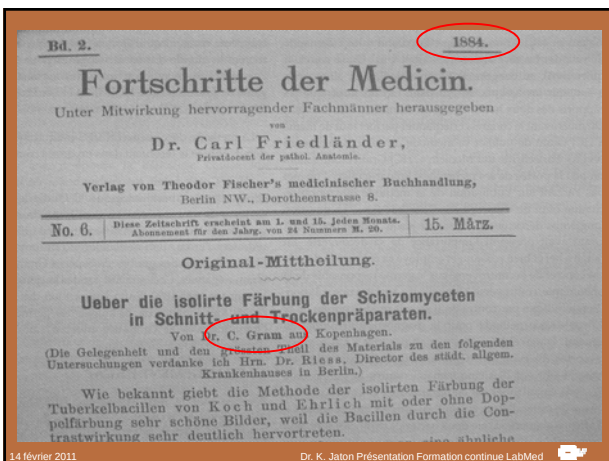
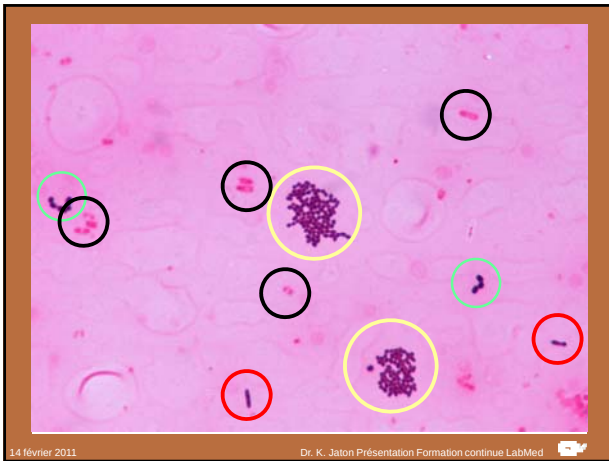






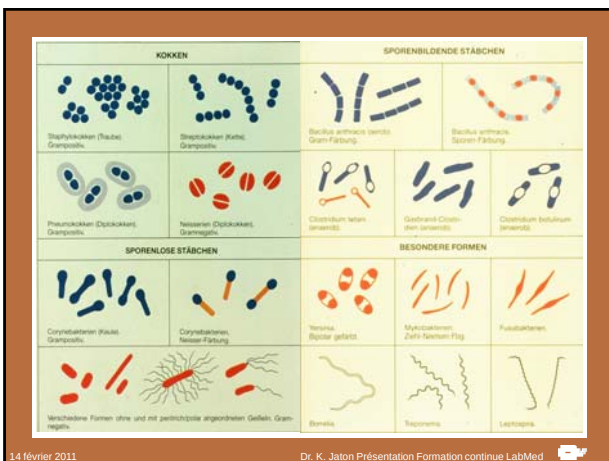




**Cas 1: patient + prélèvement
+ Gram = réponse**

- Homme jeune
- Actif sexuellement
- Dysurie,
écoulement
purulent du pénis

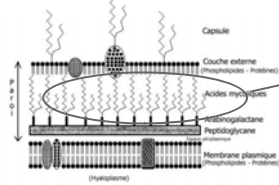
14 février 2011 Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



D'autres ont une paroi si particulière...

La **paroi** a une structure particulière, riche en cires (acides mycoliques) qui leur donnent certaines particularités (tinctoriales, résistances)

BAAR: Bacilles Acido-Alcool-Résistants



Cire de mycolates
d'arabinogalactane fixés
sur le peptidoglycane

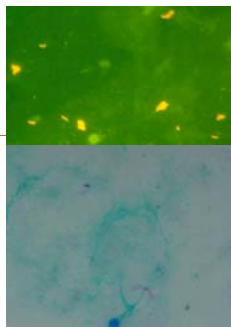
Coloration spéciale pour les voir....

Sensibilité

- Respiratoires: 50 – 65%
- Non respiratoires: 20-40%

Spécificité

On ne peut faire la distinction entre un *M. tuberculosis* ou un MOTT à l'examen direct



Ne pas voir...

L'Histoire en marche
l'exemple de *Chlamydia trachomatis*

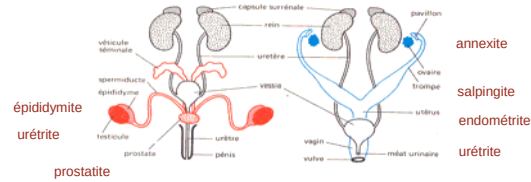
IST bactérienne la plus fréquente dans le monde
(Europe: prévalence 2%-17%, Eurosurveillance, 2007)

Ct: Infection urogénitale, asymptomatique, sous diagnostiquée, sous traitée

Gravité ne vient pas des symptômes aigus, douleurs, fièvre, mais de l'infection chronique entraînant des séquelles graves

Chez l'homme
Asymptomatique >50%
Diminution de la fertilité

Chez la femme
Asymptomatique >70%
Grossesse extra-utérine
Infertilité

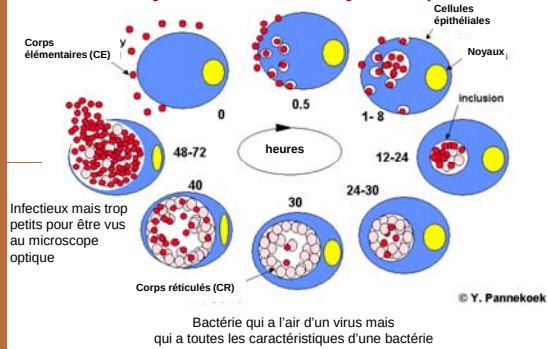


14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



Cycle de Chlamydia sp.

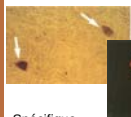


14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



Le diagnostic microbiologique 1988-2008



Spécifique, sensible 75-80% expertise, spécialisé



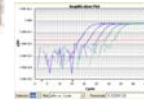
Peu sensible, expertise, spécialisé

Sonde
Peu sensible



Spécifique, sensible, commerciale, chère

PCR Amplicor



Spécifique, sensible, home made, pas chère

PCR en temps réel

Détection des antigènes par IF

Culture

POCT

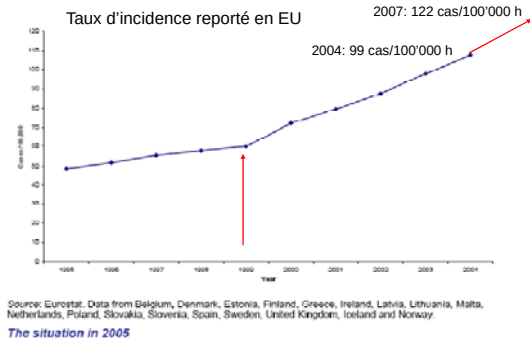
1988 1993 1998 2003 2008

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



Qui cherche, trouve...

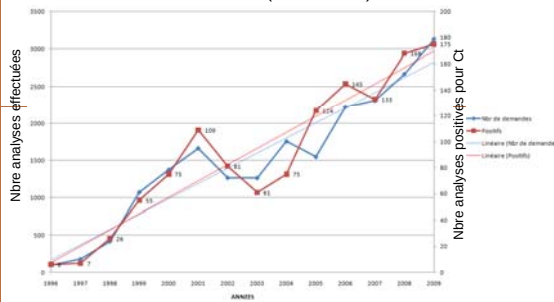


14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

Qui cherche, trouve...

Nombre d'analyses effectuées et de positifs pour C.t 1996-2009
N = 20945 (IMUL-CHUV)

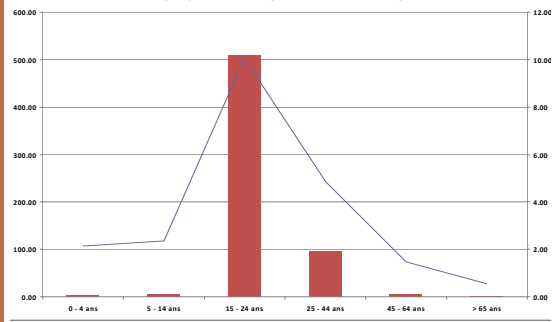


14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

Valeur ajoutée: Prélèvement simple URINE

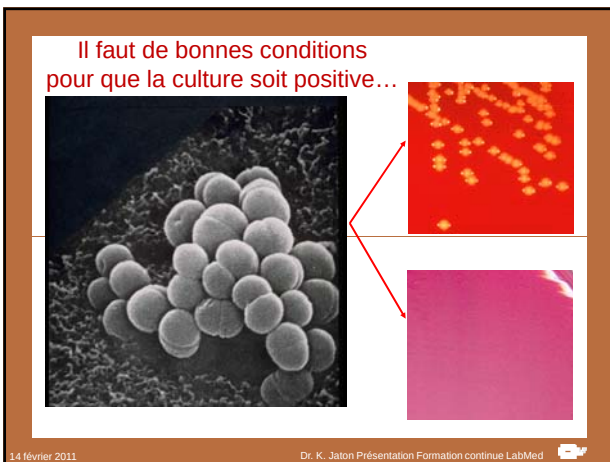
Screening systématique est envisageable

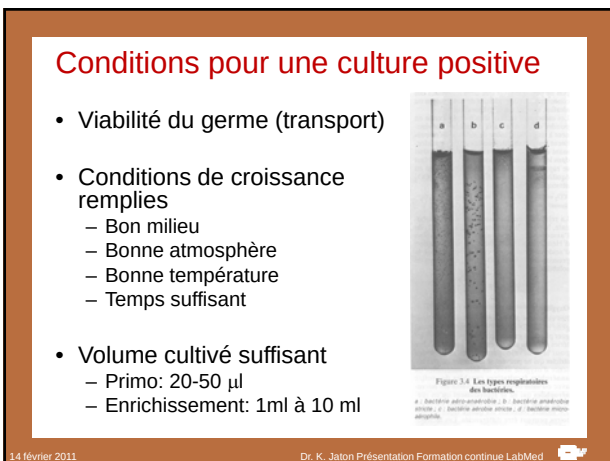


14 février 2011

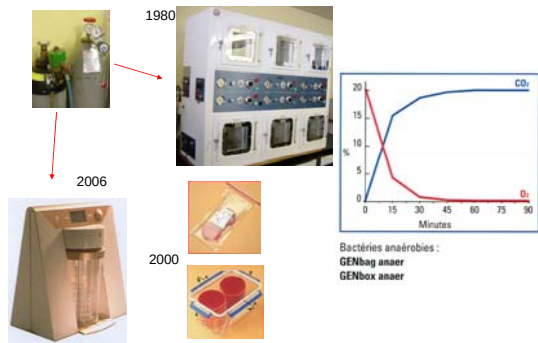
Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



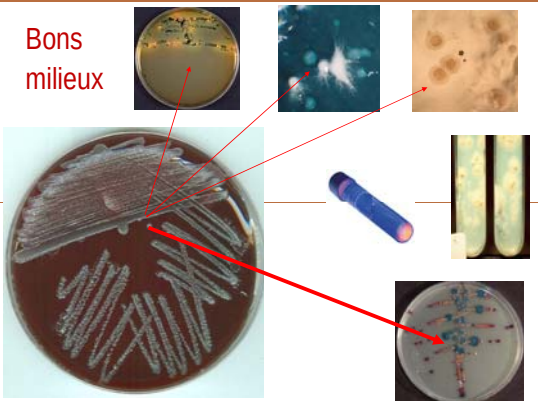




Une bonne atmosphère



Bons milieux



14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

Germes impossibles ou difficiles à cultiver
Situation clinique particulière avec AB au préalable



Place pour des méthodes alternatives
comme l'amplification des acides nucléiques
(PCR) pour visualiser

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

J-H, 1982

- **Présentation clinique de méningite**

- Rocéphine 1 dose avant le LCR et les hémocultures

- **LCR**

- Examen direct : leucocyte 4+, pas de germe
- Culture: stérile
- Hémocultures négatives

Documentation de l'infection est importante

- ✓ Traitement antimicrobien empirique adéquat
 - virus ou bactérie? Quelle bactérie ou quel virus?
- ✓ Spectre et durée de l'antibiothérapie
- ✓ Prophylaxie de l'entourage
- ✓ Épidémiologie



14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



La méningite
Situation d'urgence, grave



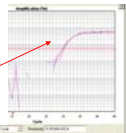
antibiotiques
avant la ponction lombaire

Il est dans ces conditions
difficile d'obtenir une culture positive

4-plex real-time PCR positive pour *N. Meningitidis*

Valeur ajoutée pour le clinicien:

- Documentation microbiologique
- Impact sur l'épidémiologie (la prophylaxie entourage, sérotypage moléculaire possible)

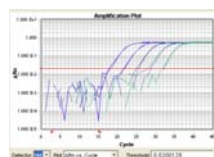
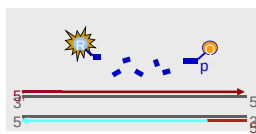
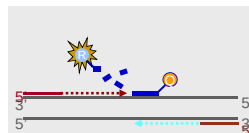
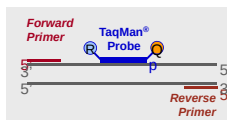


14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



La PCR en temps réel



14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



2010 : Le diagnostic moléculaire est indispensable lorsque...

- Méningite avec un LCR pathologique et AB au préalable
- Méningite, méningoencéphalite, encéphalite d'allure virale
 - Enterovirus, HSV1 et 2, VZV
 - Cas particuliers: EBV, CMV, JC, HHV6, Toxo
 - Autres étiologies rares
- Forte suspicion de méningite, cultures et autres PCR spécifiques restées négatives
 - PCR eubactérienne
(Schuurman, 2004, JCM, 734;
Welinger-Olsson, 2007, Clin. Micro. and Infection, 13, 879.)

Les PCR effectuées sur LCR pathologiques et/ou si AB au préalable

Jour 0 ou jour 1 -2 5j/7j; heures ouvrables

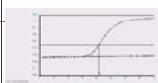
Pathogens

Enterovirus	GeneXpert
<i>Neisseria meningitidis</i>	2-plex
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2-plex
<i>Haemophilus influenzae</i> type B	2-plex
<i>Listeria monocytogenes</i>	2-plex
<i>M. tuberculosis</i>	monoplex
VZV	monoplex
HSV1	2-plex
HSV2	2-plex
JC	monoplex
CMV	monoplex
EBV	monoplex

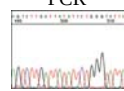
PCR-Eubactérienne: Séquençage
test supplémentaire valable lors de forte suspicion de méningite, cultures et autres PCR restées négatives.

Schuurman, 2004, JCM, 734; Welinger-Olsson, 2007, Clin. Micro. And Infection, 13, 879.

POCT: 2h
7j/7j



Real-time
PCR



Séquençage

Méningites: Performance, VA

- Bactérienne
 - La probabilité de détecter un organisme par culture est fonction des AB administrés avant la PL.
 - si AB iv, LCR stérile après 2 h pour *N. meningitidis*, 4h pour *S. pneumoniae*. Sensibilité diminue de moitié
[Kanegaye et al, Pediatrics, 2001](#)
 - étude prospective française 363 enfants avec clinique N.m. et culture CSF négative: 57% détectés par PCR
[Levy et al, Arch. Pediatr, 5105, 2008](#)
- Enterovirus
 - Réduction du TAT 5.4 vs 2.2 jours
 - Réduction AB, investigations, coûts
[Ninova L, et al. Clin Microbiol Infect 2009](#)

POCT moléculaire GeneXp
simple et rapide ... mais

Résultat en 1h à 2h!
Personnel technique non expérimenté

POCT
Bac
Virus

Enterovirus
Grippe A, H1N1

Amplification d'une cible connue
PCR à spectre réduit

- Gène cible ne doit être que dans la bactérie recherchée
- Utilisation de primers spécifiques
- Réagissent avec les séquences qui sont présentes seulement dans les bactéries que l'on cherche
- Résultat: "présence ou non présence " et quantification du germe ciblé

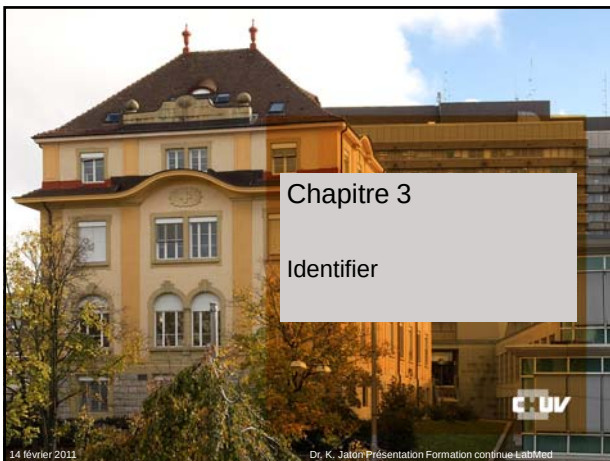
14 février 2011 Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

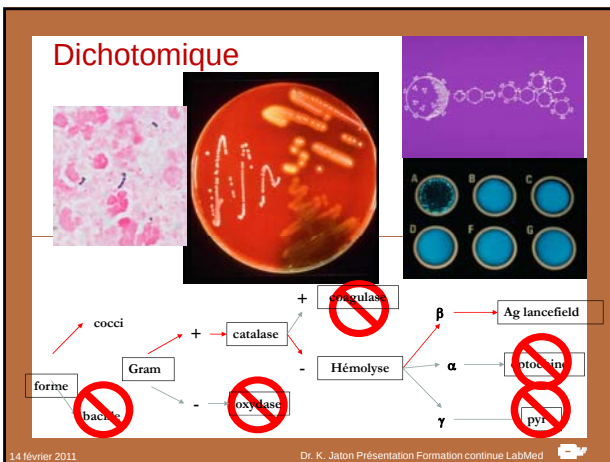
Impossibles ou difficiles à cultiver

- Micro-organismes
 - à croissance lente : Mycobactéries, ...
 - difficiles ou impossibles à cultiver

<i>Bartonella*</i>	<i>Legionella*</i>	<i>Bacillus anthracis*</i>
<i>Bordetella*</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Francisella tularensis*</i>
<i>Borrelia</i>	Méningocoques*	<i>Yersinia pestis*</i>
<i>Brucella</i>	Mycobactéries*	
<i>Chlamydia*</i>	<i>Mycoplasma*</i>	
Gonocoques*	<i>Rickettsiae*</i>	
<i>Coxiella burnetii*</i>	<i>Treponema</i> (Syphilis)	
<i>Ehrlichia</i>	<i>Tropheryma whipple</i>	
.....		

14 février 2011 Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed





Numérique

Années 80_ 11 tests_O/N_manuel

B-

Années 90_ 20 tests_O/N_manuel, interprétation standardisée → 32 tests_ 4h_ lecture et interprétation standardisée

Années 2000_ automate_ une seule carte pour enterobacteries et NF_ de 2 h- 3h (fluorescence) à 3-6 h (2005; colorimétrie)_ automate on line

2010: Maldi ToF: spectrométrie de masse, 5 min pour une identification!

CHUV semaines 1-12 2008: identification

	Phénotypique	moléculaire
Entérobactéries	1413	1
Non fermentatifs	394	13
Staphylocoques	816	5
Entérocoques	273	2
Streptocoques	157	1
Pneumocoques	54	
<i>Haemophilus</i>	64	1
<i>Campylobacter</i>	25	4
<i>Clostridium</i>	49	

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



CHUV semaines 1-12 2008: identification

	Phénotypique	moléculaire
<i>Bacillus</i>	6	
<i>Bacteroides</i>	8	1
Corynebactéries	3	1
<i>Fusobacterium</i>	1	
<i>Lactobacillus</i>	2	2
<i>Mycoplasma</i>	4	
<i>Neisseria</i>	3	2
B+ana non sporulés	10	
<i>Veillonella</i>	1	
Vibrionacées	2	

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

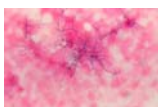


16S rRNA gene amplification followed
by direct sequencing :

NEW TOOL OR NEW TOY

for difficult-to-identify isolates from clinical
specimens?

K. Jaton, A. Wenger, C. André, O. Dubuis and J. Bille
Institut de Microbiologie, CHUV, Lausanne
ECCMID et SSM 2001



14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



JF, 1993

- 15.10: Infections mononucleose like
 31.10: Hospitalisation, fièvre, vomissement, tachypnée, et douleur thoracique: pneumonie lobe droit
 3 paires d'hémocultures
 • Début du traitement : Clarithromycine
 04.11: Pas d'amélioration clinique, épanchement pleural et péricardique
 1 paire d'hémoculture et expectoration
 • Ajout de Ceftriaxone
 14.11: Détérioration clinique. Scanner montre une pneumonie nécrosante avec un abcès pulmonaire et un épanchement pleural.
 Transfert aux soins intensifs de pédiatrie.
 Liquide pleural

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed





Consultation infectiologue après 15 jours de traitement par ceftriaxone sans amélioration...

Liquide pleural

- Examen direct : leucocyte 4+ pas de germe
- Cultures standard négatives



Infection décapitée ?
 Germe rare ?
 Germe qui ne pousse pas sur les milieux habituels ?
 Germe qui pousse lentement ?

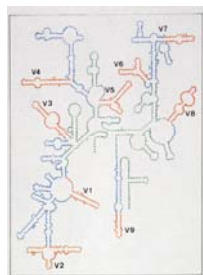
14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



PCR large spectre, eubactérienne

- ✓ Cible: 16S rDNA (petite sous-unité ribosomes procaryotes)
- ✓ Gène ancestral et essentiel
- ✓ Présent chez toutes les bactéries en plusieurs copies
- ✓ Structure en mosaïque avec des régions
 - Conservées
 - Variables (signatures)
- ✓ Séquences utilisées depuis 1980 pour la taxonomie et l'évolution des relations entre les espèces (horloge moléculaire)
- ✓ Grandes bases de données

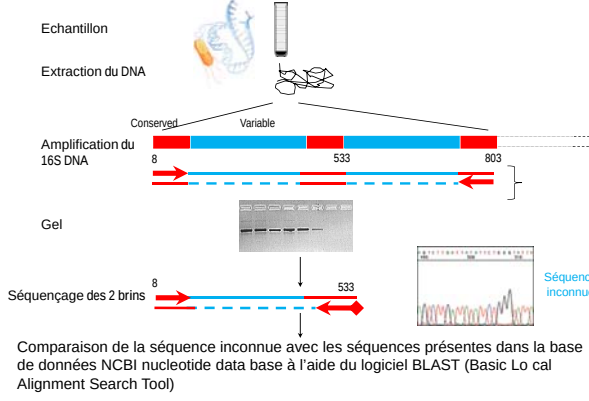


14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



PCR Eubactérienne directe



La « hit » liste

[illegible]

montre si notre séquence correspond à quelque-chose de déjà décrit dans la base de donnée

JF, 1993

Liquide pleural

✓PCR à large spectre: *Mycoplasma hominis*

Confirmation par une PCR *Mycoplasma hominis* spécifique

- 270'720'000 copies/ml!

Positive également dans le liquide péricardique

Valeur ajoutée :

- Documentation de l'infection
- Impact sur l'antibiothérapie: Doxycycline
- Amélioration rapide.

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

Chapitre 4

Antibiorésistance, mesurer l'effet des armes

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

Les cibles

- Membrane cytoplasmique
- Paroi: synthèse du peptidoglycane
- Chromosome: synthèse ou réplication
- Ribosomes: synthèse des protéines

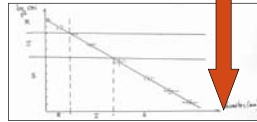
14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

A diagram showing 10 test tubes arranged in a row. Each test tube contains a liquid of a different color, representing a concentration gradient. Below each test tube is a numerical label. The labels are: 0.0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, and 256. The colors transition from dark blue for 0.0, through various shades of blue and green, to colorless for 256. A red arrow points to the test tube labeled '4'.



Diamètre inhibition



CMI

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

Interpréter

Pénicilline : CMI critiques			
	S	R	Mécanisme
<i>Entérobactéries</i>	-	-	Imperméabilité
<i>Pseudomonas</i>	-	-	Imperméabilité + pompe
<i>Staphylocoques</i>	<=0.12	>=0.25	Pénicillinase
<i>Entérocoques</i>	<=8	>=16	PLP5 c/o E. faecium
<i>Pneumocoques</i>	<=0.06	>=0.12	PLP1a, 2x, 2a, 2b modifiées (mosaïques)

Les couples germes-antibiotiques sont uniques

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

Surveiller

[illegible]

14 février 2011

Détection génotypique des résistances bactériennes

De la phénotypie à la génotypie,
deux méthodes complémentaires?

- Plusieurs mécanismes
- Pas de gène de résistance universel
- Pannel d'antibiotiques testés
- Grande diversité des mécanismes génétiques

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



Gènes de Résistance les plus utilisés en diagnostic

Bactéries	Gènes cibles	Antibiotiques
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mec A</i>	Méthicilline
Staphylocoques coag neg		
<i>Enterococcus sp</i>	<i>vanA, vanB, vanC</i>	Vancomycine
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>pbp1A</i>	Pénicilline
	<i>ermB, mefE</i>	Macrolides
Entérobactéries	<i>Bla Tem</i>	Ampicilline,
	<i>Bla SHV</i>	Céphalosporines
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>bla Rob</i>	Ampicilline
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>rpoB</i>	Rifampicine
	<i>katG</i>	
	<i>inhA</i>	Isoniazide
	<i>ahpC</i>	
...	...	...

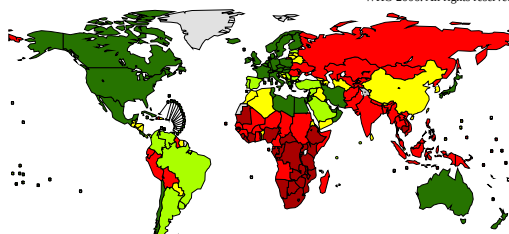
14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



Nombre de cas de tuberculose déclarés /100'000 habitants en 2006

WHO 2006. All rights reserved



Estimated new TB cases
(all forms) per 100 000 population

No estimate
 0-24
 25-49
 50-99
 100-299
 300 or more

Mycobacterium tuberculosis est un germe très contagieux,
lent et qui tue.
Culture: 20 jours (cultures gardées 8 semaines)
AB: 20 jours après la positivation de la culture

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed





L'outil moléculaire utopique devrait :

1. Améliorer la SENSIBILITE
2. Améliorer le SPECTRE des micro-organismes à détecter: détection des micro-organismes difficiles ou impossibles à cultiver
3. Améliorer la détection même lorsque des AB ont été utilisés
4. Augmenter la rapidité du rendu des résultats (TAT), « same day result » (< 6 hours)
5. Diminuer la charge de TRAVAIL au laboratoire
6. Remplacer une méthode
7. Différencier l'infection de la contamination

14 février 2011 Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

Notion de transversabilité
Plus de cloisons en microbiologie...

1. Plate-forme utilisant les mêmes cycles d'amplification pour tous les pathogènes que ce soit:
 - Les bactéries
 - Les virus
 - Les champignons
 - Les parasites
2. Notion de transversabilité de l'outil et d'abaissement des barrières entre les domaines de la microbiologie.
 - Polyvalence
 - Partage des appareils donc diminution des coûts
3. Notion de service pour la recherche
 - Partage des appareils donc diminution des coûts

14 février 2011 Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed

Notion d'uniformisation

4. Plate-forme utilisant un robot d'extraction et une seule méthode d'amplification

- Extraction : Robots...
 - Robot X pour l'ADN
 - Robot Y pour l'ARN
- Distribution des réactifs: Robot
- Amplification de détection Real-time PCR (TaqMan: un seul type d'amplification)

IMUL: 80% des analyses de diagnostic moléculaire

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



Types et nombre de pathogènes recherchés

21 Bactéries

Chlamydia trachomatis
Nisseria gonorrhoeae
M. tuberculosis complex
Toxoplasma
Bartonella henselae
Bartonella quintana
Bordetella pertussis
Bordetella parapertussis
Rickettsia sp.
Rickettsia typhi
Mycobacterium pneumoniae
Chlamydia pneumoniae
Legionella pneumophila
Coxiella burnetii
Listeria monocytogenes
Nisseria meningitidis
Streptococcus pneumoniae
Haemophilus influenzae
M. hominis
U. urealyticum
S. aureus fema

25 Virus

Herpes simplex 1&2
Varicelle zoster
Cytomegalovirus
Epstein-Barr
Entérovirus
Parvovirus B19
HIV
BK virus
JC virus
Influenza (A+B+H5)
Parainfluenza
Coronavirus
HMPV
Adenovirus
RSV
Norovirus
Papillomavirus

8 champignons

Candida sp. capsulata
Aspergillus fumigatus
Pneumocystis carinii

5 parasites

Leishmania
Paratuberculosis
Toxoplasma

5 larges spectres

Salmonella
Escherichia coli
Staphylococcus aureus
Paratyphus TM

Identification

Escherichia coli
Staphylococcus aureus
Paratyphus TM

AB

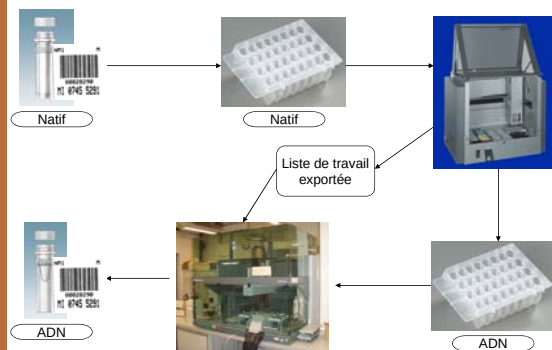
Chlamydia trachomatis
Nisseria meningitidis
M. hominis

14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed



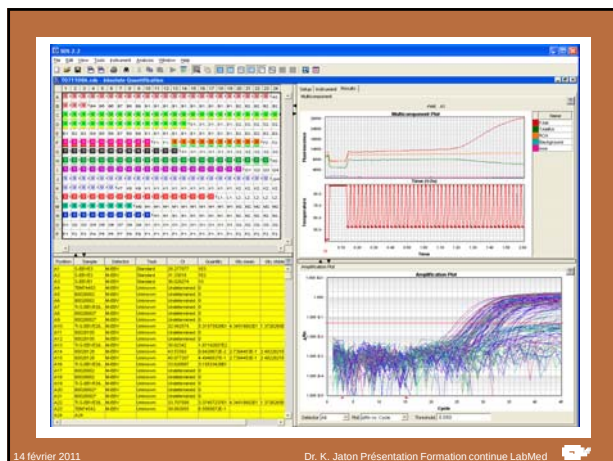
Extraction ADN

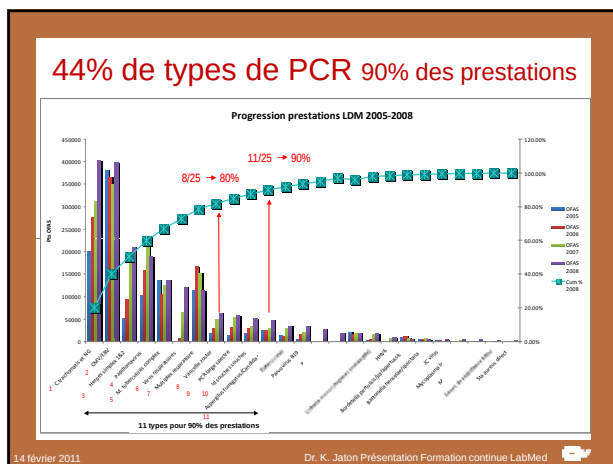


14 février 2011

Dr. K. Jaton Présentation Formation continue LabMed







Analyses (Activités)	Demande	Positif	% positif
Rickettsia sp. typhi	5	0	0.0%
Coxiella burnetii	144	0	0.0%
Haemophilus influenzae	138	0	0.0%
Parainfluenza	600	3	0.5%
Chlamydia pneumoniae	296	3	0.9%
Neisseria gonorrhoea	2386	28	1.0%
Legionella pneumophila	153	2	1.3%
Coccidioides	389	7	1.8%
HSV	386	9	2.3%
Mycoplasma pneumoniae	319	8	2.5%
MPV	191	7	3.7%
Bordetella pertussis/pertussis	108	4	3.7%
Toussigapneum	126	5	4.0%
Cytomegalovirus	110	8	7.3%
Influenza (A+B) +H5N1	429	21	4.9%
M. tuberculosis complex	974	51	5.2%
Aspergillus fumigatus	331	18	5.4%
Baranella henselae/guinea	88	5	5.7%
Chlamydia trachomatis	2099	119	5.6%
Adenovirus	221	13	5.9%
Neisseria meningitidis	142	9	6.3%
LC virus	44	3	6.8%
Streptococcus pneumoniae LydA	147	11	7.5%
Candida sp	130	13	9.7%
Mec A gene/Fem A direct	35	3	8.6%
Parainfluenza	68	6	8.8%
Parainfluenza	1224	110	9.0%
HRV8	72	7	9.7%
Streptococcus pneumoniae	140	16	11.4%
Staphylococcus aureus direct	130	13	10.0%
Herpes simplex 1&2	208	22	10.6%
Parainfluenza B19	246	25	10.1%
Parainfluenza	230	27	11.7%
Cryptosporidium (quant)	1874	225	12.0%
Enterovirus	213	27	12.7%
Mec A gene/Fem A direct	225	28	12.4%
M. tuberculosis / L. variegatum direct	36	11	30.6%
Epstein Barr (quant)	150	263	175.3%
LC virus	268	19	7.1%
Parainfluenza	1150	626	54.4%
TOTAL	20731	2233	10.8%

< 1% Objectif 2008- Indicateurs 10.8 % de positifs

1 - 5 %

5 - 10 %

10 - 20 %

> 20 %

