




**Les technologies innovantes en Infectiologie
en laboratoire polyvalent de premier recours**



Taulelle Jean-Marie
Biologiste LBM Bioesterel



Evolution de la microbiologie

Évolution rapide sur ces 10 dernières années

Automatisation : hémoculture, ensemenceur, cytologie urinaire
Réglementation qualité: norme COFRAC
Nouvelles technologies : PCR temps réel, malditof, tdr

→ meilleure offre médicale : plus rapide, plus efficace

Evolution de la microbiologie

BIOESTEREL
Laboratoire de Biologie Médicale

Exemple de solution intégrée en microbiologie

Solution Biomerieux avec intégration de technologie type PCR temps réel et/ou spectrométrie de masse

BIOESTEREL
Laboratoire de Biologie Médicale

16/04/2015 4



Laboratoire de premiers recours

Regroupement de laboratoire de ville
→ Urgence, femme enceinte, suivi chimio, HAD, EPHAD

Laboratoire CH périphérie
→ Urgence, hospitalisation, maternité,...

**Choix organisationnel en fonction
des objectifs du laboratoire
des besoins des prescripteurs (recrutement)
des locaux et personnels**

**Même objectif: être rapide ,efficace, accréditation COFRAC
coût raisonnable**



Apport aux patients

M. X, suivi pour chimiothérapie, est fébrile depuis ce matin
Hémocultures prélevées à domicile /aux urgences
Flacon positif à H+2

2 solutions possibles :

- . conventionnelle : gram BGN → ceftriaxone H+2 .5
culture +identification H+24
 - . malditof : identification : Pyo → Pip/Tazo H+2 .5
- gain de temps(-1j) ,meilleur choix antibiotique(+14%),patient mieux traités(+ 6%)

Strategies to Reduce Curative Antibiotics Use in the Intensive Care Units (Adult and Pediatric) – Guidelines and Expert Panel Report Réanimation (2014) 23:558-582

PCR en temps réel

Principe :

Amplification génique spécifique de chaque pathogène
 Sensible < 10 UFC /mL
 Utilisable sur échantillon , viabilité bactérienne , ATB préalable
 Délai 2 à 6h
 Différents systèmes : en série , au coup par coup
 ouvert (technique maison) , trousse CE prêt à l'emploi



Extraction et réaction PCR en deux étapes

Avantages :

Plus de test disponible : pneumocoque , méningocoque , HSV, chlamydiae, ...
 Possibilité de monter des technique maisons

Inconvénients :

Risque de contamination
 Locaux adaptés
 Personnels formés



Extraction et PCR en une seule étape : Genexpert

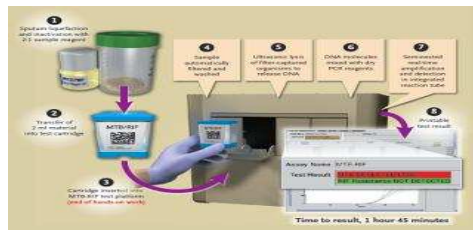


Avantages :

- Système clos avec risque limité de contamination
- Pas d'exigences techniques des locaux
- Formations simplifiées pour le personnel

Inconvénients :

- Choix de test restreint: SARM, streptoB, Cdiff, chlam, vanA/vanB...
- Au coup par coup (nb module 1 à 48)
- Coût des modules et des tests



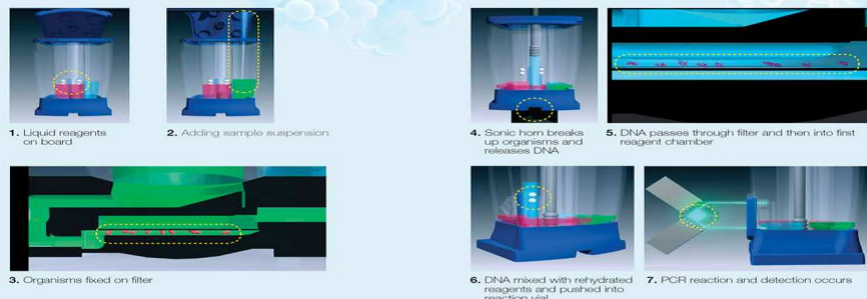
Gamme de tests disponibles sur le GenoXpert

Xpert® M50A Chloramphenicol resistance gene (cat) detection in <i>Staphylococcus aureus</i> (S. aureus) Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes	Xpert® Fu A Panel Detection of <i>Staphylococcus aureus</i> (S. aureus) and <i>Staphylococcus epidermidis</i> (S. epidermidis) Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes
Xpert® M50A-SA Nasal Detection of <i>Staphylococcus aureus</i> (S. aureus) in nasal swabs Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes	Xpert® EV Detection of <i>Escherichia coli</i> (E. coli) and <i>Salmonella enteritidis</i> (S. enteritidis) Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes
Xpert® M50A-SA S511 Detection of <i>Staphylococcus aureus</i> (S. aureus) in swabs Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes	Xpert® MTB/RIF Detection of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (M. tuberculosis) and rifampin resistance (RIF) Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes
Xpert® M50A-SA BC Detection of <i>Staphylococcus aureus</i> (S. aureus) in swabs Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes	Xpert® GBS Detection of <i>Group B Streptococcus</i> (GBS) in swabs Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes
Xpert® C. difficile Detection of <i>Clostridium difficile</i> (C. difficile) in stool Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes	Xpert® PCR A&B Detection of <i>Aspergillus fumigatus</i> (A. fumigatus) and <i>Aspergillus niger</i> (A. niger) Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes
Xpert® vanA/vanB Detection of <i>Vancomycin resistance gene A</i> (vanA) and <i>Vancomycin resistance gene B</i> (vanB) Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes	Xpert® HerpesV - FS & VV Detection of <i>Herpes simplex virus type 1</i> (HSV-1) and <i>Herpes simplex virus type 2</i> (HSV-2) Reagent: 100 Patient: 10 Time to result: 1 hour 45 minutes

Principe du genexpert



FIGURE 3. Reaction Steps



All of the complex steps required for polymerase chain reaction, including the addition of components as needed, programming of reaction times and temperatures, and monitoring fluorescence development as it occurs, take place in the cartridge without operator intervention.

For some assays, as soon as the product is detected, the reaction ends and the result is presented on the screen. This result can be directly interfaced to a laboratory information system, avoiding yet another opportunity for error.

Réflexion intégration de cette technique



- soit on utilise une technique traditionnelle longue fastidieuse
temps personnel +++
moins fiable +++(Se, Sp + faible)
- soit on envoie sur un laboratoire équipé:
coût et délai trop long, **incompatibles avec usage clinique**
mésusage d'antibiotiques, isolements inutiles, recherche de patients contacts, etc ...
- soit on se passe de l'examen et on fait du traitement probabiliste:
→ ATB large spectre chers et peu écologiques

Exemple d'intégration au laboratoire: Cdiff



	GDH+EIA	GDH + Xpert C.difficile	Xpert C.difficile
Sensibilité	6%	10,5%	11,5%
demandes par an C.Difficile	435	435	435
positifs à C.difficile toxigénique	28	49	54
gain moyen de T2A = 2800€/patient+		58 800 €	71 867 €
	GDH+EIA	GDH + Xpert C.difficile	Xpert C.difficile
Coût réactif / patient	9,8 €	13,2 €	28,0 €
Coût réactif annuel	4 252 €	5 733 €	12 180 €
Delta		1 481 €	7 928 €

Meilleure prise en charge avec technique PCR pour un surcoût raisonnable
Détection gène toxine binaire et gène toxine C (Genexpert)
→ prise en charge stricte

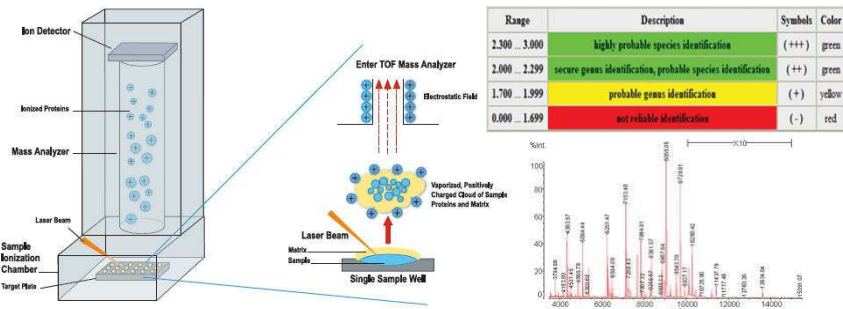
Spectrométrie de masse : MALDITOF

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight

Principe:

Désorption /ionisation assistée par matrice avec laser UV
 Identification de biomolécule selon leur masse(m) , leur charge(z) et temps de vol
 Type peptide, protéine ,glycoprotéine ,oligonucléotides

Utilisation de matrice en fonction de la taille de molécule à rechercher (DHB,HCCA)
 Résultat sous forme de spectre (score de similitude avec spectres de références)



Utilisation en routine

- Simple et rapide
- Peu de consommable
- Formation simple : technique de dépôt (spotting,...)
- Traçabilité optimale(plaque=paillasse, plan de plaque , identification patient)
- Qualité : utilisation d'un calibrant(BTS) , contrôle positif (souche atcc)
- contrôle négatif (matrice)
- Reproductibilité inter-laboratoire

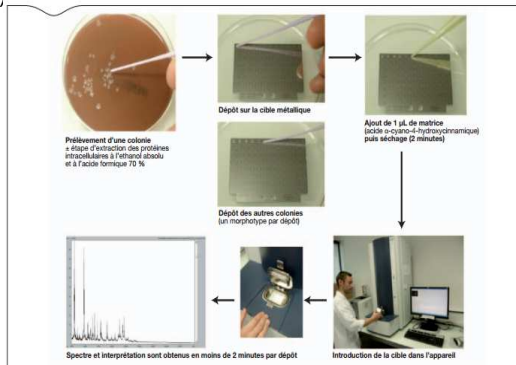
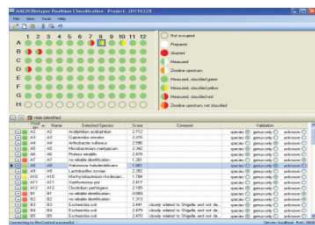


Figure 1. Séquence d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne dans un laboratoire de microbiologie clinique. (Photographies : Olivier Gallot, Laboratoire de bactériologie-hygiène, CHRU de Lille)

Utilisation en routine



Coût faible:

- direct:identification:0,1 euros la colonie (réactifs)
- indirect: gestion des déchets DASRI

Table 3. Delays, Costs, and Level of Training for Isolate Identification Methods

Method	Delay, minutes	Cost, € ^a	Level of training
Manual			
Gram staining	6	0.6	Medium to high
API system identification (bioMérieux)	1080–2880	4.6–6.0	Medium
Antibiotic susceptibility test	1080–2880	6.6–7.4	Medium
Phoenix system identification and susceptibility test (BD Diagnostics)	300–1200	12.65	Medium
Vitek system (bioMérieux)			
Identification	300–480	5.9–8.23	Medium
Identification and susceptibility test	300–480	10.38–12.71	
MALDI-TOF	6–8.5	1.43	Low to medium

NOTE. MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight.

^a Costs have been tabulated based on December 2008 price list of the providers in France

CID 2009;49 (15 August) • Seng et al

Performance analytique

Sur milieu de culture:

Auteurs	Échantillons	Id à l'espèce	Id au genre
Seng <i>et al.</i> , 2009 [13]	Routine (n = 1 660) Tous les prélèvements de routine	83,8 %	95,0 %
Blondiaux <i>et al.</i> , 2009 [15]	Routine (n = 362) Tous les prélèvements de routine	72,9 %	87,0 %
van Veen <i>et al.</i> , 2010 [14]	Routine (n = 980) Tous les prélèvements de routine	92,0 %	98,8 %
Bizzini <i>et al.</i> , 2010 [16]	Routine (n = 1 371) Tous les prélèvements de routine	93,2 %	98,5 %
Gravet <i>et al.</i> , 2010 [17]	Routine (n = 10 000) Tous les prélèvements de routine	nd	98,8 %
Bessède <i>et al.</i> , 2010 [18]	Routine (n = 1 013) Tous les prélèvements de routine	97,3 %	99,0 %

bactérie: 95-99%au genre et 84 à 97 % à l'espèce
 bactérie fastidieuse: anaérobies bartonella et coxiella, legionella, ...
 mycobactérie 97% en milieu solide 77% milieu liquide
 →innocuité technique

levure (95%)
 champignon (Aspergillus sp:92%)
 Dermatophyte , virus, parasite en développement...

Performance analytique

Sur liquide biologique:

après prétraitement : double centrifugation, extraction acide formique, kit commerciaux

-hémoculture : identification proche 100 % ,seuil $>10^7$ UFC /mL
2 germes avec un prédominant

J. Clin. Microbiol.-2012-Lagacé-Wiens-3324-8

-urine : seuil $>10^5$ UFC /mL
identification : 92% à l'espèce et 93% au genre
pas d'identification sur culture polymicrobienne

J. Clin. Microbiol.-2010-Ferreira-2110-5

-autres liquides: LCR, liquide de ponction

Performance analytique

Points forts:

Spectre reproductible de genre et d'espèce

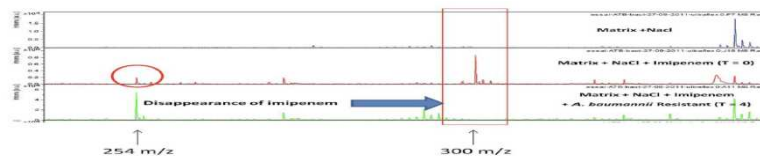
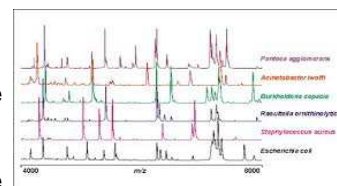
Système ouvert: utilisation automatique ou manuelle
possibilité de compléter la base

Accréditation COFRAC facilitée: méthode qualitative

Identification microorganisme au niveau de la sous-espèces, clone épidémiologique
→ utilisation biomarqueur (prot ribosomale, ,,)

Résistance bactérienne: MRSA, carbapénemase, OXA (pas en routine)

Toxine bactérienne: PVL (en développement)





Performance analytique

Points faibles :

-Difficulté d'identification pour certaines espèces
 Strepto pneumoniae avec strepto mitis/oralis
 Ecoli/Shigella
 → germe structure proche même problème avec l'approche génétique

-Qualité du spectre : nature milieu de culture, durée d'incubation

Comment améliorer ces défauts :

→compléter la base de données (nombre de spectre ,origine des spectres)

Rapid and reliable discrimination between Shigella species and Escherichia coli using MALDI-TOF mass spectrometry
[International Journal of Medical Microbiology_AVRIL 2015](#)



Réflexion de réorganisation de paillasse

Analyse de différentes méthodes de travail: milieu simple ou chromogène +/- SM

	#	Chrom Agar	Chrom + MALDI	Blood Agar	BL + MALDI	+/- Cost
Négatives	48,862	\$30,294		\$13,192		-\$17,102
Positives	14,707					
E.coli	8140	\$5047			\$6430	+\$1382
KES	1716		\$1956		\$1356	-\$600
Enterococcus	1680		\$1915		\$1325	-\$590
Strep B	668		\$762		\$528	-\$235
Proteus	630		\$718		\$497	-\$221

→ Economie estimée de 17601\$

Retour d'expérience LBM BIOESTEREL



Activité du plateau de bactériologie:

163 701 prélèvements gérés/an

31172 ATB: → 11 782 identifications + 19 390 E.coli CPS (milieu chromogène)

1552 BMR (dont 965 E.coli dans les ECBU)

131 200 ECBU

8600 prélèvements vaginaux

900 liquides de ponction

900 pus de bloc

450 pièces opératoire ou matériels de bloc

6700 coprocultures

1000 ECBC

1700 plaies

Acquisition du [MALDI Biotyper – Bruker](#) en Décembre 2014

Formation théorique et pratique sur 3 jours

Phase de mise en place et de test en parallèle du Vitek (familiarisation, germes difficiles)

Formation Sirweb

Activité de routine depuis Février 2015

Retour d'expérience du LBM BIOESTEREL



Exemples de germes retrouvés:

Nocardia

Eikenella corrodens

Actinomyces israelii

Fingoldia magna

Turicella otitidis

Aerococcus urinae

Burkholderia cepacia (dans des prélèvements de surface de service de dialyse)

E. Gallinarum

Propionibacterium acnes...

Intérêts ressentis sur 3 mois d'utilisation:

Gain de temps sur l'identification de germes difficiles

Amélioration de la fiabilité en terme d'identification

Éliminer les germes sans intérêts clinique

Pas ou peu de maintenance, lavage de plaque réutilisable en 20 minutes,,

Gestion des stocks et traçabilité simplifié



Merci de votre attention