

# Apport des « nouvelles techniques » en bactériologie pour la prise en charge des patients

Ludovic Lemée, Bactériologie, CHU et CRCM de Rouen

→ La bactériologie de la mucoviscidose est difficile et imparfaite. Les techniques bactériologiques influencent les résultats de l'ECBC : parler avec ses bactériologistes !

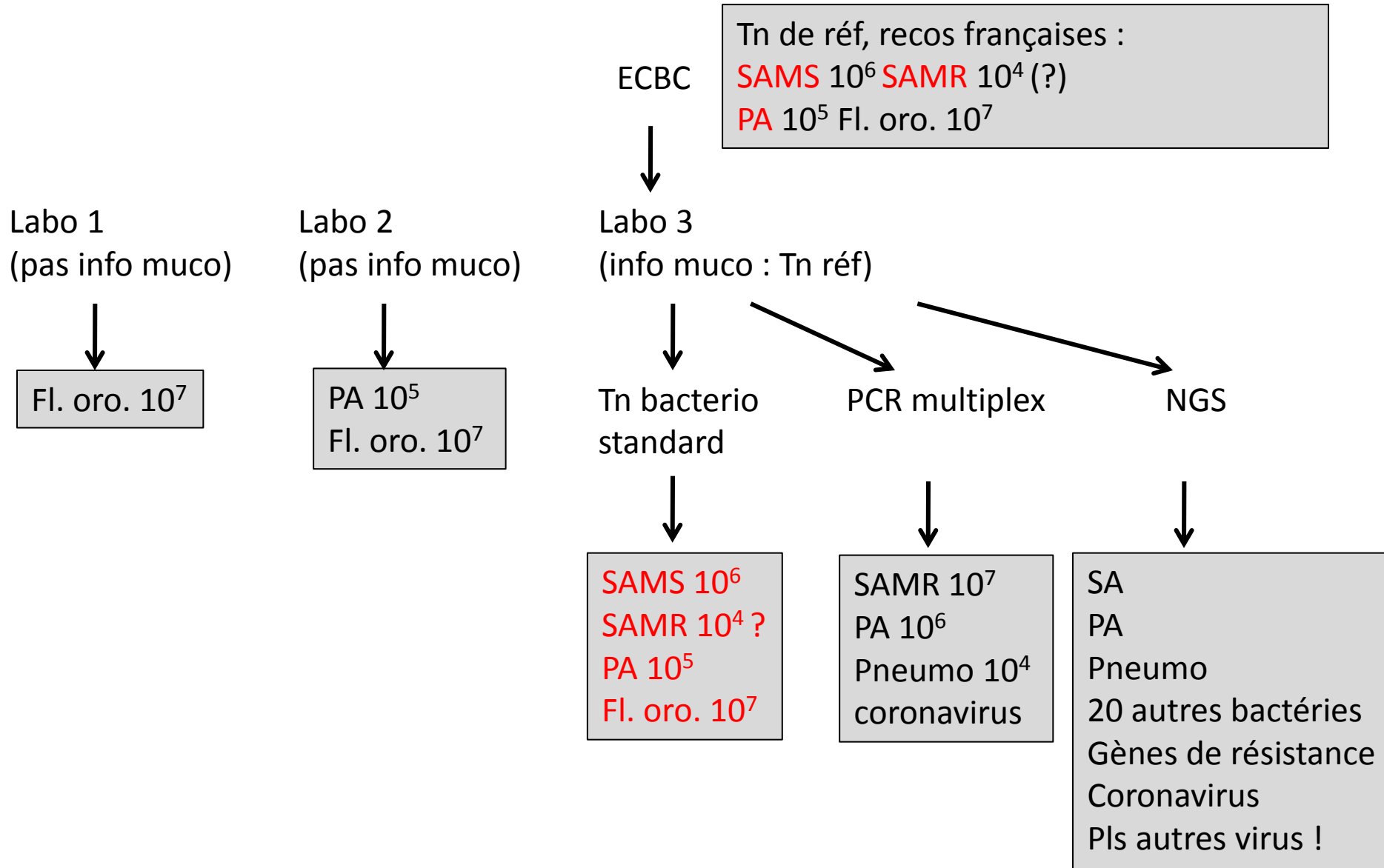
- ECBC envoyé au labo de bactériologie pour :
  - Détection pathogènes potentiels
  - Si détection : réalisation d'antibiogrammes pour obtenir les profils de sensibilité/résistance de ces pathogènes pour pouvoir traiter

(question : quels ATB pour traiter l'éventuelle exacerbation en cours ?)

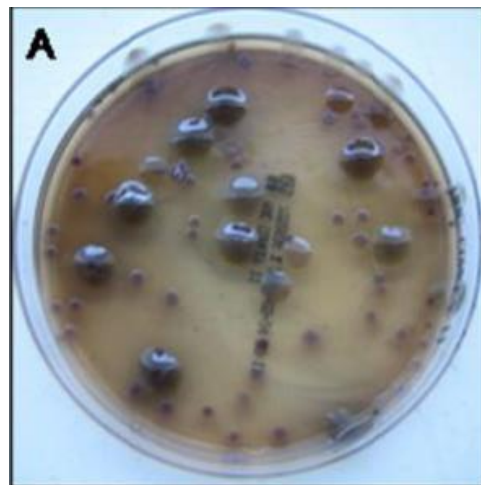
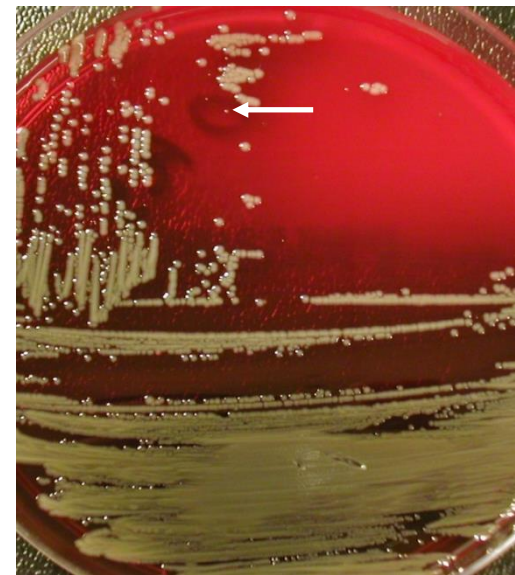
- D'habitude l'ATBG est prédictif du succès clinique
  - Ex : suspicion IU → ECBU → ATBG → choix de la molécule → succès clinique (90% !)
  - La bactériologie de la mucoviscidose, avec son ou ses ATBG finaux n'est pas aussi fiable et prédictive !
    - Choix molécules actives d'après ATBG → pas de succès clinique
    - Molécules inactives sur l'ATBG (souches toto-R ou traitement empirique) → amélioration clinique !

- 2 grands types de raisons :
  - Problèmes de détection exhaustive des pathogènes présents et/ou de tri parmi ces pathogènes
  - Problèmes sur les tests ATB (ATBG) eux-mêmes, trop éloignés du biofilm bronchique

# Les problèmes de détection de pathogènes : impact+++ des techniques bactério

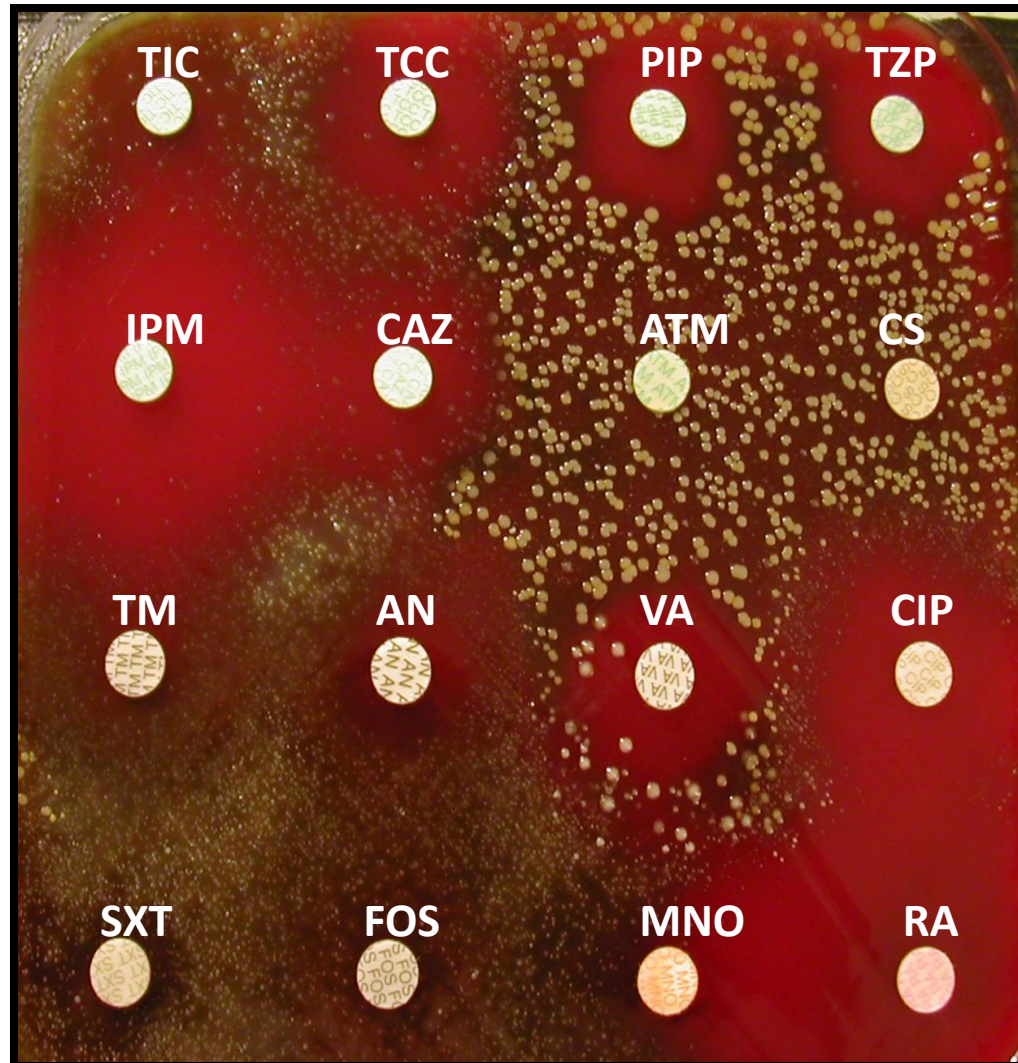


- Détecter tous les pathogènes potentiels...
- Difficile, même avec la technique de référence

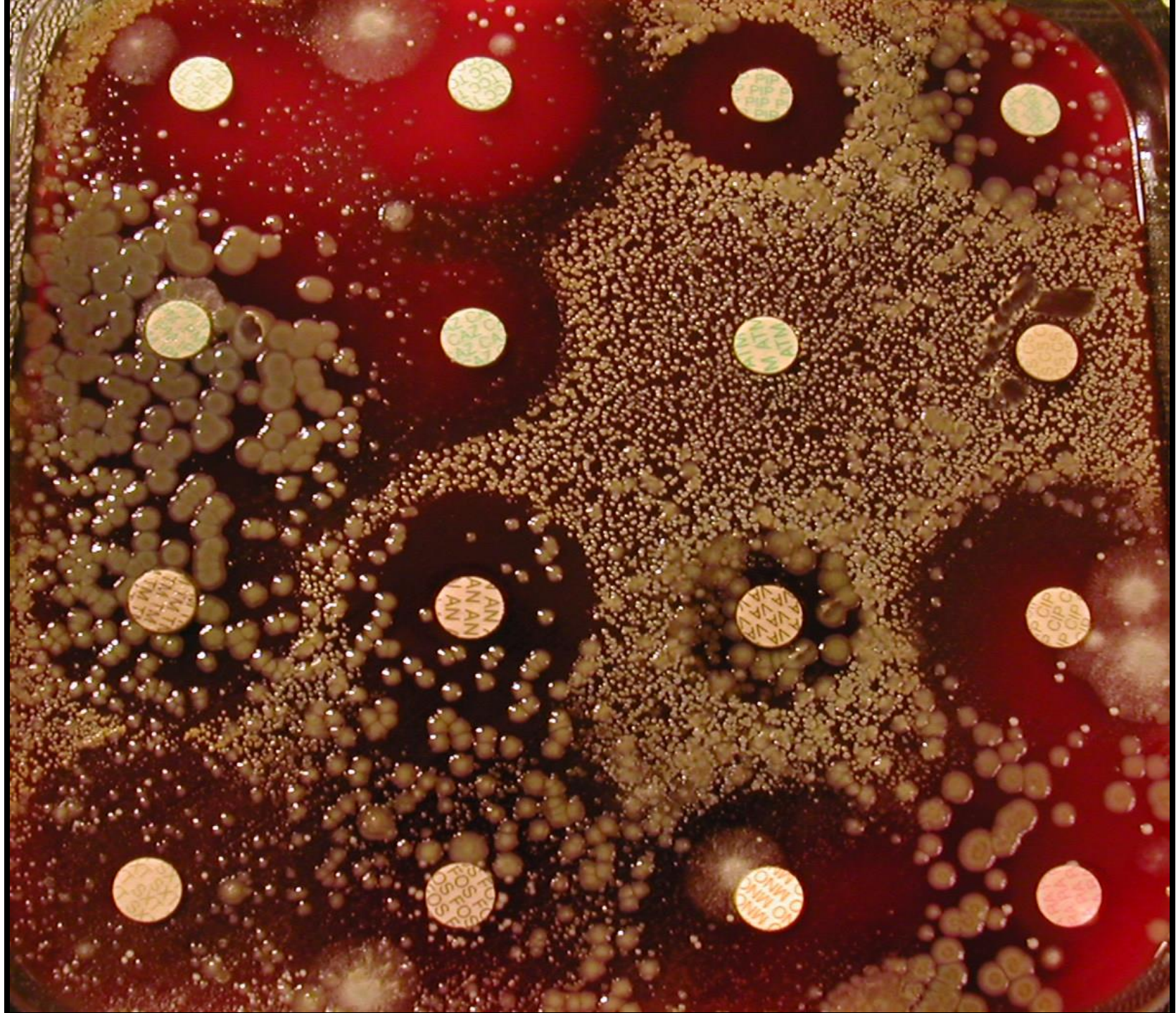




- Une 11<sup>ème</sup> gélose !







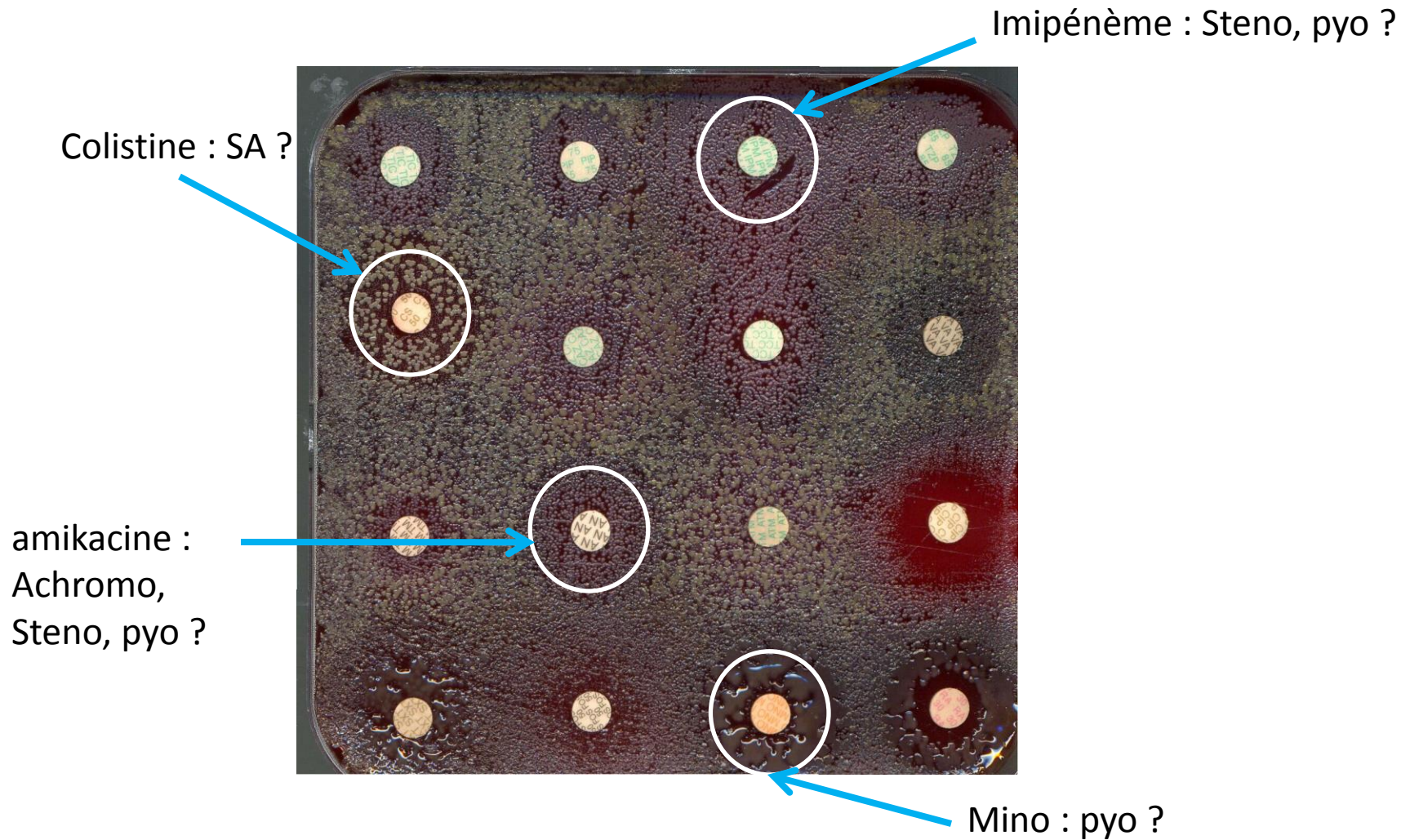


- Résout fréquemment les interaction de flores



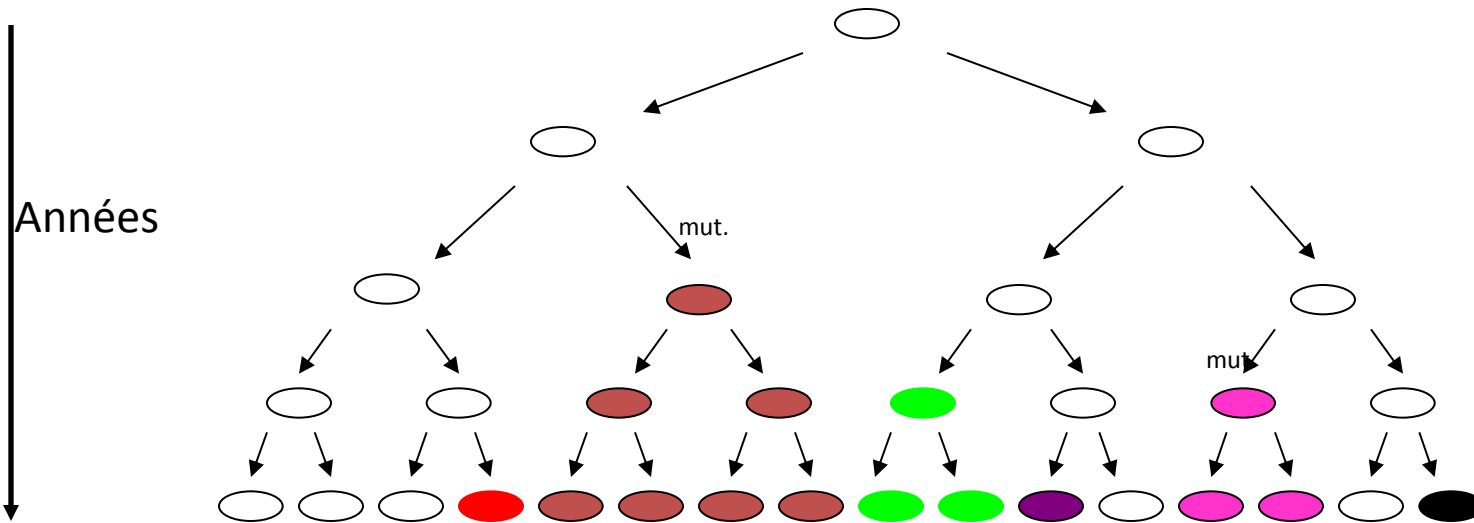


- Une aide, même sur des flores difficiles !



- Le problème des nombreux morphotypes de PA

Une souche de primo-colonisation



**Une multitude de descendants de phénotypes / génotypes différents**

(avec tendance hyper-adaptation micro-environnement bronchique et apparition variants atypiques)

- Différents morphotypes de PA → différents antibiotypes !

2 Pseudomonas aeruginosa

Antibiotiques		CMI	Antibiotiques		CMI	Antibiotiques		CMI
I TICARCILLINE	S..		I TICARCILLINE	..R	I TICARCILLINE	..R	I TICARCILLINE	..R
I TICAR+AC.CLAV	S..		I TICAR+AC.CLAV	..R	I TICAR+AC.CLAV	..R	I TICAR+AC.CLAV	..R
I PIPERACILLINE	S..		I PIPERACILLINE	S..	I PIPERACILLINE	..R	I PIPERACILLINE	..R
I PIPER+TAZO	S..		I PIPER+TAZO	S..	I PIPER+TAZO	..R	I PIPER+TAZO	..R
I CEFEPIME	S..		I CEFEPIME	S..	I CEFEPIME	..R	I CEFEPIME	..R
I IMIPENEME	S..		I IMIPENEME	S..	I IMIPENEME	S..	I IMIPENEME	S..
I CEFTAZIDIME	S..		I CEFTAZIDIME	S..	I CEFTAZIDIME	..R	I CEFTAZIDIME	..R
I AZTREONAM	S..		I AZTREONAM	..I	I AZTREONAM	..R	I AZTREONAM	..R
I TOBRAMYCINE	S..		I TOBRAMYCINE	S..	I TOBRAMYCINE	S..	I TOBRAMYCINE	..R
I AMIKACINE	S..		I AMIKACINE	S..	I AMIKACINE	S..	I AMIKACINE	..R
I CIPROFLOXACINE	S..		I CIPROFLOXACINE	..R	I CIPROFLOXACINE	..R	I CIPROFLOXACINE	..R
I TRIMETH.+SULFA.	..R		I TRIMETH.+SULFA.	..R	I TRIMETH.+SULFA.	..R	I TRIMETH.+SULFA.	..R
			I FOSFOMYCINE	..R	I FOSFOMYCINE	..R		

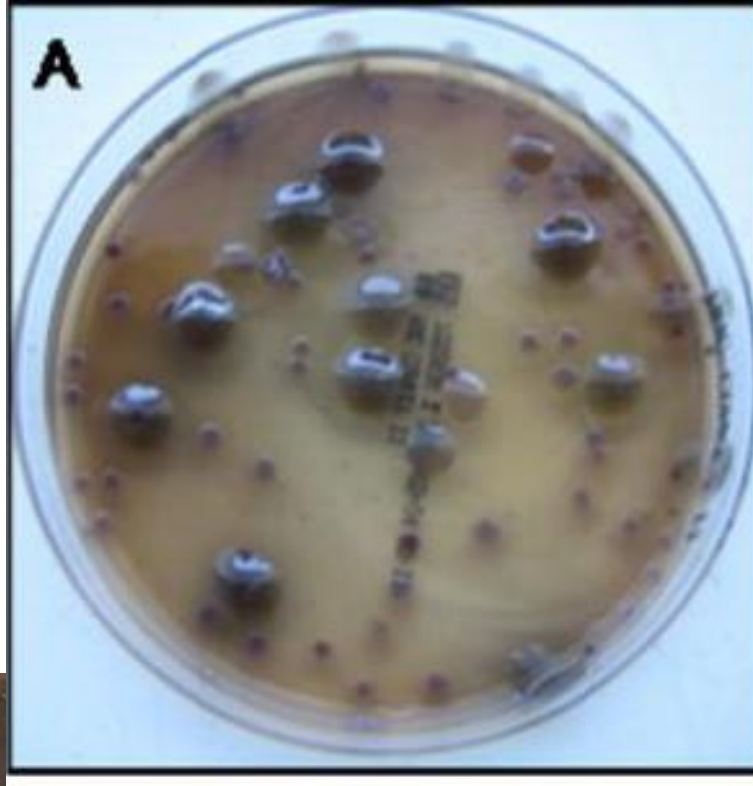
2 Pseudomonas aeruginosa

Bactérie présentant un phé  
Prendre les mesures d'hygi

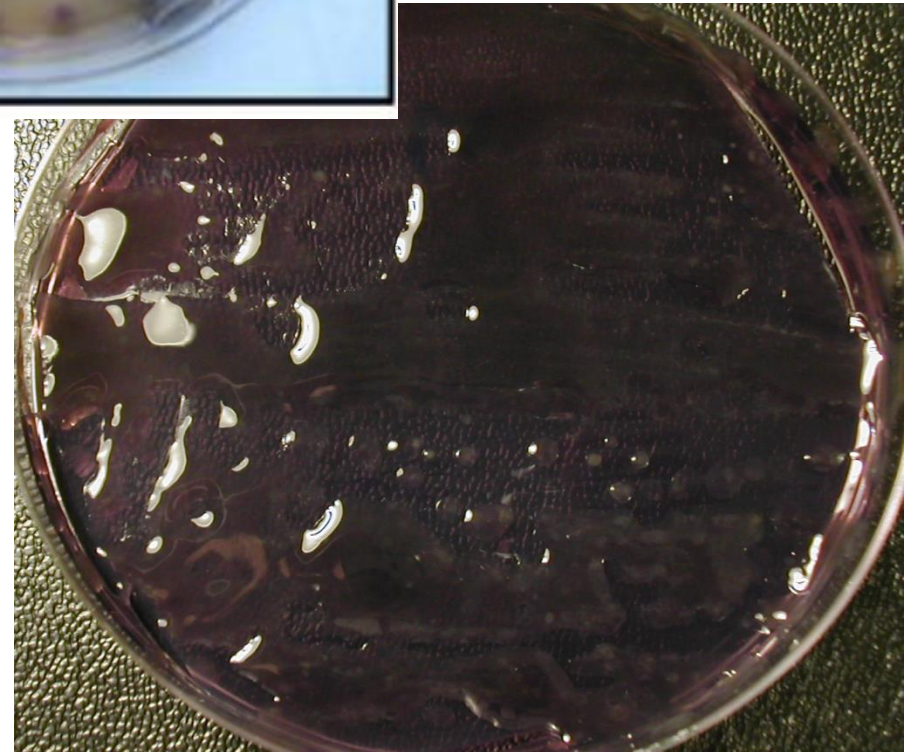
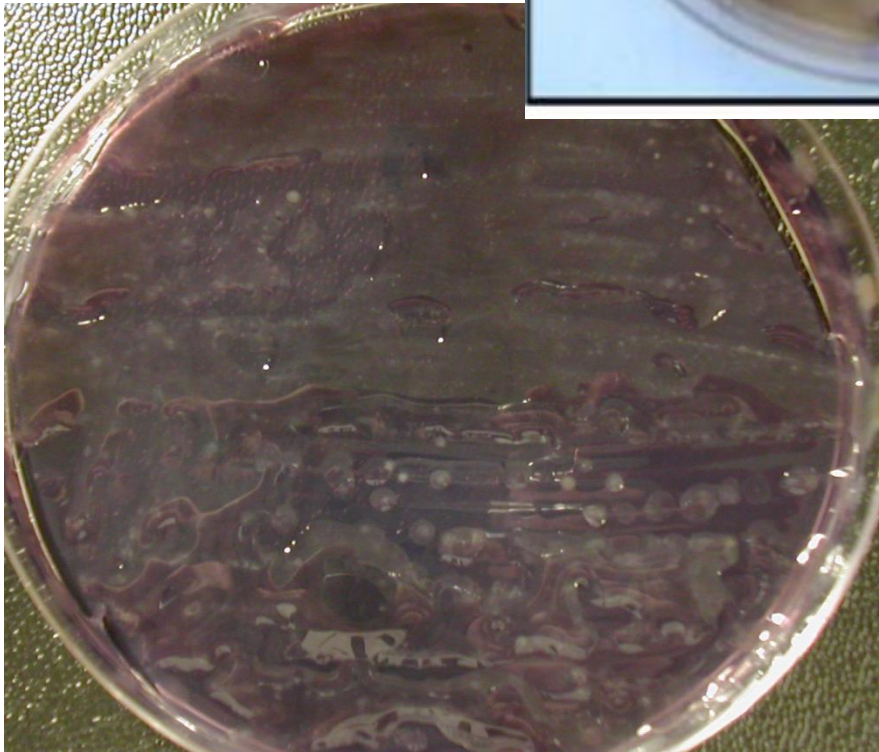
Antibiotiques		CMI
I TICARCILLINE	..R	
I TICAR+AC.CLAV	..R	
I PIPERACILLINE	..R	
I PIPER+TAZO	..R	
I CEFEPIME	..R	
I IMIPENEME	..R	
I MINOCYCLINE	..R	
I RIFAMPICINE	..R	
I CEFTAZIDIME	..R	
I AZTREONAM	..R	
I TOBRAMYCINE	..R	
I AMIKACINE	..R	
I CIPROFLOXACINE	..R	
I TRIMETH.+SULFA.	..R	



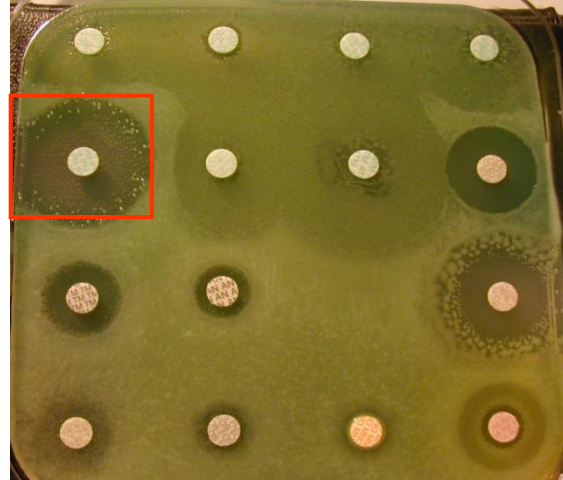
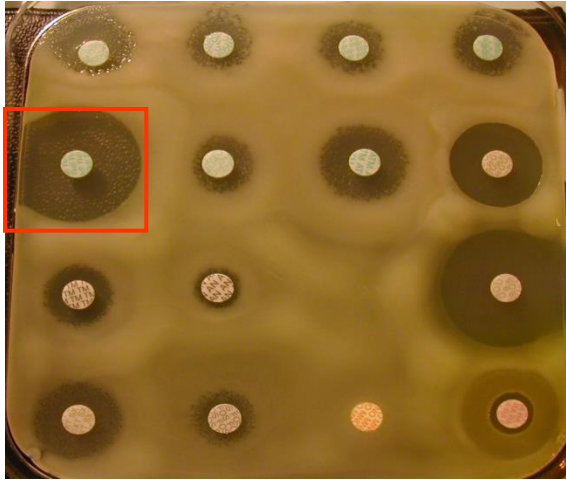
Complication : différents morphotypes → parfois même antibiotype...



...et différentes colonies de même morphotype → parfois antibiotypes différents !

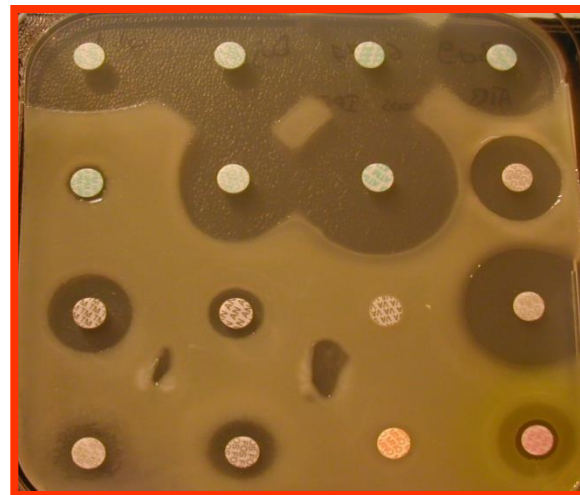
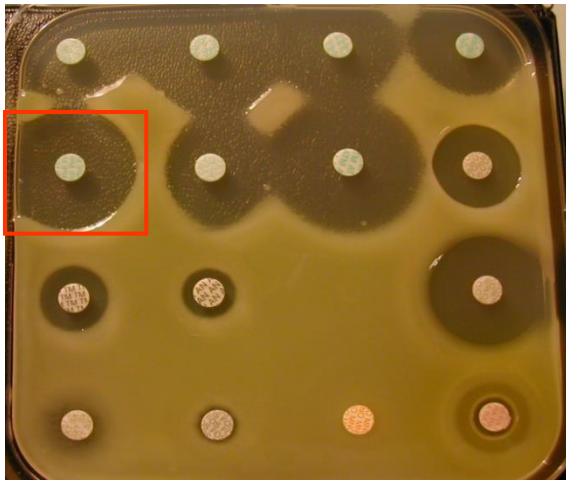


- morphotypes de PA : détection « exhaustive »...  
ou pas !



➤ Patient D.E. :  
CR itératifs mensuels:

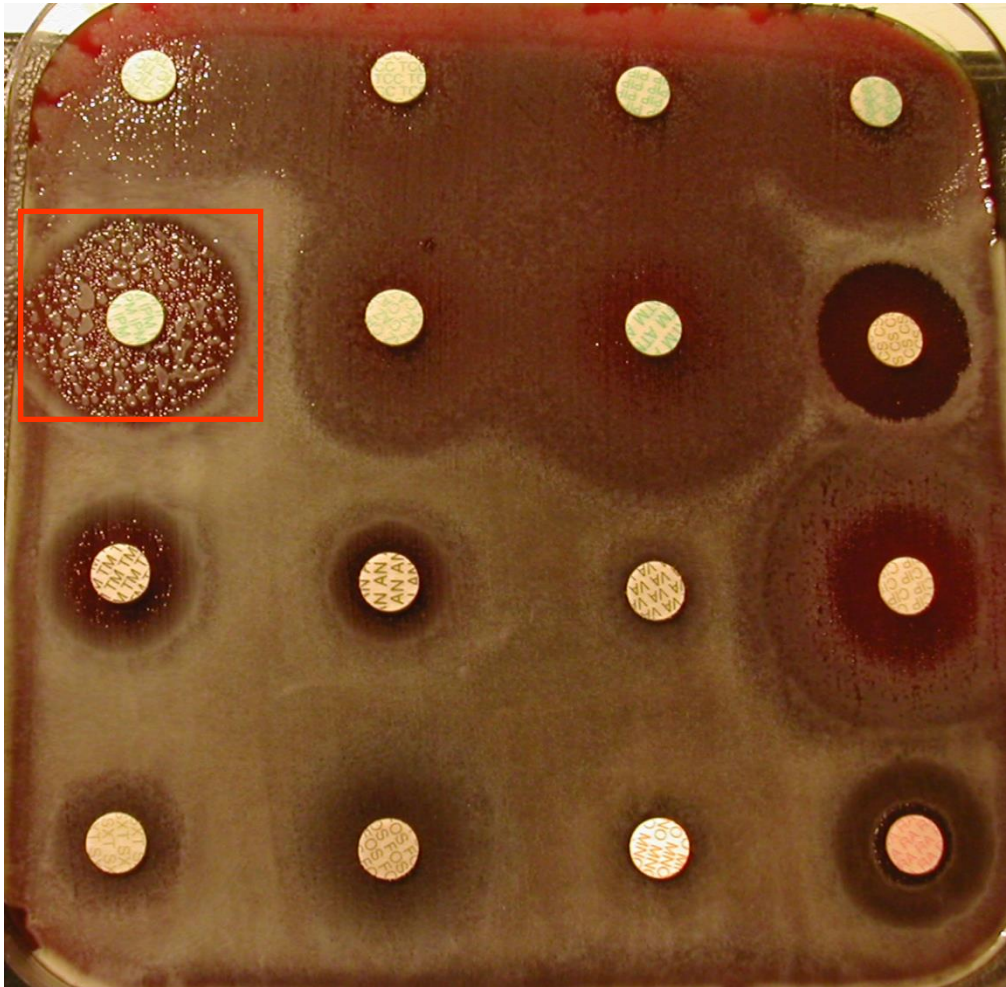
- soit 3 *P. aeruginosa*  
(tous imipénème S)



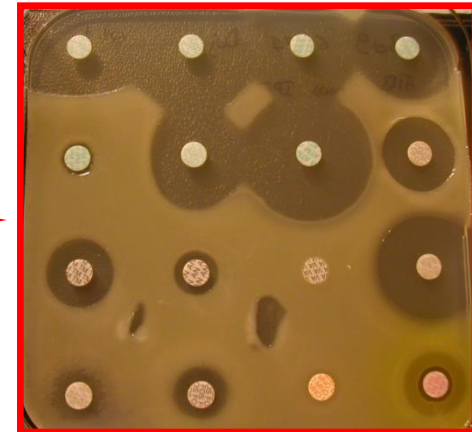
- soit 4 *P. aeruginosa*  
(dont 1 imipénème R)



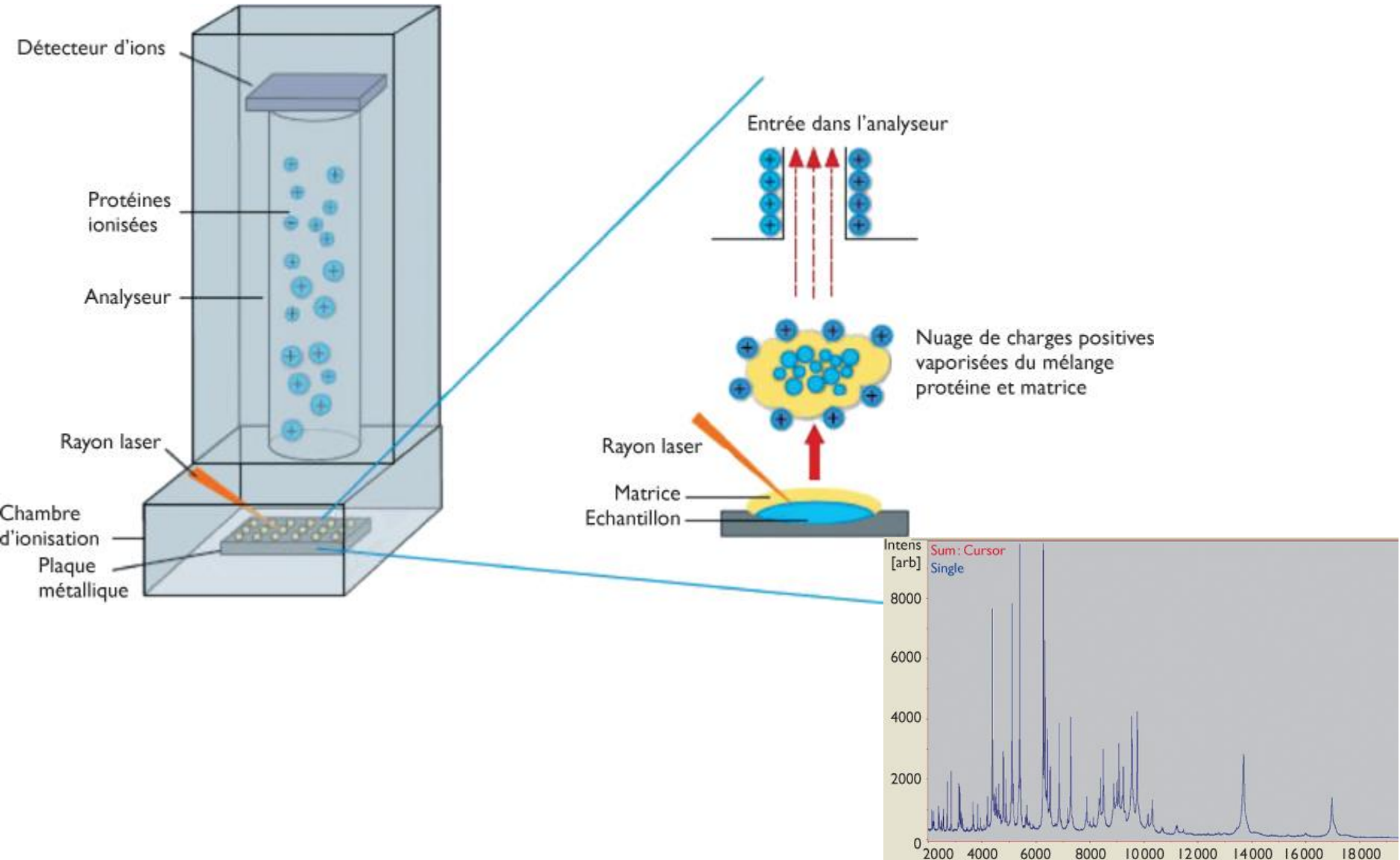
- La 11eme gélose résout aussi fréquemment ce problème de sous-populations



➤ Détection aisée des souches les plus résistantes (si densité suffisante)



- Apports du maldi-tof : fiabilité des identifications





- Apports du maldi-tof : fiabilité des identifications
- Et pour le clinicien... pleins de nouveaux noms !

- *Inquilinus limosus*
- *Chryseobacterium spp*
- *Chryseobacterium meningosepticum*
- *Comamonas spp*
- *Delftia spp*
- *Rhizobium spp*
- *Herbaspirillum spp*
- *Ralstonia insidiosa*
- *Ralstonia mannitolilytica*
- *Bordetella spp*
- *Pandoraea spp*
- *Chromobacterium spp*
- *Streptococcus milleri*
- *Cupriavidus necator*
- *Cupriavidus taiwanensis*
- *Cupriavidus gilardii*
- *Cupriavidus respiraculi*
- *Cupriavidus metallidurans*
- ....

***S. aureus / S. argenteus !?***

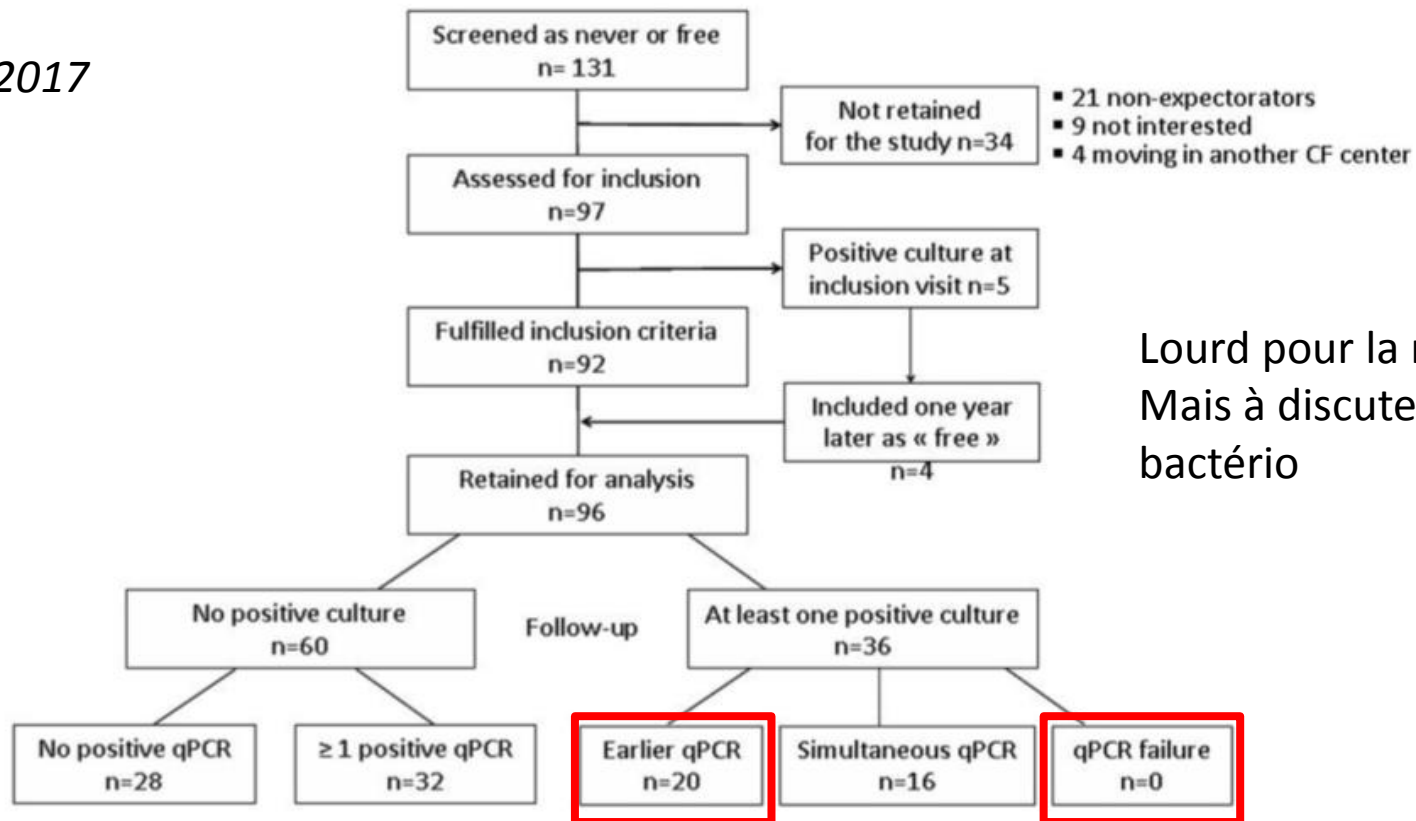
- Pathogénicité, signification... ?

# • Amélioration de la détection de PA : la PCR ?

## Evaluation of quantitative PCR for early diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: a prospective cohort study

G. Héry-Arnaud <sup>1,2,\*</sup>, E. Nowak <sup>3</sup>, J. Caillon <sup>4</sup>, V. David <sup>5</sup>, A. Dirou <sup>6</sup>, K. Revert <sup>6</sup>, M.-R. Munck <sup>7</sup>, I. Frachon <sup>8</sup>, A. Haloun <sup>9</sup>, D. Horeau-Langlard <sup>9</sup>, J. Le Bihan <sup>6</sup>, I. Danner-Boucher <sup>9</sup>, S. Ramel <sup>6</sup>, M.-P. Pelletier <sup>6</sup>, S. Rosec <sup>3</sup>, S. Gouriou <sup>1</sup>, E. Poulhazan <sup>3</sup>, C. Payan <sup>1,2</sup>, C. Férec <sup>10,11,12,13</sup>, G. Rault <sup>6</sup>, G. Le Gal <sup>3</sup>, R. Le Berre <sup>1,8,\*</sup>





CMI, 2017



Lourd pour la routine...  
Mais à discuter avec ses bactério

**Fig. 1.** Flowchart of study participants, with culture and quantitative PCR (qPCR) results for the 707 sputum samples. Results of *oprL* qPCR combined with *gyrB/efcX* qPCR if bacterial density on *oprL* qPCR was  $\geq 730$  CFU/mL are reported.

- Amélioration de la détection de différents pathogènes : les PCR multiplex ?

 <b>FilmArray®</b> <b>Pneumonia Panel <i>plus</i> - IVD</b>		 <b>BIO FIRE®</b> <small>A BIOMÉRIEUX COMPANY</small> <a href="http://www.BioFireDx.com">www.BioFireDx.com</a>				
<b>Run Information</b>						
Sample ID	11125575 [REDACTED]	Run Date	18 Mar 2021 12:06 PM			
Protocol	SPUTUM v3.3	Serial No.	29426619			
Pouch Type	Pneumoplus v2.0	Lot No.	266720			
Controls	Passed	Operator	estelle bernard (bernes)			
Run Status	Completed	Instrument	TM05B1A			
<b>Detection Summary</b>						
<b>Bacteria</b>						
		<b>Bin (copies/mL)</b>				
	<b>Bin (copies/mL)</b>		<b>10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>≥10<sup>7</sup></b>
Detected:	✓ ≥10 <sup>7</sup> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
	✓ 10 <sup>5</sup> <i>Streptococcus pneumoniae</i>					
	✓ 10 <sup>4</sup> <i>Haemophilus influenzae</i>					
	✓ 10 <sup>4</sup> <i>Staphylococcus aureus</i>					
	<p><b>Note:</b> Detection of bacterial nucleic acid may be indicative of colonizing or normal respiratory flora and may not indicate the causative agent of pneumonia. Semi-quantitative Bin (copies/mL) results generated by the FilmArray Pneumonia Panel <i>plus</i> are not equivalent to CFU/mL and do not consistently correlate with the quantity of bacterial analytes compared to CFU/mL. For specimens with multiple bacteria detected, the relative abundance of nucleic acids (copies/mL) may not correlate with the relative abundance of bacteria as determined by culture (CFU/mL). Clinical correlation is advised to determine significance of semi-quantitative Bin (copies/mL) for clinical management.</p>					
<b>Antimicrobial Resistance Genes</b>						
Detected:	None					
	<p><b>Note:</b> Antimicrobial resistance can occur via multiple mechanisms. A Not Detected result for a genetic marker of antimicrobial resistance does not indicate susceptibility to associated antimicrobial drugs or drug classes. A Detected result for a genetic marker of antimicrobial resistance cannot be definitively linked to the microorganism(s) detected. Culture is required to obtain isolates for antimicrobial susceptibility testing and FilmArray Pneumonia Panel <i>plus</i> results should be used in conjunction with culture results for the determination of susceptibility or resistance.</p>					
<b>Atypical Bacteria</b>						
Detected:	None					
<b>Viruses</b>						
Detected:	✓ Coronavirus					

	Bin (copies/mL)		10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	≥10 <sup>7</sup>
Not Detected		<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex				
Not Detected		<i>Enterobacter cloacae</i> complex				
Not Detected		<i>Escherichia coli</i>				
✓ Detected	10 <sup>4</sup>	<i>Haemophilus influenzae</i>	////			
Not Detected		<i>Klebsiella aerogenes</i>				
Not Detected		<i>Klebsiella oxytoca</i>				
Not Detected		<i>Klebsiella pneumoniae</i> group				
Not Detected		<i>Moraxella catarrhalis</i>				
Not Detected		<i>Proteus</i> spp.				
✓ Detected	≥10 <sup>7</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	////	////	////	////
Not Detected		<i>Serratia marcescens</i>				
✓ Detected	10 <sup>4</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i>	////			
Not Detected		<i>Streptococcus agalactiae</i>				
✓ Detected	10 <sup>5</sup>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	////	////		
Not Detected		<i>Streptococcus pyogenes</i>				

**Note:** Detection of bacterial nucleic acid may be indicative of colonizing or normal respiratory flora and may not indicate the causative agent of pneumonia. Semi-quantitative Bin (copies/mL) results generated by the FilmArray Pneumonia Panel *plus* are not equivalent to CFU/mL and do not consistently correlate with the quantity of bacterial analytes compared to CFU/mL. For specimens with multiple bacteria detected, the relative abundance of nucleic acids (copies/mL) may not correlate with the relative abundance of bacteria as determined by culture (CFU/mL). Clinical correlation is advised to determine significance of semi-quantitative Bin (copies/mL) for clinical management.

#### Antimicrobial Resistance Genes

Not Detected	CTX-M
Not Detected	IMP
Not Detected	KPC
Not Detected	<i>mecA/C</i> and MREJ
Not Detected	NDM
⊘ N/A	OXA-48-like
Not Detected	VIM

**Note:** Antimicrobial resistance can occur via multiple mechanisms. A Not Detected result for a genetic marker of antimicrobial resistance does not indicate susceptibility to associated antimicrobial drugs or drug classes. A Detected result for a genetic marker of antimicrobial resistance cannot be definitively linked to the microorganism(s) detected. Culture is required to obtain isolates for antimicrobial susceptibility testing and FilmArray Pneumonia Panel *plus* results should be used in conjunction with culture results for the determination of susceptibility or resistance.

#### Atypical Bacteria

Not Detected	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Not Detected	<i>Legionella pneumophila</i>
Not Detected	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>

#### Viruses

Not Detected	Adenovirus
✓ Detected	Coronavirus
Not Detected	Human Metapneumovirus
Not Detected	Human Rhinovirus/Enterovirus
Not Detected	Influenza A
Not Detected	Influenza B
Not Detected	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)
Not Detected	Parainfluenza Virus
Not Detected	Respiratory Syncytial Virus



- Techniques simples et très rapides !
- **PCRs multiplex, les limites :**
  - Coût !
  - ne trouvent que ce qu'elles cherchent (ex pour l'instant pas de Steno, Achromo, cepacia...)
  - Seuil ( $10^3$  à  $10^4$ /mL ?), fiabilité de quantification ?
  - gènes de résistance peu adaptés (sauf SAMR)

# Le futur proche : pangénomique ?

- Le NGS pour l'instant utilisé dans des protocoles de recherche (domaine microbiologie mucoviscidose)
- Étude du microbiote avec retombées cliniques (ex protocole BEACH)
- Les applications diagnostiques en routine sont pour l'instant en dehors de la mucoviscidose

# Et les tests ATB

- Pas grand-chose de neuf... qui marche !
- Tout ça pour.... Ça (Chest 2003)

1: Chest. 2003 May;123(5):1495-502.

[Related Articles, Links](#)

Full text article at  
[www.chestjournal.org](http://www.chestjournal.org)

**Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis.**

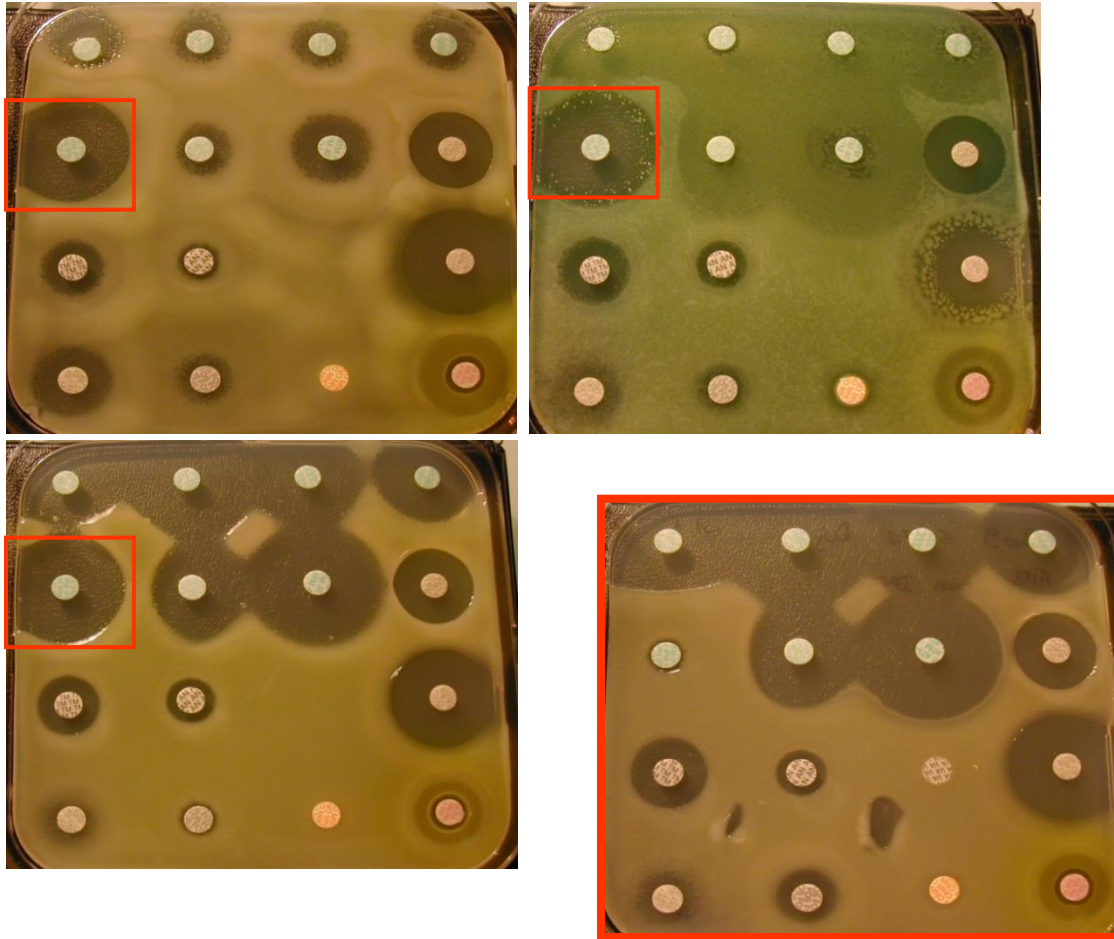
Smith AL, Fiel SB, Mayer-Hamblett N, Ramsey B, Burns JL.

Seattle Biomedical Research Institute, WA 98109, USA. [arnold.smith@sbri.org](mailto:arnold.smith@sbri.org)

- Beaucoup de discordances in vitro / in vivo
- Molécules actives in vitro → échec clinique

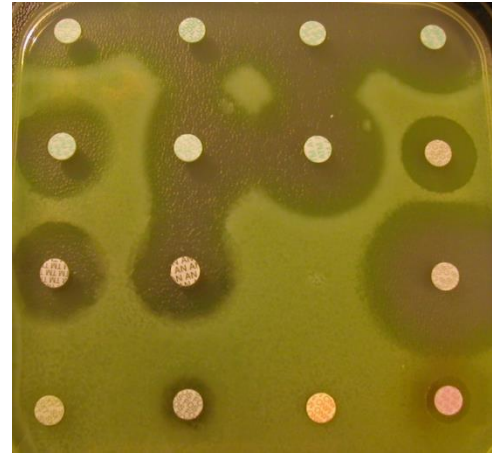
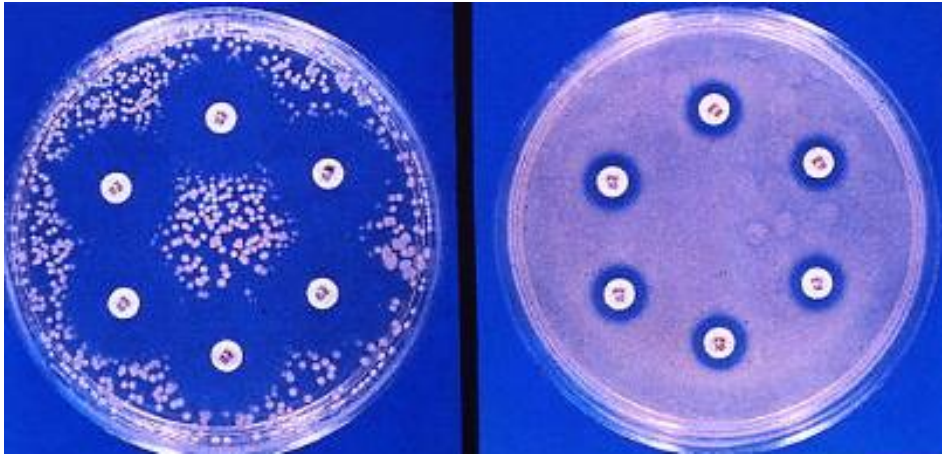


- Molécules actives in vitro → échec clinique
  - On n'a pas détecté toutes les populations !



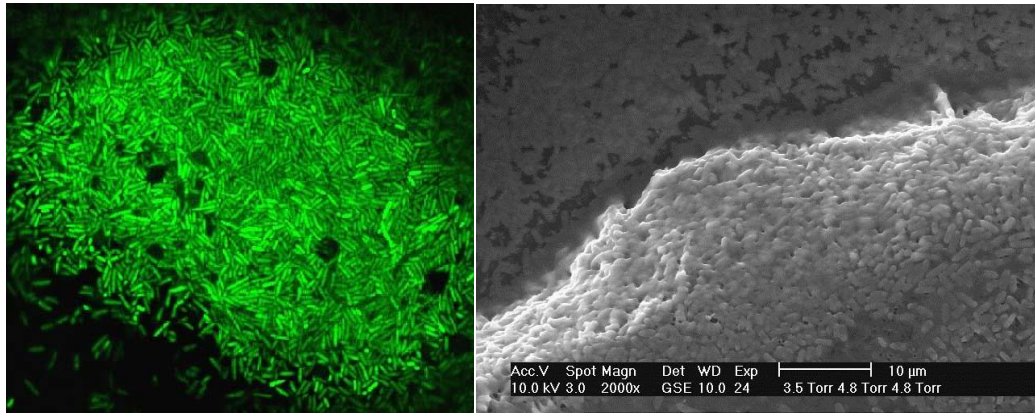
- → « L'antibiogramme direct » peut aider...

- Molécules actives in vitro → échec clinique
  - Effet inoculum ?



# • Molécules actives in vitro → échec clinique

– **C'est la faute du biofilm !**



➤ Matrice extracellulaire très abondante

- adhésion+++
- protection contre phagocytose
- pénétration difficile des ATBs???

➤ métabolisme ralenti, pptés physico-chim, anaérobiose relative

➤ Bactéries plus résistantes en mode biofilm (Aaron et al., JCM 2002)

ex : **CMI ceftazidime 8 → 256** (culture libre → biofilm)

**CMI méropénème 1 → 16, CMB 128 !**

→ Tests ATB sur biofilm in vitro en routine ? pas validés !



[Cochrane Database Syst Rev.](#) 2017 Oct; 2017(10): CD009528.  
Published online 2017 Oct 5. doi: [10.1002/14651858.CD009528.pub4](https://doi.org/10.1002/14651858.CD009528.pub4)

PMCID: [PMC6485918](#)  
PMID: [28981972](#)

**Standard versus biofilm antimicrobial susceptibility testing to guide antibiotic therapy in cystic fibrosis**

Monitoring Editor: [Valerie Waters](#), [Felix Ratjen](#), and Cochrane Cystic Fibrosis and Genetic Disorders Group

Echec !



- Molécules inactives in vitro → amélioration clinique

- diam et conc critiques CA-SFM inadaptés aux aérosols

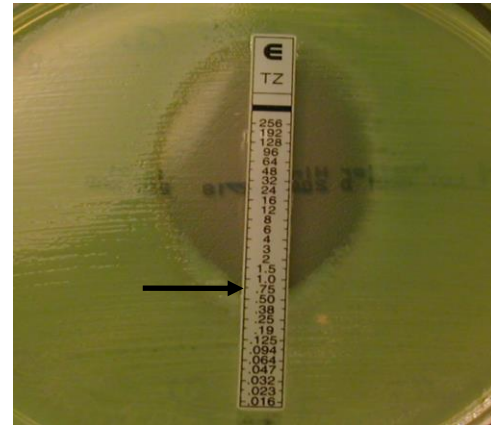
- Une association d'ATB synergique ?



CMI cipro : > 32 mg/L  
(Résistant)



CMI ceftaz : 64 mg/L  
(Résistant)



CMI cipro + ceftaz :  
0.75 mg/L (Sensible)

→ Tests d'associations in vitro en routine ? Pas validés non plus !

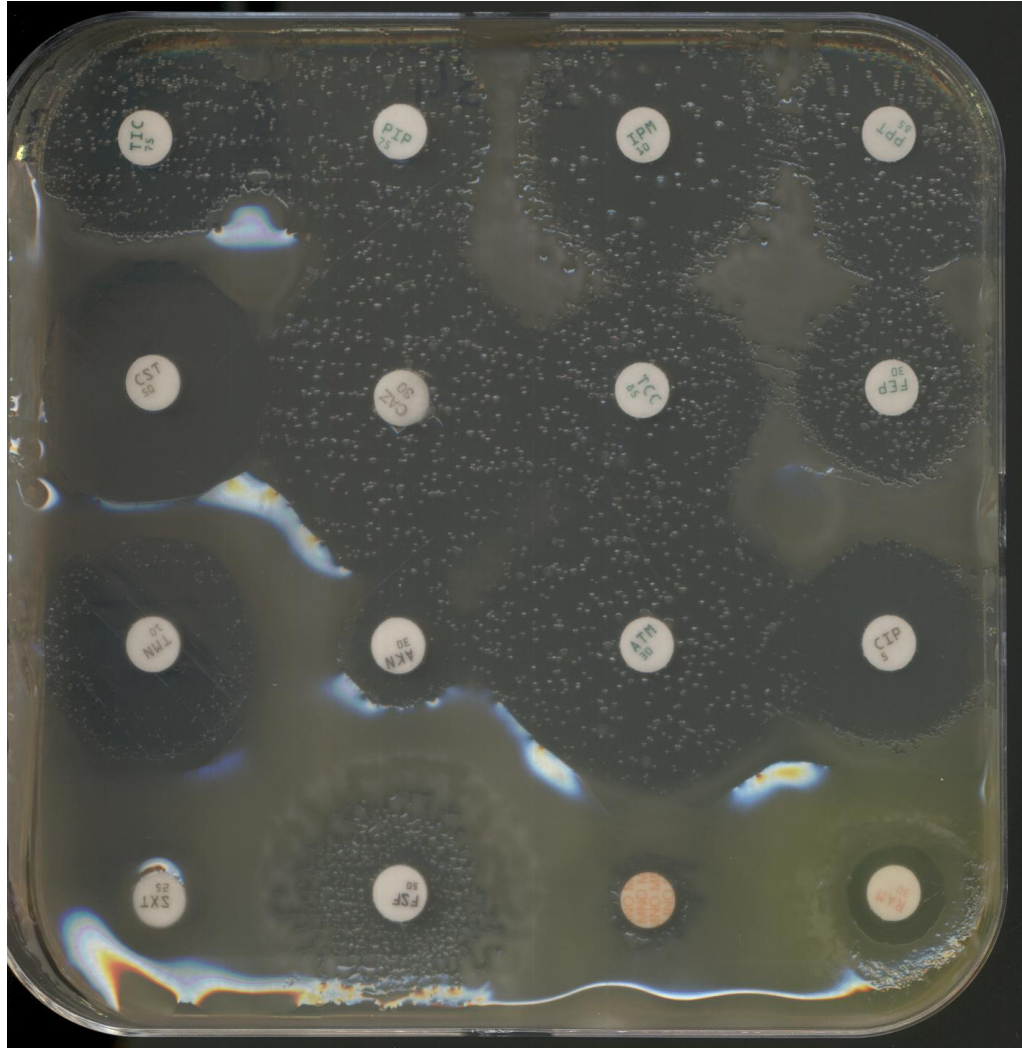
Combination antibiotic susceptibility testing to treat exacerbations of cystic fibrosis associated with multiresistant bacteria: a randomised, double-blind, controlled clinical trial

Shawn D Aaron, Katherine L Vandemheen, Wendy Ferris, Dean Fergusson, Elizabeth Tullis, David Haase, Yves Berthiaume, Neil Brown, Pearce Wilcox, Veronica Yozghatlian, Peter Bye, Scott Bell, Francis Chan, Barbara Rose, Alphonse Jeanneret, Anne Stephenson, Mary Noseworthy, Andreas Freitag, Nigel Paterson, Steve Doucette, Colin Harbour, Michel Ruel, Noni MacDonald

Lancet 2005; 366: 463-71

Echec !

- Molécules inactives in vitro → amélioration clinique
  - Toutes les populations ne sont pas aussi pathogènes ?



→ Mais quels critères pour le tri ?

# Conclusions

- Tout ça pour.... Ça (plus de questions que de réponses !)
- Pour fournir des données utiles à l'antibiothérapie, **il faut détecter au mieux les espèces et populations pathogènes**  
→ artifices de culture, maldi-tof, biologie moléculaire ?
- **Les souches sont plus résistantes in vivo qu'in vitro, mais elles n'ont peut-être pas toutes la même pathogénicité**  
→ la bactérie ne sait pas pour l'instant faire le tri !
- **Pour mieux tester les ATB, finalement rien n'est validé !**  
(sauf tester systématiquement les nouvelles molécules de recours !)
- Discuter avec ses bactériologues pour une optimisation « à la carte » sur un patient difficile