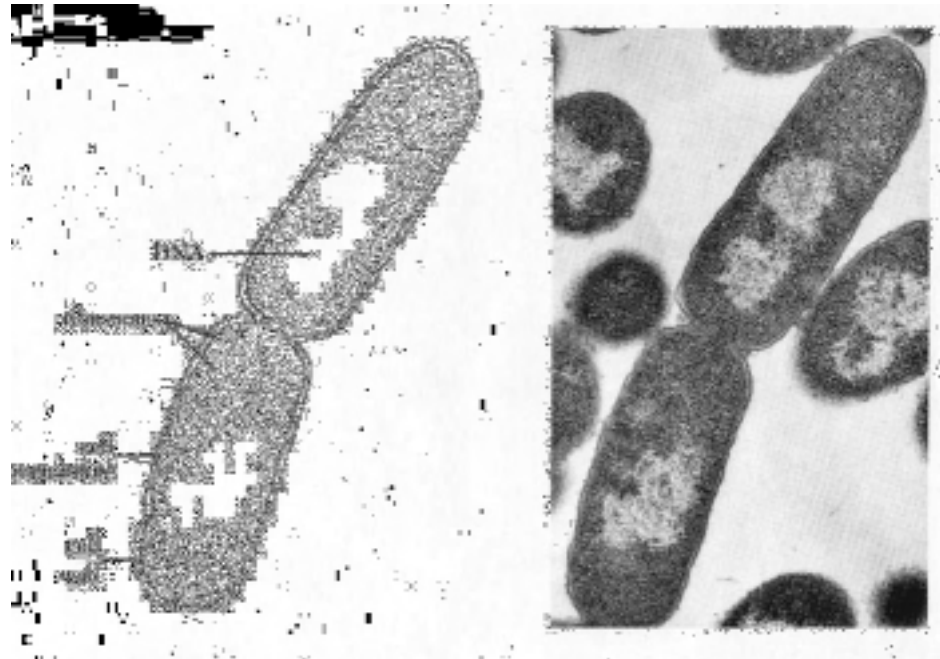


# Qu'attendre de la Biologie Moléculaire en Bactériologie



**Florence DOUCET-POPULAIRE**  
**Centre Hospitalier de Versailles**  
**Université Paris 5**

# Particularités liées à la Bactériologie

- ✓ Majorité des bactéries d'intérêt médical sont cultivables (Techniques plus ou moins longues mais peu coûteuses)
  - Bactérie non cultivable ou culture longue ou fastidieuse
- ✓ Flore commensale importante et variée
  - Recherche ciblée
- ✓ « Pathogénicité »
  - Quantification

**Rapport coût / efficacité**

# Réponse

- **Sensible (une copie)**
- **Spécifique (cible)**
- **Fiable (VPP et VPN élevées)**
- **Exacte (absence de faux négatifs et faux positifs)**
- **Rapide (<délai culture)**

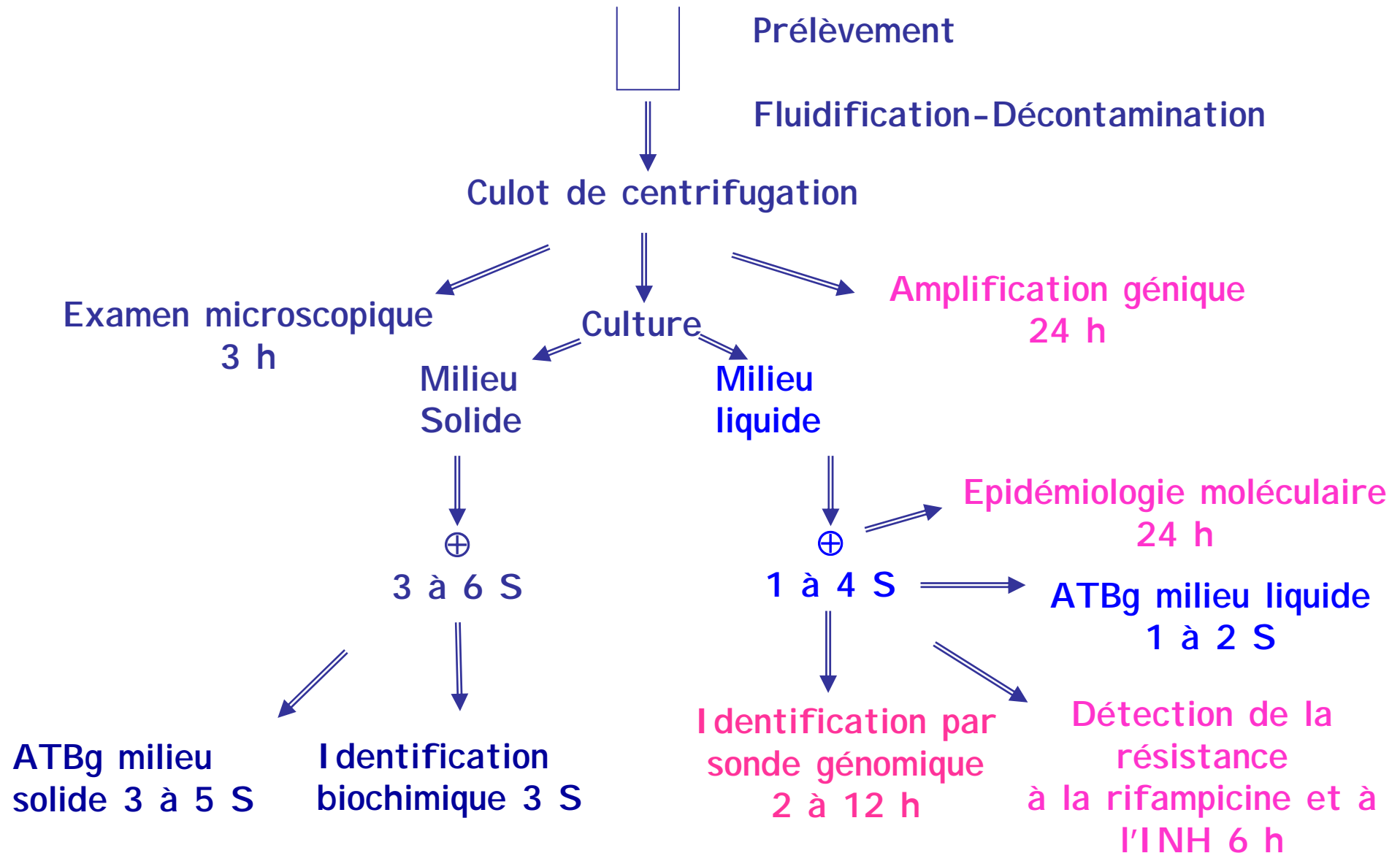
# Applications en Bactériologie des techniques de biologie moléculaire

- **Détection agent pathogène**
  - ✓ **Amplification génétique**
  
- **Identification**
  - ✓ **Sondes**
  - ✓ **Séquençage**
  
- **Détection des mécanismes de résistance**
  
- **Épidémiologie**
  - ✓ **Typage moléculaire**

# Diagnostic des infections à Mycobactéries

- **Amplification génique pour le diagnostic bactériologique de la tuberculose**
  - ✓ 1<sup>ère</sup> publication en 1989 (Brisson-Noël *et al.*, Lancet)
- **Fin des années 90, Commercialisation de kits d'amplification génique**
- **En parallèle, développement :**
  - ✓ des techniques d'identification par sonde
  - ✓ Détection de la résistance aux antituberculeux
  - ✓ Epidémiologie moléculaire
- **Début du 3<sup>ème</sup> millénaire ...**

# Diagnostic bactériologique de la Tuberculose en 2005



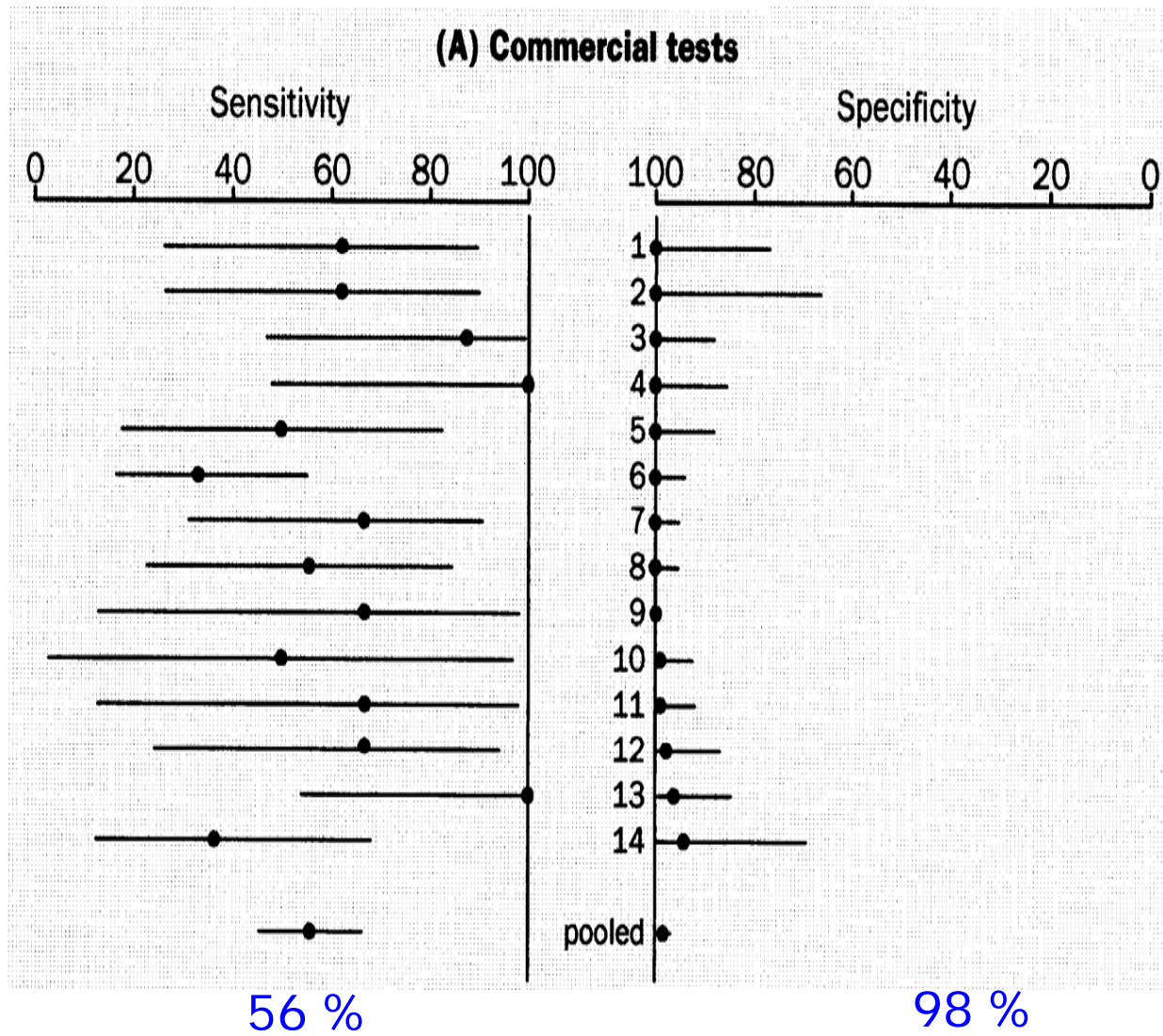
# Amplification Génique

Méthode	Sensibilité (%) Spécificité (%)	
	296 prélèvements pulmonaires	
<b>Examen microscopique</b>	<b>77</b>	<b>94</b>
<b>Culture</b>	<b>91</b>	<b>100</b>
<b>Cobasamplicor</b>		
<b>Tous prélèvements</b>	<b>94</b>	<b>100</b>
<b>μ +</b>	<b>99</b>	<b>100</b>
<b>μ -</b>	<b>75</b>	<b>100</b>
<b>AMTD</b>		
<b>Tous prélèvements</b>	<b>86</b>	<b>100</b>
<b>μ +</b>	<b>92</b>	<b>100</b>
<b>μ -</b>	<b>66</b>	<b>100</b>

## Résultats de Méta-analyses récentes sur l'exactitude des tests d'amplification génique pour la tuberculose

Publication	Nb d'études incluses	Type de tuberculose	Sensibilité	Spécificité
Sarmiento <i>et al.</i> 2003	50	Pulmonaire (μ-)	9 – 100%	25 – 100%
Piersimoni et Scarpuro, 2003	>50	Pulmonaire et extrapulmonaire	27 – 100%	91 – 100%
Pai <i>et al.</i> 2004	40	Pleurésie	20 – 100% (62%)	53 – 100% (98%)
Pai <i>et al.</i> 2003	49	Méningite	0 – 100%	0 – 100%





# Qu'attendre de l'Amplification Génique

- ☺ ✓ Réponse rapide (24 h)
- ✓ Bonne spécificité (95-100%)
- ☹ ✓ Manque sensibilité, notamment sur les prélèvements  $\mu$  -
  - ↳ Faux négatifs
    - Présence d'inhibiteur de l'amplification génique (1 à 5% des prélèvements respiratoires)
    - Faible volume analysé / culture
- ✓ Existence de faux positifs
  - Réaction croisée
  - Contaminations (séparation zones pré et post amplification)

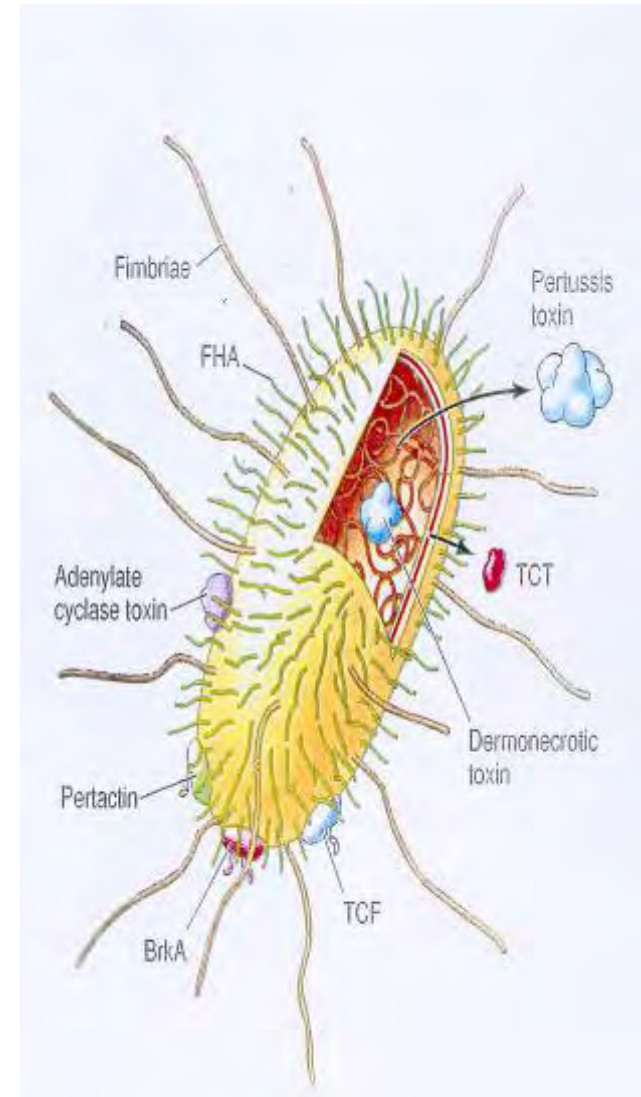
# Amplification Génique et Tuberculose

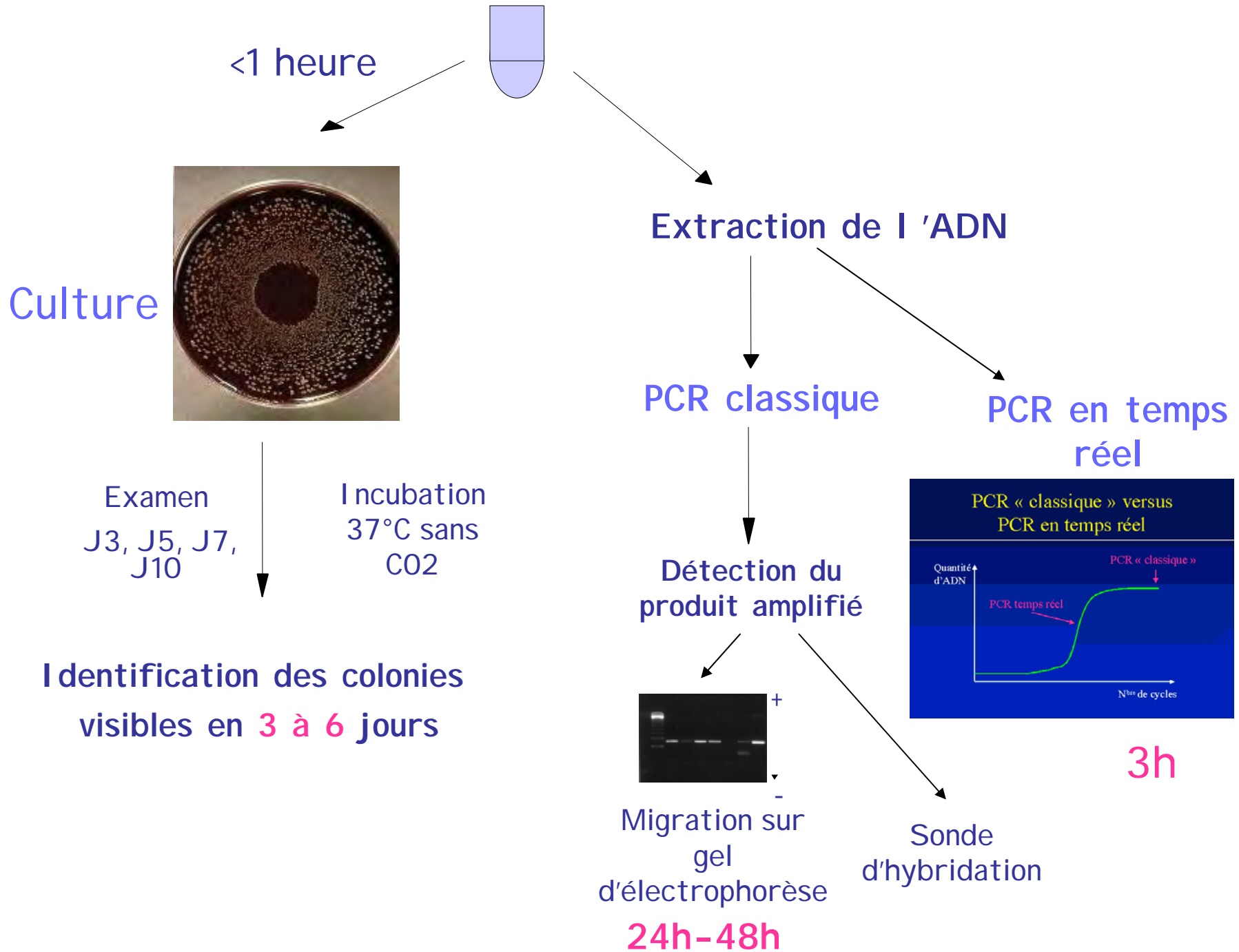
## ➤ **Recommandations actuelles**

- ✓ Ne remplace pas le diagnostic bactériologique traditionnel
- ✓ Chez certains patients nécessitant une mise au traitement rapide
- ✓ Utilisation préférentielle sur les prélèvements  $\mu$  +
- ✓ Analyse critique du résultat
  - ↪ un résultat - n'exclut pas une tuberculose
  - ↪ un résultat + doit être confirmé (signes cliniques)
- ✓ Toujours associer une culture
- ✓ Ne pas utiliser pour le suivi du traitement

↪ **Conclusion : Nécessité de méthodes plus sensibles et spécifiques**

*Bordetella  
pertussis*  
un pathogène  
oublié





## Analyses des résultats de PCR et de culture des 215 aspirations nasopharyngées

Culture	N (%)	PCR		
		Négative	Positive	Inhibiteurs
Négative	<b>150 (69,8%)</b>	<b>136</b>	12	<b>2</b>
Positive	19 (8,8%)	<b>0</b>	16	<b>3</b>
Non réalisée	<b>46 (21,4%)</b>	<b>31</b>	14	<b>1</b>
Total	<b>215</b>	<b>167 (77,7%)</b>	<b>42 (19,5%)</b>	<b>6 (2,8%)</b>



## External Quality Assessment for Molecular Detection of *Bordetella pertussis* in European Laboratories

G. Muyldermans,<sup>1\*</sup> O. Soetens,<sup>1</sup> M. Antoine,<sup>2</sup> S. Bruisten,<sup>3</sup> B. Vincart,<sup>4</sup> F. Doucet-Populaire,<sup>5</sup>  
 N. K. Fry,<sup>6</sup> P. Olcén,<sup>7</sup> J. M. Scheftel,<sup>8</sup> J. M. Senterre,<sup>9</sup> A. van der Zee,<sup>10</sup>  
 M. Riffelmann,<sup>11</sup> D. Piérard,<sup>1</sup> and S. Lauwers<sup>1</sup>

TABLE 3. Results for EQA panel 2

Sample code	Species	No. of CFU/ml	Result for laboratory <sup>a</sup> :									
			1	2	3	4	7	8	9	10	11	
B-B1	None		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
B-B5	None		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
B-B7	None		Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
B-B11	None		Neg	BP	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
B-B2	<i>B. pertussis</i>	$3 \times 10^6$	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP
B-B6	<i>B. pertussis</i>	$3 \times 10^5$	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP
B-B13	<i>B. pertussis</i>	$3 \times 10^4$	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP
B-B12	<i>B. pertussis</i>	$3 \times 10^3$	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP
B-B8	<i>B. pertussis</i>	$3 \times 10^2$	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP or BH	BP	BP
B-B3	<i>B. pertussis</i>	$3 \times 10^1$	Neg	BP	Neg	Neg	BP	BP	BP	Neg	BP	Neg
B-B9	<i>B. parapertussis</i>	$2 \times 10^6$	BPP	BP	BPP	BPP	BPP	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
B-B14	<i>B. parapertussis</i>	$2 \times 10^4$	BPP	±	BPP	BPP	BPP	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
B-B10	<i>B. holmesii</i>	$>1 \times 10^6$	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP or BH	BP	BP	Neg
B-B4	<i>B. hinzii</i>	$>1 \times 10^6$	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
B-B15	<i>B. bronchiseptica</i>	$>1 \times 10^6$	Neg/BP <sup>b</sup>	BP	BP	BP	BP	BP	BP	BP or BH	BP	Neg

<sup>a</sup> BP, positive reaction for *B. pertussis*; BPP, positive reaction for *B. parapertussis*; BH, positive reaction for *B. holmesii*; ±, unresolved result for *B. pertussis*; Neg, negative reaction for *B. pertussis* and *B. parapertussis* (when tests for *B. parapertussis* were conducted).

<sup>b</sup> A positive result for *B. pertussis* was reported by two of four technologists.

## Difficultés techniques ou d'interprétation des techniques de Biologie moléculaire

<b>Difficultés</b>	<b>Conséquences</b>
Mise en évidence de bactéries non viables	pertinence clinique ?
Contamination de laboratoire	Faux positif
Inhibition de l'amplification par des substances présentes dans le prélèvement biologique (charbon présent dans les flacons d'hémocultures, ...)	Faux négatif
Hybridation non spécifique des amorces	Faux positif
Bactérie ou prélèvement biologique difficile à lyser	Faux négatif
Choix du fragment de biopsie à analyser – hétérogénéité de l'échantillon	Faux négatif
Inoculum inférieur au seuil de détection	Faux négatif
Prélèvement plurimicrobien (infection plurimicrobienne ou présence d'une flore commensale)	Résultat ininterprétable.



# Conclusion

Identification

Détection  
Mécanisme  
de résistance

Épidémiologie

**Meilleure prise en charge du patient**

Rapidité   Sensibilité   Spécificité   Exactitude   Signification