



Thèse

2018

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

Sepsis néonatal: quelle est la place de la PCR/ESI-MS dans le processus diagnostic?

Delco, Cristina Maria

How to cite

DELCO, Cristina Maria. Sepsis néonatal: quelle est la place de la PCR/ESI-MS dans le processus diagnostic? Doctoral Thesis, 2018. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:111722

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:111722>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:111722](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:111722)



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DE MÉDECINE
Secrétariat des étudiants



DOCTORAT EN MEDECINE

Thèse de :

Cristina DELCO VOLONTE

originaire de Lugano (TI)

Intitulée :

Sepsis néonatal : quelle est la place de la PCR/ESI-MS dans le processus diagnostique ?

La Faculté de médecine, sur le préavis du Comité directeur des thèses, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 12 novembre 2018

Thèse n° 10904

Henri Bounameaux

Doyen

N.B. - La thèse doit porter la déclaration précédente et remplir les conditions énumérées dans les "Informations relatives à la présentation des thèses de doctorat à l'Université de Genève".

Sepsis néonatal: quelle est la place de la PCR/ESI-MS dans le processus diagnostic?

Cristina Delcò Volonté

Directeur de thèse

Dr Oliver Karam

Co-directrice de thèse

Prof. Klara Posfay Barbe

Table des matières

Introduction	3
Sepsis et morbidité.....	3
Définition clinique de sepsis	4
Sepsis et marqueurs sanguins.....	5
Sepsis et utilisation d'antibiotiques empiriques	6
Mise en évidence de la bactériémie	8
Sensibilité et spécificité des hémocultures.....	10
Nouvelle technologie de détection des microorganismes.....	11
Utilisation de PCR/ESI-MS en clinique	12
Discussion	13
Perspectives futures.....	21
Conclusion	22
Annexe 1	23
Annexe 2	24
References	25

Introduction

Le sepsis néonatal est une affection fréquente : on estime qu'il touche jusqu'à 3 millions de nouveau-nés dans le monde chaque année.[1] Le sepsis néonatal est non seulement une affection fréquente, mais il s'agit également d'une pathologie lourde de conséquences, son taux de mortalité étant entre 20 et 40%.[2] L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime les décès néonataux annuels à 4 millions, dont un quart serait imputable à un sepsis.[3]

Dans la population des enfants prématurés, cette pathologie est encore plus fréquente. En effet, environ 1.5% des prématurés pesant moins de 1500g à la naissance (« very low birth weight », VLBW) souffrira d'un sepsis survenant durant les premières 72h de vie (« early onset sepsis », EOS) [4] et 25% d'un sepsis survenant après les premières 72h de vie (« late onset sepsis », LOS).[5] Ce chiffre s'élève à 46% chez les prématurés nés avant 25 semaines d'aménorrhée (SA).[4]

Sepsis et morbidité

Le sepsis est également une cause importante de morbidité pour les nouveau-nés prématurés. Il est associé, par exemple, à des hospitalisations plus longues.[6] Il est également corrélé à une incidence plus importante des durées de ventilation mécanique, de dysplasie broncho-pulmonaire et d'hémorragie cérébrale.[7, 8] De plus, de nombreuses études ont mis en évidence la relation entre un sepsis et l'atteinte neuro-développementale à long terme. L'une d'entre elles est une étude de cohorte multicentrique suisse. Elle a été menée entre 2000 et 2007 et a évalué le devenir neuro-développemental à 18-24 mois de prématurés nés avant 28 SA. Parmi les 541 prématurés inclus, 136 (25%) avaient un sepsis prouvé (définie comme ayant une hémoculture et/ou une culture de liquide céphalorachidien positive), 169 (31%) avaient une suspicion de sepsis (défini par une clinique et/ou une biologie compatible avec un sepsis et une antibiothérapie de ≥ 5 jours malgré des cultures stériles) et 236 (44%) n'avaient pas de signes d'infection. Les résultats sont significatifs : 10% des nouveau-nés avec un sepsis prouvé comparé à 4% des enfants non infectés ont développé une infirmité motrice cérébrale (rapport de côtes ou odds ratio [OR]: 2.90 [95% intervalle de confiance (CI): 1.22– 6.89]; $P=.016$). Les enfants infectés avaient aussi presque deux fois plus de risque de retard global du développement (OR: 1.85 [95% CI: 1.12– 3.05]; $P=.016$). Les auteurs ont également effectué une analyse multi-variée en intégrant d'autres facteurs de risque de mauvais pronostic neurologique qui pourraient expliquer ce résultat. Cette analyse multi-variée a confirmé que les enfants avec un sepsis prouvé avaient 3 fois plus de risque de souffrir d'une infirmité motrice cérébrale (OR : 3.23 [95% CI: 1.23-8.48]; $P=.017$) comparé aux nouveau-nés n'ayant pas souffert d'infection. Les auteurs rappellent d'ailleurs que le sepsis est parmi les 4 facteurs principaux influençant le devenir neurologique à long terme, en plus de la dysplasie broncho-pulmonaire, les lésions cérébrales et la rétinopathie.[9]

Une autre étude menée sur les enfants nés à moins de 30 SA a évalué le score de développement (échelle de Bayley) à 12 mois d'âge corrigé et a montré que le LOS est en effet un facteur prédictif indépendant de mauvais pronostic. Il augmente de presque 3 fois le risque de retard moteur et mental (OR: 2.98 [95% CI: 1.09-8.14]; P=.017).[10] Finalement, une étude de cohorte multicentrique conduite sur 6093 enfants pesant moins de 1000g à la naissance (« extremely low birth weight », ELBW) a voulu évaluer l'impact d'une infection en période néonatale sur le développement à 18 mois d'âge corrigé. Les 3932 enfants ayant souffert d'un sepsis avaient un plus mauvais pronostic neuro-développemental avec notamment plus d'infirmité motrice cérébrale (OR: 1.4 [95% CI: 1.1-1.8]), des scores de développement mental (évalué par l'échelle de Bayley) (OR: 1.3 [95% CI: 1.1-1.6]), et psychomoteur (OR: 1.5 [95% CI: 1.2-1.9]) plus bas et une augmentation des déficits visuels (OR: 1.7 [95% CI: 1.3-2.2]). Il faut quand même mentionner que, dans cette étude, ces enfants infectés étaient plus immatures, plus petits en poids de naissance et étaient plus exposés à une corticothérapie post-natale. Ces facteurs peuvent, indépendamment, influencer le pronostic.[11] Le diagnostic rapide de l'infection est donc impératif afin de débiter au plus vite les traitements adéquats (les antibiotiques) et éviter ces complications graves.

Définition clinique de sepsis

Cependant, le diagnostic d'une infection bactérienne chez le nouveau-né est un défi. Tout d'abord du point de vue clinique : en effet la définition du sepsis a été créée et validée par un panel d'expert de médecine adulte. Puis, cette définition a été modifiée et adaptée à la population pédiatrique et aux nouveau-nés par la « International Pediatric Sepsis Consensus Conference » et publiée en 2005 (cf tableau joint en annexe).[12] Néanmoins, l'application et l'emploi de cette définition pour les enfants prématurés est problématique. On note par exemple qu'elle exige l'utilisation de variations des signes vitaux (fréquence cardiaque ou fréquence respiratoire). Pour les enfants les plus prématurés, il est difficile d'établir des fourchettes de normalité de ces paramètres.[2] La définition repose aussi sur des normes de température et ce paramètre non plus n'est pas adapté à notre population. En effet, non seulement la fièvre est exceptionnelle dans ce groupe de patients, mais en plus la température du prématuré est maintenue de façon artificielle par les incubateurs. Une étude prospective multicentrique menée sur 2416 VLBW avait pour but de déterminer la présentation clinique du sepsis chez le prématuré. Ces enfants présentaient principalement une augmentation des événements de type apnées (55%), une intolérance alimentaire, une distension abdominale ou du sang dans les selles (43%), une dégradation respiratoire (29%), une léthargie ou hypotonie (23%).[7] Les auteurs n'ont pas identifié l'hyperthermie comme variable d'intérêt.

En résumé, en cas de sepsis, le nouveau-né souffrira plutôt de détérioration globale de l'état général et d'autres symptômes aspécifiques évoquant un très large diagnostic différentiel comme l'entérocolite nécrosante (NEC), une pathologie du système nerveux central (comme l'hémorragie cérébrale) ou des perturbations métaboliques rendant

l'utilisation d'une définition classique du sepsis inutilisable chez les (grands) prématurés.

Sepsis et marqueurs sanguins

On peut alors se demander si on peut s'appuyer sur certains paramètres paracliniques pour diagnostiquer le sepsis. Effectivement, ces dernières années ont vu l'émergence d'une multitude d'études s'intéressant à l'utilisation de marqueurs infectieux. Meem et al, et plus récemment Sharma et al, ont publié une revue de la littérature à ce sujet.[13, 14] Comme attendu, le marqueur le plus extensivement étudié est la protéine C réactive (CRP). Ce paramètre est actuellement le plus fréquemment utilisé dans de nombreuses unités de soins intensifs néonataux, malgré le fait qu'il n'est pas idéal.[15] En effet, il s'élève tardivement après le début de l'infection (6-18 heures) et reste élevé longtemps avec un pic entre 8h et 60h plus tard.[16, 17] Il faut mentionner également que la CRP est aspécifique, s'élevant suite à de nombreux événements périnataux (aspiration de liquide méconial, chirurgie, hémorragie cérébrale, asphyxie, administration de surfactant pour en citer quelques un).[18, 19] Une autre molécule qui semblait prometteuse est la procalcitonine (PCT), une pro-hormone de la calcitonine. La PCT présente l'avantage de s'élever précocement lors de l'infection (2-4h) et semble être un marqueur plus discriminant de l'infection bactérienne. Comme les infections virales ou fongiques font aussi parfois augmenter la PCT, ce test est surtout utile pour exclure une infection.[20, 21] Ces propos sont cependant à tempérer par l'existence d'un pic physiologique néonatal survenant durant les premiers jours de vie. Cette élévation transitoire s'accompagne d'un retour progressif aux valeurs normales entre le 2ème et le 5ème jour. De plus, la PCT, comme la CRP, est peu spécifique car elle peut augmenter dans d'autres circonstances comme certaines pathologies néonatales sévères non infectieuses (détresse respiratoire, asphyxie), après l'administration de surfactant ou chez le nouveau-né de mère diabétique.[22] En conclusion concernant la PCT, son dosage semble d'intérêt limité à cette période de la vie du fait essentiellement d'un pic physiologique rendant difficile la définition d'une valeur seuil précise et fixe et de l'existence de faux positifs et négatifs. D'autres marqueurs, seuls ou en association, ont été plus ou moins largement étudiés. Nous pouvons mentionner les cytokines comme les interleukines (IL)-6 [23-26], IL-8 [27, 28] ou IL-10 [29] ou le tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) [30]. Certains antigènes de surface, comme le CD64, ont également motivé des travaux de recherche.[31, 32] Le CD64 est avant tout un récepteur considéré comme spécifique des monocytes/macrophages mais présent également en faible quantité sur la membrane des neutrophiles non activés. Son expression augmente après contact avec des bactéries. Dilli et al ont voulu étudier la sensibilité et la spécificité de cet antigène (seul ou en association avec la CRP et l'IL-6) dans le diagnostic du sepsis néonatal. Ils ont mené une étude prospective observationnelle sur 109 nouveau-nés (de 32 semaines d'aménorrhée d'âge moyen) qu'ils ont divisé en trois catégories : septiques, malades, mais sans infection (donc souffrant d'asphyxie, de détresse respiratoire ou d'autres pathologies non infectieuses) et sains. Ils ont ainsi comparé les valeurs des marqueurs infectieux dans ces 3 groupes de patients. Concernant le CD64, ils ont remarqué que son

expression était significativement augmentée chez les nouveau-nés avec un sepsis par rapport aux patients non infectés ou sains ($P=0.001$). La sensibilité du CD64 était de 88.6% et sa valeur prédictive négative de 94%.[33] Une autre étude a voulu déterminer l'utilité du CD64 en tant qu'outil de dépistage du LOS ou de la NEC. Ils ont effectué un dosage quotidien de ce marqueur chez 146 VLBW avec un total de 155 épisodes de suspicion de LOS/NEC. Effectivement, ils ont trouvé que le dosage quotidien du CD64 permettait le diagnostic de LOS/NEC un jour et demi avant leur présentation clinique. Malheureusement, un nombre non négligeable d'épisodes (63/155 soit 41%) était caractérisé par une élévation transitoire du CD64 chez des enfants complètement asymptomatiques, avec des bilans infectieux par ailleurs négatifs, enfants qui n'ont pas nécessité, par la suite, de traitement antibiotique.[34] Evidemment, ceci remet en question l'utilité de ce marqueur comme outil de dépistage, puisque son élévation a mené à 41% de bilans (donc 218 évaluations pour 155 épisodes) supplémentaires chez des enfants qui n'en auraient pas eu besoin.

En résumé, malheureusement, à l'heure actuelle, aucun examen complémentaire ne remplit de façon satisfaisante les critères pour devenir le marqueur idéal du sepsis néonatal et pour pouvoir être utilisé dans la pratique clinique quotidienne.

Sepsis et utilisation d'antibiotiques empiriques

En raison de la gravité de la pathologie, ainsi que de la difficulté diagnostique, les antibiotiques sont donc souvent débutés de façon empirique chez un nouveau-né symptomatique ou même seulement « à risque » d'infection.[35] Ils sont ensuite poursuivis jusqu'à réception des hémocultures (ou des cultures des autres liquides biologiques) qui sont, à l'heure actuelle, le gold standard pour diagnostiquer l'infection bactérienne.

Dans les pays développés, la majorité des nouveau-nés hospitalisés dans une unité de soins intensifs sera traitée pour une suspicion de sepsis au courant de son séjour. Aux Etats-Unis, selon le National Institute for Child Health and Human Development Neonatal Research Network, jusqu'à 50% des VLBW sont sous antibiotiques pendant > 5 jours alors que seuls 1.9% ont une infection prouvée par culture.[36]

D'un autre côté, les antibiotiques causent de multiples effets secondaires et complications bien documentées, certaines graves.[37, 38] Ils sont, par exemple, associés à la modification de la flore digestive pouvant contribuer à la pathogenèse de la NEC. Cette association (antibiotiques et NEC) a été rapportée par de nombreuses études. Par exemple, une étude cas-contrôle a examiné l'association entre l'utilisation d'antibiotiques et le risque de NEC. 124 cas de NEC ont été comparés à 248 contrôles (similaires pour âge gestationnel, poids de naissance et année de naissance). Les auteurs ont enregistré les facteurs de risque potentiels pour la NEC comme l'exposition à une corticothérapie anténatale, la détresse respiratoire, la présence d'un canal artériel, la prise alimentaire, l'exposition aux antibiotiques. La durée de l'antibiothérapie a été

calculée comme le nombre total de jours avec ce traitement avant le diagnostic de NEC. Chez des sujets avec des cultures stériles, chaque jour sous antibiotiques était associé à 20% de risque supplémentaire de développer une NEC. Après 1-2 jours l'OR était de 1.19 avec une augmentation progressive pour atteindre 2.94 après une exposition de 10 jours.[39]

Cotten et al ont mené une étude de cohorte rétrospective dans 19 centres, entre 1998 et 2001. Leur objectif était d'identifier les facteurs associés à l'utilisation précoce d'antibiotiques chez des ELBW avec des cultures stériles. Ils ont également analysé l'association entre la durée de cette antibiothérapie initiale et la survenue d'une NEC ou d'un décès. Etant donné que l'utilisation d'antibiotiques peut simplement indiquer quels sont les enfants plus sévèrement malades, eux-mêmes plus à risque des mauvaises issues, les auteurs ont effectué une analyse de sous-groupes selon la gravité de l'état du prématuré. Ils ont également corrélé cette analyse avec le centre de prise en charge et avec certains facteurs de susceptibilité (des facteurs maternels, l'âge gestationnel, le poids de naissance, l'adaptation à la naissance etc...), en faisant une analyse multi-variée additionnelle. Leurs données confirment tout d'abord que l'utilisation empirique d'antibiotiques est très fréquente dans cette population: 53% des 4039 ELBW inclus ont reçu une antibiothérapie débutée durant les 3 premiers jours de vie et poursuivie pendant plus que 5 jours malgré des cultures stériles. Ensuite, il apparaît que cette pratique n'est pas anodine. En effet une proportion significativement plus importante d'enfants avec une NEC ou décédés avait reçu une antibiothérapie initiale prolongée empirique (61 vs 51%). Ils ont calculé que chaque jour additionnel de ce traitement empirique était associé à une augmentation de 4% du risque de NEC ou de décès, ou de 16% de risque de décès. Le « number needed to harm », c'est-à-dire le nombre d'enfants à qui il aurait fallu administrer une antibiothérapie initiale empirique prolongée pour qu'un d'eux développe une NEC ou décède, était de seulement 22. Cette même étude a également mis en évidence une augmentation du risque de LOS ou de décès.

L'administration de plus que 4 jours d'antibiothérapie empirique était associée à une augmentation du risque combiné de LOS (causé par des germes autres que des Staphylocoques à coagulase négative(CoNS)) ou de décès (OR 1.32 (95% CI, 1.11-1.58)) dans les 120 jours après la naissance.[40]

L'association entre LOS et antibiothérapie empirique a également été retrouvée par Kuppala et al. Cette équipe a mené une étude sur 365 prématurés de ≤ 32 SA et ≤ 1500 g à la naissance. Leur objectif était d'investiguer les issues (notamment NEC, LOS et décès) après une administration précoce (durant la première semaine de vie) et prolongée (≥ 5 jours) d'antibiotiques. Ainsi, parmi les 365 prématurés, 36% avaient reçu des antibiotiques empiriquement durant > 5 jours la première semaine de vie et ceci était effectivement un facteur de risque indépendant pour le LOS (OR, 2.45 (95% CI 1.28-4.67)) et pour l'association LOS, NEC ou décès (OR 2.66 (95% CI 1.12-6.3)). A noter que les auteurs ont conduit une analyse multi-variée corrigée par rapport au poids de naissance, l'âge gestationnel, la race, la rupture prolongée des membranes, le nombre de jours de ventilation mécanique et la quantité de lait maternel administrée durant la

première semaine de vie. Ici aussi, chaque jour additionnel de traitement empirique était associé à une augmentation du risque de l'une de ces mauvaises issues.[41]

L'association entre utilisation d'antibiotiques empiriques à large spectre et colonisation à *Candida spp.* et donc de candidose invasive secondaire a également été démontrée. Une étude de cohorte sur 3702 ELBW a justement évalué la relation entre utilisation d'antibiothérapie et incidence de candidose invasive selon le centre de prise en charge. Il n'est pas surprenant d'apprendre que l'incidence de la candidose était très variable selon l'hôpital, oscillant entre 2% et 20%. Après analyse multi-variée, les auteurs ont remarqué que l'exposition à des antibiotiques à large spectre (essentiellement aux céphalosporines) durant la semaine précédant l'hémoculture était associée de façon significative à la candidose (OR 1.67).[42]

Pour terminer, à l'échelle de la santé publique, il n'est plus à démontrer que l'utilisation excessive d'antibiotiques promeut l'émergence de souches bactériennes résistantes, menant à des sérieux problèmes dans toute la population.[43, 44]

Il est donc impératif non seulement de diagnostiquer et traiter rapidement une infection bactérienne chez le nouveau-né, mais également de l'exclure le plus rapidement possible, afin d'arrêter les traitements inutiles et potentiellement dangereux.

Mise en évidence de la bactériémie

Actuellement, le « gold standard » pour le diagnostic du sepsis néonatal est la détection directe du pathogène dans une hémoculture. Les hémocultures souffrent malheureusement de nombreuses faiblesses qui font d'elles un gold standard sous-optimal.

Premièrement, le temps nécessaire pour obtenir un résultat varie entre 24 heures et plus de 5 jours : ceci retarde considérablement le diagnostic. Une étude rétrospective a voulu déterminer le « time to positivity » (TTP) des hémocultures néonatales en cas de sepsis suspecté ou prouvé. Le TTP était défini par les auteurs comme le temps s'écoulant entre l'inoculation du prélèvement (avec au minimum 1 ml de sang) dans la bouteille de culture et le signal d'alerte de positivité de l'appareil. Durant la période de l'étude, un système de détection automatique des échantillons positifs (BacT/Alert, Organon Teknica) a été utilisé. Les auteurs ont ainsi enregistré le TTP de tous les épisodes infectieux pendant environ 6 ans. Ils ont collecté 2916 cultures dont 15% étaient positives. Avec un TTP médian de 21h, 96% des cultures étaient positives à 72 heures. Ils ont également remarqué que le TTP était plus court pour les organismes dits Gram négatifs. Les auteurs suggéraient alors de restreindre le spectre des antibiotiques en se focalisant sur les germes dits Gram positifs chez les patients dont les cultures étaient négatives à 48h et d'arrêter tous les antibiotiques en cas de cultures stériles à 72h chez un enfant asymptomatique.[45] Dans la pratique de notre établissement, en cas de cultures stériles à 72h, nous réévaluons la nécessité du traitement antibiotique pour autant que le degré de suspicion d'infection clinique ou biologique soit faible.

Régulièrement, le problème se pose lorsque la situation (soit clinique, soit biologique) est ambiguë.

Deuxièmement, les hémocultures ont une mauvaise sensibilité. En effet, elles détectent difficilement les microorganismes à croissance fastidieuse (*Neisseria gonorrhoea*, *Campylobacter spp.*, par exemple), soit les bactéries qui se multiplient lentement ou qui nécessitent des milieux spécifiques pour se développer.

Troisièmement, chez le nouveau-né, une bactériémie de bas grade (soit la présence de < 10 colony forming units/ml, CFU/ml) n'est pas rare. Dans une série de 30 nouveau-nés avec une bactériémie à *Escherichia coli*, une bactériémie de haut grade (> 1000 CFU/ml) avait été trouvée dans 31% des cultures. Une proportion significative (23%) des cultures avait par contre un décompte de colonies bactériennes entre 0 et 4 CFUs/ml.[46] Un autre travail a été mené sur des enfants âgés de 0 à 15 ans, afin de déterminer la fréquence de ces bactériémies de bas grade. Dans cette population, 60% des cultures positives avaient une bactériémie ≤ 10 CFUs/ml.[47] Une grande étude a voulu documenter la fréquence de ces événements parmi 1589 nouveau-nés de 0 à 2 mois. Pour chaque enfant avec une suspicion de sepsis, ils ont cultivé 1.5 ml de sang et ont quantifié le nombre de colonies bactériennes retrouvées. 2.5% des enfants avaient une hémoculture positive dont 68% une bactériémie de bas grade.[48] Toutes les études suggèrent donc que le niveau de bactériémie chez les jeunes enfants peut parfois être bas et donc être plus difficile à détecter par les techniques standards. De plus, il semblerait, en effet, qu'en cas de CFU/ml entre 1 et 4, des volumes de sang inférieurs à 0.5 ml ne permettent pas de détecter les pathogènes circulants.[49-51] Il y a peu de données concernant l'effet du volume de sang sur le résultat des hémocultures néonatales. Globalement, afin d'en augmenter leur sensibilité, les laboratoires demandent 1-2 ml de sang pour la mise en culture.[52] Ceci représente une autre limitation de ce gold standard, car cette quantité de sang n'est pas négligeable chez un grand prématuré. Pour faire un exemple 2 ml de sang correspondent à 4% du volume circulant d'un enfant pesant 700 g, soit l'équivalent de 200 ml de sang chez un adulte de 70 kg. En plus, il n'est souvent pas facile d'obtenir du sang dans cette population de patients qui ont des accès veineux difficiles.

Quatrièmement, il ne faut pas oublier que les hémocultures souffrent également de faux négatifs, par exemple, si les antibiotiques sont débutés avant le prélèvement de sang pour l'hémoculture.[53] Dans notre population, nous sommes également confrontés à des faux négatifs lorsque la mère a reçu une antibiothérapie pendant le travail, ce qui empêche l'hémoculture du prématuré de se positiver.[49] En effet, en cas de femme porteuse de Streptocoque beta hémolytique du groupe B au niveau du col vaginal ou en présence d'autres facteurs de risque infectieux (par exemple, état fébrile maternel ou rupture prolongée des membranes), une antibiothérapie est administrée à la femme jusqu'à l'accouchement. Ce traitement a pour but d'empêcher l'infection du nouveau-né, mais parfois son efficacité sera insuffisante pour éliminer des germes imparfaitement

neutralisés. Ces micro-organismes seront ainsi présents chez l'enfant en petite quantité et seront donc difficiles à mettre en évidence, tout en étant capables, au bout d'un certain temps, de causer une infection néonatale.

Sensibilité et spécificité des hémocultures

Enfin, les hémocultures ont aussi des faux positifs rendant leur interprétation parfois difficile.[49] L'exemple le plus parlant est celui des cultures qui mettent en évidence des CoNS. Ces germes sont typiquement considérés comme non pathogènes et commensaux. Cependant, si une culture positive à CoNS chez un enfant venant de la communauté et précédemment en bonne santé est pratiquement toujours considérée comme une contamination, la situation est très différente chez les prématurés. Chez ceux-ci, les CoNS sont à l'origine d'événements septiques sévères peu bruyants, tant du point de vue clinique que biologique, ce qui rend le diagnostic plus difficile. Stoll et al ont publié une grande étude prospective sur ce sujet.[54] 6093 ELBW ont été catégorisés selon leur état infectieux (non infectés, infection clinique, sepsis, sepsis + NEC, méningite) et ont bénéficié d'une évaluation neuro-développementale à 18 mois. Comme attendu, la plus grande partie des prématurés (65%) avait souffert d'au moins une infection au courant du séjour. Comparés aux enfants non infectés, les enfants des autres catégories avaient des scores de développement plus mauvais. Curieusement, le type de germe n'avait pas d'influence ; en effet, les enfants ayant souffert d'un sepsis à CoNS avaient un plus mauvais outcome neuro-développemental. L'étude multicentrique suisse, que nous avons détaillée quelques paragraphes plus haut, trouve les mêmes conséquences neuro-développementales pour les prématurés ayant été diagnostiqués avec un sepsis à CoNS.[9] Nous sommes donc confrontés à des patients avec une clinique frustrante et non spécifique, des examens de laboratoire peu ou pas perturbés et des cultures positives pour un germe qui est habituellement un simple contaminant, mais potentiellement pathogène chez les prématurés, avec des conséquences à long terme.

Chez les adultes, plusieurs stratégies sont proposées afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité des hémocultures. Il est recommandé par exemple d'effectuer le prélèvement précocement lors de l'épisode septique. Pour détecter les bactériémies de bas grade, il est préconisé de prélever une quantité suffisante de sang (10-30 ml). Pour aider à différencier entre contamination et infection, en cas, par exemple, d'hémoculture positive, il est conseillé de prélever plusieurs bouteilles d'hémocultures durant le même épisode infectieux, par ponction périphérique et à travers un accès veineux central lorsque ce dernier est disponible.[55] On comprend aisément que ces procédés sont difficilement réalisables, voire non réalisables chez les nouveau-nés, spécialement les ELBW.

En résumé, les hémocultures ne sont pas un test diagnostique idéal pour notre population, puisque les résultats sont disponibles plusieurs jours après la suspicion de maladie. De plus, ces résultats sont parfois discutables, car ils ne détectent pas tous les germes et sont même potentiellement faussement rassurants.

Par conséquent, les cliniciens sont souvent obligés de se baser sur leur jugement clinique - variable selon l'expérience du clinicien - pour arrêter ou poursuivre les traitements et non sur les hémocultures considérées dans cette population comme un gold standard imparfait. Ceci mène à des antibiothérapies prolongées et, peut-être, non nécessaires (avec tous les effets secondaires connus), chez des enfants qui ont des cultures stériles.

Nouvelle technologie de détection des microorganismes

C'est dans ce contexte que de nouvelles technologies plus rapides, plus sensibles et nécessitant moins de sang ont vu le jour. L'une d'elles est une combinaison de techniques : la « Polymerase Chain Reaction » (PCR) associée à une ionisation par électronébuliseur et à une spectroscopie de masse, appelée PCR/ESI-MS (par exemple le IRIDICA®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA).[56-58]

Il s'agit d'une technologie associant une amplification par PCR à une ionisation par électronébuliseur et à une spectroscopie de masse (ESI-MS) qui permet l'identification de tous les germes circulants dans une petite quantité de sang et en peu de temps. Cette technologie peut être résumée comme suit : durant la première étape, l'appareil associe une lyse mécanique à une lyse chimique pour libérer le matériel génétique des germes présents dans le prélèvement de sang. Durant la deuxième étape, elle effectue une PCR qui amplifie les acides nucléiques des micro-organismes. Ces produits amplifiés par PCR sont appelés « amplicons ». Durant la troisième étape, l'appareil effectue une spectroscopie de masse. Cette technique permet de calculer le poids moléculaire de chaque amplicon. Une fois la masse moléculaire de l'amplicon établie, un logiciel prédit, grâce à un algorithme, sa composition nucléotidique. La dernière étape consiste en l'identification exacte du microorganisme. Ceci se fait grâce une base de donnée informatique (Ibis Bioscience), régulièrement mise à jour, qui contient la composition nucléotidique de > 750'000 microorganismes. Le logiciel compare donc la composition en nucléotides de l'amplicon avec les « signatures » contenues dans sa base de données et identifie le microorganisme. Il faut mentionner que l'appareil peut aussi identifier en plus un certain nombre de gènes de résistance aux antibiotiques (le gène *mecA* pour la résistance à la méthicilline, les gènes *vanA* et *vanB* pour la résistance à la vancomycine et le gène *bla_{kpc}* pour celle aux carbapénèmes). La sensibilité de détection de cette PCR/ESI-MS est estimée entre 5-320 CFU/ml (Abbott, données non publiées).

Les bénéfices de cette technologie sont multiples. Tout d'abord, elle est capable de reconnaître pratiquement tous les micro-organismes existants (bactéries, champignons et virus). En deuxième lieu, on peut émettre l'hypothèse que la détection d'ADN est plus sensible que la culture classique mesurant les CFUs puisqu'on peut détecter la présence d'ADN circulant. La machine reconnaît ainsi des petites quantités de germes (donc des bactériémies de bas grade), des bactéries non viables ou qui ne poussent pas dans les milieux standard. Troisièmement, tout le processus est extrêmement rapide puisqu'il est effectué de façon complètement automatisée en 6 heures seulement. Pour terminer, il semblerait que l'analyse peut être effectuée dans de très petits volumes de sang (0.2-0.5

ml). Ceci devra cependant être confirmé dans des études ultérieures. On comprend donc combien toutes ces caractéristiques rendent cette nouvelle technologie très attractive particulièrement pour notre population de prématurés.

Utilisation de PCR/ESI-MS en clinique

Un certain nombre d'études s'est déjà intéressé à ce nouveau procédé.

En 2013, une équipe espagnole a voulu tester la performance de la PCR/ESI-MS pour l'identification des pathogènes en cas de sepsis. Elle a inclus 175 patients adultes (247 échantillons) avec une suspicion de sepsis. De façon intéressante, afin de confirmer la capacité de ce nouveau test à identifier les germes, elle l'a d'abord testée sur les hémocultures. Pour chaque patient, l'équipe a comparé les résultats obtenus par PCR/ESI-MS avec le gold standard représenté par les hémocultures. La concordance globale entre les deux méthodes lors du test sur les hémocultures était de 94% avec une sensibilité de 97% et une spécificité de 98%, une valeur prédictive positive (VPP) de 95% et une valeur prédictive négative (VPN) de 98%. Ensuite, elle a testé la PCR/ESI-MS directement sur le sang des patients.[59] La même équipe a reconduit cette partie de l'étude prospective observationnelle avec un plus grand nombre de patients quelques années plus tard. Son objectif était le même, c'est-à-dire d'analyser la performance clinique de la PCR-ESI/MS. Elle a inclus 410 échantillons de patients adultes avec une suspicion de sepsis et comparé les résultats obtenus par hémoculture standard avec ceux obtenus par PCR-ESI/MS par rapport à l'échantillon et par rapport aux micro-organismes détectés. Les résultats entre les deux techniques concordaient dans 75% des cas pour les positifs et dans 79% des cas pour les négatifs. Il est intéressant de noter que, en cas de résultats divergents entre les deux tests, un microbiologiste et un clinicien devaient étudier, rétrospectivement, les histoires cliniques et biologiques de chaque patient en s'intéressant, par exemple, aux autres prélèvements effectués. Ils déterminaient ainsi si le patient était réellement infecté ou pas. Le but était de construire un nouveau gold standard appelé « critère clinique d'infection ». Si on comparait donc PCR/ESI-MS avec ce nouveau gold standard les résultats concordaient dans 77% et 82% des cas. Par ailleurs, la PCR/ESI-MS a détecté 41 micro-organismes (considérés comme significatifs) non identifiés par les cultures, essentiellement chez des patients déjà sous antibiotiques.[60]

Une importante étude observationnelle multicentrique a récemment voulu comparer les résultats obtenus par procédé classique avec ceux obtenus par PCR/ESI-MS. 616 échantillons de patients adultes avec un sepsis suspecté ou prouvé ont été analysés des deux façons. Les résultats étaient les suivants : la PCR/ESI-MS a identifié un germe dans 37% des cas et les hémocultures dans 11%. Dans 13 situations, la culture était positive alors que la PCR/ESI-MS était négative. Dans 384 cas, les deux tests étaient négatifs. Globalement, les auteurs trouvaient une sensibilité de PCR/ESI-MS de 81%, une spécificité de 69% et une VPN de 97%. A nouveau, les résultats étaient disponibles pour le clinicien 6 heures après le prélèvement.[61]

Il faut préciser que, jusqu'à ce jour, personne n'a effectué d'étude de coûts-bénéfices sur cet appareil. Néanmoins, des travaux avaient analysé cet aspect économique pour un

système similaire (SeptiFast, Roche, Mannheim, Allemagne) par rapport aux méthodes conventionnelles. Ils avaient trouvé une réduction significative des coûts globaux essentiellement en raison de séjours plus courts aux soins intensifs et d'une utilisation des antibiotiques plus rationnelle.[62, 63]

Les résultats sont donc prometteurs, la méthode semble fiable et, surtout, elle est extrêmement rapide, permettant l'adaptation de l'antibiothérapie déjà quelques heures après son début. A l'heure actuelle, cependant, aucune étude n'a évalué cette nouvelle technologie sur la population des nouveau-nés.

Pour pallier ce manque, nous avons mené notre étude dont l'objectif principal était justement d'évaluer la valeur prédictive négative (VPN) de la PCR/ESI-MS comparée aux hémocultures standard dans le sepsis néonatal.

Nous avons choisi de nous intéresser à la VPN car, premièrement, le plus important pour nous est de pouvoir arrêter rapidement et de façon sûre les traitements inutiles et ayant des effets secondaires. Deuxièmement, il nous semblait irréalisable de concevoir une étude de supériorité au gold standard. En effet, il est méthodologiquement impossible de démontrer une supériorité à un gold-standard, puisque toute différence entre les deux méthodes serait en défaveur du nouveau test.

Notre hypothèse, également basée sur les études sur la population adulte précédemment citées, était que la PCR/ESI-MS en cas de sepsis néonatal a une excellente VPN, arbitrairement fixée à 97%.

Discussion

Nous avons mené une étude prospective observationnelle dans le service des soins intensifs et néonatalogie des Hôpitaux Universitaires de Genève. Le but était de déterminer la VPN de cette nouvelle technologie qui est la PCR-ESI/MS dans le sepsis néonatal.

Nous avons inclus tous les nouveau-nés de moins de 28 jours de vie avec une suspicion de sepsis. Chez ces enfants, nous avons prélevé (en même temps que l'hémoculture) 0,2-0,5 ml de sang supplémentaire qui a été analysé par PCR-ESI/MS après accord des parents. La prise en charge était ensuite laissée à la discrétion de l'équipe médicale en charge du patient, non informée du résultat de cette analyse. Nous avons récolté des données anamnestiques, cliniques et biologiques, ainsi que l'apparition de certaines complications dans les 28 jours suivant l'inclusion (notamment le décès, une NEC, une candidémie ou une insuffisance rénale). Nous avons ensuite calculé la VPN de la PCR-ESI/MS par rapport aux hémocultures en divisant les vrais négatifs (hémoculture négative après 72h et PCR-ESI/MS négative) par les vrais négatifs + les faux négatifs (hémoculture positive après 72h et PCR-ESI/MS négative).

Les caractéristiques démographiques des participants sont détaillées dans l'article (tableau 1). Entre août 2013 et décembre 2014, nous avons analysé 114 prélèvements. L'âge et le poids médians étaient de 32^{3/7} SA et 1840 g respectivement. Il s'agissait surtout de EOS, l'âge médian à l'inclusion étant de 3 jours.

La présentation clinique et biologique de nos patients est détaillée dans le tableau 2 de l'article. Au moment de la suspicion d'infection, les enfants souffraient surtout de détresse respiratoire et désaturations ou de signes de mauvaise perfusion périphérique (temps de recoloration capillaire prolongé, acidose, hyper lactatémie). Du point de vue biologique, les valeurs de la formule sanguine (toujours au moment de l'inclusion) étaient pratiquement toujours dans la norme et la valeur médiane de CRP à 2mg/L. Ceci n'est pas étonnant puisque, comme nous l'avons mentionné auparavant, les modifications biologiques sont très inconstantes et/ou tardives dans le sepsis néonatal. Cela vient renforcer la nécessité d'un test qui soit fiable et rapide dans cette population de patients fragiles.

Le tableau ci-dessous résume les résultats : parmi les 114 patients, 10 (9%) avaient des hémocultures positives et 25 (22%) une PCR-ESI/MS positive. La durée moyenne du traitement antibiotique était de 5.5 jours. Parmi les 114 patients, cinq ont développé une NEC, parmi eux un patient est décédé. 4 autres patients sont décédés durant le suivi et trois ont développé une insuffisance rénale. Aucun enfant n'a souffert d'une candidose invasive. Comme on peut le remarquer, il y avait 87 prélèvements négatifs concordants (soit hémoculture et PCR-ESI/MS négatif) et deux faux négatifs, résultant ainsi en une excellente VPN pour la PCR-ESI/MS de 98% (95%CI 92-100).

Concordance des résultats entre les deux méthodes (PCR-ESI/MS et hémoculture).

		Hémoculture	
		+	-
PCR-ESI/MS	+	8 (vrais positifs)	17 (faux positifs)
	-	2 (faux négatifs)	87 (vrais négatifs)

On peut maintenant regarder de plus près les différents résultats.

Si on commence par analyser en détail les micro-organismes trouvés dans les 8 prélèvements considéré comme vrais positifs, on remarque que dans 3 cas il y avait une concordance parfaite entre les deux techniques, dans 4 cas la concordance était partielle et dans un cas les deux échantillons étaient positifs, mais pour deux germes différents (un *Staphylococcus warneri* dans la culture et un *Propionibacterium acnes* avec la PCR-ESI/MS). Globalement, la concordance infectiologique (donc les vrais positifs + les vrais négatifs/totalité des prélèvements) est de 79%.

Pour deux patients, l'hémoculture a identifié un germe alors que la PCR-ESI/MS est restée négative, il s'agit donc là de faux négatifs.

Le premier patient était un garçon prématuré né à 25^{5/7} SA de 12 jours de vie, bénéficiant d'un soutien respiratoire par ventilation non invasive et traité pour un canal artériel persistant, se présentant avec une recrudescence d'événements de type apnées-bradycardies-désaturations. Son bilan infectieux était parfaitement normal avec

notamment une CRP à 2 mg/L. La seule hémoculture prélevée a identifié un *Staphylocoque epidermidis*. L'équipe médicale en charge du patient l'a considéré comme réellement infecté et l'enfant a bénéficié de 10 jours d'antibiothérapie. Concernant le deuxième patient, il s'agissait d'un nouveau-né à terme hospitalisé à 3 jours de vie pour une hyperthermie isolée. Son laboratoire était complètement normal et la culture a mis en évidence deux CoNS: un *Staphylococcus epidermidis* et un *Streptococcus parasanguinis*. Après 48 h de traitement et surveillance en néonatalogie, le clinicien a décidé de ne pas retenir le diagnostic d'infection néonatale et a arrêté les antibiotiques. Dans le premier cas, on peut se demander s'il s'agissait vraiment d'une infection (et donc d'un défaut de détection de pathogène de la PCR-ESI/MS). Il n'est pas exclu à l'inverse que ce patient prématuré ait été traité inutilement, l'exposant ainsi aux effets délétères que ce traitement implique... Dans le deuxième cas, il s'agissait vraisemblablement de germes contaminants, puisque le patient a bien évolué sans traitement. Le nourrisson a néanmoins été séparé de sa mère pendant plusieurs jours et a subi la pose de cathéters ainsi que de multiples prélèvements. La description de nos deux faux négatifs montre à quel point le diagnostic et la prise en charge de la suspicion de sepsis néonatal restent difficiles et variables, et à quel point l'appréciation clinique est déterminante. Les conséquences, dans un sens comme dans l'autre ne sont pas négligeables, d'où l'importance de trouver un test permettant de d'exclure rapidement et sûrement le diagnostic.

Dans notre collectif, nous avons 17 patients avec un prélèvement défini comme faux positif. Ces 17 patients avaient une hémoculture négative, mais une PCR-ESI/MS positive.

Nous avons évoqué différentes hypothèses pour expliquer cette discordance.

Premièrement, nous avons exclu une contamination de l'appareil (qui aurait causé la souillure des spécimens) avec des contrôles de qualité des échantillons revenant toujours négatifs. Deuxièmement, nous avons vérifié qu'il n'y ait pas une grosse disparité de quantité de sang prélevé pouvant être à l'origine d'une mauvaise analyse de la part de l'appareil. Cette hypothèse est rapidement écartée puisque la quantité moyenne du volume sanguin de tous les échantillons sans les 17 faux positifs était identique à la moyenne du volume sanguin des 17 faux positifs, à savoir 0.38 ml. Troisièmement, nous avons pensé à la contamination du prélèvement par un germe cutané. En effet, il est possible que la désinfection du site de ponction au moment de la prise de sang détruit les pathogènes présents sur la peau, mais n'élimine pas complètement leur ADN. Dans ce cas, ce matériel génétique sera amplifié et retrouvé par la PCR-ESI/MS, mais la culture restera stérile puisque le germe n'est plus vivant et ne peut pas se multiplier.

Dans ce même sens, et afin d'avoir un argument supplémentaire pour renforcer cette hypothèse de « contamination » par ADN cutané, nous nous sommes penchés sur la modalité des prélèvements. Nous avons des échantillons obtenus par ponction veineuse périphérique ou bien par accès vasculaire central (cathéter veineux ou artériel ombilical). Dans ce dernier cas, la flore cutanée ne devrait influencer le prélèvement

qu'en moindre mesure. Si on regarde de plus près, on remarque que les 17 faux positifs étaient des échantillons prélevés par les deux méthodes. Dans 5 cas sur les 6 de « multi-germes » (≥ 3 microbes identifiés), le prélèvement provenait d'une ponction périphérique, dans un seul cas il était originaire d'un accès veineux centrale. On peut spéculer que probablement une partie de ces 17 faux positifs pourraient être originaires d'une contamination par ADN bactérien présent sur la peau. On peut accepter cette explication lorsqu'on met en évidence des micro-organismes typiquement cutanés (notamment les Staphylocoques ou le Propionibactérium, par exemple), il est plus difficile de la défendre quand on trouve des germes « atypiques » comme le *Nocardia* ou le *Gemella morbillorum*. Dans ces situations, on peut donc se demander s'il ne s'agit pas là d'un défaut des cultures standard qui seraient insuffisamment sensibles pour détecter des pathogènes qui circulent réellement dans nos patients les rendant malades. Il est donc difficile d'en tirer des conclusions. Nous ne savons pas à l'heure actuelle comment expliquer la présence de ces germes ni le poids qu'il faut leur accorder ou qu'il faut donner à ces prélèvements positifs. En effet, si d'une part la présence d'ADN bactérien chez un patient suspect d'infection semble être corrélée à une plus haute mortalité [64], certains de ces pathogènes (*Nocardia*, *Corynebacterium tuberculosis*, etc.) semblent vraiment trop inhabituels pour être mis en cause dans cette population de patients.

Comme dans les travaux de Jordana-Llunch et al, il est intéressant, au vu du désaccord entre les résultats des deux examens, de créer un nouveau gold standard défini « critère clinique d'infection ». [59, 60] Nous avons ainsi effectué cet exercice en analysant rétrospectivement les histoires cliniques et les biologies de chaque enfant qui avait une discordance entre hémoculture et PCR-ESI/MS.

Nous avons déjà détaillé l'histoire des deux faux négatifs. Nous avons donc considéré le prélèvement du deuxième patient (le bébé à terme avec une hyperthermie isolée) comme un vrai négatif.

Concernant les 17 faux positifs, après révision des contextes cliniques et biologiques, nous avons identifié 6 patients que nous avons considérés comme réellement infectés et chez qui l'hémoculture aurait dû identifier un germe. Nous les avons donc classés parmi les vrais positifs. 6 patients étaient certainement non infectés et 5 étaient possiblement infectés, mais leur histoire ne permettait pas de l'affirmer avec certitude. Nous avons laissé ces 11 patients dans la « catégorie » faux positifs.

On trouve ci-dessous les pathogènes retrouvés.

Pathogènes retrouvés par PCR-ESI/MS chez les 17 patients avec une PCR-ESI/MS positive et une hémoculture négative.

	Germes détectés
Patients réellement infectés	
Patient A	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia vulneris</i>
Patient B	<i>Staphylococcus coni</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Patient C	<i>Enterobacter spp.</i>
Patient D	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
Patient E	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Tsukamurella pulmonis</i>
Patient F	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Fungus</i>
Patients possiblement infectés	
Patient G	<i>Micrococcus spp.</i> <i>Corynebacterium tuberculosis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Patient H	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Streptococcus groupe B</i> <i>Streptococcus spp.</i>
Patient I	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Citrobacter freundii</i>
Patient J	<i>Propionibacterium acnes</i>
Patient K	<i>Enterococcus cecorum</i>
Patients non infectés	
Patient L	<i>Streptococcus spp.</i>
Patient M	<i>Streptococcus spp.</i>
Patient N	<i>Propionibacterium acnes</i>
Patient O	<i>Propionibacterium acnes</i>
Patient P	<i>Propionibacterium acnes</i>
Patient Q	<i>Nocardia spp.</i>

Ci-dessous, nous avons donc reproduit le tableau des résultats en le modifiant par rapport au nouveau gold standard qui est le «critère clinique d'infection» :

Concordance des résultats entre les deux méthodes (PCR-ESI/MS et hémoculture) selon le nouveau gold standard (critère clinique d'infection).

		Hémoculture	
		+	-
PCR-ESI/MS	+	14 (vrais positifs)	11 (faux positifs)
	-	1 (faux négatif)	88 (vrais négatifs)

Si on se réfère à ce nouveau gold standard « clinique », la concordance des résultats positifs sera de 84% alors que nous avions 79% à la base. La VPN, elle, s'élève à 99% avec ce gold standard.

A ce point de la discussion, il faut mentionner que la PCR-ESI/MS, en complément à l'identification du germe, nous fournit également son « niveau ». Cette information correspond grossièrement à une mesure semi-quantitative de l'ADN présent dans l'échantillon comparé à un contrôle. Ce paramètre pourrait être extrêmement intéressant pour l'analyse des résultats. Malheureusement actuellement aucune donnée n'est disponible concernant l'interprétation de ces niveaux, ni dans la littérature ni auprès du fabricant. A priori, des niveaux plus élevés semblent correspondre à une charge bactérienne plus importante, mais nous ne disposons pas de seuils précis. Ci-dessous, on peut voir le tableau 5 que nous avons complété avec les niveaux de chaque micro-organisme, on peut remarquer que les patients considérés comme infectés ont parfois des germes avec des niveaux semblant très bas. Inversement, chez certains patients considérés comme sains, on note des niveaux qui pourraient sembler non négligeables. Il faut se rappeler, comme déjà mentionné, que des valeurs de références et de normalité de ces niveaux n'existent pas.

Pathogènes retrouvés par PCR-ESI/MS chez les 17 patients avec une PCR-ESI/MS positive et une hémoculture négative et niveau de PCR-ESI/MS.

	Microorganismes détectés	Niveau de PCR/ESI-MS
Patients réellement infectés		
Patient A	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia vulneris</i>	4 3
Patient B	<i>Staphylococcus coni</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	18 11 11
Patient C	<i>Enterobacter spp.</i>	3
Patient D	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Gemella morbillorum</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	129 120 41 26 19
Patient E	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Tsukamurella pulmonis</i>	58 26 23 10
Patient F	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Fungus</i>	19 10
Patients possiblement infectés		
Patient G	<i>Micrococcus spp.</i> <i>Corynebacterium tuberculosis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	16 11 9
Patient H	<i>Propionibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Streptococcus groupe B</i> <i>Streptococcus spp.</i>	33 11 7 7
Patient I	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Citrobacter freundii</i>	73 55 54 38 25
Patient J	<i>Propionibacterium acnes</i>	10
Patient K	<i>Enterococcus cecorum</i>	3
Patients possiblement non infectés		
Patient L	<i>Streptococcus spp.</i>	6
Patient M	<i>Streptococcus spp.</i>	3
Patient N	<i>Propionibacterium acnes</i>	63
Patient O	<i>Propionibacterium acnes</i>	45
Patient P	<i>Propionibacterium acnes</i>	14
Patient Q	<i>Nocardia spp.</i>	30

Nous avons également ajouté les niveaux des micro-organismes dans le tableau qui détaille les 8 vrais positifs (ci-dessous). Il est intéressant, même si cela n'est pas étonnant, de découvrir que la valeur médiane de niveau des vrais positifs est largement supérieure à celle des 17 faux positifs : médiane 73 (IQR 36; 254) versus 19 (IQR 6.58),

p=0.01. On en conclut qu'effectivement un niveau plus haut correspond à une charge bactérienne plus importante permettant la détection du germe par culture standard.

Pathogènes retrouvés par PCR-ESI/MS (ainsi que leur niveau) et par hémoculture chez les 8 patients avec les deux test positifs.

	<i>Organisme détecté par hémoculture</i>	<i>Organisme détecté par PCR/ESI-MS</i>	<i>Niveaux PCR/ESI-MS</i>
Patient 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	68
Patient 2	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	61
Patient 3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	78
	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	10
Patient 4	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	26
		<i>Serratia fonticola</i>	3
Patient 5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	279
	<i>Staphylococcus capitis</i>		
Patient 6	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	103
		<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	45
		<i>Escherichia coli</i>	179
		<i>Staphylococcus caprae</i>	20
Patient 7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	805
		<i>Staphylococcus caprae</i>	28
		<i>Staphylococcus capitis</i>	20
		<i>Shigella boydii</i>	44
Patient 8	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	28

Notre étude a été publiée dans un journal faisant appel à des reviewers. Lors du processus de « peer-review », nous avons eu la possibilité d'améliorer notre manuscrit sur plusieurs points.

On nous a, entre autres, demandé pourquoi nous avons choisi les hémocultures comme méthode de référence. Effectivement, comme souligné, les faiblesses de ce test sont bien documentées, particulièrement dans notre population de patients.

Warhurst et al ont largement développé la problématique d'un gold standard plus qu'imparfait lors d'études sur les nouvelles méthodes diagnostiques.[65] Cependant, malgré un accord général du monde scientifique sur les limitations des hémocultures, ce test est mondialement utilisé dans la routine clinique pour le diagnostic et l'exclusion de l'infection, ainsi que dans les algorithmes de prise en charge. Il n'existe actuellement pas d'alternative valable, et il n'est donc pas surprenant d'avoir choisi cette méthode comme comparaison.

Une autre question qui nous a été posée était pourquoi nous avons choisi 72h d'incubation et non pas 48h ou 5 jours. Ce choix a été fait dans l'intention d'être le plus proche possible de la réalité clinique. Dans notre centre, les médecins réévaluent la nécessité à l'antibiothérapie après 72h et arrêtent les traitements si les hémocultures sont toujours stériles pour autant que la suspicion clinique de sepsis soit faible. Cette stratégie est basée sur plusieurs études (dont celle détaillée dans l'introduction) montrant qu'une période d'incubation de 72h est suffisante pour détecter une

bactériémie significative.[66] À noter que tous les prélèvements sont néanmoins gardés en culture durant 5 jours.

Dans le même registre, il est vrai que la suspicion d'infection était laissée à la discrétion du médecin en charge du patient. Là aussi, le but était d'être pragmatiques et de rester fidèles à la réalité clinique. En effet il n'existe pas une définition unique validée et unanime du sepsis néonatal.

Un autre point qui a été soulevé concerne la quantité de sang sur laquelle nous avons effectué la PCR-ESI/MS, à savoir 0.2-0.5 ml. En effet, le fabriquant de l'appareil préconise que l'analyse soit effectuée sur un échantillon de 5 ml de sang. Or ce volume de sang est bien évidemment impossible à prélever chez des enfants prématurés qui ont un volume plasmatique circulant de 80 ml/kg. Nous avons malgré tout décidé de réaliser les analyses, car d'autres auteurs ont rapporté des résultats dans des volumes inférieurs à ceux conseillés.[67, 68] Il est quand même possible que les deux faux négatifs soient dus à un défaut d'identification des germes en raison de la trop petite quantité de sang analysée, d'autant plus que les deux consistaient en 0.2 ml. Néanmoins, hormis ces deux cas, l'appareil a pu trouver des micro-organismes malgré ces petits volumes de sang. Cependant, avant l'utilisation de cette machine dans la routine clinique notre hypothèse devrait être confirmée.

Perspectives futures

A l'avenir, nous souhaiterions confirmer la valeur de cette nouvelle technologie dans la prise en charge du sepsis néonatal. Pour ceci, nous avons imaginé une étude randomisée contrôlée comparant, dans un bras, une prise en charge classique (c'est-à-dire la poursuite de l'antibiothérapie selon le résultat des hémocultures), à, dans l'autre bras, une prise en charge basée sur la PCR-ESI/MS. Afin d'évaluer la prise en charge appuyée sur cette analyse, l'outcome primaire de cette étude serait la reprise de l'infection primaire dans les 72 heures suivant l'arrêt des antibiotiques. Nous nous intéresserons également à d'autres complications comme : la mortalité, la durée de l'antibiothérapie, la durée de l'hospitalisation et des accès vasculaires, ainsi qu'à certains effets secondaires des antibiotiques comme la NEC, le LOS, la candidose invasive ou l'insuffisance rénale. Une étude économique pour chaque bras d'intervention serait également d'un très grand intérêt. Il s'agirait d'une étude de non infériorité incluant la même population que notre première étude, donc tous les nouveau-nés de moins de 28 jours de vie avec une suspicion de sepsis. Nous préleverions une hémoculture, ainsi que 0.5 ml de sang supplémentaire pour la PCR-ESI/MS avant le début de l'antibiothérapie à tous les enfants inclus. Ensuite les patients seraient randomisés (stratifiés selon l'âge gestationnel) en deux groupes:

- le groupe intervention dans lequel les antibiotiques seraient arrêtés si la PCR-ESI/MS est négative
- le groupe contrôle dans lequel les antibiotiques seraient arrêtés si l'hémoculture est stérile après 72 heures et l'enfant devient asymptomatique, sans signes biologiques d'infection.

Les chercheurs seraient « aveugles » par rapport au groupe de randomisation, les médecins en charge du malade ne le seraient pas, puisqu'ils devront décider de la suite du traitement selon le résultat des différents tests. La stratégie basée sur la PCR-ESI/MS sera considérée comme non inférieure si le taux de reprise de l'infection primaire après arrêt des antibiotiques est <3%.

On estime que le taux de récurrence d'infection primaire habituel est de 10%. Notre hypothèse est que ce taux avec la PCR-ESI/MS sera de 5%, mais nous souhaitons préciser cette hypothèse durant une phase pilote. En prenant une valeur alpha de 0.05 et une valeur beta de 0.2 (puissance de 80%) avec un delta de non-infériorité de 3% nous avons établi qu'il va nous falloir inclure 133 patients dans chaque groupe. Si notre hypothèse se confirme et que la stratégie basée sur la PCR-ESI/MS a un faible taux de récurrence, les patients pourraient bénéficier d'un arrêt plus précoce des antibiotiques. Ceci diminuerait les effets secondaires et les complications liées à ces traitements empiriques.

Conclusion

Notre étude prospective observationnelle montre qu'une nouvelle technique, la PCR-ESI/MS, a une excellente VPN en cas de sepsis néonatal. Nous pensons que la PCR-ESI/MS est une technologie très prometteuse et qui pourrait révolutionner la prise en charge de cette pathologie fréquente. Nos résultats montrent qu'une proportion significative d'enfants prématurés pourrait bénéficier d'un arrêt plus précoce des antibiotiques grâce à cette VPN élevée. Ceci pourrait être associé à une diminution de la mortalité et la morbidité dans notre population de malades. Nous pensons qu'une étude randomisée contrôlée comparant une prise en charge classique avec une prise en charge basée sur la PCR-ESI/MS dans un algorithme décisionnel devrait vérifier cette hypothèse.

Annexe 1

Définition de réponse inflammatoire systémique, sepsis, sepsis sévère et choc septique selon le « International Pediatric Sepsis Consensus Conference ». [12]

Table 2. Definitions of systemic inflammatory response syndrome (SIRS), infection, sepsis, severe sepsis, and septic shock

SIRS^a

The presence of at least two of the following four criteria, one of which must be abnormal temperature or leukocyte count:

- Core^b temperature of $>38.5^{\circ}\text{C}$ or $<36^{\circ}\text{C}$.
- Tachycardia, defined as a mean heart rate >2 SD above normal for age in the absence of external stimulus, chronic drugs, or painful stimuli; or otherwise unexplained persistent elevation over a 0.5- to 4-hr time period OR for children <1 yr old: bradycardia, defined as a mean heart rate <10 th percentile for age in the absence of external vagal stimulus, β -blocker drugs, or congenital heart disease; or otherwise unexplained persistent depression over a 0.5-hr time period.
- Mean respiratory rate >2 SD above normal for age or mechanical ventilation for an acute process not related to underlying neuromuscular disease or the receipt of general anesthesia.
- Leukocyte count elevated or depressed for age (not secondary to chemotherapy-induced leukopenia) or $>10\%$ immature neutrophils.

Infection

A suspected or proven (by positive culture, tissue stain, or polymerase chain reaction test) infection caused by any pathogen OR a clinical syndrome associated with a high probability of infection. Evidence of infection includes positive findings on clinical exam, imaging, or laboratory tests (e.g., white blood cells in a normally sterile body fluid, perforated viscus, chest radiograph consistent with pneumonia, petechial or purpuric rash, or purpura fulminans)

Sepsis

SIRS in the presence of or as a result of suspected or proven infection.

Severe sepsis

Sepsis plus one of the following: cardiovascular organ dysfunction OR acute respiratory distress syndrome OR two or more other organ dysfunctions. Organ dysfunctions are defined in Table 4.

Septic shock

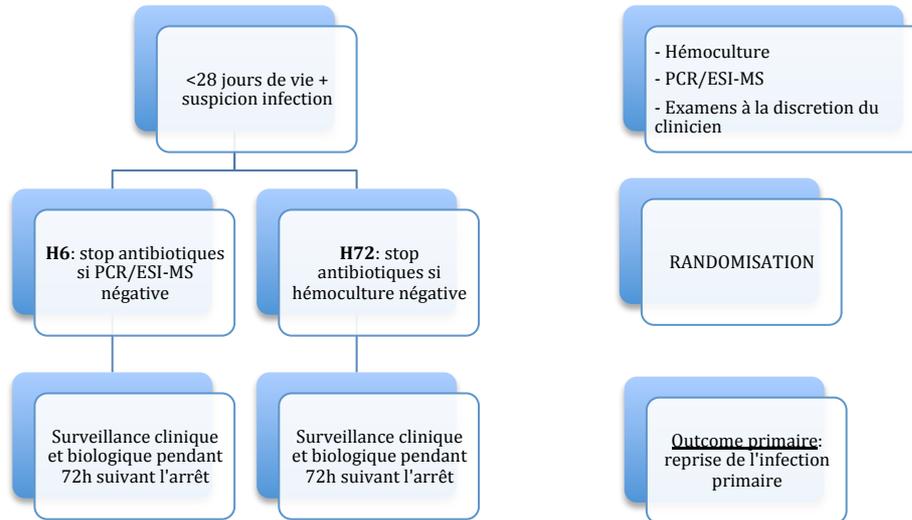
Sepsis and cardiovascular organ dysfunction as defined in Table 4.

Modifications from the adult definitions are highlighted in boldface.

^aSee Table 3 for age-specific ranges for physiologic and laboratory variables; ^bcore temperature must be measured by rectal, bladder, oral, or central catheter probe.

Annexe 2

Organigramme de l'étude randomisée contrôlée.



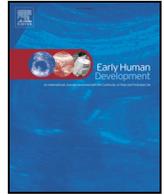
References

- [1] Darmstadt GZ, AKM; Stoll, BJ. Neonatal infections: a global perspective. In: Elsevier, editor. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 7th ed 2011. p. 24-51.
- [2] Haque KN. Definitions of bloodstream infection in the newborn. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6:S45-9.
- [3] Qazi SA, Stoll BJ. Neonatal sepsis: a major global public health challenge. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:S1-2.
- [4] Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, et al. Changes in pathogens causing early-onset sepsis in very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*. 2002;347:240-7.
- [5] Boghossian NS, Page GP, Bell EF, Stoll BJ, Murray JC, Cotten CM, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight infants from singleton and multiple-gestation births. *J Pediatr*. 2013;162:1120-4, 4 e1.
- [6] Thompson PJ, Greenough A, Hird MF, Philpott-Howard J, Gamsu HR. Nosocomial bacterial infections in very low birth weight infants. *Eur J Pediatr*. 1992;151:451-4.
- [7] Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, Verter J, Poland RL, Bauer CR, et al. Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. The National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Pediatr Infect Dis J*. 1998;17:593-8.
- [8] Marshall DD, Kotelchuck M, Young TE, Bose CL, Kruyer L, O'Shea TM. Risk factors for chronic lung disease in the surfactant era: a North Carolina population-based study of very low birth weight infants. North Carolina Neonatologists Association. *Pediatrics*. 1999;104:1345-50.
- [9] Schlapbach LJ, Aebischer M, Adams M, Natalucci G, Bonhoeffer J, Latzin P, et al. Impact of sepsis on neurodevelopmental outcome in a Swiss National Cohort of extremely premature infants. *Pediatrics*. 2011;128:e348-57.
- [10] Kiechl-Kohlendorfer U, Ralser E, Pupp Peglow U, Reiter G, Trawoger R. Adverse neurodevelopmental outcome in preterm infants: risk factor profiles for different gestational ages. *Acta Paediatr*. 2009;98:792-6.
- [11] Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA*. 2004;292:2357-65.
- [12] Goldstein B, Giroir B, Randolph A, International Consensus Conference on Pediatric S. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6:2-8.
- [13] Meem M, Modak JK, Mortuza R, Morshed M, Islam MS, Saha SK. Biomarkers for diagnosis of neonatal infections: A systematic analysis of their potential as a point-of-care diagnostics. *J Glob Health*. 2011;1:201-9.
- [14] Khassawneh M, Hayajneh WA, Kofahi H, Khader Y, Amarin Z, Daoud A. Diagnostic markers for neonatal sepsis: comparing C-reactive protein, interleukin-6 and immunoglobulin M. *Scand J Immunol*. 2007;65:171-5.
- [15] Chirico G, Loda C. Laboratory aid to the diagnosis and therapy of infection in the neonate. *Pediatr Rep*. 2011;3:e1.
- [16] Shane AL, Stoll BJ. Recent developments and current issues in the epidemiology, diagnosis, and management of bacterial and fungal neonatal sepsis. *Am J Perinatol*. 2013;30:131-41.
- [17] Hall J, Hazlewood GP, Huskisson NS, Durrant AJ, Gilbert HJ. Conserved serine-rich sequences in xylanase and cellulase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa*: internal signal sequence and unusual protein processing. *Mol Microbiol*. 1989;3:1211-9.
- [18] Weitkamp JA, J.L. Diagnostic use of C-reactive protein (CRP) in assessment of neonatal sepsis. *NeoReviews*. 2005;6:508-15.
- [19] Hofer N, Zacharias E, Muller W, Resch B. An update on the use of C-reactive protein in early-onset neonatal sepsis: current insights and new tasks. *Neonatology*. 2012;102:25-36.

- [20] Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004;89:F229-35.
- [21] Yu Z, Liu J, Sun Q, Qiu Y, Han S, Guo X. The accuracy of the procalcitonin test for the diagnosis of neonatal sepsis: a meta-analysis. *Scand J Infect Dis.* 2010;42:723-33.
- [22] Kuhn P, Escande B, Rivera S, Langlet C, Messer J. [Procalcitonin and neonatal infection]. *Arch Pediatr.* 2004;11:585-6.
- [23] Mehr S, Doyle LW. Cytokines as markers of bacterial sepsis in newborn infants: a review. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19:879-87.
- [24] Prashant A, Vishwanath P, Kulkarni P, Sathya Narayana P, Gowdara V, Nataraj SM, et al. Comparative assessment of cytokines and other inflammatory markers for the early diagnosis of neonatal sepsis-a case control study. *PLoS One.* 2013;8:e68426.
- [25] Kallman J, Ekholm L, Eriksson M, Malmstrom B, Schollin J. Contribution of interleukin-6 in distinguishing between mild respiratory disease and neonatal sepsis in the newborn infant. *Acta Paediatr.* 1999;88:880-4.
- [26] Beceiro Mosquera J, Sivera Monzo CL, Oria de Rueda Salguero O, Olivas Lopez de Soria C, Herbozo Nory C. [Usefulness of a rapid serum interleukin-6 test combined with C-reactive protein to predict sepsis in newborns with suspicion of infection]. *An Pediatr (Barc).* 2009;71:483-8.
- [27] Volante E, Moretti S, Pisani F, Bevilacqua G. Early diagnosis of bacterial infection in the neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2004;16 Suppl 2:13-6.
- [28] Franz AR, Bauer K, Schalk A, Garland SM, Bowman ED, Rex K, et al. Measurement of interleukin 8 in combination with C-reactive protein reduced unnecessary antibiotic therapy in newborn infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics.* 2004;114:1-8.
- [29] Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, De Luca A, Puopolo M, De Carolis MP, et al. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr.* 2001;160:345-50.
- [30] Shouman B, Badr R. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted and tumor necrosis factor-alpha in septic neonates. *J Perinatol.* 2010;30:192-6.
- [31] Gilfillan M, Bhandari V. Biomarkers for the diagnosis of neonatal sepsis and necrotizing enterocolitis: Clinical practice guidelines. *Early Hum Dev.* 2017;105:25-33.
- [32] Bhandari V. Effective Biomarkers for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2014;3:234-45.
- [33] Dilli D, Oguz SS, Dilmen U, Koker MY, Kizilgun M. Predictive values of neutrophil CD64 expression compared with interleukin-6 and C-reactive protein in early diagnosis of neonatal sepsis. *J Clin Lab Anal.* 2010;24:363-70.
- [34] Lam HS, Cheung HM, Poon TC, Wong RP, Leung KT, Li K, et al. Neutrophil CD64 for daily surveillance of systemic infection and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Clin Chem.* 2013;59:1753-60.
- [35] Clark RH, Bloom BT, Spitzer AR, Gerstmann DR. Reported medication use in the neonatal intensive care unit: data from a large national data set. *Pediatrics.* 2006;117:1979-87.
- [36] Stoll BJ, Hansen N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Semin Perinatol.* 2003;27:293-301.
- [37] Tzialla C, Borghesi A, Perotti GF, Garofoli F, Manzoni P, Stronati M. Use and misuse of antibiotics in the neonatal intensive care unit. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25 Suppl 4:35-7.
- [38] Tripathi N, Cotten CM, Smith PB. Antibiotic use and misuse in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatol.* 2012;39:61-8.
- [39] Alexander VN, Northrup V, Bizzarro MJ. Antibiotic exposure in the newborn intensive care unit and the risk of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr.* 2011;159:392-7.
- [40] Cotten CM, Taylor S, Stoll B, Goldberg RN, Hansen NI, Sanchez PJ, et al. Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. *Pediatrics.* 2009;123:58-66.
- [41] Kuppala VS, Meinen-Derr J, Morrow AL, Schibler KR. Prolonged initial empirical antibiotic treatment is associated with adverse outcomes in premature infants. *J Pediatr.* 2011;159:720-5.

- [42] Cotten CM, McDonald S, Stoll B, Goldberg RN, Poole K, Benjamin DK, Jr., et al. The association of third-generation cephalosporin use and invasive candidiasis in extremely low birth-weight infants. *Pediatrics*. 2006;118:717-22.
- [43] de Man P, Verhoeven BA, Verbrugh HA, Vos MC, van den Anker JN. An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *Lancet*. 2000;355:973-8.
- [44] Muller-Pebody B, Johnson AP, Heath PT, Gilbert RE, Henderson KL, Sharland M, et al. Empirical treatment of neonatal sepsis: are the current guidelines adequate? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2011;96:F4-8.
- [45] Guerti K, Devos H, Ieven MM, Mahieu LM. Time to positivity of neonatal blood cultures: fast and furious? *J Med Microbiol*. 2011;60:446-53.
- [46] Dietzman DE, Fischer GW, Schoenknecht FD. Neonatal *Escherichia coli* septicemia--bacterial counts in blood. *J Pediatr*. 1974;85:128-30.
- [47] Kellogg JA, Manzella JP, Bankert DA. Frequency of low-level bacteremia in children from birth to fifteen years of age. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2181-5.
- [48] Kellogg JA, Ferrentino FL, Goodstein MH, Liss J, Shapiro SL, Bankert DA. Frequency of low level bacteremia in infants from birth to two months of age. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:381-5.
- [49] Paolucci M, Landini MP, Sambri V. How can the microbiologist help in diagnosing neonatal sepsis? *Int J Pediatr*. 2012;2012:120139.
- [50] Lancaster DP, Friedman DF, Chiotos K, Sullivan KV. Blood Volume Required for Detection of Low Levels and Ultralow Levels of Organisms Responsible for Neonatal Bacteremia by Use of Bactec Peds Plus/F, Plus Aerobic/F Medium, and the BD Bactec FX System: an In Vitro Study. *J Clin Microbiol*. 2015;53:3609-13.
- [51] Buttery JP. Blood cultures in newborns and children: optimising an everyday test. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2002;87:F25-8.
- [52] BD BACTEC™ Peds Plus™ /F Culture Vials; Becton DaC, 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA. Culture vials : Instruction Leaflet 2000.
- [53] Driscoll AJ, Deloria Knoll M, Hammitt LL, Baggett HC, Brooks WA, Feikin DR, et al. The Effect of Antibiotic Exposure and Specimen Volume on the Detection of Bacterial Pathogens in Children With Pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2017;64:S368-S77.
- [54] Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA*. 2004;292:2357-65.
- [55] Weinstein MP. Current blood culture methods and systems: clinical concepts, technology, and interpretation of results. *Clin Infect Dis*. 1996;23:40-6.
- [56] Ecker DJ, Sampath R, Massire C, Blyn LB, Hall TA, Eshoo MW, et al. Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:553-8.
- [57] Wolk DM, Kaleta EJ, Wysocki VH. PCR-electrospray ionization mass spectrometry: the potential to change infectious disease diagnostics in clinical and public health laboratories. *J Mol Diagn*. 2012;14:295-304.
- [58] Ecker DJ, Sampath R, Li H, Massire C, Matthews HE, Toleno D, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10:399-415.
- [59] Jordana-Lluch E, Carolan HE, Gimenez M, Sampath R, Ecker DJ, Quesada MD, et al. Rapid diagnosis of bloodstream infections with PCR followed by mass spectrometry. *PLoS One*. 2013;8:e62108.
- [60] Jordana-Lluch E, Gimenez M, Quesada MD, Rivaya B, Marco C, Dominguez MJ, et al. Evaluation of the Broad-Range PCR/ESI-MS Technology in Blood Specimens for the Molecular Diagnosis of Bloodstream Infections. *PLoS One*. 2015;10:e0140865.
- [61] Vincent JL, Brealey D, Libert N, Abidi NE, O'Dwyer M, Zacharowski K, et al. Rapid Diagnosis of Infection in the Critically Ill, a Multicenter Study of Molecular Detection in Bloodstream Infections, Pneumonia, and Sterile Site Infections. *Crit Care Med*. 2015;43:2283-91.
- [62] Lehmann LE, Herpichboehm B, Kost GJ, Kollef MH, Stuber F. Cost and mortality prediction using polymerase chain reaction pathogen detection in sepsis: evidence from three observational trials. *Crit Care*. 2010;14:R186.

- [63] Alvarez J, Mar J, Varela-Ledo E, Garea M, Matinez-Lamas L, Rodriguez J, et al. Cost analysis of real-time polymerase chain reaction microbiological diagnosis in patients with septic shock. *Anaesth Intensive Care*. 2012;40:958-63.
- [64] O'Dwyer MJ, Starczewska MH, Schrenzel J, Zacharowski K, Ecker DJ, Sampath R, et al. The detection of microbial DNA but not cultured bacteria is associated with increased mortality in patients with suspected sepsis-a prospective multi-centre European observational study. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23:208 e1- e6.
- [65] Warhurst G, Dunn G, Chadwick P, Blackwood B, McAuley D, Perkins GD, et al. Rapid detection of health-care-associated bloodstream infection in critical care using multipathogen real-time polymerase chain reaction technology: a diagnostic accuracy study and systematic review. *Health Technol Assess*. 2015;19:1-142.
- [66] Kumar Y, Qunibi M, Neal TJ, Yoxall CW. Time to positivity of neonatal blood cultures. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2001;85:F182-6.
- [67] Bacconi A, Richmond GS, Baroldi MA, Laffler TG, Blyn LB, Carolan HE, et al. Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and *Candida* infections in blood. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3164-74.
- [68] Laffler TG, Cummins LL, McClain CM, Quinn CD, Toro MA, Carolan HE, et al. Enhanced diagnostic yields of bacteremia and candidemia in blood specimens by PCR-electrospray ionization mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3535-41.



Rapid detection and ruling out of neonatal sepsis by PCR coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry (PCR/ESI-MS)



Cristina Delcò^{a,*}, Oliver Karam^a, Riccardo Pfister^a, Alain Gervaix^a, Gesuele Renzi^b, Stéphane Emonet^b, Jacques Schrenzel^b, Klara M. Posfay-Barbe^a

^a Children's University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland

^b University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2016

Received in revised form 13 March 2017

Accepted 13 March 2017

Available online xxxx

Keywords:

Neonate

Sepsis

Blood culture

PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry (PCR/ESI-MS)

ABSTRACT

Background: Sepsis is an important cause of morbidity and mortality in neonates and clinicians are typically required to administer empiric antibiotics while waiting for blood culture results. However, prolonged and inappropriate use of antibiotics is associated with various complications and adverse events. Better tools to rapidly rule out bacterial infections are therefore needed.

Aims: We aimed to assess the negative predictive value of PCR coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry (PCR/ESI-MS) compared to conventional blood cultures in neonatal sepsis.

Study design: Prospective observational study.

Subjects: All consecutive neonates (<28 days old) with clinical suspicion of sepsis. Samples for PCR/ESI-MS analysis were collected at the same time as samples for the blood culture, before the initiation of antibiotics.

Outcome measures: Our primary objective was to evaluate the negative predictive value of PCR/ESI-MS for the detection of bacteria in the bloodstream of newborns with suspected sepsis. Our secondary objective was the evaluation of the sensitivity, specificity and positive predictive value of the PCR/ESI-MS in such a neonatal population.

Results: We analysed 114 samples over 14 months. The median age and weight were 32 weeks + 3 days and 1840 g, respectively. Two patients had negative PCR/ESI-MS results, but positive blood cultures. Overall, the negative predictive value was 98% (95%CI: 92% to 100%).

Conclusions: Based on these results, PCR/ESI-MS analysis of blood samples of neonates with suspected sepsis appears to have a very good negative predictive value when compared to blood cultures as gold standard. This novel test might allow for early reassessment of the need for antibiotics.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sepsis is an important cause of morbidity and mortality in neonates, especially in premature infants [1]. A rapid and accurate diagnosis is essential to prevent severe and life-threatening complications. However, diagnosis is often difficult in routine clinical practice. Biomarkers are also not sufficiently specific [2,3]. As a result, clinicians frequently administer empiric antibiotics to symptomatic or “at risk” infants while

waiting for blood culture results, which are currently the gold standard to identify bloodstream infection. Experts agree in stating that blood culture, despite being the gold standard in the microbiological diagnosis of neonatal sepsis, suffers from multiple disadvantages [4,5]. Amongst other disadvantages, blood cultures require a substantial amount of blood to reach adequate sensitivity and the one to 2 mL blood required are often difficult to obtain in very small premature infants. Furthermore, blood cultures are very “time expensive” as results are available several days after clinical suspicion. During this time clinicians continue empirical antibiotics in neonates who may not be infected.

On the other hand, prolonged and inappropriate use of antibiotics is associated with various and well documented complications and adverse events: [6,7] increased risk of death, necrotizing enterocolitis [8], late onset sepsis [9], alteration of gut colonization, increased risk of *Candida* colonization and subsequent invasive candidiasis [10], and increased bacterial antibiotic resistance [11]. Therefore, it is mandatory

Abbreviations: PCR/ESI-MS, PCR coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry; NICU, Neonatal Intensive Care Unit; CBC, complete blood count; CRP, C-reactive protein; IQR, interquartile range; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; CI, confidence interval; PDA, patent ductus arteriosus; NEC, necrotizing enterocolitis; CPAP, continuous positive airway pressure.

* Corresponding author at: Neonatology and Pediatrics Intensive Care Unit, University Hospitals of Geneva, 4 rue Gabrielle-Perret-Gentil, 1211 Geneva, Switzerland.

E-mail address: cristinadelco@gmail.com (C. Delcò).

not only to rapidly treat a suspected neonatal sepsis, but also to rule out the infection as soon as possible, in order to stop unnecessary antibiotics.

Molecular methods have the potential to overcome many limitations of blood culture [5].

PCR/ESI-MS (IRIDICA®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) is a novel culture-independent technology coupling broad amplification by PCR and detection of the PCR-amplified products by electrospray ionization mass spectroscopy (ESI-MS). PCR/ESI-MS can detect over 600 different species of bacteria in a single assay, and in approximately 6 h. The concentration of pathogens in neonatal bacteraemia appears to be highly variable: despite many organisms occur in high concentrations, low-density bacteraemia is also recorded for most pathogens [4, 12]. Therefore, one could hypothesize that DNA analysis could be more sensitive than standard blood cultures, thanks to the detection of circulating DNA from dead or non-growing bacteria.

Our primary objective was to evaluate the negative predictive value of PCR/ESI-MS for the detection of bacteria in the bloodstream of newborns with suspected sepsis. Our secondary objective was the evaluation of the sensitivity, specificity and positive predictive value of the PCR/ESI-MS in such a neonatal population.

2. Patients and methods

This prospective observational study was conducted in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU) at the University Hospitals of Geneva, a tertiary perinatal centre in Switzerland. The study was approved by the local ethics committee. Informed written consent was obtained from the parents before inclusion.

2.1. Patient inclusion and exclusion criteria

All newborns <28 days-old admitted in our NICU were eligible. Patients were included if the treating physicians diagnosed a suspected sepsis and intended to treat it with antibiotics. Neonates were excluded if blood sample for blood cultures and/or PCR/ESI-MS were impossible to obtain, or if their parents declined consent. Neonates were also excluded a posteriori if the PCR/ESI-MS blood sample was not analysable (because blood sample not available).

2.2. Sepsis evaluation, specimen collection and processing

As per standard procedure, we measured complete blood count (CBC) and C-reactive protein (CRP) for all infants with suspected sepsis.

A venous or arterial blood culture was collected (a minimum of 0.5 ml EDTA whole blood) through a central line or a peripheral blood draw, and analysed by a Bactec Peds PlusF system (Becton Dickinson Diagnostics system, Sparks, MD). Results of these routine tests were transmitted to the medical team and decision regarding antibiotic treatment was left to the discretion of the physician in charge of the patient.

Simultaneously, from the same blood draw, all included patients also had another 0.2 to 0.5 mL of blood sampled in an EDTA tube. Specimens were stored at 4 °C in the unit within 30 min of collection, then transported to the central laboratory, where samples were kept at –20 °C until analysis by batch was performed.

The principle of PCR/ESI-MS (IRIDICA®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) can be summarized as follows: multiple pairs of primers are used to amplify carefully selected regions of the genome of the microorganisms of interest (called amplicons). Following amplification, a fully automated mass spectroscopy analysis is performed weighting such amplicons. The nucleotide composition is then deduced for each amplicon present and compared with a database, allowing for the identification of the microorganism, by relying on the analysis of several amplicons. As a result PCR/ESI-MS can detect >600 pathogens in a single assay, and in approximately 6 h. It can also identify three classes of antibiotics resistance markers (mecA, vanA/vanB and KPC). A full

description of the method is reported by Ecker et al. [13]. PCR/ESI-MS also provides levels, which are semi-quantitative measurements of pathogen DNA in samples. Currently, there are no data regarding interpretation of PCR/ESI-MS levels, but higher levels may indicate higher pathogen load.

The medical team was not informed of the results of the PCR/ESI-MS analysis.

2.3. Clinical data collection

The following baseline data were collected: patient demographics (gestational age, sex, birth weight, day of life at inclusion), infectious risk factors (e.g., maternal group B *Streptococcus* carriage, maternal chorioamnionitis, prolonged membrane rupture of >18 h, neonatal central lines, mechanical ventilation) and major comorbidities (necrotizing enterocolitis, patent ductus arteriosus, intraventricular haemorrhage, malformations, or previous surgery).

Clinical and laboratory data were also recorded: vital signs, hyperthermia (defined as at least one central temperature measure >38 °C), hypothermia (defined as at least one central temperature measure <36 °C), and thermal instability (defined as the variation of environmental temperature >1 °C to maintain constant skin temperature), recrudescence of apnea-bradycardia-desaturation episodes (defined as >50% of baseline), prolonged refill time (>3 s), blood gas parameters (acidosis defined as pH <7.3, BE <–4, lactates >2 mmol/L), and laboratory inflammatory markers (CRP, white blood cells count, neutrophil and platelet count).

Finally, outcome data included death, necrotizing enterocolitis, invasive candidiasis, and renal failure (defined as diuresis <0.5 ml/kg/h and increased plasmatic creatinine) <28 days after inclusion.

The follow-up period was for 28 days after inclusion.

2.4. Statistical analysis

Results are presented as median and interquartile range (IQR) or number and proportion. Results obtained with the PCR/ESI-MS technology for each specimen were compared with those obtained using conventional microbiology methods (blood cultures) for the same sample.

We defined a true negative result as negative blood cultures at 72 h after incubation AND negative PCR/ESI-MS results. We defined a false negative result as positive blood cultures within 72 h after incubation AND negative PCR/ESI-MS result.

We defined a true positive result as positive blood cultures AND positive PCR/ESI-MS results. We defined a false positive result as positive PCR/ESI-MS results AND negative blood culture at 72 h after incubation.

The choice of 72 h was made with the intention to be the closest to our clinical setting. Indeed, in our center, clinicians usually stop antibiotics after 72 h if the blood culture remains negative. This strategy is based on a study that showed that a 3-day incubation period is sufficient to detect all clinically important blood culture isolates using the automated system [14]. However, all blood samples were indeed kept for culture for 5 days, and the information regarding possible late positive results were available to us (data not shown).

Negative predictive value (NPV) was calculated by dividing the true negative / (true negative + false negative).

In 2012, 289 blood cultures were obtained in neonates <28-days old in our center (NICU, pediatric intensive care unit, emergency room, general pediatric wards), for 209 distinct episodes. Among these, 22 (11%) yielded one or more bacteria after standard blood cultures. Our objective was to achieve a lower margin of the NPV 95%CI ≥95%, therefore, we calculated a sample size of 111 patients if the proportion of false positive was only 1% and the prevalence of negative results in our population was 89%.

3. Results

3.1. Demographic characteristics of the participants

From August 2013 through December 2014, we approached 124 parents, and included 123 participants. 114 specimens were analysed, as nine blood samples were not analysable. No participant was lost to follow-up after study inclusion. As showed in Table 1 the median age and weight were 32 weeks + 3 days (IQR 27 + 1–36 + 5 weeks) and 1840 g (IQR 1100–2970 g), respectively.

Clinical and laboratory characteristics are shown in Table 2.

3.2. Blood culture and PCR/ESI-MS

3.2.1. Primary outcome

Among the 114 patients, there were 10 (11%) positive blood cultures, and 25 (22%) had a positive PCR/ESI-MS (Table 3). There were 87 concordant negative specimens, yielding a NPV for PCR/ESI-MS in neonatal sepsis of $87/89 = 98\%$ (95%CI 92–100).

For two patients, blood cultures identified an organism, whereas their cognate PCR/ESI-MS results were negative. The first patient was a premature baby presenting a late-onset sepsis without any inflammatory markers (WBC 18 g/L, CRP 2 mg/L, platelets 250 g/L). Blood culture identified a *Staphylococcus epidermidis* in one bottle out of one. After 48 h, the treating physician considered him as truly infected, and treated him with antibiotics for a total of 10 days. The second patient was a full-term neonate hospitalized with an isolated fever without any inflammatory marker (WBC 9.6 g/L, CRP 3 mg/L, platelets 371 g/L). Blood culture was positive for two bacteria: *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus parasanguinis*. After 48 h of evaluation, the treating physician considered him as not infected and stopped the antibiotics.

3.2.2. Secondary outcomes

Of the 114 patients, eight had both a positive blood culture and positive PCR/ESI-MS. In three patients, there was a full agreement between both tests. In four patients, there was a partial agreement, as more than one bacterial species was detected in one test, but not in the other. In one patient, both tests were positive, but for different bacteria (Table 4).

Overall, we found a sensitivity of PCR/ESI-MS of 80% and a positive predictive value of 32%. PCR/ESI-MS revealed an organism in 17 additional samples that had negative blood cultures, resulting in a specificity

Table 1
Patient demographics and baseline clinical characteristic of 114 septic neonates.

		IQR 25–75
Median gestational age, (weeks–days)	32 + 3/7	27 + 1/7–36 + 5/7
Male ^a	42	
Median birth weight, grams	1840	1100–2970
Median days of life at inclusion	3	1–5
Prolonged rupture of membranes ^a	26	
Maternal group B <i>Streptococcus</i> ^a	21	
Maternal chorioamnionitis ^a	22	
Neonatal central line ^{a,b}	24	
PDA ^{a,c}	10	
NEC ^{a,d}	2	
Respiratory support ^{a,e}	75	
Intraventricular haemorrhage ^a	7	
Malformations ^{a,f}	8	
Prior surgery ^{a,g}	3	

PDA, patent ductus arteriosus; NEC, necrotizing enterocolitis.

^a %.

^b Arterial/venous umbilical line or peripherally inserted central catheter, in place >48 h.

^c PDA needing treatment (medical or surgical).

^d NEC Bell 2 or 3.

^e Defined as needing for oxygen, continuous positive airway pressure (CPAP) or invasive mechanical ventilation.

^f Including oesophageal and jejunal atresia, hypospadias, clubfeet, trisomia 21, cleft palate, inter ventricular communication, cerebral posterior fossa malformations.

^g Including oesophageal surgery, PDA ligation and central nervous system drainage.

Table 2

Clinical and laboratory characteristics of 114 septic neonates.

		IQR 25–75
Hyperthermia ^a	17	
Hypothermia ^a	4	
Thermal instability ^a	8	
Peripheral refill time > 3 s ^a	42	
Lactates > 2 mmol/l ^a	59	
Base excess < −4 ^a	48	
pH < 7.3 ^a	57	
Tachypnea ^a	37	
Respiratory distress ^a	68	
Tachycardia ^a	17	
Hypotension ^a	15	
Apnea ^a	19	
Bradycardia ^a	9	
Desaturation ^a	58	
Mean white blood count, g/L	14	8–18
Mean thrombocytes, g/L	216	160–260
Mean neutrophils, g/L	8.7	4.7–12
Mean immature/total neutrophils	0.16	0.02–0.16
Mean C-reactive protein mg/L	17	2–24

^a %.

of 84%. Details of these pathogens and PCR/ESI-MS levels are reported in Table 5.

3.2.3. Clinical outcomes

The mean duration of antibiotic treatment was 5.5 days (IQR 3–7 days). Among 114 patients, five died, five developed necrotizing enterocolitis (Bell 2 or 3) [15] and three had a renal failure <28 days after inclusion. No patient had an invasive candidiasis during the study.

4. Discussion

Our study shows that a novel assay, PCR/ESI-MS, performs as well as blood cultures in terms of NPV (98%). One of the two patients with the mismatched results (blood culture +/PCR/ESI-MS −) was considered by the caretaking physician as not infected regardless of the bacteria found on the culture, which were interpreted as contaminants. The other patient was considered as infected by the clinician and would be considered in this study as a false negative. Similar results were recently published in adult patients (NPV of 97%) with suspected or proven bloodstream infections [16,17]. Makhoul et al. [18] compared PCR with blood culture in the diagnosis of neonatal staphylococcal sepsis: they also found a NPV of 98%.

One of the main problems with blood cultures is the fact that results are available many days after clinical suspicion; meanwhile, the patient is exposed to antibiotics with all the well-described consequences. A major benefit of this novel technology (PCR/ESI-MS) is that the result can be available six to eight hours after sampling. This feature may help physicians to stop the antibiotic treatment several days earlier when the pre-test probability of sepsis is already low. Such a strategy may avoid unnecessary antibiotics, which could reduce per se the morbidity and mortality in neonates, as well as decrease bacterial resistance and microorganism selection through prolonged treatment with

Table 3

Concordance (2 × 2 table) of culture results and PCR/ESI-MS in blood samples of 114 septic neonates.

	Blood culture (n)			95% CI		
PCR/ESI-MS (n)	+	−	Total	Sensitivity	80%	44–97
+	8	17	25	Specificity	84%	75–90
−	2	87	89	PPV	32%	15–53
Total	10	104	114	NPV	98%	92–100

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; CI: confidence interval.

Table 4

Microorganisms in the eight patients with positive blood cultures and positive PCR/ESI-MS. In three patients (white cells), there was a full agreement between both tests. In four patients (light grey cells), there was a partial agreement, as more than one germ was detected in one test, but not in the other. In one patient (dark grey cells), both tests were positive, but for different bacteria.

	Organism detected by blood culture	Organism detected by PCR/ESI-MS
Patient 1	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis
Patient 2	Escherichia coli	Escherichia coli
Patient 3	Staphylococcus epidermidis Staphylococcus warneri	Staphylococcus epidermidis Staphylococcus warneri
Patient 4	Serratia marcescens	Serratia marcescens Serratia fonticola
Patient 5	Staphylococcus epidermidis Staphylococcus capitis	Staphylococcus epidermidis
Patient 6	Staphylococcus epidermidis Staphylococcus capitis	Staphylococcus epidermidis Streptococcus pseudopneumoniae Escherichia coli Staphylococcus caprae
Patient 7	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus epidermidis Staphylococcus caprae Staphylococcus capitis Shigella boydii
Patient 8	Staphylococcus warneri	Propionibacterium acnes

antimicrobials. Furthermore, reducing length of therapy would decrease not only the length of hospital stay, but also the economical and psychological burden of hospitalization.

Another problem with blood cultures in newborns, especially premature infants is the quantity of blood necessary for accurate results. Limited clinical data on the effect of blood volume on blood culture's results is available in newborn: at least 1 mL is usually recommended by paediatric blood culture bottle manufacturers [19]. We performed PCR/ESI-MS using smaller volumes of blood (0.2 to 0.5 mL), which is of particular interest in this population with small total blood volumes and often repeated blood draws.

We had 17 false positive samples (blood culture –/PCR/ESI-MS +) in our study. Device contamination was excluded by performing quality control samples, which were always negative. Earlier contamination of the blood sample by skin pathogens is still a possibility. Furthermore, we cannot exclude that skin disinfection at the time of sampling kills the skin bacteria, but fails to remove their DNA. In this situation, PCR/ESI-MS would amplify this genetic material even if the disinfection was performed properly. Conversely, one can also question if blood culture is not sensitive enough to detect certain pathogens, especially with those with a low inoculum, unlike PCR/ESI-MS, which may detect them. This could be of some interest because presence of microbial DNA in patients with suspected sepsis might be associated with a higher mortality [20]. One can question the choice of blood culture as the gold standard. The limitations of blood culture as a gold standard are generally acknowledged and were recently extensively discussed by Warhurst et al. [21]. However, it is used routinely worldwide and the formal definitions and guidelines relating to the diagnosis of suspected bloodstream infection are based on this test with no currently accepted alternatives.

It is therefore not surprising that the diagnostic validity of new technologies, such as PCR, is compared to blood culture. Our results, as in many clinical settings in which clinicians decide to treat with antibiotics patients based on clinical impressions and/or laboratory markers, six infants were clinically infected or had abnormal inflammation markers, and were treated with antibiotics despite negative blood cultures. PCR/ESI-MS detected frequently several bacteria in each patient, some of which were unusual in neonates. Therefore, the clinical significance of positive PCR/ESI-MS – but negative blood culture – is still not clear, limiting its use for antimicrobial stewardship actions.

Internal validity is enhanced by the prospective design, the appropriate sample size, and the absence of loss to follow-up. Some limitations must, however, be recognized. First, we only drew 0.2 to 0.5 mL of blood for the PCR/ESI-MS test, whereas the current recommended blood volume by the manufacturer is 5 mL. It's possible that the two false negative results might be due to small blood volume (0.15 and 0.2 mL) that was drawn. It is nevertheless important to acknowledge that we detect bacteria thanks to this system even with such small quantities of blood. Some authors have reported results with lower volumes (as low as 2 mL) [16,17,22]. However, as our NPV is similar to that reported in the RADICAL study [16], our experience suggests that it is possible to use such a low volume in our patient population in which this issue is of paramount importance. Probably, before a future randomised controlled study, it would be useful to test this hypothesis. Second, we did not perform an economical cost-benefit analysis of the PCR/ESI-MS test. This will have to be performed in future trials. Third, we could not re-test the blood cultures and the PCR/ESI-MS results of patients with discordant results. This control would be difficult to perform in preterm infants with small circulating blood volumes limiting the amount of blood available. Fourth, the inclusion criteria of “presumed sepsis” was left to the appreciation of the attending physician, without any standardized definition. However, there is no validated definition of neonatal sepsis. This allowed a pragmatic study design. Finally, we do not know the clinical implications of our results. Because of a “faster track” with PCR/ESI-MS, it would seem likely that an earlier result with a high NPV would be helpful to the clinician. However, the design of our study with batched results could not explore the impact of the change in care. This will have to be investigated in future randomized controlled trials.

In conclusion, we found that, in neonates with suspected sepsis, PCR/ESI-MS had a very good NPV when compared to blood cultures as gold standard. We think that the ability of this novel test to decrease unnecessary antibiotic treatment must be assessed in randomized controlled trials.

Funding

There is no financial interest or conflict of interest to report. Abbott was not involved in the trial design, data collection, analysis or interpretation. However, they provided the PCR/ESI-MS device and consumables. They also sponsored the participation to three scientific meetings where we presented preliminary results.

Contributorship

Dr. Delco and Dr. Karam conceptualized and designed the study, enrolled the patients, collected the data, analysed the results and drafted the initial manuscript.

Dr. Pfister, Dr. Gervais and Dr. Emonet reviewed the manuscript.

Mr. Renzi performed the tests.

Dr. Schrenzel designed the study, performed the tests and analysed the results.

Dr. Posfay-Barbe designed the study, analysed the results and reviewed and revised the manuscript.

Table 5

PCR/ESI-MS results for the 17 patients with positive PCR/ESI-MS but negative blood culture. Patients were categorized as truly infected (as assessed by treating physician who continued antibiotics despite negative blood cultures), possibly infected (defined as clinical or laboratory parameters of infection but antibiotics treatment of two to four days) and possibly not infected (neonate not infected).

	Organism detected	Clinical condition	CRP (mg/L)
Truly infected patients			
Patient A	<i>Citrobacter freundii</i>	Respiratory distress, metabolic acidosis, hypothermia	<10
Patient B	<i>Escherichia vulneris</i>	Respiratory distress, metabolic acidosis, prolonged refill time	35
	<i>Staphylococcus comi</i>		
Patient C	<i>Staphylococcus aureus</i>	Prolonged refill time	50
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
Patient D	<i>Enterobacter</i> spp.	Prolonged refill time, thermal instability, thrombocytopenia	<10
Patient E	<i>Streptococcus</i> spp.	Respiratory distress, metabolic acidemia	72
	<i>Streptococcus mitis</i>		
	<i>Propionibacterium acnes</i>		
	<i>Gemella morbillorum</i>		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
Patient F	<i>Propionibacterium acnes</i>	Respiratory distress	84
	<i>Streptococcus</i> spp.		
Possibly infected patients	<i>Streptococcus mitis</i>	Respiratory distress, metabolic acidemia	24
	<i>Propionibacterium acnes</i>		
	<i>Streptococcus</i> spp.		
Patient H	<i>Streptococcus mitis</i>	Respiratory distress	36
	<i>Tsukamurella pulmonis</i>		
	<i>Propionibacterium acnes</i>		
	<i>Streptococcus</i> spp.		
Patient I	<i>Enterobacter cloacae</i>	Respiratory distress, thermal instability	33
	<i>Streptococcus mitis</i>		
	<i>Streptococcus</i> spp.		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
	<i>Citrobacter freundii</i>		
Patient J	<i>Propionibacterium acnes</i>	Respiratory distress, metabolic acidosis, prolonged refill time	36
Patient K	<i>Enterococcus cecorum</i>	Respiratory distress, metabolic acidosis	2
Possibly non-infected patients			
Patient L	<i>Streptococcus</i> spp.	Respiratory distress	<10
Patient M	<i>Streptococcus</i> spp.	Respiratory distress, metabolic acidemia, prolonged refill time	<10
Patient N	<i>Propionibacterium acnes</i>	Hyperthermia, metabolic acidemia	<10
Patient O	<i>Propionibacterium acnes</i>	Apnea, respiratory distress, prolonged refill time, arterial hypotension	<10
Patient P	<i>Propionibacterium acnes</i>	Respiratory distress, metabolic acidemia	<10
Patient Q	<i>Nocardia</i> spp.	Respiratory distress, arterial hypotension, metabolic acidemia, prolonged refill time	<10

All authors contributed to the manuscript and approved the final draft as submitted. All authors agree to be accountable for all aspects of the work.

Conflicts of interest

Nope.

References

- [1] L.J. Schlapbach, M. Aebischer, M. Adams, G. Natalucci, J. Bonhoeffer, P. Latzin, et al., Impact of sepsis on neurodevelopmental outcome in a Swiss National Cohort of extremely premature infants, *Pediatrics* 128 (2011) e348–e357.
- [2] A. Afshari, S. Harbarth, Procalcitonin as diagnostic biomarker of sepsis, *Lancet Infect. Dis.* 13 (2013) 382–384.
- [3] M. Meem, J.K. Modak, R. Mortuza, M. Morshed, M.S. Islam, S.K. Saha, Biomarkers for diagnosis of neonatal infections: a systematic analysis of their potential as a point-of-care diagnostics, *J. Glob. Health* 1 (2011) 201–209.
- [4] M. Paolucci, M.P. Landini, V. Sambri, How can the microbiologist help in diagnosing neonatal sepsis? *Int. J. Pediatr.* 2012 (2012) 120139.
- [5] D.J. Ecker, R. Sampath, C. Massire, L.B. Blyn, T.A. Hall, M.W. Eshoo, et al., Ibis T5000: a universal biosensor approach for microbiology, *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2008) 553–558.
- [6] C. Tziiala, A. Borghesi, G.F. Perotti, F. Garofoli, P. Manzoni, M. Stronati, Use and misuse of antibiotics in the neonatal intensive care unit, *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 25 (Suppl. 4) (2012) 35–37.
- [7] N. Tripathi, C.M. Cotten, P.B. Smith, Antibiotic use and misuse in the neonatal intensive care unit, *Clin. Perinatol.* 39 (2012) 61–68.
- [8] C.M. Cotten, S. Taylor, B. Stoll, R.N. Goldberg, N.I. Hansen, P.J. Sanchez, et al., Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants, *Pediatrics* 123 (2009) 58–66.
- [9] V.S. Kuppala, J. Meinzen-Derr, A.L. Morrow, K.R. Schibler, Prolonged initial empirical antibiotic treatment is associated with adverse outcomes in premature infants, *J. Pediatr.* 159 (2011) 720–725.
- [10] C.M. Cotten, S. McDonald, B. Stoll, R.N. Goldberg, K. Poole, D.K. Benjamin Jr., et al., The association of third-generation cephalosporin use and invasive candidiasis in extremely low birth-weight infants, *Pediatrics* 118 (2006) 717–722.
- [11] P. de Man, B.A. Verhoeven, H.A. Verbrugh, M.C. Vos, J.N. van den Anker, An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli, *Lancet* 355 (2000) 973–978.
- [12] D.P. Lancaster, D.F. Friedman, K. Chiotos, K.V. Sullivan, Blood volume required for detection of low levels and ultralow levels of organisms responsible for neonatal bacteremia by use of BACTEC Peds Plus/F, Plus Aerobic/F medium, and the BD BACTEC FX system: an in vitro study, *J. Clin. Microbiol.* 53 (2015) 3609–3613.
- [13] D.J. Ecker, R. Sampath, H. Li, C. Massire, H.E. Matthews, D. Toleno, et al., New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 10 (2010) 399–415.
- [14] Y. Kumar, M. Qunibi, T.J. Neal, C.W. Yoxall, Time to positivity of neonatal blood cultures, *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* 85 (2001) F182–F186.
- [15] J. Neu, Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenic theory leading to prevention, *Pediatr. Clin. North Am.* 43 (1996) 409–432.
- [16] J.L. Vincent, D. Brealey, N. Libert, N.E. Abidi, M. O'Dwyer, K. Zacharowski, et al., Rapid diagnosis of infection in the critically ill, a multicenter study of molecular detection in bloodstream infections, pneumonia, and sterile site infections, *Crit. Care Med.* 43 (2015) 2283–2291.
- [17] A. Bacconi, G.S. Richmond, M.A. Baroldi, T.G. Laffler, L.B. Blyn, H.E. Carolan, et al., Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and Candida infections in blood, *J. Clin. Microbiol.* 52 (2014) 3164–3174.

- [18] I.R. Makhoul, T. Smolkin, P. Sujov, I. Kassis, A. Tamir, R. Shalginov, et al., PCR-based diagnosis of neonatal staphylococcal bacteremias, *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005) 4823–4825.
- [19] BD BACTEC™ Peds Plus™/F Culture Vials; Becton, Dickinson and Company, 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA.
- [20] M.J. O'Dwyer, M.H. Starczewska, J. Schrenzel, K. Zacharowski, D.J. Ecker, R. Sampath, et al., The detection of microbial DNA but not cultured bacteria is associated with increased mortality in patients with suspected sepsis—a prospective multi-centre European observational study, *Clin. Microbiol. Infect.* 23 (208) (2017) e1–e6.
- [21] G. Warhurst, G. Dunn, P. Chadwick, B. Blackwood, D. McAuley, G.D. Perkins, et al., Rapid detection of health-care-associated bloodstream infection in critical care using multipathogen real-time polymerase chain reaction technology: a diagnostic accuracy study and systematic review, *Health Technol. Assess.* 19 (2015) 1–142.
- [22] T.G. Laffler, L.L. Cummins, C.M. McClain, C.D. Quinn, M.A. Toro, H.E. Carolan, et al., Enhanced diagnostic yields of bacteremia and candidemia in blood specimens by PCR-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Clin. Microbiol.* 51 (2013) 3535–3541.