était jusqu'il y a peu une exigence pour l'interprétation des résultats selon le germe retrouvé. Cependant, en réponse à l'évolution des pratiques cliniques, le groupe de travail de l'ISCVID (*International Society for Cardiovascular Infectious Diseases*) a préconisé l'abandon des exigences complexes concernant les hémocultures, notamment en ce qui concerne le moment et la nécessité de réaliser des ponctions veineuses distinctes. Chez les adultes suspectés de bactériémie, il est recommandé de réaliser au moins deux séries d'hémocultures. Bien que les recommandations de bonnes pratiques préconisent de procéder à une ponction veineuse distincte pour chaque hémoculture lorsque cela est possible, cela n'est plus exigé par les critères modifiés de Duke. En l'absence de positivité, il est recommandé de répéter les hémocultures 2 à 3 jours plus tard et d'envisager l'hypothèse de micro-organismes non ou difficilement cultivables.

Tableau 6 : Volume de sang à prélever en fonction du poids de l'enfant (43)

Poids (kg)	Volume de sang (mL)						Volume total cultivé (mL)	Volume total soustrait (%)
	Culture 1		Culture 2		Culture 3			
	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie		
≤ 1	0,5 à 2						0,5 à 2	1,5 à 3
1,1-2	1,5 à 4,5						1,5 à 4,5	1,7 à 3
2,1-3,9	3 à 6						3 à 6	1,8
4-7,9	6						6	1 à 2
8-13,9	4 à 5		4 à 5				8 à 10	1 à 1,5
14-18,9	5	5 à 7	5 à 8	5 à 7			20 à 24	1,8 à 2,4
19-25,9	5	5	5	5	5	5	30	1,8 à 2,2
26-39,9	10	10	10	10			40	1,7 à 2,2
≥40	10	10	10	10	10	10	60	≤ 2,3

Les flacons doivent être acheminés rapidement au laboratoire et incubés dans un automate dédié à $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La pré-incubation des flacons avant introduction dans l'automate étant associée à un risque de faux-négatifs (44,45), il convient de laisser les flacons à température ambiante avant introduction dans l'automate et de les incuber aussi rapidement que possible, selon l'organisation propre à chaque laboratoire (46).

C.2.b.ii. Analytique

Deux systèmes analytiques sont très majoritairement utilisés en France : le BacT/ALERT®VIRTUO® de bioMérieux et le BD Bactec® de Becton-Dickinson. La croissance bactérienne est détectée via l'évolution du taux de CO_2 dans le flacon, par réflectométrie (BacT/ALERT®) ou par fluorimétrie (BD Bactec®), avec une lecture de chaque flacon toutes les 10 minutes (Figure 7).

Dans le système BacT/ALERT®VIRTUO®, la détection du CO_2 repose sur l'utilisation d'un détecteur colorimétrique, appelé « *pastille CO_2 sensor* », présent dans chaque flacon. Lorsque la croissance bactérienne se produit, la concentration en CO_2 augmente, entraînant une baisse du pH du milieu de culture. Cette variation de pH provoque un changement de couleur de la pastille, passant du vert au jaune. Une LED émet un faisceau lumineux vers le capteur, et une photodiode mesure l'intensité de la lumière réfléchiée par le capteur sous forme d'unité de réflectance (Figure 7).

Le système BD Bactec® utilise également un capteur associé à une membrane semi-perméable. Le CO_2 produit par les micro-organismes présents dans l'échantillon provoque la réduction d'un sel de ruthénium contenu dans le capteur, entraînant ainsi l'émission de fluorescence, laquelle est mesurée par une photodiode (Figure 7).

Une alarme visuelle et/ou sonore signale tout flacon positif. L'incubation dure 5 jours avant que le flacon ne soit considéré comme négatif. Pour le diagnostic des endocardites, il était auparavant recommandé de prolonger l'incubation jusqu'à 10 jours pour détecter les bactéries à croissance lente comme les bactéries du groupe HACCEK. Avec les automates et flacons actuellement sur le marché, ce protocole

n'est plus recommandé car il n'améliore pas la sensibilité diagnostique. En effet, la plupart des germes retrouvés au-delà de 5 jours sont des contaminants (47–49).

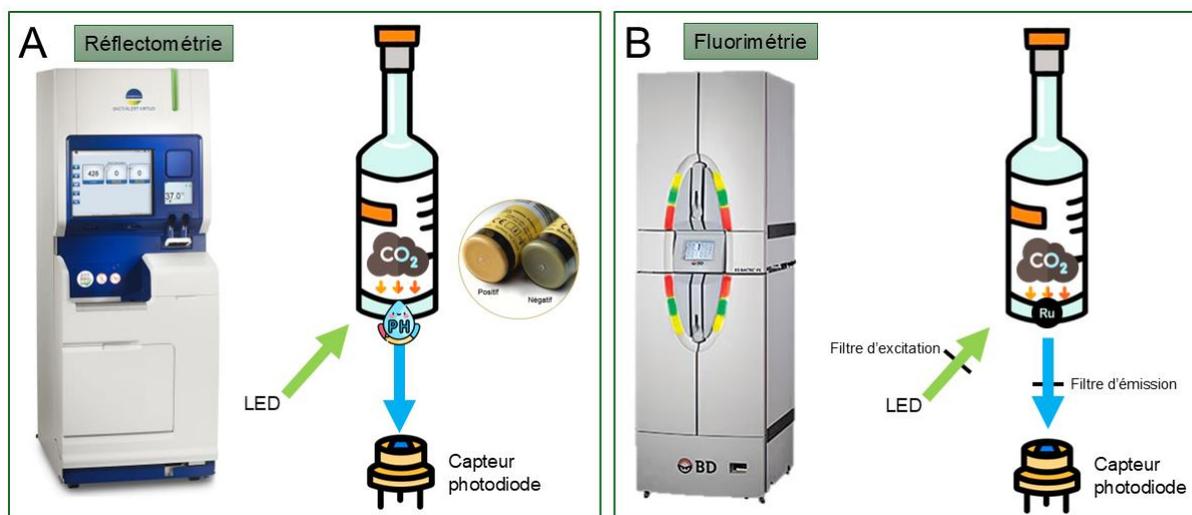


Figure 7 : Systèmes analytiques d'incubation des hémocultures

A : BacT/ALERT®VIRTUO® de bioMérieux, B : BD Bactec® de Becton-Dickinson

Lorsqu'une croissance bactérienne est détectée par l'automate dans un flacon, la première étape (Figure 9) consiste en l'examen microscopique du contenu du flacon après coloration de Gram permettant la description morphologique du micro-organisme en cause (cocci/bacille, Gram négatif/positif). Un examen microscopique sans coloration (état frais entre lame et lamelle) peut être intéressant pour certaines bactéries à mobilité particulière, comme *Campylobacter* spp. En général, les espèces retrouvées dans les hémocultures présentent une morphologie et une mobilité caractéristiques (Figure 8). Cependant, l'apparence de certains germes peut parfois être trompeuse. Par exemple, un pneumocoque peut se décolorer, tandis que le méningocoque ou *Acinetobacter* spp., mal décolorés, peuvent être confondus avec des cocci à Gram positif. Il est donc crucial de rester vigilant et de mettre en perspective ces résultats avec le contexte clinique du patient. Le résultat de l'examen direct est un élément clé pour le clinicien afin de guider le choix de l'antibiothérapie, il doit donc être communiqué dès que possible.

En cas d'examen microscopique négatif, il convient de réintroduire le flacon dans l'automate pour compléter le processus d'incubation. Il arrive qu'un flacon soit faussement positif (aucun germe n'est retrouvé ni à l'examen microscopique, ni en subculture). Cela peut être dû à l'activité métabolique importante des leucocytes, chez les patients d'hématologie présentant une hyperleucocytose majeure par exemple, ou si le niveau de remplissage du flacon est trop élevé (50,51).

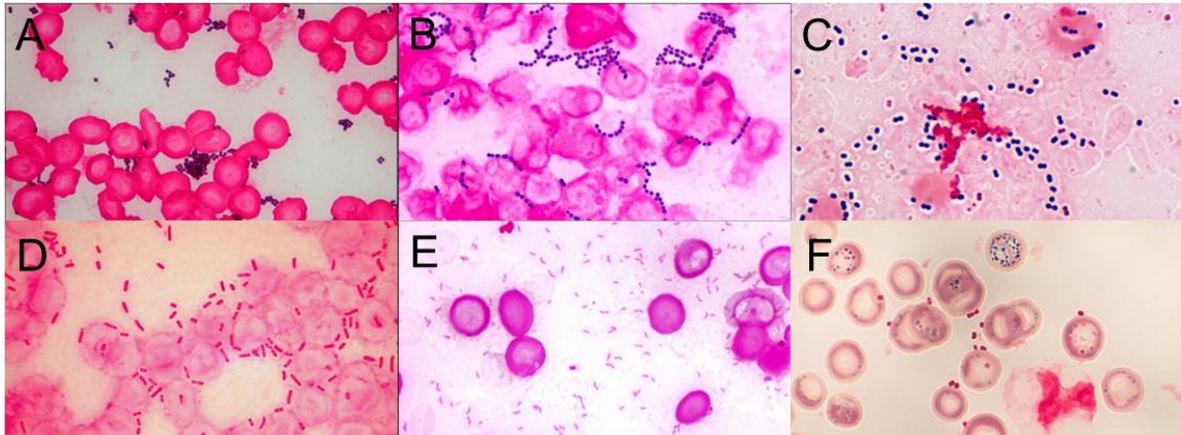


Figure 8 : Aspect en coloration de Gram des bactéries principalement retrouvées dans les hémocultures (52)

A : Cocci Gram positif en amas → *Staphylocoques* (ici *Staphylococcus aureus*)

B : Cocci Gram positif en chainettes → *Entérocoques, streptocoques* (ici *Enterococcus faecalis*)

C : Cocci Gram positif capsulés en diplocoques → *Streptococcus pneumoniae*

D : Bacille Gram négatif droit → *Enterobacteriales, Pseudomonas spp.* (ici *Klebsiella pneumoniae*)

E : Bacille Gram négatif incurvé → *Campylobacter spp.* (ici *Campylobacter coli*)

F : Cocci Gram négatif en "grain de café" → *Neisseria spp.* (ici *Neisseria meningitidis*)

Suite à l'examen microscopique, le contenu du flacon d'hémoculture est subcultivé sur des milieux de culture gélosés. Le choix des milieux et de l'atmosphère d'incubation sont guidés par la morphologie bactérienne déterminée au microscope, le type de flacon concerné, mais aussi les antécédents du patient. Classiquement, après 18 à 24h de subculture, l'identification des colonies est réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 9) (53).

L'étude de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, communément appelé antibiogramme, peut être réalisée par différentes techniques, en milieu liquide ou solide. En France, les recommandations de réalisation des antibiogrammes émanent

du CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie) et se superposent en grande partie aux recommandations de la société européenne, l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (54).

La méthode de référence est la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par microdilution en milieu liquide. Toute autre technique utilisée doit lui être corrélée (55,56). Selon la valeur de CMI, il existe différentes catégorisations : sensible à posologie standard (S), sensible à forte posologie (SFP ou F) ou résistant (R). En routine, les laboratoires combinent en général une méthode en milieu liquide semi-automatisée et une méthode de diffusion en milieu gélosé. Toutefois, la microdilution reste la seule technique validée pour certains antibiotiques comme la colistine. Des techniques supplémentaires peuvent être requises selon le germe et/ou le contexte. La recherche de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) est par exemple réalisée pour les *Enterobacterales* par différentes méthodes selon que l'antibiogramme est réalisé en milieu liquide ou solide. Pour les *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Acinetobacter baumannii*, la recherche de production de carbapénémase est parfois nécessaire. Plusieurs méthodes sont commercialisées : milieu chromogène de dépistage, test immunochromatographique, ou encore techniques de biologie moléculaire permettant la détection des 5 familles majeures circulantes en France (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48-like). Enfin, il existe des méthodes de dépistage de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) par recherche de la PLP2a ou du gène *mecA*.

L'antibiogramme peut maintenant être réalisé directement à partir du flacon d'hémoculture positif, selon les recommandations du CA-SFM (54). Dans certains contextes et/ou pour certains germes, un antibiogramme complémentaire doit être réalisé à partir de la subculture et le dossier complet sera donc souvent rendu 24h plus tard (Figure 9).

La prise en charge d'une hémoculture est donc un processus chronophage. En effet, après le prélèvement, les bactéries doivent être cultivées dans des conditions spécifiques, qui peuvent prendre plusieurs jours. De plus, des tests supplémentaires sont souvent nécessaires pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques, ce qui prolonge encore le délai avant d'obtenir un résultat complet. Ainsi, bien que les

premiers indices puissent être disponibles rapidement, un diagnostic définitif et précis peut prendre 48 à 72 heures, voire plus dans certains cas (Figure 9).

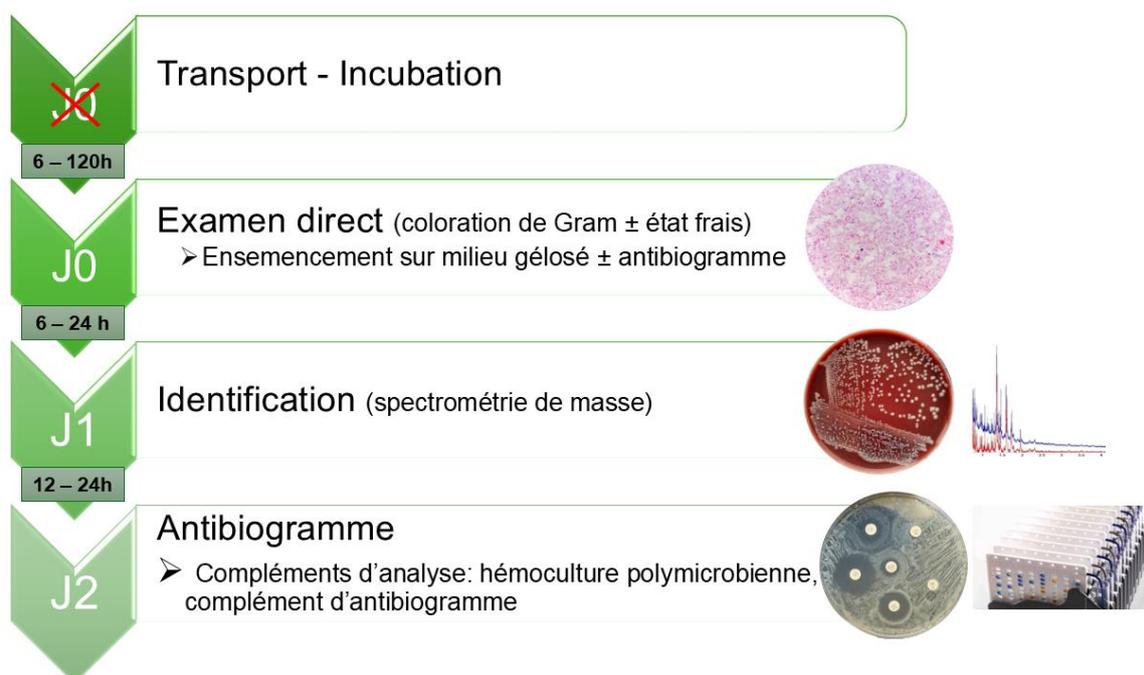


Figure 9 : Prise en charge des hémocultures : du prélèvement au rendu complet

C.2.b.iii. Post-analytique

L'interprétation de l'examen dépend de plusieurs facteurs que sont l'espèce microbienne retrouvée, le nombre de flacons positifs et éventuellement le délai de positivité. Certaines espèces bactériennes sont considérées comme pathogènes dès le premier flacon positif et justifient l'instauration d'une thérapeutique appropriée : les *Enterobacterales*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, ... Des bactéries commensales de la peau (*Corynebacterium* spp.) ou environnementales (*Bacillus* spp., sauf *Bacillus anthracis*) peuvent être mises en évidence, mais sont presque toujours considérées comme contaminants de culture. On parle de contamination lorsque l'organisme retrouvé n'est pas présent dans la circulation sanguine du patient mais résulte d'une asepsie inadéquate lors du prélèvement et/ou du traitement des hémocultures. D'autres espèces peuvent être d'interprétation plus délicate, c'est le cas des staphylocoques coagulase négative (SCN) qui sont en général à considérer comme des contaminants, mais qui peuvent être pathogènes dans certaines situations. Le contexte clinique, la présence ou non de matériel endovasculaire, l'état d'immunité du patient et le nombre

de flacons positifs avec la même souche sont autant d'éléments permettant d'étayer le diagnostic de bactériémie à SCN (Figure 10).

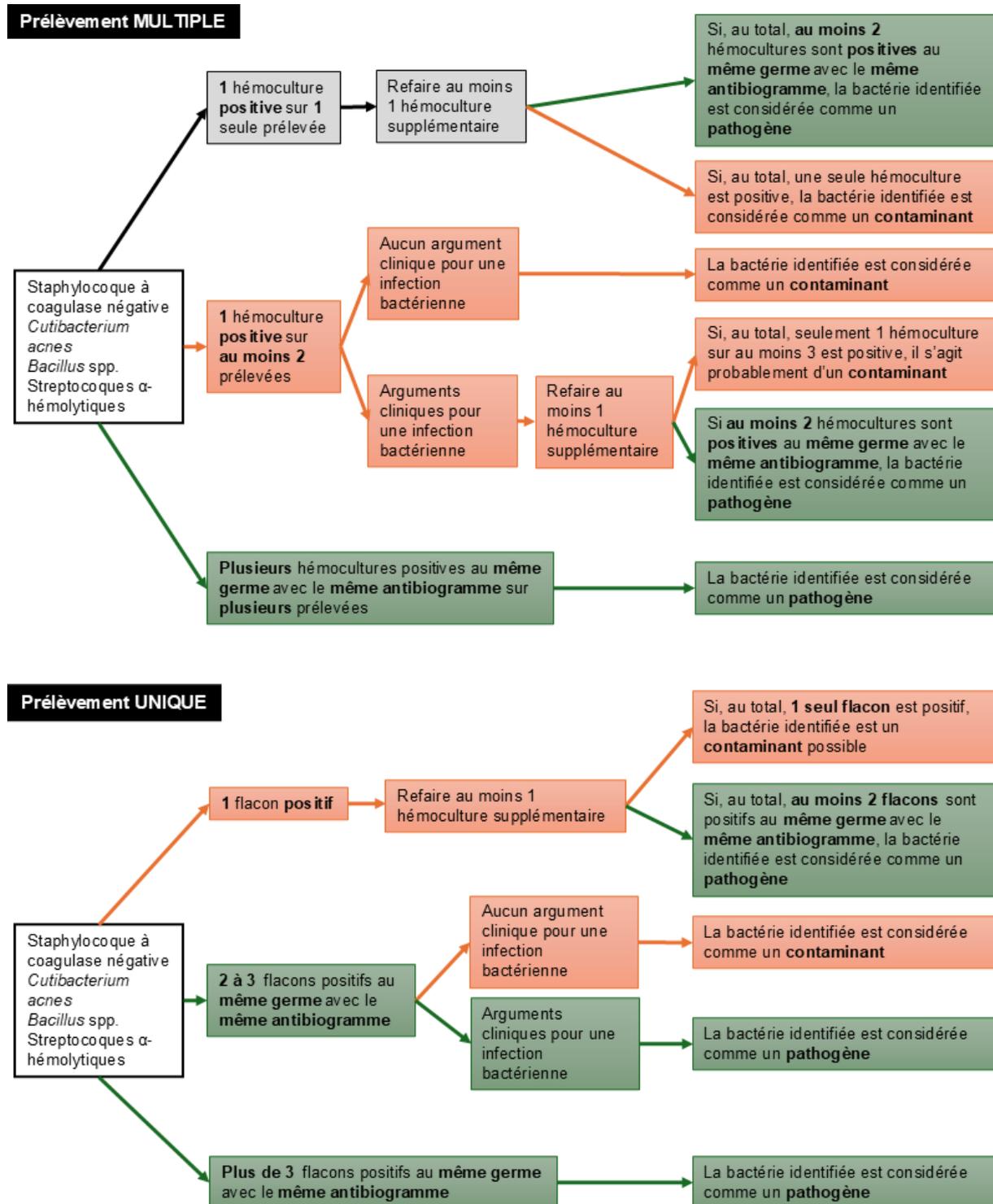


Figure 10 : Algorithmes d'interprétation des résultats d'hémocultures en cas de bactéries environnementales (2)

Une hémoculture comprend un flacon aérobie et un flacon anaérobie. Elle est positive quand au moins un flacon est positif.

D. Prise en charge thérapeutique

La *Surviving Sepsis Campaign* (SSC), portée par 55 experts et 25 sociétés savantes, propose des recommandations internationales pour la prise en charge du sepsis et du choc septique afin de guider les cliniciens (57). Les recommandations françaises publiées récemment par la HAS et élaborées par plusieurs sociétés savantes, préconisent de s'y conformer (26). Elles s'articulent autour de deux axes principaux : la prise en charge hémodynamique du choc et le traitement infectieux.

D.1. Prise en charge du choc

La prise en charge hémodynamique est un élément clé de la réanimation en cas de sepsis et de choc septique. L'objectif est de restaurer le transport et la perfusion en oxygène des organes défaillants en corrigeant l'hypovolémie mixte.

Elle repose sur le remplissage vasculaire en première intention, qui sera accompagné d'agents vasoactifs, et d'un transfert en réanimation en cas d'échec. La SSC recommande d'utiliser des cristalloïdes comme agent de remplissage de première intention pour la réanimation (57). Ils ont l'avantage d'être peu coûteux, largement disponibles et l'utilisation de colloïdes n'a pas montré de bénéfice clair. Il est suggéré d'ajouter de l'albumine si le volume administré est important. Le volume à utiliser est à adapter au contexte du patient, notamment la porte d'entrée du sepsis et la fonction cardiaque.

Concernant les agents vasoactifs, la noradrénaline est la molécule de première intention. La vasopressine puis l'adrénaline sont ajoutés si l'objectif de PAM de 65 mmHg n'est pas atteint. En cas de dysfonctionnement cardiaque avec hypoperfusion persistante malgré une PAM normale, l'ajout d'un inotrope tel que la dobutamine est recommandé, avec un contrôle du débit cardiaque (2). Par ailleurs, l'installation d'une voie veineuse centrale ne doit pas retarder l'administration des vasopresseurs, qui peuvent initialement être instaurés par voie périphérique. En dehors de la phase initiale urgente du choc septique, l'administration de fluides doit être adaptée à l'évaluation hémodynamique du patient. Ce monitoring doit être réalisé à l'aide d'un dispositif invasif de mesure de la pression artérielle, plutôt que non invasif, dès que cela est possible.

Pour assurer une perfusion en oxygène suffisante des organes, une oxygénothérapie adéquate est essentielle. Elle passe par un masque à haute concentration, voire par une intubation/ventilation artificielle si nécessaire. La transfusion de culots globulaires peut être envisagée pour corriger une anémie éventuelle et augmenter ainsi l'apport en oxygène (2).

D.2. Traitement anti-infectieux

D.2.a. Recommandations générales

L'administration précoce d'une antibiothérapie adaptée constitue l'un des moyens le plus efficace pour diminuer la mortalité chez les patients présentant un sepsis (Figure 11). La réduction de la mortalité liée à l'administration précoce d'antibiotiques semble être particulièrement marquée chez les patients en état de choc septique, comparé au sepsis sans choc (58). Le diagnostic du sepsis est complexe, car ses symptômes peuvent être subtils et certaines présentations, initialement suspectées comme un sepsis, peuvent finalement être liées à des affections non infectieuses. L'évaluation de la probabilité d'infection et de la gravité de l'état de chaque patient suspecté de sepsis doit permettre de déterminer si une administration d'antibiotique est nécessaire et urgente.

Les recommandations insistent sur l'importance de traiter rapidement les sepsis et chocs septiques, en administrant une antibiothérapie dans l'heure suivant le diagnostic (Figure 12)(57). Un traitement à large spectre, couvrant les différents types de micro-organismes possibles (bactéries, levures, virus selon le contexte) et composé d'une ou plusieurs molécules, doit être administré aux patients en état grave. Toutefois, ces recommandations soulignent la nécessité de prélever des hémocultures avant de commencer l'antibiothérapie. Si ce prélèvement n'est pas effectué, la documentation de l'infection devient plus complexe.

Un aspect clé de ces mesures est la désescalade thérapeutique dès que les résultats bactériologiques et le profil de sensibilité aux antibiotiques sont disponibles. La désescalade a été prouvée comme un moyen de réduire la sélection des résistances, les effets indésirables, tout en améliorant la survie des patients et en réduisant les coûts. Dans cette même optique, lorsque l'état du patient le permet, il

peut être recommandé d'attendre les résultats des cultures bactériologiques avant de commencer un traitement.

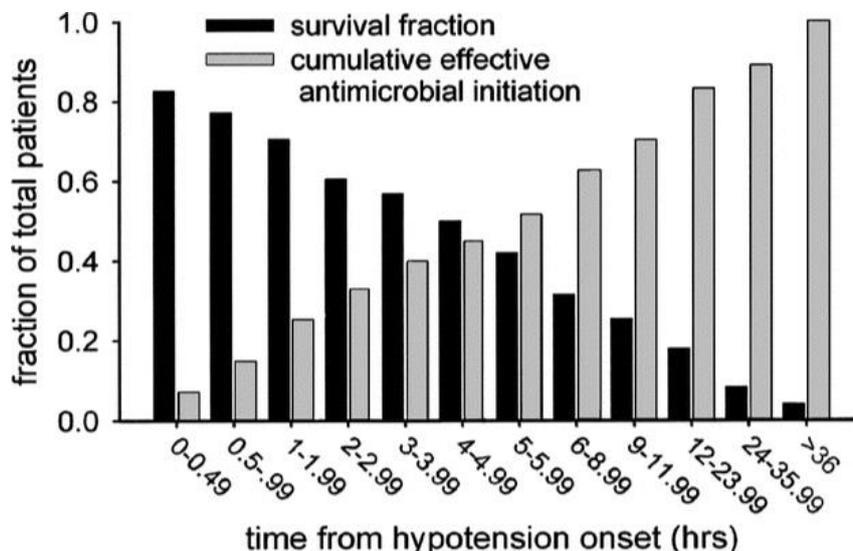


Figure 11 : Instauration cumulative efficace des antibiotiques après l'apparition d'une hypotension associée à un choc septique et survie associée (59)

L'axe des x représente le temps (en heures) après la première documentation d'hypotension associée à un choc septique. Les barres noires de l'histogramme représentent la fraction de patients vivants jusqu'à la sortie de l'hôpital pour un traitement efficace initié dans l'intervalle de temps donné. Les barres grises de l'histogramme représentent la fraction cumulée des patients ayant reçu des antibiotiques efficaces à un moment donné.

Le traitement antibiotique doit être administré initialement par voie parentérale en utilisant des molécules bactéricides. En cas d'utilisation de bêta-lactamines, il est conseillé d'utiliser une perfusion prolongée pour l'entretien (après un bolus initial) plutôt qu'une perfusion en bolus conventionnelle. La durée de l'antibiothérapie dépend de plusieurs facteurs : l'agent infectieux, le terrain, le ou les foyer(s) infectieux associé(s). Les recommandations françaises préconisent une durée d'antibiothérapie inférieure ou égale à 7 jours en l'absence de justification d'une durée plus longue (26). Dans le cas où le foyer infectieux a été contrôlé de manière optimale et que la durée du traitement n'est pas claire, le consensus d'expert recommande d'utiliser la PCT associée à l'évaluation clinique pour décider de l'arrêt de l'antibiothérapie, plutôt que l'évaluation clinique seule (57).

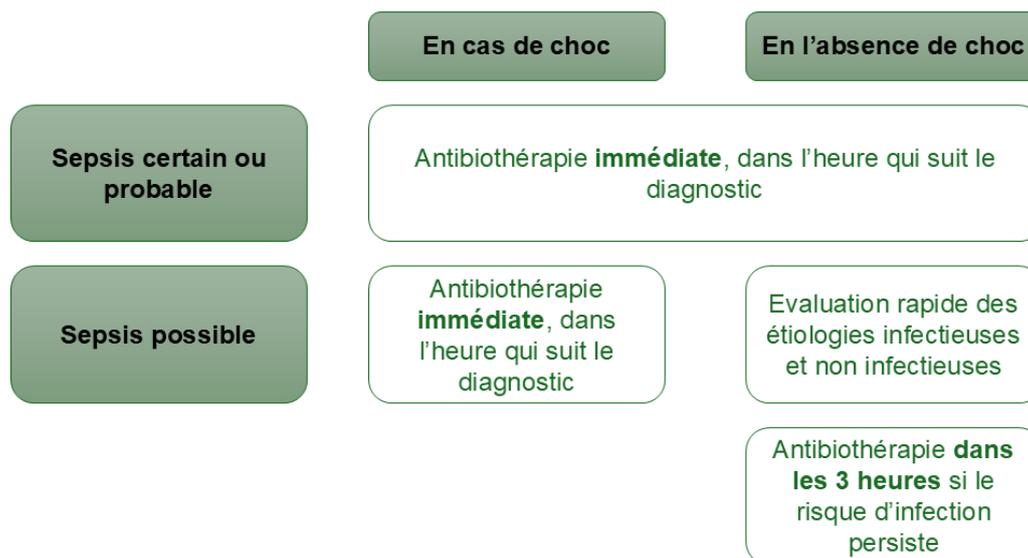


Figure 12 : Recommandations sur le délai d'instauration de l'antibiothérapie (57)

D.2.b. Choix de l'antibiothérapie

En présence de signes de gravité, le traitement est instauré sans attendre le résultat des hémocultures (Tableau 7). Les recommandations françaises suggèrent de prendre en compte l'origine présumée du foyer infectieux, l'épidémiologie générale et locale, les risques spécifiques du malade, et les résultats d'éventuels examens directs de prélèvements (60). En cas d'absence d'hypothèse diagnostique, le traitement comporte en général une β -lactamine (Céphalosporine de 3^{ème} génération en cas d'infection communautaire, β -lactamine large spectre en cas d'infection associée aux soins) et un aminoside, en fonction de la gravité (Tableau 7). L'intérêt des aminosides repose sur leur bactéricidie rapide et leur synergie avec les β -lactamines. Une fois le contrôle du sepsis obtenu, l'aminoside est souvent interrompu rapidement. Pour les patients à risque élevé d'infection par des bactéries multirésistantes (BMR), il est recommandé d'initier une bithérapie à activité contre les Gram négatifs pour le traitement empirique, plutôt qu'une monothérapie (57).

L'antibiothérapie doit être réévaluée dès que possible et adaptée à l'espèce, puis à l'antibiogramme, dès connaissance des résultats du laboratoire (Tableau 8).

Tableau 7 : Antibiothérapie probabiliste en présence de signes de gravité (sepsis ou choc septique) (61)

Foyer infectieux initial présumé	Traitement probabiliste
Digestif, voies biliaires	C3G (Fluoroquinolone si allergie) + Métronidazole ± Aminoside
Urinaire	C3G (Aztréonam si allergie) + Aminoside
Pneumonie aiguë communautaire	C3G + Macrolide
Pas de foyer, infection communautaire	C3G ± Aminoside
Pas de foyer, infection associée aux soins	β-lactamine large spectre (Pipéracilline-tazobactam ou Céfépime ou Ceftazidime ou Méropénème) + Amikacine ± Vancomycine ± Echinocandine selon le terrain
Infection liée au cathéter	Idem, la Vancomycine pouvant être remplacée par la Daptomycine

Tableau 8 : Exemples d'antibiothérapies ciblées (61,62)

Bactérie responsable	Antibiothérapie ciblée
<i>Staphylococcus aureus</i>	Daptomycine dans l'attente de l'antibiogramme <ul style="list-style-type: none"> ❖ SAMS : (Cl)oxacilline (Céfazoline, voire Daptomycine si allergie aux pénicillines) ❖ SARM : Daptomycine <p><i>En cas d'atteinte pulmonaire, la Daptomycine doit être remplacée par la Vancomycine (ou la Teicoplanine, moins néphrotoxique)</i></p>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Amoxicilline OU C3G si insuffisance rénale labile OU Pipéracilline/tazobactam si infection cutanée nécrosante + Anti-toxinique si signe de gravité ou sepsis : Clindamycine ou Linézolide
<i>Enterococcus faecalis</i>	Amoxicilline ± Gentamicine (si sepsis ou suspicion d'endocardite)
<i>Enterobacterales du groupe 3</i>	Céfépime (ou Méropénème si facteur de risque de BLSE) ± Amikacine (si sepsis)

D.2.c. Traitement de la porte d'entrée

Le traitement de la porte d'entrée est essentiel pour éviter les rechutes. Selon le contexte, il peut prendre différentes formes : drainage d'abcès, levée d'obstacle urinaire ou biliaire, résection de tissus nécrosés, ... Il est aussi vivement recommandé de retirer rapidement les dispositifs intravasculaires qui sont une source possible de sepsis, après qu'un autre accès vasculaire ait été établi. Selon le foyer infectieux, il peut être nécessaire d'allonger la durée de l'antibiothérapie.

II. Approches actuelles permettant d'accélérer le rendu de résultats des bactériémies

Bien que le processus diagnostique actuel des hémocultures soit essentiel pour identifier les agents pathogènes responsables des bactériémies, le délai de rendu reste un frein majeur à une prise en charge rapide et efficace des patients. En effet, l'attente prolongée des résultats peut retarder l'initiation d'une antibiothérapie ciblée, ce qui a un impact direct sur les chances de survie. Face à cet enjeu, il est important d'explorer des solutions permettant d'accélérer le diagnostic. C'est précisément ce que nous aborderons dans la deuxième partie de cette thèse, en nous intéressant aux outils diagnostic actuellement disponibles et/ou innovants qui visent à réduire ces délais et à améliorer la prise en charge des patients en situation de sepsis.

A. Préambule : critères d'évaluation

En ce qui concerne l'évaluation des performances pour une nouvelle méthode d'antibiogramme par rapport à la méthode de référence (microdilution), les critères d'évaluation sont les suivants (56):

- Accord de catégorie (AC) : accord des résultats S-F-R avec la méthode de référence
- Accord essentiel (AE) : CMI obtenues qui sont entre plus ou moins une double dilution de la valeur de CMI établie avec la méthode de référence
- Ecart très majeur (ETM) : fausse sensibilité (nombre d'ETM divisé par le nombre de souches résistantes testées)
- Ecart majeur (EM) : fausse résistance (nombre d'EM divisé par le nombre de souches sensibles testées)
- Ecart mineur (Em) : sensible forte posologie par rapport à sensible ou résistant (nombre d'Em divisé par le nombre total de souches testées)

Cette norme a été révisée en 2021 et recommande des mesures de performance de test uniquement, et non d'interprétation de résultats. C'est pourquoi, dans les études les plus récentes, les termes AC, ETM, EM et Em n'existe plus et la méthode est évaluée uniquement par l'AE et le calcul du biais sur la CMI. Malgré cela, la pertinence

clinique de l'AC ne doit pas être négligée car les cliniciens s'appuient souvent sur la catégorisation S-SFP-R, plus que sur les CMI, pour prendre les décisions de traitement.

B. Tests phénotypiques

B.1. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

La méthode largement utilisée pour l'identification des bactéries est la spectrométrie de masse MALDI-TOF (53). C'est une technique d'ionisation douce pour l'analyse de biomolécules telles que les protéines, peptides, acides nucléiques et lipides. Elle permet d'identifier et de caractériser ces molécules intactes, en minimisant leur fragmentation. Une petite quantité de la culture bactérienne est déposée sur une plaque métallique et recouverte d'une matrice organique, généralement un acide phénolique comme l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA). Ce mélange est ensuite séché, formant des cristaux co-cristallisés. Sous l'irradiation d'un laser pulsé (souvent à 337 nm ou 355 nm), la matrice absorbe l'énergie et se sublime rapidement, entraînant la désorption et l'ionisation de l'échantillon. Les ions produits sont accélérés dans un tube de vol sous vide. Leur temps de vol jusqu'au détecteur est mesuré, ce qui permet de déterminer leur rapport masse/charge (m/z) (63). Le spectre obtenu, correspondant aux protéines ribosomales bactériennes, est comparé à une base de données de spectres de référence. La correspondance des profils permet d'identifier l'espèce bactérienne avec précision.

B.1.a. Identification sur culture jeune

Comme décrit plus tôt, la méthode d'identification conventionnelle repose sur l'incubation pendant 18 à 24h d'une subculture du flacon. Divers auteurs ont évalué l'identification des bactéries après une incubation de plus courte durée sur milieu gélosé (2 à 6h en général), ce qui permet parfois d'obtenir un nombre suffisant de colonies pour les analyser. Afin de permettre la croissance optimale de tous les micro-organismes, le milieu choisi est en général une gélose au sang incubée dans une atmosphère enrichie en CO₂.

La sensibilité de cette méthode est évidemment corrélée à la durée d'incubation choisie. Les performances sont meilleures pour les bactéries à Gram négatif, et ce d'autant plus que le temps d'incubation sur gélose est prolongé (80 % à 2h, 95 % à 4h). Pour les bactéries à Gram positif, une incubation moyenne de 6h minimum est nécessaire (64). Une extraction supplémentaire par l'éthanol/acide formique permet de réduire ce temps d'incubation à environ 3h pour les cocci à Gram positif (65). Dans le cas de flacons polymicrobiens, l'identification des différentes espèces présentes est difficile. Dans la majorité des cas BGN/CGP, l'identification sur culture jeune permet d'identifier le BGN, qui a une croissance plus rapide.

Cette méthode est simple et économique. Le temps de manipulation, ainsi que le coût, est peu changé par rapport à la méthode d'identification conventionnelle.

B.1.b. Identification directe sur flacon d'hémoculture

Pour gagner encore plus de temps, l'identification directement à partir du flacon d'hémoculture, sans subculture, a été évaluée.

Les flacons d'hémoculture renferment des substances, tels que le milieu de culture, les cellules et les protéines de l'hôte pouvant interférer avec les protéines bactériennes, rendant ainsi l'identification par MALDI-TOF inefficace. Divers protocoles « maisons » et kits commerciaux ont été décrits pour éliminer ces composants et permettre une identification directement à partir du flacon. La majorité des protocoles débutent par une étape de lyse, utilisant un tampon de lyse composé de saponine, de chlorure d'ammonium, d'acide trifluoroacétique, de Triton 10X ou d'eau stérile (64). Cette étape est suivie d'une centrifugation, après quoi le culot bactérien est lavé avec de l'eau, de l'éthanol ou une solution saline. Une dernière centrifugation est réalisée pour recueillir le culot bactérien, qui est ensuite déposé sur une cible, soit immédiatement, soit après avoir appliqué une méthode d'extraction standard pour les isolats bactériens.

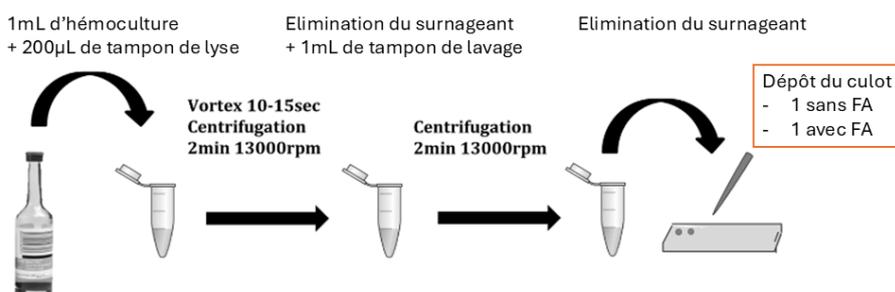
Le kit Sepsityper[®] (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) utilise un processus similaire à celui des différents protocoles maisons publiés et offre l'avantage de fournir un protocole standardisé. Ce kit a été évalué pour la première fois en 2011 (66). 507 bouillons d'hémoculture positifs ont été inclus dont 93,9 % étaient

monomicrobiens et 6,1 % polymicrobiens. Une identification au niveau du genre et de l'espèce a été obtenue dans 379/507 (74,8 %) et 301/507 (59,4 %) bouillons d'hémoculture, respectivement. Cinq des 379 (1,3 %) ont été mal identifiés au niveau de l'espèce, mais pas du genre. Il s'agissait de 4 souches de *Streptococcus mitis/oralis* identifiées à tort comme *Streptococcus pneumoniae* et une souche de *Pseudomonas putida* identifiée comme *Pseudomonas fulva* par le Sepsityper. Parmi 4 bactéries anaérobies, aucune n'a été identifiée. Parmi les 31 bouillons d'hémocultures polymicrobiennes, 20 (64,5%) ont permis d'obtenir l'identification d'un seul pathogène, 10 (32,3 %) n'ont pas été identifiés, et 1 (3,2 %) a été mal identifié au niveau de l'espèce.

Une méta-analyse réalisée en 2015 a colligé les données des études disponibles relatant des performances du kit Sepsityper®. Sur 21 études, au total 3320 hémocultures monomicrobiennes ont été testées. Parmi celles-ci, 2 648 ont permis une identification fiable de l'espèce, soit 79,8 % (67). De manière générale, ce kit est plus performant pour les bactéries à Gram négatif (89,6%) que pour les bactéries à Gram positif (76,1%). Seules 2 études rapportent des meilleurs résultats pour les bactéries à Gram positif. Certains genres bactériens sont plus difficiles à identifier, comme les streptocoques pour lesquels plusieurs études rapportent de fréquentes erreurs d'identification à l'espèce (68). Les performances sont moins bonnes pour les hémocultures polymicrobiennes. Une seule espèce est souvent identifiée (69), voire aucune (70). Les fournisseurs proposent des seuils d'acceptation de l'identification, au genre et à l'espèce en général. Plusieurs auteurs ont montré qu'avec un abaissement du seuil, les mêmes performances peuvent être obtenues, augmentant ainsi le nombre de souches correctement identifiées (64).

Le délai de réalisation des protocoles internes varie entre 15 minutes et 2 heures et impliquent de multiples étapes, ce qui complique leur intégration dans le flux de travail des hémocultures positives. Une nouvelle version appelée Rapid MBT Sepsityper® commercialisée depuis 2021 permet de réduire le temps de manipulation à 10min (Figure 13). L'utilisation du kit Sepsityper® permet de gagner entre 8 et 48h en moyenne (jusqu'à 100 heures dans certaines études) sur le délai global d'obtention de l'identification (67).

a **Rapid Sepsityper® Protocol (10min):**



b **Standard Sepsityper® Protocol (30min):**

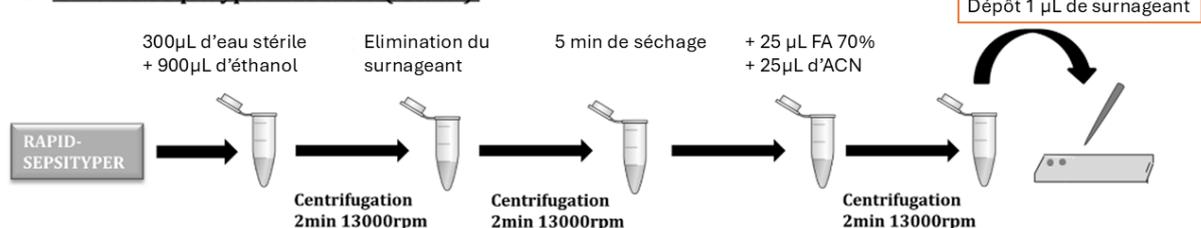


Figure 13 : Protocoles techniques du Rapid Sepsityper® (a) et du Standard Sepsityper® (b) (71)

Le protocole Standard Sepsityper nécessite d'abord d'effectuer le protocole Rapid Sepsityper, puis de poursuivre avec les étapes présentées dans la partie b de la figure. (FA : Acide formique ; ACN : Acétonitrile ; rpm : tours par minute).

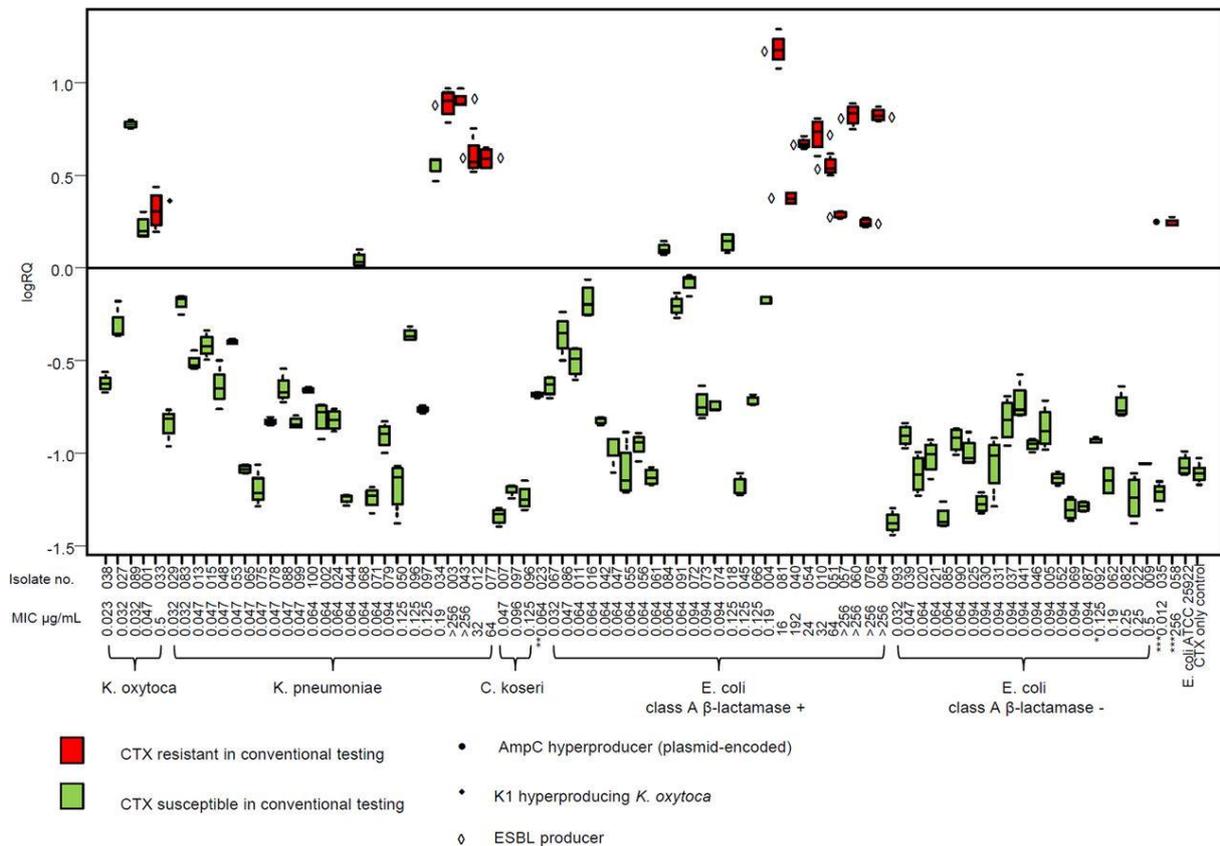
Comparé à l'identification sur culture jeune, le Sepsityper requiert l'investissement dans un kit commercial et plusieurs étapes techniques. L'identification des agents pathogènes à partir de cultures mixtes est un obstacle tant pour la méthode directe qu'avec des cultures jeunes, bien que les deux méthodes permettent d'identifier de manière fiable l'un des organismes dans la plupart des cas. La pureté des cultures doit donc être contrôlée de manière conventionnelle, quelle que soit la méthode d'identification précoce utilisée.

B.1.c. Sensibilité aux antibiotiques

La spectrométrie de masse MALDI-TOF permet aussi de recueillir des données de sensibilité aux antibiotiques. En effet, elle peut détecter la disparition d'un pic spécifique d'une molécule d'antibiotique suite à sa dégradation enzymatique après incubation avec la souche concernée. Cette méthode a d'abord été appliquée aux colonies avant d'être étendue aux hémocultures positives. Plusieurs tests ont été développés pour détecter la résistance aux C3G, classe d'antibiotique largement

utilisée en antibiothérapie probabiliste. L'un d'eux était capable de détecter les souches productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) ou hyperproductrice de la céphalosporinase AmpC en moins de 3 heures, ce qui permet de recourir raisonnablement aux C3G lorsque le test est négatif (72). Des valeurs élevées suggèrent une production probable de BLSE ou d'AmpC, indiquant que le traitement devrait être remplacé par un carbapénème. Ce protocole a été testé directement à partir du flacon d'hémoculture avec une extraction type Sepsityper® optimisée et également après une subculture de 24h sur gélose au sang. La sensibilité était de 100% dans les 2 cas, mais la subculture améliorait la spécificité (97% vs 92%). Un protocole semblable pour la détection des souches productrices de carbapénémases en moins de 60 minutes a également été rapporté, utilisant l'hydrolyse de l'imipénème (73). Bien que la spécificité de 100% du test déconseille l'utilisation des carbapénèmes lorsque le test est positif, ces tests ne détectent que les mécanismes de résistance enzymatique, et pas les mécanismes d'imperméabilité ni la perte de porine (Figure 14).

Le temps de manipulation assez conséquent de cette technique doit être pris en compte. De plus, les réglages du spectromètre pour évaluer la dégradation enzymatique des antibiotiques diffèrent de ceux utilisés pour l'identification. Cette méthode nécessite donc un ajustement des paramètres du logiciel d'acquisition, ainsi qu'une interprétation des données qui n'est pas encore standardisée. Enfin, cette approche permet de tester un nombre limité de molécules. En attendant des développements supplémentaires, l'adoption de cette méthode dans le diagnostic de routine est limitée par ces contraintes pratiques majeures.



Proteus vulgaris* *Proteus mirabilis* *BC containing 1 ampicillin resistant and 1 ampicillin susceptible strain

Figure 14 : Détection des souches d'Enterobacterales productrices de BLSE ou d'AmpC par mesure de l'hydrolyse enzymatique du céfotaxime (CTX) par spectrométrie de masse MALDI-TOF (72)

Une valeur seuil arbitraire de 0 a été fixée pour le logRQ. Chaque échantillon a été testé 4 fois pour évaluer la répétabilité, les résultats sont donc présentés en diagramme en boîte. Tous les isolats phénotypiquement résistants au CTX en raison d'une BLSE ou d'une activité enzymatique AmpC présentaient des valeurs logRQ >0.

B.2. Antibiogramme direct par dilution

Le CA-SFM propose des modalités de réalisation d'antibiogramme en milieu gélosé directement à partir du flacon d'hémoculture positif pour les *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, les staphylocoques, entérocoques et streptocoques. La dilution dépend du genre, présumé par la coloration de Gram. Cela permet de gagner en général 24h sur la méthode conventionnelle. De plus, depuis 2018, l'EUCAST propose de raccourcir le temps d'incubation. Cette méthode est validée pour 8 espèces fréquemment retrouvées dans les bactériémies (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *faecium*, *Acinetobacter baumannii*). Les

diamètres d'inhibition sont validés par espèce et par délai de lecture (4, 6 et 8 heures) (74). Pour faire face à la plus grande variation (car l'inoculum est moins précis) et à la séparation moins nette compliquant la lecture, la notion de zone d'incertitude technique (ZIT) a été introduite. Ainsi, pour chaque temps de lecture, les résultats possibles pour un antibiotique donné sont S, R et ZIT (interprétation non permise). Tous les diamètres ne peuvent pas être lus après 4 heures, il faut alors les lire à nouveau à 6 voire 8 heures, ou lorsque cela est nécessaire, également après 16 à 20 heures (75). Cette méthode a été évaluée dans de nombreux laboratoires européens, en comparaison à la méthode de microdilution de référence. Les résultats montrent que, pour la plupart des hémocultures positives, un résultat valide peut être obtenu après 4 à 6 heures, avec un AC global de 97 % (76). La proportion de zones lisibles après 4, 6 et 8 heures d'incubation était de 88 %, 96 % et 99 % respectivement. Aussi, la proportion de résultats dans la ZIT diminue avec le temps d'incubation. Aucune différence systématique liée au système de culture (automate ou flacons) n'a été détectée.

L'avantage majeur de cette méthode est qu'elle nécessite uniquement du matériel et des compétences déjà disponibles dans les laboratoires cliniques.

B.3. Microscopie en temps réel

Plusieurs systèmes automatisés utilisent la technique de microscopie en temps réel pour la réalisation de l'antibiogramme : Accelerate Pheno[®], QMAC-dRAST et AS^{Tar}[®]. Ils se différencient par leurs panels de bactéries et d'antibiotiques évaluables.

B.3.a. Accelerate Pheno[®]

Le système Accelerate Pheno[®] (Accelerate Diagnostics, Inc., Tucson, AZ, USA) utilise la technologie d'électrofiltration sur gel et l'hybridation in situ en fluorescence (PNA-FISH) pour identifier les pathogènes, en complément de l'imagerie microscopique automatisée pour l'antibiogramme. Le panel comprend 7 bactéries à Gram positif, 8 à Gram négatif et 2 levures (Figure 15). Le temps de manipulation annoncé est inférieur à 5min puisque le système est ensuite entièrement automatisé pour l'identification et l'antibiogramme. L'identification est obtenue en 1 à 2h et l'antibiogramme en 7h. A l'heure actuelle, c'est la seule technologie disponible qui fournit à la fois une

identification rapide et un test de sensibilité phénotypique directement à partir des hémocultures (68). L'une des limites du système est qu'il ne peut traiter qu'un seul échantillon à la fois par module, bien qu'il puisse éventuellement accueillir jusqu'à 4 modules.

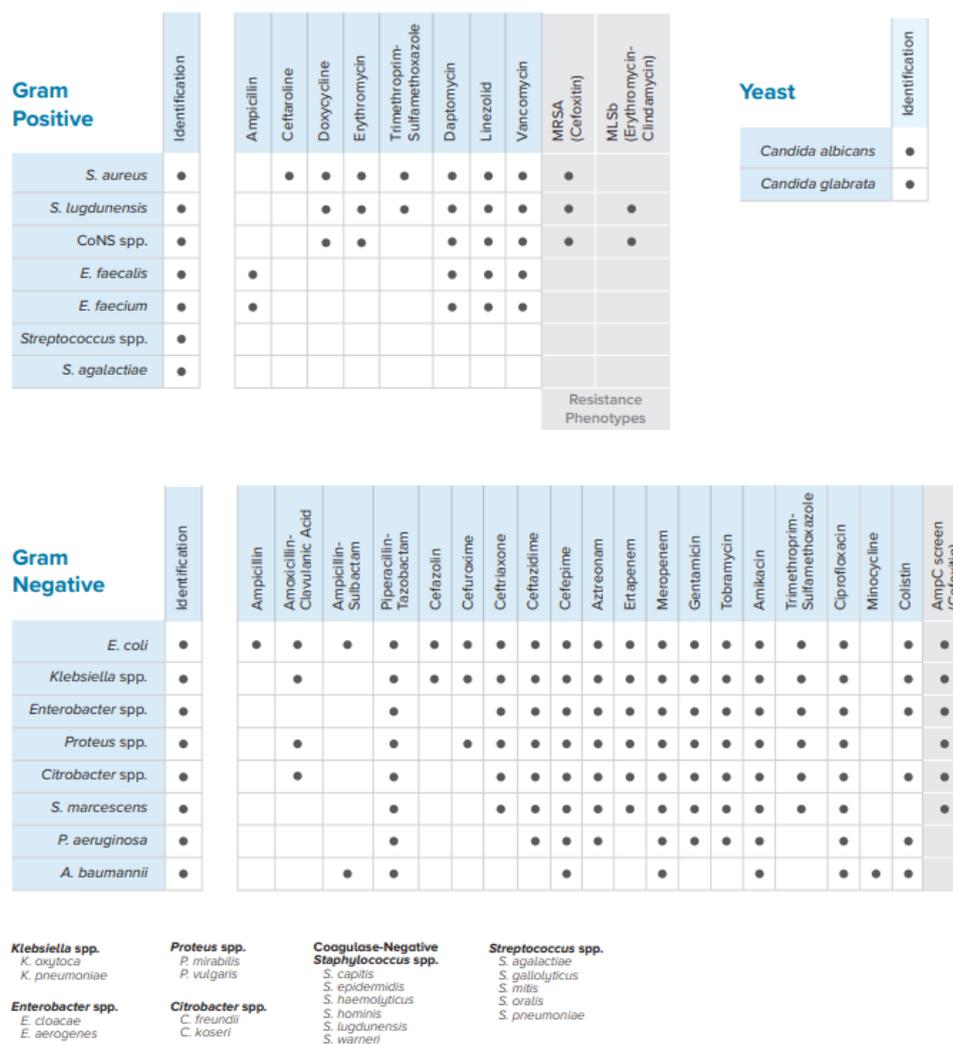


Figure 15: Panel de micro-organismes identifiés par le système Accelerate Pheno® et antibiotiques disponibles

La technique d'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est une méthode éprouvée pour détecter et localiser des séquences spécifiques d'acides nucléiques. La technologie Accelerate Pheno® permet une hybridation rapide de plusieurs oligonucléotides d'ADN marqués, ciblant l'ARN ribosomique bactérien, grâce à un ensemble de tests FISH réalisés simultanément. Pour chaque test, un signal provenant d'une sonde cible est comparé à celui de sondes universelles bactériennes

et eucaryotes. Grâce à la microscopie numérique, la co-localisation du signal de la sonde cible avec celui de la sonde universelle confirme la présence et l'identité de la cible, tout en distinguant les colorations non spécifiques (Figure 16). L'identification détermine automatiquement le choix des antibiotiques à utiliser. L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques est effectuée par analyse morphocinétique cellulaire, qui analyse les caractéristiques phénotypiques des organismes, telles que leur taille, leur forme et leur taux de division, alors qu'ils se développent sous l'effet de concentrations spécifiques d'antibiotiques. A l'aide d'algorithmes et de régressions mathématiques basés sur la réponse d'isolats ayant des CMI connues pour un antibiotique donné, les courbes de croissance sont converties en valeurs de CMI (Figure 16).

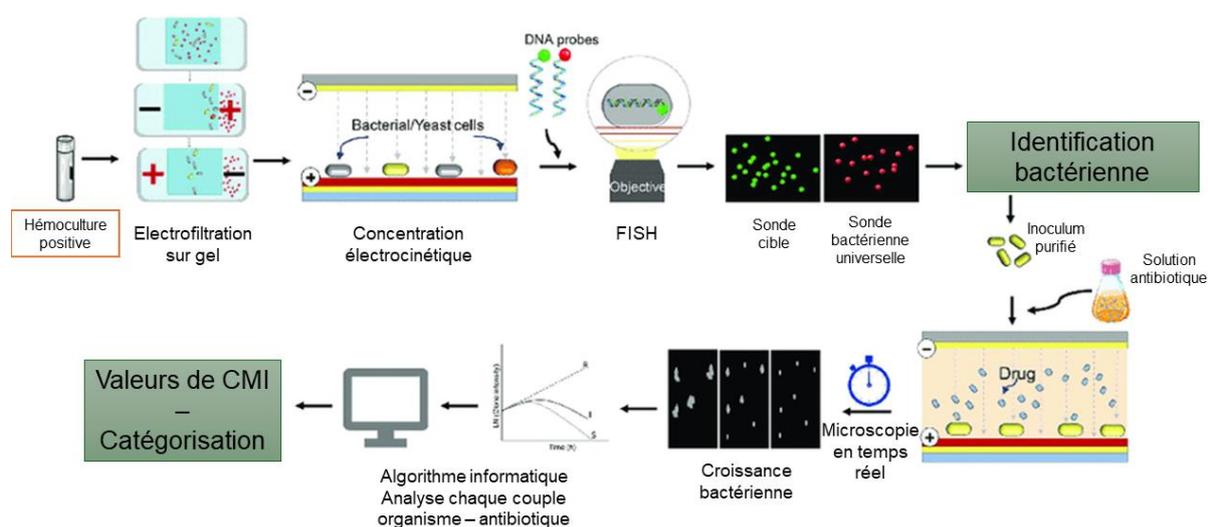


Figure 16 : Workflow schématique du système Accelerate Pheno® pour l'identification et l'antibiogramme à partir d'hémocultures positives (77)

Depuis son approbation par la FDA en 2017, les performances du système Accelerate Pheno® ont été évaluées par de nombreuses équipes.

Pour l'identification, si l'on considère uniquement les micro-organismes compris dans le panel, le taux de concordance avec les méthodes de culture conventionnelles varie de 96 à 100% (68). En revanche, si l'on prend en compte toutes les hémocultures (données pas toujours disponibles selon les articles), on trouve des taux d'identification avec succès de 88,7% à 92,3% (78,79). La différence est due aux micro-organismes que ce système n'est pas capable d'identifier. Les performances sont moins bonnes et plus hétérogènes sur les cultures polymicrobiennes, de 40% à 100% selon les études (68). Quand la culture associe BGN et CGP, l'Accelerate

Pheno® rend en général l'identification du BGN (79). Pour un grand nombre de bactéries, l'identification n'est possible qu'au genre et pas à l'espèce (Figure 15) ce qui est dommageable pour certains genres comme *Streptococcus* spp. pour lequel ce système ne permet pas de trancher contaminant/pathogène selon l'espèce. Certaines bactéries intéressantes manquent à l'appel comme *S. pyogenes*, *Morganella* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* ou les bacilles à Gram positif.

Pour l'antibiogramme, l'AC entre le système Accelerate Pheno® et la méthode conventionnelle varie de 93,7 % à 96,4 % (78,80), une étude ayant constaté une baisse globale pour les bêta-lactamines (céfépime 84,4 %, pipéracilline-tazobactam 86,5 %, ceftazidime 87,6 %) et pour *Pseudomonas aeruginosa* (avec céfépime 33,3 %, pipéracilline-tazobactam 77,8 %, ceftazidime 0 %) (79). Des tests supplémentaires sont nécessaires pour certains organismes, par exemple *Acinetobacter baumannii* et les organismes Gram-négatifs produisant des carbapénémases. Des souches porteuses de BLSE ont été incluses dans les études et le système a correctement détecté les résistances à la pipéracilline-tazobactam, à la ceftriaxone et aux carbapénèmes. Cela démontre le potentiel du système Accelerate Pheno® à détecter les phénotypes MDR (68). L'évaluation des performances d'une nouvelle version du kit d'hémoculture et du système (version 1.4) indique des résultats plus fiables pour les *Enterobacterales*, pour la majorité des antibiotiques fréquemment utilisés (80). Par ailleurs, il ne rend pas d'antibiogramme pour *Streptococcus* spp.

Concernant le délai de rendu des résultats, le système Accelerate Pheno® permet d'identifier les pathogènes environ 27h avant la culture traditionnelle (78). Certains auteurs ont évalué l'impact de l'utilisation de ce système sur la prise en charge du sepsis. Une diminution du délai médian de mise en place d'une l'antibiothérapie ciblée (- 21,2 heures) a été observée pour les bactériémies à BGN, ainsi qu'une diminution de l'utilisation des agents à large spectre au profit des bêta-lactamines à spectre étroit. Aucune différence dans les résultats cliniques n'a été mise en évidence, notamment pour la mortalité hospitalière et à 30 jours, la durée d'hospitalisation, la réadmission ou la récurrence de la bactériémie (81–83). Une étude a montré que la mise en œuvre du système Accelerate Pheno® était associée à une réduction de la durée du séjour (- 1,8 jours) lorsqu'il est intégré dans un système global avec une équipe d'infectiologie (84).

B.3.b. Autres automates

Deux autres systèmes automatisés utilisent la microscopie en temps réel. Contrairement à l'Accelerate Pheno[®], ils ne sont pas couplés à une méthode d'identification.

Le système QMAC-dRAST[™] (QuantaMatrix[®], Inc., Seoul, République de Corée) permet de réaliser des tests phénotypiques de sensibilité directement à partir d'hémocultures positives, en 4 à 6 heures, après coloration de Gram (car il existe deux panels, un pour les bactéries à Gram négatif et un pour celles à Gram positif). L'échantillon d'hémoculture est directement mélangé avec de l'agarose et inoculé dans une micropuce plastique composée de 96 puits contenant des antibiotiques à différentes concentrations. Il ne nécessite pas d'inoculum précis pour obtenir des résultats reproductibles (68). Les études prospectives évaluant ses performances ont montré un AC supérieur à 94,6 % pour les cocci à Gram positif et 92,1 % pour les Gram négatif, même lorsque des organismes hautement résistants étaient inclus. Certaines études ont rapporté un manque de fiabilité pour certaines combinaisons antibiotique-bactérie, telles que *E. coli* et pipéracilline-tazobactam (taux d'erreur majeure de 70,6 %). Un essai contrôlé randomisé de 2021 a montré une réduction significative du temps nécessaire pour obtenir les résultats et une proportion plus élevée de patients recevant des antibiotiques optimaux à 72 heures par rapport aux méthodes conventionnelles. Cela n'a pas permis de réduire les taux de mortalité liés à la bactériémie (85).

Le kit ASTar[®] BC G2 (Q-linea AB, Uppsala, Suède) est lui doté d'un panel de 23 antibiotiques pour les bactéries à Gram négatif exclusivement (*Enterobacterales*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, et *H. influenzae*). Il fournit des résultats en environ 6 heures. Une étude réalisée sur 412 hémocultures simulées et 74 hémocultures cliniques a trouvé un AC de 97,6 % et un AE de 95,8 % par rapport à la méthode de référence, avec un taux d'ETM de 2,4 % (86). Des études plus petites ont trouvé des résultats très similaires (68). ASTar[®] a été capable d'identifier correctement tous les patients nécessitant une escalade thérapeutique et 75 % de ceux éligibles à une désescalade (86,87). Des erreurs ont été rapporté principalement pour l'association amoxicilline/acide clavulanique (68).

B.4. Détection de composés organiques volatils

Le système VITEK® REVEAL™ (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) très récemment autorisé (juin 2024), utilise une technologie de capteurs colorimétriques pour détecter l'émission de composés organiques volatils produits par les populations bactériennes pendant leur croissance. Un réseau de capteurs de molécules volatiles est scellé sur une plaque antibiotique contenant 96 puits dans lesquels est inoculé l'échantillon bactérien. Au-dessus de chaque puit, on retrouve un réseau hexagonal de 7 capteurs qui changent de couleur en réponse aux émissions volatiles produites par la croissance bactérienne (Figure 17).

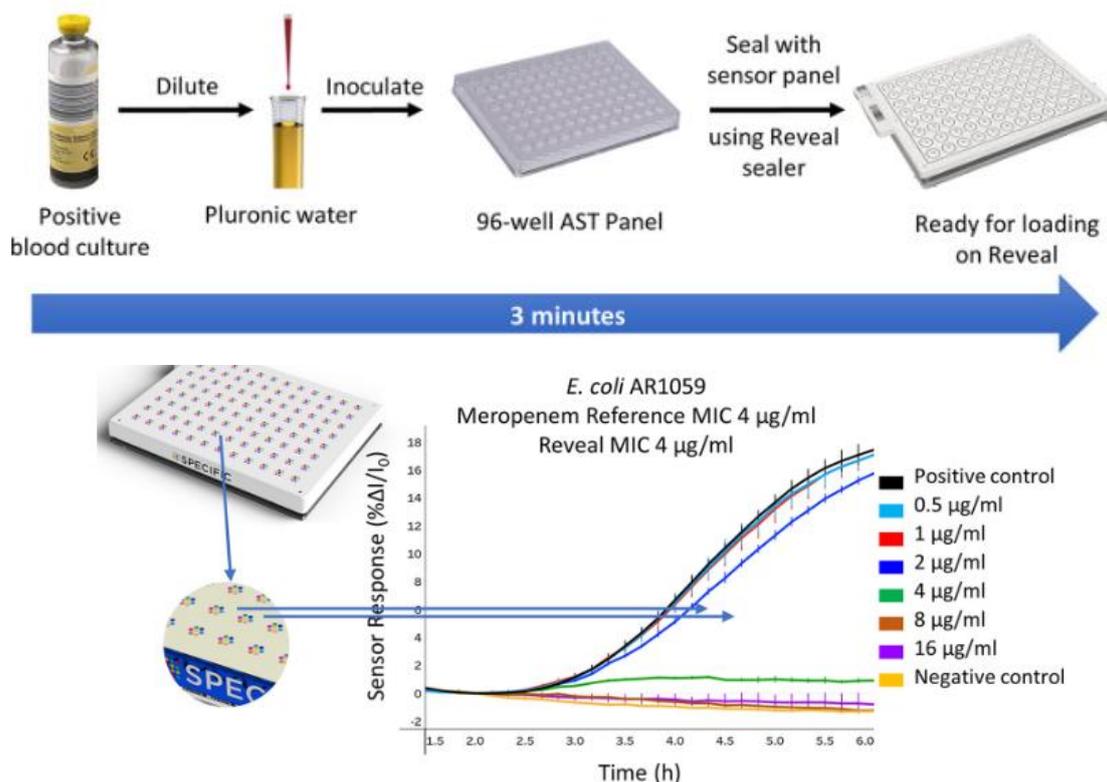


Figure 17 : Manipulation et détermination de la CMI par le VITEK® REVEAL™ (88)

Les signaux du contrôle positif (courbe noire) et des puits de méropénème à des concentrations $\leq 2\mu\text{g/mL}$ indiquent une croissance, tandis que les signaux du contrôle négatif (courbe jaune) et des puits de méropénème à des concentrations $>2\mu\text{g/mL}$ indiquent une absence de croissance. La différence de réponse du capteur dans les puits de croissance par rapport au contrôle négatif permet de déterminer la CMI, qui est de $4\mu\text{g/mL}$ dans ce cas.

C'est un système modulaire, chaque module pouvant traiter 4 échantillons à la fois, une pile de trois modules permet de traiter 12 échantillons. La préparation des échantillons est relativement peu complexe et demande en moyenne 3 minutes. Le

panel comprend 29 antibiotiques, exclusivement pour les bactéries à Gram négatif, et fournit des résultats phénotypiques en 5h30 en moyenne. La colistine ou de nouvelles combinaisons carbapénème/inhibiteur ne font pas partie du panel à l'heure actuelle. Le système requiert l'identification bactérienne pour permettre l'application des breakpoints correspondants et la catégorisation S/SFP/R. L'identification peut être saisie à tout moment par l'utilisateur, pendant ou après l'analyse. En pratique, l'intégration immédiate de ce système dans le flux quotidien après les résultats de la coloration de Gram pourrait entraîner l'échec de certains tests si les bactéries n'entraient pas dans le panel. Le fournisseur recommande de réaliser le test dans les 16h après la positivité de l'hémoculture. Une étude a cependant montré que la précision était indépendante de la durée pendant laquelle le flacon est resté à température ambiante (88). Aussi, il n'y a pas de corrélation entre la quantité d'UFC et les performances du système, suggérant une certaine robustesse du test pour la gamme d'inoculum présent au moment de la positivité du flacon.

De rares études ont évalué ses performances (Tableau 9) (88–91). La technique a été comparée à la méthode de référence de microdilution et aussi à des techniques très utilisées en routine comme le Vitek® 2. Des souches cliniques ont été utilisées, ainsi que des flacons d'hémocultures inoculés avec des souches connues pour certaines résistances, afin de tester ses performances sur des profils particuliers. Les organismes testés étaient les Enterobacterales (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *oxytoca* et *aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter koseri*), *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*. Les différentes données publiées montrent que les résultats du VITEK®REVEAL sont globalement concordants avec la méthode de référence ainsi qu'avec les techniques automatisées largement utilisées. Le test de dépistage des BLSE, qui utilise les CMI des combinaisons céfotaxime/clavulanate et ceftazidime/clavulanate, par rapport aux céphalosporines seules, a mis en évidence la présence de toutes les BLSE rapportées par les tests conventionnels. Plusieurs études s'entendent sur le fait que ce nouveau système a plutôt tendance à sous-estimer les CMI, parfois de façon majeure tel que pour l'association ceftazidime/avibactam vis-à-vis des *Enterobacterales* (biais de – 78,9%)(90,91). Des performances moyennes ont été relevées concernant la sensibilité de *K. pneumoniae* au méropénème (AC de 61,9%) (90). Cela n'est pas retrouvé vis-à-vis de l'imipénem et de l'ertapénème. Les auteurs mettent en cause les breakpoints

de l'EUCAST car avec les critères CLSI les performances sont rattrapées. Toutes les études ont exclu les hémocultures polymicrobiennes. Certaines espèces (*C. koseri*, *K. aerogenes*, *E. cloacae* ou encore *K. oxytoca*) sont peu représentées dans les cohortes, rendant les conclusions peu significatives, de même pour le phénotype AmpC inducible pour lequel il n'y a pas de données exploitables (88,91).

Tableau 9 : Performances du rendu d'antibiogramme par le VITEK® REVEAL™ (88–91)

	Délai moyen (h)	AC (%)	AE (%)	ETM (%)	EM (%)	Em (%)
Tibbetts <i>et al.</i>	4,6	96,3	98,0	1,3	0,3	3,5
Bianco <i>et al.</i>	-	97,6	97,7	1,6	1,2	2,4
Menchinelli <i>et al.</i>	4,4 – 5,54	99,2	98,8	0,4	0,3	1,0
Antonelli <i>et al.</i>	5,4	-	> 90	-	-	-

Le délai moyen de rendu des résultats varie entre 4 et 5 heures (Tableau 9), comme annoncé par le fournisseur. Il semble plus court pour les organismes résistants que pour les souches sensibles (91), bien que certaines études n'ait pas trouvé de différence significative (88). Une étude rétrospective monocentrique française a évalué l'impact potentiel du VITEK® REVEAL sur la gestion du flux de travail des hémocultures positives, ainsi que sur les adaptations potentielles de l'antibiothérapie (92). Son utilisation a conduit à une réduction significative du temps d'analyse et du délai de résultats par rapport à la méthode standard utilisant VITEK®2 (7,1 h VS 9,6 h, sans inclure le temps de sous-culture nécessaire, qui était en moyenne de 12,8 h). Le temps moyen d'adaptation des antibiotiques était significativement plus court lors de l'implémentation du VITEK®REVEAL (34,9 h VS 51,6 h). Il est important de noter que, tandis que les données de la méthode standard sont observées, les données concernant le VITEK®REVEAL sont simulées. Des études supplémentaires dans divers contextes de laboratoire sont nécessaires pour valider ces résultats encourageants.

B.5. Cytométrie en flux

Grâce à la cytométrie en flux, il est possible de suivre les changements de morphologie, d'activité physiologique et métabolique, ainsi que la survie des micro-organismes après leur exposition aux antibiotiques (93). Les effets du traitement sont visibles en quelques heures. En utilisant des colorants nucléaires qui ne traversent pas les parois cellulaires des organismes sains, il est aussi possible de déterminer rapidement le nombre de cellules mourantes et mortes. Pour déterminer le spectre d'émission, les cellules doivent passer dans un canal de flux et être excitée par un laser pour libérer le colorant.

La méthodologie brevetée et semi-automatisée FASTinov[®] (FASTinov SA, Porto, Portugal) repose sur la détection précoce des lésions cellulaires microbiennes ou des changements métaboliques, en utilisant une combinaison de sondes fluorescentes spécifiques qui ciblent ces changements et les rendent identifiables par cytométrie en flux. Des antibiotiques sont utilisés à différentes concentrations permettant l'interprétation catégorielle (et non le rendu des CMI) basée sur les critères EUCAST ou CLSI par un logiciel propriétaire intégré (bioFAST). Il existe un panel de 7 antibiotiques pour les bactéries à Gram positif, utilisable sur les souches de *Staphylococcus* spp. et *Enterococcus* spp. (pénicilline, ampicilline, céfoxitine, oxacilline, vancomycine, linézolide et gentamicine). Il inclut la CMI de la vancomycine pour *S. aureus*. Le panel Gram négatif comprend lui 12 antibiotiques pour les souches d'*Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. et *Acinetobacter* spp. (ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique, céfotaxime, ceftazidime, céfépime, pipéracilline-tazobactam, ceftolozane-tazobactam, ceftazidime-avibactam, méropénème, ciprofloxacine, gentamicine et amikacine). Il inclut la détection des BLSE et le dépistage de la présence d'AmpC et des carbapénémases (68). En pratique, la préparation à partir de l'hémoculture positive prend une dizaine de minutes, après quoi une intervention humaine est requise de manière intermittente pendant quelques minutes. Les résultats sont obtenus en moins de 2 heures, ce qui est l'avantage majeur de cette technologie.

Les études sont rares, essentiellement dans des équipes portugaises d'où provient l'automate. Dans la première étude publiée évaluant l'impact potentiel de FASTinov[®], seules les bactéries à Gram négatif ont été incluses, avec un AC de 98% avec la méthode de microdilution de référence et un taux d'Em, EM et ETM

respectivement de 1,03%, 1,59% et 1,06%. Il a également permis une détection correcte des souches productrices de BLSE (AC = 100%) (94). D'autres études incluant des hémocultures simulées et cliniques, tant Gram positives que négatives, ont trouvé des valeurs d'AC supérieures à 96,4% pour les Gram négatif et 98,6% pour les Gram positif. Les ETM variaient jusque 0,6% (95,96).

Un des principaux défis futurs sera d'améliorer la capacité du système à différencier les dommages cellulaires causés par des antibiotiques bactéricides ou bactériostatiques, tout en résolvant le problème de l'autofluorescence chez certaines espèces bactériennes. De plus, une validation considérable est nécessaire pour confirmer la base de données cliniques et la méthode elle-même.

B.6. Diffusion de la lumière laser

L'Alfred 60 AST® (Alifax S.r.l., Polverara, Italie) est un dispositif automatisé basé sur la technique de diffusion laser, qui fournit des résultats de sensibilité aux antibiotiques directement à partir de flacons d'hémoculture positive, en 4 à 6 heures. Chaque préparation prend environ 15 minutes. Le nombre d'échantillons pouvant être testés dépend de la quantité d'antibiotiques choisis (par exemple, 10 isolats peuvent être testés simultanément pour 6 antibiotiques). Le panel d'antibiotiques étant choisi par l'utilisateur, une identification préalable (ou *a minima* le résultat de la coloration de Gram) est nécessaire. Il n'est pas validé pour les streptocoques et *Stenotrophomonas maltophilia* (97). Cette technologie ne rend pas de valeur de CMI mais uniquement une catégorisation.

En pratique, 30 µL d'une hémoculture positive sont inoculés dans un bouillon. La diffusion de la lumière est mesurée jusqu'à ce que la turbidité atteigne un niveau de 0,4-0,6 McFarland. Une série d'antibiotiques est ensuite inoculée de façon automatisée. Les interférences causées par des substances non répliquatives, telles que les érythrocytes, les leucocytes, les cellules mortes et les sels présents dans l'échantillon, sont éliminées lors de la première lecture du zéro. Un faisceau laser traverse l'échantillon, et deux photodétecteurs placés à des angles de 30° et 90° captent les signaux générés par la lumière diffusée par les bactéries présentes. Les courbes de croissance cinétique sont générées pour chaque détecteur et présentées sous forme de deux courbes (Figure 18). Un pourcentage d'inhibition de croissance

est calculé en comparant à la croissance d'un contrôle positif (sans antibiotique). Il est rapporté en trois catégories : résistant (inhibition < 50 %), intermédiaire (inhibition entre 50 et 65 %) et sensible (inhibition > 65 %). Afin de garantir une détection fiable de l'inhibition de la croissance, il est nécessaire de détecter une croissance suffisante ($\geq 700\ 000$ UFC/ml). Si ce critère n'est pas respecté, le test est rendu invalide (98).

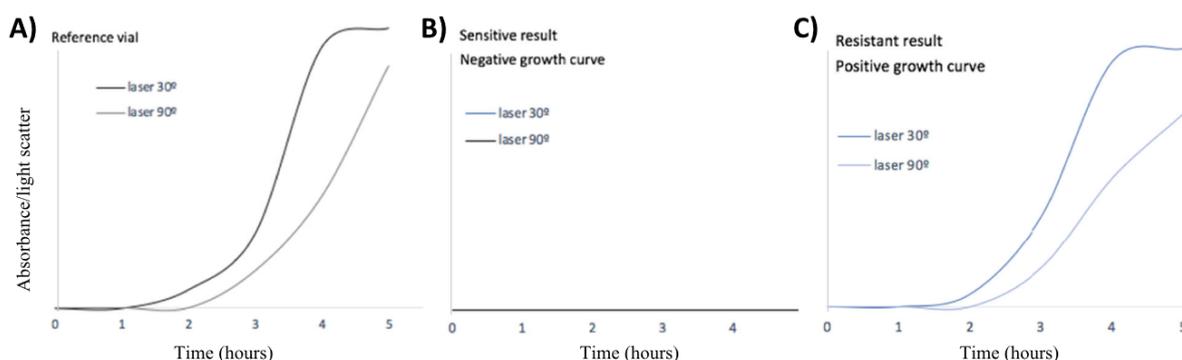


Figure 18 : Représentation des courbes de croissance analysées par le système Alfred 60 AST™ (98)

Les courbes représentent les signaux lumineux diffusés reçus par les photodétecteurs placés à 30° et 90° du faisceau laser. A) représente la courbe de croissance standard (sans présence d'antibiotique) B) représente un résultat sensible, pas de courbe de croissance C) représente un résultat résistant, la courbe de croissance est positive, comparable à celle du flacon de référence.

Il est difficile de comparer les études évaluant l'Alfred 60 AST™ entre elles, car les souches incluses (espèces et profils de sensibilité) mais surtout les panels d'antibiotiques choisis varient d'une étude à l'autre comme l'utilisateur est totalement libre. L'AC avec les méthodes conventionnelles est supérieure à 90 % dans la plupart des études, une seule étude montrant une faible AC de 62,1 % (68). Cela peut être expliqué par le fait qu'il s'agit de l'étude la plus ancienne (2016) et que le fabricant a depuis optimisé les réactifs au fil des évaluations. Les équipes s'entendent sur des problèmes de discordances pour la piperacilline/tazobactam vis-à-vis des bactéries à Gram négatif. Ceci est connu du fabricant et des modifications dans la formulation du réactif ont permis de corriger une partie de ces erreurs. De même, des incohérences de concentration de la céfoxitine dans le panel ont été rapportées pour le dépistage de la méticillino-résistance chez les SCN (98), ce qui rend difficile l'interprétation des résultats. Un taux non négligeable d'exclusion est rapporté dans certaines études, jusqu'à 21%, en raison d'absence de croissance bactérienne (organismes anaérobies ou microaérophiles), de croissance insuffisante ou de culture polymicrobienne (97).

La durée de l'analyse est en moyenne de 6h (1h à 1h30 pour atteindre la turbidité requise puis 5h en présence d'antibiotiques). Dans une étude évaluant l'impact clinique de ce nouveau système, le rendu plus rapide de l'antibiogramme a permis d'initier plus tôt un traitement efficace (chez les patients qui ne recevaient pas d'antibiothérapie empirique), d'éviter une deuxième dose d'aminosides et de réduire le délai d'introduction d'une antibiothérapie optimale (99). Cependant, même s'il a été démontré que les résultats de sensibilité peuvent être obtenus plus rapidement, aucune étude n'a encore mis en évidence un impact sur la mortalité ou la durée de séjour des patients.

B.7. Adaptation des tests immunochromatographiques de détection de la résistance

En parallèle de ces méthodes rendant des antibiogrammes complets, des tests rapides complémentaires peuvent être utiles pour détecter de façon précoce certains profils de résistance. Ces tests ne fournissent aucune information sur l'identification bactérienne, ils se limitent à détecter la présence ou l'absence de certains mécanismes de résistance. Il est donc nécessaire d'avoir identifié la bactérie au préalable.

Des tests colorimétriques ont été développés pour détecter la dégradation enzymatique des β -lactames en utilisant un substrat chromogène ou un indicateur de pH pour provoquer un changement de couleur dans le milieu. Initialement conçus pour être réalisés sur des colonies, certains de ces tests ont été évalués directement sur des culots d'hémocultures positives, avec des résultats obtenus en moins d'une heure. Une étude prospective sur 132 hémocultures positives à BGN a étudié les performances du β Lacta[®] Test (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) comparé à la méthode de diffusion standard comprenant la recherche de BLSE par synergie. La sensibilité était de 95,7% et la spécificité de 100% (100). Ils ont montré que la présence simultanée d'*Enterobacterales* et de cocci à Gram positif n'avait pas d'impact sur le résultat du test. Comme l'avait déjà démontré de précédentes études sur les colonies, ce test ne parvient pas à détecter les souches surexprimant AmpC. Des tests similaires existent pour détecter les *Enterobacterales* résistantes à la colistine.

De la même manière, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM) peuvent être mises en évidence à l'aide d'un test immunochromatographique détectant la protéine de liaison à la pénicilline 2a (PLP2a). Le test BinaxNOW® PBP2a (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA) peut être utilisé directement sur flacon d'hémoculture. Il a montré de très bonnes performances pour *S. aureus* (Se = 95,24 – 100% et Sp = 100%) mais n'est pas fiable pour les autres espèces de staphylocoques (101,102).

C. Tests génotypiques

La plupart des méthodes de biologie moléculaire sont basées sur l'amplification, l'hybridation ou le séquençage. Dans les méthodes basées sur l'amplification, la séquence du gène cible est amplifiée pour permettre la détection ; dans les techniques basées sur l'hybridation, des sondes d'acide nucléique hybridées ciblent des séquences de gènes permettant la détection ; et dans les approches basées sur le séquençage, les séquences du génome sont entièrement analysées.

C.1. PCR multiplex

La méthode d'amplification la plus couramment utilisée pour la détection de gènes spécifiques est la réaction en chaîne par polymérase (PCR). Des tests multiplex, permettant d'analyser simultanément différentes espèces et plusieurs déterminants génétiques, ont été conçus. Ces tests permettent généralement d'identifier une large gamme de gènes, tels que ceux codant pour les céphalosporinases ou les carbapénémases, ainsi que le gène *mecA*, responsable de la résistance à la méticilline chez les SARM. Ces méthodes moléculaires ont été développées et testées en tant qu'alternative ou complément à l'antibiogramme conventionnel. Ils sont plus rapides que les tests phénotypiques basés sur la culture, les résultats étant disponibles dans un délai d'une à quelques heures.

Actuellement, 3 systèmes principaux permettent d'identifier les micro-organismes et les gènes de résistance associés à partir des flacons d'hémoculture positifs. Ils se différencient par leurs technologies moléculaires mais aussi par l'étendue de leur(s) panel(s).

C.1.a. BioFire® Blood Culture Identification 2 (BCID2)

Les tests BioFire® FilmArray® (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA) sont des tests PCR en deux étapes, réalisés dans un système en plastique fermé, jetable et à usage unique. La préparation du test nécessite quelques minutes et fournit des résultats en 1 heure environ. Le panel BCID2 est conçu pour identifier simultanément 30 agents étiologiques de sepsis (9 Gram positif, 14 Gram négatif et 7 levures) ainsi que des gènes de résistance courants (Figure 19). L'instrument Biofire® Torch® peut abriter 2 à 12 modules selon le débit prévu. Les échantillons peuvent être lancés au coup par coup sans impact sur le délai de résultat.

Cibles du BioFire BCID2 Panel

BACTÉRIES À GRAM NÉGATIF

Complexe *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*
Bacteroides fragilis
Enterobacterales
Complexe *Enterobacter cloacae*
Escherichia coli
Klebsiella aerogenes
Klebsiella oxytoca
Groupe *Klebsiella pneumoniae*
Proteus
Salmonella
Serratia marcescens
Haemophilus influenzae
Neisseria meningitidis
Pseudomonas aeruginosa
Stenotrophomonas maltophilia

BACTÉRIES À GRAM POSITIF

Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Listeria monocytogenes
Staphylococcus
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus lugdunensis
Streptococcus
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes

LEVURES

Candida albicans
Candida auris
Candida glabrata
Candida krusei
Candida parapsilosis
Candida tropicalis
Cryptococcus neoformans/gattii

GÈNES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Carbapénémases

IMP
KPC
OXA-48-like
NDM
VIM

Résistance à la colistine

mcr-1

BLSE

CTX-M

Résistance à la méticilline

mecA/C
mecA/C et MREJ (SARM)

Résistance à la vancomycine

vanA/B

Figure 19 : Panel de micro-organismes et de gènes de résistance détectés par le BioFire® BCID2

Les études évaluant le BioFire® BCID2 ont démontré de bonnes performances pour la détection de ces cibles, particulièrement pour les cultures monomicrobiennes. Un taux de résultats invalides très faible est rapporté (103). Une méta-analyse de 2022 a montré que la spécificité du test était particulièrement excellente pour toutes les cibles étudiées. La sensibilité du BCID2 était élevée (> 95 %) pour les cibles cruciales, telles que les *Enterobacterales*, *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *P. aeruginosa*, *Enterococcus* spp. et *Candida* spp., ainsi que pour certains facteurs majeurs de résistance comme les BLSE de type CTX-M, les carbapénémases et *mecA/C* (> 90 %). Certains résultats

faussement positifs ont été observés, notamment pour *Staphylococcus epidermidis*, où la limite inférieure de l'intervalle de confiance pour la spécificité était de 93,1 %, ainsi que pour *mecA/C*. Dans la majorité de ces cas, *S. epidermidis* a souvent été identifié à la place d'autres SCN. Une autre limitation observée était l'incapacité à prédire systématiquement la résistance aux céphalosporines de troisième génération dans les isolats présentant des mécanismes de résistance. Le système n'a pas toujours détecté le gène *ctx-m* codant pour les BLSE lorsqu'il était présent. En effet il n'est pas capable de détecter tous les variants CTX-M, bien qu'il détecte la majorité d'entre eux (103). De plus, les autres gènes codant une résistance aux céphalosporines ne sont pas recherchés. Cela peut limiter l'interprétation notamment pour les souches d'*E. cloacae* pour lequel la proportion de CTX-M parmi les BLSE est moindre que pour *E. coli* ou *K. pneumoniae*.

Cinq études ont fourni des données sur la concordance pour des échantillons d'hémocultures polymicrobiennes. Dans l'ensemble, la concordance totale entre les deux méthodes était de 83%, comprenant l'identification des pathogènes et la détection des marqueurs de résistance (103).

Plusieurs études ont montré que le délai de résultat à partir du prélèvement de l'hémoculture était significativement diminué grâce à l'utilisation du BioFire® par rapport à la méthode conventionnelle, que ce soit pour l'identification (jusqu'à 10h) ou pour la mise en évidence de résistance (jusqu'à 28h) (103). Un essai randomisé axé principalement sur la durée du traitement antibiotique, a montré que l'ajout de commentaires d'interprétation aux résultats du BioFire® entraînait une réduction de l'utilisation d'antibiotiques à large spectre (- 12 heures pour l'association pipéracilline-tazobactam) (83). Une autre étude menée par MacVane *et al.* a démontré que l'ajout du BioFire® à un programme de gestion des antibiotiques existant permettait une identification plus rapide des micro-organismes (17 heures contre 57 heures) et une désescalade plus rapide des antibiotiques (48 heures contre 63 heures) (104). Toutefois, dans les deux études, aucun impact n'a été observé en termes de mortalité, de durée d'hospitalisation ou de coût.

C.1.b. Verigene®

Le Verigene® System (Luminex Corporation, Austin, TX, USA) utilise la technologie des puces à ADN pour détecter la présence de séquences spécifiques d'acides nucléiques grâce à de courts oligonucléotides complémentaires immobilisés sur une surface solide. Étant donné que ces oligonucléotides peuvent être disposés très rapprochés les uns des autres, cette méthode permet de détecter plusieurs séquences en un seul essai. Elle offre ainsi la possibilité de détecter simultanément et en parallèle différents agents pathogènes et un grand nombre de gènes de résistance. Il comprend 2 panels avec respectivement 13 bactéries à Gram positif et 9 à Gram négatif, ainsi que les gènes de résistance associés (Figure 20). Une coloration de Gram est donc nécessaire afin de choisir le panel à utiliser. Il ne sait pas distinguer *E. coli* de *Shigella* spp. (105). Les résultats sont disponibles dans un délai de 2h30 avec un temps de manipulation de 5 minutes (68).

VERIGENE® BC-GP	VERIGENE® BC-GN
Species	Species
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> *
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Streptococcus anginosus</i> Group	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Genus
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Citrobacter</i> spp.
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacter</i> spp.
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Proteus</i> spp.
Genus	Resistance
<i>Staphylococcus</i> spp.	CTX-M (ESBL)
<i>Streptococcus</i> spp.	IMP (carbapenemase)
<i>Listeria</i> spp.	KPC (carbapenemase)
Resistance	NDM (carbapenemase)
<i>mecA</i> (methicillin)*	OXA (carbapenemase)
<i>vanA</i> (vancomycin)**	VIM (carbapenemase)
<i>vanB</i> (vancomycin)**	

Figure 20 : Panel de bactéries et de gènes de résistance détectés par le Verigene®
En Europe, *Micrococcus* spp. et *Serratia marcescens* font aussi partie du panel.

Pour le panel Gram positif, les différentes études rapportent des taux d'identification d'environ 90% pour les hémocultures monomicrobiennes, mais ce pourcentage chute

à 62,5 % pour les cultures polymicrobiennes. Concernant les Gram-négatif, le système identifie correctement les pathogènes dans 80 à 93 % des flacons d'hémocultures monomicrobiennes et dans 77,8 % des cultures polymicrobiennes (68). Le gène de résistance *mecA/C* est détecté avec une sensibilité de 95,2 %, avec des performances de détection légèrement plus élevées chez *S. aureus* que chez *S. epidermidis*. Ce gène n'est pas détecté pour les autres espèces de staphylocoques.

Quelques études ont évalué l'impact clinique de ce système. Pour exemple, une étude de Walker *et al.* a révélé que les patients atteints de bactériémie à Gram négatif avaient une durée de séjour en soins intensifs plus courte (12 jours contre 16,2 jours), une mortalité à 30 jours plus faible (8,1 % contre 19,2 %) et plus particulièrement une mortalité due aux bactéries multirésistantes moins élevée (12,5 % contre 63 %) (106).

C.1.c. Cobas® eplex

L'ePlex® System (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) est un système de diagnostic moléculaire automatisé. Il comprend une préparation d'échantillons basée sur la microfluidique et l'amplification associée à la technologie de détection eSensor® (GenMark Diagnostics, Carlsbad, CA, USA) pour la détection électrochimique de l'ADN cible au sein de la même cartouche.

Les panels d'identification des hémocultures Cobas® eplex sont les plus larges disponibles pour le diagnostic des bactériémies (Figure 21). Ils incluent la détection de contaminants potentiels des hémocultures (*Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Cutibacterium acnes*), ce qui peut permettre une désescalade plus rapide du traitement antibiotique. L'inclusion de pathogènes résistants à de nombreux antibiotiques, tels que *Stenotrophomonas maltophilia*, peut faciliter l'initiation précoce du traitement et les bacilles anaérobies à Gram négatif, tels que *Fusobacterium* spp. ou *Bacteroides fragilis*, ce qui incite à ajouter une couverture anaérobie aux antibiothérapies probabilistes. En ce qui concerne les gènes de résistance, on peut noter la présence du gène *mecC*, plus rarement responsable de la méticillino-résistance. Comme pour le Verigene®, la coloration de Gram est primordiale pour choisir le panel à utiliser. Cependant, le panel Gram positif comprend un marqueur

Pan Gram négatif et inversement, ce qui peut aider à détecter les hémocultures polymicrobiennes.

Panel à Gram positif	Panel à Gram négatif	Panel d'agents pathogènes fongiques
Groupe <i>Bacillus cereus</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>
Groupe <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Candida auris</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Candida famata</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobacter</i> (non-cloacae complex)	<i>Candida glabrata</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Listeria</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Candida lusitanae</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Staphylococcus</i>	Groupe <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Proteus</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Groupe <i>Streptococcus anginosus</i> group	<i>Salmonella</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Serratia</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (GAS)	<i>Serratia marcescens</i>	
Gènes de résistance	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
<i>mecA</i>	Gènes de résistance	
<i>mecC</i>	CTX-M	
<i>vanA</i>	ME	
<i>vanB</i>	KPC	
Cibles Pan	NDM	
Pan Gram négatif	OXA	
Pan- <i>Candida</i>	VIM	
	Cibles Pan	
	Pan Gram positif	
	Pan- <i>Candida</i>	

Figure 21 : Panel de micro-organismes et de gènes de résistance détectés par le cobas ePlex® BCID

Selon les études, la concordance avec la méthode conventionnelle varie de 89 à 97% pour le panel Gram négatif et de 89 à 100% pour panel Gram positif (68). La présence de marqueurs Pan dans les deux panels aident à l'analyse des hémocultures polymicrobiennes, bien que la plupart des divergences retrouvées dans les résultats concernent encore des échantillons polymicrobiens. Ces marqueurs uniques peuvent alerter sur la présence éventuelle d'un deuxième organisme.

Comme pour les deux techniques similaires vues précédemment, l'impact clinique de ce système repose sur la réduction significative du délai de résultat amenant à un traitement optimal plus rapide, que ce soit un arrêt des antibiotiques inutiles ou une escalade en cas de gènes de résistance détectés (107–110).

C.2. Résonance magnétique T2MR[®]

La résonance magnétique T2 est une méthode basée sur les changements dans le signal de relaxation T2 des protons de l'eau en présence de champs magnétiques. Plus précisément, le T2MR[®] System (T2 Biosystems, Lexington, MA, USA) détecte les acides nucléiques en utilisant deux populations différentes de nanoparticules superparamagnétiques, qui se lient aux sondes hybridant respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'ADN cible. Lors de l'hybridation aux sondes, l'ADN cible induit l'assemblage des nanoparticules en un cluster, nécessitant seulement quelques copies d'acides nucléiques pour que le signal du cluster soit détecté (Figure 22) (111–113). Toutes les étapes du test sont automatisées par l'instrument T2Dx. Il a été mis au point pour détecter les cellules microbiennes à des concentrations aussi faibles que 1 UFC/mL directement sur du sang total (tube EDTA), sans passer par l'étape d'incubation de l'hémoculture. Il semblerait qu'il détecte les organismes entiers et non l'ADN circulant. Le panel T2Bacteria peut détecter six espèces (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, et *E. coli*), appelés pathogènes ESKAPE, en 3 à 5 heures. La préparation est simple et dure environ 5 minutes.

Les études évaluant la performance clinique de la méthode pour détecter les pathogènes cibles dans le sang total ont montré des sensibilités allant de 83 à 100 % et des spécificités de 90 à 100 % (68,113). La sensibilité chute à 43 % pour la détection de tout organisme d'infection sanguine dans une étude de 2019 menée par Nguyen *et al.* (114), ceci dû à la faible couverture du panel. Un résultat problématique des études comparant la concordance entre le panel T2Bacteria et les hémocultures était les résultats T2Bacteria-positif/hémoculture négative. Ce taux peut inclure soit des hémocultures faussement négatives, soit des faux positifs du T2Bacteria. Un travail de 2018 de De Angelis *et al.* montré que les résultats T2Bacteria-positif/hémoculture négative étaient significativement plus fréquents chez les patients recevant un traitement antibiotique (115), ce qui peut expliquer l'inhibition de la culture. Les

performances du test se sont améliorées lorsqu'un « critère d'infection véritable » a été utilisé comme comparateur au lieu des hémocultures (c'est-à-dire le micro-organisme détecté uniquement par T2Bacteria, mais cultivé à partir d'un autre type d'échantillon reflétant la source de l'infection) (115), ou lorsque les bactériémies probables et possibles étaient incluses comme comparateurs en plus des bactériémies avérées (114). Cela a permis de classer certains des résultats T2Bacteria-positifs/hémoculture négative comme des vrais positifs. De même, d'autres études ont montré que les résultats discordants T2Bacteria-positif/hémoculture négative étaient associés à des infections localisées (abcès, pneumonie, ostéomyélite), ce qui pourrait alors correspondre à la détection d'une bactériémie intermittente de concentration trop faible pour être détectée par la culture conventionnelle (116).

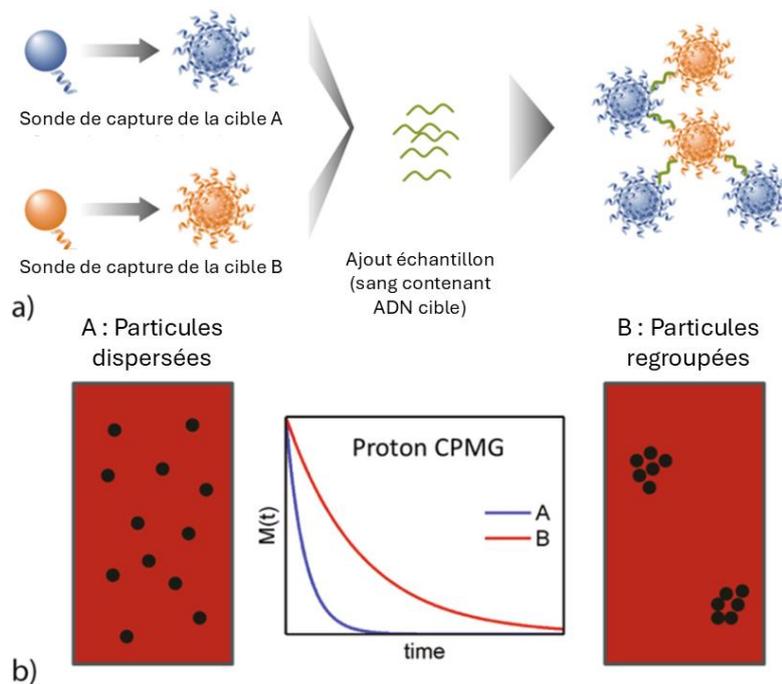


Figure 22 : Principe de la détection d'acides nucléiques par le système T2MR® (117)

a) Les particules magnétiques sont fonctionnalisées avec des sondes oligonucléotidiques qui provoquent le regroupement des particules en présence de l'ADN cible. b) Lorsque le signal magnétique normalisé ($M(t)$) est tracé en fonction du temps, les particules regroupées (B) présentent une décroissance du signal plus lente, ou un signal T2MR plus long, que les particules dispersées (A).

Dans une revue systématique récente de Giannella *et al.*, l'utilisation du T2MR a été associée à un délai plus court pour l'identification de l'espèce (– 77 heures) permettant une antibiothérapie ciblée plus précoce (– 42 heures). Une durée d'hospitalisation plus

courte (– 4,8 jours) et une durée de séjour en unité de soins intensifs plus courte (– 5 jours) ont aussi été mises en évidence mais de manière moins significative (118).

Un panel T2Resistance a été développé mais n'est utilisable qu'en recherche. Il détecte les gènes de résistance suivants : KPC, CTXM-14/15, NDM/IMP/VIM, AmpC, OXA, *vanA*, *vanB*, et *mecA/mecC*. Une unique étude observationnelle prospective a évalué ses performances. La sensibilité du T2R pour identifier les gènes du panel, en comparaison avec les systèmes standards de détection de résistance moléculaire et les tests phénotypiques, était de 100 % pour les gènes CTXM-14/15, NDM/IMP/VIM, AmpC et *mecA/mecC*, et de 87,5 % pour KPC (119).

Malheureusement, la société T2 Biosystems a tout récemment cessé ses activités. Nous avons malgré tout choisi de présenter leur technologie en raison de son caractère innovant.

C.3. Métagénomique

La métagénomique fait référence au séquençage des acides nucléiques d'un échantillon. Il existe deux grandes stratégies de séquençage : le séquençage ciblé et le séquençage non ciblé, aussi appelé métagénomique sans a priori ou shotgun. Le séquençage ciblé vise des régions conservées universelles. Chez les bactéries, on utilise en général l'ARN 16S. Contrairement à ça, la métagénomique shotgun cible l'ensemble du contenu génétique présent dans l'échantillon, ce qui permet de détecter tous les agents pathogènes potentiels que sont les bactéries, virus, champignons et parasites, mais aussi les gènes impliqués dans la résistance aux antimicrobiens, ce qui rend cette technique très intéressante.

Elle fait l'objet de nombreuses études en raison de la grande diversité des technologies de séquençage actuellement disponibles dans de nombreuses plateformes commerciales. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients spécifiques en termes de longueur des lectures (allant de 25 pb à 10 kb), de débit, de temps d'exécution, du taux d'erreur global, ainsi que du coût. Des approches transcriptomiques basées sur l'ARN ont également été explorées. Cependant, malgré ces avantages, il n'est pas encore utilisé dans la pratique clinique en raison des délais

d'exécution, des contaminations parasites et du coût élevé par rapport aux méthodes traditionnelles et émergentes.

C.3.a. Description générale

La première étape dans la réalisation d'un test mNGS est l'extraction des acides nucléiques (Figure 23), qui est effectuée à l'aide de méthodes standards, similaires à celles utilisées dans les tests PCR classiques.

Après l'extraction, le mélange d'acides nucléiques présent dans l'échantillon est traité pour préparer une bibliothèque compatible avec l'analyse de séquences à haut débit. La préparation de la bibliothèque est un processus en plusieurs étapes qui vise à préserver ou à enrichir les séquences pathogènes présentes, tout en maintenant la diversité complexe des séquences. La plupart des tests cliniques mNGS utilisent une approche de bibliothèque d'ARN ou d'ADN total non biaisée dans le but de détecter tout type de pathogène. Cependant, des sous-ensembles spécifiques peuvent être analysés par amplification PCR, comme l'ARNr 16S ou les panels PCR viraux. Une fois que l'échantillon est prêt pour la création de la bibliothèque, des codes-barres sont ajoutés (Figure 23). Ce sont de courtes séquences d'ADN qui sont placés aux extrémités de chaque bibliothèque d'échantillon. Cela permet de regrouper plusieurs échantillons pour le séquençage et d'identifier l'origine de chaque séquence. Les méthodes les plus courantes pour ajouter ces oligonucléotides sont la ligature ou l'ajout médié par transposase. Il est essentiel que les méthodes de préparation de la bibliothèque ne génèrent pas de biais ou de contaminations significatifs. En effet, la contamination est un des enjeux majeurs de ces techniques de mNGS, rendant l'interprétation des résultats plus difficile. Par conséquent, un contrôle de qualité rigoureux des lots de réactifs utilisés est nécessaire pour garantir l'absence de contamination (120).

Le séquençage à proprement parlé se fait sur différentes plateformes qui offrent une analyse à haut débit. La quantification peut se faire par différentes méthodes, comme la quantification totale de l'ADN, la PCR quantitative ou des stratégies de normalisation par billes. La concentration finale des bibliothèques dans le pool doit être optimisée afin de garantir des données de bonne qualité. Les fichiers de données brutes peuvent être très volumineux, ce qui nécessite une gestion efficace du

traitement et du stockage des données en milieu clinique. Les deux technologies les plus couramment utilisées actuellement sont le séquençage Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA) et le séquençage par nanopore utilisant des instruments de Oxford Nanopore Technologies (120). Les lectures issues du séquençage Illumina sont plus courtes (50–300 pb), peuvent être générées à des profondeurs de séquençage très élevées (par exemple, 25-40 millions et 350-400 millions de lectures par cycle de 12 à 24 heures sur les instruments MiSeq et NextSeq, respectivement) et sont plus précises (taux d'erreur <1%) que les lectures par nanopore. En effet, ces dernières ont un débit plus faible (0,5 million de lectures/h) avec des taux d'erreur plus élevés (10-15%), mais elles peuvent être plus longues (>1 kB) et produire des données de séquençage avec des délais plus rapides (< 6 heures). Ainsi, le séquençage Illumina est plus adapté pour traiter de nombreux échantillons multiplexés en parallèle, tandis que le séquençage par nanopore permet une analyse en temps réel et des résultats le jour même à partir d'un nombre plus limité d'échantillons.

L'analyse des données de séquençage implique une analyse bioinformatique utilisant un pipeline établi pour identifier les séquences de pathogènes présentes. Les étapes principales comprennent le filtrage de qualité, la soustraction des séquences humaines, l'alignement avec une base de données de pathogènes et la caractérisation taxonomique (Figure 23). La confiance dans la détection d'un organisme est liée au nombre de lectures de séquences identifiées pour cet organisme (normalisé par rapport au nombre total de lectures obtenues pour cet échantillon).

Après l'analyse des données de séquençage mNGS, les informations cliniquement pertinentes sont compilées dans un compte rendu qui précise les organismes identifiés et peut inclure un commentaire interprétatif concernant la signification clinique potentielle de la détection. Étant donné que ces tests sont relativement nouveaux, discuter des résultats avec les cliniciens peut aider à clarifier leur signification.

Afin de simplifier le discours et de comprendre les enjeux de ces nouvelles technologies, nous décrivons une technique de séquençage ciblé, le SepsiTTM (Molzym GmbH & Co. KG, Brême, Allemagne) et une technique de métagénomique shotgun, le Karius[®] Test (Karius, Inc., Redwood City, CA, USA).

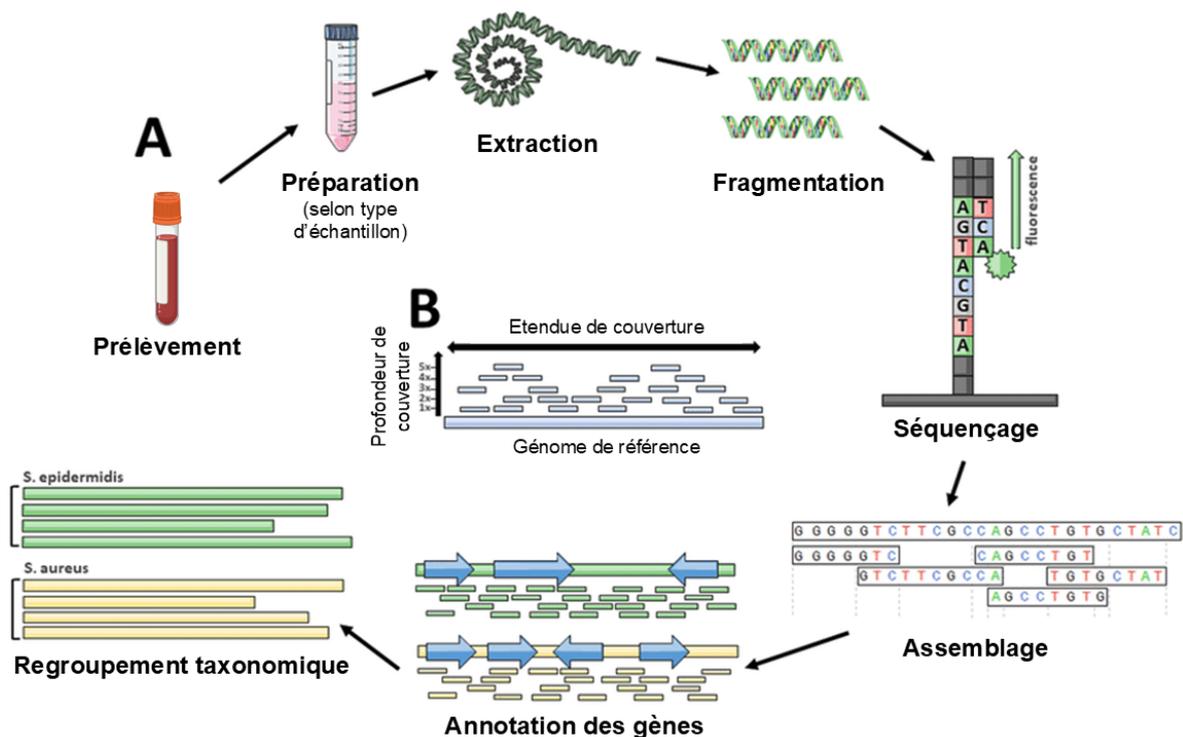


Figure 23 : Principe général des techniques de métagénomique shotgun (121)

A) Après le prélèvement de l'échantillon et l'extraction des acides nucléiques (ADN ou ARN), le matériel génétique doit être fragmenté. Les courts fragments générés sont tous séquencés en parallèle à l'étape suivante. Les lectures courtes qui en résultent doivent être assemblées *in silico* afin de créer des segments suffisamment longs pour l'annotation des gènes et/ou l'assemblage du génome entier. Pour ce faire, on utilise soit le génome de référence de la base de données, soit un assemblage de novo. Dans l'étape suivante, une variété de procédures peut être entreprise, y compris le regroupement phylogénétique des séquences résultantes. B) Une représentation suffisante des fragments amplifiés (profondeur de couverture) doit être obtenue pour que les algorithmes informatiques puissent réassembler avec succès les séquences d'intérêt. Compte tenu de la grande complexité des échantillons (étendue de la couverture), cet aspect est particulièrement important pour les études métagénomiques.

C.3.b. Sepsitest™ (Molzym)

Ce test approuvé en 2008, est réalisé sur 1 mL de sang total et combine la PCR des gènes de l'ARNr 16S (bactéries) et 18S (champignons) et le séquençage Sanger (séquençage dit de première génération). Une étape de lyse sélective et de dégradation de l'ADN humain est utilisée pour améliorer la sensibilité (122). Le résultat de la PCR, disponible après 4 heures, indique si des bactéries ou champignons sont présents dans l'échantillon. Les amplicons des échantillons positifs sont ensuite séquencés pour confirmer le résultat de la PCR et déterminer l'espèce (Figure 24). Le résultat final est rendu en 8 à 12h (123). Il nécessite de multiples étapes qui ne sont

pas intégrées dans une seule plateforme, ce qui augmente le risque de contamination et peut rallonger le délai d'exécution selon l'organisation du laboratoire. Douze échantillons peuvent être traités simultanément. La sensibilité analytique du test varie de 10 à 80 UFC/mL, selon l'espèce.

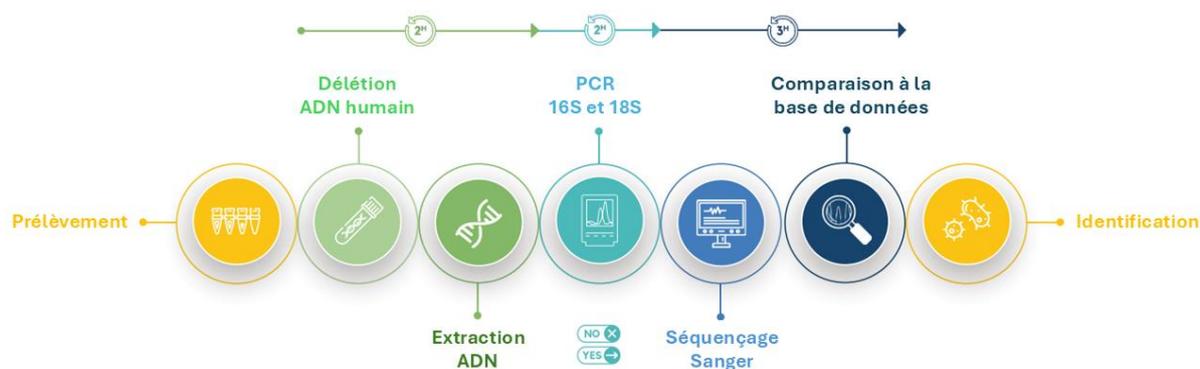


Figure 24 : Différentes étapes du Sepsitest™ du prélèvement au résultat d'identification (124)

Dans les différentes études publiées, le Sepsitest™ présente une sensibilité allant de 11 à 87 % et une spécificité élevée allant de 85 à 96 % par rapport à l'hémoculture chez des patients adultes et pédiatriques atteints de syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS), de sepsis, de neutropénie fébrile ou encore d'endocardite infectieuse (122). De nombreuses études font état de valeurs prédictives négatives prometteuses (jusqu'à 97 %) par rapport à l'hémoculture. Des sensibilités similaires allant de 37 à 78 % et des spécificités allant de 86 à 94 % ont été observées dans des études incluant le contexte clinique afin d'exclure les contaminants (122). Il peut, en pratique, détecter les infections polymicrobiennes. Les agents pathogènes détectés dans les échantillons polymicrobiens ont souvent été identifiés comme des contaminants (122).

Le test reste peu implanté, comme en témoigne l'absence d'études depuis 2016, probablement en raison de sa sensibilité très variable et de son incapacité à détecter les résistances.

C.3.c. Karius® Test

Le Karius® Test repose sur un NGS sans *a priori* de l'ADN libre (ou acellulaire) dans 5mL de plasma. Il permet d'identifier plus de 1000 pathogènes cliniquement pertinents.

Le séquençage est réalisé via la technologie Illumina. Il rend des résultats en 24h (123). Par rapport au séquençage Sanger, le NGS permet une couverture génomique plus importante et la possibilité de fournir des données quantitatives. L'ADN provenant d'organismes présents au-delà d'un seuil statistique est rapporté et quantifié en molécules par microlitre. Depuis plus récemment, le test Karius inclut automatiquement une recherche complémentaire de sept marqueurs de résistance aux antimicrobiens (*SCCmec*, *mecA*, *mecC*, *vanA*, *vanB*, CTX-M, KPC), dès lors qu'un ou plusieurs des pathogènes concernés par ces résistances sont détectés. Les résultats liés à la résistance sont communiqués sous forme d'ajout au rapport initial d'identification, environ 24 heures plus tard (68).

Dans l'essai SEP-SEQ de 2017, le test NGS Karius® sur le plasma a permis d'identifier un large éventail d'agents pathogènes chez les patients atteints de sepsis, trois fois plus souvent que l'hémoculture (125). Une étude ultérieure a démontré la validation analytique et clinique du test, avec une concordance globale de 93,7 % par rapport aux hémocultures (126). Dans cette cohorte de 350 patients suspectés de sepsis aux urgences, le test avait une sensibilité de 92,9 % et une spécificité de 62,7 %, comparé à la référence qui incluait les hémocultures initiales, des tests microbiologiques supplémentaires (cultures de tissus/fluides, sérologies, PCR spécifiques) et l'évaluation clinique. Il a permis de déterminer l'étiologie du sepsis dans 37 cas supplémentaires par rapport aux tests conventionnels. Une étude rétrospective plus récente, menée sur un ensemble de patients ayant bénéficiés d'un test Karius® dans cinq hôpitaux américains pendant plus d'un an, a révélé que l'impact clinique du test, basé sur l'interprétation des résultats par l'équipe médicale, reste limité. Cependant, cette étude a évalué l'utilisation du test Karius® pour diverses indications, y compris pour le diagnostic d'infections autres que les infections sanguines (notamment les infections respiratoires et fongiques invasives), et ses résultats ne peuvent donc pas être généralisés au sepsis (127). Des conclusions similaires ont été observées dans une étude rétrospective sur une cohorte pédiatrique, où le mNGS a montré une faible valeur ajoutée lorsqu'il était prescrit en parallèle des méthodes conventionnelles, lesquelles ont en moyenne fourni les mêmes résultats, mais plus rapidement (128).

III. Discussion

Les bactériémies, en particulier dans un contexte de sepsis, représentent une urgence médicale avec un impact fort sur la mortalité. Le diagnostic rapide est crucial, car chaque heure de retard dans l'antibiothérapie appropriée augmente le risque de décès (59). L'hémoculture reste la méthode de référence pour détecter une bactériémie, mais elle présente plusieurs limites telles qu'un délai de rendu de résultat important (souvent > 24h) et une dépendance à la culture microbienne. Ces contraintes freinent parfois la mise en place rapide d'un traitement ciblé. Dans ce contexte, des tests de diagnostic rapide (TDR) ont été développés pour améliorer la prise en charge, soit à partir d'hémocultures positives, avec ou sans subculture, soit directement sur le sang total, sans passer par l'étape de culture. Leur intégration en pratique clinique soulève cependant des enjeux techniques, organisationnels et économiques que cette discussion analysera. Les performances des outils ayant déjà été analysées dans la partie précédente, nous ne les aborderons pas de nouveau ici.

A. Impacts techniques

Les différentes méthodes à partir d'hémocultures positives (Sepsityper®, PCR multiplex, Accelerate Pheno®...) sont de plus en plus utilisées dans la pratique clinique. Elles peuvent accélérer le diagnostic étiologique par rapport à la microbiologie conventionnelle, en fournissant non seulement l'identification de l'agent pathogène, mais aussi, dans certains cas, des profils de résistance spécifiques (Tableau 10). Toutefois, ces technologies dépendent de la positivité de l'hémoculture ce qui introduit un délai incompressible de plusieurs heures à plusieurs jours après le prélèvement sanguin (Figure 25). En parallèle, la métagénomique de nouvelle génération (mNGS) est une technologie de séquençage prometteuse, indépendante de la culture, pour la détection d'une multitude de pathogènes (bactéries, virus, champignons) comprenant des pathogènes rares, voire inattendus ou nouveaux, sans aucune préconception. Toutefois, dans l'état actuel des connaissances, la métagénomique n'est pas toujours bien placée pour aider les cliniciens à prendre rapidement des décisions thérapeutiques en raison de l'expertise requise pour la préparation des échantillons, le séquençage et l'analyse bioinformatique, ainsi que de la grande variabilité des méthodologies et des interprétations. Si le mNGS tend à être plus sensible que les

méthodes traditionnelles, l'un des inconvénients de cette sensibilité est qu'il peut détecter une contamination microbienne provenant de l'environnement, des contenants et des réactifs ou encore des micro-organismes colonisateurs de l'hôte, ce qui donne des résultats faussement positifs. En effet, l'homme étant l'hôte de divers organismes commensaux, distinguer les micro-organismes responsables d'une véritable bactériémie de ceux issus de la flore gastro-intestinale ou orale transitoire dans les échantillons sanguins représente un défi pour l'interprétation des résultats. Par ailleurs, le mNGS détecte aussi bien l'ADN persistant d'agents pathogènes morts, ce qui peut poser des problèmes d'interprétation lors du suivi thérapeutique. Une solution possible consiste à détecter l'ARN, dont l'abondance est directement liée au niveau d'activité transcriptionnelle des gènes, ce qui permet de différencier les organismes morts des organismes vivants dans un échantillon clinique (129).

Tableau 10 : Résumé des principales caractéristiques des différentes techniques

	Panel d'identification	Test rapide de sensibilité	Coût
Sepsityper	Illimité	Non	10-15€
Culture jeune	Illimité	Non	< 5€
Accelerate Pheno	17 (7GP, 8GN, 2F)	Oui (8GP, 19GN)	~ 150 €
QMAC-dRAST	-	Oui (18GP, 19GN)	NC
AStar BC G2	-	Oui (23GN)	NC
Vitek Reveal	-	Oui (29GN)	~ 150 €
FASTinov	-	Oui (7GP, 12GN)	NC
Alfred 60 AST	-	Oui (35 au choix)	30 – 40 €
Biofire BCID2	30 (9GP, 14GN, 7F)	Oui, 12 gènes	~ 250 €
Verigene	22 (13GP, 9GN)	Oui, 9 gènes	~ 150 €
eplex	56 (20GP, 21GN, 15F)	Oui, 10 gènes	150 €
T2Bacteria	6 (2GP, 4GN)	Non	~ 200 €
Sepsitest	Illimité	Non	125 – 174€
Karius	Illimité	Oui, 7 gènes	~ 1700 €

GP = bactérie à Gram positif, GN = bactérie à Gram négatif, F = espèce fongique

Les thérapeutiques importantes sur le plan clinique pour les pathogènes à Gram positif sont principalement prédites par l'identification bactérienne (par exemple *Enterococcus faecalis* contre *faecium* ou *Staphylococcus aureus* contre les staphylocoques coagulase-négative) ainsi que par des marqueurs de résistance limités, tels que *mecA/mecC* pour les staphylocoques résistants à la méticilline et

vanA/vanB pour les entérocoques résistants à la vancomycine. Par conséquent, les tests moléculaires peuvent suffire à orienter les décisions cliniques (130). En revanche, la résistance parmi les pathogènes à Gram négatif peut être induite par de nombreux mécanismes de résistance différents (BLSE, carbapénémases et une combinaison de niveaux d'expression d'enzymes, de porines et de pompes d'efflux). De plus, la présence d'un gène de résistance ne signifie pas qu'il est exprimé ni que l'organisme présentera un phénotype de résistance. Certains gènes comme *ampC* peuvent n'être exprimés qu'en présence d'antibiotiques ou par des mutations de gènes régulateurs. Il n'existe donc pas un petit nombre de marqueurs de résistance capables de prédire avec certitude la sensibilité. Par conséquent, les cliniciens ont besoin de l'ensemble de l'antibiogramme pour décider de manière fiable du traitement approprié (130).

Les études comparatives portant sur les approches diagnostiques rapides restent encore peu nombreuses. Parmi les plus rigoureuses méthodologiquement, celle menée par Sze *et al.* compare l'utilisation en pratique de l'Accelerate Pheno[®] versus PCR BCID2[®] associée à l'antibiogramme direct (Vitek 2) (131). Cette étude comparative montre que ces deux approches offrent des alternatives efficaces au diagnostic conventionnel à partir d'hémocultures positives. Le premier permet une identification et un antibiogramme intégrés en environ 7 heures avec un temps de manipulation minimal, ce qui en fait une solution adaptée aux laboratoires à effectifs réduits. Il présente une bonne concordance globale, bien que sa couverture soit limitée (Tableau 10). En comparaison, BCID2 fournit une identification génotypique rapide et une détection des gènes de résistance, complétée par un antibiogramme direct sous 9 à 20 heures, mais au prix d'un processus plus complexe. Le choix entre ces méthodes dépend des ressources disponibles et des contraintes du laboratoire, l'approche combinée génotype/phénotype restant la plus complète (131).

Enfin, malgré les limitations des méthodes traditionnelles, leur utilisation demeure essentielle en pratique clinique pour obtenir des résultats fiables conformément aux protocoles standardisés, ou pour effectuer des comparaisons avec les résultats des nouvelles techniques.

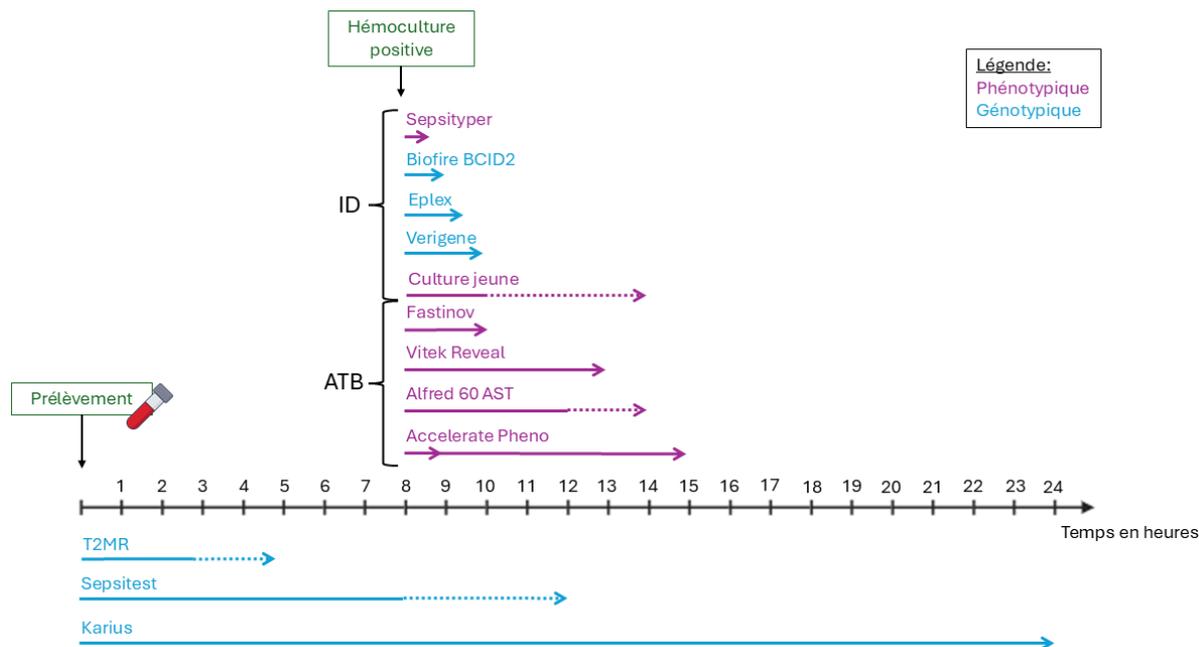


Figure 25 : Délais de rendu des résultats des différentes techniques

Au-dessus de la frise sont représentées les techniques réalisées à partir d'un flacon d'hémoculture positif, ce qui explique le délai avant leur mise en œuvre. En dessous figurent les techniques effectuées directement sur sang total. Les flèches en pointillés correspondent à des durées variables de rendu de résultat.

B. Impacts cliniques et organisationnels

L'un des principaux obstacles à la mise en œuvre de méthodes rapides pour les hémocultures réside dans leur intégration au flux de travail. La plupart de ces méthodes, difficiles à automatiser intégralement, peuvent nécessiter un temps de manipulation non négligeable en raison de la fréquence peu élevée des hémocultures positives. Par conséquent, le gain de temps réel en pratique clinique est souvent moins significatif que prévu (64). L'intégration dans le flux de travail du laboratoire est particulièrement complexe la nuit, lorsque la disponibilité du personnel est limitée. Les méthodes de biologie moléculaire basées sur la PCR nécessitent en général un temps de manipulation minimal et permettent d'obtenir des résultats en 1 à 2 heures sans intervention humaine (Figure 25). L'identification par ces méthodes doit rivaliser avec les protocoles d'identification rapide par spectrométrie de masse MALDI-TOF directement à partir des flacons positifs, ce qui convient parfaitement aux diagnostics à la demande et permet d'obtenir un résultat en une trentaine de minutes. Cependant, le Sepsityper® implique une manipulation plus complexe avec plusieurs étapes

manuelles et des temps d'attente, mais il offre des résultats rapides sans être limité à un panel prédéfini d'agents pathogènes (Tableau 10) (132). L'une des limites actuelles de ces techniques est qu'elles ne fournissent pas de données précises sur la sensibilité aux antimicrobiens, à savoir les CMI. Ces technologies d'identification précoce des bactéries, sans données de sensibilité aux antibiotiques peuvent ne pas avoir d'impact significatif sur la thérapeutique, sauf si l'identification de l'espèce prédit une sensibilité spécifique (par exemple, *Streptococcus pyogenes*) ou une possible contamination (133).

Pour remédier à cela, de nombreux laboratoires de microbiologie ont introduit l'approche d'antibiogramme direct dans la routine des hémocultures positives, comme préconisé par le CA-SFM, ce qui permet de réduire le délai d'obtention des résultats à environ 24 h après la positivité du flacon (54). Néanmoins, les résultats restent souvent indisponibles le jour de la détection de la positivité de l'hémoculture. Les différents systèmes automatisés décrits permettent d'obtenir des résultats dans la journée (Figure 25). Cependant, ces avancées doivent être mises en perspective avec l'organisation du laboratoire. En effet, dans la majorité des études, les hémocultures prises en charge le matin peuvent bénéficier de ces avancées, permettant d'obtenir des résultats en fin de journée. En revanche, une extension du délai d'inclusion repousserait la disponibilité des résultats vers la soirée ou la nuit, ce qui impliquerait un fonctionnement du laboratoire en 24h/24 et la disponibilité immédiate d'un clinicien référent pour adapter sans délai le traitement antibiotique. Une étude comparative récente, évaluant les tests Sepsityper® et BCID2® pour l'identification et dPhoenix (microdilution en milieu liquide) et QMAC-dRAST™ pour l'antibiogramme rapide a montré que même sans activité continue, toutes les méthodes rapides ont réduit significativement les délais par rapport aux méthodes conventionnelles (132). Cependant, une part importante du temps total est liée au retard avant le démarrage du test, soulignant qu'un fonctionnement 24/7 pourrait encore améliorer l'efficacité de ces outils. Pourtant, peu de laboratoires fonctionnent en continu : une étude européenne a montré que seuls 13 % assurent un traitement immédiat des hémocultures positives, et une étude coréenne indique que seulement 0,9 % réalisent une identification microbienne ou un antibiogramme la nuit en semaine (132).

En complément, une étude récente a comparé l'utilisation de plusieurs TDR en termes de sensibilité, délai de rendu de résultats, temps de manipulation et attentes

des cliniciens (134). L'utilisation de la méthodologie BED FRAME (*Bayesian Evaluation to Determine the Functional Role of Advanced Molecular Diagnostics Evidence*) permet de modéliser la performance d'un test (sensibilité, spécificité, délai, etc.) et de pondérer ces performances selon la prévalence des pathogènes ciblés dans un contexte donné (hôpital, pays, etc.) pour estimer l'utilité clinique globale d'un test pour un établissement de santé donné. Cette étude met notamment en parallèle le Sepsityper[®] et la PCR BioFire[®] BCID2. Les deux techniques affichent une sensibilité globale comparable, avec de meilleures performances pour les Gram négatif pour le Sepsityper[®], et pour les Gram positif pour la PCR. En conditions réelles, le délai de rendu reste similaire (~1 heure), rendant le choix entre les deux difficile du point de vue organisationnel. Toutefois, les cliniciens ont en majorité préféré la PCR, en raison des informations complémentaires sur certains gènes de résistance présents dans le panel. L'étude révèle également une tendance marquée des cliniciens à privilégier des tests plus précis, même légèrement plus lents, à condition que les résultats soient disponibles dans les quatre heures suivant la détection de la positivité (134). Cet aspect soulève l'importance de l'intégration des TDR dans une stratégie clinique coordonnée.

Plusieurs études ont montré que l'impact clinique des tests de diagnostic rapide des bactériémies n'est significatif que lorsqu'ils sont associés à un *Antimicrobial Stewardship Program* (ASP) (83,133,135–137). Ce terme, largement utilisé dans la littérature, fait référence à toute action visant à optimiser la prescription des antibiotiques et impliquant une équipe pluridisciplinaire (microbiologiste, infectiologue, pharmacien) (138). De manière concrète, cela peut passer par diverses stratégies d'aide à la décision clinique : recommandations de prescription dans les comptes rendus microbiologiques, réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP) ou encore des systèmes informatisés intégrant données cliniques, prescriptions et résultats biologiques pour suggérer ou ajuster un traitement (133). Dans ce contexte, une méta-analyse récente a montré un avantage en termes de survie associé au TDR par rapport aux méthodes conventionnelles lorsque les deux sont associés à l'ASP (137).

C. Impacts économiques

Les TDR alourdissent le coût du diagnostic d'une bactériémie en raison des frais supplémentaires liés à leur utilisation. Parmi les différentes approches, les tests d'identification phénotypique par spectrométrie de masse (directe ou sur culture jeune) sont les moins coûteux. Les tests commerciaux, comme le Sepsityper[®], sont plus onéreux que les protocoles internes, ces derniers ne coûtant que quelques centimes d'euro par test. En revanche, les kits de biologie moléculaire appliqués aux flacons positifs représentent au minimum une centaine d'euros par échantillon (107). Les tests indépendants de la culture sont généralement plus onéreux que les méthodes conventionnelles, avec un coût variant autour de 200€ pour les tests basés sur l'amplification, et pouvant atteindre jusqu'à 2000\$ (~1700€) pour certains tests de métagénomique comme le Karius (Tableau 10). Pour les plateformes, ce coût varie selon le nombre d'échantillons analysés par jour et en incluant ou non l'investissement dans un outil de PCR et un séquenceur par exemple.

Ces dépenses doivent cependant être mises en balance avec les économies potentielles, notamment grâce à une réduction de la durée d'hospitalisation, une utilisation plus ciblée des antibiotiques, et de meilleurs résultats cliniques. Par exemple, l'étude de Perez *et al.* a montré que l'intégration de l'identification rapide par MALDI-TOF et d'un programme de gestion de l'antibiothérapie permettait de réduire significativement la durée d'hospitalisation (de 11,9 à 9,3 jours) ainsi que les coûts moyens par patient (de 45 709\$ à 26 162\$) (139). De même, une étude sur la PCR multiplex Biofire[®] a démontré la rentabilité du test pour les patients avec hémocultures positives (140). Une collaboration étroite entre laboratoire et cliniciens a permis une utilisation plus ciblée des antibiotiques et une réduction des durées d'hospitalisation, notamment pour les patients présentant des contaminations à staphylocoques à coagulase négative, générant environ 30 000\$ d'économies pour 100 patients — un montant suffisant pour compenser le coût du test. Plus récemment, la société FASTinov a évalué les retombées économiques de sa solution d'antibiogramme ultra-rapide, comparée à l'antibiogramme automatisé standard. Cette solution a permis une réduction de la mortalité de 8 %, une diminution de la durée d'hospitalisation de 30,1 % et une baisse des coûts de 28 %, soit environ 2 395€ économisés par patient (141).

Toutefois, une méta-analyse récente a mis en évidence que l'impact du TDR ou de l'ASP sur la durée du séjour hospitalier est généralement restreint. Cela est important d'un point de vue clinique, mais aussi lors de l'estimation des coûts associés à l'implémentation du TDR. En effet, les dépenses supplémentaires engendrées par l'utilisation de ces nouveaux outils ne sont pas forcément compensées par la réduction de la durée d'hospitalisation des patients (137). Il faut donc prendre en considération l'ensemble des dépenses liées à l'hospitalisation d'un patient pour sepsis. En raison de son coût plus élevé, l'antibiogramme rapide pourrait par exemple être introduit dans des établissements présentant une forte prévalence d'agents pathogènes multi-résistants et son utilisation devrait être prioritaire pour les patients critiques qui bénéficieraient potentiellement davantage d'un ajustement rapide de l'antibiothérapie probabiliste.

Enfin, l'évaluation de la rentabilité des TDR reste complexe (142). Les données issues d'études en conditions réelles sont limitées et fortement dépendantes du contexte d'installation de la solution retenue.

Dans l'ensemble, les TDR disponibles ou en développement présentent un potentiel indéniable pour améliorer la prise en charge du sepsis, notamment en réduisant les délais d'obtention des résultats microbiologiques et en augmentant la sensibilité de détection de certains pathogènes, notamment ceux difficilement identifiables par les méthodes conventionnelles. Toutefois, leur évaluation et leur comparaison restent complexes. Les études disponibles sont hétérogènes, tant sur le plan de la méthodologie (études observationnelles, essais randomisés, analyses rétrospectives) que des contextes d'application (soins intensifs, services d'urgences, hôpitaux universitaires ou périphériques, infections nosocomiales/communautaires), et utilisent des techniques de référence variables pour évaluer la performance des nouveaux outils (131,132,134,143,144). Cette diversité méthodologique rend difficile une méta-analyse rigoureuse et une comparaison directe entre technologies. En outre, les critères d'évaluation utilisés sont souvent différents d'un travail à l'autre : certains se concentrent sur des paramètres microbiologiques (délai d'identification, concordance avec les cultures standards), d'autres sur des indicateurs thérapeutiques (délai d'instauration de l'antibiothérapie appropriée, ajustement thérapeutique), tandis que les études évaluant des critères tels que la durée de séjour, les complications ou

la mortalité sont plus rares et généralement peu concluantes (133). En effet, si la majorité des publications suggèrent une amélioration significative du délai d'instauration d'un traitement ciblé, cette avancée ne se traduit pas systématiquement par une amélioration des issues cliniques majeures, probablement en raison de nombreux facteurs confondants (gravité initiale, comorbidités, variabilité des pratiques locales, prise en charge globale du patient). L'intégration réussie de ces outils dans les algorithmes décisionnels doit donc également s'accompagner de stratégies organisationnelles (accès 24/7, formation des équipes, réponse clinique rapide aux résultats) pour en maximiser les bénéfices (135).

IV. Conclusion et perspectives

Dans la prise en charge du sepsis, l'administration rapide d'un antibiotique efficace est cruciale pour améliorer les résultats cliniques des patients. L'hémoculture reste le moyen le plus accessible et le moins coûteux pour vérifier la présence d'un pathogène dans une bactériémie. Pour intégrer efficacement les méthodes rapides dans le flux de travail, les équipes doivent tenir compte non seulement des performances du test mais également du délai de rendu des résultats, de la simplicité de mise en œuvre, du rapport coût-efficacité, ainsi que de la disponibilité du personnel. Il convient également de prendre en considération les besoins cliniques, la gestion des antibiotiques, la présence d'un clinicien référent et l'épidémiologie locale. L'éventail diversifié de méthodes actuellement proposées pour améliorer le diagnostic des bactériémies permet aux laboratoires de développer une approche sur mesure. Étant donné l'absence de solution universelle, la microbiologie clinique évoluera sans doute vers des méthodes plus rapides, tout en maintenant une approche complexe basée sur l'utilisation de multiples techniques. À l'avenir, l'intelligence artificielle pourrait jouer un rôle clé en microbiologie, en particulier pour l'analyse rapide et automatisée des données complexes issues de la métagénomique (145). En facilitant l'interprétation des résultats et la détection des profils de résistance, elle pourrait contribuer à une prise en charge plus précoce du sepsis. Si des aspects tels que le format unitaire, la mutualisation des plateformes, la robustesse des techniques, l'analyse des données et l'interprétation clinique sont correctement pris en compte, la métagénomique pourrait représenter une avancée majeure, à l'instar de l'introduction de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans le diagnostic microbiologique, offrant ainsi un potentiel significatif pour améliorer la qualité des soins aux patients.

Références

1. 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):801-10.
2. Pilly E, Chirouze C, Épaulard O, Le Berre Rozenn. In: *Maladies infectieuses et tropicales*. 27e édition 2020. Paris: Édition Alinéa Plus; 2019.
3. Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, van der Poll T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence*. 1 janv 2014;5(1):36-44.
4. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. déc 2002;420(6917):885-91.
5. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *The Lancet*. 7 août 2004;364(9433):545-8.
6. Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL. Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primer*. 30 juin 2016;2:16045.
7. Nessler N, Matthay MA, Seguin P. Choc septique: définitions, épidémiologie, monitoring et principes thérapeutiques. Le congrès Sfar, Paris. 2017;
8. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML, Seymour CW, Liu VX, Deutschman CS, et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 23 févr 2016;315(8):775-87.
9. Fleischmann-Struzek C, Rudd K. Challenges of assessing the burden of sepsis. *Med Klin Intensivmed Notfallmedizin*. déc 2023;118(Suppl 2):68-74.
10. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. 18 janv 2020;395(10219):200-11.
11. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. févr 2016;193(3):259-72.
12. Fleischmann-Struzek C, Mellhammar L, Rose N, Cassini A, Rudd KE, Schlattmann P, et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med*. 1 août 2020;46(8):1552-62.
13. Global Report on the Epidemiology and Burden of Sepsis: Current Evidence, Identifying Gaps and Future Directions. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 2020. 56 p.

14. Pandolfi F, Guillemot D, Watier L, Brun-Buisson C. Trends in bacterial sepsis incidence and mortality in France between 2015 and 2019 based on National Health Data System (Système National des données de Santé (SNDS)): a retrospective observational study. *BMJ Open*. 24 mai 2022;12(5):e058205.
15. Dupuis C, Bouadma L, Ruckly S, Perozziello A, Van-Gysel D, Mageau A, et al. Sepsis and septic shock in France: incidences, outcomes and costs of care. *Ann Intensive Care*. 20 oct 2020;10(1):145.
16. Wardi G, Tainter CR, Ramnath VR, Brennan JJ, Tolia V, Castillo EM, et al. Age-related incidence and outcomes of sepsis in California, 2008–2015. *J Crit Care*. 1 avr 2021;62:212-7.
17. Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E, Pettilä V, Parviainen I, Ala-Kokko TI, et al. Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. *Intensive Care Med*. 1 mars 2007;33(3):435-43.
18. Imaeda T, Nakada T aki, Takahashi N, Yamao Y, Nakagawa S, Ogura H, et al. Trends in the incidence and outcome of sepsis using data from a Japanese nationwide medical claims database-the Japan Sepsis Alliance (JaSA) study group. *Crit Care*. 16 sept 2021;25(1):338.
19. Laupland KB, Church DL. Population-Based Epidemiology and Microbiology of Community-Onset Bloodstream Infections. *Clin Microbiol Rev*. oct 2014;27(4):647-64.
20. 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.
21. Verway M, Brown KA, Marchand-Austin A, Diong C, Lee S, Langford B, et al. Prevalence and Mortality Associated with Bloodstream Organisms: a Population-Wide Retrospective Cohort Study. *J Clin Microbiol*. 7 mars 2022;60(4):e02429-21.
22. Diekema DJ, Hsueh PR, 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*. 24 juin 2019;63(7):10.1128/aac.00355-19.
23. Kern WV, Rieg S. Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. *Clin Microbiol Infect*. 1 févr 2020;26(2):151-7.
24. Reddy EA, Shaw AV, Crump JA. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 1 juin 2010;10(6):417-32.
25. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med*. juill 1996;22(7):707-10.

26. HAS. Prise en charge du sepsis du nouveau-né, de l'enfant et de l'adulte : recommandations pour un parcours de soins intégré [Internet]. 2025. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2025-02/reco_sepsis.pdf
27. Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*. 30 sept 1930;52(4):561-71.
28. Sproston NR, Ashworth JJ. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front Immunol*. 2018;9:754.
29. Tan M, Lu Y, Jiang H, Zhang L. The diagnostic accuracy of procalcitonin and C-reactive protein for sepsis: A systematic review and meta-analysis. *J Cell Biochem*. 2019;120(4):5852-9.
30. Assicot M, Bohuon C, Gendrel D, Raymond J, Carsin H, Guilbaud J. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *The Lancet*. 27 févr 1993;341(8844):515-8.
31. Schuetz P. How to best use procalcitonin to diagnose infections and manage antibiotic treatment. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 1 avr 2023;61(5):822-8.
32. Liang P, Yu F. Value of CRP, PCT, and NLR in Prediction of Severity and Prognosis of Patients With Bloodstream Infections and Sepsis. *Front Surg*. 2022;9:857218.
33. Lippi G, Cervellin G. Procalcitonin for diagnosing and monitoring bacterial infections: for or against? *Clin Chem Lab Med CCLM*. 1 août 2018;56(8):1193-5.
34. de Jong E, van Oers JA, Beishuizen A, Vos P, Vermeijden WJ, Haas LE, et al. Efficacy and safety of procalcitonin guidance in reducing the duration of antibiotic treatment in critically ill patients: a randomised, controlled, open-label trial. *Lancet Infect Dis*. 1 juill 2016;16(7):819-27.
35. Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent JL. Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. *Crit Care Lond Engl*. 5 juin 2020;24(1):287.
36. Póvoa P, Teixeira-Pinto AM, Carneiro AH, Portuguese Community-Acquired Sepsis Study Group SACiUCI. C-reactive protein, an early marker of community-acquired sepsis resolution: a multi-center prospective observational study. *Crit Care Lond Engl*. 15 juill 2011;15(4):R169.
37. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti JJ, Tattevin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the-Art. *Front Microbiol*. 2016;7:697.
38. Garcia RA, Spitzer ED, Beaudry J, Beck C, Diblasi R, Gilleeny-Blabac M, et al. Multidisciplinary team review of best practices for collection and handling of blood cultures to determine effective interventions for increasing the yield of true-positive bacteremias, reducing contamination, and eliminating false-positive central line-associated bloodstream infections. *Am J Infect Control*. nov 2015;43(11):1222-37.

39. Dargère S, Parienti JJ, Roupie E, Gancel PE, Wiel E, Smaiti N, et al. Unique blood culture for diagnosis of bloodstream infections in emergency departments: a prospective multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 1 nov 2014;20(11):O920-7.
40. Vitrat-Hincky V, François P, Labarère J, Recule C, Stahl JP, Pavese P. Appropriateness of blood culture testing parameters in routine practice. Results from a cross-sectional study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1 avr 2011;30(4):533-9.
41. Neves L, Marra AR, Camargo TZS, dos Santos MC, Zulin F, da Silva PC, et al. Correlation between mass and volume of collected blood with positivity of blood cultures. *BMC Res Notes.* 28 août 2015;8(1):383.
42. Fowler VG, Durack DT, Selton-Suty C, Athan E, Bayer AS, Chamis AL, et al. The 2023 Duke-International Society for Cardiovascular Infectious Diseases Criteria for Infective Endocarditis: Updating the Modified Duke Criteria. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 22 août 2023;77(4):518-26.
43. Société Française de Microbiologie. In: *Référentiel en microbiologie Médicale.* 7ème édition. 2022.
44. Lemming L, Holt HM, Petersen IS, Østergaard C, Bruun B. Bactec 9240 blood culture system: to preincubate at 35 °C or not? *Clin Microbiol Infect.* 1 déc 2004;10(12):1089-91.
45. van der Velden LB, Vos FJ, Mouton JW, Sturm PD. Clinical impact of preincubation of blood cultures at 37°C. *J Clin Microbiol.* janv 2011;49(1):275-80.
46. Venturelli C, Righi E, Borsari L, Aggazzotti G, Busani S, Mussini C, et al. Impact of Pre-Analytical Time on the Recovery of Pathogens from Blood Cultures: Results from a Large Retrospective Survey. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169466.
47. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged Incubation and Extensive Subculturing Do Not Increase Recovery of Clinically Significant Microorganisms from Standard Automated Blood Cultures. *Clin Infect Dis.* 1 déc 2005;41(11):1677-80.
48. Weinstein MP. Emerging Data Indicating that Extended Incubation of Blood Cultures Has Little Clinical Value. *Clin Infect Dis.* 1 déc 2005;41(11):1681-2.
49. Petti CA, Bhally HS, Weinstein MP, Joho K, Wakefield T, Reller LB, et al. Utility of extended blood culture incubation for isolation of *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, and *Kingella* organisms: a retrospective multicenter evaluation. *J Clin Microbiol.* janv 2006;44(1):257-9.
50. Karahan ZC, Mumcuoglu I, Guriz H, Tamer D, Balaban N, Aysev D, et al. PCR evaluation of false-positive signals from two automated blood-culture systems. *J Med Microbiol.* 2006;55(1):53-7.
51. Pitsch A, Ergani A, Vasse M, Farfour E. False-positive of blood culture instrument: leukocytosis, overfilled vials or defective position? *Ann Biol Clin (Paris).* 2019;77(6):665-7.

52. Department Medical Microbiology and Infectious diseases, University Medical Center Rotterdam. Microbe Canvas [Internet]. 2025. Disponible sur: <https://www.microbe-canvas.com/>
53. Faron ML, Buchan BW, Ledebor NA. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization. *J Clin Microbiol.* déc 2017;55(12):3328-38.
54. Société Française de Microbiologie. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: Recommandations 2024 V.1.0 Juin [Internet]. 2024. Disponible sur: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2024/06/CASFM2024_V1.0.pdf?
55. International Organization for Standardization. ISO 20776-1: Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogramme - Partie 1: méthode de référence de microdilution [Internet]. 2019. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:70464:fr>
56. International Organization for Standardization. ISO 20776-2: Systèmes d'essais en laboratoire et de diagnostic in vitro - Partie 2: Evaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes par rapport à une méthode de référence de microdilution en bouillon [Internet]. 2021. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:20776:-2:ed-2:v1:fr>
57. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med.* nov 2021;49(11):e1063.
58. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS, et al. Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N Engl J Med.* 8 juin 2017;376(23):2235-44.
59. 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.
60. Martin C, Brun-Buisson C. Prise en charge initiale des états septiques graves de l'adulte et de l'enfant. *Ann Fr Anesth Réanimation.* 2007;26(1):53-73.
61. Cazanave C, Chirouze C, Lanternier F, Sotto A. Bactériémie/Fongémie de l'adulte et de l'enfant (ITEM 157). In: *Pilly étudiant 2023 : maladies infectieuses & tropicales.* 2ème édition 2023. Paris: Édition Alinéa Plus; 2023. p. 122-9.
62. Groupement d'infectiologie et de lutte contre l'antibiorésistance. Antibiogilar - Recommandations du Centre Hospitalier de Béthune [Internet]. Disponible sur: <https://gilar.org/antibiogilar.html>
63. Li D, Yi J, Han G, Qiao L. MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Meas Sci Au.* 27 juill 2022;2(5):385-404.

64. Dubourg G, Lamy B, Ruimy R. Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial bloodstream infections: meeting the challenge to reduce the time to result. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* sept 2018;24(9):935-43.
65. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect.* 1 oct 2014;20(10):1001-6.
66. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2011;6(8):e23285.
67. Morgenthaler NG, Kostrzewa M. Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis: Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit. *Int J Microbiol.* 2015;2015(1):827416.
68. Liborio MP, Harris PNA, Ravi C, Irwin AD. Getting Up to Speed: Rapid Pathogen and Antimicrobial Resistance Diagnostics in Sepsis. *Microorganisms.* 3 sept 2024;12(9):1824.
69. Pranada AB, Cordovana M, Meyer M, Hubert H, Abdalla M, Ambretti S, et al. Identification of micro-organism from positive blood cultures: comparison of three different short culturing methods to the Rapid Sepsityper workflow. *J Med Microbiol.* août 2022;71(8).
70. Lin HH, Tseng KH, Tien N, Lin YT, Yu J, Hsueh PR, et al. Evaluation of the Rapid Sepsityper protocol and specific MBT-Sepsityper module for the identification of bacteremia and fungemia using Bruker Biotyper MALDI-TOF MS. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi.* déc 2022;55(6 Pt 2):1330-3.
71. Ponderand L, Pavese P, Maubon D, Giraudon E, Girard T, Landelle C, et al. Evaluation of Rapid Sepsityper® protocol and specific MBT-Sepsityper module (Bruker Daltonics) for the rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-TOF-MS. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 9 déc 2020;19(1):60.
72. Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. *J Clin Microbiol.* mars 2014;52(3):924-30.
73. Oviaño M, Sparbier K, Barba MJ, Kostrzewa M, Bou G. Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS). *Int J Antimicrob Agents.* déc 2016;48(6):655-60.
74. 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.

75. Jonasson E, Matuschek E, Kahlmeter G. Evaluation of prolonged incubation time of 16–20 h with the EUCAST rapid antimicrobial susceptibility disc diffusion testing method. *J Antimicrob Chemother.* 1 déc 2023;78(12):2926-32.
76. Åkerlund A, Jonasson E, Matuschek E, Serrander L, Sundqvist M, Kahlmeter G, et al. EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories. *J Antimicrob Chemother.* 1 nov 2020;75(11):3230-8.
77. Maugeri G, Lychko I, Sobral R, Roque A. Identification and Antibiotic-Susceptibility Profiling of Infectious Bacterial Agents: A Review of Current and Future Trends. *Biotechnol J.* 19 juill 2018;14:1700750.
78. Marschal M, Bachmaier J, Autenrieth I, Oberhettinger P, Willmann M, Peter S. Evaluation of the Accelerate Pheno System for Fast Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing from Positive Blood Cultures in Bloodstream Infections Caused by Gram-Negative Pathogens. *J Clin Microbiol.* juill 2017;55(7):2116-26.
79. Descours G, Desmurs L, Hoang TLT, Ibranosyan M, Baume M, Ranc AG, et al. Evaluation of the Accelerate Pheno™ system for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacteria in bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* août 2018;37(8):1573-83.
80. Patel YA, Kirn TJ, Weinstein MP, Uprety P. Systematic Evaluation of the Accelerate Pheno System for Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria Isolated from Blood Cultures. *Microbiol Spectr.* 22 déc 2021;9(3):e01836-21.
81. Robinson ED, Stilwell AM, Attai AE, Donohue LE, Shah MD, Hill BK, et al. Implementation of a Rapid Phenotypic Susceptibility Platform for Gram-Negative Bloodstream Infections With Paired Antimicrobial Stewardship Intervention: Is the Juice Worth the Squeeze? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 7 sept 2021;73(5):783-92.
82. Ehren K, Meißner A, Jazmati N, Wille J, Jung N, Vehreschild JJ, et al. Clinical Impact of Rapid Species Identification From Positive Blood Cultures With Same-day Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing on the Management and Outcome of Bloodstream Infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 17 mars 2020;70(7):1285-93.
83. Banerjee R, Teng CB, Cunningham SA, Ihde SM, Steckelberg JM, Moriarty JP, et al. Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction-Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 oct 2015;61(7):1071-80.
84. Dare RK, Lusardi K, Pearson C, McCain KD, Daniels KB, Van S, et al. Clinical Impact of Accelerate Pheno Rapid Blood Culture Detection System in Bacteremic Patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 6 déc 2021;73(11):e4616-26.
85. Kim JH, Kim I, Kang CK, Jun KI, Yoo SH, Chun JY, et al. Enhanced antimicrobial stewardship based on rapid phenotypic antimicrobial susceptibility testing for

bacteraemia in patients with haematological malignancies: a randomized controlled trial. *Clin Microbiol Infect.* 1 janv 2021;27(1):69-75.

86. Göransson J, Sundqvist M, Ghaderi E, Lisby JG, Molin Y, Eriksson E, et al. Performance of a System for Rapid Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria Directly from Positive Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol.* 28 févr 2023;61(3):e01525-22.
87. Esse J, Träger J, Valenza G, Bogdan C, Held J. Rapid phenotypic antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative rods directly from positive blood cultures using the novel Q-linea ASTar system. *J Clin Microbiol.* 21 nov 2023;61(11):e0054923.
88. Tibbetts R, George S, Burwell R, Rajeev L, Rhodes PA, Singh P, et al. Performance of the Reveal Rapid Antibiotic Susceptibility Testing System on Gram-Negative Blood Cultures at a Large Urban Hospital. *J Clin Microbiol.* 15 juin 2022;60(6):e0009822.
89. Bianco G, Boattini M, Comini S, Bondi A, Curtoni A, Piccinini G, et al. Detection of volatile organic compounds as new paradigm to accelerate antimicrobial susceptibility testing: performance evaluation of VITEK® REVEAL™. *J Antimicrob Chemother.* 3 sept 2024;79(9):2237-45.
90. Antonelli A, Cuffari S, Casciato B, Giani T, Rossolini GM. Evaluation of the Vitek® Reveal™ system for rapid antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative pathogens, including ESBL, CRE and CRAB, from positive blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis.* déc 2024;110(4):116503.
91. Menchinelli G, Squitieri D, Magri C, De Maio F, D'Inzeo T, Cacaci M, et al. Verification of the Vitek Reveal System for Direct Antimicrobial Susceptibility Testing in Gram-Negative Positive Blood Cultures. *Antibiot Basel Switz.* 7 nov 2024;13(11):1058.
92. Yuceel-Timur I, Thierry E, Chainier D, Ndao I, Labrousse M, Grélaud C, et al. Retrospective evaluation of rapid genotypic ID and phenotypic AST systems on positive blood culture turnaround time and simulated potential impacts on bloodstream infection management. *J Antimicrob Chemother.* 1 sept 2024;79(Supplement_1):i26-31.
93. Ambriz-Aviña V, Contreras-Garduño JA, Pedraza-Reyes M. Applications of Flow Cytometry to Characterize Bacterial Physiological Responses. *BioMed Res Int.* 2014;2014:461941.
94. Costa-de-Oliveira S, Teixeira-Santos R, Silva AP, Pinho E, Mergulhão P, Silva-Dias A, et al. Potential Impact of Flow Cytometry Antimicrobial Susceptibility Testing on the Clinical Management of Gram-Negative Bacteremia Using the FASTinov® Kit. *Front Microbiol.* 2017;8:2455.
95. Pina-Vaz C, Silva-Dias A, Martins-Oliveira I, Gomes R, Perez-Viso B, Cruz S, et al. A multisite validation of a two hours antibiotic susceptibility flow cytometry assay directly from positive blood cultures. *BMC Microbiol.* 28 mai 2024;24(1):187.

96. Silva-Dias A, Pérez-Viso B, Martins-Oliveira I, Gomes R, Rodrigues AG, Cantón R, et al. Evaluation of FASTinov Ultrarapid Flow Cytometry Antimicrobial Susceptibility Testing Directly from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*. 20 sept 2021;59(10):e0054421.
97. Van den Poel B, Meersseman P, Debaveye Y, Klak A, Verhaegen J, Desmet S. Performance and potential clinical impact of Alfred60AST (Alifax®) for direct antimicrobial susceptibility testing on positive blood culture bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. janv 2020;39(1):53-63.
98. Anton-Vazquez V, Adjepong S, Suarez C, Planche T. Evaluation of a new Rapid Antimicrobial Susceptibility system for Gram-negative and Gram-positive bloodstream infections: speed and accuracy of Alfred 60AST. *BMC Microbiol*. 29 nov 2019;19(1):268.
99. Anton-Vazquez V, Suarez C, Planche T. Impact of rapid susceptibility testing on antimicrobial therapy and clinical outcomes in Gram-negative bloodstream infections. *J Antimicrob Chemother*. 2 mars 2022;77(3):771-81.
100. Walewski V, Podglajen I, Lefeuvre P, Dutasta F, Neuschwander A, Tilouche L, et al. Early detection with the β -LACTA™ test of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1 nov 2015;83(3):216-8.
101. Heraud S, Freydiere AM, Doleans-Jordheim A, Bes M, Tristan A, Vandenesch F, et al. Direct Identification of *Staphylococcus aureus* and Determination of Methicillin Susceptibility From Positive Blood-Culture Bottles in a Bact/ALERT System Using Binax Now *S. aureus* and PBP2a Tests. *Ann Lab Med*. juill 2015;35(4):454-7.
102. Romero-Gómez MP, Quiles-Melero I, Navarro C, Paño-Pardo JR, Gómez-Gil R, Mingorance J. Evaluation of the BinaxNOW PBP2a assay for the direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis*. mars 2012;72(3):282-4.
103. Peri AM, Ling W, Furuya-Kanamori L, Harris PNA, Paterson DL. Performance of BioFire Blood Culture Identification 2 Panel (BCID2) for the detection of bloodstream pathogens and their associated resistance markers: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. *BMC Infect Dis*. 20 oct 2022;22(1):794.
104. MacVane SH, Nolte FS. Benefits of Adding a Rapid PCR-Based Blood Culture Identification Panel to an Established Antimicrobial Stewardship Program. *J Clin Microbiol*. oct 2016;54(10):2455-63.
105. Dunbar SA, Gardner C, Das S. Diagnosis and Management of Bloodstream Infections With Rapid, Multiplexed Molecular Assays. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:859935.
106. Walker T, Dumadag S, Lee CJ, Lee SH, Bender JM, Cupo Abbott J, et al. Clinical Impact of Laboratory Implementation of Verigene BC-GN Microarray-Based

Assay for Detection of Gram-Negative Bacteria in Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* juill 2016;54(7):1789-96.

107. Caspar Y, Deves A, Richarme C, Le Marechal M, Ponderand L, Mounayar AL, et al. Clinical impact and cost-consequence analysis of ePlex® blood culture identification panels for the rapid diagnosis of bloodstream infections: a single-center randomized controlled trial. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1 juin 2024;43(6):1193-203.
108. McCarty TP, Cumagun P, Meeder J, Moates D, Edwards WS, Hutchinson J, et al. Test Performance and Potential Clinical Utility of the GenMark Dx ePlex Blood Culture Identification Gram-Negative Panel. *Microbiol Spectr.* 14 févr 2023;11(1):e0409222.
109. Martin T, Wilber E, Advani S, Torrisi J, Patel M, Rebolledo PA, et al. The impact of implementation of rapid blood culture identification panels on antimicrobial optimization: a retrospective cohort study. *Antimicrob Steward Healthc Epidemiol ASHE.* 2024;4(1):e44.
110. Thomas JK, Clark J, Arora V, Burgess DS, Burgess DR, Mynatt RP, et al. Performance of ePlex® blood culture identification panels in clinical isolates and characterization of antimicrobial stewardship opportunities. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 juill 2024;109(3):116269.
111. 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 Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* sept 2018;24(9):944-55.
112. Florio W, Morici P, Ghelardi E, Barnini S, Lupetti A. Recent advances in the microbiological diagnosis of bloodstream infections. *Crit Rev Microbiol.* mai 2018;44(3):351-70.
113. Peri AM, Harris PNA, Paterson DL. Culture-independent detection systems for bloodstream infection. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* févr 2022;28(2):195-201.
114. Nguyen MH, Clancy CJ, Pasculle AW, Pappas PG, Alangaden G, Pankey GA, et al. Performance of the T2Bacteria Panel for Diagnosing Bloodstream Infections: A Diagnostic Accuracy Study. *Ann Intern Med.* 18 juin 2019;170(12):845-52.
115. 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.
116. Kalligeros M, Zacharioudakis IM, Tansarli GS, Tori K, Shehadeh F, Mylonakis E. In-depth analysis of T2Bacteria positive results in patients with concurrent negative blood culture: a case series. *BMC Infect Dis.* 7 mai 2020;20(1):326.
117. Snyder JL, Lapp HS, Luo ZX, Manning B, Lowery TJ. Nucleic Acid Amplicons Detected and Identified by T2 Magnetic Resonance. In: Tang YW, Stratton CW,

- éditeurs. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*: [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 491-503. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-319-33900-9_23
118. Giannella M, Pankey GA, Pascale R, Miller VM, Miller LE, Seitz T. Antimicrobial and resource utilization with T2 magnetic resonance for rapid diagnosis of bloodstream infections: systematic review with meta-analysis of controlled studies. *Expert Rev Med Devices*. 4 mai 2021;18(5):473-82.
 119. Walsh TJ, Mencacci A, Paggi R, Douka E, Vrettou C, Smith R, et al. Prospective observational pilot study of the T2Resistance panel in the T2Dx system for detection of resistance genes in bacterial bloodstream infections. *J Clin Microbiol*. 8 mars 2024;62(4):e01296-23.
 120. Miller S, Chiu C. The Role of Metagenomics and Next-Generation Sequencing in Infectious Disease Diagnosis. *Clin Chem*. 1 janv 2022;68(1):115-24.
 121. Godlewska U, Brzoza P, Kwiecień K, Kwitniewski M, Cichy J. Metagenomic Studies in Inflammatory Skin Diseases. *Curr Microbiol*. nov 2020;77(11):3201-12.
 122. Sinha M, Jupe J, Mack H, Coleman TP, Lawrence SM, Fraley SI. Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis. *Clin Microbiol Rev*. avr 2018;31(2):e00089-17.
 123. Mangioni D, Peri AM, Rossolini GM, Viaggi B, Perno CF, Gori A, et al. Toward Rapid Sepsis Diagnosis and Patient Stratification: What's New From Microbiology and Omics Science. *J Infect Dis*. 16 mars 2020;221(7):1039-47.
 124. Molzym [Internet]. SepsisTest™-UMD. Disponible sur: https://www.molzym.com/images/downloads/Molzym_SepsisTest-UMD_Flyer_V06ENG_Web.pdf
 125. Thair S, Seng H, Hollemon D, Hong D, Blauwkamp T, Kertesz M, et al. The SEP-SEQ Trial: Clinical Validation of the Karius Plasma Next-Generation Sequencing Test for Pathogen Detection in Sepsis. *Open Forum Infect Dis*. 1 oct 2017;4(suppl_1):S735.
 126. Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, Blair L, Lindner MS, Vilfan ID, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. *Nat Microbiol*. avr 2019;4(4):663-74.
 127. Hogan CA, Yang S, Garner OB, Green DA, Gomez CA, Dien Bard J, et al. Clinical Impact of Metagenomic Next-Generation Sequencing of Plasma Cell-Free DNA for the Diagnosis of Infectious Diseases: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 27 janv 2021;72(2):239-45.
 128. Niles DT, Wijetunge DSS, Palazzi DL, Singh IR, Revell PA. Plasma Metagenomic Next-Generation Sequencing Assay for Identifying Pathogens: a Retrospective Review of Test Utilization in a Large Children's Hospital. *J Clin Microbiol*. 21 oct 2020;58(11):e00794-20.

129. Batool M, Galloway-Peña J. Clinical metagenomics-challenges and future prospects. *Front Microbiol.* 2023;14:1186424.
130. Maurer FP, Christner M, Hentschke M, Rohde H. Advances in Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory: Implications for Patient Care and Antimicrobial Stewardship Programs. *Infect Dis Rep.* 30 mars 2017;9(1):6839.
131. Sze DTT, Lau CCY, Chan TM, Ma ESK, Tang BSF. Comparison of novel rapid diagnostic of blood culture identification and antimicrobial susceptibility testing by Accelerate Pheno system and BioFire FilmArray Blood Culture Identification and BioFire FilmArray Blood Culture Identification 2 panels. *BMC Microbiol.* 18 déc 2021;21(1):350.
132. Park S, Kim D, Ryoo N. Comparative Assessment of Rapid Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Bloodstream Infections in a Non-24/7 Clinical Microbiology Laboratory. *Microorganisms.* mai 2025;13(5):1041.
133. Banerjee R, Özenci V, Patel R. Individualized Approaches Are Needed for Optimized Blood Cultures. *Clin Infect Dis.* 15 nov 2016;63(10):1332-9.
134. Smith RD, Zhan M, Zhang S, Leekha S, Harris A, Doi Y, et al. Comparison of three rapid diagnostic tests for bloodstream infections using Benefit-risk Evaluation Framework (BED-FRAME). *J Clin Microbiol.* 17 janv 2024;62(1):e0109623.
135. Bauer KA, Perez KK, Forrest GN, Goff DA. Review of Rapid Diagnostic Tests Used by Antimicrobial Stewardship Programs. *Clin Infect Dis.* 15 oct 2014;59(suppl_3):S134-45.
136. Timbrook TT, Morton JB, McConeghy KW, Caffrey AR, Mylonakis E, LaPlante KL. The Effect of Molecular Rapid Diagnostic Testing on Clinical Outcomes in Bloodstream Infections: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 janv 2017;64(1):15-23.
137. Peri AM, Chatfield MD, Ling W, Furuya-Kanamori L, Harris PNA, Paterson DL. Rapid Diagnostic Tests and Antimicrobial Stewardship Programs for the Management of Bloodstream Infection: What Is Their Relative Contribution to Improving Clinical Outcomes? A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 15 août 2024;79(2):502-15.
138. Dyar OJ, Huttner B, Schouten J, Pulcini C. What is antimicrobial stewardship? *Clin Microbiol Infect.* 1 nov 2017;23(11):793-8.
139. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Land GA, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med.* sept 2013;137(9):1247-54.
140. Pardo J, Klinker KP, Borgert SJ, Butler BM, Giglio PG, Rand KH. Clinical and economic impact of antimicrobial stewardship interventions with the FilmArray blood culture identification panel. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 févr 2016;84(2):159-64.

141. FASTinov. New Economic Study Highlights Life-Saving and Cost-Effective Benefits of FASTinov's Ultra-Rapid Antimicrobial Susceptibility Test in Portuguese healthcare [Internet]. Disponible sur: <https://www.fastinov.com/2025/01/07/fastinov-releases-economic-study/>
142. Buehler SS, Madison B, Snyder SR, Derzon JH, Cornish NE, Saubolle MA, et al. Effectiveness of Practices To Increase Timeliness of Providing Targeted Therapy for Inpatients with Bloodstream Infections: a Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Microbiol Rev.* janv 2016;29(1):59-103.
143. Smith RD, Johnson JK, Ernst RK. Comparison of 3 diagnostic platforms for identification of bacteria and yeast from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis.* oct 2023;107(2):116018.
144. Martinez RM, Bauerle ER, Fang FC, Butler-Wu SM. Evaluation of Three Rapid Diagnostic Methods for Direct Identification of Microorganisms in Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* juill 2014;52(7):2521-9.
145. Wani AK, Roy P, Kumar V, Mir T ul G. Metagenomics and artificial intelligence in the context of human health. *Infect Genet Evol.* 1 juin 2022;100:105267.

Université de Lille
UFR3S-Pharmacie
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2024/2025

Nom : LUCAS
Prénom : Angèle

Titre de la thèse : Améliorer le rendu des résultats des bactériémies et la prise en charge du sepsis : quels outils en 2025 ?

Mots-clés : Bactériémie, sepsis, diagnostic, identification, antibiogramme, nouvelles technologies

Résumé : Le sepsis est une urgence médicale majeure pour laquelle un diagnostic microbiologique rapide est essentiel pour en adapter la prise en charge et réduire le risque de mortalité. Pour cette situation clinique, l'hémoculture demeure l'examen de laboratoire de référence, mais elle présente des limitations, notamment en termes de délai et de sensibilité, peu compatibles avec les circonstances d'une urgence vitale. Dans ce contexte, de nouveaux outils diagnostiques sont apparus. Ils incluent des tests moléculaires, allant de ceux dits « multiplexes » jusqu'à la métagénomique *shotgun*, et des tests phénotypiques permettant une identification microbienne directement à partir du flacon d'hémoculture, voire du sang du patient, ainsi qu'une détection plus rapide de la sensibilité aux antibiotiques des micro-organismes incriminés, via des plateformes plus ou moins automatisées. Ces technologies, bien que prometteuses, posent des défis techniques et économiques, notamment en raison de leur coût intrinsèque et de la nécessité d'une expertise spécialisée. Leur succès dépend de leur intégration dans le flux de travail des laboratoires et de leur accompagnement par des stratégies efficaces de gestion de l'utilisation des antibiotiques.

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur FOLIGNÉ Benoît,
Professeur des Universités, Université de Lille

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur BLONDIAUX Nicolas,
Pharmacien Praticien des Hôpitaux, GHICL

Assesseurs : Monsieur le Docteur PATOZ Pierre
Pharmacien Praticien Hospitalier, CH Tourcoing

Monsieur le Docteur WEYRICH Pierre
Médecin Praticien des Hôpitaux, GHICL