Détection rapide des résistances bactériennes

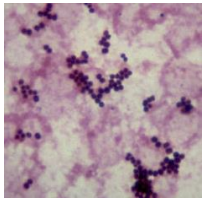
DUACAI
17 février 2022

Dr. Caroline Loïez

Les bases du diagnostic bactériologique

Diagnostic « classique »

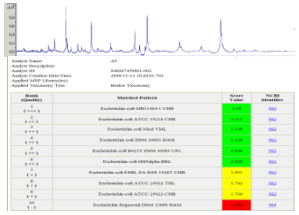
Examen microscopique avec **Gram**



Orientation diagnostique rapide

Culture

Incubation à 37°C 24h



Identification en
24 h (MALDI-TOF)
Antibiogramme en 48 h

Diagnostic moléculaire

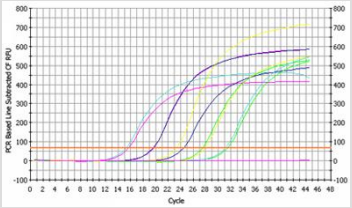
Extraction de l'ADN

PCR classique

Détection du produit amplifié

Électrophorèse
24 – 48 h
Pas d'antibiogramme

PCR en temps réel



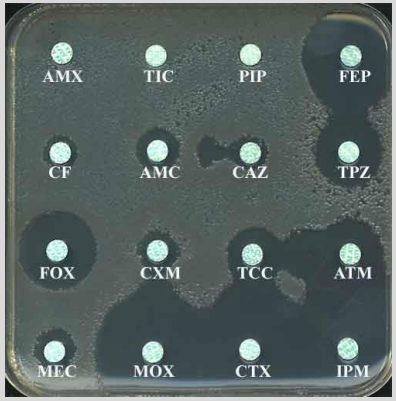
Résultat en
3 – 4 h
Pas d'antibiogramme

Techniques classiques : parfois trop longues mais irremplaçables

Antibiogrammes en routine

Référentiels : CA-SFM / EUCAST

ANTIBIOGRAMME EN DIFFUSION



ANTIBIOGRAMME AUTOMATISE

Susceptibility Information	Card: AST-P580		Lot Number: 360375210	Expires: Mar 23, 2017 12:00 SGT	
	Completed: Feb 5, 2016 20:50 SGT		Status: Final	Analysis Time: 8.75 hours	
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Benzylpenicillin	>= 0.5	R	Mupirocin		
Cefoxitin Screen	NEG	-	Nitrofurantoin	<= 16	S
Clindamycin	>= 8	R	Oxacillin	>= 4	R
Erythromycin	>= 8	R	Rifampicin	<= 0.5	S
Fosfomycin	<= 8	S	Teicoplanin	<= 0.5	S
Fusidic Acid	<= 0.5	S	Tetracycline	>= 16	R
Gentamicin	>= 16	R	Tigecycline	<= 0.12	S
Inducible Clindamycin Resistance	NEG	-	Tobramycin	>= 16	R
Levofloxacin	>= 8	R	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R
Linezolid	1	S	Vancomycin	<= 0.5	S
Moxifloxacin	4	R			

+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings:	Last Modified: Oct 13, 2015 15:45 SGT	Parameter Set: Global+Natural Resistance_SGH
Confidence Level:	Analysis not performed	

Méthodes phénotypiques vs génotypiques

Méthodes phénotypiques

- Avantages
  - Rendu du résultat en catégorie clinique S, I, R
  - Appréciation du niveau d'expression
  - Détection de nouveaux mécanismes
  - Faible coût
- Inconvénients
  - Nécessite une culture pure
  - Délai : 24-48H
  - Antibiothérapie probabiliste parfois non adaptée
  - Problème de détection de certaines résistances

Méthodes génotypiques

- Avantages
  - Peut-être réalisée sur tout type de prélèvement parfois sans culture préalable
  - Possibilité d'une réponse rapide < 2 heures
  - Antibiothérapie adaptée précoce
- Inconvénients
  - On ne détecte que ce que l'on connaît
  - Réponse : présence ou absence
  - On ne détecte pas le niveau d'expression (sauf quantification des ARNm)
  - Coût variable mais > méthode phénotypique
  - Faux négatifs : variabilité génique
  - Faux positifs : ADN ≠ INFECTION
- Délai
  - Meilleure prise en charge du patient (isolement, traitement)
  - Diminution du coût de l'antibiothérapie, des complications
  - Bactéries à croissance difficile (*M.tuberculosis, H. pylori*)
- Efficacité
  - Détection des SARM, des ERV, β-lactamases
- Mécanisme de résistance (épidémiologie)
  - β-lactamases

Phénotype ≠ Génotype

Attention : **l'information génétique n'est pas suffisante**

Interaction entre les gènes (sensibilité aux ATB) nécessite une analyse simultanée du phénotype

Pourquoi être plus rapide ?

- **Collectif : Repérer les patients colonisés à BMR**

- **Individuel : Adapter le plus rapidement possible le traitement antibiotique au microorganisme en cause pour permettre**
  - ✓ Diminution de la **mortalité**
  - ✓ Prévention de l'émergence de **résistance aux ATB**
  - ✓ Diminution de la **durée d'hospitalisation**

Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy and Its Effect on Survival in a Clinical Trial of Immunomodulating Therapy for Severe Sepsis

Stephan Harbarth, MD, MS, Jorge Garbino, MD, Jérome Pugin, MD, Jacques A. Romand, MD, Daniel Lew, MD, Didier Pittet, MD, MS

Am J Med. 2003 Nov;115(7):529-35.

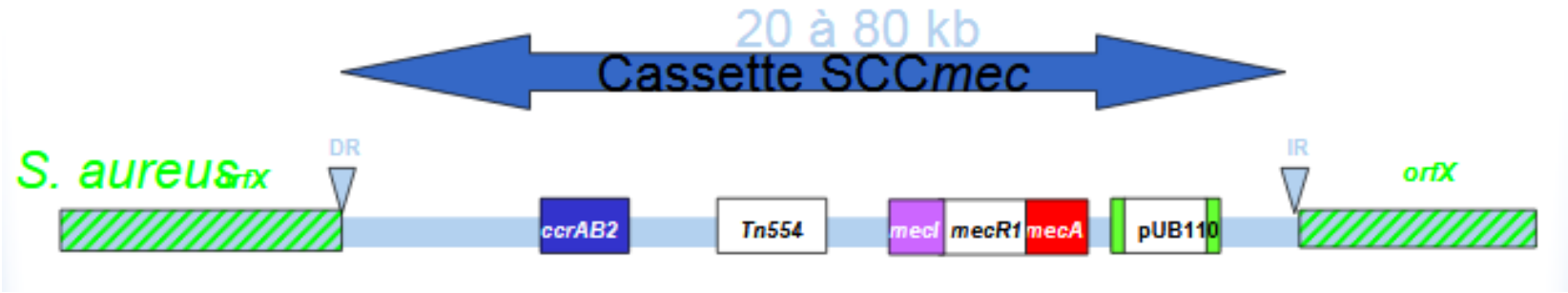
Résistance à la méticilline : SARM

Résistance due à l'acquisition d'une PLP additionnelle **PLP2a,**

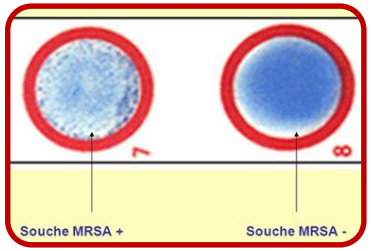
→ codé par le gène ***mecA*** inclus dans un élément génétique mobile la cassette **SCC*mec***

→ expression hétérogène

→ mauvaise affinité pour les β -lactamines (résistance croisée)

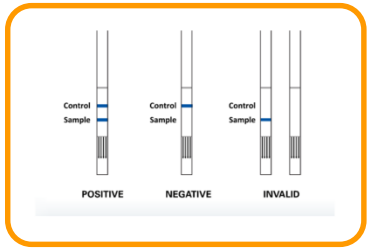


Détection phénotypique des SARM



Test Latex : technique d'agglutination

- Principe : agglutination latex-anticorps monoclonaux anti-PLPL2a
- A partir des colonies isolées
- Délai : 5 min
- Avantages : Test simple, rapide, non onéreux
- Limites : manque de sensibilité et de spécificité

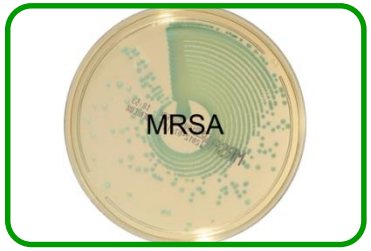


Test PBP2a : technique immunochromatographique

- Principe : bandelettes avec Ac anti-PLP2a
- A partir des colonies isolées
- Délai : 5 min
- Avantages : test simple, rapide, coût raisonnable
- Limites : nécessité d'une induction par une β-lactamine

Test BinaxNow® : technique immunochromatographique

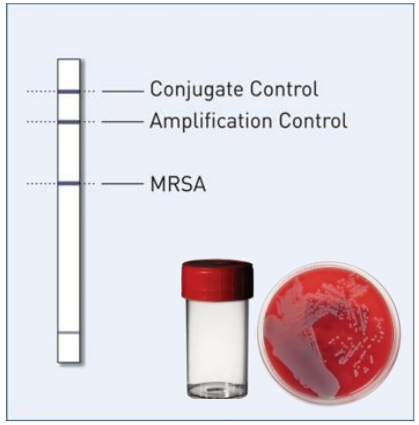
- Principe : carte avec Ac anti-PLP2a / Ac Staphylocoque
- A partir des hémocultures directement
- Délai : 30 min
- Avantages : test simple, rapide,
- Limites : coût et lourdeur technique et organisationnelle



Milieux chromogènes

- Principe : **Milieu chromogénique sélectif** contenant des **substrats chromogènes** permettant la coloration des colonies à la suite de sa dégradation par des enzymes bactériennes spécifiques et de la libération du chromophore, et des **antibiotiques**.
- A partir du prélèvement
- Délai : 18-24 heures
- Avantages : test simple, onéreux
- Limites : ne présume pas toujours du mécanisme de résistance en cause

Détection génotypique des SARM

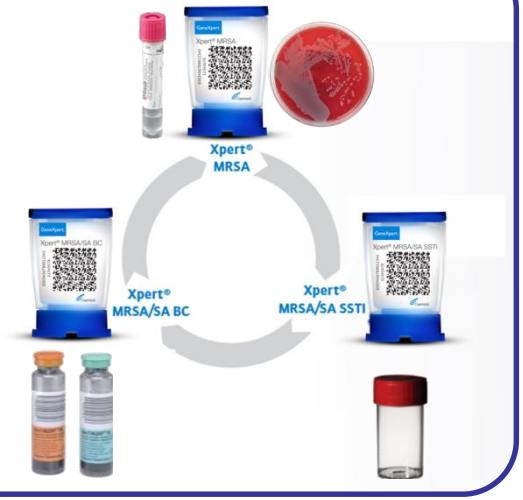


Genotype®MRSA Direct
(Hain Life Science)

Technique d'hybridation

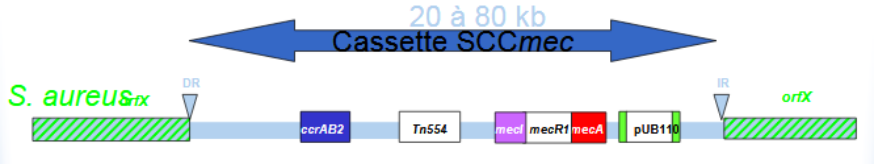
- Principe : utilisation de bandelettes avec sondes biotinylées permettant la détection d'un fragment spécifique du SARM combiné à la détection des SCC*mec* de type I-IV

- A partir des colonies et/ou du prélèvement
- Délai : 4 heures
- Limites : test lourd et coûteux
- Nécessité d'un inoculum suffisant quand sur les prélèvements



Techniques moléculaires

- Principe : mise en évidence du support génétique (*mec*A et SSC*mec*)



- A partir des colonies et/ou du prélèvement et/ou hémocultures
- Délai : 1 heure
- Avantages : test simple, rapide, sensible
- Limites : coût (attention : mélange bactérien)

Résistance à la vancomycine : ERV

Résistance due à une modification de la cible (modification enzymatique du site de fixation du glycopeptide

→ synthèse de précurseurs du peptidoglycane de faible affinité

(DAla-DLacPP ou Dala-DSerPP au lieu de Dala-DAlaPP)

→ élimination des précurseurs de faible affinité

Résistance	Acquise					Intrinsèque
	Haut niveau	Niveau variable	Niveau moyen	Bas niveau		Bas niveau
Type	VanA	VanB	VanD	VanG	VanE	VanC1/C2/C3
CMI (mg/L)						
Vancomycine	64 - 1000	4 - 1000	64 - 128	16	8-32	2 - 32
Teicoplanine	16 - 512	0,5 - 1	4 - 64	0,5	0,5	0,5 - 1
Espèce	*E. faecium* *E. faecalis* *E. gallinarum* *E. casseliflavus* *E. avium* *E. durans* *E. mundtii* *E. raffinosus*	*E. faecium* *E. faecalis* *S. bovis*	*E. faecium* *E. faecalis*	*E. faecalis*	*E. faecalis*	*E. gallinarum* *E. casseliflavus* *E. flavescens*
Expression	Inductible (Constitutive)		Constitutive	Inductible	Inductible Constitutive	Constitutive Inductible
Cible modifiée	D-Ala-D-Lac			D-Ala-D-Ser		

P. Courvalin 2004

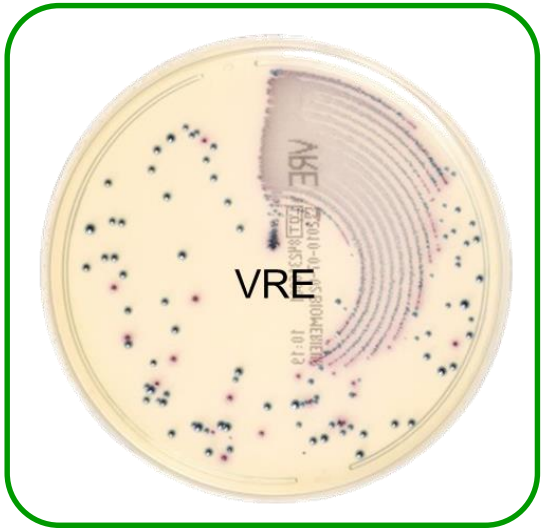
→ codé par les gènes ***van*** **:**

*van*A, B, D, G, E, C

- plasmidique (*van*A, *van*B)
- chromosomique (*van*C)

Détection phénotypique des ERV

Milieux chromogènes

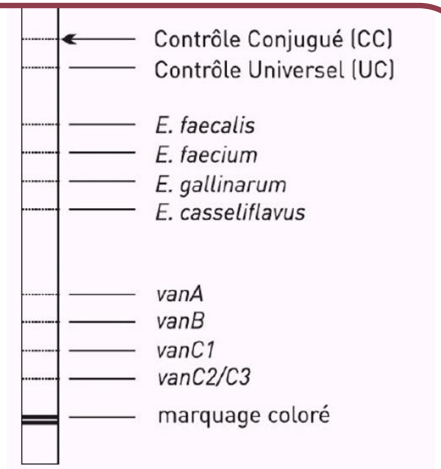


- Principe : **Milieu chromogénique sélectif** contenant des **substrats chromogènes** permettant la coloration des colonies à la suite de sa dégradation par des enzymes bactériennes spécifiques et de la libération du chromophore, et des **antibiotiques**.
  - **bleu-vert** = ***E. faecalis***
  - **violet** = ***E. faecium***

  Milieu contenant 8 mg/l de vancomycine et 2 substrats α-glucosidase et ß-galactosidase d'où inhibition de la croissance des entérocoques naturellement résistants et de bacilles à Gram négatif)

- A partir du prélèvement
- Délai : 18-24 heures
- Avantages : test simple
- Limites : test onéreux

Détection génotypique des ERV

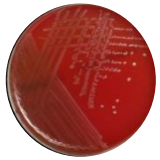


Genotype® Enterococcus
(Hain Life Science)

Technique d'hybridation

- Principe :
  - extraction d'ADN à partir des cultures
  - amplification avec des amorces biotinylées
  - Hybridation sur bandelettes
  - Révélation colorimétrique (streptavidine – PAL + substrat)

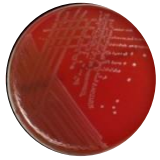
- A partir des colonies
- Délai : < 5 heures
- Limites : test lourd et coûteux



Techniques moléculaires

- Principe : mise en évidence du support génétique (*van*A et *van*B)

- A partir des colonies et/ou du prélèvement de dépistage
- Délai : 45 min
- Limites : test simple, rapide mais coûteux
- Attention : présence du gène *van*B chez d'autres bactéries



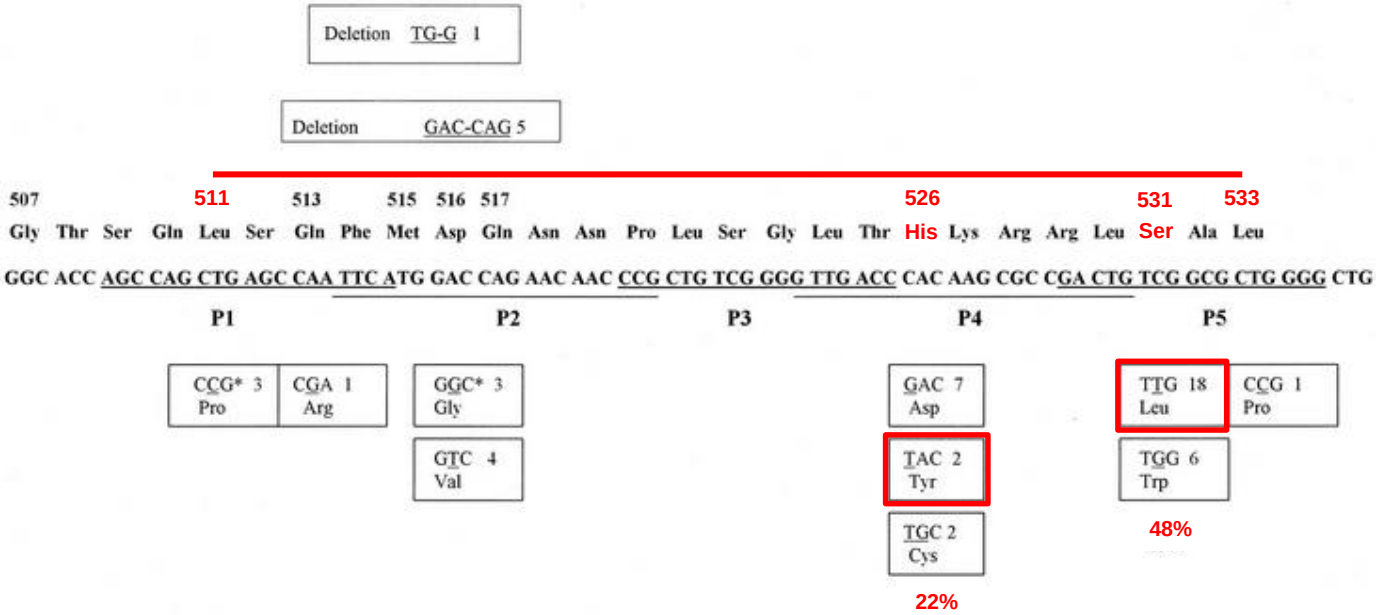
Résistance à la rifampicine : *M. tuberculosis*

Résistance liée à **:**

- des **mutations ponctuelles** dans la région 507-533 du gène *rpo*B codant la sous-unité β de l'ARN polymérase : Ser531Leu et His526Tyr (93 % entre les codons 511 et 533)
- des petites **insertions** et des **délétions**

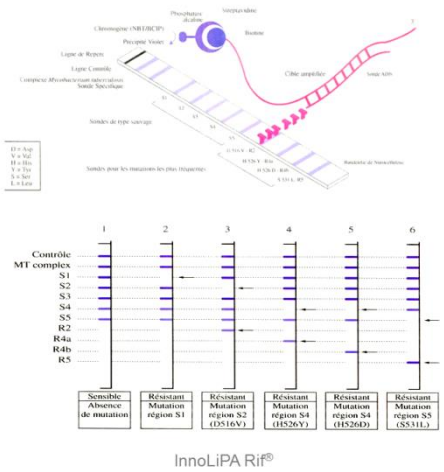
→ modification de l'enzyme, diminuant ainsi la fixation ou l'accessibilité de la rifampicine, et sont associées à un haut niveau de résistance.

- 90% des souches RIF-R sont résistants à l'isoniazide.
- La détection de la résistance à la rifampicine est donc un marqueur pour la détection des souches MDR.

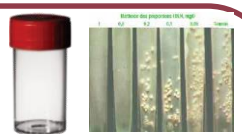


Détection génotypique des MDR

Technique d'hybridation



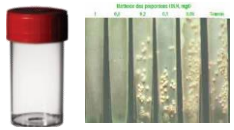
InnoLiPA Rif®



- Principe : Principe du **reverse dot-blot**
  Les produits d'amplification marqués à la biotine sont hybridés avec des oligonucléotides spécifiques, immobilisés sur une membrane de nitrocellulose. Les hybrides ainsi formés sont détectés par méthode colorimétrique.

- A partir des colonies et/ou du prélèvement dont l'ED est très positif
- Délai : 4 heures
- Avantage : détection rapide et facile des mutations les plus fréquentes du gène *rpo*B
- Limites : test lourd, coûteux qui ne détecte que les mutations connues
  Faux positifs positifs

Techniques moléculaires



- Principe : mise en évidence du support génétique *rpo*B

- A partir des colonies et/ou du prélèvement (crachat)
- Délai : 1 heure
- Limites : test simple, rapide mais coûteux (attention : mélange bactérien)

Résistance aux carbapénèmes : EPC

Classification d'Ambler

A
- ❑ Pénicillinases (TEM, SHV)
- ❑ BLSE de type TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES…
- ❑ **Sérine carbapénémases (KPC, GES…)**

B
- ❑ **Métallo-bêta-lactamases (VIM, IMP, NDM)**

C
- ❑ Céphalosporinases (AmpC)

D
- ❑ Oxacillinases (OXA)
- ❑ BLSE de type OXA
- ❑ **Oxa-carbapénémases (OXA-48, variants)**

β-lactamines

Pénicillines	Céphalosporines 5 générations	Monobactams Aztréonam	Carbapénèmes

β-lactamases

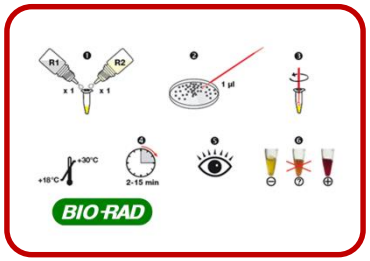
Class A penicillinases — ESBL — KPC

Class B metallo-enzymes — NDM, VIM, IMP

Class C cephalosporinases

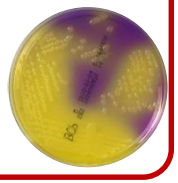
Class D oxacillinases — OXA-48

Détection phénotypique des EPC



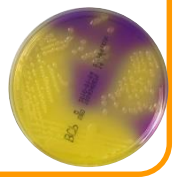
β CARBA Test : technique colorimétrique

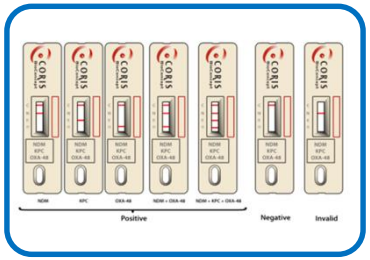
- Principe : test d'hydrolyse des carbapénèmes
- A partir des colonies isolées
- Délai : 10 min
- Avantages : test simple, rapide, non onéreux
- Limites : parfois couleur douteuse



Test RAPIDEC Carba NP : technique colorimétrique (valable pour *P.aeruginosa*)

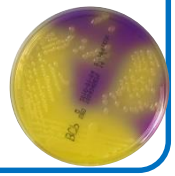
- Principe : Détection de l'acidification (virage indicateur coloré) liée à l'hydrolyse de l'imipéneme par les carbapénémases → identification des carbapénémases (A, B et D)
- A partir des colonies isolées
- Délai : 30 min à 2 h
- Avantages : test rapide, se / spe = 97,8%
- Limites : lecture parfois difficile

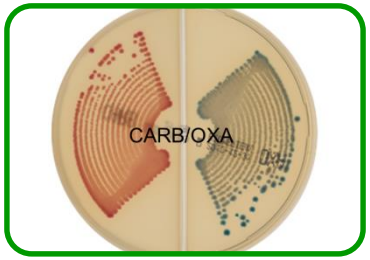




Test Coris : technique immunochromatographique

- Principe : détection avec des anticorps monoclonaux
- Directement à partir des colonies et des écouvillons de dépistage
- Délai : 5-10 minutes
- Avantage : test simple, rapide



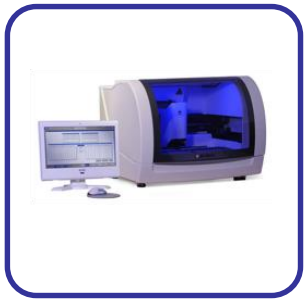


Milieux chromogènes

- Principe : **Milieu chromogénique sélectif** contenant des **substrats chromogènes** permettant la coloration des colonies à la suite de sa dégradation par des enzymes bactériennes spécifiques et de la libération du chromophore, et des **antibiotiques**.
- A partir du prélèvement
- Délai : 18-24 heures
- Limites : Test simple, +/- onéreux

Détection génotypique des EPC

Test unitaire



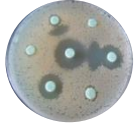
Tests par série

Techniques moléculaires

Principe : mise en évidence du support génétique
= KPC, NDM, VIM, IMP-1, OXA-48 et variants (y compris OXA-181 & OXA-232)

- A partir des colonies et/ou du prélèvement de dépistage
- Délai : 1 heure
- Limites : test simple, rapide mais coûteux

Résistance aux β-lactamines : E-BLSE



Résistance due à la production de β-lactamases

(enzymes capables d'hydrolyser le cycle β -lactam)

β-lactamines

Pénicillines	Céphalosporines 5 générations	Monobactams Aztréonam	Carbapénèmes

Classification d'Ambler

A
- ❑ Pénicillinases (TEM, SHV)
- ❑ **BLSE de type TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES…**
- ❑ Sérine carbapénémases (KPC, GES…)

B
- ❑ Métallo-bêta-lactamases (VIM, IMP, NDM)

C
- ❑ Céphalosporinases (AmpC)

D
- ❑ Oxacillinases (OXA)
- ❑ **BLSE de type OXA**
- ❑ Oxa-carbapénémases (OXA-48, variants)

β-lactamases

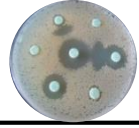
Class A penicillinases — ESBL — KPC

Class B metallo-enzymes — NDM, VIM, IMP

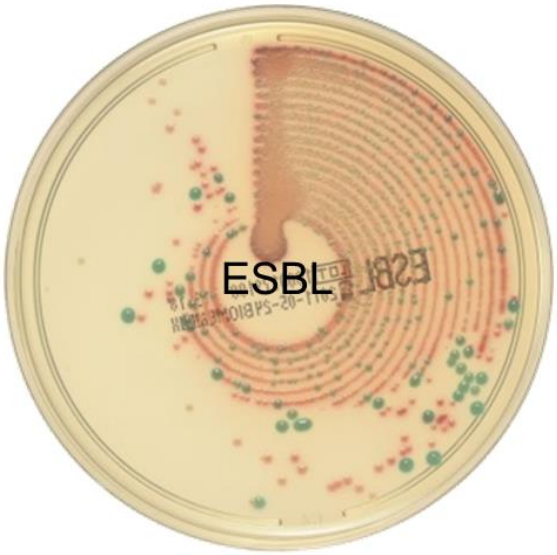
Class C cephalosporinases

Class D oxacillinases — OXA-48

Détection phénotypique des E-BLSE



Milieux chromogènes



- Principe : **Milieu chromogénique sélectif** contenant des **substrats chromogènes** permettant la coloration des colonies à la suite de sa dégradation par des enzymes bactériennes spécifiques et de la libération du chromophore, et des **antibiotiques (dont le cefpodoxime)**.
  → Isolement et identification des micro-organismes cibles en une seule étape, ce qui permet de raccourcir le temps de rendu du résultat

  - ***Escherichia coli*** :
    Coloration **rose** à **bordeaux** des souches productrices de ß-glucuronidase
  - ***Proteae* (*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*)** :
    Coloration **brune** à **marron** des souches exprimant une désaminase.
  - ***Klebsiella*, Enterobacter, *Serratia*, Citrobacter (KESC)** :
    Coloration **vert** / **bleu** à **vert-brun** des souches productrices de ß-glucosidase
  - **Inhibition sélective** des bactéries Gram positif et des levures
  - **Le caractère BLSE** doit être vérifié par la technique de synergie dite "en bouchon de champagne"

- A partir du prélèvement
- Délai : 18-24 heures
- Limites : Test simple, onéreux
- mais ne présume pas toujours du mécanisme de résistance en cause

Synthèse

	A partir des écouvillons de dépistage	A partir des prélèvements	A partir des flacons d'HC positifs	A partir des colonies
SARM	Milieux chromogènes Biologie moléculaire	Milieux chromogènes Biologie moléculaire Hybridation	Milieux chromogènes Immuno chromatographie Biologie moléculaire	Agglutination Immuno chromatographie Hybridation
ERV	Milieux chromogènes Biologie moléculaire	Milieux chromogènes	Milieux chromogènes	Hybridation Biologie moléculaire
EPC	Milieux chromogènes Biologie moléculaire	Milieux chromogènes	Milieux chromogènes	Colorimétrie Immuno chromatographie Biologie moléculaire
E-BLSE	Milieux chromogènes	Milieux chromogènes	Milieux chromogènes	
M. tuberculosis		Hybridation Biologie moléculaire		Hybridation Biologie moléculaire

T0	T12-15 h	T18-24 h

Détection phénotypique multiple

Technique qui va probablement se développer

MALDI-TOF

- Principe : **Recherche d'une modification du spectre d'un antibiotique**
  → après mise en contact pendant quelques heures de la souche à tester avec une solution d'antibiotique, mise en évidence de la **disparition du pic correspondant à cet antibiotique** et de l'**apparition d'un pic correspondant au(x) produit(s) d'hydrolyse de ce même antibiotique**.
- A partir de la souche ou directement d'un prélèvement
- Délai : 2-3 heures
- Avantages : peu coûteux si on dispose déjà de l'instrument
- Limites : Test nécessitant une mise au point fine

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) ☆

Marina Oviaño [a], Katrin Sparbier [b], Maria José Barba [a], Markus Kostrzewa [b], Germán Bou [a,*]

[a] Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Xubias de Arriba s/n, 3a Planta Ed. Sur, 15006 La Coruña, Spain
[b] Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany

Approche syndromique : PCR automatisée multiplex

Accessible à tous les laboratoires, quel que soit le personnel

FilmArray® (bioMérieux)

- Principe : détection de cibles d'acides nucléiques multiples : 16 à 27 cibles en fonction des panels (bactéries, parasites, virus et marqueurs de résistance)
- Délai : 1 h environ (2 min de préparation)
- Avantages : test unitaire, totalement automatisé
- Limites : coût 100-150 € / test + coût instrument (50k€)

A partir d'hémocultures positives :

- 33 pathogènes
- 10 gènes de résistance

Bactéries à Gram+	Bactéries à Gram–
Enterococcus faecalis *Enterococcus faecium* *Listeria monocytogenes* *Staphylococcus* *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis* *Staphylococcus lugdunensis* *Streptococcus* *Streptococcus agalactiae* *Streptococcus pyogenes* *Streptococcus pneumoniae*	*Acinetobacter calcoaceticus- baumannii complexe* *Bacteroides fragilis* *Enterobacterales* *Enterobacter cloacae complexe* *Escherichia coli* *Klebsiella aerogenes* *Klebsiella oxytoca* *Klebsiella pneumoniae groupe* *Proteus* *Salmonella* *Serratia marcescens* *Haemophilus influenzae* *Neisseria meningitidis* *Pseudomonas aeruginosa* *Stenotrophomonas maltophilia*
Levures	**Gènes de Résistance aux antibiotiques**
Candida albicans *Candida auris* *Candida glabrata* *Candida krusei* *Candida parapsilosis* *Candida tropicalis* *Cryptococcus neoformans/gattii*	**Carbapenemases** IMP KPC OXA-48-like NDM VIM **Résistance à la colistine** *mcr-1* **BLSE** CTX-M **Résistance à la méticilline** *mecA/C* *mecA/C* et MREJ (MRSA) **Résistance à la vancomycine** *vanA/B*

A partir de prélèvements respiratoires :

- 27 pathogènes
- 7 gènes de résistance

BACTÉRIES
(Résultats semi-quantitatifs)
Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complexe
Enterobacter cloacae complexe
Escherichia coli
Haemophilus influenzae
Klebsiella aerogenes
Klebsiella oxytoca
Groupe *Klebsiella pneumoniae*
Moraxella catarrhalis
Proteus spp.
Pseudomonas aeruginosa
Serratia marcescens
Staphylococcus aureus
Streptococcus agalactiae
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes

BACTÉRIES ATYPIQUES
(Résultats qualitatifs)
Chlamydia pneumoniae
Legionella pneumophila
Mycoplasma pneumoniae

VIRUS
Adénovirus
Coronavirus
Métapneumovirus humain
Entérovirus/rhinovirus humains
Virus de la grippe A
Virus de la grippe B
Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS CoV)
Virus parainfluenza
Virus respiratoire syncytial

GÈNES DE RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Résistance à la méticilline
mecA/C et MREJ

Carbapénémases
IMP
KPC
NDM
OXA-48-like
VIM

BLSE
CTX-M

A partir de liquides articulaires (non commercialisé) :

- 31 pathogènes
- 8 gènes de résistance

Limites des techniques moléculaires

- Culture = **technique de référence** pour la plupart des bactéries
  → accès aux souches
  - sensibilité aux antibiotiques
  - données épidémiologiques
  - mise en évidence de nouveaux mécanismes de résistance

- Validation **technique** = de plus en plus facile
  - Développement des kits commerciaux marqués CE-IVD +++
  - Accessible à tous : plus de nécessité d'un personnel dédié et qualifié
  - Problème de coût

- Validation **clinique** = problème d'interprétation
  - la présence d'ADN n'est pas synonyme de présence de bactéries vivantes
  - la présence du gène ne signifie pas que ce gène s'exprime

  → importance de la relation bio-clinique

- Coût +++ ↔ **Indications limitées** **(mais développement des approches syndromiques)**
  - Sepsis
  - Méningites
  - Dépistage BMR …

Domaines d'applications

A visée épidémiologique

Obtenir dans un délai bref un **diagnostic de quasi-certitude** ou **d'exclusion** d'une colonisation, dans une situation épidémiologique particulière

- SARM
- EPC
- ERV

- **Isolement rapide des patients porteurs de BMR**
- **Levée d'isolement plus rapide des patients non porteurs de BMR**
- **Gestion des épidémies / Limiter la propagation de la résistance bactérienne**
- **Décolonisation des patients SARM**

A visée thérapeutique

Gain pronostique pour les patients

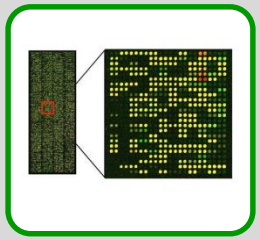
- Impact économique
- Impact clinique

- **Adaptation de l'antibiothérapie probabiliste en fonction de la présence ou non d'un gène de résistance**
- **Epargne thérapeutique**

Conclusion

- **En routine** = association des différents outils
  - détection rapide des SARM dans le dépistage nasal
  - détection rapide des E-BLSE et des EPC dans le dépistage anal
  - détection des ERV dans le dépistage anal
  - détection rapide des carbapénèmases à partir des souches isolées (plusieurs outils)
  - détection rapide de la résistance à la rifampicine à partir des crachats (ED +)

- **En développement**
  - détection des résistances enzymatiques sur MALDI-TOF
  - antibiogramme par génotypage
  - détection génotypique des E-BLSE (puces→ problème : coût +++)



ON NE PEUT DETECTER RAPIDEMENT que :

- ✓ la résistance à un antibiotique
- ✓ le support de résistance

JAMAIS, on ne pourra affirmer la sensibilité à un antibiotique avec les tests rapides actuels

PROBLEME PRINCIPAL : le coût +++

Nécessité de cibler certains patients dans certains services : réanimation…

Nécessité d'évaluations médico-économiques