

## Table des matières :

Partie I : Contexte du travail.....	12
Partie II : Introduction de l'étude.....	16
Partie III : Matériels et méthodes.....	19
Partie IV : Résultats.....	25
Partie V : Discussion.....	33
Partie VI : Conclusion et perspectives.....	37
Partie VII : Conclusion générale.....	39
Partie VIII : Article.....	42
Partie IX : Bibliographie.....	65
Partie X : Serment de Galien.....	68

## Liste des abréviations par ordre alphabétique

BSAC : British Society for Antimicrobial Chemotherapy

BLSE : béta-lactamases à spectre élargi

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CMI : Concentration minimal inhibitrice

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

IV : intraveineux

J0 : Jours 0

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight

MH : Mueller-Hinton

MHR : Mueller-Hinton Rapid

ME : Erreur majeure

Me : Erreur mineure

mL : millilitre

mm : millimètre

PCR : Polymerase Chain Reaction

VME : Very Major Error

SIL : Système d'informatisation du laboratoire

24/7 : 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7

## **Partie I : Contexte du travail**

L'hémoculture est une analyse bactériologique prescrite dans un contexte de suspicion de bactériémie, de sepsis ou choc septique, de fièvre d'origine indéterminée, de suspicion de bactériémie et/ou d'infection liée au cathéter ou enfin de suspicion d'endocardite ou de fongémie.

Les flacons d'hémoculture sont incubés dans un automate qui va assurer l'agitation et la détection de la pousse microbienne. Les micro-organismes présents dans le flacon d'hémoculture vont produire du CO<sub>2</sub> en se développant. Ce CO<sub>2</sub> va entraîner une diminution du pH qui va modifier la couleur d'un sensor de silicium présent au fond du flacon d'hémoculture, cette modification de couleur sera détectée par l'automate.

Au total, 60 000 à 70 000 flacons sont annuellement incubés au laboratoire de bactériologie du CHU de Nice (49% des analyses pris en charge au laboratoire). Le nombre annuel d'épisodes ayant nécessité le prélèvement d'hémocultures est d'environ 18000 à 20000 patients. Le taux de positivité est de 10% (données 2013 à 2018). Mensuellement, près de 200 patients présentent un ou plusieurs flacons positifs au CHU de Nice.

Jusqu'en 2017, le CHU de Nice ne possédait pas de laboratoire de microbiologie ouvert 24/7, les flacons d'hémoculture n'étaient donc pas pris en charge la nuit avec pour conséquence un retard diagnostic et un risque de flacons faussement négatifs<sup>1</sup>.

Le sepsis est un problème de santé public majeur avec un coût estimé à 20 milliards de dollars, soit 5,2% du coût total des hôpitaux<sup>2</sup>, et se classe en première position des affections les plus coûteuses à traiter. Le coût moyen par patient hospitalisé est de \$22 100 avec une mortalité estimée à 10% chez les enfants et 38,4% chez les personnes âgées<sup>3</sup>. L'incidence des sepsis est estimée entre 300 et 1000/100 000 habitants<sup>4</sup> et elle augmente en raison du vieillissement de la population<sup>5,6</sup> et du meilleur diagnostic<sup>7</sup>.

Le retard dans l'administration des antibiotiques entraîne une augmentation des risques de mortalité hospitalière<sup>8</sup>. Pour chaque heure de retard la mortalité augmente de 0,4% pour le sepsis ( $p=0,02$ ) et 1,8% pour le choc septique ( $p=0,001$ )<sup>9</sup>.

Une politique de réponse rapide est menée depuis 2017 au sein du service de microbiologie. Cette politique a mené à la mise en place d'une ouverture 24/7 permettant l'incubation en continu des hémocultures et le traitement immédiat lorsqu'elles sont positives.

Une étude a été menée sur l'ouverture 24/7 et a permis de montrer une réduction du délai pour obtenir une antibiothérapie efficace de 10.4h<sup>10</sup>.

Toujours dans ce but de réponse rapide, l'intégration du Maldi-Tof a permis d'obtenir une identification de 80% des bactéries en direct depuis le flacon d'hémoculture et 96% des entérobactéries<sup>11</sup> dans un délai de 10 minutes. Une première adaptation de l'antibiothérapie probabiliste peut donc se faire sur les résultats obtenus grâce au Maldi-Tof.

Un protocole d'antibiothérapie probabiliste a été rédigé par le laboratoire en accord avec le service d'infectiologie pour adapter au mieux l'antibiothérapie probabiliste aux caractéristiques microbiologiques. Pour les entérobactéries du groupe 1-2 (*Escherichia coli* , *Salmonella* sp, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*) l'utilisation de la céfotaxime IV est conseillée sauf en cas de contexte nosocomial où nous recommandons la Piperacilline/tazobactam IV. Si le patient présente des antécédents de BLSE ou des facteurs de risque de BLSE l'imipénem/Cilastatine IV est utilisée.

Pour les entérobactéries du groupe 3 (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Serratia marcescens*, *Providencia* sp, *Pantoea agglomerans*) l'utilisation de la céfémide IV est conseillée. Si le patient présente des antécédents de BLSE ou facteurs de risque de BLSE l'imipénem/Cilastatine IV est utilisée. Si des facteurs de gravité sont présents l'amikacine est ajoutée.

Ces évolutions ont considérablement amélioré le diagnostic des bactériémies.

Enfin nous avons amélioré le délai d'obtention des résultats de l'antibiogramme en faisant un antibiogramme en direct depuis un flacon d'hémoculture sur des milieux mueller-hinton avec un résultat obtenu en 16 à 24 heures. Les diamètres sont lus en fonction des recommandations de l'EUCAST/CA-SFM.

Cette organisation est complétée par la transmission tous les matins d'un listing des patients pour lesquels un flacon d'hémoculture s'est positivé dans la nuit (fichier Excel provenant d'une extraction du SIL adressée par mail aux biologistes par l'interne de garde) avec un staff médical (biologistes, internes) bi-hebdomadaire (vendredi, lundi) visant à assurer la continuité du service (analytique, post-analytique).

Nous souhaitons maintenant raccourcir le délai d'incubation des antibiogrammes (qui est actuellement de 16 heures), cela serait permis par le milieu MHR-SIR. Ce milieu commercialisé permet une lecture de l'antibiogramme au bout de 6 à 8 heures.

On m'a confié la mission d'évaluer les performances du MHR en fonction des recommandations d'inoculum proposées par la BSAC et le CA-SFM et de comparer les résultats MHR/MH obtenus sur des flacons d'hémocultures positives. J'ai ensuite estimé la réduction du délai de rendu des antibiogrammes directement faits à partir d'un flacon d'hémoculture au sein du CHU de Nice.

## Partie II : Introduction de l'étude

Rapport-Gratuit.com

Le sepsis est un problème de santé publique majeur en raison d'une mortalité élevée estimée à 10% chez les enfants et 38.4% chez les personnes âgées<sup>3</sup>. L'augmentation de la mortalité chez les patients en sepsis est due à un retard d'administration des antibiotiques<sup>8</sup>, une antibiothérapie inadaptée<sup>12,13</sup> ou à la présence de résistances bactériennes comme des BLSE<sup>14</sup>. La bactérie responsable du sepsis peut être mise en évidence par la réalisation d'hémocultures. Les résultats de sensibilité (antibiogramme) permettent d'adapter l'antibiothérapie. Un rendu d'antibiogramme plus rapide est associé à une meilleure évolution clinique des patients en sepsis<sup>15</sup>. Actuellement à partir d'un flacon positif les résultats de l'antibiogramme sont obtenus en 16 à 24 heures. Les bactéries majoritairement impliquées dans le sepsis sont les entérobactéries et *Staphylococcus aureus*<sup>16</sup>.

Ces dernières années, les laboratoires de bactériologie ont amélioré la prise en charge des flacons d'hémocultures. Dans un premier temps ils ont élargi leur plage de travail 24/7<sup>10</sup> afin d'incuber en continu les flacons d'hémocultures dans les automates. Cependant la lecture et la validation des antibiogrammes demeurent des activités réalisées entre 8h30 et 17h.

Dans un deuxième temps, l'utilisation de la protéomique avec la spectrométrie de masse (Maldi-tof) a permis d'obtenir une identification en direct depuis le flacon d'hémoculture positif dans un délai de 10 minutes à 1 heures ou après une pré-culture de 4 heures<sup>17</sup>. Dans notre laboratoire la méthode (lyse + lavage) permet une identification de 80% des bactéries (96% des entérobactéries) dans un délai de 10 minutes<sup>11</sup>. Une première adaptation de l'antibiothérapie probabiliste peut donc se faire à partir de ces résultats. Cette identification en direct permet d'éviter l'étape de subculture qui nécessite un délai supplémentaire de 24 heures<sup>18</sup>.

Plusieurs méthodes moléculaires ont été développées et utilisées pour détecter directement sur des flacons d'hémocultures positifs les résistances bactériennes. Par exemple la détection de la résistance à la méticilline chez les *S. aureus* par Xpert MRSA/SA (Cepheid, Sunnyvale, CA) est utilisée pour les flacons d'hémocultures positifs à cocci gram positif en amas afin d'adapter le traitement. La résistance chez les entérobactéries peut être également détectée par des tests moléculaires ciblant plusieurs gènes de résistances<sup>19</sup>. Ces techniques ont comme inconvénient d'avoir un surcoût important et des études médico-économiques sont actuellement en cours afin de définir la place de ces tests dans la stratégie diagnostique. Par ailleurs ces techniques ne permettent pas de détecter les céphalosporinases hyperproduites<sup>17</sup>.

Les méthodes phénotypiques restent pour l'instant le gold standard permettant de tester la sensibilité de la bactérie à un large panel d'antibiotiques. Cependant le résultat de l'antibiogramme à partir d'un flacon positif nécessite un délai de 16 à 24 heures.

Récemment une méthode de rendu rapide des antibiogrammes par diffusion sur un milieu de culture a été développée. Cette méthode utilise un milieu particulier contenant des adjuvants dans la gélose associée à une lecture précoce des diamètres par une caméra (SIR-scan). Ce milieu Mueller-Hinton Rapid-SIR (MHR-SIR) vient d'être évalué et il permettrait un gain de 17 heures sur le rendu de l'antibiogramme<sup>20</sup>. Cependant dans l'étude de Pilmis et *al.* 2019, il n'y a pas eu d'évaluation des performances du milieu MHR et d'étude comparative du milieu MHR par rapport au milieu MH sur des flacons d'hémoculture positifs. De plus, elle a été réalisée sur les entérobactéries et le *S. aureus* avec un antibiogramme réalisé en direct depuis des flacons d'hémoculture positifs en suivant les recommandations d'inoculum de la British society for antimicrobial chemotherapy<sup>21</sup>. L'utilisation de la PCR à la recherche du gène *mecA* par la majorité des laboratoires limite l'utilisation d'un milieu MHR pour les *S. aureus*. Cette étude n'indique pas si la validation des antibiogrammes est effectuée de 8h30 à 18h30.

Par ailleurs depuis 2018, les laboratoires français de microbiologie suivent les recommandations d'inoculum du CA-SFM pour la réalisation d'un antibiogramme en direct depuis un flacon d'hémoculture positif. Ces recommandations sont différentes de celle utilisées dans le travail précédemment publié<sup>20</sup>.

Les objectifs de notre travail sont : (i) évaluer les performances (répétabilité et reproductibilité) du MHR selon les recommandations d'inoculum proposées par la BSAC et le CA-SFM, (ii) de comparer les résultats MHR/MH obtenus sur des flacons d'hémocultures positives à entérobactéries de patients en sepsis, (iii) estimer la réduction du délai de rendu des antibiogrammes d'entérobactéries directement réalisés à partir d'un flacon d'hémoculture au sein de notre laboratoire où la lecture des antibiogrammes est effectuée de 8h30 à 17h00.

## Partie III : Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Bactériologie du centre Hospitalo-universitaire de Nice. Cet établissement prend en charge des adultes et des enfants avec une capacité de 1667 lits. Le laboratoire traite annuellement 65 000 flacons d'hémoculture et cette activité représente 49% des analyses prises en charges. Notre laboratoire assure une permanence d'activité 24/7 pour la prise en charge des prélèvements. Toutes les hémocultures prélevées sont incubées dans un automate (BacT/ALERT® 3D automated device (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)) jusqu'à détection de la positivité. Les hémocultures positives bénéficient d'une coloration de Gram (PREVI® Color automated Gram staining system (bioMérieux)), une identification en direct sur les flacons grâce au MalDI-TOF MS (MicroFlex LT and Biotyper database; Bruker, Wissembourg, France) comme précédemment décrit<sup>11</sup>. Dans notre protocole standard les antibiogrammes sont ensemencés directement à partir du flacon positif sur milieu MH (I2a, Montpellier, France). Les diamètres d'inhibition sont lus avec le SIR-Scan 2000 (I2a) et interprétés selon les données du CA-SFM 2019 V1 de janvier 2019. L'ensemencement de la gélose se fait en suivant les recommandations d'inoculum du CA-SFM (qui préconise 15 gouttes de bouillon de culture dans 9mL de NaCl 0.9%)<sup>22</sup> par ensemencement à l'écouillon d'une gélose MH appliqué dans les 3 directions.

Les 25 antibiotiques (I2a) testés sont les suivants : Amoxicilline 10 µg (AM10), Amoxicilline-acide clavulanique 30 µg (AMC30), Ticarcilline 75 µg (TIC75), Ticarcilline-acide clavulanique 85 µg (TIM85), Pipéracilline 30 µg (PRL30), Pipéracilline-tazobactam 36 µg (TPZ36), Mécillinam 10 µg (MEC10), Céfalexine 30 µg (CL30), Céfoxitine 30 µg (FOX30), Céfixime 5 µg (CFM5), Céfotaxime 5 µg (CTX5), Ceftazidime 10 µg (CAZ10), Céfèpime 30 µg (FEP30), Aztréonam 30 µg (ATM30), Ertapénem 10 µg (ETP10), Imipénem 10 µg (IPM10), Méropénem 10 µg (MEM10), Gentamicine 10 µg (CN10), Amikacine 30 µg (AK30), Tobramycine 10 µg (TOB10), Acide nalidixique 30 µg (NA30), Ofloxacine 5 µg (OFX5), Ciprofloxacine 5 µg (CIP5), Triméthoprime + sulfaméthoxazole 25 µg (SXT25), Tigécycline 15 µg (TGC15).

Les antibiogrammes sont lus et validés, au minimum 16 heures après la positivité du flacon d'hémoculture<sup>22</sup>, entre 8h30 et 17h.

Un conseil d'antibiothérapie est effectué par un biologiste communiquant les résultats de l'identification du germe en fonction d'un protocole d'antibiothérapie de première intention établi en consensus avec les infectiologues du CHU de Nice.

### Comparaison BSAC vs CA-SFM sur gélose MHR après inoculation de flacons d'hémocultures

L'ensemencement de l'hémoculture a été réalisé grâce à l'incubation d'un flacon contenant 10 mL de sang avec 1mL d'une souche type *E.coli* ATCC 25922 à 0,5 Mac Farland. Le flacon était détecté positif après 7 heures d'incubation. Dès la positivité du flacon d'hémoculture un ensemencement est effectué sur 2 géloses MHR (I2a) avec un inoculum suivant les recommandations du CA-SFM de 15 gouttes du flacon d'hémoculture dilué dans 9 mL (15G) de sérum physiologique et 2 géloses MHR suivant les recommandations du BSAC avec 1 goutte dans 5mL d'eau stérile (1G).

Le milieu MHR (I2a) contient des adjuvants dans la gélose permettant de mieux révéler une faible pousse bactérienne associée à des paramètres spécifiques d'acquisition d'image sur le SIR-Scan 2000 Automatic (I2a). La lecture sur l'automate se fait toutes les 1/2 heures à partir de la 6<sup>ème</sup> heure et jusqu'à la 8<sup>ème</sup> heure d'incubation.

La répétabilité a été effectuée grâce à 20 antibiogrammes réalisés par le même opérateur, avec le même lot de réactifs, le même instrument et dans le délai le plus court possible.

La reproductibilité a été effectuée avec 34 antibiogrammes. Les critères de variation sont le temps et les opérateurs avec 34 opérateurs différents sur 3 jours. Les diamètres sont lus et corrigés par un biologiste en fonction du CA-SFM 2019 V1.

Les données de diamètre d'inhibition et de sensibilité ont été extraites du SIR-Scan 2000 (I2a) à l'aide du logiciel SIRWEB (I2a). Ces données ont été comparées entre elles et par rapport aux limites acceptables pour la souche *E. coli* ATCCC 25922 décrites dans le CA-SFM 2019 V1.

### Comparaison MHR vs MH sur des flacons d'hémocultures positives

Les performances du milieu MHR ont été comparées à celles du milieu MH en testant les flacons positifs sur une période de 4 mois (Juin 2019 et Septembre 2019). Nous avons inclus les flacons détectés positifs mono-microbien à entérobactéries entre 9h et 16h de patients en sepsis. L'antibiogramme a été réalisé sur un flacon positif par patient. L'ensemencement du milieu MHR se fait selon les recommandations de la BSAC et celui du milieu MH se fait selon les

recommandations standard du laboratoire (CA-SFM) qui est considéré comme la référence. L'interprétation des sensibilités est faite grâce aux diamètres décrits dans le CA-SFM 2019 V1.

Discordance d'interprétation pour la comparaison MH vs MHR :

Pour chaque bactérie et chaque antibiotique nous avons comparé la concordance de l'interprétation entre les deux méthodes. Sensible = S, intermédiaire = I ou résistant = R. En cas de discordances une CMI est déterminée par technique de bandelette Etest (BioMérieux).

Les discordances étaient classées selon les critères d'interprétation suivants :

- Erreurs mineures / Minor Error (me) : antibiotiques interprétés S ou I avec une méthode et respectivement I ou R avec l'autre méthode.
- Erreurs majeures / Major Error (ME) : antibiotiques interprétés R avec le MHR-SIR et S avec la méthode standard.
- Erreurs très majeures/ Very Major Error (VME) : antibiotiques interprétés S avec le MHR et le R avec le MH standard.

Estimation de la réduction du délai de rendu de l'antibiogramme grâce à l'utilisation du MHR en direct depuis des flacons d'hémoculture positifs.

Nous avons relevé les délais d'obtention des antibiogrammes avec une étude mono-centrique entre le 1<sup>er</sup> juillet 2017 et le 31 octobre 2017 sur toutes les hémocultures de patients ayant plus de 18 ans présentant une bactériémie mono-microbienne à entérobactéries. Les données concernant l'identification bactérienne, le temps d'identification bactérienne et le délai de rendu de l'antibiogramme ont été extraites depuis le système d'informatisation du laboratoire (SIL).

Un senior de microbiologie et une équipe mobile d'infectiologie sont disponibles de 8:30AM à 6:30PM. Le senior de microbiologie assure une lecture des antibiogrammes de 8:30AM à 5:00PM.

Lorsqu'une hémoculture est positive le temps estimé pour l'identification par maldi-tof et la réalisation de l'antibiogramme est de 1.5 heures. Ce délai a été calculé sur une période de 4 mois en réalisant une moyenne du temps nécessaire pour obtenir une identification bactérienne en direct depuis un flacon d'hémoculture et du temps nécessaire pour la

réalisation de l'antibiogramme. Le temps moyen nécessaire à l'incubation d'une gélose Mueller-Hinton était durant notre étude de 16 heures. Un délai de 17.5 heures est donc nécessaire pour lire un antibiogramme réalisé depuis un flacon d'hémoculture positif.

Avec le milieu MH, les hémocultures positives après 11:30PM (J0) et jusqu'à 3PM (J1) auront un antibiogramme lu et validé par un microbiogiste à partir 8:30AM (J2). Les hémocultures positives de 3PM (J1) à 11:30PM (J1) auront un antibiogramme lu et validé par le microbiogiste dès la fin d'incubation entre 8:30AM (J2) et 5PM (J2) (Fig.1).

Le temps moyen nécessaire pour une lecture par l'automate du milieu MHR était durant notre étude de 7 heures. Un délai de 8.5h était donc nécessaire pour lire l'antibiogramme réalisé depuis un flacon d'hémoculture positif. Ce délai se compose du délai moyen d'incubation (7 heures) et de 1.5 heures pour réaliser l'identification bactérienne avec l'ensemencement du milieu.

Avec le milieu MHR, les hémocultures positives entre 3PM (J1) et 12:00AM de (J2) auront un antibiogramme théoriquement lu et validé par un microbiogiste à 8:30AM (J2). Les hémocultures positives de 12:00AM (J2) à 8:30AM (J2) auront un antibiogramme lu et validé par le microbiogiste dès la fin d'incubation entre 8 :30AM (J2) et 5PM (J2). Les hémocultures positives entre 8:30AM (J1) et 3PM (J1) n'auront pas de bénéfice (sur le délai d'obtention de l'antibiogramme) à être ensemencé sur milieu MHR. (Fig.1).

Le MHR permet donc un gain de temps pour les hémocultures positives entre 3PM de J1 et 8:30AM de J2 (Fig. 1).

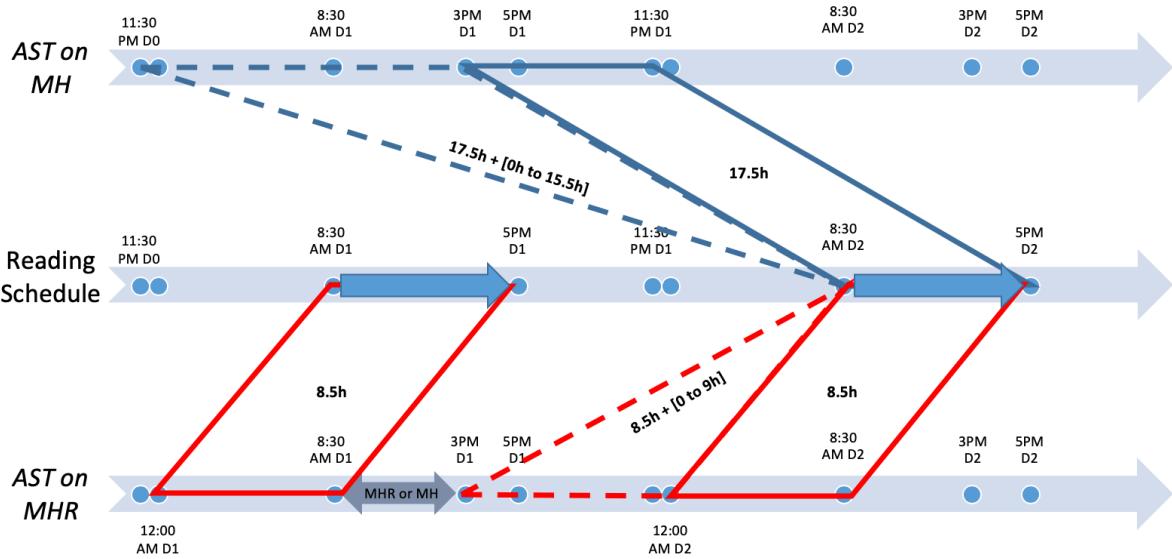


Fig.1 : Délai de lecture théorique des antibiogrammes MH et MHR en fonction des horaires de positivité de l'hémoculture. Représentation de 3 échelles, avec l'échelle supérieure qui représente les heures de positivité des flacons d'hémoculture avec le délai de 17.5 heures à 33 heures pour obtenir un antibiogramme en direct sur gélose MH. L'échelle du milieu représente les plages horaires de lecture des antibiogrammes (de 8:30AM à 5PM). L'échelle inférieure représente les heures de positivité des flacons d'hémoculture avec un délai de 8.5 heures à 17.5 heures pour obtenir un antibiogramme en direct depuis un flacon d'hémoculture positif, les hémocultures positives entre 8:30AM et 3PM peuvent être ensemencées en MH ou en MHR sans impact sur le délai d'obtention de l'antibiogramme. D0 = Jours 0, D1 = Jours 1 et D2 = Jours 2.

Nous avons ensuite estimé le gain de temps sur le rendu de l'antibiogramme que pourrait apporter le MHR par rapport au milieu MH à partir des données extraites de notre SIL.

#### Analyses statistiques :

Afin d'identifier les différences de diamètre pour la comparaison des recommandations CA-SFM ou BSAC nous avons utilisé un test paramétrique, le T-test (comparaison de moyenne). La recherche de différence significative entre le nombre de discordances a été réalisée grâce à un test de  $\chi^2$ . Ces deux tests ont été effectuées grâce à Minitab® version 19.2020.1.0. Le résultat était significatif si le  $p < 0.05$ . Les graphiques ont été réalisés avec Rstudio® version 1.3.959 et R® 4.0.1.

## Partie IV : Résultats

## Comparaison BSAC vs CA-SFM sur gélose MHR après inoculation de flacons d'hémocultures

Sur les 1000 diamètres d'inhibition étudiés lors de l'étude de répétabilité nous avons eu 79 diamètres hors des limites de diamètres acceptables décrites dans le CA-SFM 2019 V1 pour la souche type *E. coli* ATCC 25922. Avec 20 diamètres hors bornes pour le MHR selon les recommandations d'inoculum 1G (BSAC) et 59 pour le MHR selon les recommandations d'inoculum 15G (CA-SFM). Les différences sont significatives avec  $p < 0.001$  (chi2). Les diamètres hors des limites étaient répertoriés pour la cefoxitine, la céfèpime, l'imipénem et le méropénem, les quinolones et le triméthoprime-sulfamethoxazole. (Fig.2)

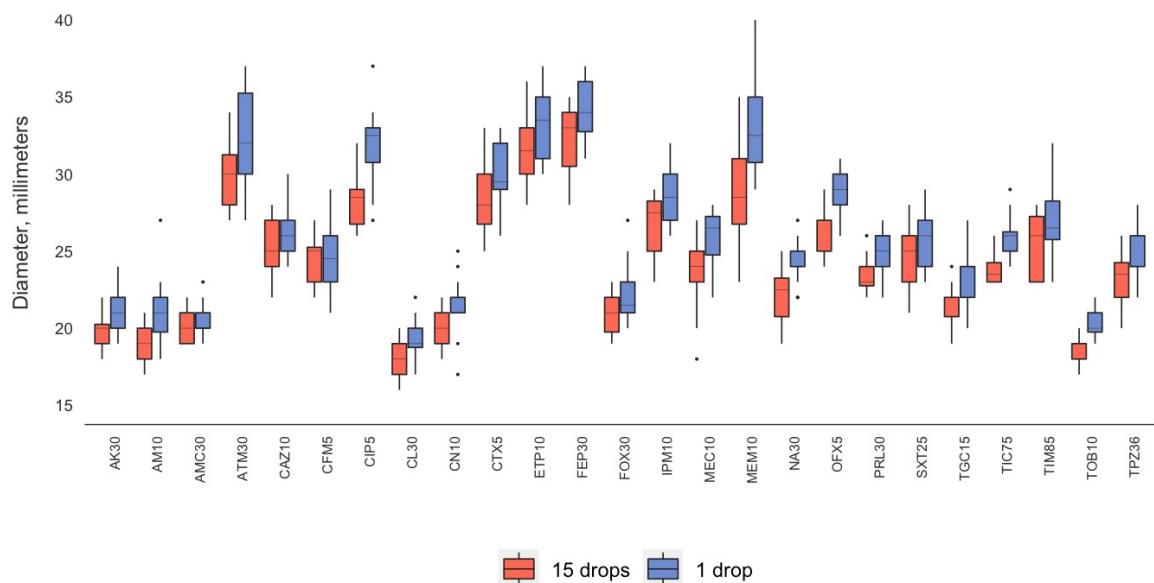


Fig.2 : Comparaison des diamètres obtenus lors de la répétabilité. 1 drop pour les recommandations de la BSAC et 15 drops pour les recommandations du CA-SFM. Le boxplot montre le 25ème et 75ème percentile avec une barre horizontale indiquant la médiane. Les moustaches représentent le 5ème et 95ème percentile. Les valeurs extrêmes sont représentées avec des points. AM10 = Amoxicilline 10 µg, AMC30 = Amoxicilline-acide clavulanique 30 µg, TIC75 = Ticarcilline 75 µg, TIM85 = Ticarcilline-acide clavulanique 85 µg, PRL30 = Pipéracilline 30 µg, TPZ36 = Pipéracilline-tazobactam 36 µg, MEC10 = Mécillinam 10 µg, CL30 = Céfalexine 30 µg, FOX30 = Céfoxitine 30 µg, CFM5 = Céfixime 5 µg, CTX5 = Céfotaxime 5 µg, CAZ10 = Ceftazidime 10 µg, FEP30 = Céfèpime 30 µg, ATM30 = Aztréonam 30 µg, ETP10 = Ertapénem 10 µg, IPM10 = Imipénem 10 µg, MEM10 = Méropénem 10 µg, CN10 = Gentamicine 10 µg, AK30 = Amikacine 30 µg, TOB10 = Tobramycine 10 µg, NA30 = Acide nalidixique 30 µg, OFX5 = Ofloxacine 5 µg, CIP5 = Ciprofloxacine 5 µg, SXT25 = Triméthoprime + sulfaméthoxazole 25 µg, TGC15 = Tigécycline 15 µg.

Sur les 1700 diamètres étudiés lors de l'étude de reproductibilité nous avons eu 145 diamètres hors des limites de diamètres acceptables décrites dans le CA-SFM 2019 V1 pour la souche type *E. coli* ATCC 25922. Avec 56 diamètres hors bornes pour le MHR selon les recommandations d'inoculum 1G et 91 pour le MHR selon les recommandations d'inoculum 15G. Ces différences sont significatives avec  $p = 0.003$ . Les antibiotiques touchés étaient l'amoxicilline, la céfoxitine, la céfixime, la céfipime, le méropénem, les quinolones et le triméthoprime-sulfaméthoxazole. (Fig.3)

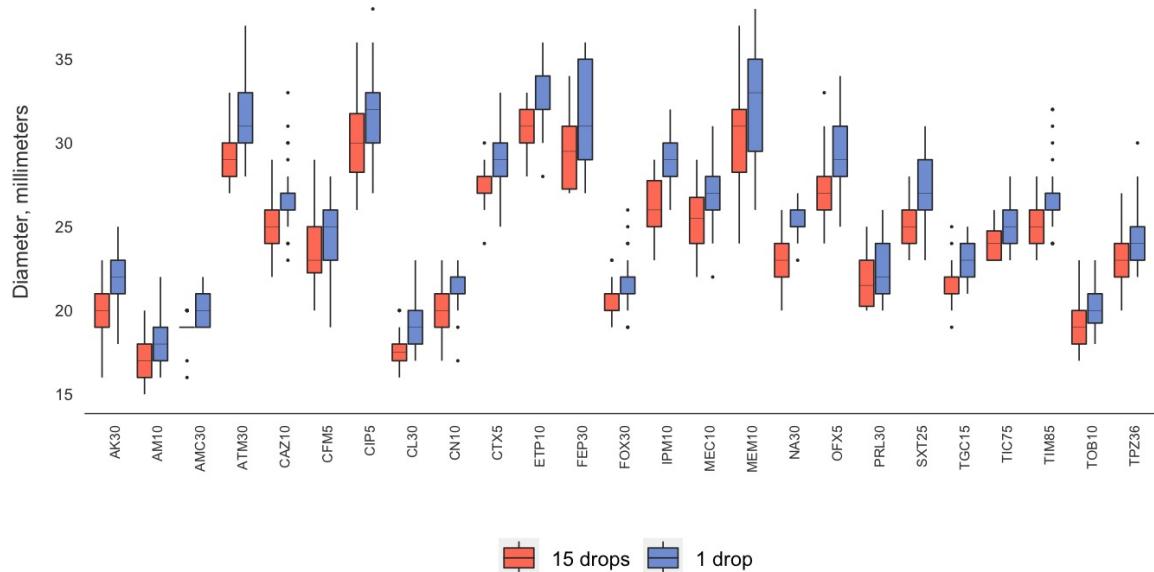


Fig.3 : Comparaison des diamètres lors de la reproductibilité. 1 drop pour les recommandations de la BSAC et 15 drops pour les recommandations du CA-SFM. La boxplot montre le 25ème et 75ème percentile avec une barre horizontale indiquant la médiane. Les moustaches représentent le 5ème et 95ème percentile. Les valeurs extrêmes sont représentées avec des points. AM10 = Amoxicilline 10 µg, AMC30 = Amoxicilline-acide clavulanique 30 µg, TIC75 = Ticarcilline 75 µg, TIM85 = Ticarcilline-acide clavulanique 85 µg, PRL30 = Pipéracilline 30 µg, TPZ36 = Pipéracilline-tazobactam 36 µg, MEC10 = Mécillinam 10 µg, CL30 = Céfalexine 30 µg, FOX30 = Céfoxitine 30 µg, CFM5 = Céfixime 5 µg, CTX5 = Céfotaxime 5 µg, CAZ10 = Ceftazidime 10 µg, FEP30 = Céfipime 30 µg, ATM30 = Aztreonam 30 µg, ETP10 = Ertapénem 10 µg, IPM10 = Imipénem 10 µg, MEM10 = Méropénem 10 µg, CN10 = Gentamicine 10 µg, AK30 = Amikacine 30 µg, TOB10 = Tobramycine 10 µg, NA30 = Acide nalidixique 30 µg, OFX5 = Ofloxacine 5 µg, CIP5 = Ciprofloxacine 5 µg, SXT25 = Triméthoprime + sulfaméthoxazole 25 µg, TGC15 = Tigécycline 15 µg.

Le nombre de diamètres hors des limites acceptables a été groupé entre la répétabilité et la reproductibilité afin d'augmenter la taille des effectifs par antibiotique et identifier les antibiotiques les plus significativement touchés. Nous n'avons pas observé de différences significatives pour l'amoxicilline, la céfoxitine, la céfixime, la céfèpime, l'imipénem, le méropénem. Une différence significative a été observée pour les quinolones (Acide nalidixique, Ofloxacine et Ciprofloxacine) (Table 1)

Table 1 : Comparaison du nombre de diamètres hors des limites définies pour la souche *E. coli* ATCC 25922 en fonction des conditions d'inoculations 1 goutte (BSAC) et 15 gouttes (CA-SFM) sur le milieu MHR.

Antibiotic (n=54)	Value out of acceptable limits with 1 drop	Value out of acceptable limits with 15 drop	p
Amoxicillin	6	10	NS*
Cefoxitine	22	41	NS
Cefixime	6	2	NS
Cefepime	11	22	NS
Imipenem	1	4	NS
Meropenem	12	10	NS
Nalidixic acid	1	8	0,026
Ofloxacin	13	38	0,04
Ciprofloxacine	2	13	0,008
Trimethoprim-sulfamethoxazole	2	2	NS
Total	76	150	

\* = non significatif.

Une comparaison des diamètres de lecture entre les recommandations 1G et 15G a été effectuée par comparaison de moyenne. Pour la répétabilité une différence statistiquement significative était observée pour tous les antibiotiques à l'exception de l'Amoxicilline-Acide clavulanique, Ticarcilline-acide clavulanique, la Céfixime, Ceftazidime, Gentamicine et le triméthoprime + sulfaméthoxazole. Pour la reproductibilité une différence statistiquement significative était observée pour tous les antibiotiques à l'exception de l'amoxicilline, la pipéracilline, le mécillinam, le méropénem, la gentamicine et l'ofloxacine.

Pour l'utilisation du MHR, les résultats obtenus en suivant les recommandations de la BSAC présentent moins de diamètres hors des limites acceptables par rapport aux recommandations du CA-SFM.

#### Comparaison MHR vs MH sur des flacons d'hémocultures positives

71 flacons d'hémocultures positives monomicrobiennes ont été recueillis pendant la période d'étude chez des patients en sepsis. Les bactéries identifiées étaient : *E. coli* ( $n=36$ ), *K. pneumoniae* ( $n=15$ ), *E. cloacae* ( $n=6$ ), *P. mirabilis* ( $n=5$ ), *S. marcescens* ( $n=4$ ), *E. aerogenes* ( $n=2$ ), *K. oxytoca* ( $n=2$ ), *M. morganii* ( $n=1$ ). Les souches avaient un profil de résistance aux bêta-lactamines de type sauvage pour 46 d'entre-elles, 15 avec une pénicillinase, 1 avec une céphalosporinase hyperproduite, 1 avec une céphalosporinase acquise et 8 avec une BLSE (Table 2).

Table 2 : Liste des différentes espèces bactériennes de l'étude avec leurs profils de résistances par rapport aux bêta-lactamines.

Identification	Number	Beta-lactam profile
<i>Escherichia coli</i>	36	17 Wild Type 2 Inhibitor-resistant TEM 4 High level penicillinase 8 Penicillinase 1 Plasmid cephalosporinase 4 Extended spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae (ESBL)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	12 Wild Type 3 ESBL
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	5 Wild Type 1 ESBL
<i>Proteus mirabilis</i>	5	4 Wild Type 1 Penicillinase 3 Wild Type
<i>Serratia marcescens</i>	4	1 Hyperproduction of the chromosomal cephalosporinase (AmpC)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	2 Wild Type
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2 Wild Type
<i>Morganella morganii</i>	1	1 Wild Type

Ces 71 flacons d'hémocultures nous ont permis de tester 1775 combinaisons (25 antibiotiques x 71). Sur ces combinaisons nous avons eu 7 erreurs. 1 minor error pour le trimethoprim-sulfamethoxazole, 5 Major error pour les quinolones (4 Major error pour la ciprofloxacine et 1 pour l'ofloxacine) et 1 Very Major Error pour le trimethoprim-sulfamethoxazole (Table 3). Ces discordances ont été confirmé en E-test.

Le milieu MHR présente donc une concordance dans 99,6% avec le milieu MH. Ces résultats ont donc montré une excellente corrélation de catégorisation clinique entre les diamètres MHR-SIR et la méthode standard.

Table 3 : Erreurs de catégorisation des antibiotiques du milieu MHR par rapport au milieu MH.

Species	Mistake	MHR Minor	MHR Major	MHR VME
<i>Escherichia coli</i>		Trimethoprim-sulfamethoxazole		
<i>Serratia marcescens</i>			Ciprofloxacin	
<i>Escherichia coli</i>			Ciprofloxacin	
<i>Escherichia coli</i>			Ciprofloxacin	
<i>Escherichia coli</i>			Ofloxacin	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				Trimethoprim-sulfamethoxazole

La lecture des antibiogrammes de MHR étant toujours effectuée grâce à l'interface SIR-Scan nous rapportons une visualisation difficile des synergies de BLSE par rapport au milieu MH en raison de la pousse fine fréquemment retrouvée sur la gélose MHR (Fig.4). Sur les 8 BLSE, il n'y a qu'une seule fois où nous n'avons pas réussi à visualiser les synergies.

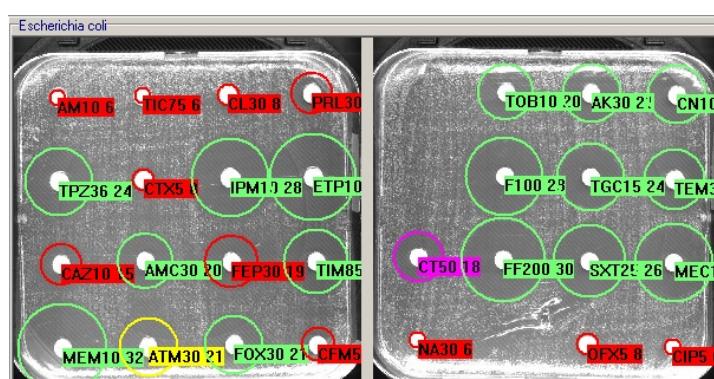


Fig.4 : *E. coli* BLSE sur milieu MHR avec une lecture en 7h depuis un flacon hémoculture.

Estimation de la réduction du délai de rendu de l'antibiogramme grâce à l'utilisation du MHR en direct depuis des flacons d'hémoculture positifs.

Durant la période du 1<sup>er</sup> juillet 2017 au 31 octobre 2017 nous avons eu 161 hémocultures monomicrobiennes positives à entérobactéries. 121 hémocultures étaient positives entre 3PM et 8:30AM. 43 entre 3 PM et 00:00 et 78 entre 00:00 et 8:30AM. (Fig.5)

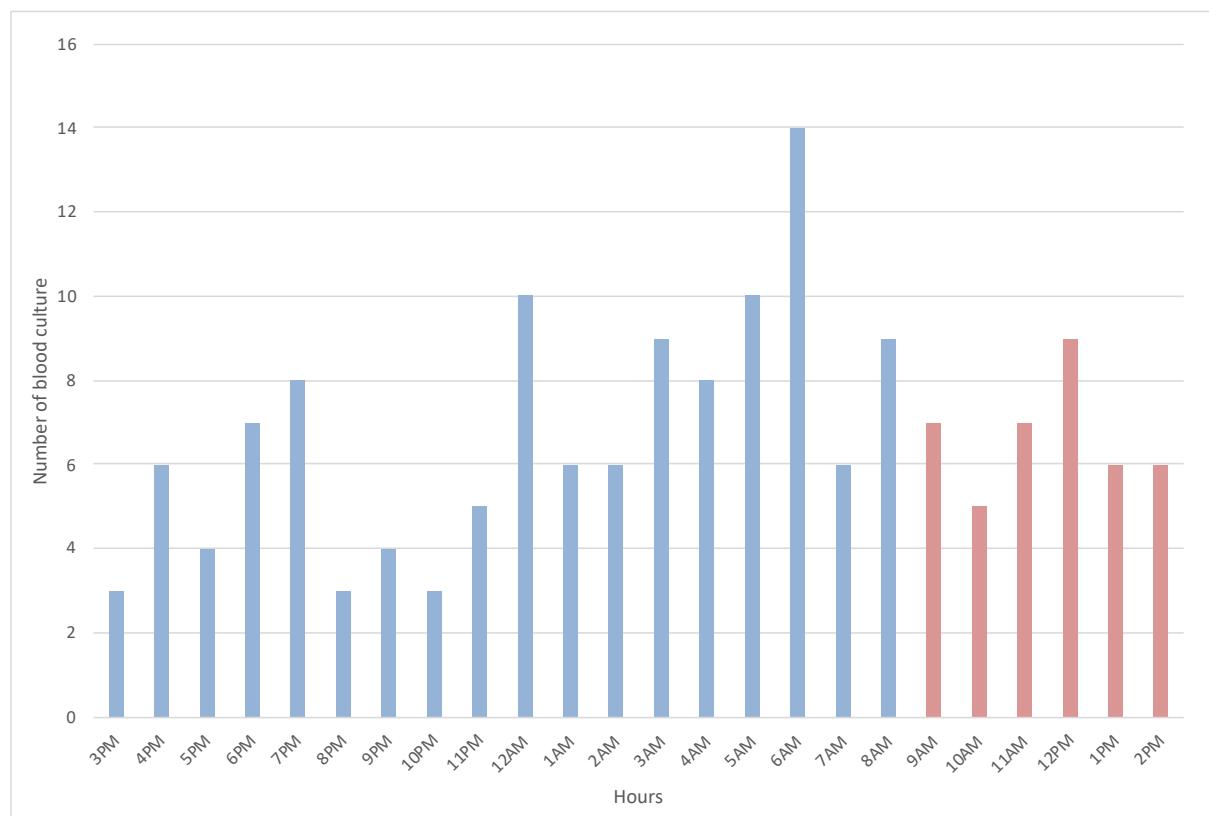


Fig.5 : Répartition du nombre d'hémocultures positives en fonction de l'heure de la journée. En bleu les hémocultures pouvant bénéficier d'une réduction de délai en cas de réduction du MHR et en rouge les hémocultures n'en bénéficiant pas.

La mise en place du MHR permet un rendu de l'antibiogramme en 8.5 heures pour toutes les hémocultures positives entre 00:00 et 8:30AM soit 48.5% des hémocultures de notre étude (78/161) et un rendu en moins de 17.5 heures pour toutes les hémocultures positives entre 3PM et 00:00 soit 26.7% des hémocultures de notre étude (43/161). Le MHR permet de bénéficier d'une réduction de temps pour 75.1% des hémocultures.

Le temps moyen nécessaire au rendu définitif de l'antibiogramme avec le milieu MH est de 27 heures avec un temps minimum de 17heures et 30 minutes et un temps maximum de 36 heures et 30 minutes. Dans le cadre de l'utilisation théorique du MHR le temps moyen est de 10heures et 50 minutes avec un délai minimum pour obtenir un antibiogramme validé de 8 heures et 30 minutes et un délai maximum de 23 heures et 52 minutes (Fig.6). Nous avons en moyenne une réduction de 16 heures du délai pour obtenir un antibiogramme.

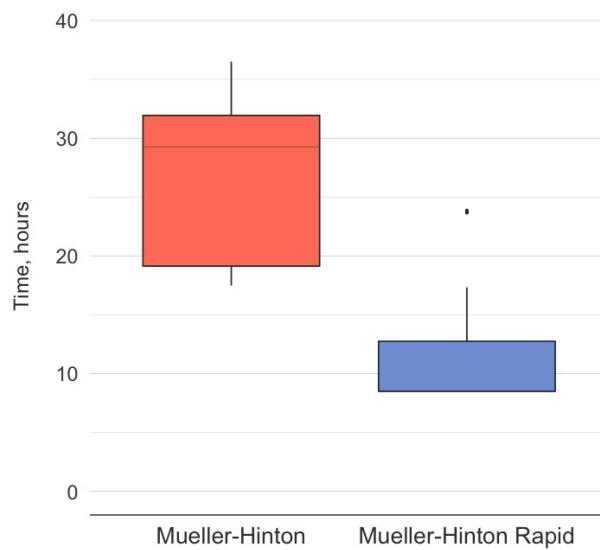


Fig.6 : Temps nécessaire pour obtenir l'antibiogramme en direct depuis un flacon d'hémoculture pour le MHR et pour le MH. Les boxplots montrent le 25ème et 75ème percentile avec la barre horizontale montrant la médiane. Les moustaches (whiskers) représentent le 5ème et 95ème percentile. Les outliers (valeurs extrêmes) sont représentés par des points.

## Partie V : Discussion

Dans ce travail nous avons montré que le MHR était comparable à la méthode standard avec le bénéfice d'un délai d'incubation raccourci à 7 heures +/- 30 minutes. Cette gélose permet ainsi une diminution importante du délai d'incubation de l'antibiogramme avec une excellente concordance par rapport à la méthode effectuée en routine au sein du laboratoire. Ce résultat confirme l'étude déjà effectuée sur les flacons d'hémoculture<sup>23</sup>. Ce milieu s'ajoute donc aux techniques actuelles d'identification phénotypique rapide à partir d'un flacon d'hémoculture positif<sup>17</sup> avec un coût faible, une bonne reproductibilité et une adaptation simple au sein du workflow du laboratoire.

Pour la première fois sur le milieu MHR nous avons comparé les recommandations d'inoculum de la BSAC<sup>21</sup> vs CA-SFM<sup>22</sup> avec moins de discordance en faveur de l'inoculum proposé par la BSAC. Plusieurs méthodes sont décrites pourensemencer un antibiogramme directement depuis un flacon d'hémoculture positive mais aucune ne fait pour l'instant consensus<sup>24-26</sup>. Des études souhaitant standardiser les recommandations d'inoculum ont échoué à trouver l'inoculum parfait<sup>27</sup>. Les recommandations sont donc souvent nationales. Notre résultat est en faveur d'une utilisation du milieu MHR en suivant les recommandations de la BSAC malgré l'incrémantation dans l'EUCAST de l'ATU sensé absorber les variations dues à une différence d'inoculum<sup>28</sup>. L'ATU (Area of Technical Uncertainty) correspond à des zones d'incertitude technique. Le but est de minimiser la variations systémiques et aléatoires afin de ne pas compromettre la reproductibilité des tests.

Ici, deux sources de variation peuvent expliquer la différence observée entre les recommandations CA-SFM et BSAC. Premièrement, le diamètre CA-SFM était significativement réduit pour la majorité des antibiotiques, en lien avec l'utilisation d'un inoculum initial plus important. Deuxièmement, l'utilisation de deux milieux différents pour diluer l'hémoculture, du sérum physiologique pour le CA-SFM, de l'eau stérile pour le BSAC peut avoir un impact sur la culture bactérienne comme il a été montré dans une étude ancienne<sup>29</sup>.

L'identification en direct des hémocultures et la réalisation des antibiogrammes 24/7<sup>30</sup> associés à la lecture des antibiogrammes de 8h30 à 17 heures sont des adaptations techniques et organisationnelles qui permettent un rendu plus rapide de l'antibiogramme. L'identification en direct depuis un flacon d'hémoculture positif permet un gain de 12 à 24 heures par rapport à l'identification par culture bactérienne<sup>17</sup>. A ce gain de temps s'ajoute ensuite la réduction du

délai permise par l'ouverture 24/7 avec une réduction de 3.4 heures du délai depuis le prélèvement veineux à l'incubation dans l'automate et 10.4 heures sur l'adaptation de l'antibiothérapie<sup>31</sup>.

Le temps moyen gagné du MHR comparé à la méthode standard était de 16 heures comme il a été montré dans l'étude récente sur le milieu MHR<sup>20</sup>. Au sein du CHU de Nice, l'identification en direct depuis les flacons d'hémoculture de 96%<sup>11</sup> des entérobactéries couplée à un rendu en moins de 8.5 heures de la majorité des antibiogrammes permettrait de réduire la durée d'hospitalisation<sup>12</sup>, les complications et la mortalité hospitalière<sup>8</sup>.

L'équipe mobile d'infectiologie disponible de 8h30 à 18h30 permet de faire le lien entre le rendu rapide des phénotypes de résistance et l'adaptation de l'antibiothérapie chez le patient<sup>32</sup>.

Grâce à la mise en place du MHR nous allons permettre un gain sur le temps nécessaire au rendu de l'antibiogramme pour 75.1% des hémocultures avec un gain théorique moyen de 16 heures. Ce gain est à revoir en fonction des facteurs humains et de l'organisation du travail au sein de notre laboratoire. En effet le workflow du MHR devrait permettre une validation biologique dès la disponibilité du MHR (entre 8:30AM et 5PM) mais un délai lié à la disponibilité du biologiste peut exister. Nous apportons ici une explication précise de l'intégration de ce milieu au sein d'un laboratoire hospitalier de microbiologie ce qui n'a pas été réalisé dans l'étude précédente.

L'intégration du milieu MHR au sein du workflow du laboratoire doit respecter les critères de la norme ISO 15189.

La lecture du milieu est réalisée par l'interface informatique du SIR-Scan (I2a), il n'y a donc plus la possibilité d'utiliser le pied à coulisse pour s'aider en cas de diamètre difficile à lire. On peut donc observer une difficulté à la lecture lorsque les conditions d'acquisition d'image sont mauvaises ou lorsque les limites entre la zone d'inhibition et la zone de pousse sont mal délimitées.

Nous ajoutons que les images synergiques des BLSE peuvent s'avérer difficiles à interpréter (Fig.4), dans ce cas la détection des BLSE peut être confirmée à l'aide d'un algorithme décisionnel sur le phénotype de résistance. La confirmation d'une BLSE est basée sur la

présence d'un diamètre <6mm pour la ticarcilline, la résistance à la céfotaxime associée à une céfoxitine sensible pour les entérobactéries du groupe 1 et 2 lorsqu'il n'y avait pas de co-résistance. Si un doute était présent sur les entérobactéries du groupe 3, une gélose MH avec de la cloxacilline était réalisée avec un rapprochement de disque.

Nous avons constaté une pousse fine uniforme sur l'ensemble de la gélose de façon assez fréquente n'empêchant pas la lecture des antibiogrammes. Le milieu MHR a cependant montré une excellente concordance avec le milieu MH et a permis un raccourcissement du temps de rendu de l'antibiogramme. De plus cette méthode phénotypique permet d'étudier la sensibilité à 25 antibiotiques et de détecter les dérépressions de céphalosporinases<sup>17</sup>.

Récemment l'EUCAST a publié des diamètres spécifiques en fonction du délai d'incubation et de l'espèce pour une lecture sur MH standard au bout de 4, 6 ou 8 heures d'incubation. Pour le développement de cette méthode l'EUCAST recommande de prélever 125µl depuis le flacon d'hémoculture à déposer directement sur la gélose et d'incuber les boîtes sur une durée maximale de 8 heures. La multiplication des diamètres de lecture en fonction du temps d'incubation et de l'espèce risque de compromettre l'utilisation dans les laboratoires de microbiologie. L'intégration du MHR au sein du workflow sera plus aisée et moins contraignantes.

Notre étude comporte cependant plusieurs limites. Nous avons un faible effectif d'hémocultures sur lesquels un milieu MHR en direct a été réalisé et notre étude est monocentrique. Notre échantillon de bactéries représente une épidémiologie classique de laboratoire et donc comporte une faible quantité de bactéries BLSE et une absence de carbapénémases. Une collection de souches avec des carbapénémases et BLSE permettrait d'explorer de façon plus poussée les limites de l'automate permettant l'acquisition des images (SIR-scan). Cette étude apporte une réduction de délai théorique qu'il serait nécessaire de confirmer dans les conditions d'utilisation du milieu MHR. L'évaluation du nombre d'erreurs n'a pas été faite sur le nombre de résistants mais sur le nombre total d'antibiotiques testés<sup>33</sup>.

## Partie VI : Conclusion et perspectives

Nos résultats ont montré une excellente corrélation entre les deux méthodes MH et MHR-SIR. Cette méthode permet une identification phénotypique rapide, jusqu'à présent impossible.

Le laboratoire de microbiologie clinique du CHU de Nice travaille actuellement sur le développement d'une forte coopération avec le service d'infectiologie ce qui permettra une adaptation précoce de l'antibiogramme. Associé à cette coopération un conseil antibiotique sera directement intégré au rendu de l'antibiogramme afin d'inciter les cliniciens à adapter l'antibiothérapie notamment chez les patients en sepsis.

## Partie VII : Conclusion générale

Dans un environnement hospitalier à la recherche perpétuelle de rapidité, les techniques de diagnostic moléculaire, avec principalement l'arrivée de la PCR multiplex, ont fortement bousculé les méthodes conventionnelles, lentes chronophages et fortement dépendantes d'une intervention humaine. Ces PCR présentent l'avantage d'obtenir un résultat rapide avec une excellente sensibilité et spécificité associés à peu de manipulations techniques. L'interprétation biologique de ces tests est restreinte avec pour les techniques multiplex commerciales un rendu binaire (positif/négatif).

La détection rapide des phénotypes de résistances bactériennes est un enjeu majeur permettant de repositionner dans un délai convenable face à l'urgence, le rendu des profils phénotypiques de résistance bactérienne. Ces méthodes permettent d'étudier l'expression des gènes de résistance et ont un avantage sur la détection des céphalosporinase hyperproduite. L'avantage que procure le MHR est aussi au niveau médico-économique. En effet plusieurs centaines d'euros sont nécessaires afin de rechercher 9 gènes de résistance pour les méthodes les plus performantes (Verigene® Bloodstream Infection Testing Panels (Luminex Corporation, Nanosphere, Northbrook, Etats-Unis)) avec un délai de 2.5 heures.

La méthode phénotypique MHR permet d'obtenir le résultat de 25 antibiotiques avec une concordance par rapport au gold standard (MH) de 99.6% et pour un coût inférieur à 9 euros. Le MHR associé aux modifications organisationnelles et technologiques effectuées au sein du laboratoire permet un gain de 16 heures en moyenne sur le rendu de l'antibiogramme.

Le laboratoire propose donc en cas d'identification d'une entérobactérie sur le flacon d'hémoculture d'effectuer une gélose MHR en direct depuis le flacon, ce qui permet d'obtenir le résultat de l'antibiogramme dans un délai minimum de 8,5 heures. En cas d'identification d'un *S. aureus* ou en cas de cocci gram positifs en amas non identifiés par la spectrométrie de masse de faire une PCR MRSA (GeneXpert® System) avec un résultat disponible en 1 heure. Cette PCR permet d'adapter rapidement l'antiothérapie avec de la céfazoline en cas d'absence du gène *mecA* ou de la Daptomycine/Vancomycine le cas échéant. Lorsque les hémocultures sont positives à un autre germe, un protocole standard avec une gélose MH sera réalisé.

La PCR et le milieu MHR sont donc complémentaires. L'utilisation en routine du milieu MHR peut être associée à l'utilisation de la PCR multiplex pour certains cas critiques selon un

algorithme défini avec l'équipe mobile d'infectiologie. L'équipe mobile d'infectiologie est l'élément permettant le lien entre le laboratoire et le service d'hospitalisation. Sans coopération efficace entre ces deux unités le gain de temps du laboratoire n'est pas transformé en gain pour le patient.

Les objectifs à venir pour notre laboratoire seront de réduire le délai d'identification par spectrométrie de masse des germes en direct depuis les flacons d'hémoculture. En raison du travail en lot de notre laboratoire un délai de 1,5 heures est nécessaire pour obtenir une identification du germe avec un ensemencement de l'antibiogramme. Un travail en continu permettrait de gagner une heure sur le délai d'obtention du résultat de l'antibiogramme MHR et de réduire encore l'écart de temps entre la PCR et le milieu MHR.

## Partie VIII : Article

1        EVALUATION OF A DIRECT ANTIBIOPHARMACOGRAM ON BLOOD CULTURE IN LESS THAN 8 HOURS BY  
2                    THE RAPID MUELLER-HINTON DIFFUSION METHOD

3        J. Kasprzak<sup>1</sup>, A. Gaudart<sup>1</sup>, K. Legueult<sup>4</sup>, C. Pradier<sup>4</sup>, R. Lotte<sup>1,2,3</sup>, R. Ruimy<sup>1,2,3</sup>

4        <sup>1)</sup> Laboratoire de Bactériologie, Hôpital L'archet 2, CHU de Nice, Nice, France

5        <sup>2)</sup> INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Équipe 6, Nice, France

6        <sup>3)</sup> Faculté de Médecine, Université Côte d'Azur, Nice, France

7        <sup>4)</sup> Département de santé publique, CHU de Nice, Nice, France

8        Corresponding author :

9        James Kasprzak, Microbiologie, Hôpital l'Archet 2, CHU de Nice, Nice, France ; 151 Route de  
10      Saint Antoine, 06200 NICE, France ; +33 4 92 03 62 14 ; Mail : james@kasprzak.fr

11

12

13

14 **Abstract :**

15 Introduction: The time necessary to give the results of an antibiotic susceptibility test in agar  
16 MH from a positive blood culture sample is usually between 16 to 24 hours. In the event of  
17 sepsis, any delay in the early adaptation of the antibiotic therapy to the results of the  
18 antibiotic susceptibility test increases the mortality rate. A new MHR medium reduces this  
19 delay to 6-8 hours. There is actually little data available on the assessment of this  
20 environment.

21

22 Objectives: We have compared the performance of the MHR versus the MH medium for  
23 performing antibiograms directly from enterobacteria positive blood culture bottles and  
24 estimated the time that was saved on the turnaround time of the antibiogram.

25

26 Methods: The performance of the MHR medium was studied with an *E. coli* strain ATCC  
27 25922 which was inoculated into the blood culture bottles. The sensitivity of 25 antibiotics  
28 was tested and the diameters were read by camera (SIR-scan). The results obtained with two  
29 inoculum 1 drop/5mL (1D) and 15 drops/15mL (15D) were compared to the acceptable limits  
30 of the strain. The antibiograms of 71 enterobacteria-positive blood cultures (wild-type,  
31 hyperCase, ESBL) in sepsis patients were compared in mediums MHR versus MH. The  
32 effective time saving was calculated with a validation of the antibiograms from 8:30 AM to  
33 5PM. The statistical tests were performed with « R ».

34

35 Results: Of the 1000 diameters tested in the repeatability study, 20 (2%) of the diameters  
36 were out of bounds with a 1D inoculum and 59 (5,9%) with 15D ( $p<0.001$ ). Of the 1700  
37 diameters tested in the reproducibility study, we had 56 (3.3%) out of bounds diameters with  
38 a 1D inoculum and 91 (5.3%) with a 15D inoculum ( $p=0.003$ ). For the rest of the study, we  
39 chose a 1D inoculum. Out of the 1775 diameters tested from blood culture bottles that were  
40 positive for enterobacteriaceae, we had 7 errors with the MHR: 1 minor error and 1 Very  
41 Major Error for trimethoprim-sulfamethoxazole, and 5 Major Errors for fluoroquinolones,  
42 which makes an agreement rate of 99.6%. Finally, the theoretical average time gained on the  
43 antibiogram is 16 hours.

44

45 Conclusion: Our results showed an excellent performance of the MHR medium for performing  
46 direct antibiogram susceptibility testing from enterobacteria positive blood culture bottles  
47 and a good correlation between the MH and MHR medium with a turnover time of the  
48 antibiotic susceptibility test in 8.5 hours.

49 **Introduction**

50 Sepsis is a major public health problem due to a high mortality rate which is estimated at 10%  
51 among children and 38.4% among the elderly<sup>1</sup>. The increased mortality in sepsis patients is  
52 due to delayed antibiotic administration<sup>2</sup>, inappropriate antibiotic therapy<sup>3,4</sup> or the presence  
53 of bacterial resistance such as Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL)<sup>5</sup>. The bacteria  
54 responsible for sepsis can be detected in blood cultures. Sensitivity results (antibiograms) are  
55 used to adjust the antibiotic therapy. A faster turnover time of the antibiogram is associated  
56 with improved clinical outcome in sepsis patients<sup>6</sup>. Currently, the results of the antibiogram  
57 from a positive blood culture bottle are obtained in 16 to 24 hours. The bacteria mostly  
58 involved in sepsis are enterobacteria and *Staphylococcus aureus*<sup>7</sup>.

59 These last few years, bacteriology laboratories have improved their management of blood  
60 culture bottles. Initially they have expanded their 24/7 working hours<sup>8</sup> in order to continuously  
61 incubate the blood culture bottles in the automated devices. However, the reading and  
62 validation of the antibiograms remain activities that are carried out between 8:30AM and  
63 5:00PM.

64 Secondly, the use of proteomics with mass spectrometry (Maldi-tof) enabled an on-line  
65 identification from the positive blood culture bottles within 10 minutes to 1 hour or after a 4-  
66 hour pre-culture<sup>9</sup>. In our laboratory the method (lysis + washing) allows the identification of  
67 80% of the bacteria (96% of the enterobacteria) within 10 minutes<sup>10</sup>. An initial adaptation of  
68 probabilistic antibiotic therapy can therefore be made on the basis of these results. This on-  
69 line identification avoids the subculture stage, which requires an additional 24 hours<sup>11</sup>.

70 Several molecular methods have been developed and used to detect bacterial resistance  
71 directly on positive blood culture bottles. For example, the detection of methicillin resistance  
72 in *S. aureus* by Xpert MRSA/SA (Cepheid, Sunnyvale, CA) is used for gram-positive cocci  
73 clusters in blood culture bottles in order to adapt the treatment. Resistance in enterobacteria  
74 can also be detected by molecular tests targeting multiple resistance genes<sup>12</sup>. The  
75 disadvantage of these techniques is that they have a significant cost premium and medico-  
76 economic studies are currently underway to define the place of these tests in the diagnostic  
77 strategy. Moreover, these techniques do not detect hyperproduced cephalosporinases<sup>9</sup>.  
78 Phenotypic methods remain for the moment gold standard allowing to test the bacterium's

79 sensitivity to a large panel of antibiotics. However, the result of the antibiogram from a  
80 positive vial requires a delay of 16 to 24 hours.

81 Recently a method of rapid turnover time of antibiograms by diffusion on a culture medium  
82 has been developed. This method uses a special medium containing adjuvants in the agar  
83 (MHR) combined with an early reading of the diameters by a camera (SIR-scan). This Mueller-  
84 Hinton Rapid-SIR (MHR) medium has just been evaluated and it would allow a gain of 17 hours  
85 on the antibiogram turnover time<sup>13</sup>. In the study of Pilmis et al. 2019, there was no evaluation  
86 of the performance of the MHR medium and no comparative study of the MHR medium versus  
87 the MH medium on positive blood culture bottles. Moreover it was conducted on  
88 enterobacteria and *S. aureus* antibiotic susceptibility and testing was performed directly from  
89 positive blood culture bottles following the inoculum recommendations of the British society  
90 for antimicrobial chemotherapy<sup>14</sup>. The use of PCR to search for the *mecA* gene by the majority  
91 of laboratories limits the use of a MHR medium for *S. aureus*. In addition, it is not recommended  
92 if the validation of the antibiograms is done between 8.30 AM and 6.30 PM.

93 In addition, since 2018, French microbiology laboratories have been following the CA-SFM  
94 inoculum recommendations for performing a direct antibiogram from a positive blood culture  
95 bottle. These recommendations are different from those used in the previously published  
96 work<sup>13</sup>.

97 The objectives of our work are: (i) to evaluate the performance (repeatability and  
98 reproducibility) of MHR according to the inoculum recommendations proposed by the BSAC  
99 and the CA-SFM, (ii) to compare MHR/MH results obtained on enterobacteria positive blood  
100 culture vials from sepsis patients, (iii) to estimate the reduction in the turnover time of  
101 enterobacteria antibiograms performed directly from a blood culture bottles in our laboratory  
102 where the reading of the antibiotic susceptibility test is performed from 8:30AM to 5:00PM.

103 **Matériels et méthodes**

104 This work was carried out in the Bacteriology Laboratory of the University Hospital of Nice. This  
105 establishment takes care of adults and children with a capacity of 1667 beds. The laboratory  
106 processes 65,000 blood culture bottles annually and this activity represents 49% of the analyses  
107 performed. Our laboratory ensures a permanent activity 24/7 for the taking in charge of the  
108 samples. All the blood cultures collected are incubated in an automated device (BacT/ALERT®  
109 3D automated device (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)) until positive results are detected.  
110 Positive blood cultures benefit from Gram staining (PREVI® Color automated Gram staining  
111 system (bioMérieux)), direct identification on the vials using MalDI-TOF MS (MicroFlex LT and  
112 Biotype database; Bruker, Wissembourg, France) as previously described<sup>10</sup>. In our standard  
113 protocol the antibiograms are inoculated directly from the positive vial onto the MH medium  
114 (I2a, Montpellier, France). The inhibition diameters are read with the SIR-scan 2000 (I2a) and  
115 interpreted according to the CA-SFM 2019 V1 data of January 2019. Agar inoculation is carried  
116 out according to the CA-SFM inoculum recommendations (which recommends 15 drops of  
117 culture broth in 9mL of 0.9% NaCl<sup>15</sup>) by swab inoculation of MH agar applied in all 3 directions.  
118 The 25 antibiotics (I2a) tested are as follows: Amoxicillin 10 µg (AM10), Amoxicillin-clavulanic  
119 acid 30 µg (AMC30), Ticarcillin 75 µg (TIC75), Ticarcillin-clavulanic acid 85 µg (TIM85),  
120 Piperacillin 30 µg (PRL30), Piperacillin-tazobactam 36 µg (TPZ36), Mecillinam 10 µg (MEC10),  
121 Cefalexin 30 µg (LC30), Cefoxitin 30 µg (FOX30), Cefixime 5 µg (CFM5), Cefotaxime 5 µg (CTX5),  
122 Ceftazidime 10 µg (CAZ10), Cefepime 30 µg (FEP30), Aztreonam 30 µg (ATM30), Ertapenem 10  
123 µg (ETP10), Imipenem 10 µg (IPM10), Meropenem 10 µg (MEM10), Gentamicin 10 µg (CN10),  
124 Amikacin 30 µg (AK30), Tobramycin 10 µg (TOB10), Nalidixic acid 30 µg (NA30), Ofloxacin 5 µg  
125 (OFX5), Ciprofloxacin 5 µg (CIP5), Trimethoprim + sulfamethoxazole 25 µg (SXT25), Tigecycline  
126 15 µg (TGC15).

127 Antibiograms are read and validated at least 16 hours after the blood culture bottle tests  
128 positive<sup>15</sup>, between 8.30 AM and 5 PM.

129 An antibiotic therapy advice is carried out by a microbiologist communicating the results of the  
130 identification of the germ according to a first-line antibiotic therapy protocol established in  
131 consensus with the infectiologists of the Nice University Hospital.

132 Comparison of BSAC vs. CA-SFM on MHR agar after inoculation of blood culture bottles

133 The blood culture was inoculated by incubating a vial containing 10 mL of blood with 1mL of  
134 0.5 Mac Farland *E. coli* strain ATCC 25922. The vial was detected positive after a 7-hour  
135 incubation period. As soon as the blood culture vial is positive, inoculation is performed on 2  
136 MHR(I2a) agars with an inoculum according to the recommendations of CA-SFM of 15 drops  
137 from the blood culture vial diluted in 9 mL (15D) of saline and 2 MHR agars according to the  
138 recommendations of BSAC with 1 drop in 5mL of sterile water (1D).

139 The MHR medium (I2a) contains agar adjuvants which allows to better reveal weak bacterial  
140 growth associated with specific image acquisition parameters on the SIR-scan 2000 Automatic  
141 (I2a). The reading on the automated device is done every 1/2 hour from the 6th hour to the  
142 8th hour of incubation.

143 Repeatability was achieved with 20 antibiograms performed by the same operator, using the  
144 same batch of reagents, the same instrument and in the shortest possible time.

145 Reproducibility was performed with 34 antibiograms. The variation criteria are time and  
146 operators with 34 different operators over 3 days. The diameters are read and corrected by a  
147 microbiologist according to CA-SFM 2019 V1.

148 The inhibition diameter and sensitivity data were extracted from the SIR-scan 2000 (I2a) using  
149 the SIRWEB software (I2a). These data were compared to each other and to the acceptable  
150 limits for *E. coli* strain ATCCC 25922 described in CA-SFM 2019 V1.

151 MHR vs. MH comparison on positive blood cultures

152 The performance of the MHR medium was compared to that of the MH medium by testing  
153 positive vials over a 4-month period (June 2019 and September 2019). We have included the  
154 vials that were detected positive to a mono-microbial enterobacteria between 9am and 4pm  
155 from sepsis patients. The antibiogram was performed on one positive vial per patient. The MHR  
156 medium is inoculated according to the recommendations of the BSAC and the MH medium is  
157 inoculated according to the standard recommendations of the laboratory (CA-SFM) which is  
158 considered as the reference. Sensitivities are interpreted using the diameters described in CA-  
159 SFM 2019 V1.

160 Inconsistency in the interpretation for the comparison MH vs MHR :

161 For each bacterium and each antibiotic we compared the concordance of interpretation  
162 between the two methods. Sensitive = S, intermediate = I or resistant = R. In case of  
163 inconsistencies a MIC is determined by the Etest strip technique (BioMérieux).

164 The inconsistencies were classified according to the following interpretation criteria:

165 - minor error (me): antibiotics interpreted S or I with one method and respectively I or R with  
166 the other method.

167 - Major Error (ME): antibiotics interpreted R with the MHR-SIR and S with the standard method.

168 - Very Major Error/Very Major Error (VME): antibiotics interpreted S with the MHR and R with  
169 the standard MH.

170 Estimation of the reduction in turnaround time of the antibiogram by using live MHR from  
171 positive blood culture bottles.

172 We have listed the turnover times necessary to obtain antibiograms with a single-center study  
173 between July 1, 2017 and October 31, 2017 on all blood cultures from patients over 18 years  
174 of age with mono-microbial enterobacteria bacteremia. Data on bacterial identification,  
175 bacterial identification time and antibiogram turnaround time were extracted from the  
176 Laboratory Information System (LIS).

177 A senior microbiologist and a mobile infectious disease team are available from 8:30AM to  
178 6:30PM. The Senior microbiologist reads the antibiogram from 8:30AM to 5:00PM.

179 When a blood culture is positive the estimated time for maldi-tof identification and antibiotic  
180 susceptibility testing is 1.5 hours. This time was calculated over a period of 4 months by  
181 averaging the time required to obtain a direct bacterial identification from a blood culture  
182 bottle and the time required to perform the antibiogram. The average time required to  
183 incubate a Mueller-Hinton agar was 16 hours during our study. A delay of 17.5 hours is  
184 therefore necessary to read an antibiogram from a positive blood culture bottle.

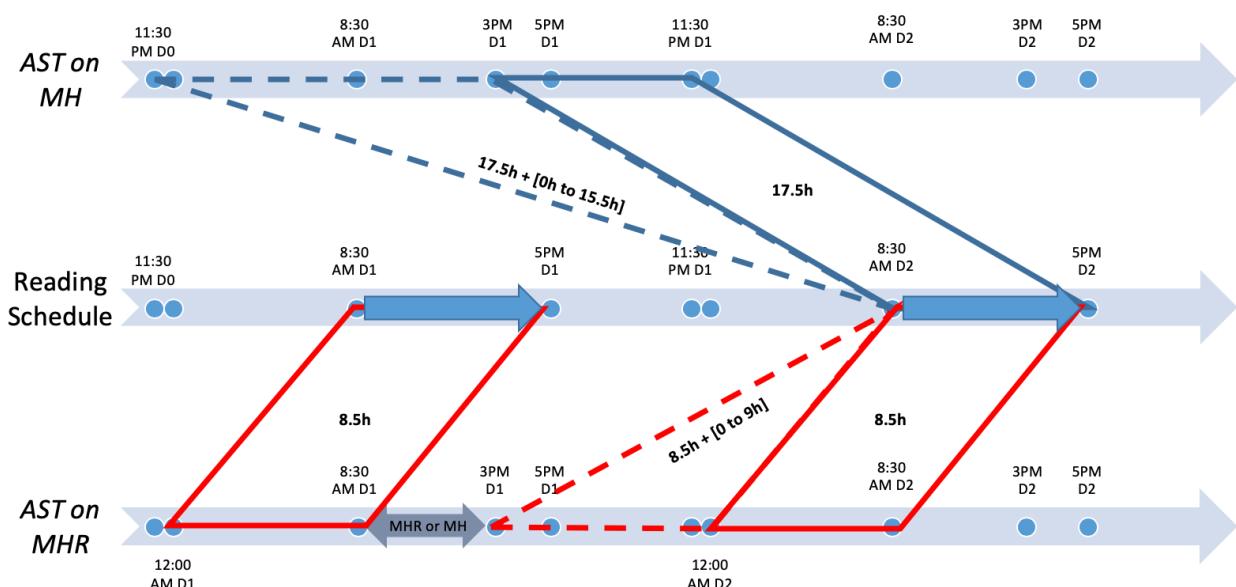
185 With the MH medium, blood cultures which turn out positive after 11:30PM (D0) and up to  
186 3PM (D1) will have an antibiogram that is read and validated by a microbiologist starting at  
187 8:30AM (D2). Positive blood cultures from 3PM (D1) to 11:30PM (D1) will have an antibiogram

188 that is read and validated by the microbiologist at the end of incubation between 8:30AM (D2)  
189 and 5PM (D2) (Fig.1).

190 The average time required for a reading of the MHR medium by the automated device was,  
191 during our study, of 7 hours. 8.5 hours were therefore necessary to read the antibiogram  
192 performed from a positive blood culture. This time is composed of the average incubation time  
193 (7 hours) and 1.5 hours to perform the bacterial identification with inoculation of the medium.

194 With the MHR medium, the blood cultures which turn out positive between 3PM (D1) and  
195 12:00AM of (D2) will have an antibiogram that is theoretically read and validated by a  
196 microbiologist at 8:30AM (D2). Blood cultures which turn out positive between 12:00AM (D2)  
197 to 8:30AM (D2) will have an antibiogram that is read and validated by the microbiologist at the  
198 end of incubation between 8:30AM (D2) and 5PM (D2). Blood cultures which turn out positive  
199 between 8:30AM (D1) and 3PM (D1) will have no benefit (on the time to obtain the  
200 antibiogram) in being inoculated on MHR medium (Fig.1).

201 The MHR therefore saves time for positive blood cultures between 3PM on D1 and 8:30AM  
202 on D2(Fig.1).



203

204 Fig.1: Theoretical reading time of the MH and MHR antibiograms as a function of blood culture  
205 positivity schedules. Representation of 3 scales, with the upper scale representing the hours of  
206 positivity of the blood cultures with the delay of 17.5 hours to 33 hours to obtain a direct

207 antibiogram on MH agar. The middle scale represents the time ranges for reading the  
208 antibiograms (8:30AM to 5PM). The lower scale represents the hours of positivity of the blood  
209 culture bottles with a delay of 8.5 hours to 17.5 hours to obtain a direct antibiogram from a  
210 positive blood culture bottle, positive blood cultures between 8:30AM and 3PM can be  
211 inoculated in MH or MHR with no impact on the time to obtain the antibiogram. D0 = Days 0,  
212 D1 = Days 1 and D2 = Days 2.

213 We then estimated the time that could be saved on the turnover time of the antibiogram  
214 provided by the MHR compared to the MH medium from the data extracted from our LIS.

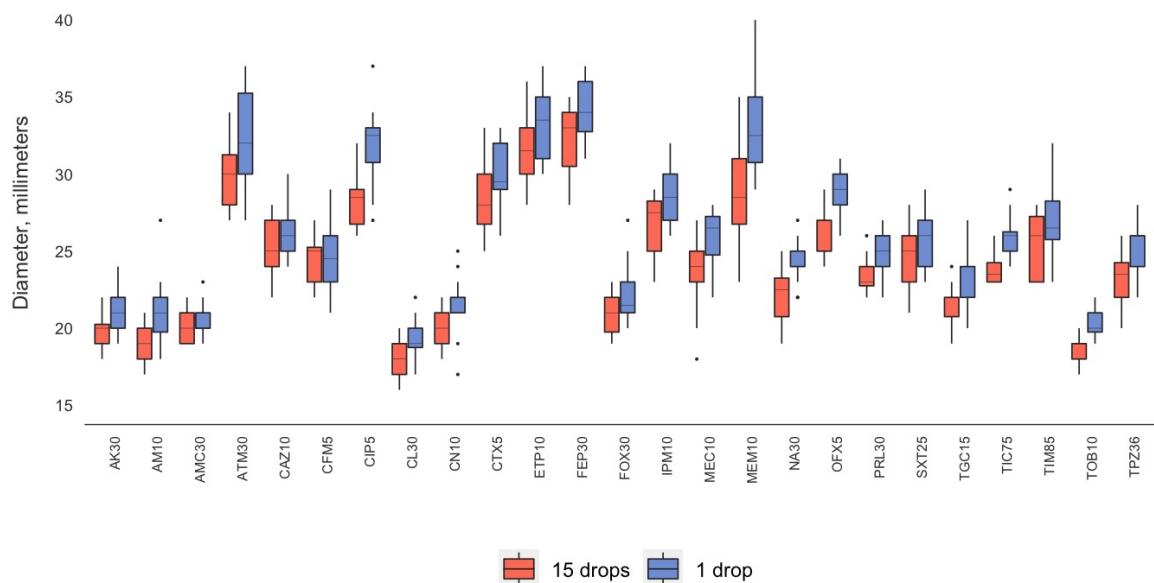
215 Statistical analysis :

216 In order to identify diameter differences for the comparison of the CA-SFM or BSAC  
217 recommendations we used a parametric test, the T-test (comparison of means). The search for  
218 a significant difference in the number of discrepancies was performed in a test of  $\chi^2$  using  
219 Minitab® version 19.2020.1.0. The result was significant if the  $p < 0.05$ . The graphics were  
220 created with Rstudio® version 1.3.959 and R® 4.0.1.

221 **Results**

222 Comparison of BSAC vs. CA-SFM on MHR agar after inoculation of blood culture bottles.

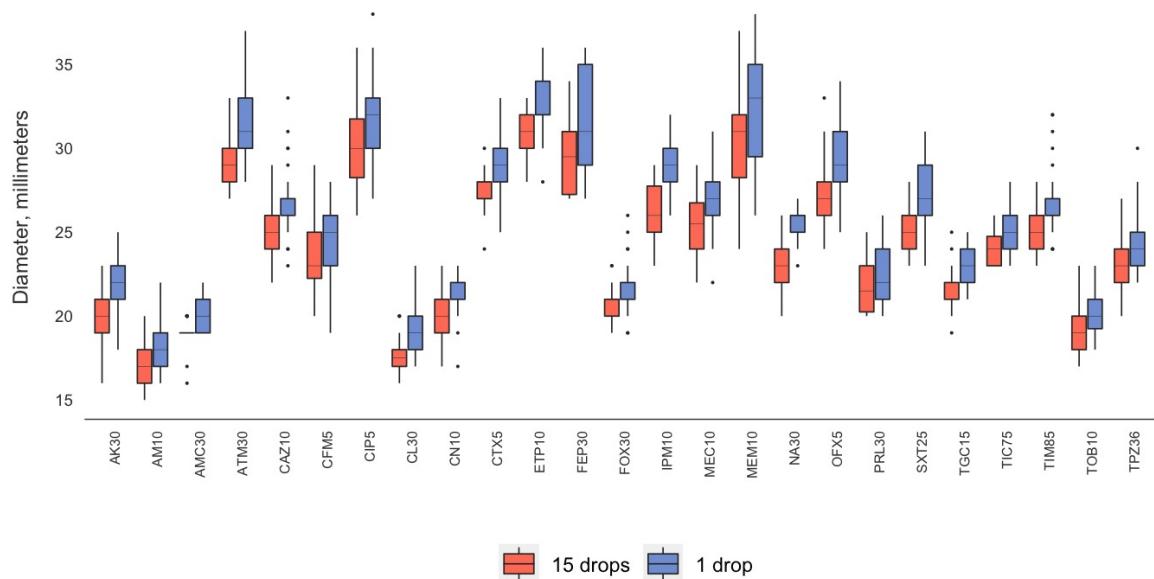
223 Of the 1000 inhibition diameters studied in the repeatability study we had 79 diameters outside  
224 the acceptable diameter limits described in CA-SFM 2019 V1 for *E. coli* strain ATCC 25922. With  
225 20 out of bounds diameters for the MHR according to the 1D inoculum recommendations  
226 (BSAC) and 59 for the MHR according to the 15D inoculum recommendations (CA-SFM). The  
227 differences are significant with  $p < 0.001$  (chi2). Out-of-limit diameters were listed for cefoxitin,  
228 cefepime, imipenem and meropenem, quinolones and trimethoprim-sulfamethoxazole. (Fig.2)



229

230 Fig.2: Comparison of diameters obtained during repeatability. 1 drop for the BSAC  
231 recommendations and 15 drops for the CA-SFM recommendations. The boxplot shows the 25th  
232 and 75th percentile with a horizontal bar indicating the median. Whiskers represent the 5th  
233 and 95th percentile. Extreme values are shown with dots. AM10 = Amoxicillin 10  $\mu$ g, AMC30 = Amoxicillin-  
234 clavulanic acid 30  $\mu$ g, TIC75 = Ticarcillin 75  $\mu$ g, TIM85 = Ticarcillin-clavulanic acid 85  $\mu$ g, PRL30 = Piperacillin 30  $\mu$ g, TPZ36 = Piperacillin-  
235 tazobactam 36  $\mu$ g, MEC10 = Mecillinam 10  $\mu$ g, LC30 = Cefalexin 30  $\mu$ g, FOX30 = Cefoxitin 30  $\mu$ g, CFM5 = Cefixime 5  $\mu$ g, CTX5 = Cefotaxime 5  
236  $\mu$ g, CAZ10 = Ceftazidime 10  $\mu$ g, FEP30 = Cefepime 30  $\mu$ g, ATM30 = Aztreonam 30  $\mu$ g, ETP10 = Ertapenem 10  $\mu$ g, IPM10 = Imipenem 10  $\mu$ g,  
237 MEM10 = Meropenem 10  $\mu$ g, CN10 = Gentamicin 10  $\mu$ g, AK30 = Amikacin 30  $\mu$ g, TOB10 = Tobramycin 10  $\mu$ g, NA30 = Nalidixic acid 30  $\mu$ g, OFX5  
238 = Ofloxacin 5  $\mu$ g, CIP5 = Ciprofloxacin 5  $\mu$ g, SXT25 = Trimethoprim + sulfamethoxazole 25  $\mu$ g, TGC15 = Tigecycline 15  $\mu$ g.

239 Of the 1700 diameters studied in the reproducibility study, 145 diameters were outside the  
 240 acceptable diameter limits described in CA-SFM 2019 V1 for *E. coli* strain ATCC 25922. With  
 241 56 out of bounds diameters for the MHR according to the 1D inoculum recommendations  
 242 (BSAC) and 91 for the MHR according to the 15D inoculum recommendations (CA-SFM).  
 243 These differences are significant with  $p = 0.003$ . The antibiotics affected were amoxicillin,  
 244 cefoxitin, cefixime, cefepime, meropenem, quinolones and trimethoprim-sulfamethoxazole.  
 245 (Fig.3)



246  
 247 Fig.3: Comparison of diameters during reproducibility. 1 drop for BSAC recommendations and  
 248 15 drops for CA-SFM recommendations. The boxplot shows the 25th and 75th percentile with  
 249 a horizontal bar indicating the median. Whiskers represent the 5th and 95th percentile.  
 250 Extreme values are shown with dots. AM10 = Amoxicillin 10  $\mu$ g, AMC30 = Amoxicillin-clavulanic acid 30  $\mu$ g, TIC75 =  
 251 Ticarcillin 75  $\mu$ g, TIM85 = Ticarcillin-clavulanic acid 85  $\mu$ g, PRL30 = Piperacillin 30  $\mu$ g, TPZ36 = Piperacillin-tazobactam 36  $\mu$ g, MEC10 =  
 252 Mecillinam 10  $\mu$ g, LC30 = Cefalexin 30  $\mu$ g, FOX30 = Cefoxitin 30  $\mu$ g, CFM5 = Cefixime 5  $\mu$ g, CTX5 = Cefotaxime 5  $\mu$ g, CAZ10 = Ceftazidime 10  
 253  $\mu$ g, FEP30 = Cefepime 30  $\mu$ g, ATM30 = Aztreonam 30  $\mu$ g, ETP10 = Ertapenem 10  $\mu$ g, IPM10 = Imipenem 10  $\mu$ g, MEM10 = Meropenem 10  $\mu$ g,  
 254 CN10 = Gentamicin 10  $\mu$ g, AK30 = Amikacin 30  $\mu$ g, TOB10 = Tobramycin 10  $\mu$ g, NA30 = Nalidixic acid 30  $\mu$ g, OFX5 = Ofloxacin 5  $\mu$ g, CIP5 =  
 255 Ciprofloxacin 5  $\mu$ g, SXT25 = Trimethoprim + sulfamethoxazole 25  $\mu$ g, TGC15 = Tigecycline 15  $\mu$ g.

256  
 257 The number of diameters outside the acceptable limits were grouped between repeatability  
 258 and reproducibility in order to increase the size of the effectives per antibiotic and to identify  
 259 the antibiotics that were most significantly affected. No significant differences were observed

260 for amoxicillin, cefoxitin, cefixime, cefepime, imipenem, meropenem. A significant difference  
261 was observed for the quinolones (Nalidixic Acid, Ofloxacin and Ciprofloxacin) (Table 1).

262

263 Table 1: Comparison of the number of diameters outside the defined limits for *E. coli* strain  
264 ATCC 25922 as a function of 1 drop (BSAC) and 15 drop (CA-SFM) inoculation conditions on the  
265 MHR medium.

Antibiotic (n=54)	Value out of acceptable limits with 1 drop	Value out of acceptable limits with 15 drop	p
Amoxicillin	6	10	NS*
Cefoxitine	22	41	NS
Cefixime	6	2	NS
Cefepime	11	22	NS
Imipenem	1	4	NS
Meropenem	12	10	NS
Nalidixic acid	1	8	0,026
Ofloxacin	13	38	0,04
Ciprofloxacin	2	13	0,008
Trimethoprim-sulfamethoxazole	2	2	NS
Total	76	150	

266

267 \*= not significant. 1 drop for the BSAC recommendations and 15 drops for the CA-SFM  
268 recommendations

269 A comparison of reading diameters between the 1D and 15D recommendations was carried  
270 out by comparing averages. For repeatability a statistically significant difference was observed  
271 for all antibiotics with the exception of Amoxicillin-Clavulanic acid, Ticarcillin-Clavulanic acid,  
272 Cefixime, Ceftazidime, Gentamicin and Trimethoprim + Sulfamethoxazole. For reproducibility  
273 a statistically significant difference was observed for all antibiotics except amoxicillin,  
274 piperacillin, mecillinam, meropenem, gentamicin and ofloxacin.

275 For the use of the MHR, the results obtained by following the BSAC recommendations show  
276 fewer diameters outside the acceptable limits compared to the recommendations of the CA-  
277 SFM.

278 MHR vs. MH comparison on positive blood cultures

279 71 vials of positive monomicrobial blood cultures were collected during the study period from  
280 patients with sepsis. The bacteria identified were: *E. coli* (n=36), *K. pneumoniae* (n=15), *E.*  
281 *cloacae* (n=6), *P. mirabilis* (n=5), *S. marcescens* (n=4), *E. aerogenes* (n=2), *K. oxytoca* (n=2), *M.*  
282 *morganii* (n=1). The strains had a wild-type beta-lactam resistance profile for 46 of them, 15  
283 had penicillinase, 1 had a hyperproduced cephalosporinase, 1 had an acquired  
284 cephalosporinase and 8 had ESBL (Table 2).

285 Table 2: List of the different bacterial species in the study with their resistance profiles to beta-  
286 lactam antibiotics.

Identification	Number	Beta-lactam profile
<i>Escherichia coli</i>	36	17 Wild Type 2 Inhibitor-resistant TEM 4 High level penicillinase 8 Penicillinase 1 Plasmid cephalosporinase 4 Extended spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae (ESBL)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	12 Wild Type 3 ESBL
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	5 Wild Type 1 ESBL
<i>Proteus mirabilis</i>	5	4 Wild Type 1 Penicillinase 3 Wild Type
<i>Serratia marcescens</i>	4	1 Hyperproduction of the chromosomal cephalosporinase (AmpC)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	2 Wild Type
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2 Wild Type
<i>Morganella morganii</i>	1	1 Wild Type

287 288 These 71 vials of blood cultures allowed us to test 1775 combinations (25 antibiotics x 71). On  
289 these combinations we had 7 mistakes. 1 minor error for trimethoprim-sulfamethoxazole, 5  
290 Major Error for quinolones (4 Major Error for ciprofloxacin and 1 for ofloxacin) and 1 Very Major  
291 Error for trimethoprim-sulfamethoxazole (Table 3). These discrepancies were confirmed in the  
292 E-test.

293 294 The MHR medium thus shows 99.6% concordance with the MH medium. These results  
295 therefore showed an excellent clinical categorization correlation between MHR-SIR diameters  
and the standard method.

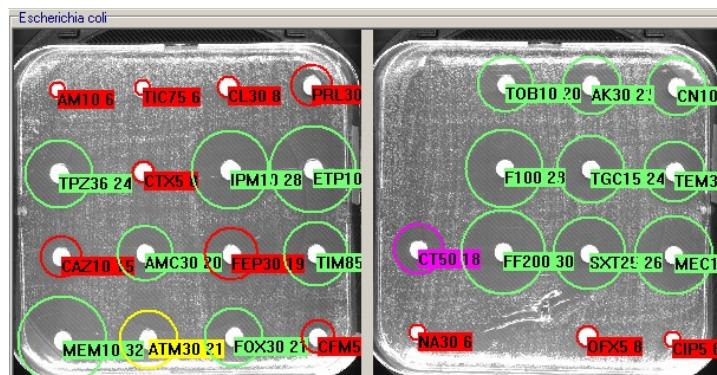
296

297 Table 3: Errors in the categorization of antibiotics of the MHR versus the MH medium

Species	Mistake		
	MHR Minor	MHR Major	MHR VME
<i>Escherichia coli</i>	Trimethoprim-sulfamethoxazole		
<i>Serratia marcescens</i>		Ciprofloxacin	
<i>Escherichia coli</i>		Ciprofloxacin	
<i>Escherichia coli</i>		Ciprofloxacin	
<i>Escherichia coli</i>		Ciprofloxacin	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Oflloxacin	Trimethoprim-sulfamethoxazole

298

299 Since the reading of MHR antibiograms is always performed using the SIR-scan interface, we  
 300 report a difficult visualization of ESBL synergies with the MH medium due to the fine growth  
 301 frequently found on MHR agar (Fig.4). Out of the 8 ESBL, there was only one ESBL where we  
 302 did not manage to visualize the synergies.

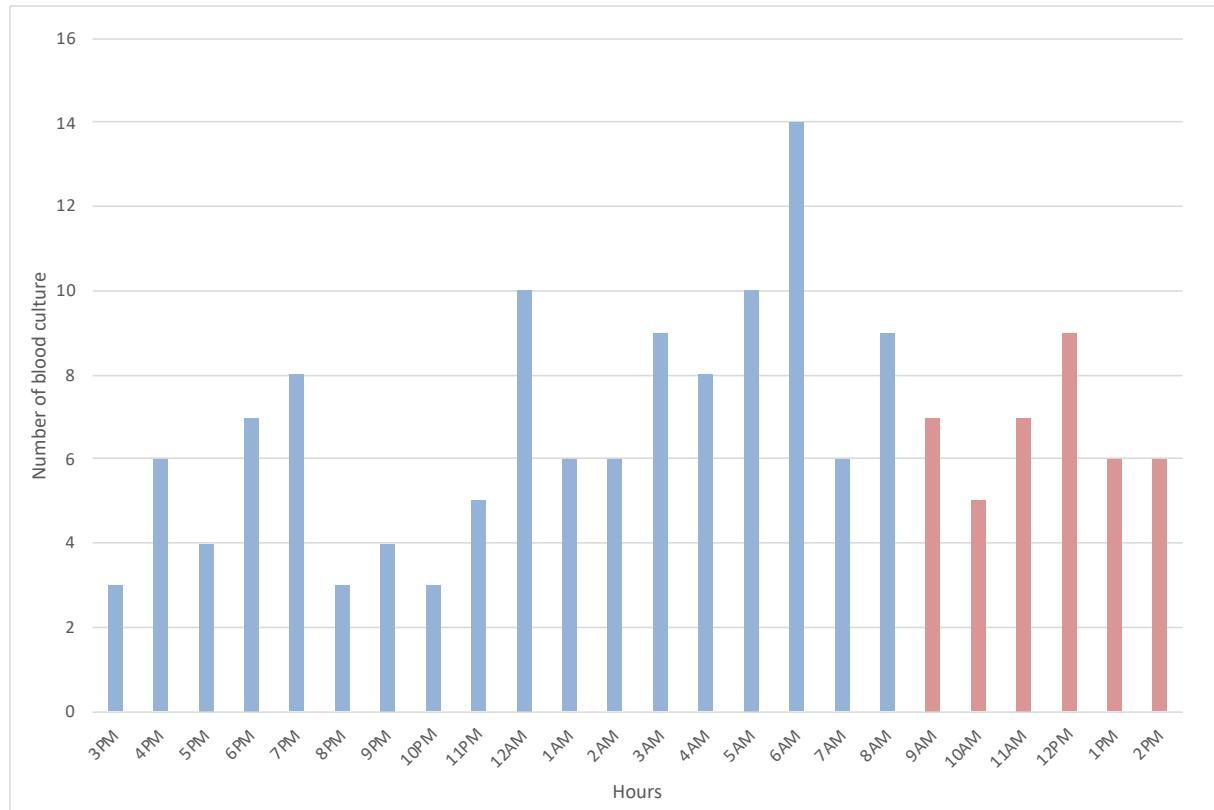


303

304 Fig.4: *E. coli* ESBL on MHR medium with a 7-hour reading from a blood culture bottle.

305 Estimated reduction in antibiotic susceptibility testing turnaround time by using direct MHR  
 306 from positive blood cultures.

307 During the period of July 1, 2017 to October 31, 2017 we had 161 positive blood cultures with  
 308 monobacterial enterobacteria. 121 blood cultures were positive between 3PM and 8:30AM. 43  
 309 between 3 PM and 00:00 and 78 between 00:00 and 8:30AM (Fig.5).

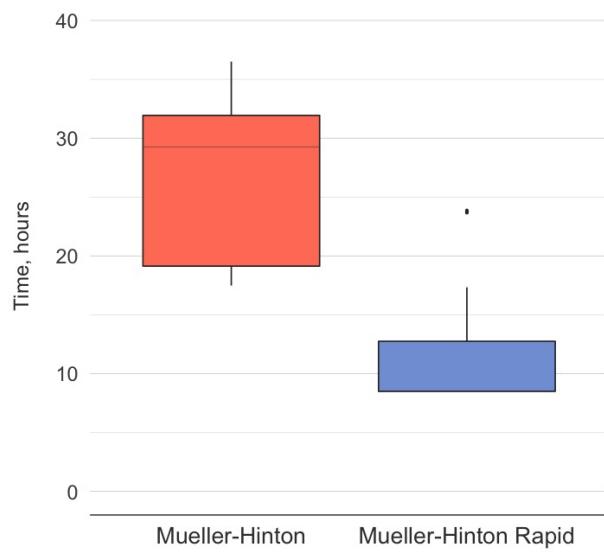


310

311 Fig.5: Distribution of the number of positive blood cultures as a function of time of the day. In  
 312 blue are the blood cultures that can benefit from a reduction in delay in case of reduction of  
 313 the MHR and in red are the blood cultures that do not.

314 The MHR system allows the antibiogram to have a turnover time of 8.5 hours for all positive  
 315 blood cultures between 00:00 and 8:30AM, i.e. 48.5% of the blood cultures in our study  
 316 (78/161) and in less than 17.5 hours for all positive blood cultures between 3PM and 00:00, i.e.  
 317 26.7% of the blood cultures in our study (43/161). The MHR allows a time reduction for 75.1%  
 318 of all blood cultures.

319 The average time required for the final rendering of the antibiogram with the MH medium is  
 320 27 hours with a minimum time of 17 hours and 30 minutes and a maximum time of 36 hours  
 321 and 30 minutes. For the theoretical use of the MHR the average time is 10 hours and 50 minutes  
 322 with a minimum time to obtain a validated antibiogram of 8 hours and 30 minutes and a  
 323 maximum time of 23 hours and 52 minutes (Fig. 6). On the average we have a 16-hour reduction  
 324 in the turnover time to get an antibiogram.



325

326 Fig.6: Time required to obtain the direct antibiogram from a blood culture vial for the MHR  
 327 and for the MH. Boxplots show the 25th and 75th percentile with the horizontal bar showing  
 328 the median. Whiskers show the 5th and 95th percentile. The outliers are represented by dots.

329 Discussion

330

331 In this work we have shown that the MHR was comparable to the standard method with the  
332 benefit of a shortened incubation period of 7 hours +/- 30 minutes. This agar thus allows a  
333 significant reduction in the incubation time of the antibiogram with an excellent concordance  
334 with the method routinely performed in the laboratory. This result confirms the study that was  
335 already carried out on the blood culture bottles<sup>16</sup>. This medium is therefore in addition to the  
336 current techniques for rapid phenotypic identification from a positive blood culture vial<sup>9</sup> with  
337 low cost, good reproducibility and a simple adaptation within the laboratory workflow.

338 For the first time on the MHR medium we compared the inoculum recommendations of the  
339 BSAC<sup>14</sup> vs CA-SFM<sup>15</sup> with less disagreement in favor of the inoculum proposed by BSAC. Several  
340 methods are described to inoculate an antibiogram directly from a positive blood culture, but  
341 there is currently no consensus on any of them<sup>17-19</sup>. Studies seeking to standardize inoculum  
342 recommendations have failed to find the perfect inoculum<sup>20</sup>. The recommendations are  
343 therefore often national. Our result is in favour of using the MHR medium following the BSAC  
344 recommendations despite the incrementation in the EUCAST of the ATU which is supposed to  
345 absorb variations due to a difference in inoculum<sup>21</sup>. The ATU relates to areas of technical  
346 uncertainty. The aim is to minimise systemic and random variation so as to not compromise  
347 the reproducibility of the tests.

348 Here, two sources of variation can explain the difference observed between the CA-SFM and  
349 BSAC recommendations. Firstly, the CA-SFM diameter was significantly reduced for the  
350 majority of antibiotics, related to the use of a larger initial inoculum. Second, the use of two  
351 different media to dilute the blood culture, saline for CA-SFM and sterile water for BSAC may  
352 have an impact on the bacterial culture as shown in an earlier study<sup>22</sup>.

353 Direct identification of blood cultures and performing antibiotic susceptibility testing 24/7<sup>23</sup>,  
354 associated with the reading of antibiograms from 8:30AM to 5:00PM. are technical and  
355 organizational adaptations that allow a faster rendering of the antibiogram. Direct  
356 identification from a positive blood culture bottle allows a gain of 12 to 24 hours compared to  
357 identification by bacterial culture<sup>9</sup>. In addition to this time saving, the 24/7 opening allows a

358 reduction of 3.4 hours from venous sampling to incubation in the automated device and 10.4  
359 hours on the adaptation of the antibiotic therapy<sup>24</sup>.

360 The average time saved from the MHR compared to the standard method was 16 hours as  
361 shown in the recent study of the MHR medium<sup>13</sup>. At the Nice University Hospital, the direct  
362 identification of 96%<sup>10</sup> of enterobacteria from blood culture vials, coupled with a rendering of  
363 the majority of antibiograms in less than 8.5 hours, would make it possible to reduce the length  
364 of hospitalisation<sup>3</sup>, complications and hospital mortality<sup>2</sup>.

365 The mobile infectiology team available from 8:30AM to 6:30PM allows it to be possible to make  
366 the link between the rapid rendering of resistance phenotypes and the adaptation of antibiotic  
367 therapy for the patient<sup>25</sup>.

368 Thanks to the implementation of the MHR we will allow a gain in the turnover time of the  
369 antibiogram for 75.1% of blood cultures with an average theoretical gain of 16 hours. This gain  
370 is to be reviewed according to human factors and the organization of work in our laboratory.  
371 Indeed, the MHR workflow should allow biological validation as soon as the MHR is available  
372 (between 8:30AM and 5PM) but a delay linked to the availability of the microbiologist may exist.  
373 We bring here a precise explanation of the integration of this environment within a hospital  
374 microbiology laboratory, which was not achieved in the previous study.

375 The integration of the MHR environment within the laboratory workflow must comply with the  
376 criteria of the ISO 15189 standard.

377 The reading of the medium is performed by the SIR-scan computer interface (I2a), so there is  
378 no longer the possibility to use the calliper as an aid in case of difficulty to read diameters.  
379 Reading difficulty can therefore be observed when the image acquisition conditions are poor  
380 or when the boundaries between the inhibition zone and the push zone are poorly defined.

381 We add that synergistic ESBL images often proved difficult to interpret (Fig.4), so ESBL detection  
382 was done with the help of a decisional algorithm on the resistance phenotype. Confirmation of  
383 an ESBL was based on the presence of a <6mm diameter for ticarcillin associated with a  
384 cefoxitin sensitive for Group 1 and 2 enterobacteria when there was no co-resistance. If there  
385 was any doubt for Group 3 enterobacteria, MH agar with cloxacillin was performed with disc  
386 approximation.

387 We found a uniform fine growth throughout the agar, quite frequently, but without preventing  
388 the reading of the antibiograms. However, the MHR medium showed excellent agreement with  
389 the MH medium and allowed a shortening of the antibiogram turnover time. Moreover, this  
390 phenotypic method allows the study of the sensitivity to 25 antibiotics and the detection of  
391 cephalosporinase derepressions<sup>9</sup>.

392 Recently EUCAST has published specific diameters depending on incubation time and species  
393 for a reading on standard MH after 4, 6- or 8-hours incubation. For the development of this  
394 method EUCAST recommends taking 125µl from the blood culture bottle to be deposited  
395 directly on the agar and to incubate the plates for a maximum of 8 hours. The multiplication of  
396 reading diameters according to incubation time and species may compromise the use in  
397 microbiology laboratories. The integration of the MHR within the workflow will be easier and  
398 less constraining.

399

400 However, our study has several limitations. We have a small number of blood cultures on which  
401 direct MHR medium has been performed and our study is monocentric. Our bacterial sample  
402 represents a classic laboratory epidemiology and therefore has a low amount of ESBL bacteria  
403 and an absence of carbapenemase. A strain collection with carbapenemase and ESBL would  
404 allow further exploration of the limitations of the image acquisition system (SIR-scan). This  
405 study provides a reduction in theoretical delay that would need to be confirmed under the  
406 conditions of use of the MHR medium. The evaluation of the number of errors was not made  
407 on the number of resistant bacteria but on the total number of antibiotics tested.<sup>26</sup>.

408

409 **Conclusion and outlook**

410

411 Our results showed an excellent correlation between the two methods MH and MHR-SIR. This

412 method allows a rapid phenotypic identification, which was until now impossible.

413 The clinical microbiology laboratory of the Nice University Hospital is currently working on the

414 development of a strong cooperation with the infectiology department which will allow an

415 early adaptation of the antibiogram. Associated with this cooperation, an antibiotic advice will

416 be directly integrated into the antibiotic susceptibility test in order to encourage clinicians to

417 adapt antibiotic therapy, particularly in patients with sepsis.

418 Bibliography

- 419 1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology  
420 of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit  
421 Care Med.* 2001;29(7):1303-1310. doi:10.1097/00003246-200107000-00002
- 422 2. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe  
423 sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1368-1377. doi:10.1056/NEJMoa010307
- 424 3. Shorr AF, Micek ST, Welch EC, Doherty JA, Reichley RM, Kollef MH. Inappropriate  
425 antibiotic therapy in Gram-negative sepsis increases hospital length of stay. *Crit Care Med.*  
426 2011;39(1):46-51. doi:10.1097/CCM.0b013e3181fa41a7
- 427 4. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections:  
428 a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest.* 1999;115(2):462-474.  
429 doi:10.1378/chest.115.2.462
- 430 5. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and  
431 Economic Impact of Bacteremia with Extended- Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing  
432 Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1257-1262.  
433 doi:10.1128/AAC.50.4.1257-1262.2006
- 434 6. Galar A, Leiva J, Espinosa M, Guillén-Grima F, Hernández S, Yuste JR. Clinical and economic  
435 evaluation of the impact of rapid microbiological diagnostic testing. *Journal of Infection.*  
436 2012;65(4):302-309. doi:10.1016/j.jinf.2012.06.006
- 437 7. de Kraker MEA, Jarlier V, Monen JCM, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The  
438 changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial  
439 Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(9):860-868. doi:10.1111/1469-  
440 0691.12028
- 441 8. Impact de l'ouverture du laboratoire de bactériologie 24h/24 sur la prise en charge des  
442 bactériémies, faculté de médecine de nice, 2018.
- 443 9. Dubourg G, Lamy B, Ruimy R. Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of  
444 bacterial bloodstream infections: meeting the challenge to reduce the time to result. *Clin Microbiol  
445 Infect.* 2018;24(9):935-943. doi:10.1016/j.cmi.2018.03.031
- 446 10. Simon L, Ughetto E, Gaudart A, Degand N, Lotte R, Ruimy R. Direct Identification of 80  
447 Percent of Bacteria from Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time  
448 of Flight Mass Spectrometry Using a 10-Minute Extraction Protocol. *J Clin Microbiol.* 2019;57(2).  
449 doi:10.1128/JCM.01278-18
- 450 11. Vlek ALM, Bonten MJM, Boel CHE. Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization  
451 Time-of-Flight Mass Spectrometry Improves Appropriateness of Antibiotic Treatment of Bacteremia.  
452 *PLoS One.* 2012;7(3). doi:10.1371/journal.pone.0032589
- 453 12. Huang T-D, Melnik E, Bogaerts P, Evrard S, Glupczynski Y. Evaluation of the ePlex Blood  
454 Culture Identification Panels for Detection of Pathogens in Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol.*  
455 2019;57(2). doi:10.1128/JCM.01597-18
- 456 13. Pilmiss B, Thy M, Diep J, et al. Clinical impact of rapid susceptibility testing on MHR-SIR

- 457 directly from blood cultures. *J Antimicrob Chemother*. Published online August 3, 2019.  
458 doi:10.1093/jac/dkz271
- 459 14. British society for antimicrobial chemotherapy, Version 12 May 2013. [http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013\\_final.pdf](http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013_final.pdf)
- 460 15. CA-SFM / EUCAST 2019. [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASF2019\\_V1.0.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASF2019_V1.0.pdf)
- 461 16. Périllaud-Dubois C, Pilmiss B, Diep J, et al. Performance of rapid antimicrobial susceptibility  
462 testing by disk diffusion on MHR-SIR agar directly on urine specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect*  
463 *Dis*. 2019;38(1):185-189. doi:10.1007/s10096-018-3413-5
- 464 17. Coyle MB, McGonagle LA, Plorde JJ, Clausen CR, Schoenknecht FD. Rapid antimicrobial  
465 susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk  
466 diffusion tests. *J Clin Microbiol*. 1984;20(3):473-477.
- 467 18. Doern GV, Scott DR, Rashad AL, Kim KS. Evaluation of a direct blood culture disk diffusion  
468 antimicrobial susceptibility test. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981;20(5):696-698.
- 469 19. Wegner DL, Mathis CR, Neblett TR. Direct Method to Determine the Antibiotic Susceptibility  
470 of Rapidly Growing Blood Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;9(5):861-862.
- 471 20. Fay D, Oldfather JE. Standardization of direct susceptibility test for blood cultures. *J Clin*  
472 *Microbiol*. 1979;9(3):347-350.
- 473 21. Jonasson E, Matuschek E, Kahlmeter G. The EUCAST rapid disc diffusion method for  
474 antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. *J Antimicrob*  
475 *Chemother*. 2020;75(4):968-978. doi:10.1093/jac/dkz548
- 476 22. Sherman JM, Holm GE, Albus WR. Salt Effects in Bacterial Growth. *J Bacteriol*.  
477 1922;7(6):583-588.
- 478 23. Eveillard M, Lemarié C, Cottin J, et al. Assessment of the usefulness of performing bacterial  
479 identification and antimicrobial susceptibility testing 24 h a day in a clinical microbiology laboratory.  
480 *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(8):1084-1089. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03044.x
- 481 24. Chirio D, Ruimy R. The clinical impact of an around the clock processing of blood cultures.
- 482 25. Morency-Potvin P, Schwartz DN, Weinstein RA. Antimicrobial Stewardship: How the  
483 Microbiology Laboratory Can Right the Ship. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(1):381-407.  
484 doi:10.1128/CMR.00066-16
- 485 26. Jorgensen JH. Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system. *Journal of*  
486 *Clinical Microbiology*. 1993;31(11):2841-2844. doi:10.1128/JCM.31.11.2841-2844.1993
- 487
- 488
- 489
- 490

## Bibliographie

1. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti J-J, Tattevin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Front Microbiol.* 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00697
2. Torio CM, Andrews RM. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief #160. In: *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs*. Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2006. Accessed May 9, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169005/>
3. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1303-1310. doi:10.1097/00003246-200107000-00002
4. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med.* 2013;41(5):1167-1174. doi:10.1097/CCM.0b013e31827c09f8
5. Iwashyna TJ, Cooke CR, Wunsch H, Kahn JM. The Population Burden of Long-Term Survivorship after Severe Sepsis Among Older Americans. *J Am Geriatr Soc.* 2012;60(6):1070-1077. doi:10.1111/j.1532-5415.2012.03989.x
6. Rhee C, Gohil S, Klompa M. Regulatory Mandates for Sepsis Care — Reasons for Caution. *N Engl J Med.* 2014;370(18):1673-1676. doi:10.1056/NEJMp1400276
7. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.* 2013;41(2):580-637. doi:10.1097/CCM.0b013e31827e83af
8. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1368-1377. doi:10.1056/NEJMoa010307
9. Liu VX, Fielding-Singh V, Greene JD, et al. The Timing of Early Antibiotics and Hospital Mortality in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017;196(7):856-863. doi:10.1164/rccm.201609-1848OC
10. Impact de l'ouverture du laboratoire de bactériologie 24h/24 sur la prise en charge des bactériémies, faculté de médecine de nice, 2018.
11. Simon L, Ughetto E, Gaudart A, Degand N, Lotte R, Ruimy R. 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). doi:10.1128/JCM.01278-18
12. Shorr AF, Micek ST, Welch EC, Doherty JA, Reichley RM, Kollef MH. Inappropriate antibiotic therapy in Gram-negative sepsis increases hospital length of stay. *Crit Care Med.* 2011;39(1):46-51. doi:10.1097/CCM.0b013e3181fa41a7

13. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest*. 1999;115(2):462-474. doi:10.1378/chest.115.2.462
14. Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Kaye KS, Ben-Ami R, Schwartz D, Carmeli Y. Clinical and Economic Impact of Bacteremia with Extended- Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(4):1257-1262. doi:10.1128/AAC.50.4.1257-1262.2006
15. Galar A, Leiva J, Espinosa M, Guillén-Grima F, Hernández S, Yuste JR. Clinical and economic evaluation of the impact of rapid microbiological diagnostic testing. *Journal of Infection*. 2012;65(4):302-309. doi:10.1016/j.jinf.2012.06.006
16. de Kraker MEA, Jarlier V, Monen JCM, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(9):860-868. doi:10.1111/1469-0691.12028
17. 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*. 2018;24(9):935-943. doi:10.1016/j.cmi.2018.03.031
18. Vlek ALM, Bonten MJM, Boel CHE. Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Improves Appropriateness of Antibiotic Treatment of Bacteremia. *PLoS One*. 2012;7(3). doi:10.1371/journal.pone.0032589
19. Huang T-D, Melnik E, Bogaerts P, Evrard S, Glupczynski Y. Evaluation of the ePlex Blood Culture Identification Panels for Detection of Pathogens in Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol*. 2019;57(2). doi:10.1128/JCM.01597-18
20. Pilmiss B, Thy M, Diep J, et al. Clinical impact of rapid susceptibility testing on MHR-SIR directly from blood cultures. *J Antimicrob Chemother*. Published online August 3, 2019. doi:10.1093/jac/dkz271
21. British society for antimicrobial chemotherapy, Version 12 May 2013. [http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013\\_final.pdf](http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-12-Apr-2013_final.pdf)
22. CA-SFM / EUCAST 2019. [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASF2019\\_V1.0.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/CASF2019_V1.0.pdf)
23. Périllaud-Dubois C, Pilmiss B, Diep J, et al. Performance of rapid antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion on MHR-SIR agar directly on urine specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(1):185-189. doi:10.1007/s10096-018-3413-5
24. Coyle MB, McGonagle LA, Plorde JJ, Clausen CR, Schoenknecht FD. Rapid antimicrobial susceptibility testing of isolates from blood cultures by direct inoculation and early reading of disk diffusion tests. *J Clin Microbiol*. 1984;20(3):473-477.
25. Doern GV, Scott DR, Rashad AL, Kim KS. Evaluation of a direct blood culture disk diffusion antimicrobial susceptibility test. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981;20(5):696-698.
26. Wegner DL, Mathis CR, Neblett TR. Direct Method to Determine the Antibiotic Susceptibility

- of Rapidly Growing Blood Pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;9(5):861-862.
27. Fay D, Oldfather JE. Standardization of direct susceptibility test for blood cultures. *J Clin Microbiol*. 1979;9(3):347-350.
28. 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*. 2020;75(4):968-978. doi:10.1093/jac/dkz548
29. Sherman JM, Holm GE, Albus WR. Salt Effects in Bacterial Growth. *J Bacteriol*. 1922;7(6):583-588.
30. Eveillard M, Lemarié C, Cottin J, et al. Assessment of the usefulness of performing bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing 24 h a day in a clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(8):1084-1089. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03044.x
31. Chirio D, Ruimy R. The clinical impact of an around the clock processing of blood cultures.
32. Morency-Potvin P, Schwartz DN, Weinstein RA. Antimicrobial Stewardship: How the Microbiology Laboratory Can Right the Ship. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(1):381-407. doi:10.1128/CMR.00066-16
33. Jorgensen JH. Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31(11):2841-2844. doi:10.1128/JCM.31.11.2841-2844.1993