

# Apport du laboratoire de microbiologie : des techniques conventionnelles aux tests rapides (Chapitre 111 du traité complet)

I. Podglajen, J.-L. Mainardi, M.-L. Joly-Guillou

## PLAN DU CHAPITRE

Introduction . . . . .	277	Rôle et expertise du laboratoire de microbiologie et interaction avec les services cliniques . . . . .	280
Diagnostic bactériologique conventionnel . . . . .	277	Conclusion . . . . .	281
Diagnostic moléculaire bactériologique . . . . .	279		

## Introduction

Le laboratoire de microbiologie, regroupant les spécialités de bactériologie, de virologie et de parasitologie-mycologie, accompagne les cliniciens dans l'identification des agents pathogènes responsables d'infections et dans le choix ciblé et adapté des anti-infectieux, et ce, le plus rapidement possible. Plusieurs études montrent que le rôle du laboratoire est déterminant tant pour la survie du patient que sur le plan économique [1–3]. Le laboratoire de microbiologie doit être en mesure de proposer des techniques de diagnostic performantes et rapides si possible, dont la réalisation et les résultats devront être en accord avec les référentiels de la Société française de microbiologie (SFM) [4].

Depuis une quinzaine d'années, la bactériologie vit une véritable révolution : milieux de culture plus performants (pour hémoculture par exemple) et sélectifs (milieux chromogènes), automatisation et informatisation qui ont simplifié la prise en charge des échantillons cliniques et ont permis d'accélérer les délais de rendu des résultats. Ainsi, les laboratoires peuvent désormais s'équiper d'ensemencement automatisés, de cytomètres de flux (cytologie urinaire), d'automates de coloration de Gram qui viennent compléter les systèmes

déjà existants tels que les automates d'hémocultures, automates d'antibiogramme en milieu liquide ou caméra de lecture des antibiogrammes en milieu solide. Même si le délai de rendu des antibiogrammes reste aux alentours de 48 heures (à partir du prélèvement de l'échantillon), des automates permettant des rendus de sensibilité et de résistance aux antibiotiques en 6 heures sont en cours d'étude, et quelques tests rapides de détection de la résistance à certains antibiotiques ont été commercialisés. Les plus grandes avancées technologiques concernent les diagnostics syndromiques par biologie moléculaire (BM) et l'identification des micro-organismes par spectrométrie de masse (*Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight* ou MALDI-TOF) qui ont permis de gagner au moins 24 heures sur le rendu des identifications.

## Diagnostic bactériologique conventionnel

Le diagnostic bactériologique est un ensemble de moyens permettant d'identifier l'étiologie d'une infection. La séquence du diagnostic reste classique : analyse cytologique, examen microscopique et ensemencement des échantillons, le jour de

leur réception; lecture des milieux de culture, à 24 heures et 48 heures (jusqu'à 5 jours); identification des colonies, le jour où la culture est positive grâce à la spectrométrie de masse et antibiogramme (avec un rendu des résultats 24 heures après l'obtention des colonies). La place des nouvelles technologies dans ce schéma sera évoquée dans les paragraphes suivants.

### Apport de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse MALDI-TOF a permis de gagner 24 heures sur le rendu des identifications des bactéries et des levures (par rapport à l'identification biochimique), et ce, à un faible coût. La technique nécessite une culture au préalable et repose sur l'analyse des profils de protéines ribosomales en comparaison avec une base de données remise à jour régulièrement [5,6]. Le délai de rendu est d'environ 20 minutes. Il arrive que deux espèces phylogénétiquement proches ne puissent être différenciées (*Escherichia coli* et *Shigella*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus mitis*) mais les améliorations constantes de la technologie et des bases de données permettent des analyses de plus en plus fines. Actuellement, aucune identification n'est possible directement à partir d'un échantillon clinique. En dehors de l'identification et pour certaines espèces bactériennes, cette technologie permet de réaliser du typage de souches dans le cadre d'études épidémiologiques (par analyse comparative des profils) [7, 8]. Elle permet également de détecter certaines résistances aux antibiotiques (vancomycine, métilcilline, carbapénèmes, etc.) par mise en évidence de profils de pics caractéristiques, par détection de l'hydrolyse d'une  $\beta$ -lactamine, par incorporation d'acides aminés marqués (non radioactif) ou par détection de la croissance bactérienne en présence/absence d'antibiotique [8–10]. Le délai de rendu varie entre une heure et quelques heures en fonction des techniques. Actuellement, les laboratoires utilisent plus facilement d'autres tests rapides de BM ou biochimique pour détecter la résistance (cf. paragraphe « Apport des tests rapides pour la détection de la résistance aux antibiotiques »).

Nombreux sont les laboratoires qui utilisent maintenant le MALDI-TOF pour identifier les micro-organismes des hémocultures positives, soit en réalisant une préculture (3 heures à 5 heures), soit directement à partir des flacons d'hémoculture après un traitement préalable qui peut être court (10 minutes) [11]. Des études ont montré que l'identification des bactéries à partir des hémocultures était plus performante pour les bactéries à Gram négatif que pour les bactéries à Gram positif [12] mais, quoi qu'il en soit, l'intérêt dans la prise en charge thérapeutique des patients n'est pas discutable [8, 13, 14], en particulier si l'identification est associée à la recherche de certains mécanismes de résistance à l'aide de tests rapides.

### Apport des tests rapides pour la détection de la résistance aux antibiotiques

L'antibiogramme et la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) restent les techniques de référence pour plusieurs raisons : le faible coût, la détection de mécanismes inconnus, la possibilité de tester de nombreux antibiotiques appartenant à différentes familles et l'existence de critères d'interprétation édités par le Comité de l'antibiogramme de la SFM (CASFM) et l'*European committee on antimicrobial susceptibility*

*testing* (EUCAST) [15]. Cependant, des tests rapides (rendus en maximum une heure) basés sur des méthodes chromogéniques, colorimétriques ou immunologiques apportent des aides précieuses dans le choix des anti-infectieux avec une très bonne valeur prédictive négative (VPN). Les plus utilisés en France permettent de détecter :

- la résistance à la métilcilline chez *Staphylococcus aureus* par la mise en évidence de la PLP2a. Pour les staphylocoques à coagulase négative cette détection nécessite une induction avec la céfoxitine donc un délai supplémentaire de 24 heures pour le rendu des résultats [16];
- la production des  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) chez les entérobactéries. Mais, les tests ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter les céphalosporinases de haut niveau [17,18];
- la production des carbapénémases chez les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* avec des sensibilités variables en fonction des tests et des espèces bactériennes [19, 20].

Des tests permettant la détection et l'identification de certaines carbapénémases de type NDM, VIM, KPC, OXA-48 Type, IMP sont également largement utilisés [21]. Le plus souvent, ces tests sont réalisés à partir des cultures sur milieux gélosés (3 heures à 18 heures d'incubation à 35 °C) mais la détection précoce des BLSE à partir des hémocultures et des urines a été décrite [22–24].

### Apport des tests rapides conventionnels pour le diagnostic des infections

Du fait du développement des tests rapides de diagnostic moléculaire, les principaux tests conventionnels encore utilisés sont les tests immunologiques permettant de détecter les antigènes (Ag) solubles urinaires pour le diagnostic des pneumonies communautaires à *S. pneumoniae* (sensibilité, 66 à 89 %) et à *Legionella pneumophila* essentiellement de séro-groupe 1 (sensibilité, 70 % à 90 %), que le patient ait pris ou non des antibiotiques [25, 26]. Le délai de rendu est inférieur à 30 minutes. Ces tests sont utiles pour le diagnostic de légionellose en cas de pneumonie aiguë avec signes de sévérité, signes extra-respiratoires, contexte nosocomial et épidémique ou échec d'une première ligne antibiotique par  $\beta$ -lactamines, et pour le diagnostic des infections à pneumocoque en cas de pneumonie grave avec impact thérapeutique lié au résultat du test. Ces tests et leur coût sont actuellement décriés, de par le faible impact sur la prise en charge thérapeutique des pneumonies à pneumocoques et pour les légionelles, du fait que la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est plus sensible et permet de détecter d'autres espèces de *Legionella* et d'autres sérogroupes que *L. pneumophila* séro-groupe 1. En fait, l'utilisation de ces tests ne doit pas être remise en cause mais leur prescription doit être parfaitement justifiée.

Les tests rapides immunologiques sont également utilisés dans le diagnostic des diarrhées à *Clostridium difficile* (CD). Cette technique permet la recherche rapide de la glutamate déshydrogénase (GDH) qui caractérise la présence de CD dans les selles (VPN de 97 %). Sur les selles positives en GDH, les toxines (B principalement) doivent être recherchées soit par tests immunochromatographiques, soit par tests de BM. Les premiers ont une mauvaise VPN mais un test positif est

en faveur d'une infection à CD. En cas de négativité, un test de BM devra être réalisé (excellente VPN) [27,28].

## Diagnostic moléculaire bactériologique

Le diagnostic bactériologique moléculaire repose principalement sur des techniques d'amplification d'acides nucléiques et d'hybridation. Elles peuvent être réalisées soit à partir de colonies bactériennes, soit directement à partir d'échantillons cliniques et nécessitent au préalable une étape d'extraction des acides nucléiques. Le but est de détecter des gènes spécifiques d'espèces bactériennes (détection et identification), des gènes de résistance aux antibiotiques et des gènes de virulence. Il est particulièrement utile pour la recherche directement dans des échantillons de bactéries pathogènes de culture difficile, voire impossible avec les techniques de culture conventionnelles (*Coxiella burnetii*, *Tropheryma whippelii*), et de bactéries non cultivables suite, par exemple, à une antibiothérapie préalable [29, 30]. Le délai de rendu des résultats peut être très court (moins de 2 heures), d'où l'utilité de ces tests dans le diagnostic d'infections nécessitant la mise en œuvre de mesures préventives d'hygiène et dans le diagnostic d'infections graves pour lesquelles la prescription d'une antibiothérapie rapidement adaptée est bénéfique.

## Apport des PCR ciblées et PCR syndromiques dans le diagnostic des infections

Il existe un très large répertoire de techniques et de kits qui permettent de mettre en évidence un grand nombre d'espèces bactériennes (*Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et non *pneumophila*, *Kingella kingae*, *T. whippelii*, etc.). Pour les bactéries pathogènes, le rendu sous forme de présence/absence est suffisant. Pour les bactéries commensales qui pourraient être impliquées dans une infection, une quantification de l'ADN permettant d'extrapoler au nombre de bactéries présent dans un échantillon devrait être réalisée. Toutefois, la détermination du seuil de bactéries nécessaires pour différencier colonisation et infection n'est pas évidente à établir. Dans les prélèvements respiratoires, le seuil pour *Streptococcus pneumoniae* a été défini, par rapport à un groupe contrôle, à  $10^5$  copies d'ADN par mL, mais il est fonction, entre autres facteurs, de l'échantillon biologique et de la cible utilisée pour la PCR [31, 32].

Des tests de BM simples et rapides, incluant les étapes d'extraction et de PCR, ont été commercialisés pour la détection de *Staphylococcus aureus* et de la résistance à la méticilline directement dans les tissus, les hémocultures ou à partir d'écouvillons nasaux [33–35]. La recherche du gène *mecA* par BM reste la technique de référence pour les staphylocoques à coagulase négative. La détection rapide par BM de *Mycobacterium complex tuberculosis* et de la résistance à la rifampicine est également très utile. Ce test a une sensibilité supérieure à l'examen microscopique mais inférieure à la culture [36]; son intérêt pour la détection des formes pulmonaires dans les pays à faible

prévalence de tuberculose est discuté. En revanche, il a toute son indication pour les échantillons positifs à l'examen microscopique et pour la détection des formes extrapulmonaires de tuberculose [37, 38]. D'autres tests permettent la détection à partir des selles ou des écouvillons rectaux des gènes *vanA* et *vanB* (conférant la résistance aux glycopeptides chez *Enterococcus faecium* et *E. faecalis*) et de certains gènes de carbapénémase. La détection de ces gènes n'est pas associée à l'identification des bactéries qui les portent, mais leur présence dans un échantillon de dépistage doit déclencher la mise en œuvre de mesures préventives d'hygiène, en dehors de *vanB* qui peut être présent dans des espèces autres qu'*Enterococcus*. Bien que coûteux, ces tests rapides se sont avérés très utiles lors de la prise en charge d'épidémies hospitalières ou pour le dépistage des bactéries hautement résistantes chez des patients revenant de pays étrangers et hospitalisés dans des services à haut niveau de soins [39]. La biologie moléculaire a également rendu possible la détection rapide de gènes de virulence comme la leucocidine de Pantou-Valentine (présente chez certaines souches de *S. aureus*), et ce, directement dans les pus [40] et les toxines de *Clostridium difficile* dans les selles (technique plus sensible que les tests immunochromatographiques, cf. paragraphe « Apport des tests rapides conventionnels pour le diagnostic des infections ») [41]. La rapidité du rendu de l'analyse a montré un véritable impact sur la prise en charge des patients [42]. Toutefois, cette recherche ne doit être prescrite qu'en cas de suspicion d'une infection à *C. difficile*, la présence d'ADN correspondant aux gènes de toxines et ne signant pas forcément une infection; le seuil pour distinguer infection de colonisation est, comme dit précédemment, difficile à définir.

Ces dernières années ont vu une explosion des tests de PCR multiplex, faciles à utiliser et permettant la détection de plusieurs pathogènes en une seule analyse selon une approche dite « syndromique ». Dans ce contexte, la tendance est à la détection simultanée d'acides nucléiques de bactéries, de virus et, dans certains cas, de champignons. Avec un délai de rendu des résultats possiblement inférieur à 2 heures et une prise d'essai d'échantillon faible pour un grand nombre d'analyses, ces tests sont séduisants mais le coût est souvent très élevé. Par ailleurs, ils n'apportent pas forcément une aide quant au choix des molécules anti-infectieuses car ils ne détectent quasiment pas de marqueurs de résistance et, de toute façon, aucune technologie rapide ne peut actuellement apporter les mêmes informations qu'un antibiogramme. Parmi les panels commercialisés, on peut citer le plus ancien, « infections sexuellement transmissibles (IST) », dont l'intérêt a été démontré, les bactéries en cause étant difficilement cultivables [43]. L'impact des panels « respiratoires haut et bas » sur la prise en charge des différentes pathologies respiratoires est controversé et elle doit être évaluée par des études médico-économiques sérieuses [44]. Une PCR simplex ou duplex peut se montrer suffisante et moins coûteuse (période d'épidémie de grippe et VRS). En ce qui concerne les panels « infections du système nerveux central » et « digestifs », la sensibilité de la détection des micro-organismes impliqués est supérieure à celle de la culture. L'impact sur la prise en charge du patient a été suggéré si la prescription était justifiée [45, 46]. Toutefois, même dans le contexte des encéphalites et méningites,

certaines études montrent que la PCR multiplex n'a pas de répercussion sur le délai d'hospitalisation et sur la prise en charge anti-infectieuse [47]. L'enjeu est donc de trouver le positionnement intelligent de ces tests.

### **Apport des PCR universelles dans le diagnostic des infections**

Ces techniques, coûteuses, ont actuellement un délai de rendu de plusieurs jours. Les PCR qui ciblent le gène qui code pour l'ARN16S permettent d'amplifier l'ADN de n'importe quelle bactérie sans avoir d'indication préalable sur l'identité de l'espèce. En effet, ce gène comporte des séquences nucléotidiques conservées chez les eubactéries (dans lesquelles sont localisées les amorces universelles) qui encadrent des séquences plus variables spécifiques d'espèce bactérienne. Le séquençage des fragments variables permet, après analyse et comparaison avec des séquences compilées dans des banques de données, d'identifier l'espèce bactérienne. Le nombre de copies du gène *ADNr16S* varie en fonction de l'espèce bactérienne et donc la sensibilité de la technique est variable en fonction de l'espèce bactérienne présente dans l'échantillon.

Les indications générales de cette analyse sont les fortes suspicions d'infections cliniques et biologiques chez des patients sous antibiothérapie préalable au recueil de l'échantillon, chez des patients sans antibiothérapie mais pour lesquels les échantillons recueillis sont restés stériles (6 jours) et chez des patients suspects d'infection avec des germes de culture difficile (réaliser également des PCR spécifiques) [29]. Cette analyse doit faire partie d'une stratégie globale de diagnostic, en particulier en l'absence de données de bactériologie conventionnelle. L'intérêt de la PCR-ADNr16S n'est plus à démontrer dans le diagnostic des endocardites à hémocultures négatives, empyèmes pleuraux, infections ostéo-articulaires, endophtalmies infectieuses, péricardites dans le contexte d'un bilan complet (incluant la recherche des virus) et dans les errances diagnostiques [29,48]. Rappelons, toutefois, que la PCR-ADNr16S est moins sensible que les PCR spécifiques. L'intérêt de la PCR-ADNr16S dans le diagnostic étiologique des méningites est très limité. Pour cette pathologie, il faut privilégier les PCR spécifiques, de même que pour les recherches de bactéries dans le sang ou le sérum. Enfin, l'analyse par PCR-ADNr16S sur échantillons plurimicrobiens devient maintenant possible grâce aux techniques de séquençage à haut débit [49]. Ces nouvelles technologies de séquençage sont à l'origine du développement de la métagénomique sur échantillon biologique (détermination de la composition en micro-organismes; bactéries, virus, parasites et champignon) qui, à l'avenir, pourrait jouer un rôle dans le diagnostic des maladies infectieuses.

### **Limites des techniques de BM**

Le diagnostic moléculaire nécessite, même pour les tests unitaires « clés en main », des compétences et des connaissances de biologie moléculaire, des locaux et du matériel adaptés de façon à minimiser les risques de contamination externe et de contamination interéchantillons qui sont majoritairement à l'origine des faux positifs.

Des résultats faussement négatifs peuvent être obtenus en cas d'échantillons de quantité insuffisante ou présentant un *inoculum* bactérien faible. La sensibilité de la technique est liée en partie au nombre de copies de la cible à amplifier par bactérie. Plus le nombre est grand, plus la technique sera sensible. D'autres notions sont également à prendre en compte dans l'interprétation des résultats, comme la persistance de l'ADN dans un prélèvement. La présence d'un ADN bactérien dans un prélèvement ne signifie pas que la bactérie soit viable et donc ne signe pas forcément une infection bactérienne active. Rovey *et al.* ont montré que l'ADN de certains streptocoques, entérocoques et bartonelles pouvait persister jusqu'à 7 ans dans le tissu valvulaire cardiaque de patients préalablement traités de façon adaptée et efficace pour une endocardite infectieuse [50]. De même, van der Heijden *et al.* ont montré que, chez des patients présentant une arthrite traitée de façon adaptée, les ADN de *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* et de *Peptostreptococcus anaerobius* pouvaient persister jusqu'à 10 jours dans le liquide articulaire et jusqu'à 20 jours pour *Streptococcus pyogenes* et *Escherichia coli* [51]. Enfin, et ce n'est pas la moindre des limitations, la majorité des tests génotypiques ne permettent de mettre en évidence que « ce que l'on cherche ou connaît ».

La recherche d'un ADN bactérien ne doit jamais être réalisée dans le seul but d'exclure le diagnostic d'une infection; les résultats doivent toujours être confrontés avec ceux des autres examens biologiques et anatomopathologiques et, surtout, doivent être évalués par rapport au contexte clinique. Les tests coûteux répondant à une approche syndromique peuvent être utiles dans les urgences thérapeutiques et/ou épidémiologiques et les infections mixtes, en particulier si le résultat est positif et en adéquation avec les symptômes cliniques. Néanmoins, ils ne doivent pas détourner le médecin de son raisonnement diagnostique. Les enjeux à venir seront de rationaliser l'utilisation des tests multiplex de BM et de les intégrer dans des algorithmes associant des tests rapides moins onéreux.

## **Rôle et expertise du laboratoire de microbiologie et interaction avec les services cliniques**

Il n'est pas inutile de rappeler que, même avec la présence d'automates et l'apport des tests rapides de biologie moléculaire, la bactériologie reste une discipline complexe dont les résultats dépendent d'un ensemble multifactoriel : justification et modalité de réalisation des prélèvements (service clinique), analyse des échantillons au laboratoire en intégrant les composantes techniques et humaines, rendues et interprétation des résultats en intégrant les performances des tests et les modifications des référentiels parfois bisannuelles [15].

Que l'on soit en parfait accord ou pas, et malgré les contraintes des étapes analytiques des échantillons (broyage, dilution, multiplicité des examens en dehors de la culture, etc.), l'automatisation totale des laboratoires de microbiologie avec une expertise sur écran du dossier microbiologique est en marche. Certes, elle permet de répondre aux exigences

de la norme ISO 15189 (accréditation COFRAC), elle améliore la qualité des analyses (en excluant le facteur humain) et augmente souvent l'efficacité, la sécurité et la traçabilité, mais l'automatisation peut encourager l'injuste prescription des analyses et peut également participer à la perte des compétences des techniciens et biologistes. Par ailleurs, les coûts générés par l'achat et l'entretien des automates obligent les laboratoires à se regrouper en diminuant le nombre de techniciens et de biologistes et en éloignant géographiquement les microbiologistes de leurs interlocuteurs cliniciens, rompant souvent un dialogue pourtant indispensable. Enfin, précisons que la restructuration des plateaux techniques doit impérativement intégrer, pour être fonctionnel et sans retentissement sur la prise en charge des patients, le développement de systèmes informatiques performants et une logistique adaptée du transport des échantillons (nécessitant des investissements importants).

En dehors de la multiplicité des outils diagnostiques qui nécessite, pour la juste prescription et interprétation, un dialogue étroit avec le clinicien, il est un domaine dans lequel cette interaction est encore plus évidente : le choix de l'antibiothérapie, qu'elle soit probabiliste ou adaptée aux résultats de l'antibiogramme, en respectant les recommandations de plus en plus complexes du Comité de l'antibiogramme SFM/EUCAST [15, 52]. Pour exemple, le changement de définition de la zone « intermédiaire », avec l'importance des posologies élevées [15, 52].

Enfin, le dialogue entre microbiologistes, hygiénistes et cliniciens est également indispensable dans le déclenchement des alertes épidémiologiques, qu'elles se rapportent au risque de transmission de micro-organismes pathogènes ou au risque de transmission de micro-organismes résistants aux antibiotiques (bactéries multirésistantes comme les *S. aureus* résistants à la méticilline et les entérobactéries produisant des BLSE, et bactéries hautement résistantes émergentes, comme les ERV et les bactéries produisant des carbapénémases acquises). Le laboratoire de bactériologie génère les données initiales relatives aux infections liées aux soins. Il a également pour mission de recenser annuellement les éléments d'écologie microbienne et d'en informer chaque service. Ces informations importantes peuvent être utilisées par les cliniciens afin de réévaluer chaque année leur politique d'antibiothérapie probabiliste. Les résistances anormalement élevées aux antibiotiques seront soulignées et, si possible, mises en parallèle avec les consommations d'antibiotique du service. En cas d'épidémie de souches, ces dernières devront être typées. Avec l'arrivée de techniques rapides et simples basées, par exemple, sur l'analyse des spectres infrarouge des bactéries, tous les laboratoires pourraient rendre des résultats en moins de 24 heures [53, 54]. Le résultat du typage donnera des indications précieuses sur le mode de diffusion de l'épidémie.

## Conclusion

Au cours des quinze dernières années, les laboratoires de bactériologie ont profondément évolué. L'apport des nouvelles technologies est indéniable pour la prise en charge des patients mais les techniques conventionnelles sont

encore largement d'actualité, en particulier pour l'obtention des profils de sensibilité/résistance des bactéries. Quelles que soient les évolutions, la proximité et le dialogue entre microbiologistes et cliniciens restent indispensables. La collaboration doit permettre de choisir le test le plus pertinent en fonction de l'urgence de la réponse, en intégrant sécurité collective (épidémie, bioterrorisme), organisation du laboratoire, quantité d'échantillons et enjeu économique. Cette collaboration, en améliorant la pertinence de l'antibiothérapie probabiliste ou ciblée, permet la juste prescription des antibiotiques. Enfin, ce partenariat est enrichissant par l'amélioration réciproque des connaissances et il permet le développement d'études clinicomicrobiologiques.

## Références

- [1] Byl B, Clevenberg GP, Jacobs F, et al. Impact of infectious disease specialists and microbiological data on the appropriateness of antimicrobial therapy for bacteremia. *Clin Infect Dis* 1999; 29(1) : 60–6.
- [2] Galar A, Yuste JR, Espinosa M, et al. Clinical and economic impact of rapid reporting of bacterial identification and antimicrobial susceptibility results of the most frequently processed specimen type. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(9) : 2445–52.
- [3] Patel R. New Developments in Clinical Bacteriology Laboratories. *Mayo Clin Pro* 2016; 91(10) : 1448–59.
- [4] Société Française de Microbiologie. *Rémic (Référentiel en microbiologie médicale)*. 6<sup>e</sup> édition; 2018.
- [5] Clark AE, Kaleta EJ, Wolk DM, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry : a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(3) : 547–603.
- [6] Lavigne JB, Riegel P. Place de la spectrométrie de masse en bactériologie. *Ann Biol Clin* 2015; 73(1) : 113–25.
- [7] Lindgren A, Karami N, Ahren C, et al. Development of a rapid MALDI-TOF MS based epidemiological screening method using MRSA as a model organism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37(1) : 57–68.
- [8] Rodríguez-Sánchez B, Cercenado E, Coste AT, Greub G. Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018. *Euro Surveill* 2019; 24(4) : 1800193.
- [9] Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G, et al. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance : current achievements and future perspectives. *Ann Transl Med* 2018; 6(12) : 240–54.
- [10] Oviño M, Bou G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Rapid Detection of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Beyond. *Clin Microbiol Rev* 2019; 32(1). e00037–e000118.
- [11] Simon L, Ughetto E, Gaudart A, et al. Direct identification of 80 percent of bacteria from blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry using a 10-minute extraction protocol. *J Clin Microbiol* 2019; 57(2). e01278–18.
- [12] 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. 827416.
- [13] Martiny D, Debaugnies F, Gateff G, et al. Impact of rapid microbial identification directly from positive blood culture using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry on patient management. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(12) : E568–81.
- [14] Verroken A, Defourny L, le Polain de Waroux O., et al. Clinical impact of MALDI-TOF MS identification and rapid susceptibility

- testing on adequate antimicrobial treatment in sepsis with positive blood Cultures. *PLoS One* 2016; 11(5): e0156299.
- [15] Société française de microbiologie. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Recommandations 2019; (V.1.0 Janvier) <https://www.sfm-microbiologie.org/2019/01/07/casfm-eucast-2019/>.
- [16] Dupieux C, Trouillet-Assant S, Tasse J, et al. Evaluation of a commercial immunochromatographic assay for rapid routine identification of PBP2a-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016; 86(3) : 262–4.
- [17] Renvois e A, Decr e D, Amarsy-Guerle R, et al. Evaluation of the  $\beta$ -Lacta test, a rapid test detecting resistance to third-generation cephalosporins in clinical strains of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2013; 51(12) : 4012–7.
- [18] Walewski V, Podglajen I, Lefeuvre P, et al. Early detection with the  $\beta$ -LACTA™ test of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 83(3) : 216–8.
- [19] Banerjee R, Humphries R. Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence* 2017; 8(4) : 427–39.
- [20] Simmer PJ, Opene BNA, Chambers KK, et al. Carbapenemase detection among carbapenem-resistant glucose-nonfermenting Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2017; 55(9) : 2858–64.
- [21] Kolenda C, Benoit R, Carricajo A, et al. Evaluation of the new multiplex immunochromatographic O.K.N.V K- S et assay for the rapid detection of OXA-48-like, KPC, NDM and VIM carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2018; 56(11). pii : e01247-18.
- [22] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2012; 50(9) : 3016–22.
- [23] Gallah S, Decr e D, Genel N, Arlet G. The  $\beta$ -Lacta test for direct detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in urine. *J Clin Microbiol* 2014; 52(10) : 3792–4.
- [24] Amzalag J, Mizrahi A, Naouri D, et al. Optimization of the  $\beta$  LACTA test for the detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing bacteria directly in urine samples. *Infect Dis* 2016; 48(9) : 695–8.
- [25] Viasus D, Calatayud L, McBrown MV, et al. Urinary antigen testing in community-acquired pneumonia in adults : an update. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2019; 17(2) : 107–15.
- [26] Avni T, Bieber A, Green H, et al. Diagnostic accuracy of PCR alone and compared to urinary antigen testing for detection of *Legionella* spp. : a systematic review. *J Clin Microbiol* 2016; 54(2) : 401–11.
- [27] Gateau C, Couturier J, Coia J, Barbut F. How to : diagnose infection caused by *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24(5) : 463–8.
- [28] Krutova M, Wilcox MH, Kuijper EJ. The pitfalls of laboratory diagnostics of *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24(7) : 682–3.
- [29] Rampini SK, Bloemberg GV, Keller PM, et al. Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2011; 53 : 1245–51.
- [30] Levy PY, Fournier PE, Fenollar F, et al. Systematic PCR detection in culture-negative osteoarticular infections. *Am J Med* 2013; 126(12). 1143.e27.
- [31] Str alin K, Herrmann B, Abdeldaim G, et al. Comparison of sputum and nasopharyngeal aspirate samples and of the PCR gene targets *lytA* and *Spn9802* for quantitative PCR for rapid detection of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 2014; 52 : 83–9.
- [32] Clavel M, Barraud O, Mouchadel V, et al. Molecular quantification of bacteria from respiratory samples in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22(9) : 812.e1–7.
- [33] Valour F, Blanc-Pattin V, Freydi ere AM, et coll. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance in bone and joint infection samples : evaluation of the GeneXpert MRSA/SA SSTI assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 78 : 313–5.
- [34] Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, et al. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia : state of the art. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21 : 313–22. Review.
- [35] Searns JB, Robinson CC, Wei Q, et al. Validation of a novel molecular diagnostic panel for pediatric musculoskeletal infections : Integration of the Cepheid Xpert MRSA/SA SSTI and laboratory-developed real-time PCR assays for clindamycin resistance genes and *Kingella kingae* detection. *J Microbiol Methods* 2019; 156 : 60–7.
- [36] Detjen AK, DiNardo AR, Leyden J, et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children : a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir Med* 2015; 3(6) : S2213–600.
- [37] Maynard-Smith L, Larke N, Peters JA, et al. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non-respiratory samples : a systematic review. *BMC Infect Dis* 2014; 14 : 709.
- [38] Shinnick TM, Starks AM, Alexander HL, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15(1) : 9–22.
- [39] Birgand G, Ruimy R, Schwarzinger M, et al. Rapid detection of glycopeptide-resistant enterococci : impact on decision-making and costs. *Antimicrob Resist Infect Control* 2013; 2 : 30.
- [40] Bouchiat C, Bes M, Bouveyron C, et al. Evaluation of the R-Biopharm RIDA® GENE Panton-Valentine leukocidin (PVL) kit for the detection of *Staphylococcus aureus* PVL from pus samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34(9) : 1905–8.
- [41] Le Guern R, Herwegh S, Courcol R, et al. Molecular methods in the diagnosis of *Clostridium difficile* infections : an update. *Expert Rev Mol Diagn* 2013; 13 : 681–92.
- [42] Barbut F, Surgers L, Eckert C, et al. Does a rapid diagnosis of *Clostridium difficile* infection impact on quality of patient management? *Clin Microbiol Infect* 2014; 20 : 136–44.
- [43] Fern andez G, Martr o E, Gonz alez V, et al. Usefulness of a novel multiplex real-time PCR assay for the diagnosis of sexually-transmitted infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 34(8) : 471–6.
- [44] Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, et al. Syndromic panel-based testing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2018; 31(1). e00024-17.
- [45] Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, et al. Multicenter evaluation of BioFire FilmArray meningitis/encephalitis panel for detection of bacteria, viruses, and yeast in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Microbiol* 2016; 54(9) : 2251–61.
- [46] Roger PM, Dubuis-Gourdange P, Sindt A, et al. Approche syndromique pour le diagnostic de gastro-ent rite :  valuation du panel PCR Multiplex FilmArray® GE, BioM erieux dans un h pital g n ral. *Med Mal Inf* 2018; 48(4S) : S67.
- [47] Dack K, Pankow S, Ablah E, et al. Contribution of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel : assessing antimicrobial duration and length of stay. *Kans J Med* 2019; 12(1) : 1–3.
- [48] Basein T, Gardiner BJ, Andujar Vazquez GM, et al. Microbial identification using DNA target amplification and sequencing : clinical utility and impact on patient management. *Open Forum Infect Dis* 2018; 5(11). ofy257.
- [49] Kai S, Matsuo Y, Nakagawa S, et al. Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer. *FEBS Open Bio* 2019; 9(3) : 548–57.
- [50] Roverly C, Greub G, Lepidi H, et al. PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis. *J Clin Microbiol* 2005; 43 : 163–7.
- [51] van der Heijden IM, Wilbrink B, Vije AE, et al. Detection of bacterial DNA in serial synovial samples obtained during antibiotic treatment from patients with septic arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42 : 2198–203.

- [52] Joly-Guillou ML. L'antibiogramme. In : Rôle du laboratoire de microbiologie dans la stratégie thérapeutique probabiliste. 3<sup>e</sup> éd Paris : ESKA; 2012.
- [53] Hornemann A, Sinning D, Cortes S, et al. A pilot study on fingerprinting *Leishmania* species from the Old World using Fourier transform infrared spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2017; 409(29) : 6907–23.
- [54] Rodríguez-Sánchez B, Cercenado E, Coste AT, Greub G. Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018. *Euro Surveill* 2019; 24(4) : 1800193.