

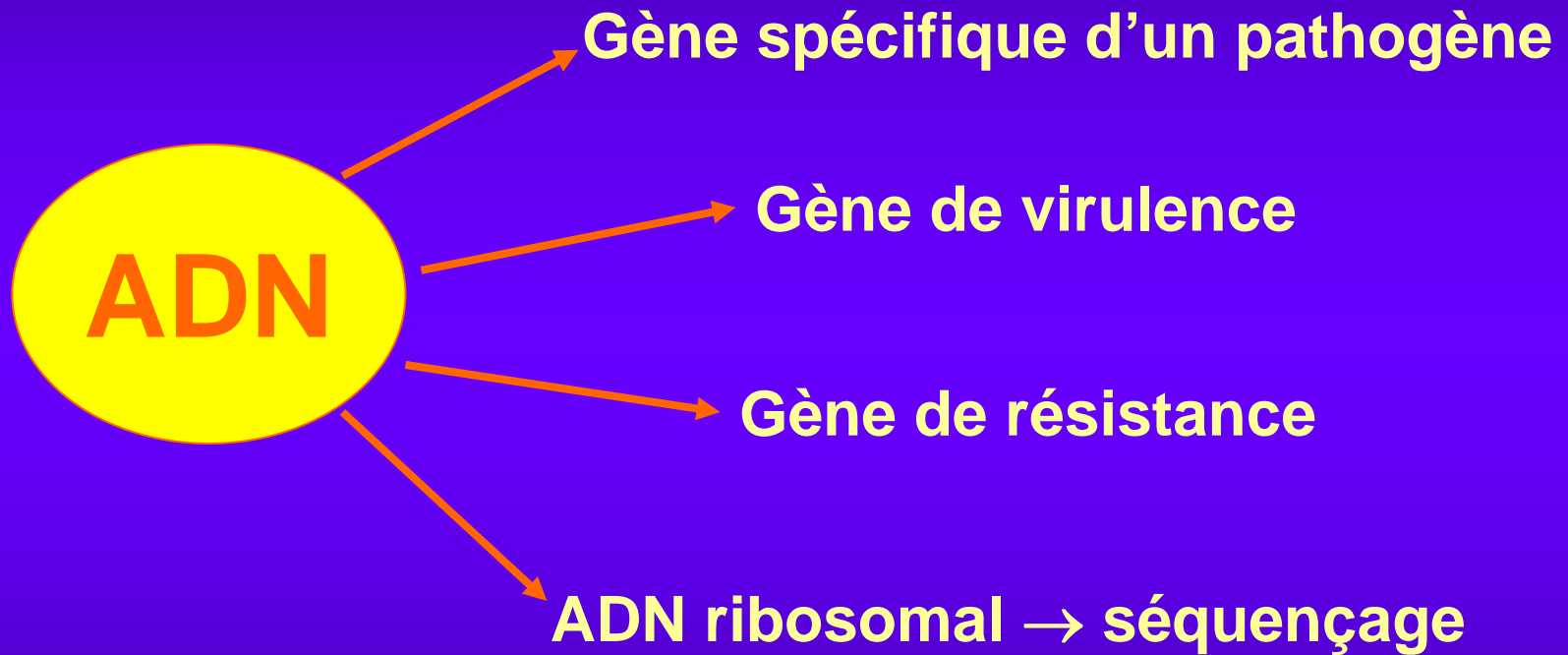
Place de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections bactériennes

C. Alauzet

Laboratoire de Bactériologie

Secteur de Biologie Moléculaire Bactériologie - Hygiène

Quelle cible ?



Dans quel but ?

- **DIAGNOSTIQUE**
 - Directement à partir du prélèvement
 - A partir de la culture (identification, confirmation...)
- **AIDE A L'ANTIBIOTHERAPIE**
- **EPIDEMIOLOGIQUE**
 - Détection de portage de BMR
 - Typage moléculaire

Intérêts de la biologie moléculaire

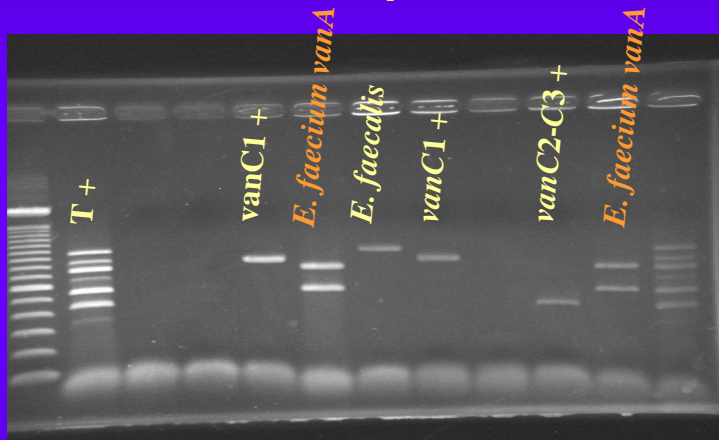
- **Rapidité**
- **Bactéries non cultivables**
- **Bactéries de culture lente et/ou difficile**
- **Spécificité**
- **Faible charge bactérienne**
- **Traitement ATB déjà en place**

Détection du portage de BMR 1

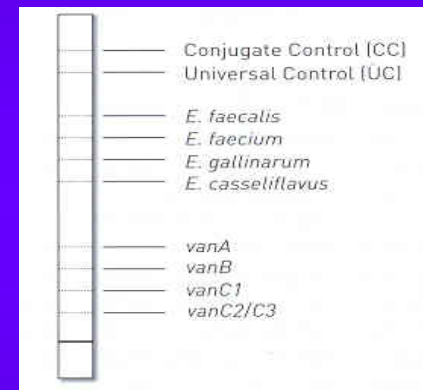
- Détection des ERV

- à partir de la culture sur milieu sélectif

- PCR multiplex



- GenoType®Enterococcus (STIC)



Identification *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2-C3*, *E. faecium* et *E. faecalis*

- à partir d'un écouvillon rectal par PCR en temps réel

- LC VRE Detection Kit® de Roche (extraction MagnaPure)

Identification *vanA*, *vanB*, *vanB2-B3*

Détection du portage de BMR 2

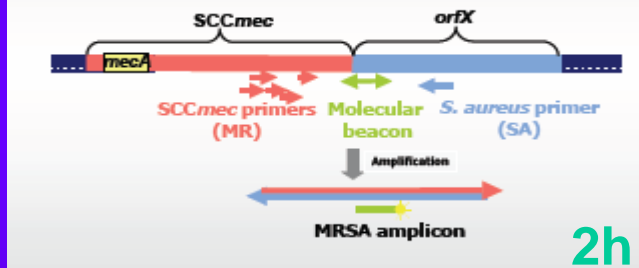
- Détection des SAMR

- à partir d'un écouvillon nasal

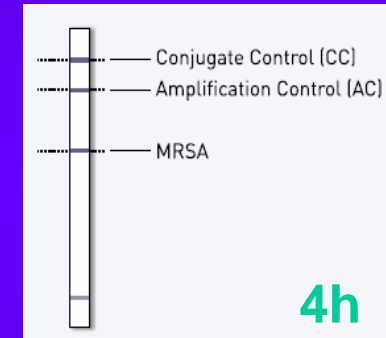
- **IDI-MRSA®** (Smart Cycler)

- Test **IDI-MRSA⁽¹⁻²⁾** (GeneOhm Sciences)

- Principe :



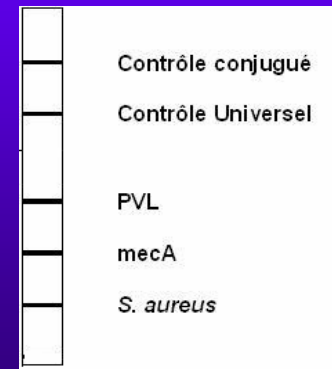
- **GenoType®MRSA Direct**



- Détection des SA producteurs de leucocidine de Panton Valentine

- **GenoType®MRSA** (STIC)

- A partir de la culture (pathologies nécrosantes ou infections cutanées sévères)



Biologie moléculaire et diagnostic bactériologique

```
graph TD; A[Biologie moléculaire et diagnostic bactériologique] --> B[Recherche de pathogènes spécifiques]; A --> C[Recherche de tout type de pathogènes]; B --> D[PCR classique ou en temps réel]; C --> E[séquençage]
```

Recherche de pathogènes spécifiques

PCR

classique ou en temps réel

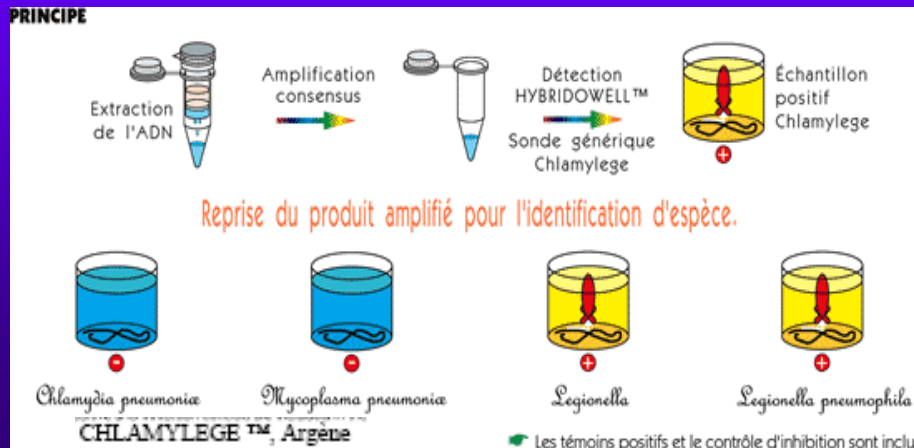
Recherche de tout type de pathogènes

séquençage

Détection de pathogènes spécifiques par PCR 1

- Pathologies **pulmonaires**

- Recherche de ***Bordetella pertussis*** (aspirations nasopharyngées)
- PCR multiplex «**pneumopathies atypiques**» sur prélèvements pulmonaires
 - **ProPneumo®**: détection en temps réel de *Chlamydophila pneumoniae* et de *Mycoplasma pneumoniae*
 - **Chlamylege®**:

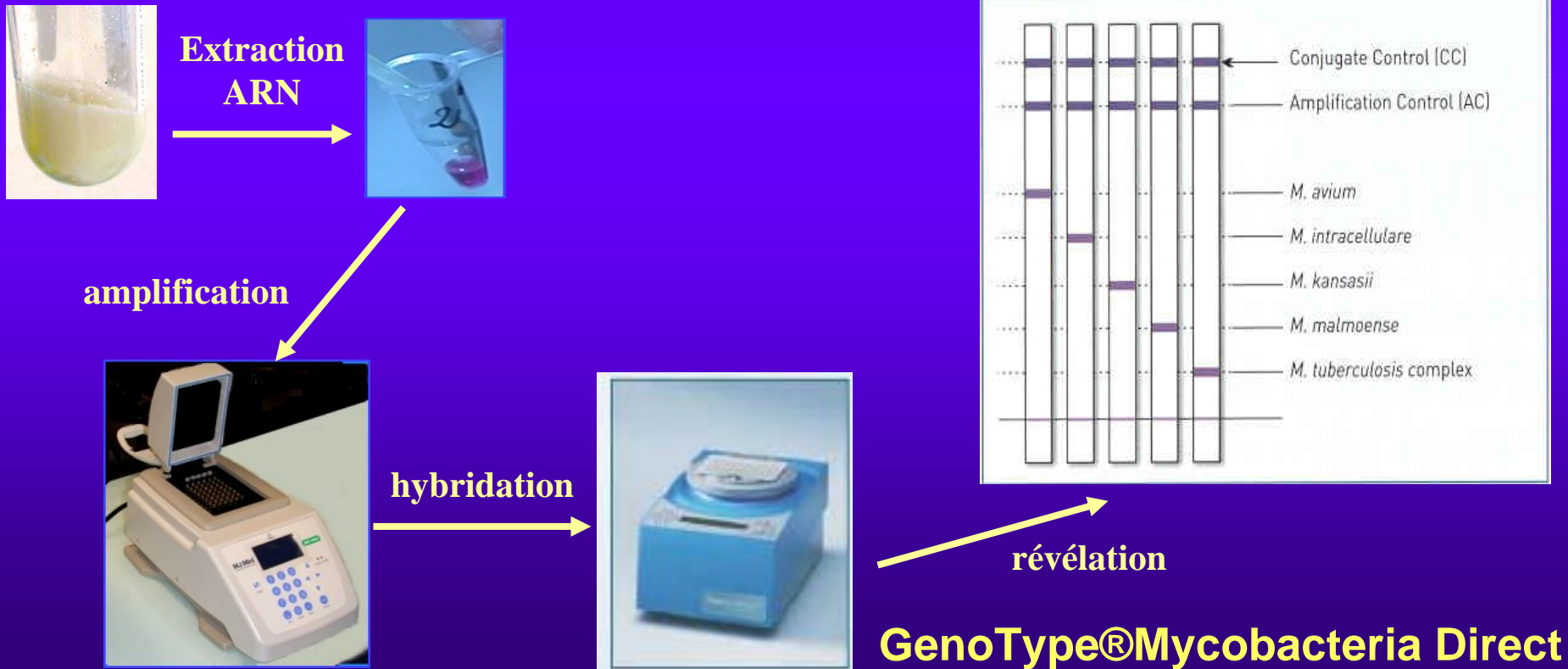


détection par PCR/hybridation de *Legionella pneumophila*, *C. pneumoniae* et *M. pneumoniae*

Détection de pathogènes spécifiques par PCR 2

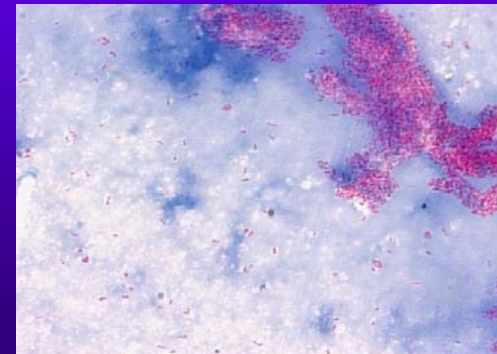
- Pathologies pulmonaires

- Recherche de *Mycobacterium tuberculosis* directement dans les prélèvements : nouvelle technique à Nancy



Place de la PCR dans le diagnostic d'une infection à mycobactéries

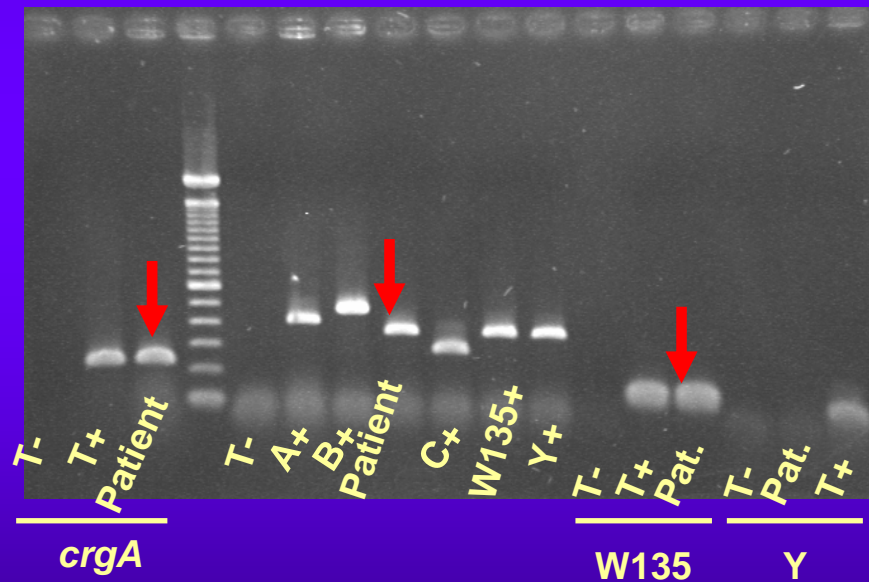
- **Sensibilité moyenne** → **Culture > PCR > ED**
95-100% si ED+, 50% si ED- (<50% dans LCR)
 - Paroi difficile à lyser donc si peu de bactéries → FN
 - Risque d'inhibiteurs dans le prélèvement
- **Bonne spécificité** (Amplicor® de Roche)
 - Si **ED+** et **PCR NEG** → mycobactériose
- **INDICATIONS**
 - **Présence de BAAR à l'ED**
 - **Forte suspicion clinique**



Détection de pathogènes spécifiques par PCR ³

- URGENCES :

- Recherche de ***Neisseria meningitidis*** (*crgA*) dans le LCR ou à partir de la culture et **génomogroupage** (*mynB*, *siaD*)



- PCR multiplex en temps réel «**méningites bactériennes**» sur LCR
Kits commercialisés vs PCR « maison »

Détection de pathogènes spécifiques par PCR 4

- URGENCES :
 - Caractérisation des agents responsables de **septicémies**
 - Actuellement : délai de positivité de l'hémoculture → orientation par le résultat de l'ED → identification et ATBgramme le lendemain
 - Nécessité pour certains patients d'accélérer et d'affiner l'identification → orientation thérapeutique plus rapide

SEPTIFAST vs GENOTYPE BLOOD CULTURE

SeptiFast

Rapid identification of bloodstream infection with real-time PCR



Diagnostics

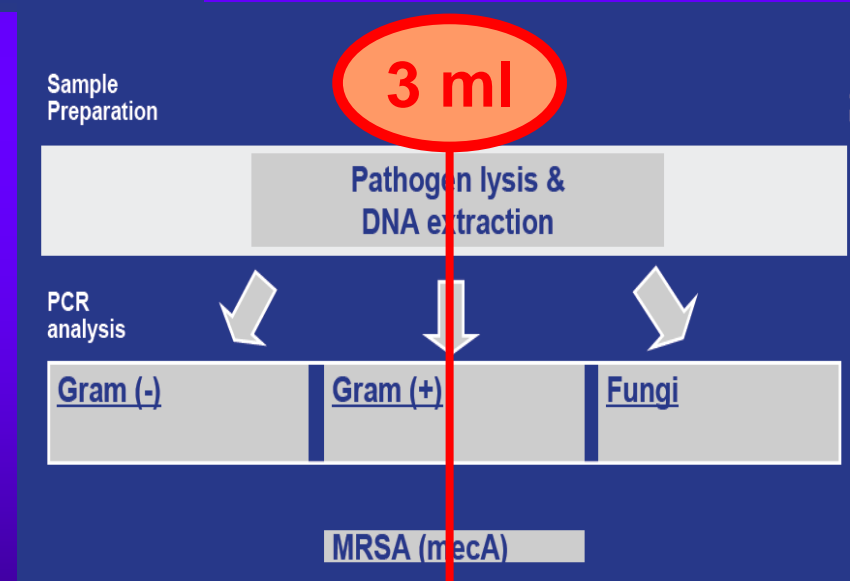


Utilisation du
LightCycler
de Roche

RAPIDITE+++
(6h)

25 pathogens detected, covers 85-95% of sepsis cases

Gram (-)	Gram (+)
<ul style="list-style-type: none">•Escherichia coli•Klebsiella (pneumoniae/oxytoca)•Serratia marcescens•Enterobacter (cloacae/aerog.)•Proteus mirabilis•Pseudomonas aeruginosa•Acinetobacter baumannii•Stenotrophomonas maltophilia	<ul style="list-style-type: none">•Staphylococcus aureus•CoNS¹•Strep. pneumoniae•Streptococcus spp.•Enterococcus faecium•Enterococcus faecalis
	Fungi
	<ul style="list-style-type: none">•Candida albicans•Candida tropicalis•Candida parapsilosis•Candida glabrata•Candida krusei•Aspergillus fumigatus



SENSIBILITE????

GenoType® Blood Culture (Hains)

A partir d'une hémoculture positive (délai + important):
choix du kit en fonction de l'ED

- **GenoType® BC grampositive**

- Streptocoques: A et B, milleri, oraux, *S. gallolyticus*
- Pneumocoques
- Staphylocoques: SA et SCN + *mecA*
- Entérocoques + *vanA*, B, C

17 espèces

- **GenoType® BC gramnegative**

- *E. coli*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Salmonella*
- *Acinetobacter*
- *Stenotrophomonas*
- *Haemophilus*

15 espèces

Bonne sensibilité = 10^4 CFU/ml (ED: 10^5 CFU/ml)

Bonne spécificité = 97-99%

Résultats en 4h après ED

Détection de pathogènes spécifiques par PCR 5

- Autres types de pathogènes recherchés:
 - ***E. coli* entéro-hémorragiques** : détection des toxines Shiga-like 1 et 2 dans les selles (SHU)
 - ***C. difficile* ribotype 027** : détection des toxines A et B + ribotypage
 - Recherche de pathogènes de la **sphère génitale** : *Chlamydia trachomatis*, *Streptococcus agalactiae*
 - Détection de ***Kingella kingae*** dans les infections articulaires de l'enfant

Development of a broad range 16S rDNA Q-PCR for the diagnosis of septic arthritis in children

- 94 liquides de ponction articulaire testés en culture vs PCR

	Culture + PCR+	Culture + PCR -	PCR + Culture -	TOTAL
<i>K. kingae</i>	5 (5%)	1 (1%)	15 (16%)	21 (22%)
<i>S. pneumoniae</i>	1	1	1	3
<i>S. aureus</i>	3	0	0	3
<i>S. pyogenes</i>	2	0	0	2
<i>S. enterica</i>	1	0	0	1

Chez l'enfant, la PCR n'améliore pas la détection d'autres pathogènes que *Kingella kingae*

Contribution of a broad range PCR reaction to the diagnosis of osteoarticular infections caused by *Kingella kingae*

- 171 liquides de ponction articulaire (enfants, arthrites et ostéomyélites)
 - 64 cultures + : 47% *S. aureus*, 16% *S. pyogenes*, 14% *K. kingae*, 11% SCN, 3% *P. acnes*
 - 107 cultures - → PCR ADNr 16S puis séquençage

	Culture		Total
	positive	négative	
PCR+	NR	15	-
PCR-	NR	92	-
Total	64	107	171

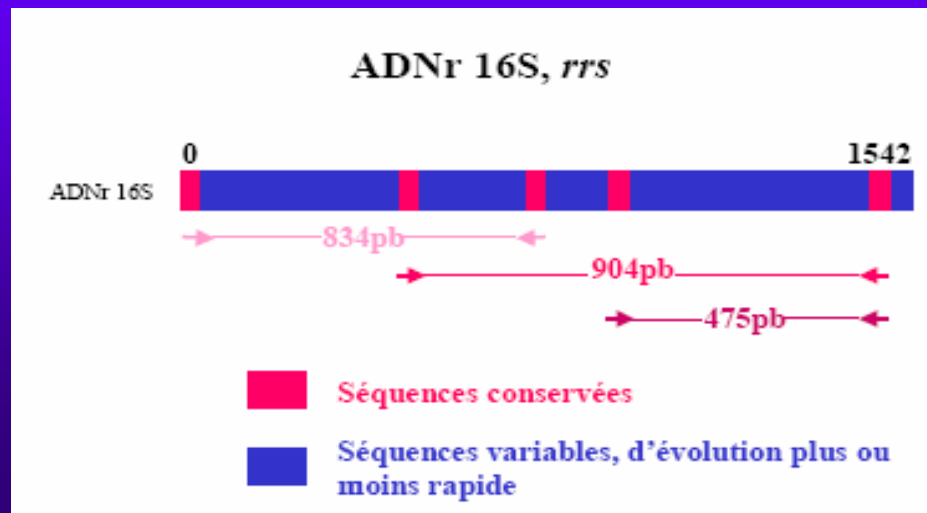
**exclusivement
*K. kingae***

30% des infections
ostéo-articulaires

Détection de tout type de pathogènes par séquençage 1

- **TECHNIQUE :**

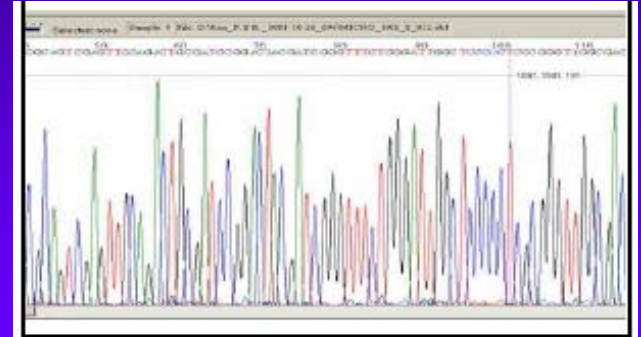
- Isolement de l'ADN bactérien à partir d'une culture ou d'un prélèvement
- Amplification de l'ADN ribosomal 16S par des amorces universelles
 - spécifiques des procaryotes
 - reflet de l'évolution → outil taxonomique



Détection de tout type de pathogènes par séquençage 2

- TECHNIQUE :

- Séquençage du gène
- Analyse critique de la séquence obtenue
- Comparaison avec les banques de données
 - GenBank (NCBI Blast)
 - Ribosomal Database Project
 - BIBI Database



3 jours minimum

Détection de tout type de pathogènes par séquençage 3

- APPLICATIONS :

- Identification et taxonomie bactérienne
 - Techniques classiques d'identification insuffisantes
 - Bactéries de culture lente et/ou difficile
- Diagnostic: recherche de bactéries dans des sites normalement stériles
 - **Valves cardiaques**

Comparative Molecular and Microbiologic Diagnosis of Bacterial Endocarditis

- 46 EI (classification de Duke)
 - 36 certaines dont 6 à hémocultures NEG
 - 10 possibles
- 25 témoins négatifs

Identification classique vs séquençage

Table. Comparison of results obtained from blood cultures with conventional methods of identification (CMI-BC) and from valves with sequence-based identification (SBI-V)

Positive blood culture (n = 30)		Negative blood culture (n = 6)	
		PCR negative (n = 4) ^a	PCR positive (n = 5)
Species identification		PCR negative n = 1	
Concordance (n = 16) (CMI-BC/SBI-V)	Discordance (n = 10)		
	CMI-BC	SBI-V	
<i>Strep. mutans</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Staph. aureus</i>
<i>Strep. sanguis</i>	<i>Gemella</i> spp.	<i>Aerococcus urinae</i>	<i>Staph. epidermidis</i>
<i>Strep. gallolyticus</i> (4)	Group C streptococci	<i>Abiotrophia adiacens</i>	<i>Staph. caprae</i>
<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Strep. mitis</i> (2)	<i>Strep. sanguis</i> (2)	<i>Strep. gallolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> ^b	<i>Strep. sanguis</i>	<i>Strep. oralis</i> ^c	<i>Bartonella quintana</i> (3)
<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Strep. salivarius</i>	<i>Strep. oralis</i> ^c	<i>B. henselae</i>
<i>Staph. aureus</i> (2)	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>H. aphrophilus</i>	} ^d
<i>Strep. oralis</i> (2) ^c	<i>H. aphrophilus</i>	<i>H. paraphrophilus</i>	
<i>Strep. mitis</i> (2) ^c	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Strep. gordonii</i>	
<i>Strep. pneumoniae</i> ^e			

^aIn the case of positive blood cultures with *Staphylococcus (Staph) aureus*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus (Strep) pneumoniae*, PCR was positive, but direct sequencing was not interpretable.

^bSpecies identification based on sequence analysis of PCR-amplified *rpoB_{int}*.

^cSpecies identification based on sequence analysis of PCR-amplified *sodA_{int}*.

^dThree species were identified in the blood culture.

Comparative Molecular and Microbiologic Diagnosis of Bacterial Endocarditis

- EI à hémocultures POS n=36
 - 26 PCR+: - 16 avec résultat concordant
- 10 avec discordance (7:espèce, 3:genre)
 - 4 PCR-: travail sur mauvaise fraction de la valve?
- EI à hémocultures NEG (traitement avant chirurgie) n=6
 - 5 PCR+: ***S. gallolyticus***, ***B. quintana*** (3), ***B. henselae***
 - 1 PCR-: étiologie infectieuse discutée
- EI possibles: hémocultures-, PCR-, histologie-

↳ réajustement du traitement ATB

Recherche et identification de bactéries dans les valves cardiaques

- Identification des bactéries impliquées dans les EI à hémocultures négatives
 - Infections décapitées par **traitement ATB** (streptocoques, staphylocoques)
 - Bactérie de **culture difficile ou impossible** (*Abiotrophia*)
 - Nouveaux pathogènes **émergents** (*T. whippelii*)
- Confirmer ou infirmer l'implication de certaines bactéries isolées d'EI à hémocultures positives

Détection de tout type de pathogènes par séquençage 4

- APPLICATIONS :

- Identification et taxonomie bactérienne

- Techniques d'identification classique insuffisante
 - Bactérie de culture lente et/ou difficile

- Diagnostic: recherche de bactéries dans sites normalement stériles

- **Valves cardiaques**
 - arthrites infectieuses à culture négative → ANAEROBIES?
 - **LCR**

Prospective study of use of PCR amplification and 16S rDNA from CSF for diagnosis of bacterial meningitis in clinical setting

- 227 LCR testés en culture vs PCR

	Culture		Total
	positive	négative	
PCR+	24	6	30
PCR-	13	184	197
Total	37	190	227

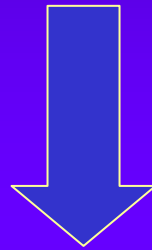
- 9 contaminations (SCN, *Pantoea*)
- 4 FN: *N. meningitidis* (3), *L. monocytogenes* (paucibactériens)

-5 «décapitées»: *S. pneumoniae* (3), SGB, *N. meningitidis*
- *P. bivia* (pas de culture)

DELAI???

Schuurman et al, *J Clin Microbiol*, 2004

**La biologie moléculaire
est-elle la panacée ???**



**Très bon outil mais présente
plusieurs limites technologiques
et logistiques**

Limites de la BM 1

- **La culture = REFERENCE** → sensibilité aux ATB, épidémiologie
- Absence de standardisation, de contrôles qualité
protocoles «maison» vs kits commercialisés
- Nécessité d'appareillages particuliers et de personnel qualifié
- Validation clinique nécessaire → présence d'ADN ne signifie pas bactéries vivantes
- La présence d'un gène ne donne pas d'indication sur son expression

Limites de la BM 2

- FAUX POSITIFS et PROBLEMES d'INTERPRETATION
 - Amorces universelles → amplification de tout ADN bactérien → pb d'interprétation (à partir des prélèvements)
 - 16S pas toujours suffisamment discriminant → autres gènes
 - Non adapté pour les infections pluri-microbiennes
- FAUX NEGATIFS
 - Pb d'extraction (échantillon, certaines bactéries)
 - Présence d'inhibiteurs de la *Taq* polymérase dans certains tissus
 - Seuil théorique de détection = SENSIBILITE???
 - Choix du fragment de biopsie à traiter

Perspectives

- Amélioration des techniques
- Acquisition de matériel plus performant
- Utilisation de kits « CE »
- Développement de puces à ADN à usage diagnostique
- Pyroséquençage
- Spectrométrie de masse
- DHPLC

...