

Apport de la *polymerase chain reaction* (PCR) en temps réel dans le diagnostic du sepsis sévère en réanimation

Usefulness of real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of intensive care unit-acquired infections

C. Loïez · M. Titécat · F. Wallet

Reçu le 10 décembre 2012 ; accepté le 22 janvier 2013
© SRLF et Springer-Verlag France 2013

Résumé Les méthodes de *polymerase chain reaction* (PCR) en temps réel peuvent détecter rapidement dans le sang des patients un large panel de micro-organismes. Elles présentent donc un intérêt dans la prise en charge des patients en permettant de documenter les états infectieux graves notamment en réanimation, ce d'autant que ces patients sont souvent sous antibiotiques au moment du prélèvement. Les kits commercialisés, dont le plus expertisé dans la littérature est le LightCycler® SeptiFast, fournissent 1,5 à 2 fois plus de résultats positifs comparés aux hémocultures. Cependant, si l'obtention de l'identification est rapide par ces kits couvrant 90 % des micro-organismes rencontrés en réanimation, peu de cibles renseignant sur la résistance aux antibiotiques sont disponibles. Or, compte tenu des résistances portées par ces micro-organismes, la nécessité de rendre aux cliniciens un antibiogramme est primordiale et les techniques de bactériologie conventionnelles sont loin d'être obsolètes. Un résultat d'identification rapide positif pour une bactérie spécifique permettrait donc uniquement de décrétement l'antibiothérapie afin de diminuer la pression de sélection. Ces techniques de PCR en temps réel doivent être interprétées en fonction du contexte clinique et il est important de s'interroger sur la signification d'un signal d'acide désoxyribonucléique (ADN) positif, sachant que celui-ci ne présage pas de la viabilité du micro-organisme : quelle est la pertinence clinique d'une ADNémie bactérienne ou fongique ? Signifie-t-elle la présence d'un réel sepsis ? Peut-on au plan pronostique accorder un crédit à un signal positif alors que les hémocultures restent négatives ? C'est pourquoi un tel résultat doit toujours être interprété selon le tableau bioclinique du patient. Enfin, la rentabilité de ces

tests de PCR en temps réel doit intégrer la notion de coût. C'est pourquoi ces techniques sont à réserver aux patients sévères en réanimation. De plus, le panel des pathogènes reconnus ainsi que les cibles de résistance aux antibiotiques devraient être plus larges pour que cette technologie puisse, à l'avenir, être utile à la prise en charge rapide du sepsis.

Mots clés PCR en temps réel · LightCycler® SeptiFast · Sepsis · Hémocultures · Réanimation

Abstract Real-time polymerase chain reaction (PCR) methods are able to rapidly detect a wide panel of microorganisms. These methods are of interest in critically ill patients to determine the presence of bacteria in blood samples, especially in patients with prior antimicrobial treatment. In the intensive care unit (ICU), the most frequently used kit is the LightCycler® SeptiFast (LC-SF) Test providing 1.5- to 2-fold higher positivity rate compared with conventional blood cultures. Although identification of the bacterium by LC-SF is rapid and sensitive, susceptibility test can not be performed using this technique, except for methicillin-resistance of *Staphylococci*. Thus conventional cultures remain necessary for blood samples due to the high incidence of multidrug-resistant bacteria in the ICU and the need of antimicrobial susceptibility in order to initiate appropriate antimicrobial treatments. A negative result for a Gram positive or negative bacterium could allow deescalating the initial antimicrobial treatment, decreasing the pressure of selection. Moreover, it is necessary to the clinicians to understand and interpret a deoxyribonucleic acid (DNA) signal knowing that a dead bacterial material may be detected in a patient without any infection. What is the clinical relevance of bacterial DNA present in the blood? Does the DNAemia reflect a true infection? Does a positive DNA signal without positive blood cultures correspond to an unfavorable outcome? Cost-effectiveness of the real-time PCR should be investigated. Meanwhile, this test should be restricted to severe clinical situations, especially

C. Loïez · M. Titécat · F. Wallet (✉)
Université Lille-Nord de France, F-59000 Lille, France
e-mail : frederic.wallet@chru-lille.fr

Institut de microbiologie, centre de biologie-pathologie,
CHU de Lille, boulevard du Professeur-Leclercq,
F-59000 Lille, France

to ICU patients with severe sepsis. In the future, real-time PCR tests should include more pathogens and antimicrobial resistance targets.

Keywords Real-time PCR · SeptiFast[®] Test · Blood cultures · Sepsis · Intensive care unit

Introduction

Le sepsis sévère est une pathologie retrouvée chez 75 % des patients hospitalisés en réanimation [1]. Il est associé à une augmentation de la durée de séjour en réanimation, jusqu'à huit jours supplémentaires en comparaison avec des patients sans sepsis sévère [2]. La moitié du coût thérapeutique (médicaments et nutrition) est attribuée au traitement antimicrobien chez ces patients [3]. De plus, le sepsis acquis en réanimation est associé à une mortalité accrue [4]. En cas de sepsis grave, la thérapie antimicrobienne appropriée peut être cruciale pour le patient, augmentant sa survie de 25 à 45 % [5,6].

La documentation microbiologique du sepsis est primordiale. Elle conditionne le traitement antibiotique qui doit être débuté précocement en adéquation avec les micro-organismes potentiellement en cause afin de diminuer la mortalité et la morbidité [7–9]. Ainsi, une prise en charge rapide est recommandée pour le sepsis sévère. Une antibiothérapie inappropriée est associée à une augmentation de la mortalité, notamment dans les bactériémies dues à *Staphylococcus aureus* [10] et à *Pseudomonas aeruginosa* [11,12].

Actuellement, le moyen de documenter un sepsis grave est de réaliser des hémocultures, considérées comme le *gold standard* pour mettre en évidence les micro-organismes viables dans l'échantillon de sang. Les souches bactériennes isolées du sang peuvent être identifiées, comparées avec celles retrouvées au niveau d'une porte d'entrée éventuelle, et la sensibilité aux antibiotiques peut être déterminée. L'adéquation entre antibiogramme et traitement mis en œuvre est un paramètre important, comme l'ont montré plusieurs études dans lesquelles un traitement inadéquat est un facteur de risque indépendant de mortalité et d'échec de traitement chez ces patients de réanimation [7,13]. Cependant, si l'automatisation a permis de nets progrès, le rendement des hémocultures reste dépendant de plusieurs facteurs. En effet, le faible inoculum sanguin en cas de sepsis, le faible volume de sang prélevé [14], le délai entre l'échantillonnage et l'incubation, l'antibiothérapie préalable sont autant de paramètres influençant la sensibilité de la culture de sang. De plus, les cliniciens doivent attendre entre 48 à 72 heures après la réalisation des prélèvements pour obtenir une identification et un antibiogramme. Pendant les 24 premières heures de sepsis évoqué cliniquement, l'antibiothérapie initiale est donc le plus souvent probabiliste. Elle est rapportée pour être inadaptée (c'est-à-dire, un ou plusieurs

pathogènes non couverts ou résistants aux antibiotiques choisis) dans 10–60 % des cas selon les études [8,15]. Cette antibiothérapie inadaptée est associée à une mortalité s'étendant de 10–50 % [7,16], à l'apparition de résistance aux antibiotiques en réanimation [8] et à une augmentation de la durée de séjour à l'hôpital [17,18].

Diagnostic par PCR en temps réel

Dans ce contexte, des tests diagnostiques plus sensibles donnant une réponse rapide au clinicien sont nécessaires à la documentation microbienne des sepsis sévères pour permettre d'améliorer le traitement antimicrobien chez ces patients de réanimation. Ces nouvelles technologies sont fondées sur la détection d'acides nucléiques des bactéries ou des champignons utilisant l'amplification génique. Après une première étape d'extraction et de purification d'acide désoxyribonucléique (ADN), ces méthodes peuvent détecter des cibles de micro-organismes :

- soit à partir de flacons d'hémocultures incubés et détectés positifs avec une première orientation donnée par l'examen microscopique à la coloration de Gram ;
- soit directement dans des échantillons biologiques dont le sang notamment.

Actuellement, les techniques de *polymerase chain reaction* (PCR) à partir de flacons d'hémocultures positifs sont concurrencées par la spectrométrie de masse *matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight-mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) réalisée sur le culot de centrifugation lavé du bouillon d'hémoculture. Ainsi, une identification rapide des micro-organismes détectés dans les flacons d'hémocultures positifs lors des bactériémies peut être obtenue avec des taux d'identification supérieurs à 80 %, dans un délai de 20 à 90 minutes, à partir d'un signal positif de détection signant un inoculum de l'ordre de 10^6 UFC/ml [19–21]. D'une manière générale, les bactéries à Gram négatif sont mieux identifiées que les bactéries à Gram positif [22] et les hémocultures polymicrobiennes peuvent poser problème, car la spectrométrie ne permet pas toujours de pouvoir différencier les spectres rendus. C'est pourquoi dans la suite de cette présentation, l'utilisation de la PCR sera centrée sur son application directe dans les prélèvements biologiques sans phase de préculture dans un bouillon d'enrichissement de type hémoculture [23–25].

Les contraintes d'accréditation des réactifs de laboratoire de la Communauté européenne in vitro diagnostic (CE-IVD) permettent, dans le cadre de cette présentation, l'utilisation de cinq principaux kits commerciaux disponibles regroupés dans le Tableau 1 en fonction de leur panel de bactéries et de gènes de résistance aux antibiotiques.

La technique PCR en temps réel combine l'amplification et la détection des produits amplifiés dans une étape de

Kit	Technique	Gène de résistance	Nombre de pathogènes détectables	Évaluation clinique
LightCycler® SeptiFast	Multiplex PCR temps réel	<i>mecA</i>	10 bactéries à Gram négatif, 9 bactéries à Gram positif et 6 champignons	Oui
SepsiTest®	PCR + séquençage	0	> 300 espèces	Oui
VYOO	Multiplex PCR + électrophorèse	<i>mecA, vanA, vanB, vanC, bla_{SHV}</i>	18 bactéries à Gram négatif, 10 bactéries à Gram positif et 6 champignons	Oui
Plex-ID® (Abbott Ibis Biosciences, États-Unis)	Multiplex PCR + spectrométrie de masse electro spray	<i>mecA, vanA, vanB, vanC, bla_{SHV}</i>	> 3 000 espèces	Non
MagicPlex® (SeeGene, Corée)	Multiplex PCR temps réel	<i>mecA, vanA, vanB</i>	11 bactéries à Gram négatif, 73 bactéries à Gram positif et 6 champignons	Non

réaction unique. La PCR en temps réel est plus rapide, sensible et précise que la PCR conventionnelle avec un risque de contamination moindre. Comme dans toute PCR, la première étape d'extraction d'ADN à partir du prélèvement de sang doit être validée par un contrôle interne extrait et amplifié dans le même temps pour détecter l'inhibition de la réaction et prouver la validité de la méthode. L'avantage des kits commerciaux de PCR en temps réel est d'inclure un témoin d'extraction et de valider cette étape.

De nombreuses cibles peuvent être amplifiées par PCR en temps réel. Les plus intéressantes sont des cibles « universelles » capables de détecter un large panel de bactéries et de champignons. La cible la plus exploitée est la région située entre l'ADN ribosomal 16S et 23S pour les bactéries et la région située entre l'ADN ribosomal 18S et 5,6S pour les champignons. Ces cibles contiennent des régions variables et polymorphes permettant une bonne discrimination des espèces bactériennes et fongiques avec utilisation d'amorces de PCR dégénérées correspondant à des régions conservées au sein de l'ADN codant pour ces ARN 16S ou 18S.

Utilisation des kits de PCR en temps réel dans le sepsis

LightCycler® SeptiFast Test (LC-SF) [Roche, Allemagne]

Il s'agit du kit de PCR en temps réel qui a été le plus évalué dans la littérature dans le cadre du sepsis.

Études concernant uniquement les services de réanimation

Cinq études publiées utilisant LC-SF ont inclus des patients suspects de sepsis sévère hospitalisés en réanimation [26–30] (Tableau 2). Dans trois de ces cinq études, LC-SF a donné 1,5 à 2 fois plus de résultats positifs comparativement aux hémocultures conventionnelles. L'étude prospective de Maubon et al. [30] menée sur 110 patients ayant des tumeurs solides ou des hémopathies hospitalisés en réanimation a permis également d'apprécier les performances

Références	Patients	Nombre échantillons HC/LC-SF	Résultats positifs HC/LC-SF (%)	Performance LC-SF <i>gold standard</i> clinicobiologique ^a (%)
[26]	108	453	12,8/25,2	Se = 83 ; Sp = 93 ; VPN = 95
[27]	50	90	16/17	Se = 82 ; Sp = 95
[28]	142	236	16,5/34,7	NF
[29]	72	100	10/15	Se = 78 ; Sp = 99 ; VPP = 93 ; VPN = 95
[30]	110	110	29/26	Se = 51 ; Sp = 83 ; VPP = 74 ; VPN = 69

^a *Gold standard* clinicobiologique : caractéristiques cliniques et autres résultats microbiologiques du patient.
Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative ; HC : hémocultures ; LC-SF : LightCycler® SeptiFast Test ; NF : non fait.

suyvantes des hémocultures versus LC-SF en prenant un *gold standard* basé sur des critères cliniques et biologiques : sensibilité : 47/51 % ; spécificité : 95/83 % ; valeur prédictive positive : 90/74 % ; valeur prédictive négative : 66/69 %. Quand les performances de LC-SF sont similaires aux hémocultures, un test LC-SF exécuté en temps réel dans le laboratoire permet un résultat d'identification bactérienne ou fongique en six à huit heures sans préincubation. Même si les hémocultures sont rapidement positives (moyenne : 18–20 heures), le retard à obtenir l'identification du micro-organisme est lié au temps de croissance des bactéries (18 heures) décalant l'identification au jour suivant. Ainsi, l'utilisation du test de PCR en temps réel permettrait de diminuer le nombre des traitements antimicrobiens inadéquats.

Études concernant les services de réanimation et autres services

D'autres études ont intégré l'utilisation du LC-SF à la fois chez des patients de réanimation et des patients hospitalisés dans d'autres unités médicales ou d'urgence [31–35]. Dans ces études, il est difficile d'extraire les résultats concernant seulement les patients de réanimation. Cependant, le taux de résultats positifs est toujours supérieur avec LC-SF en comparaison des hémocultures. L'étude de Dierkes et al. [33] a montré pour 101 échantillons (83 exécutés chez des patients de réanimation) correspondant à 77 patients (66 patients de réanimation), 21 % d'hémocultures positives contre 27 % de LC-SF positifs. Ce test a été aussi rétrospectivement évalué chez 34 patients présentant un sepsis sévère en réanimation néonatale [34]. Les hémocultures étaient positives chez trois patients tandis que LC-SF donnait sept patients positifs. L'étude japonaise récente [35] portant sur 407 prélèvements de sang correspondant à 212 patients soupçonnés de syndrome inflammatoire de réponse systémique (SIRS) en réponse à une infection et hospitalisés dans des services de chirurgie, d'hématologie, d'urgence et de réanimation montrait un test LC-SF positif dans 11,3 % des échantillons de sang versus 8 % d'hémocultures positives, avec un gain significatif chez les patients recevant des antibiotiques.

Études réalisées dans les services différents de la réanimation

D'autres études ont évalué LC-SF chez des patients non hospitalisés en réanimation, en particulier des patients immunocompromis et neutropéniques [36–39] ou dans des services d'urgences [40,41]. Les résultats obtenus chez les patients d'hématologie étaient particulièrement intéressants lorsque les patients étaient déjà traités par des agents antimicrobiens et mettaient en évidence une détection plus rapide des étio-

logies de sepsis et particulièrement *Aspergillus fumigatus*. Aux urgences, l'étude de Tsalik et al. [40] réalisée sur 263 patients soupçonnés d'infection a montré que le test LC-SF était moins pertinent, fournissant les mêmes résultats que les hémocultures (sensibilité et spécificité de 20 et 100 % contre 25 et 95 %, respectivement), cependant dans un délai plus court. De même Avolio et al. [41] ont rapporté, dans une cohorte de 144 patients soupçonnés de bactériémies avec au moins deux critères de SIRS et admis aux urgences, 40/144 (28 %) LC-SF positifs contre 43/144 (30 %) hémocultures. LC-SF a identifié 7/144 bactériémies non détectées par hémocultures. Les auteurs ont conclu que cette performance réduite aux urgences par rapport aux réanimations était certainement due à la fréquence plus faible des bactériémies avec des inoculi potentiellement inférieurs.

Autres tests commerciaux

La littérature concernant les autres kits commercialisés pouvant être utilisés dans la démarche diagnostique lors du sepsis est beaucoup moins fournie par rapport au LC-SF. Ainsi, SeptiTest[®]VYOO (Molzylm, Molecular Diagnostics, Allemagne) a été évalué sur 187 patients dont 79,1 % étaient hospitalisés en réanimation pour SIRS [42]. Comparé aux hémocultures, ce test présentait une sensibilité et une spécificité de 87 et 85,8 % respectivement avec une concordance de 86 %. Les discordances PCR positives/hémocultures négatives, chez ces patients septiques, étaient en réalité de vraies PCR positives soit expliquées par une antibiothérapie préalable au prélèvement ayant conduit à la négativité des hémocultures, soit authentifiées par la positivité d'autres sites anatomiques avec le même agent que celui retrouvé en PCR. Les discordances PCR négatives/hémocultures positives étaient, quant à elles, principalement dues à des staphylocoques à coagulase négative retrouvés dans les hémocultures et considérés comme contaminants. L'avantage de ce kit est le large panel de micro-organismes pouvant être détectés. Le SeptiTest[®]VYOO (SIRS-Lab, Allemagne) a été évalué sur 72 patients en réanimation [43]. Sur les 72 patients présentant un SIRS, 20 et 35 présentaient respectivement des hémocultures positives et d'autres prélèvements microbiologiques positifs : seuls 51,4 % de ces patients avaient un test moléculaire positif. A contrario, 29,4 % de patients septiques sans documentation microbiologique conventionnelle présentaient un test VYOO positif. Un cas d'hémoculture positive à *Candida albicans* était pris en défaut par le test moléculaire. Deux tests moléculaires positifs à *Streptococcus pneumoniae* et *Morganella morganii*, compatibles avec des tableaux de sepsis ne retrouvaient aucune documentation bactériologique. Les auteurs concluaient à une concordance entre test moléculaire et bactériologie conventionnelle de 46,2 %.

Avantages et limites de ces tests moléculaires

L'avantage de ces différents tests moléculaires quand ils sont utilisés théoriquement en temps réel dans les services de réanimation est de pouvoir rendre un résultat plus précocement que celui obtenu par les hémocultures quant à l'identification de l'agent microbien dans le sepsis. Ainsi, au plan écologique, le clinicien pourrait restreindre la pression de sélection des antibiotiques, en fonction de son épidémiologie locale, en ciblant plus précisément les bactéries à Gram positif ou négatif détectées compte tenu que classiquement une bactériémie est le plus souvent monomicrobienne. Cependant, LC-SF et VYOO ont plusieurs limitations. D'abord, le panel restreint des micro-organismes détecté par ces techniques peut expliquer des résultats négatifs avec LC-SF ou VYOO et positifs par hémoculture avec un autre micro-organisme non inclus dans le kit (Tableau 1). Ce biais n'existe pas avec SeptiTest® qui couvre un très large panel. Avec LC-SF, une leucocytose supérieure à 30 000/mm³ peut expliquer une inhibition de la PCR par compétition entre ADN bactérien ou fongique et ADN génomique humain donnant potentiellement un faux-négatif. Enfin, ces kits commerciaux évalués ne disposent au maximum que de cinq marqueurs de résistance aux antibiotiques (Tableau 1) ne pouvant permettre aux microbiologistes et cliniciens de se passer des techniques conventionnelles d'antibiogramme sur les souches isolées afin de déterminer la sensibilité de l'agent microbien aux autres anti-infectieux non contenus dans ces kits moléculaires.

La détection d'ADN bactérien ou fongique dans le sang du patient pose une première question : celle de la pertinence clinique d'un tel signal. En effet, l'ADNémie reflète-t-elle une infection vraie compte tenu que ces kits moléculaires détectent un support génétique de micro-organismes sans présager de la vitalité du micro-organisme ? Un traitement antibactérien ou antifongique prescrit au moment des prélèvements peut expliquer des hémocultures négatives, les hémocultures ne constituant alors pas le bon *gold standard* pour évaluer ces nouvelles techniques. C'est pourquoi le résultat d'un test moléculaire devra toujours être interprété en fonction du contexte bioradioclinique du patient. Le sepsis sévère dans le cadre d'aspergillose invasive ne montre quasi jamais d'hémocultures positives à *Aspergillus* sp. alors que les antigènes circulants font partie des arguments biologiques à prendre en compte : il peut en être de même pour l'ADN fongique dans ces tableaux cliniques d'aspergillose invasive. A contrario, un signal d'ADN positif à *Staphylococcus epidermidis* sans plusieurs séries d'hémocultures positives est très difficile à interpréter sachant qu'il s'agit de l'espèce bactérienne le plus souvent rencontrée comme contaminant. La deuxième question soulevée concerne la valeur d'un signal ADN positif dans le cadre de sepsis sévère vrai avec des hémocultures négatives. Un tel signal présente

peut-être un intérêt en tant que marqueur pronostique. L'étude prospective de Bloos utilisant LC-SF menée en réanimation chirurgicale sur 142 patients à sepsis sévère a montré une mortalité plus importante chez les patients LC-SF positif versus LC-SF négatif (39,1 %/25,3 %, $p = 0,115$). De même, les études de Peters et al. et de Rello et al. [44,45] menées prospectivement sur 45 patients et sur 93 patients respectivement présentant une pneumonie à *S. pneumoniae* ont montré une corrélation entre ADNémie pneumococcique (gène *lytA*) augmentée et gravité du sepsis chez ces patients, même si les hémocultures étaient négatives, faisant de ce marqueur un facteur pronostique de prise en charge. Enfin, Chuang et al. [46] ont évalué rétrospectivement dans le sepsis sévère à *Acinetobacter baumannii* la clairance de l'ADN de cette bactérie dans la bonne prise en charge anti-infectieuse de cette infection (318 échantillons sanguins correspondant à 51 patients) montrant une adéquation entre une antibiothérapie efficace et la diminution dans le sang de la charge d'ADN de cette bactérie, ce qui en fait là encore un éventuel marqueur pronostique.

Conclusion

Ces nouvelles technologies fondées sur la PCR en temps réel doivent également être évaluées au plan de la rentabilité compte tenu du coût de l'analyse. En effet, elles restent encore très onéreuses et ne peuvent être appliquées à tous les contextes septiques en parallèle des hémocultures. Dans un premier temps, cet outil prometteur tant au plan diagnostique que pronostique, ne peut être réservé qu'aux patients présentant un sepsis sévère en réanimation ou aux patients hautement immunodéprimés. Il faut cependant garder en mémoire que les panels d'identification bactérienne peuvent être pris en défaut, même s'ils couvrent 90 % des micro-organismes retrouvés dans le sepsis. Enfin, il est difficile de se limiter aux marqueurs de résistance proposés par ces kits, et les techniques conventionnelles de cultures bactériennes sont loin d'être obsolètes pour tester les antibiotiques sur les bactéries isolées afin de rendre des notions de sensibilité aux cliniciens.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Esper A, Martin GS (2007) Is severe sepsis increasing in incidence and severity? Crit Care Med 35:1414–5
- Angus DC (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated cost of care. Crit Care Med 29:1303–10

3. Biswal S, Mishra P, Malhotra S, et al (2006) Drug utilization pattern in the ICU of a tertiary care hospital. *J Clin Pharmacol* 46:945–51
4. Laupland KB, Lee H, Gregson DB, Manns BJ (2006) Cost of intensive care unit-acquired bloodstream infections. *J Hosp Infect* 63:124–32
5. Rivers A, Nguyen B, Havstad S, et al (2001) Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 345:1368–77
6. Kumar A, Haery C, Paladugu B, et al (2006) The duration of hypotension before the initiation of antibiotic treatment is a critical determinant of survival in a murine model of *Escherichia coli* septic shock: association with serum lactate and inflammatory cytokine levels. *J Infect Dis* 193:251–8
7. Kollef MH (2000) Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 31:S131–S8
8. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, et al (2003) Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med* 115:529–35
9. Meehan TP, Fine MJ, Krumholz HM, et al (1997) Quality of care, process, and outcomes in elderly patients with pneumonia. *JAMA* 278:2080–4
10. Lodise TP, McKinnon PS, Swiderski L, Rybak MJ (2003) Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 36:1418–23
11. Kang CI, Kim SH, Kim H, et al (2003) *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis* 37:745–51
12. Lodise TP, Patel N, Kwa A, et al (2007) Predictors of 30-day mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3510–5
13. Zaragoza R, Artero A, Camarena JJ, et al (2003) The influence of inadequate empirical antimicrobial treatment on patients with bloodstream infections in an intensive care unit. *Clin Microbiol Infect* 9:412–8
14. Bouza E, Sousa D, Rodriguez-Creixems M, et al (2007) Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of bloodstream infections? *J Clin Microbiol* 45:2765–9
15. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, et al (2000) The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 118:146–55
16. Kollef KE, Schramm GE, Wills AR, et al (2008) Predictors of 30-day mortality and hospital costs in patients with ventilator-associated pneumonia attributed to potentially antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *Chest* 134:281–7
17. Paterson DL, Rice LB (2003) Empirical antibiotic choice for the seriously ill patient: are minimization of selection of resistant organisms and maximization of individual outcome mutually exclusive? *Clin Infect Dis* 36:1006–12
18. Lye DC, Earnest A, Ling ML, et al (2012) The impact of multi-drug resistance in healthcare-associated and nosocomial Gram-negative bacteraemia on mortality and length of stay: cohort study. *Clin Microbiol Infect* 18:502–8
19. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Munoz-Bellido JL, et al (2011) Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs extraction method. *Clin Microbiol Infect* 17:1007–12
20. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR (2010) Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48:444–7
21. Christner M, Rohde H, Wolters M, et al (2010) Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol* 48:1584–91
22. Schmidt V, Jarosch A, Marz P, et al (2012) Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:311–7
23. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, et al (2010) The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev* 23:235–51
24. Tissari P, Zumla A, Tarkka E, et al (2010) Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet* 16:224–30
25. Afshari A, Schrenzel J, Ieven M, Harbarth S (2012) Bench-to bedside review: rapid molecular diagnostics for bloodstream infection — a new frontier? *Crit Care* 16:222
26. Lehmann LE, Hunfeld KP, Steinbrucker M, et al (2009) Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis. *Intensive Care Med* 36:49–56
27. Dark P, Chadwick P, Warhurst G (2009) Detecting sepsis-associated bloodstream infection acquired in intensive care using multi-pathogen real-time PCR. *J Infect* 59:296–8
28. Bloos F, Hinder F, Becker K, et al (2009) A multicenter trial to compare blood culture with polymerase chain reaction in severe human sepsis. *Intensive Care Med* 36:241–7
29. Wallet F, Nseir S, Baumann L, et al (2010) Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin Microbiol Infect* 16:774–9
30. Maubon D, Hamidfar-Roy R, Courby S, et al (2010) Therapeutic impact and diagnostic performance of multiplex PCR in patients with malignancies and suspected sepsis. *J Infect* 61:335–42
31. Vince A, Zivodec Lepej S, Barsic B, et al (2008) LightCycler® SeptiFast assay as tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy. *J Med Microbiol* 57:1306–7
32. Louie RF, Tang Z, Albertson TE, et al (2008) Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* 36:1487–92
33. Dierkes C, Ehrenstein B, Siebig S, et al (2009) Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis. *BMC Infect Dis* 9:126–33
34. Paolucci M, Capretti MG, Dal Monte P, et al (2009) Laboratory diagnosis of late-onset sepsis in newborns by multiplex real-time PCR. *J Med Microbiol* 58:533–4
35. Yanagihara K, Kitagawa Y, Tomonaga M, et al (2010) Evaluation of pathogen detection from clinical samples by real-time polymerase chain reaction using a sepsis pathogen DNA detection kit. *Crit Care* 14:R159
36. Mancini N, Clerici D, Diotti R, et al (2008) Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* 57:601–4
37. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, et al (2009) Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *J Infect* 58:346–51
38. von Lilienfeld-Toal M, Lehmann LE, Raadts AD, et al (2009) Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J Clin Microbiol* 47:2405–10
39. Mauro MV, Cavalcanti P, Perugini D, et al (2012) Diagnostic utility of LightCycler® SeptiFast and procalcitonin assays in the

- diagnosis of bloodstream infection in immunocompromised patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73:308–11
40. Tsalik EL, Jones D, Nicholson B, et al (2010) Multiplex PCR to diagnose blood stream infections in patients admitted from the emergency department with sepsis. *J Clin Microbiol* 48:26–33
 41. Avolio M, Diamante P, Zamparo S, et al (2010) Molecular identification of bloodstream pathogens in patients presenting to the emergency department with suspected sepsis. *Shock* 34:27–30
 42. Wellinghausen N, Kochem AJ, Disqué C, et al (2009) Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-base PCR and sequence analysis. *J Clin Microbiol* 47:2759–65
 43. Fitting C, Palarto M, Adib-Conquy M, et al (2012) DNAemia detection by multiplex PCR and biomarkers for infection in systemic inflammatory response syndrome patients. *PlosOne* 7: e38916
 44. Peters RP, de Boer RF, Schuurman T, et al (2009) *Streptococcus pneumoniae* DNA load in blood as a marker of infection in patients with community-acquired. *J Clin Microbiol* 47:3308–12
 45. Rello J, Lisboa T, Lujan M, et al (2009) Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest* 136:832–40
 46. Chuang YC, Chang SC, Wang WK (2012) Using the rate of bacterial clearance determined by real-time polymerase chain reaction as a timely surrogate marker to evaluate the appropriateness of antibiotic usage in critical patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Crit Care Med* 40:2273–80