

CNRP



HEGP

Hôpital Européen Georges Pompidou



Outils modernes du diagnostic microbiologique

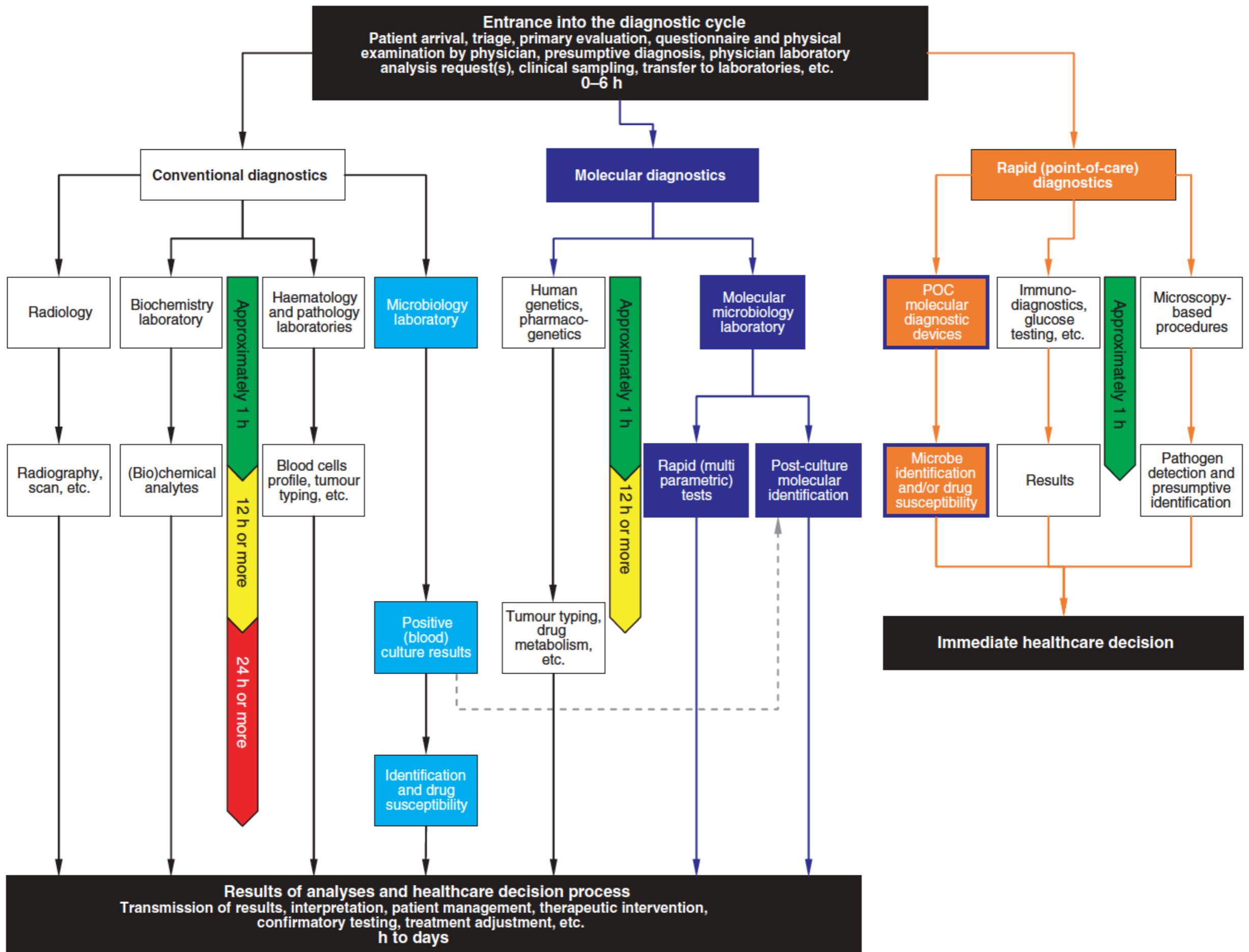
Emmanuelle Varon

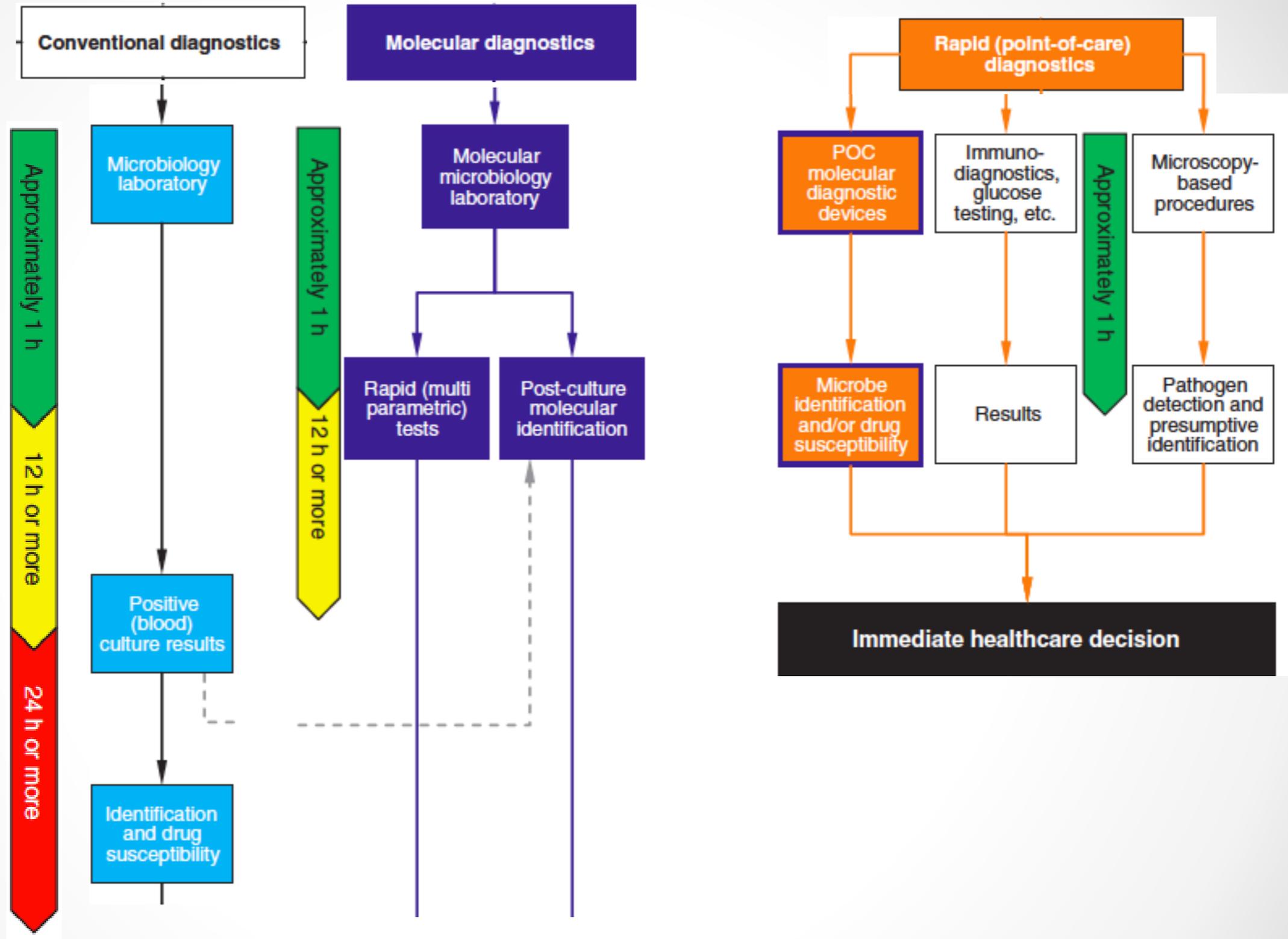
Microbiologie, CNRP

Hôpital Européen Georges-Pompidou, Paris.

Déclaration de liens d'intérêt

Lien	Laboratoire
Invitation à des congrès / Participation à un groupe d'experts	Pfizer





Point-of-care testing

- Tests faciles à utiliser
 - Identification
 - +/- Toxine
 - +/- Résistance aux anti-infectieux
- Résultats rapides (30 min. à 3 heures)
 - Immunochromatographie (ICT)
 - PCR / systèmes automatisés miniatures
- Connaître les limites des tests
- CQ
- Traçabilité des résultats

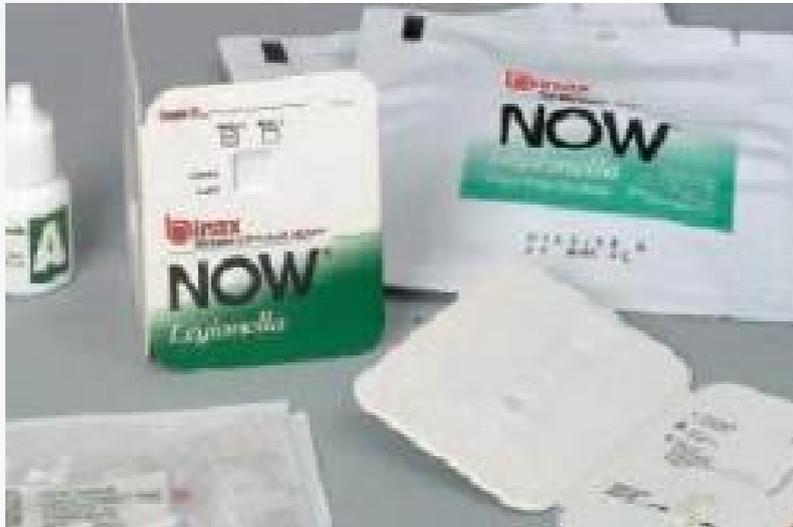


Meilleure prise en charge

- Antibiothérapie ciblée et adaptée
- Limiter la transmission (BMR, MST, ...), gérer l'isolement
- Durée d'hospitalisation

Immunochemistry tests (ICT)

Ag urinaires de *Legionella pneumophila* sérotype 1



	Ag U
Spté	99%
Faux +	Sérum anti-lymphocytaire
Sbté	56 à 99% 70 à 88% si [urines concentrées]



Concentration systématique des urines
(centrifugation, 10 à 20 minutes)

CNR legionelles

http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/hcl2004/CNR_legionelles

Et aussi : Strepto A, *H. pylori*, Chlamydia, palu, grippe, *S. aureus* et PBP2a ...

Exemples de résultats du test Binax Now® *S. pneumoniae* dans les urines

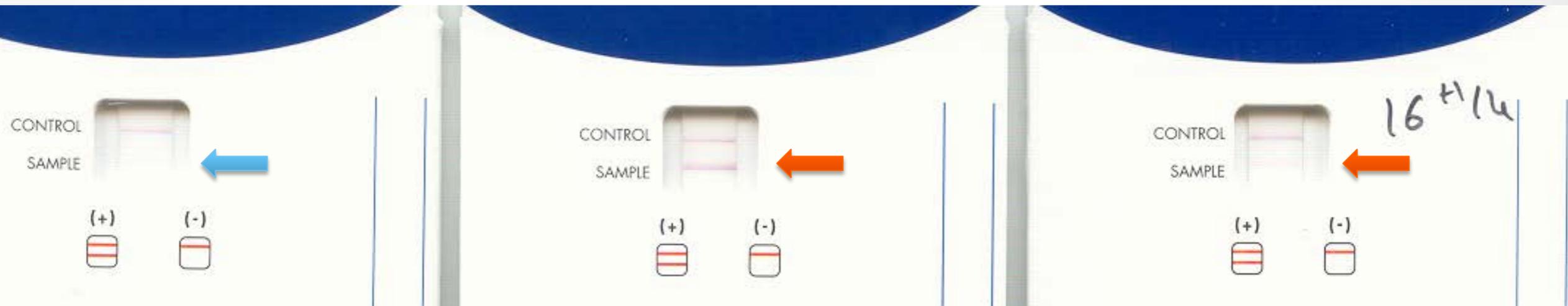
Sensibilité 0,74 (0,72-0,77), spécificité 0,94 (0,93-0,95)

Boulware *et al.* J Infection 2007

Négatif

Positif

Positif faible



- 1^{ère} lecture à 15 minutes : validation d'un résultat positif
- 2^{ème} lecture à 30 minutes pour valider un résultat négatif



Détection de mécanisme de résistance : SARM *mecC*

- Depuis la fin des années 2000, il a été décrit des souches de SARM de profil particulier

Variant *mecA*_{LGA251}
dans une nouvelle cassette de type XI (CC130)

- Résistance isolée à la méticilline
 - Non détectée par certains systèmes d'antibiogramme
 - Non détectée par certains milieux de screening
- Non détection du gène *mecC* par
 - *Real Time PCR* (NucliSENS EasyQ, bioMérieux - GeneOhm, BD - Xpert, Cepheid)
 - *PCR hybridation* (GenoType Staphylococcus test, Haine-Biocentric)
 - *PCR « maison »*
 - *DNA microarray* (StaphyType Kit, Alere)
- ○ Détection par ICT Clearview Exact PBP2a et Binax Now S. aureus test (Alere)

PCR directe sur le sang

Multiplex PCR Allows Rapid and Accurate Diagnosis of Bloodstream Infections in Newborns and Children with Suspected Sepsis^{∇†§}

Barbara Lucignano,^{1‡} Stefania Ranno,^{1‡} Oliver Liesenfeld,² Beatrice Pizzorno,³ Lorenza Putignani,^{1*} Paola Bernaschi,^{1*} and Donato Menichella¹

- 16S-23S rRNA
- 5-18S rRNA



3 réactions PCR temps réel

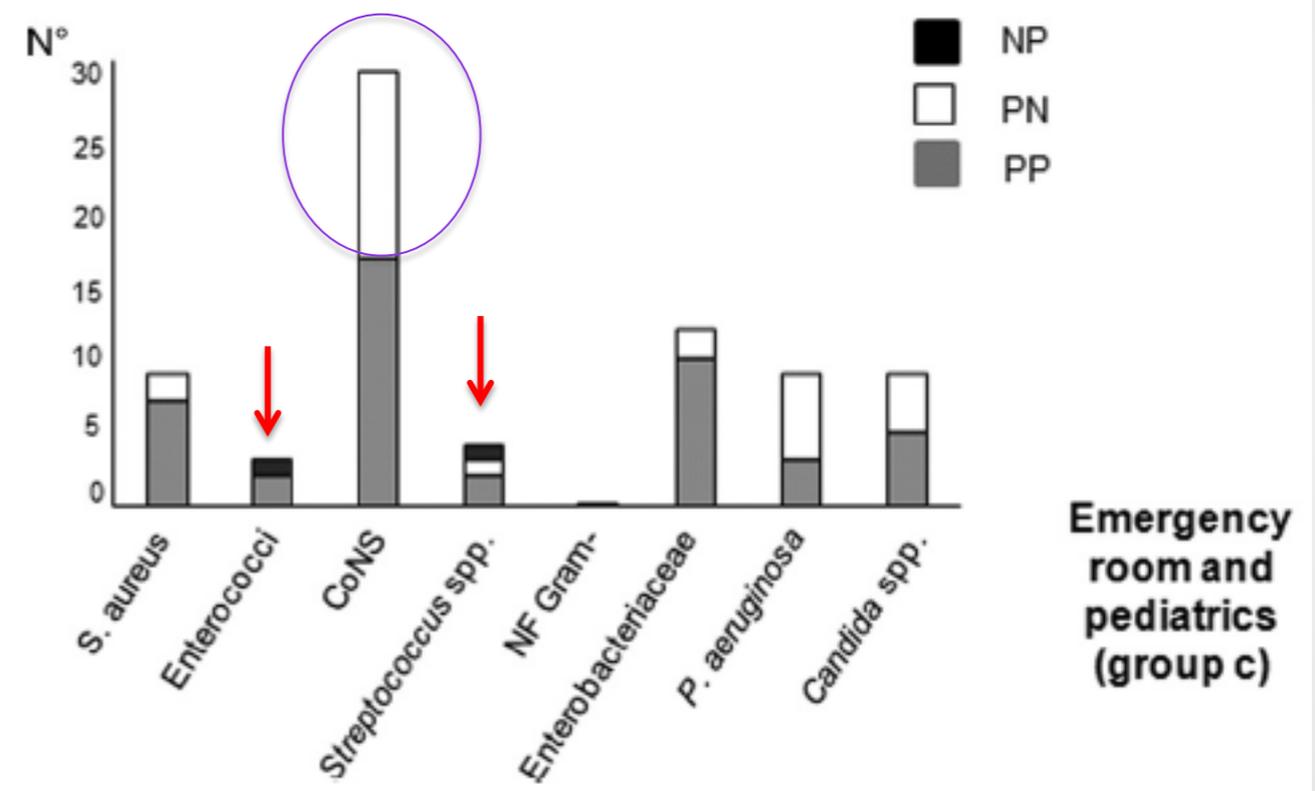
TABLE 1. SeptiFast master list

Gram-negative organisms	Gram-positive organisms	Fungi
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> / <i>K. oxytoca</i>	CoNS ^a	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Enterobacter cloacae</i> / <i>E. aerogenes</i>	<i>Streptococcus</i> spp. ^b	<i>Candida glabrata</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		

25 micro-organismes
(90% des espèces isolées d'hémocultures)

803 enfants, 1673 échantillons

Septifast®/Hémoc



Emergency room and pediatrics (group c)

Lucignano et al. J Clin Microbiol 2011

Sensitivity 85.0% (95% CI 78.7 to 89.7%)
Specificity 93.5% (95% CI 92.1 to 94.7%)
compared to blood culture.



Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study

Päivi Tissari, Alimuddin Zumla, Eveliina Tarkka, Sointu Mero, Laura Savolainen, Martti Vaara, Anne Aittakorpi, Sanna Laakso, Merja Lindfors, Heli Piiparinen, Minna Mäki, Caroline Carder, Jim Huggett, Vanya Gant

Lancet 2010; 375: 224–30

Prove-it : Amplification and detection of *gyrB*, *parE*, and *mecA* genes of 50 bacterial species

Gram-negative species

- *Neisseria meningitidis*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus vulgaris*
- *Salmonella enterica* subspecies *enterica**
- *Serratia marcescens*
- Enterobacteriaceae family†
- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Haemophilus influenzae*
- *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*
- *Bacteroides fragilis* group‡

Gram-positive species

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- Coagulase-negative staphylococcus§
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Enterococcus faecalis*
- *Enterococcus faecium*
- *Listeria monocytogenes*
- *Clostridium perfringens*

Antibacterial resistance

- Meticillin resistance marker *mecA*

Sensitivity of 94.7% (95% CI 93.6 – 95.7)

Specificity of 98.8% (98.1 – 99.2)

18 h faster than conventional bloodculture method

Difficultés

- Faux négatif
 - Extraction+++
 - Répartition inhomogène des bactéries dans le prélèvement
 - Micro-organismes difficile à lyser
 - Séparer l'ADN eucaryote +++ (SeptiTest®, Looxster®)
 - Présence d'inhibiteurs de la Taq
 - Seuil de détection (3 à 1000 UFC/ml selon l'espèce et la méthode)
- Faux positif et problèmes d'interprétation
 - Contaminations
 - Persistance de l'ADN bactérien (streptocoques, bartonelles, ...)
- Non adapté pour les prélèvements pluri-microbiens
- ADN ne reflète pas des bactéries vivantes → Validation clinique +++++

Lab-on-a-chip concept

- Micro plateformes semi-automatisées de biologie moléculaire
 - Extraction
 - PCR real-time simple ou multiplexe
 - CQI
- Système fermé
- Durée de réalisation : environ 1 heure
- Coût élevé

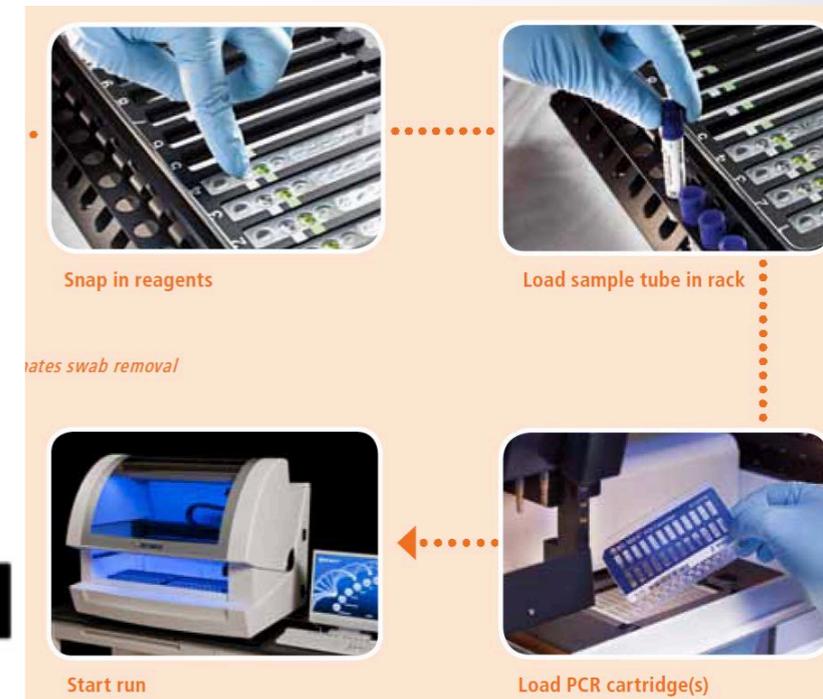
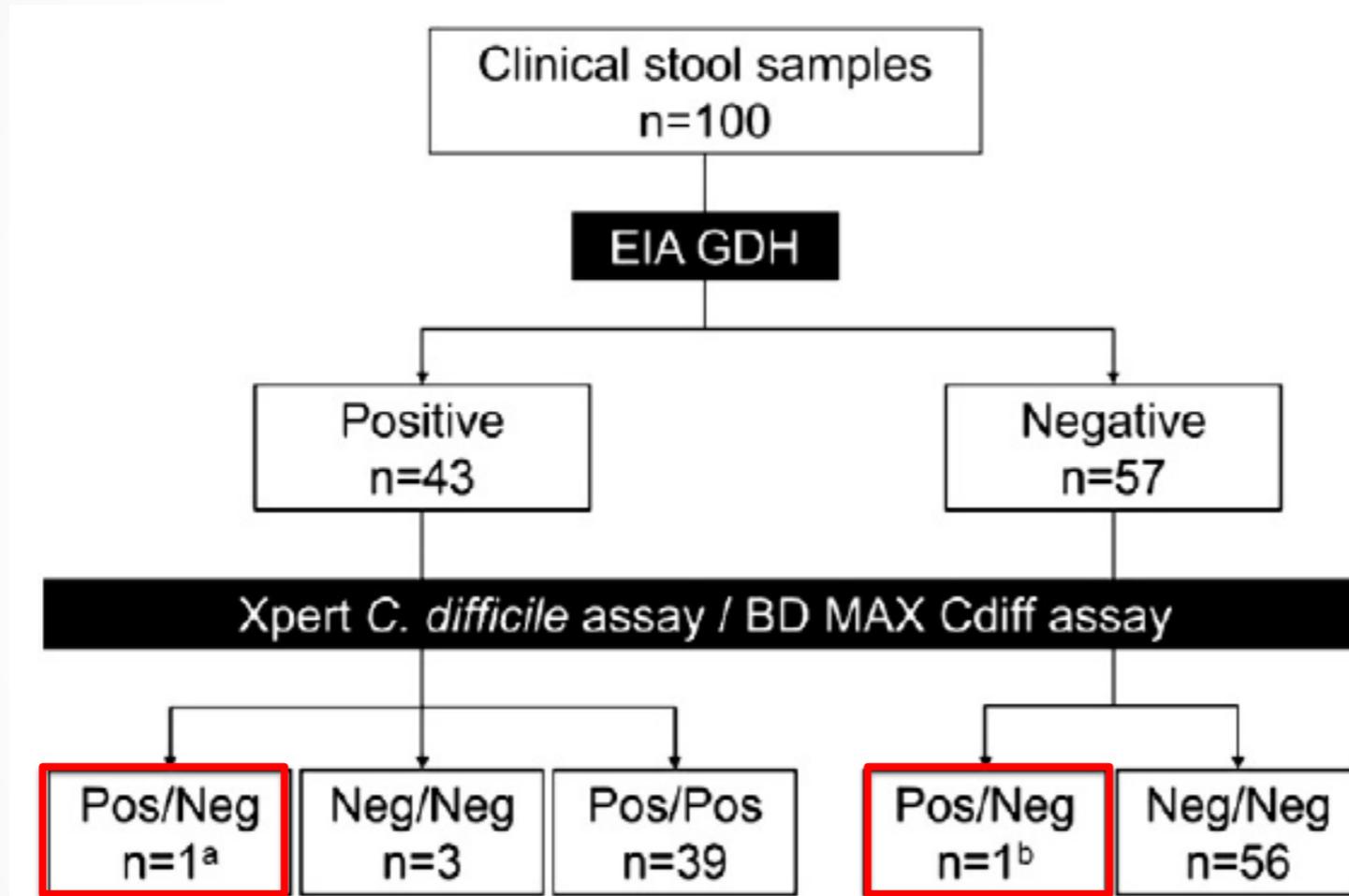


Xpert® Cepheid

- À partir de prélèvements sur écouvillons
 - Strepto B (ou après pré-culture)
 - *C. difficile*/Toxine B / clone 027
 - *S. aureus* / SARM
 - VanA
 - *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* (et urines)
- A partir d'hémoculture +
 - *S. aureus* / SARM
- A partir d'échantillons
 - Enterovirus (LCR)
 - *M. tuberculosis* et résistance à la rifampicine
 - *S. aureus* / SARM (SCCmec I, II, III, IVa, V, VI)

Evaluation of the new CE-IVD marked BD MAX Cdiff Assay for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* harboring the *tcdB* gene from clinical stool samples

Paul O. Verhoeven ^{a,b,1}, Anne Carricajo ^{a,b,1}, Sylvie Pillet ^{a,b}, Alain Ros ^b, Nathalie Fonsale ^b, Elisabeth Botelho-Nevers ^{a,c}, Frédéric Lucht ^{a,c}, Philippe Berthelot ^{a,b,c}, Bruno Pozzetto ^{a,b,*}, Florence Grattard ^{a,b}



CT=35,0 cycles



Pos
CT=37,
5

PCR *tcdB* Barbut et al.

CT=33,7 cycles



Pos
CT=33,
3

PCR et hybridation

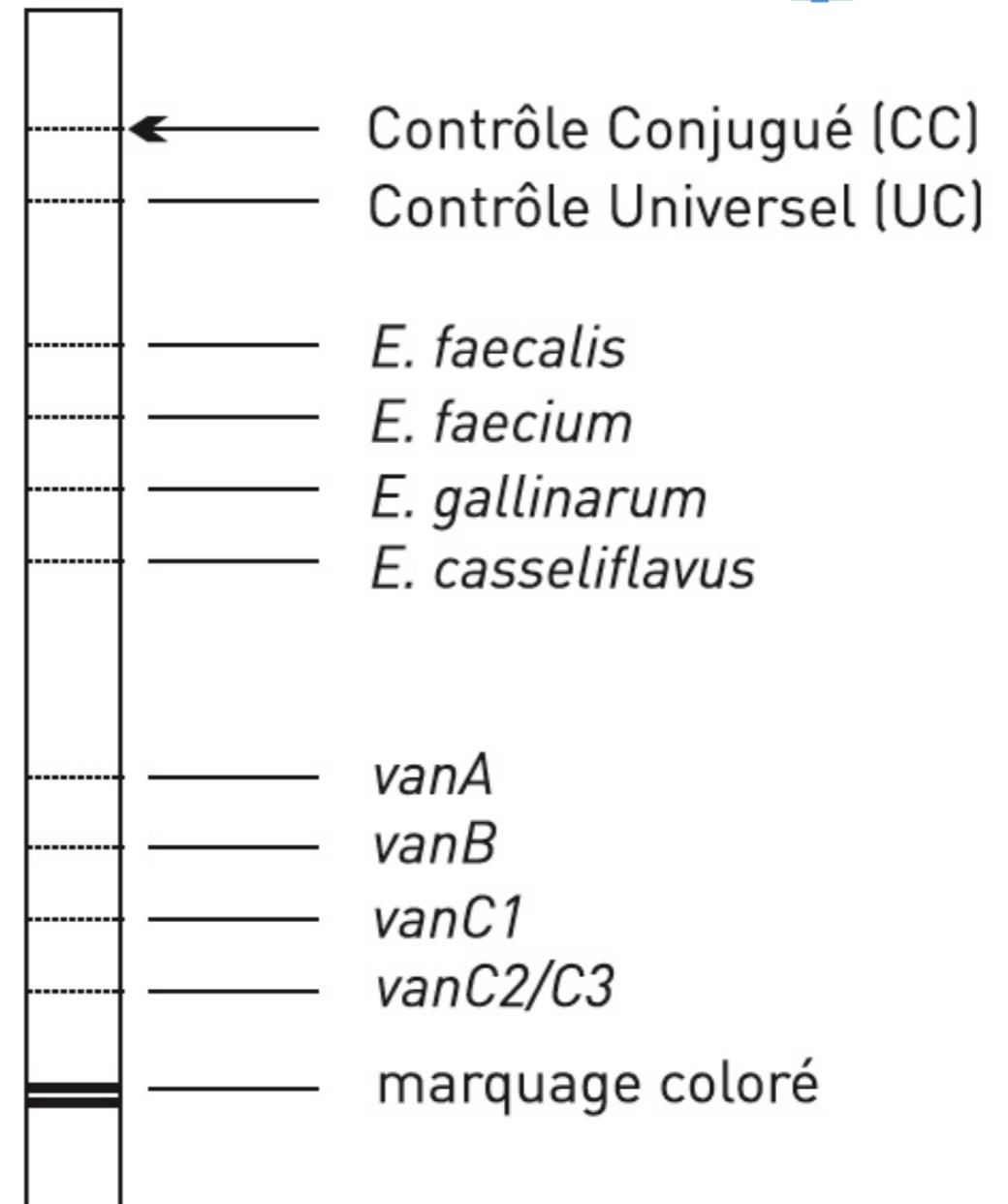
Identification rapide

et détection de gènes de résistance



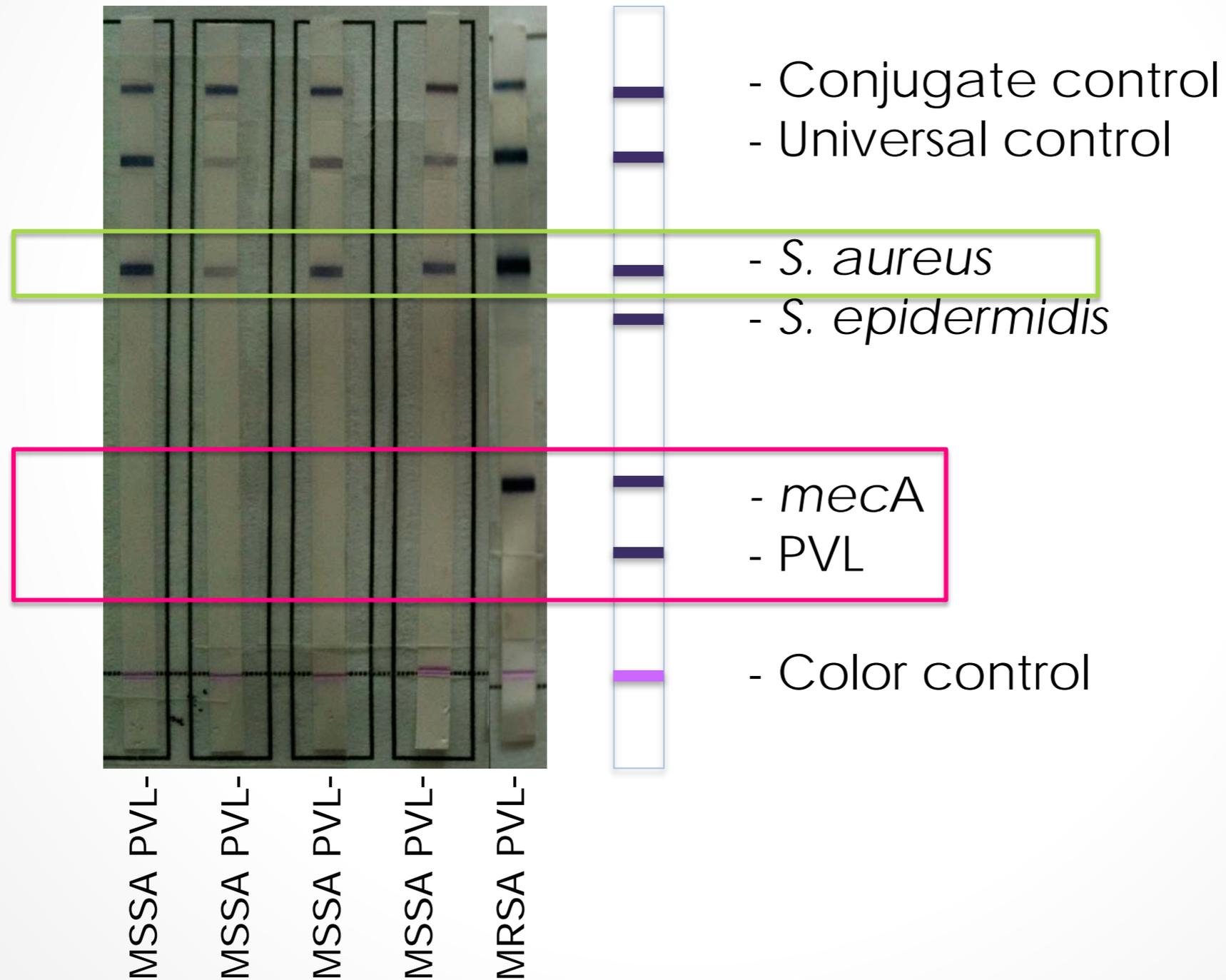
Genotype® Enterococcus

- A partir d'une culture
 - Extraction
 - PCR avec amorces biotinylées
 - Hybridation sur bandelettes
 - Révélation colorimétrique
- Délai 4 h
- Etude sur 105 souches d'enterocoques
 - Identification spécificité 100%
 - Détection du génotype 100%



PCR et hybridation

Identification et détection *mecA* & PVL (cultures)

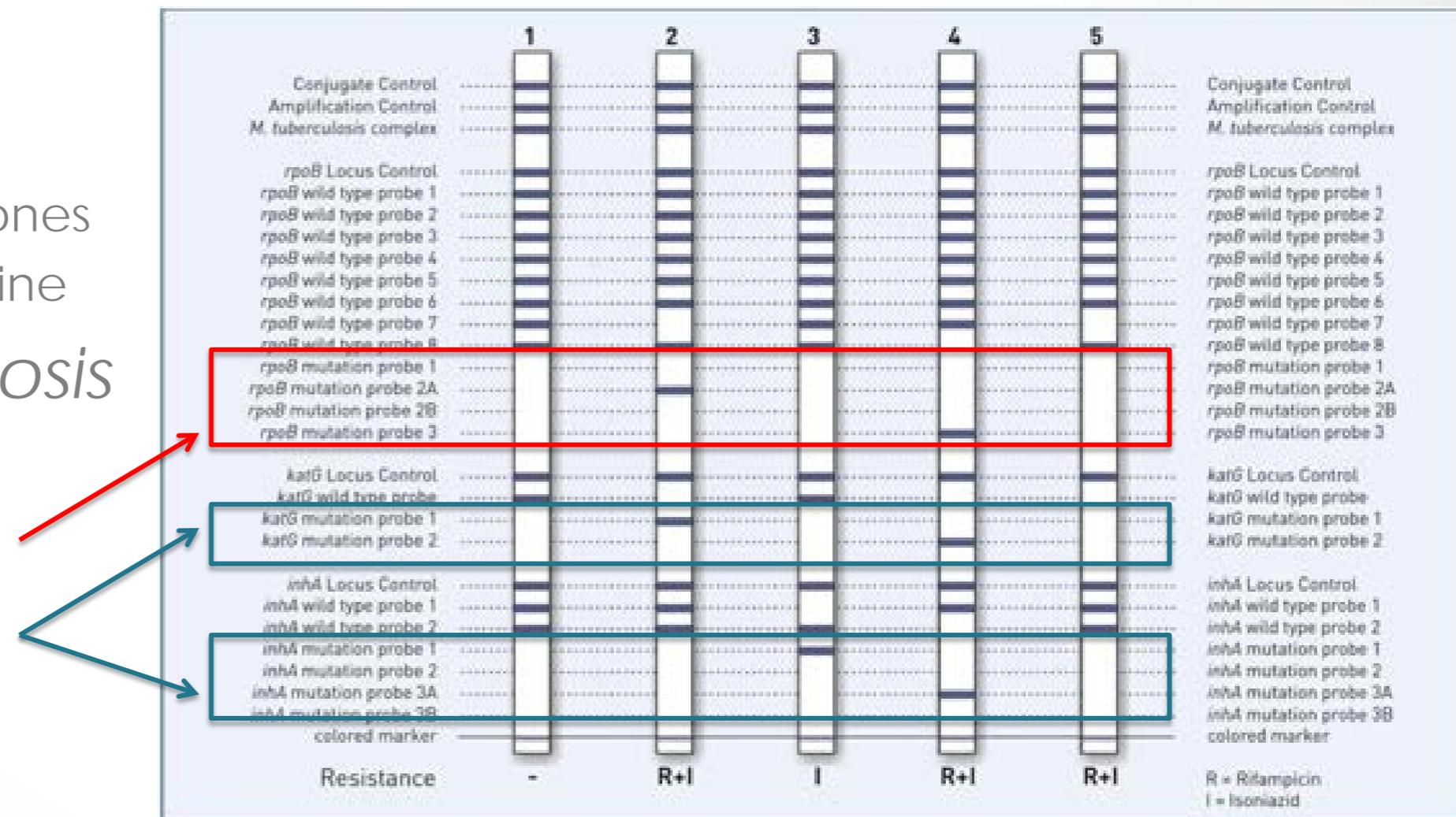


PCR et hybridation

Rapid detection of antibiotic resistance

Exemple pour *M. tuberculosis*

- *H. pylori*
 - Fluoroquinolones
 - Clarithromycine
- *M. tuberculosis*
 - Rifampicine
 - INH



Genotype® (Hain)

MALDI-TOF MS

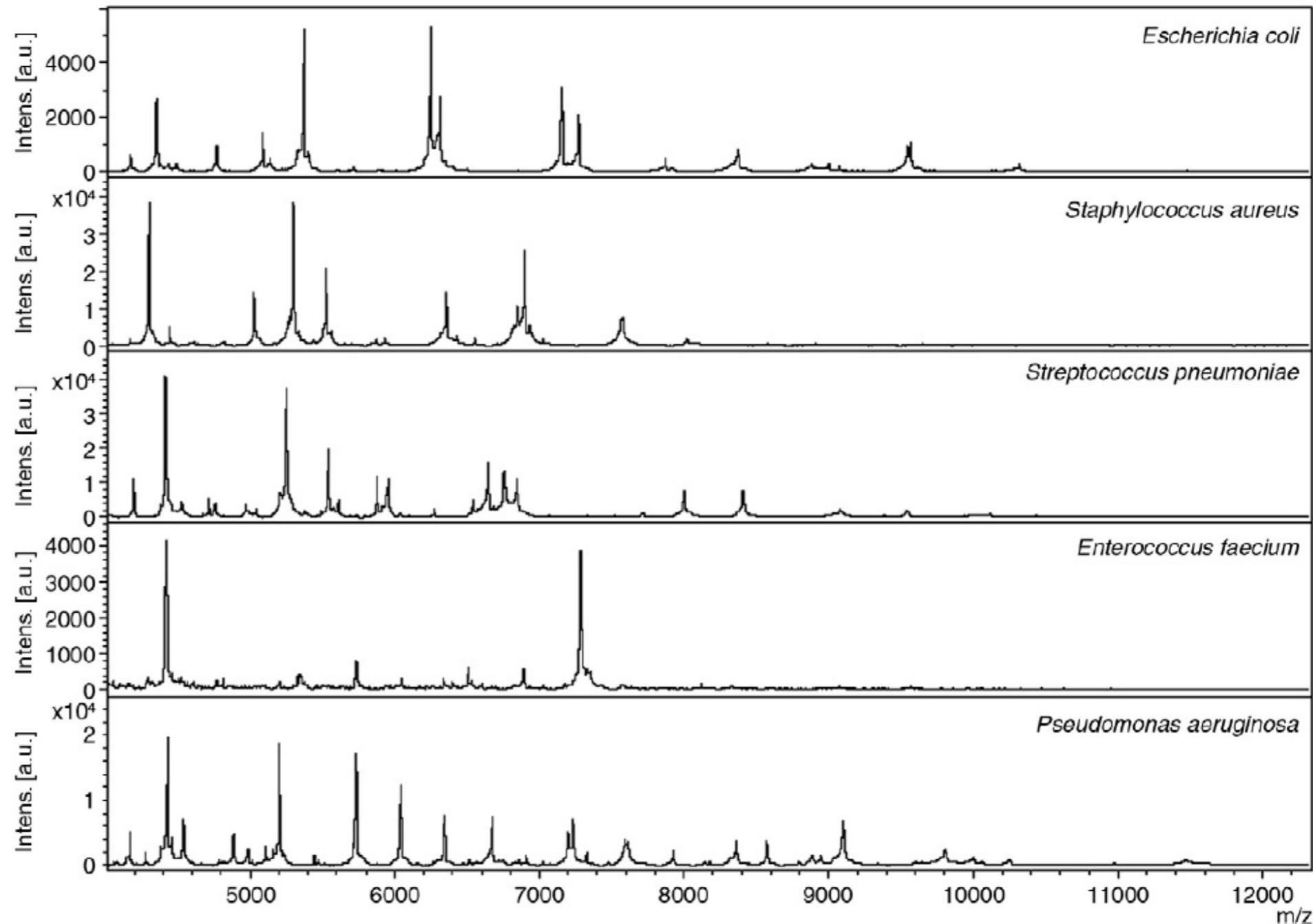
Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry



- Matrice + échantillon en solution cristalline → Cible (plaque métallique)
- Laser → désorption ionisation
- Analyseur à temps de vol
- Profil de pics (protéines bactériennes) définis par leur ratio m/z et leur intensité relative

MALDI-TOF MS

- Pics spécifiques
 - Genre
 - Espèce
 - (Sous-espèce)
- Reproductibles
SI conditions de
croissance
identiques



MALDI-TOF MS sur colonies

Authors	Sample		Id species level	Id genus level	Main identification difficulty
Seng et al. [32]	Routine (n = 1660)	all routine samples	83.8%	95%	<i>Propionobacterium acnes</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , ← <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Shigella</i> sp.
van Veen et al. [36]	Routine (n = 980)	all routine samples	92%	98.8%	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , ← anaerobic bacteria
Blondiaux et al. [37]	Routine (n = 362)	all routine samples	72.9%	87%	viridans streptococci group. ← <i>Shigella</i> sp.

- Temps d'identification bactérienne : quelques minutes

Exemples d'espèces bactériennes identifiées par Maldi-TOF MS

- ...
 - *Enterobacter cloacae*
 - *Enterobacter aerogenes*
 - *Enterobacter amnigenus*
 - *Enterobacter asburiae*
 - *Enterobacter cancerogenus*
 - *Enterobacter cowanii*
 - *Enterobacter gergoviae*
 - *Enterobacter hormaechei*
 - *Enterobacter kobei*
 - *Enterobacter ludwigii*
 - *Enterobacter pyrinus*
 - *Enterobacter radicincitans*
 - ...
-
 - *Granulicatella adiacens*
 - *Granulicatella balaenopterae*
 - *Granulicatella elegans*
 - *Grimontia hollisae*
 -

MALDI-TOF MS sur prélèvements

Authors	Sample		Id species level	Id genus level	Main identification difficulty
La Scola et al. [43]	Blood (n = 599)	positive blood culture	76%	76%	<i>Streptococcus</i> sp., ← polymicrobial samples
Stevenson et al. [44]	Blood (n = 212)	positive blood culture (179), spiked bottles (33)	80.2%	80.2%	<i>Streptococcus mitis</i> group, ← <i>Propionibacterium acnes</i>
Ferroni et al. [45]	Blood (n = 685)	positive blood culture (388), spiked bottles (312)	89%	98%	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , ← <i>Streptococcus mitis</i> group ←
Christner et al. [46]	Blood (n = 277)	positive blood culture	94.2%	95%	Cocci Gram +
Ferreira et al. [47]	Blood (n = 300)	positive blood culture	42.6%, GN: 83.3%, GP: 31.8%	71.6%, GN: 96.6%, GP: 65.7%	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i>
Ferreira et al. [48]	Urine (n = 220)	positive urine samples > 10 ⁵ CFU/ml	91.8%, GN: 93.6%, GP: 66.6% <i>E. coli</i> 97.6%	92.7%, GN: 94.6%, GP: 66.6%	<i>Streptococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Raoultella</i> sp.

Et demain...

- Spectrométrie de masse MALDI-TOF
 - Progression du nombre d'espèces identifiables
 - Développement des bases de données (Bruker-Biotyper, bioMérieux Shimadzu-Anagnostec, Andromas)
 - Mise au point d'autres protocoles d'analyse
 - Pneumocoques et *S. mitis* / *S. oralis* ; *E. coli* et *Shigella*
 - A partir des prélèvements
 - Détection de facteurs de virulence : PVL, TSST...
 - Détection de gènes de résistance
 - SCCmec, BLSE, carbapénémases...
 - Analyse d'autres molécules (polysaccharides, acides gras, ...)
- Typage, séquençage (MLST-like par MALDI-RE, PCR-ESI...)
- Séquenceurs de nouvelle génération (très haut débit) "de pailleasse"
 - Identifier les cibles d'intérêt pour le diagnostic d'un grand nombre d'espèces

Rapid 16S rRNA Next-Generation Sequencing of Polymicrobial Clinical Samples for Diagnosis of Complex Bacterial Infections

Stephen J. Salipante^{1,2*}, Dhruva J. Sengupta¹, Christopher Rosenthal¹, Gina Costa⁴, Jessica Spangler⁴, Elizabeth H. Sims³, Michael A. Jacobs³, Samuel I. Miller³, Daniel R. Hoogestraat¹, Brad T. Cookson^{1,3}, Connor McCoy⁵, Frederick A. Matsen⁵, Jay Shendure², Clarence C. Lee⁴, Timothy T. Harkins⁴, Noah G. Hoffman^{1*}

May 2013 | Volume 8 | Issue 5 | e65226

- Sequençage haut débit Ion Torrent (Life Technologies)
- Cible = ADNr 16S, V1-V2

Specimen Name/Clinical Sanger Sequencing results	Species name	% of total Reads	Number of Reads	Number of De-noised Clusters	Maximum % Identity	Minimum % Identity
Brain 1/	<i>Streptococcus constellatus/intermedius</i>	36.86	11269	5	99.69	99.07
No diagnosis (multiple templates)	No match $\geq 99\%$	34.43	10526	29		
	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	28.55	8728	11	99.68	99.05
	<i>Streptococcus constellatus</i>	0.17	52	2	99.08	99.07
Brain 2/	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.01	6874	9	99.68	99.01
No diagnosis (multiple templates)	<i>Comamonas testosteroni*</i>	0.69	48	1	100	99.31
	No match $\geq 99\%$	0.3	21	1		
Brain 3/	No match $\geq 99\%$	44.44	6155	33		
No diagnosis (multiple templates)	<i>Prevotella oris</i>	31.62	4379	4	99.37	99.05
	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	15.6	2161	3	99.68	99.37
	<i>Streptococcus constellatus/intermedius</i>	6.28	870	1	99.69	99.08
	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	2.06	286	2	99.41	99.12

Rapid Diagnosis of Bloodstream Infections with PCR Followed by Mass Spectrometry

Elena Jordana-Lluch¹, Heather E. Carolan², Montserrat Giménez¹, Rangarajan Sampath², David J. Ecker², M. Dolores Quesada¹, Josep M. Mòdol³, Fernando Arméstar⁴, Lawrence B. Blyn², Lendell L. Cummins², Vicente Ausina^{1,5*}, Elisa Martró^{1,6}

April 2013 | Volume 8 | Issue 4 | e62108

- PCR sur sang (bactéries, *Candida*, *mecA*, *vanA/B*, *kpc*) comparée à PCR sur hémoculture
- Analyse des amplicons par ESI-TOF

	PCR/ESI-MS results	Conventional methods	Comments
Clinical evidence supporting PCR/ESI-MS results	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Hepatocellular carcinoma and biliar obstruction.
	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Candida albicans</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	Intravascular catheter-related sepsis in patient with leukemia and neutropenia treated with caspofungin. <i>C. albicans</i> confirmed by sequencing.
	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	Sepsis of abdominal origin.
	<i>Escherichia coli</i>	Negative	Urine culture positive for <i>E. coli</i> .
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Negative	Pneumonia in a splenectomized patient. Confirmed by sequencing.
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negative	Pneumonia due to <i>S. aureus</i> .
No clinical evidence supporting PCR/ESI-MS results	<i>Escherichia coli</i>	Negative	Pneumonia due to MRSA. ²
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Negative	Pneumonia due to <i>S. pneumoniae</i> .

...Il reste quelques défis

- Séparation des espèces dans les prélèvements pluri-microbiens
- Quantification
 - pathogène vrai : Non
 - commensal : Oui, mais quel seuil différencie infection de colonisation?
- La biologie moléculaire ne se conçoit pas sans concertation microbio-clinique de la réalisation du prélèvement à l'interprétation des résultats.

Et surtout n'oubliez pas que
dans tous les cas,
les cultures restent
indispensables

...