

NEWSLETTER 2016

DANS CE NUMÉRO :

<i>Déménagement des laboratoires de microbiologie diagnostique dans de nouveaux locaux au BH18</i>	2
<i>Tests rapides</i>	3
<i>10 ans de R&D et d'automatisation dans le diagnostic moléculaire</i>	4
<i>Automatisation en bactériologie</i>	5
<i>Impact du Gram de LCR en urgence sur le traitement empirique des suspicions de méningites</i>	6
<i>Neisseria meningitidis, l'as du cache-cache</i>	7
<i>Génomique d'importance médicale</i>	8
<i>Infections cutanées à Staphylococcus aureus...</i>	9
<i>Séquençage complet de génomes pour l'investigation d'épidémie...</i>	10
<i>Laboratoire de métagénomique diagnostique</i>	11
<i>Introduction du score de Ison en lieu et place de la culture</i>	12
<i>Détection rapide des BLSE dans les hémocultures</i>	13
<i>Révolution dans le monde de la tuberculose</i>	14
<i>Bactéries intracellulaires au sein des tiques du genre Ixodes en Suisse</i>	15
<i>Le « multiplex-bead assay » (MBA), une nouvelle technologie au service du diagnostic de la boréliose de Lyme</i>	16
<i>Centre National de référence sur la fièvre Q</i>	17
<i>Mise à jour du diagnostic des papillomavirus</i>	18
<i>Pensez à la Leishmaniose</i>	19
<i>Résistance transférable aux polymyxines (colistine)</i>	20
<i>5ème journée de formation en microbiologie diagnostique</i>	21
<i>Innovations en microbiologie diagnostique</i>	22

EDITORIAL GILBERT GREUB



Après les newsletters de 2012 et de 2014, voici la dernière newsletter de l'institut de microbiologie qui présente les innovations récentes effectuées par le laboratoire de diagnostic de microbiologie, ainsi que les grands changements qui ont marqué ces 2 dernières années.

Mentionnons à titre d'exemple le déménagement des laboratoires de bactériologie et parasitologie dans de nouveaux locaux au BH18, locaux partagés avec le laboratoire d'épidémiologie et d'hygiène hospitalière.

Mentionnons également l'automatisation, la génomique, la métagénomique et le développement des tests rapides qui permettent à notre laboratoire de microbiologie diagnostique d'apporter des tests

de qualité et des technologies de pointe pour le plus grand bien des patients.

Et n'oublions pas les techniciennes et techniciens en analyse biomédicale, les biologistes et les médecins, qui tous solidaires sont les véritables acteurs de ces changements. Acteurs qui doivent toutefois s'adapter en raison de l'automatisation accrue et du changement de métier que cela implique et de la place croissante que la bioinformatique et la micro-informatique prennent dans nos laboratoires.

J'espère donc que ce numéro 2016 de la newsletter vous permettra d'apprécier le dynamisme de notre laboratoire diagnostique qui doit faire face au quotidien, non seulement aux changements des techniques,

mais également aux changements épidémiologiques et à une proportion accrue de bacilles Gram négatifs multi-résistants. De plus, notre laboratoire doit adapter les outils diagnostiques spécifiques pour certains pathogènes majeurs dont par exemple, l'agent de la tuberculose, le méningocoque ou l'agent de la maladie de Lyme.

Je vous souhaite donc une bonne lecture et un bel automne.

Lausanne,
le 4 octobre 2016



DÉMÉNAGEMENT DES LABORATOIRES DE MICROBIOLOGIE DIAGNOSTIQUE DANS DE NOUVEAUX LOCAUX AU BH18

Christian Durussel, Dominique Blanc, Guy Prod'hom & Gilbert Greub



*« Déménagement :
une opportunité de
réorganisation des
activités »*

Le projet New LAB 18 consistait en un déménagement (i) des laboratoires de l'institut de microbiologie ainsi que (ii) du laboratoire d'épidémiologie de l'unité d'hygiène prévention et contrôle de l'infection (HPCI) au 18ème étage du bâtiment principal du CHUV. Cet emménagement, dans une longue plateforme commune de 7m de large et environ 50m de long, a été une opportunité de réorganisation des activités avec une amélioration du flux de travail, un partage des locaux, des compétences et des équipements entre la microbiologie et l'unité HPCI. Le déménagement s'est déroulé sur une période de 4 semaines et n'a pas perturbé la qualité des prestations, grâce à l'engagement de l'ensemble de l'équipe. Le bilan est très positif puisque dans ces nouveaux locaux, l'ensemble des techniciennes et techni-

ciens interrogés saluent le bruit moins important, la plus grande luminosité des laboratoires et l'ergonomie accrue, notamment grâce à des tables dont la hauteur est réglable.

La réunion des techniciennes et techniciens des deux laboratoires dans la même plateforme a nécessité des adaptations afin d'uniformiser les pratiques. Ces adaptations ont pu se faire très rapidement et ont permis un enrichissement réciproque des deux équipes.



Figure :

Les nouveaux locaux de microbiologie, avec à l'avant-plan le WASP permettant l'ensemencement automatisé des géloses.

TESTS RAPIDES

Gilbert Greub, Dominique Blanc, Christian Durussel, Katia Jatton, Pascal Meylan & Guy Prod'hom

Suite à notre proposition avalisée par la direction générale en septembre 2015, le laboratoire de microbiologie diagnostique offre dès le 1er janvier 2016 des prestations de 7h00 à 22h00, 7j/7j (au lieu de 8h-17h 5j/7j et 8h-14h le week-end). Ces prestations élargies incluent certains examens de Gram et de mises en culture pour des échantillons précieux (liquides articulaires, LCR...) et également des tests rapides. Les tests rapides sont des tests immunochromatographiques et des tests moléculaires semi-automatisés. Ces tests rapides permettent de diminuer le temps jusqu'au rendu des résultats avec (i) une amélioration de la qualité des soins lors d'infections sévères, (ii) une amélioration de la prise en charge des infections nosocomiales, (iii) une amélioration du flux des patients (décision d'isolement ou non) et (iv) un bénéfice financier au niveau institutionnel.

Ces tests rapides incluent entre autres la détection de staphylocoques dorés résistants à la méthicilline (MRSA), la détection d'entérocoques résistants à la vancomycine (VRE), la détection de l'agent de la tuberculose (*M. tuberculo-*

sis), de l'agent de la grippe (Influenza), du norovirus, de l'entérovirus, de la dengue...(1) Notons ici que le coût des tests PCR rapides de type GeneXpert, bien que significatif, se justifie généralement par le bénéfice d'isoler ou non un patient. C'est le cas pour l'agent de la grippe, pour le staphylocoque résistant à la méthicilline (MRSA), *C. difficile*, *M. tuberculosis*, Norovirus et le virus respiratoire syncytial. L'utilisation de la PCR GeneXpert entérovirus se justifie également puisque la durée d'hospitalisation est considérablement raccourcie grâce à ce test rapide moléculaire, passant d'une médiane de 4 jours à une médiane de 11 heures environ (2). Ainsi, les coûts sont réduits de CHF 3691.- sans PCR ou de CHF 2738.- avec une PCR classique à CHF 580.- par hospitalisation pour une méningite à entérovirus.

L'implémentation de ces nouveaux horaires nous permet également de prendre en charge les hémocultures qui se positivent en fin de journée. Cet élargissement des horaires a été associé à un arrêt des piquets de nuit entre 22h00 et 7h00 du matin puisque les principales urgences infectiologiques (suspicion de méningite et suspicion de

malaria), peuvent être traitées empiriquement dans l'attente d'un résultat microbiologique. De plus, nous avons montré la faible utilité de l'examen direct sur le liquide céphalorachidien la nuit, en raison de la faible sensibilité de ce test et du fait que basé sur les recommandations actuelles, 100% des patients souffrants de méningites sont traités empiriquement par ceftriaxone en attendant le résultat des cultures et des PCR (3).

Références :

(1) Clerc O, Greub G.

Routine use of point-of-care tests: usefulness and application in clinical microbiology.

Clin Microbiol Infect. 2010;16(8):1054-61.

(2) Giulieri SG, Chapuis-Taillard C, Manuel O, Hugli O, Pinget C, Wasserfallen JB, Sahli R, Jatton K, Marchetti O, Meylan P.

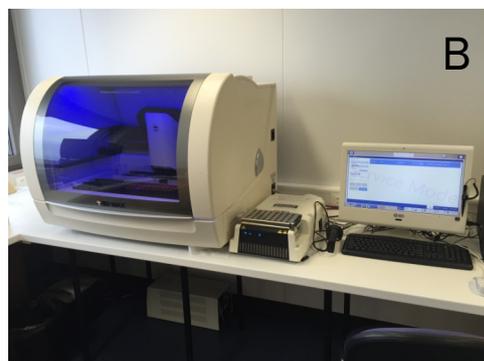
Rapid detection of enterovirus in cerebrospinal fluid by a fully-automated PCR assay is associated with improved management of aseptic meningitis in adult patients.

J Clin Virol. 2015 Jan;62:58-62.

(3) Tissot F, Prod'hom G, Manuel O, Greub G.

Impact of round-the-clock CSF Gram stain on empirical therapy for suspected central nervous system infections.

« Ces tests rapides permettent de diminuer le temps jusqu'au rendu des résultats »



Figures :

Les tests rapides moléculaires sont effectués à Lausanne à l'aide du Genxpert (Panel A) et du BD-Max (panel B).

10 ANS DE R&D ET D'AUTOMATISATION DANS LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

Katia Jaton et Gilbert Greub



*« Grâce à
l'automatisation,
les bactéries,
virus, parasites et
champignons
peuvent être
testés par PCR sur
une même plaque
de 384 puits »*

Les applications des tests de diagnostic moléculaire continuent d'augmenter de manière drastique. Ces tests moléculaires s'appliquent actuellement dans tous les domaines de la microbiologie c'est à dire aussi bien pour la détection des bactéries à croissance fastidieuse, des bactéries intracellulaires, des virus, des levures, des champignons filamenteux et de divers parasites, mais également pour la détection de toxines ou d'autres facteurs de virulence, la détection rapide de gènes codant pour la résistance aux antibiotiques et/ou de mutations conférant une résistance aux antimicrobiens, pour le diagnostic lors de cultures négatives en raison d'antibiothérapies préalables et enfin pour le typage. Malgré le développement de nombreux tests moléculaires commerciaux, et selon une étude effectuée par le groupe européen du diagnostic moléculaire (ESGMD), 47% des laboratoires interviewés utilisent des tests « home-made ». Ces tests moléculaires sont généralement le résultat de processus recherche et développement (R&D) incluant des approches standardisées et une série d'étapes de validation.

En parallèle l'automatisation s'est développée en microbiologie que ce soit pour la microbiologie dite classique ou pour le diagnostic moléculaire. Comme en témoigne notre plateforme de diagnostic moléculaire développée à Lausanne, nous avons pu automatiser en plaque de 384 puits l'analyse par PCR de plus de 90 paramètres différents, incluant des bactéries, virus, parasites et champignons. Les avantages principaux de cette automatisation sont financiers, qualitatifs (reproductibilité augmentée, moins

de faux positifs), augmentation du nombre de tests par heure (throughput), diminution du temps du rendu du résultat (<24H), et la disponibilité d'une plateforme flexible permettant de faire face à une soudaine augmentation de la demande. Cette plateforme nous permet de nous adapter aux nouveaux besoins des cliniciens (épidémies, nouveaux pathogènes) et de rester vigilants scientifiquement (polymorphisme).

Le processus de recherche et développement, la description de cette plateforme ainsi que le portfolio des tests à disposition sont sur notre site..

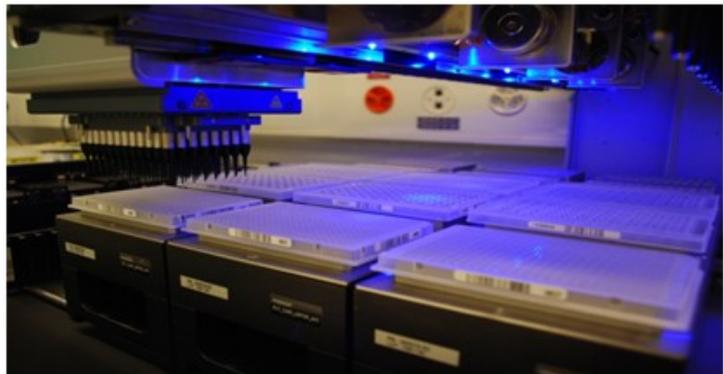


Référence :

Gilbert Greub, Roland Sahli, René Brouillet and Katia Jaton.

Ten years of R&D and full automation in molecular diagnosis.

Future in Microbiology. Volume 11, pages 403-425, March 2016.



AUTOMATISATION EN BACTÉRIOLOGIE

Gilbert Greub, Guy Prod'hom & Antony Croxatto

Depuis 3 ans, notre laboratoire de microbiologie diagnostique utilise le système automatisé WASP pour inoculer les géloses. Ainsi quotidiennement, plus de mille géloses sont ensemencées. La durée d'incubation moyenne étant d'environ 2 jours, chaque gélose est généralement lue au moins 2 fois ce qui représente un total de 2 000 géloses lues par jour. Ainsi l'utilisation future d'incubateurs intelligents capables de détecter la croissance sur les géloses, d'acquérir des images de ces géloses et de permettre une lecture à distance (appelée télébactériologie) est hautement souhaitée, puisqu'elle permettra une économie significative en terme d'emplois pleins temps (EPT) des techniciennes et techniciens en analyses biomédi-

cales (TAB) et d'augmenter significativement la productivité. Il existe actuellement sur le marché principalement 2 chaînes entièrement automatisées commercialisées respectivement par Copan et BD-Kiestra (2). Nous avons par conséquent comparé ces deux systèmes d'inoculation et, avons pu montrer, qu'avec des schémas d'ensemencements similaires, il n'y a qu'un avantage modéré en faveur du système Inoqula (1). Par contre, les 2 systèmes automatisés confèrent une amélioration significative de la qualité permettant un rendu de résultat plus rapide et une réduction des coûts réactifs (1).

Ainsi, nous envisageons de faire un appel d'offre publique dans le but d'acquérir ce type de chaîne automatisée.

Références :

(1) Croxatto A, Dijkstra K, Prod'hom G, Greub G.

Comparison of Inoculation with the Inoqula and WASP Automated Systems with Manual Inoculation.

J Clin Microbiol. 2015 Jul;53(7):2298-307.

(2) Croxatto A, Prod'hom G, Faverjon F, Rochais Y, Greub G.

Laboratory automation in clinical bacteriology: what system to choose ?

Clin Microbiol Infect. 2016 Mar;22(3):217-35.



Image de BD Kiestra
(The Netherlands)



Image de Copan
(Italy)

« Ce type de chaîne automatisée permet un rendu de résultat plus rapide et une réduction des coûts »

IMPACT DU GRAM DE LCR EN URGENCE SUR LE TRAITEMENT EMPIRIQUE DES SUSPICIONS DE MÉNINGITES

Guy Prod'hom & Gilbert Greub,



« *L'examen microscopique du LCR pendant la nuit n'a qu'un impact limité sur la prescription de traitement antibiotique* »

Les méningites bactériennes sont des urgences médicales associées à une mortalité significative variant entre 15 et >30% selon les études. L'examen microbiologique en urgence du liquide céphalo-rachidien (LCR) permet d'identifier près de 60-90% des organismes provenant d'infections communautaires et 20-60% des méningites nosocomiales. Depuis plusieurs années, des algorithmes de prises en charge des patients proposent des antibiothérapies empiriques précoces afin de réduire les délais avant l'introduction d'un traitement efficace. Lors d'une étude rétrospective portant sur 6 ans de résultats de LCR obtenus en urgence et parvenu au laboratoire en dehors des heures d'ouvertures, nous avons déterminé l'impact du résultat sur la prescription d'antibiotiques pendant

la nuit. Sur 241 cas de suspicion d'infections, 89 (37%) ont été microbiologiquement documentées. Notamment, 51 cas de méningites bactériennes (23 communautaires, 28 nosocomiales), 29 cas de méningites aseptiques et 9 cas de méningo-encéphalites. Globalement, 24 (10%) LCR étaient positifs à l'examen microscopique, la sensibilité de l'examen microscopique était de 43%, et la spécificité de 99% (2 faux positifs à l'examen microscopique pendant la nuit). Un traitement empirique avait été introduit avant l'examen microscopique dans 19/24 cas (79%). Dans 12 cas, le traitement est resté inchangé. Dans 7 cas, un antibiotique a été rajouté au traitement en cours et dans 5 cas, le traitement empirique a été instauré après le résultat du Gram. L'analyse des exa-

mens de LCR négatifs a montré qu'un résultat négatif a été utilisé pour interrompre un traitement alors qu'il était inapproprié selon l'algorithme en vigueur dans l'hôpital. L'étude conclut que la réalisation des examens microscopiques du LCR pendant la nuit n'a qu'un impact modeste sur la prescription de traitement antibiotique et que la grande majorité des cas avait un traitement empirique justifié par d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

Référence :

Tissot F, Prod'hom G, Manuel O, Greub G. Eur J *Impact of round-the-clock CSF Gram stain on empirical therapy for suspected central nervous system infections.* Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Jul 4

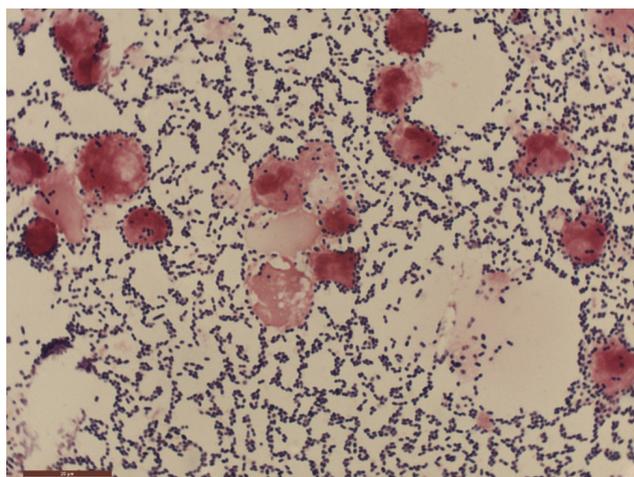


Figure: Examen microscopique après cyto-centrifugation lors de méningite sévère à *Streptococcus pneumoniae*. La coloration de Gram montre la présence de cellules inflammatoires (polymorphonucléaires) en rose et une importante quantité de cocci Gram positif souvent en diplocoques évocateurs de *S. pneumoniae*.

NEISSERIA MENINGITIDIS, L'AS DU CACHE CACHE

Gilbert Greub et Katia Jatou

Au cours des 20 dernières années, le diagnostic de la méningite bactérienne a été amélioré par le développement de tests de PCR qui ciblent spécifiquement les agents pathogènes responsables. En effet, depuis près de 10 ans, nous utilisons les amorces et la sonde décrite par Corless et al. (1) ciblant, pour le méningocoque, le gène *ctrA* responsable du transport des polysaccharides. Ce gène est également utilisé par la plupart des autres groupes effectuant cette PCR pour le diagnostic médical.

Cependant, le gène *ctrA* est absent dans environ 60% des méningocoques non groupables généralement associés à un portage naso-pharyngé et de plus il a été démontré par notre groupe que ce gène peut être polymorphe et générer des résultats faussement négatifs (2). Ces éléments et le fait que l'identification de *N. meningitidis* par le MALDI-TOF peut également poser des problèmes avec *Neisseria polysaccharia* (3) nous ont poussés à développer plusieurs autres cibles pour l'identification et la détection de *N. meningitidis* (4).

Une analyse génomique comparative détaillée pour identifier de nouveaux gènes cibles a permis le développement de PCR quantitative en temps réel ciblant 3 autres gènes spécifiques de *N. meningitidis*.

Ces 3 cibles ont été évaluées quant à leur performance en utilisant l'ADN génomique extrait à partir d'isolats et des échantillons cliniques de souches capsulées et non capsulées. Finalement nous avons choisi les gènes *metA* et *tauE*, qui se sont révélés être des cibles spécifiques et sensibles pour la détection de *N. meningitidis* à partir d'échantillons cliniques.

L'apparition de polymorphisme ou la perte des gènes ciblés dans certains isolats de *N. meningitidis* ne peut être exclue. Ainsi, nous utilisons plusieurs gènes en parallèle c'est à dire *ctrA*, *metA* et *tauE* pour le diagnostic de cet important pathogène afin d'éviter des erreurs d'identification ou des faux-négatifs qui peuvent avoir des conséquences graves pour le patient.

Références :

(1) Corless, C. E., M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, A. J. Fox, and E. B. Kaczmarek. 2001.

Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR.

J Clin Microbiol 39:1553-1558.

(2) Jatou K, Ninet B, Bille J, Greub G.

False-negative PCR result due to gene polymorphism: the example of Neisseria meningitidis.

Journal of Clinical Microbiology. 2010 Dec;48(12):4590-4591.

(3) Scott A. Cunningham, Jill M. Mainella and Robin Patel.

Misidentification of Neisseria polysaccharia as Neisseria meningitidis with the Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry.

J Clin Microbiol. 2014 Jun; 52(6): 2270-2271.

(4) Diene SM, Bertelli C, Pillonel T, Jacquier N, Croxatto A, Jatou K, Greub G.

Comparative genomics of Neisseria meningitidis strains: new targets for molecular diagnostics.

Clin Microbiol Infect. 2016 Jun;22(6):568.e1-7.

« Les *Neisseria* sont sujets à des polymorphismes génétiques pouvant causer des résultats faussement négatifs »

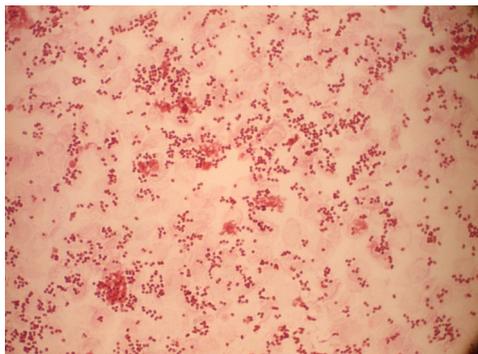


Figure:

N. meningitidis, visualisés par coloration de Gram.

GÉNOMIQUE D'IMPORTANCE MÉDICALE

Florian Tagini, Trestan Pillonel, Sébastien Aeby & Gilbert Greub



Le laboratoire diagnostique de génomique bactérienne a vu la demande pour des séquençages de génomes croître exponentiellement depuis sa création par le Professeur Greub le 1^{er} février 2012. Ainsi, si le nombre de génomes séquencés en 2014 ne s'élevait qu'à 26, ce chiffre a bondi en 2015 à 131 et devrait atteindre 270 en 2016 (extrapolation des 115 génomes déjà séquencés durant les cinq premiers mois de l'année). Rappelons que la facturation au demandeur se fait selon un tarif forfaitaire de CHF 1'000.-, comprenant, non seulement le séquençage du génome mais également son annotation ainsi qu'une analyse de son virulome et de son résistome. Une analyse de différentes souches par typing sur la base des « single nucleotide polymorphism » est également possible sur demande. Après extraction de l'ADN et vérification de sa qualité à l'aide du « Fragment Analyzer », le séquençage proprement dit est effectué à l'aide de l'appareil « MiSeq » (Illumina).

Les applications de la génomique bactérienne incluent :

- Epidémiologie intra-hospitalière et extra-hospitalière (1, 2)
- Analyse du virulome (3,4)
- Analyse du résistome (5)
- Mise en évidence de nouvelles cibles diagnostiques (6,7)
- Soutien à la génomique fonctionnelle par le séquençage des génomes de mutants

Etant centré autour du patient, notre laboratoire tient à proposer une réponse dans les délais les plus brefs. Par exemple, nous avons été mandatés par le médecin cantonal vaudois pour rechercher la présence du gène encodant pour la toxine de la diphtérie dans une souche qui semblait particulièrement pathogène. En moins de 10 jours, l'analyse a permis de détecter la présence de certaines régions phagiques et confirmer l'absence de la toxine cardiotoxique, ce qui a permis d'interrompre l'isolement du patient et le laisser rentrer à domicile (3). Un autre mandat nous fût proposé par le responsable de la médecine des migrants, de manière coordonnée avec la santé publique ; il s'agissait de déterminer si la prévalence accrue de staphylocoques dorés porteur de PVL pouvait être liée à une épidémie au

sein des hébergements pour réfugiés. Là encore, notre capacité d'analyse rapide a permis d'apporter une réponse en quelques semaines, montrant un nombre de polymorphismes significatifs et permettant d'exclure une transmission récente (1). Ainsi, le nombre important de certains sous-types (152,...) chez ces migrants témoigne seulement de leurs lieux d'origine - où ces souches sont endémiques - et ne justifie pas de mesures de santé publique additionnelles au sein des sites d'hébergements. Enfin, notre laboratoire de génomique effectuée en routine, sur mandat du service de l'hygiène hospitalière, le séquençage des souches issues de l'épidémie d'entérocoques résistants à la vancomycine documentées au sein de l'hôpital, afin de les guider dans les mesures de contrôle de l'épidémie.

En conclusion, notre laboratoire diagnostique de génomique bactérienne dont l'activité croît exponentiellement, est fonctionnel, fiable et particulièrement utile à notre hôpital et ses patients.

Références :

- (1) Jaton L, Pillonel T, Jaton K, Dory E, Prod'homme G, Blanc DS, et al. *Common skin infection due to Pantone-Valentine leucocidin-producing Staphylococcus aureus strains in asylum seekers from Eritrea: a genome-based investigation of a suspected outbreak.* Clin Microbiol Infect. 2016 Jun 6
- (2) Sherry NL, Porter JL, Seemann T, Watkins A, Stinear TP, Howden BP. *Outbreak investigation using high-throughput genome sequencing within a diagnostic microbiology laboratory.*

J Clin Microbiol. 2013 May;51(5):1396-401.

(3) Tagini et al. En préparation.

(4) Shimomura Y, Okumura K, Murayama SY, Yagi J, Ubukata K, Kirikae T, et al.

Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). BMC Genomics. 2011;12:17.

(5) Opota et al, En révision.

(6) Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al.

Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PLoS One. 2011;6(7):e22751.

(7) Greub G, Kebbi-Beghdadi C, Bertelli C, Collyn F, Riederer BM, Yersin C, et al.

High Throughput Sequencing and Proteomics to Identify Immunogenic Proteins of a New Pathogen: The Dirty Genome Approach. Valdivia RH, editor. PLoS ONE. 2009 Dec 23;4(12):e8423.

(8) Diene SM, Bertelli C, Pillonel T, Jacquier N, Croxatto A, Jaton K, et al. *Comparative genomics of Neisseria meningitidis strains: new targets for molecular diagnostics.*

Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2016 Jun;22(6):568.e1-7.



Sébastien Aeby

INFECTIONS CUTANÉES À *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PRODUCTEUR DE LA TOXINE DE PANTON-VALENTINE

Laure Jaton, Patrick Bodenmann & Gilbert Greub



Depuis 2014, une augmentation du nombre d'infections dermatologiques de type abcès ou furoncles a été observée chez des requérants d'asile, originaires d'Erythrée, consultant au CHUV ou à la PMU à Lausanne. Ces lésions étaient souvent multiples, récurrentes et nécessitaient souvent un drainage. Toutes ces lésions étaient dues à une infection à *Staphylococcus aureus* (figure), producteur de la toxine de Panton-Valentine (PVL).

La recherche de la PVL est effectuée à l'Institut de microbiologie par PCR, directement sur l'échantillon (frottis, pus, ...) ou sur la culture de *S. aureus* et le résultat est obtenu en moins de 24 heures. Ceci nous a permis de mettre en évidence cette problématique car en effet, et contrairement aux Etats-Unis où la majorité des souches de *S. aureus* communautaire résistant à la pénicilline sont productrices de PVL, en Europe moins de 5 % des souches de *S. aureus* sont PVL positives et ces dernières sont, pour la plupart, sensibles à la pénicilline.

Ainsi nous avons observé 29 cas d'infection à *S. aureus* sécrétant la PVL entre janvier 2014 et décembre 2015 à Lausanne, dont vingt étaient des infections chez des requérants d'asile érythréens, éthiopiens ou soudanais (1). Cliniquement, la grande majorité des cas observés étaient des infections dermatologiques récurrentes, difficiles à traiter (abcès, furoncles, adénite ou cellulite) à MSSA. Il y a eu un cas de pneumonie nécrosante et un cas de bactériémie soutenue sur une thrombose veineuse septique.

Grâce à un séquençage du génome de certaines de ces souches, une épidémie a pu être exclue (1). En effet, plus de 30 mutations ponctuelles différenciaient les souches les plus proches. Deux complexes clonaux ont été identifiés (CC15 et CC152) tous deux prévalents en Afrique de l'Est, et connus pour exprimer la PVL. Ainsi, face à une infection dermatologique inhabituelle chez un patient migrant d'Afrique, avant de rechercher des causes plus rares telles qu'une leishmaniose, une

rickettsiose ou une mycobactérie, il est important de penser à une infection à *S. aureus* producteur de PVL et rechercher la PVL par une PCR spécifique, en tout cas lors d'infections graves ou lorsque les lésions cutanées sont récurrentes.

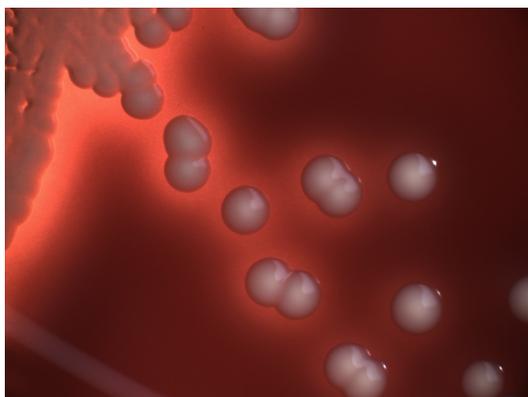
Références :

- (1) Jaton L., Pillonel t. Jaton K, Dory E, Prod'hom G. Blanc DS, Tissot F. Bodenmann P, Greub G. *Common skin infection due to Panton-Valentine leucocidin-producing Staphylococcus aureus strains in asylum seekers from Eritrea : a genome based investigation of a suspected outbreak.* Clin Microbiol Infect. 2016 Aug;22(8):739

« Le staphylocoque exprimant la toxine de Panton-Valentine (PVL) est une cause fréquente d'abcès cutanés récidivants chez les migrants »

Figure :

Colonies de *Staphylococcus aureus* sur une gélose au sang. Grossissement 12 x sur milieu de Columbia ; présence d'une hémolyse autour des colonies.



SEQUENÇAGE COMPLET DE GÉNOMES POUR L'INVESTIGATION D'ÉPIDÉMIE : EXEMPLE AVEC LE SAVON CONTAMINÉ DU CHUV

Dominique Blanc



« L'utilisation du typage DLST suivi du séquençage de génome a permis d'exclure un impact du savon contaminé sur les patients »

Durant l'investigation d'infections à *Pseudomonas aeruginosa* dans les soins intensifs du CHUV, nous avons découvert que le savon liquide pour les mains était hautement contaminé avec ce pathogène opportuniste. Pour évaluer si cette contamination a eu un impact sur les patients, toutes les souches de *P. aeruginosa* isolées durant la période d'exposition au savon contaminé ont été, dans un premier temps, analysées par typage moléculaire. L'utilisation d'une méthode simple que nous avons développé ("double locus sequence typing") nous a permis d'analyser un grand nombre de souches (776 isolats provenant de 358 patients). Les résultats ont montré qu'un génotype identique à celui retrouvé dans le savon a été mis en évidence chez 3 patients. Cependant, pour deux d'entre eux, les données épidémiologiques montraient que la contamination avec le savon était peu probable.

Dés lors, nous avons utilisé le séquençage complet de génome ("whole genome sequencing") pour analyser ces souches. Il a en effet déjà été montré que cette nouvelle méthode, issue des développements du séquençage à haut débit, permettait d'avoir un pouvoir discriminant beaucoup plus élevé que les méthodes moléculaires standards. Les résultats sont présentés sous forme d'un dendrogramme dans la figure 1, montrant qu'il n'y a pas de relation génétique entre les souches des 3 patients et celles du savon.

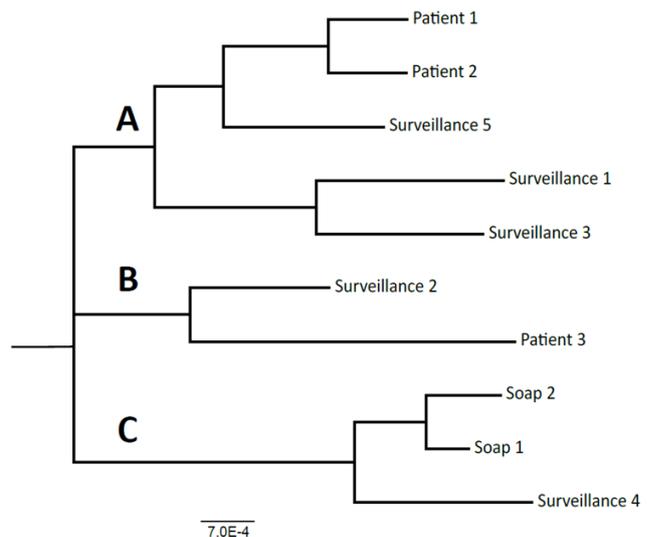
L'utilisation du typage

conventionnel dans un premier temps, suivi du séquençage de génome a ainsi permis d'exclure un impact potentiel du savon contaminé sur les patients. La raison est probablement due au fait que l'hygiène des mains se fait essentiellement avec une solution hydro-alcoolique depuis de nombreuses années et que le savon pour les mains n'est utilisé que dans des situations particulières. Une telle contamination représente néanmoins une sour-

Référence :

Blanc DS, Gomes Magalhaes B, Abdelbary M, Prod'hom G, Greub G, Wasserfallen JB, Genoud P, Zanetti G, Senn L. *Hand soap contamination by Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care hospital: no evidence of impact on patients.*

Journal of Hospital Infection 93 (2016) 63-67.



ce potentielle d'infections qui devrait être évitée à tout prix dans un milieu hospitalier.

Jadis réservé à des grands centres de recherche, le séquençage à haut débit est devenu accessible à des prix abordables et dans des délais raisonnables. L'Institut de Microbiologie s'est doté depuis 2015 d'un tel instrument (Illumina Mi-Seq) permettant l'investigation rapide des épidémies futures.

Figure 1. Phylogénie des souches de *P. aeruginosa* séquencées. La barre d'échelle représente le nombre moyen de substitutions par site. Les souches des patients (Patient 1 à 3), du savon (Soap 1 et 2), ainsi que 5 autres souches du même génotype mais isolées en dehors de la période d'exposition au savon (Surveillance 1 à 5) sont représentées.

LABORATOIRE DE MÉTAGÉNOMIQUE DIAGNOSTIQUE

Sébastien Aeby, Marta Rosikiewicz & Gilbert Greub



Grâce au développement technologique, il est dorénavant possible d'offrir à but diagnostique, dans un délai relativement court, une analyse du microbiote, c'est à dire de la diversité microbienne présente dans un échantillon clinique donné. Cette analyse se fait actuellement au sein de notre laboratoire de métagénomique diagnostique, par une combinaison d'une PCR amplifiant le gène codant pour l'unité 16S du ribosome des bactéries et un séquençage à haut débit en utilisant un instrument appelé le MiSeq (Figure 1). En pratique, avant séquençage, la qualité de l'ADN est contrôlée par le Fragment Analyser (Figure 2). Les applications cliniques de la métagénomique ne sont pas encore reconnues par l'office des assurances sociales (OFAS) et aucun tarif officiel n'est disponible. Dans l'attente de positions tarifaires OFAS, nous proposons déjà cette analyse aux cliniciens, dans le cadre d'études cliniques. Les applications de la métagénomique clinique sont nombreuses. Citons tout d'abord l'analyse des selles pour détermi-

ner le rôle de la flore microbienne dans la pathogenèse de l'obésité, de l'anorexie, du diabète, ou de maladies inflammatoires de l'intestin (Crohn, RCUH). Des prélèvements cutanés peuvent également être examinés pour investiguer la présence d'une colonisation par des agents pathogènes des larges plaies présentes chez les sujets brûlés par exemple et/ou pour détecter si une flore cutanée particulière pourrait être en cause dans la pathogenèse de certaines maladies inflammatoires de la peau comme le psoriasis ou la dermatite atopique. L'analyse des prélèvements respiratoires peut être utile afin, à terme, de détecter d'éventuels agents impliqués dans la pathogenèse de l'asthme ou d'autres pneumopathies. Enfin, il peut être utile d'étudier la flore cervico-vaginale et l'implication de cette flore dans d'éventuelles fausses couches, chez les femmes enceintes. Cependant à ce jour, la plupart de ces applications restent de la recherche clinique et à très court terme, seule (i) la recherche d'un agent étiologique à partir d'un échan-

tillon normalement stérile et (ii) l'analyse de selles pour aider à la prise en charge d'un patient souffrant d'obésité morbide paraissent déjà prêts à être mise en application clinique, en dehors de protocoles de recherches.

Notons que notre laboratoire de métagénomique clinique offre aussi la possibilité de faire une analyse de l'ensemble des gènes présents dans un échantillon clinique (métagénomique *sensu stricto*). Ce type d'analyse permet de connaître de manière globale la présence de facteurs de virulence (*virulome*) et/ou de gènes codant pour la résistance aux antibiotiques (*résistome*) dans un échantillon clinique complexe en terme de flore microbienne. Actuellement, notre activité se concentre principalement sur des analyses du microbiote effectuées après amplification moléculaire (métagénome post-PCR). Ainsi, environ 200 métagénomomes sont effectués dans notre laboratoire par année et sont facturés aux demandeurs selon des tarifs forfaitaires variants d'environ CHF 300.- à CHF 350.- selon le

« *La métagénomique, permet de préciser le rôle de la flore digestive dans la pathogenèse de l'obésité* »



Figure 1 : Le MiSeq (Illumina) est un séquenceur de nouvelle génération.



Figure 2 : Avant le séquençage, la qualité de l'ADN est vérifiée grâce au Fragment Analyser. Ces 2 instruments se trouvent à l'institut de microbiologie au sein du laboratoire de génomique et métagénomique.

INTRODUCTION DU SCORE DE ISON EN LIEU ET PLACE DE LA CULTURE

Guy Prod'hom & Gilbert Greub



« *Le score de Nugent-Ison a permis de substituer la culture par l'examen microscopique des frottis vaginaux* »

Le microbiote vaginal est complexe et diverses études ont montré qu'il contient plus de 100 genres bactériens différents. La pathologie la plus fréquente est la vaginose bactérienne (VB) qui représente un déséquilibre de la flore physiologique avec une pullulation d'anaérobies commensaux et une baisse relative de *Lactobacillus*.

Plusieurs scores basés sur les différents morphotypes bactériens observés à la coloration de Gram de frottis mince (Nugent 1991 ; Ison & Hay, 2002) ont montré une bonne corrélation avec la culture notamment de *Gardnerella vaginalis*. Afin de valider l'introduction du score de Nugent adapté par Ison dans notre pratique de laboratoire, nous avons prospectivement comparé le résultat de l'examen microscopique avec la culture du frottis vaginal. Nos résultats ont montré que seules 3% des

cultures étaient positives pour *Gardnerella vaginalis* lorsque le Gram présentait une flore normale et que le taux de portage augmentait à 26% lors de flore dite 'intermédiaire' et jusqu'à 69% en présence d'un examen microscopique évoquant une vaginose bactérienne. La signification clinique de la flore aérobie d'accompagnement (ex: Entérobactéries, *Staphylococcus aureus*, Streptococcus bêta-hémolytique) est plus difficile à préciser. Après concertation avec nos collègues gynécologues et obstétriciens, nous avons décidé d'abandonner la culture systématique et de la remplacer par l'estimation du score de Nugent-Ison dès avril 2015.

Un bilan fin octobre 2015 montre que pendant les 3 derniers mois, pour 97% des frottis vaginaux, l'examen microscopique a été jugé suffisant par le corps médical et seuls 3% des

frottis ont fait l'objet d'une mise en culture standard. En fonction des points OFAS de la liste des analyses, on peut estimer une économie annuelle approximative de 157'000.- Cette démarche a donc permis de substituer une culture dont l'interprétation est insatisfaisante par un examen microscopique rapide répondant ainsi aux besoins des cliniciens.

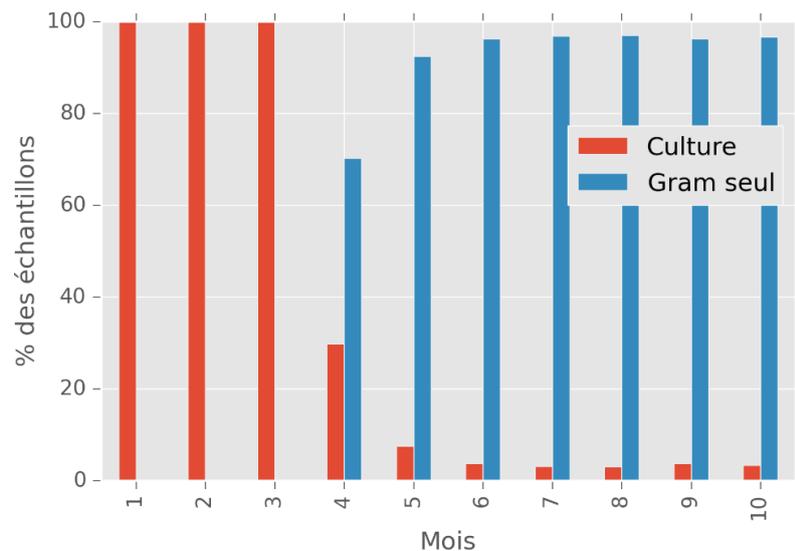


Figure: Evolution des mises en cultures et des Gram (Score de Nugent-Ison) des frottis vaginaux et frottis de col à partir du mois d'avril 2015 (mois 4) qui correspond à la mise en place de la démarche. Pour 97% des frottis, l'examen microscopique a été jugé suffisant par le corps médical et seuls 3% des frottis ont fait l'objet d'une mise en culture standard après implémentation du score de Nugent-Ison.

DÉTECTION RAPIDE DES BLSE DANS LES HÉMOCULTURES

Guy Prod'hom & Gilbert Greub

Les bactériémies et sepsis sont des affections sévères, qui s'accompagnent d'une morbidité et mortalité significative. Un traitement antibiotique auquel le germe est sensible permet de réduire les complications. Depuis plusieurs années, on assiste à une augmentation significative des germes multirésistants en provenance de la communauté et notamment des entérobactéries porteuses de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE). Actuellement, le taux de bactériémies à *E. coli* et *K. pneumoniae* s'élève au CHUV à 10% et 9%, respectivement. Récemment, un test rapide destiné à la détection des BLSE à partir des colonies d'entérobactéries est disponible. Ce test est basé sur la dégradation d'une céphalosporine chromogénique (HMRZ-86) en présence d'une bêta-lactamase capable de lyser des céphalosporines de 3^{ème} génération. Le HMRZ-86 contient une chaîne latérale qui protège le noyau bêta-lactame de la plupart des bêta-lactamases des classes A, C et D. Le produit est dégradé en présence de BLSE, de carbapénémases et de certaines céphalosporinases du groupe AmpC plasmidiques ou déréprimées.

Nous avons testé cette trousse diagnostique (bêta-lacta, Biorad) sur des culots d'hémocultures positives pour des entérobactéries. Les culots bactériens provenant d'hémocultures positives ont été préparés selon la méthode appliquée depuis 2009 dans notre laboratoire à base de chlorure d'ammonium. Pour une prise en main du test, nous avons appliqué le test sur des hémocultures factices préparées à partir de souches d'entérobactéries

dont les mécanismes de résistance avaient été caractérisés au niveau moléculaire puis prospectivement sur des hémocultures réelles. Dans ces cas, les résistances ont été caractérisées sur la base de tests phénotypiques utilisés dans le laboratoire.

L'étude des hémocultures factices a montré les résultats suivants: l'ensemble des souches BLSE ont donné un résultat positif (virage colorimétrique) à l'exception d'une souche de *E. coli* porteur du gène bla TEM-53 dont le résultat était douteux. Une souche de *E. coli* sur 2 porteuse d'un plasmide producteur d'une bêta-lactamase AmpC a donné un résultat positif. 80% des souches produisant une AmpC chromosomique constitutive sauvage (inductible ou déréprimée) ont donné un résultat négatif. Une souche de *K. oxytoca* avec hyperproduction de la bêta-lactamase K1 a donné un résultat douteux. Cinq souches productrices de carbapénémases sont restées négatives.

Le test appliqué sur les hémocultures réelles a permis de détecter l'ensemble des BLSE avec un virage chromogénique complet ou partiel (résultat douteux), ainsi que 2 *K. oxytoca* produisant la bêta-lactamase K1 et une souche de *Haf-*

nia alvei naturellement producteur d'une AmpC chromosomique. Globalement, la sensibilité du test est de 70% pour la détection d'entérobactéries avec une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération et une spécificité de 100%. Même si la sensibilité de ce

test est imparfaite, la transmission au médecin traitant d'un résultat positif obtenu directement à partir des culots d'hémocultures préparés le jour du signal positif de l'automate d'hémoculture permet de s'assurer d'une couverture antibiotique adéquate pour traiter les germes producteurs de BLSE.

Références :

Prod'hom G, Durussel C, Blanc D, Croxatto A, Greub G. *Early detection of extended-spectrum β -lactamase from blood culture positive for an Enterobacteriaceae using β LACTA test.* New Microbes New Infect. 2015 Jun 9;8:1-3.

Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets.* J Clin Microbiol. 2010 Apr;48(4).

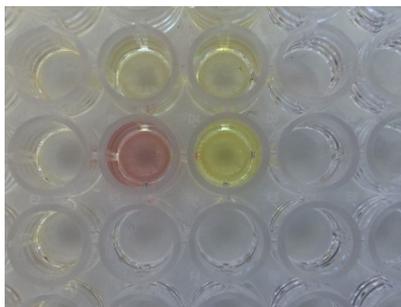


Figure : Détection de BLSE en microplaque par le test β -LACTA™ de Biorad. La cupule jaune représente le témoin négatif, la cupule adjacente, orange-rouge, a subi un virage colorimétrique par la dégradation d'une céphalosporine chromogénique (HMRZ-86) en présence d'une bêta-lactamase présente dans le culot d'hémoculture.

« Avec une spécificité de 100%, le Bêta-lacta test permet de traiter les germes producteurs de BLSE précocement lorsque le résultat est positif. »

RÉVOLUTION DANS LE MONDE DE LA TUBERCULOSE

Onya Opota et Katia Jatón



La détection de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) dans des échantillons respiratoires a été historiquement la première analyse microbiologique effectuée face à une suspicion de tuberculose pulmonaire et l'est encore dans beaucoup de laboratoires. Cette méthode a aussi largement été utilisée pour l'évaluation du risque de transmission. Ainsi, un résultat positif renforce la suspicion de tuberculose et est associé à un risque élevé de transmission du bacille de Koch. Cependant cet examen présente à la fois une sensibilité et une spécificité limitées. Le GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, Ca), est un test rapide (en anglais POCT pour « point of care test ») moléculaire basé sur une PCR en temps réel permettant à la fois la détection de la présence d'ADN des bacilles du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et la résistance à la rifampicine. Depuis 2013, ce test est recommandé par l'OMS pour initier le diagnostic microbiologique de la tuberculose pulmonaire en raison d'une excellente sensibilité et spécificité et d'un délai d'exécution extrêmement court (1).

Nous avons réalisé une étude rétrospective (période Mai 2010 - Décembre 2014) basée sur la comparaison des performances du GeneXpert et de la recherche de BAAR (coloration à l'auramine) sur le premier échantil-

lon respiratoire de patients (n=242) avec une suspicion de tuberculose pulmonaire. Après avoir confirmé la nette supériorité du GeneXpert par rapport à la microscopie pour le diagnostic de la tuberculose dans notre hôpital, nous avons mis en évidence la corrélation qu'il existe entre le résultat semi-quantitatif du GeneXpert et le résultat de la microscopie. Cette corrélation permet d'aider les cliniciens pour une discrimination rapide des patients avec un risque important de transmission de la tuberculose de ceux avec un faible risque de transmission. En effet, nous avons rapporté qu'un GeneXpert négatif corréle avec une absence de BAAR à l'examen direct (VPN 100%) (Table 1). A l'opposé 97% à 100% des échantillons avec un GeneXpert positif avec une quantité moyenne ou élevée ont une détection de BAAR positive, indiquant une tuberculose pulmonaire hautement transmissible nécessitant le maintien de mesures additionnelles d'isolement.

Cette étude a démontré la possibilité d'utiliser le GeneXpert MTB/RIF, non seulement pour le diagnostic initial de la tuberculose, mais surtout pour évaluer le potentiel de transmission de la maladie des patients tuberculeux. Elle a permis d'introduire pour la première fois un algorithme clinique et microbiologique de prise

en charge des patients avec suspicion de tuberculose dans lequel le **GeneXpert remplace la détection de BAAR** par examen direct pour initier le diagnostic microbiologique. Ce changement diagnostique, qui sonne comme une révolution dans le monde de la tuberculose, est une valeur ajoutée indéniabie en termes de gestion de flux de patients, de leur prise en charge clinique et de l'organisation du laboratoire de microbiologie. Les détails de cette étude ont été publiés et sont disponibles en accès libre dans *Clinical Microbiology and Infection* (2).

Références :

- (1) World Health Organization. Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes, Third edition. 2003.
- (2) Opota O, Senn L, Prod'hom G, Stalder JM, Tissot F, Greub G and Jatón K. *Added value of the molecular assay Xpert MTB/RIF compared to sputum smear microscopy to assess the risk of tuberculosis transmission in a low-prevalence country.* Clinical microbiology and infection 2016.

	Smear microscopy result					Prediction of smear positivity			
	negative	scanty	1+	2+	3+	Total smear positive ^(a)	Total samples	Predictive value of smear positivity (95% CI)	
Xpert MTB/Rif	Positive high		1	1	1	3	6	6	PPV=100% (54.1.0-100)
	Positive medium	1	6	14	5	2	27	28	PPV=96.4% (81.6-99.9)
	Positive low	11	7	3	2		12	23	PPV=52.2% (30.6-73.2)
	Positive very low	8		1			1	9	PPV= 11.1% (0.3-48.2)
	Negative	166	8 [§]	2 [#]			0	176	NPV ^(a) = 100% (97.8-100)
Total	186	22	21	8	5	46	242		

*Clinical presentation suggestive of high transmission risk (cf. patient 23 suppl. table 1)

§*M. tuberculosis* culture negative (6 NTMs and 2 samples with 1-2 BAAR)

#*M. tuberculosis* culture negative (2 NTMs)

(a) After exclusion of NTMs and mycobacterial negative samples

PPV=Positive Predictive Value

NPV=Negative Predictive Value

BACTÉRIES INTRACELLULAIRES PRÉSENTES AU SEIN DES TIQUES DU GENRE *IXODES* EN SUISSE

Ludovic Pilloux, Sébastien Aeby et Gilbert Greub



Les tiques du genre *Ixodes* sont les plus prévalentes en Suisse. Elles sont connues pour être les vecteurs d'une spirochète, *Borrelia*, agent de la maladie de Lyme. Elles sont également vecteurs du virus de l'encéphalite à tiques.

Dans le cadre d'un large projet national, et compte tenu du rôle de notre laboratoire lausannois au sein du centre national de référence pour les maladies transmises par les tiques, nous avons eu pour mission (mandat de l'OFSP) de tester 62'889 tiques poolées en 8'534 lots. Ces tiques avaient été récoltées par l'armée suisse à l'aide de la méthode du drapeau dans diverses régions du pays.

Nous avons étudié la présence au sein de ces tiques de 3 types de bactéries intracellulaires différentes :

- *Anaplasma phagocytophilum* (agent de l'anaplasmose)
- *Coxiella burnetii* (agent de la fièvre Q)
- *Chlamydia* et bactéries apparentées aux *Chlamydia*

Ainsi plus de 24'000 PCR ont été effectuées au sein de notre plateforme automatisées (8'534 par pathogène). De l'ADN d'*Anaplasma phagocytophilum* a été retrouvé au sein des tiques du genre *Ixodes* dans 1'018 pools sur 8'534, soit une prévalence par pool de 11,9% (1). Ainsi la préva-

lence estimée au sein des tiques individuelles peut être estimée de l'ordre de 1,6% à 12% (1). Les tiques positives se retrouvent largement dispersées au niveau suisse, sans préférence territoriale.

La prévalence de bactéries apparentées aux *Chlamydia* était également élevée puisque 543 des 8'534 pools investigués (6,4%) se sont révélés positifs (2). Ainsi la prévalence estimée dans les tiques individuelles était de l'ordre de 0,9%. Après séquençage, nous avons pu déterminer que les bactéries les plus fréquentes au sein des tiques étaient les *Parachlamydiaceae* et les *Rhabdochlamydiaceae* ainsi que des espèces encore non classifiées de bactéries proches phylogénétiquement des *Chlamydia* (2). Notons que la quantité de bactéries présente au sein de ces tiques était parfois si importante (de l'ordre de 100'000 bactéries par millilitre de broyat) que le séquençage du génome de certaines souches a pu être effectué directement à partir de l'extrait d'ADN du broyat de tiques et ce sans étape de culture (3). *Coxiella* n'a pas été documenté parmi les 8'534 pools testés.

Au vu de la haute prévalence d'*Anaplasma* et de diverses *Chlamydiales*, des études cliniques vont être prochainement initiées afin d'évaluer l'impact sur la

santé de l'exposition à ces germes lors de piqûres de tiques.

Références :

(1) Pilloux L, Baumgartner A, Brouillet R, Jaton K, Lienhard R, Schürch N, Beuret C, Greub G. *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland: an underestimated epidemiological risk?

In preparation

(2) Pilloux L, Aeby S, Gäumann R, Burri C, Beuret C, Greub G. 2015. *The high prevalence and diversity of Chlamydiales DNA within Ixodes ricinus ticks suggest a role for ticks as reservoirs and vectors of Chlamydia-related bacteria.*

Appl Environ Microbiol 81:8177–8182.

(3) T Pillonel, C Bertelli, S Aeby, M De-Barsy, N Jacquier, C Kebbi-Beghdadi, L Mueller, L Pilloux, M Vouga and G Greub

Sequencing the obligate intracellular *Rhabdochlamydia heleveticae* within its tick host *Ixodes ricinus*

In preparation

« L'ADN d'*Anaplasma* et de *Chlamydiae* a été retrouvé dans de nombreuses tiques questionnent l'impact sur la santé de l'exposition à ces germes suite à des piqûres de tiques »



LE « MULTIPLEX-BEAD ASSAY » (MBA), UNE NOUVELLE TECHNOLOGIE AU SERVICE DU DIAGNOSTIC DE LA BORRÉLIOSE DE LYME

Antony Croxatto et Pascal Meylan

Le sérodiagnostic de la maladie de Lyme se fait en 2 étapes, un test de dépistage sensible mais peu spécifique, surtout pour les IgM, et un test de confirmation. Les tests de dépistage en IgG et IgM de la borréliose de Lyme sont traditionnellement confirmés par western blot sur des membranes contenant des antigènes natifs purifiés ou recombinants. Le western blot est, avec les critères d'interprétation établis, une technique spécifique mais avec une sensibilité moyenne et qui requiert du temps et des techniciens expérimentés pour son interprétation. Le multiplex bead assay (MBA) [1, 2] est une nouvelle technologie adaptée à l'analyse des profils de réponses immunitaires complexes en permettant l'analyse simultanée de nombreux paramètres antigéniques en un seul test (cf figure). Le test MBA est constitué de lots de microsphères marquées par des colorants fluorescents (ii) qui leur confèrent une signature optique spécifique. Chaque lot de microsphère est recouvert de différents antigènes spécifiques. Ainsi, chaque antigène de *Borrelia burgdorferi sensu lato* (9 antigènes pour les IgG, 8 antigènes pour les IgM) utilisé dans ce test est caractérisé par une fluorescence unique du lot correspondant de microsphères. Les anticorps du patient (i) se fixant aux antigènes recouvrant les microsphères sont reconnus par des anticorps anti-IgG ou IgM humains marqués par un autre marqueur fluorescent (iii), générant ainsi un signal d'intensité fluorescent pour chaque lot antigénique de microsphère (iv). La lecture du test se fait sur un cytomètre de flux de type Luminex qui utilise 2 lasers différents permettant une classification des signaux de fluorescence des billes (signature de l'antigène) et une quantification de l'immuno-réaction des anticorps du sérum patient avec les antigènes de *Borrelia* recouvrant les billes (signature de la réponse immunitaire). Le test de confirmation est interprété comme négatif (borréliose de Lyme peu probable), douteux (borréliose de Lyme pas entièrement exclue) ou positif (fort

souçon de borréliose de Lyme) en fonction de la combinaison du nombre d'antigènes détectés comme positifs ou faiblement positifs. Le test MBA offre probablement une plus grande sensibilité que le western blot mais présente vraisemblablement un plus grand coefficient de variation (CV), nécessitant des mesures de standardisation strictes pour obtenir une bonne reproductibilité. Comme pour les autres tests diagnostics ; en sérologie la spécificité du test MBA en IgM n'est pas optimale. Tout résultat de confirmation en IgG et IgM par cette nouvelle technologie doit être interprété en relation avec la clinique, car en sérologie de Lyme, la valeur prédictive négative est généralement supérieure à 96% (sauf pour le stade précoce localisé, caractérisé par un érythème chronique migrant, qui présente une sensibilité de 40-60%) de sorte qu'un test négatif permet d'exclure avec une grande probabilité le diagnostic de maladie de Lyme, par contre la valeur prédictive positive est fortement dépendante de la valeur prétest, et donc de la clinique.

Quelles que soient les techniques utilisées, il faut réaliser combien la maladie de Lyme, en particulier les atteintes du système nerveux (neuroborréliose) représente un challenge diagnostique et thérapeutique, et ceci pour des raisons multiples. L'infection est difficile à démontrer par des méthodes de diagnostic direct (culture et plus communément PCR). Les méthodes sérologiques (diagnostic indirect) sont confondues par des déterminants antigéniques partagés avec d'autres bactéries ainsi que par la séroprévalence élevée (de l'ordre de 10%), reflétant une infection passée traitée ou non et asymptomatique dans la population locale en bonne santé. Enfin, à l'heure actuelle, la maladie de Lyme semble servir de fourre-tout diagnostique pour expliquer différents états de malaise sans explication causale évidente. Cet état



de fait rend désirable des efforts de validation de tests diagnostics, de standardisation de la prise en charge de ces patients et de dissémination d'information de qualité à destination des professionnels de la santé et du public. A ces fins, des investigateurs, dont les sous-signés, souhaitent mettre sur pied un registre des patients avec neuroborréliose prouvée par PCR dans le LCR, ainsi que certains groupes de contrôle, dans le cadre d'un Programme National de Recherche sur les maladies transmises par les tiques, en voie d'organisation.

Références :

- 1 Gerritzen A, Brandt S. *Serodiagnosis of lyme borreliosis with bead based immunoassays using multiplex technology. Methods.* 2012; **56**: 477-483.
- 2 Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, Fairclough LC. *Elisa in the multiplex era: Potentials and pitfalls. Proteomics Clinical applications.* 2015; **9**: 406-422.

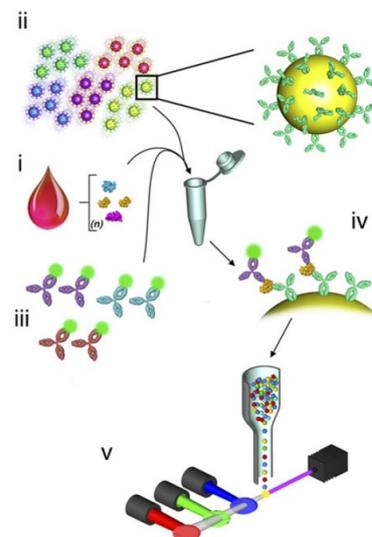


Figure from Tighe et al. *Proteomics Clin. Appl.* 2015.

CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE SUR LA FIÈVRE Q

Antony Croxatto, Katia Jaton, Pascal Meylan & Gilbert Greub

La fièvre Q est une maladie zoonotique acquise surtout suite à l'exposition à des moutons ou chèvres infectés (1). Cette maladie au décours parfois sévère est l'une des causes majeures d'endocardite à hémoculture négative.

Lausanne est devenue centre national de référence pour la fièvre Q suite à l'investigation d'une épidémie survenue dans le Lavaux en 2012 (2). Dans ce contexte, notre laboratoire diagnostique propose à la fois des tests sérologiques pour la fièvre Q, des tests PCR et la possibilité de séquencer le génome de la souche en cause à partir d'échantillons.

La sérologie fièvre Q se caractérise par des antigènes de phase 1 (antigène naturel généralement témoin d'une infection chronique) et des antigènes de phase 2 (antigène obtenu par culture cellulaire et généralement témoin d'une infection récente, aiguë). Les sérologies sont effectuées par immunofluorescence et les résultats sont donnés en titre (3). Des titres élevés supérieurs à 1/800^{ème} en IgG phase I sont généralement témoins d'une infection endovasculaire (endocardite ou infection d'une prothèse vasculaire aortique).

La PCR, que nous avons développée à Lausanne, est une PCR en temps réel

de type Taqman. Cette PCR peut s'appliquer à la fois sur des échantillons cliniques (valve cardiaque, expectoration,...) ainsi que sur des séras. Les séras sont positifs par PCR en phase aiguë, lors de primo-infection avant que la sérologie ne se positive.

Par contre dès qu'une séroconversion a eu lieu, les séras deviennent négatifs en PCR. Les séras peuvent être à nouveau positifs par PCR lors d'infections chroniques endovasculaires telle que l'endocardite.

La charge bactérienne présente au niveau d'une valve cardiaque infectée peut être très importante. Ainsi, notre laboratoire de génomique bactérienne d'importance médicale a pu récemment séquencer le génome d'une souche de *Coxiella* directement à partir de l'échantillon, sans amplification préalable en culture. Ce type de séquençage peut être utile lorsque le patient souffrant d'endocardite présente une évolution défavorable, afin de s'assurer que la souche ne présente pas d'arguments pour une résistance aux antibiotiques prescrits. L'analyse par génomique directe sur échantillons est en effet plus efficace, plus rapide et moins coûteuse qu'une analyse de génome effectuée après culture cellulaire, d'une part au vu de la faible sensibilité de la

culture cellulaire, et d'autre part, de la complexité d'une telle analyse qui doit être effectuée dans un laboratoire de biosécurité de niveau 3 pour cet agent.

Références :

(1) Delaloye J, Greub G.- *Q fever, a zoonosis often overlooked.* - Rev Med Suisse. 2013 Apr 24; 9(383):879-84.

(2) Bellini C, Magouras I, Chapuis-Taillard C, Clerc O, Masserey E, Peduto G, Péter O, Schaerrer S, Schuepbach G, Greub G.- *Q fever outbreak in the terraced vineyards of Lavaux, Switzerland.* New Microbes New Infect. 2014 Jul; 2(4):93-9.

(3) Bizzini A, Péter O, Baud D, Edouard S, Meylan P, Greub G. - *Evaluation of a new serological test for the detection of anti-Coxiella and anti-Rickettsia antibodies.* Microbes Infect. 2015 Nov-Dec;17(11-12):811-6.],

(4) Jaton K, Peter O, Raoult D, Tissot JD, Greub G.- *Development of a high throughput PCR to detect Coxiella burnetii and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period.* - New Microbes New Infect. 2013 Oct;1(1):6-12.

« Lausanne est devenue centre national de référence pour la fièvre Q suite à l'investigation d'une épidémie survenue dans le Lavaux en 2012 »



Figures : Les moutons sont avec les chèvres les 2 réservoirs principaux de l'agent de la fièvre Q, *Coxiella burnetii*.

MISE À JOUR DU DIAGNOSTIC DES PAPILOMAVIRUS

Roland Sahli



« L'évaluation de la persistance des virus à haut risque améliore la valeur positive prédictive du test HPV vis-à-vis du cancer du col utérin »

Le géotypage du papillomavirus humain (HPV) est proposé depuis 1999 par notre institut pour le dépistage du cancer du col utérin (cc) en complément de l'examen cytologique. Si la valeur prédictive négative du test HPV est excellente, sa valeur prédictive positive est médiocre sans intégration de l'historique HPV des patientes. En effet, le risque du cc est fortement lié à la persistance de l'infection par un même géotype à haut risque, HPV16 en tête. Grâce à notre base de données spécifique, nous offrons un tel suivi pour chaque patiente.

Depuis janvier 2016 le test PGMY-CHUV a été remplacé par une trousse automatisable (Seegene Anyplex HPV28) qui est au moins aussi sensible et spécifique (2). En distinguant 28 géotypes, elle permet également d'évaluer la persistance de l'infection. Vous ne verrez donc pas de différence dans les rapports d'essais.

Nous avons réparti les géotypes dans trois groupes de risque, visant à optimiser la spécificité clinique du test HPV et donc sa valeur prédictive positive.

HPV à haut risque : 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 69, 73 et 82.

HPV à bas risque : 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 66 et 70.

HPV à risque indéterminé : 26.

Cette répartition diffère de celle du fournisseur pour les trois géotypes suivants : HPV26, HPV53 et HPV66. Leur distribution originale dans le groupe à haut risque est basée essentiellement sur des aspects phylogénétiques. Cette distribution n'est

cependant pas étayée par leur fréquence observée dans les cas de cancers relativement aux cas normaux (HPV53 et 66, Combes et al, 2015). HPV26 est très rare, ce qui nous empêche de confirmer sa caractéristique « haut risque », d'où notre classification.

Veillez noter que nous utilisons un système de détection additionnel (HPV51 RUO) mis à disposition par notre fournisseur pour la détection d'HPV51, laquelle manque de sensibilité avec le kit original.

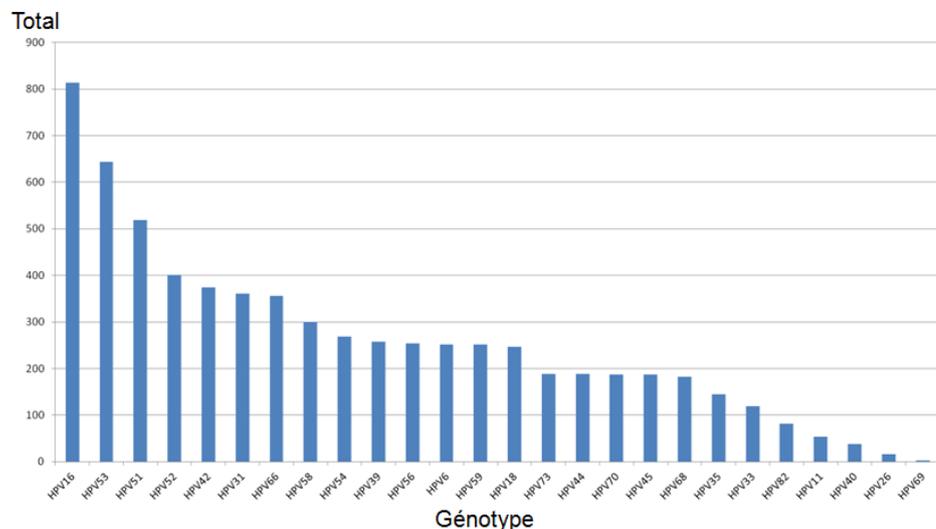
Nous vous rendons attentifs-ves, à ce qu'Anyplex HPV28 est limité aux virus des muqueuses de la sphère anogénitale, de l'oropharynx et des conjonctives. Il ne permet donc pas de détecter les HPV communément associés aux verrues de la peau, que nous renonçons à analyser dorénavant au vu de leur faible impact clinique et de la rareté des demandes les concernant qui nous sont soumises.

Références :

(1) Combes, J. D., P. Guan, et al. (2015). "Judging the carcinogenicity of rare human papillomavirus types." *Int J Cancer* **136**(3): 740-742.

(2) Estrade, C. and R. Sahli (2014). "Comparison of Seegene Anyplex II HPV28 with the PGMY-CHUV Assay for Human Papillomavirus Genotyping." *J Clin Microbiol* **52**(2): 607-612.

Nombre d'infections HPV observées sur la période 1999-2015 par ordre décroissant



On note que les virus à haut risque les plus fréquents sont HPV16, -51, -52, et -31. Les virus à bas risque les plus fréquents sont HPV53, -42 et -66.

DIAGNOSTIC MOLECULAIRE : PENSEZ À LA LEISHMANIOSE

Onya Opota et Katia Jaton



Chez les transplantés d'organe solide, le diagnostic de la leishmaniose viscérale est souvent retardée en raison de signes et de symptômes non spécifiques. Une étude de cas que nous avons réalisée révèle que la PCR en temps réel a le potentiel d'accélérer le diagnostic de cette maladie et soulève la question d'une stratégie de diagnostic préventif de la leishmaniose viscérale basée sur la PCR en temps réel chez les patients à risque dans le but d'accélérer le diagnostic de cette maladie (1).

La leishmaniose viscérale est la forme la plus sévère de la leishmaniose, maladie due à des parasites protozoaires du genre *Leishmania* transmis à l'homme par la piqûre de femelles phlébotomes infectés ; non traitée, elle peut être mortelle. On estime à 1,3 millions le nombre de nouveaux cas annuel et de 20.000 à 30.000 le nombre de décès dus à cette maladie avec un nombre croissant d'infections chez les patients immunodéprimés. Chez les transplantés d'organes solides, jusqu'à 25% des diagnostics sont posés plus de 1 mois après le début des symptômes. Il est aussi

important de noter que ces mêmes patients peuvent rester asymptomatiques pendant de longues périodes d'où l'importance de l'anamnèse de voyage pour identifier un séjour en zone endémique pour cette maladie.

Nous disposons d'une PCR en temps réel hautement sensible capable de détecter la présence de très faible quantité d'ADN de *Leishmania* à partir de différents types de prélèvement. En effet cette PCR cible l'ADN kinétoplastique dont chaque amastigote peut contenir de 1000 à 10000 copies. Dans le cas du diagnostic d'une leishmaniose viscérale, la sensibilité de cette PCR sur du sang périphérique est ainsi $\ll 1$ parasite par ml. Notre analyse de cas suggère que la leishmaniose viscérale peut se présenter sous forme d'une infection subclinique prolongée chez les patients immunodéprimés (1).

L'utilisation de la PCR sur du sang périphérique de façon préemptive pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale chez les patients immunodéprimés asymptomatiques à risque de réactivation nécessite des investigations complé-

mentaires. Néanmoins, penser à cette maladie peut permettre un diagnostic précoce par PCR en temps réel de façon non invasive sur du sang périphérique et une amélioration de la prise en charge clinique des patients. Cette PCR en temps réel permet aussi de suivre l'efficacité d'un traitement et de mettre en évidence des échecs potentiels.

Référence :

Opota O, Balmpouzis Z, Berutto C, Kaiser-Guignard J, Greub G, Aubert JD and Jaton K.

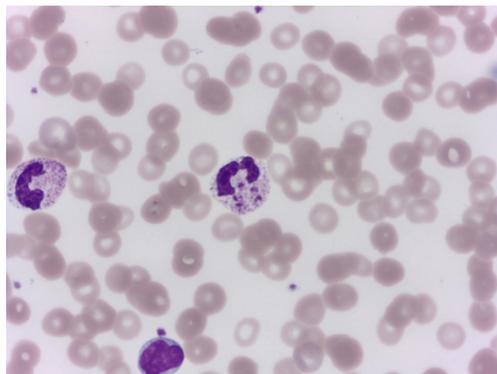
Visceral leishmaniasis in a lung transplant recipient: usefulness of highly sensitive real-time polymerase chain reaction for pre-emptive diagnosis.

Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society. 2016.

« Le diagnostic précoce de la leishmaniose viscérale est possible par PCR sur le sang ».

Figure :

Frottis sanguin permettant de visualiser des amastigotes intra-leucocytaires (images tirée de Opota et al., Transpl Infect Dis 2016)



RÉSISTANCE TRANSFÉRABLE AUX POLYMYXINES (COLISTINE)

Patrice Nordmann



Les polymyxines (colistine notamment), antibiotiques naturels découverts en 1947, ont été d'usage limités en Médecine dans les cinquante dernières années. La raison de la faible utilisation de cette classe d'antibiotiques réside dans (i) leur toxicité potentielle neurologique et rénale, (ii) leur faible diffusion tissulaire (iv) leur pharmacocinétique peu étudiée et (iv) la mise au point de nouveaux antibiotiques très efficaces depuis les années 60.

Cependant, étant donné la croissance rapide des résistances aux antibiotiques chez les Gram négatifs, les polymyxines font l'objet désormais d'un regain d'intérêt. Leur usage est maintenant quasi-quotidien dans des pays comme la Grèce ou l'Italie. Cette augmentation de l'usage des polymyxines s'accompagne de résistance à ces antibiotiques que l'on croyait uniquement chromosomiques c'est à dire non transférable. Or en novembre 2015, coup de tonnerre, la résistance transférable plasmidique (MCR-1) a été rapportée en Chine, dans de très nombreux isolats humains, animaux et environnementaux (essentiellement *E. coli*). Nous avons rapporté en décembre 2015 la première souche qui exprimait à la fois MCR-1 et une carbapénémase VIM-1 provenant du milieu communautaire de Genève, de même que d'autres souches de *E. coli* MCR-1 isolées en milieu hospitalier à Neuchâtel. Depuis début 2016, de nombreuses études internationales font état de la diffusion de souches MCR-1 dont le réservoir semble être clairement le monde animal (très large usage des polymyxines en milieu

vétérinaire), avec une transmission humaine secondaire.

Afin de connaître la diffusion de ce nouveau déterminant de résistance MCR-1 nous avons réalisé rapidement en mars 2016 une étude rétrospective parmi les 257 souches de d'entérobactéries isolées d'hémocultures du CHUV en 2015 ; *E. coli* (n = 164), *Klebsiella pneumoniae* (n = 41), *Enterobacter cloacae* (n = 16), *Klebsiella oxytoca* (n = 14), *Enterobacter aerogenes* (n = 6), *Citrobacter koseri* (n = 5), *Citrobacter freundii* (n = 5), *Hafnia alvei* (n = 3) *Kluyvera ascorbata* (n = 1), et *Salmonella serovar enteritidis* (n = 2). Les souches ont été screenées dans un premier temps grâce au test de diagnostic rapide de la résistance aux polymyxines que nous avons mis au point (Rapid Polymyxin NP test, photo) Ce test est extrêmement spécifique et sensible. Puis le gène MCR-1 a été recherché par PCR en temps réel. Quatre souches (3 souches de *H. alvei* et une seule *E. cloacae*) étaient résistantes à la colistine (taux de prévalence de cette résistance, 1,17 %). Aucune souche ne possédait de gène MCR-1. Cette étude montre que, vraisemblablement la diffusion du gène MCR-1 dans le milieu hospitalier suisse n'a pas encore eu lieu à une forte fréquence.

Il est donc intéressant de tester systématiquement au moins toute souche d'entérobactérie productrice de carbapénémases (multirésistantes) pour cette résistance à la colistine. L'utilisation du test de diagnostic rapide mis au point sera donc d'un grand

intérêt et permettrait de prévenir la diffusion de ce nouveau marqueur de résistance aux antibiotiques. La résistance aux polymyxines additionnée de celle aux carbapénèmes est potentiellement redoutable !

Référence :

P. Nordmann, L. Assouvie, G Prod'Hom, L. Poirel and G. Greub (2016).

Screening of plasmid-mediated MCR-1 colistin-resistance from bacteremia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, in press

« La résistance aux polymyxines est potentiellement redoutable si elle survient chez une souche résistante aux carbapénèmes »

Rapid Polymyxin NP test

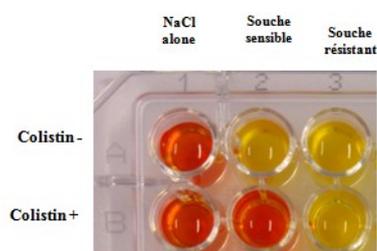


Figure : La souche sensible ne pousse pas en présence de colistine (absence de virage de l'indicateur de croissance, restant rouge) alors que la souche résistante pousse en présence de colistine (virage de l'indicateur de croissance du rouge au jaune). Résultat < 2h. Sensibilité 99 %, spécificité 95 %.

5^{ème} Journée de formation en microbiologie diagnostique

Organisée par K. Jaton, J. Schrenzel et G. Greub
et sponsorisée par Becton Dickinson et Axon Lab AG



Mardi 4 octobre 2016, de 9h00 à 17h00
Auditoire Tissot, zone auditoires, BH-08, CHUV – Lausanne

Cette formation est reconnue avec 5.5 crédits par la FAMH et par 8 crédits par la SSI («formation élargie»)

INFECTIONS SEVERES



Greub et al AM J Med 2005



09h00 Introduction

Gilbert Greub, Lausanne

09h10 Fasciite nécrosante et cellulites

Stéphane Emonet, Genève

09h30 Questions & discussion

09h35 Endocardite : diagnostic étiologique

Gilbert Greub, Lausanne

09h55 Questions & discussion

10h00 Place de la PCR dans la recherche des infections gastro-intestinales

Reto Lienhard, La Chaux de Fonds

10h25 Questions & discussion

10h30 – 11h00 Pause café

GENOMIQUE ET METAGENOMIQUE



Bertelli and Greub. Clin Microbiol Infect 2013

11h00 Investigation par séquençage de génomes d'infections sévères à *Streptococcus pyogenes*

Florian Tagini, Lausanne

11h25 Questions & discussion

11h25 Métagénomique et obésité

Jacques Schrenzel, Genève

11h45 Questions & discussion

11h50 Métagénomique clinique

Etienne Ruppé, Genève

12h10 Questions & discussion

12h20 – 13h50 Repas

LES STREPTOCOQUES



<https://microbewiki.kenyon.edu/>

13h50 Streptocoques du groupe A

Annelise Zinkernagel, Zurich

14h15 Questions & discussion

14h20 Streptocoques du groupe B : pathogénèse

Claire Poyart, Paris

14h45 Questions & discussion

14h50 Streptocoques du groupe B : prévention par le dépistage

Béatrice Eggel, Lausanne

15h10 Questions & discussion

15h15 – 15h45 Pause café

BIOSECURITE



Jaton and Greub Clinical Microbiol Infect 2014

15h45 Tuberculose multi-résistante

Jean-Paul Janssens, Genève

16h05 Questions & discussion

16h10 Histoire du bioterrorisme

Vincent Barras, Lausanne

16h35 Questions & discussion

16h45 Conclusion

Katia Jaton, Lausanne

INNOVATIONS EN MICROBIOLOGIE DIAGNOSTIQUE

La microbiologie diagnostique est en constante évolution, et parmi les mandats des spécialistes FAMH et des techniciennes et techniciens œuvrant dans les laboratoires de microbiologie, la recherche et développement (R&D) sont essentiels pour offrir une technologie de pointe et des méthodes diagnostiques fiables, de haute sensibilité et spécificité, aux demandeurs d'analyses. Ce secteur de R&D est favorisé par la localisation sous un même toit, à l'Institut de Microbiologie de l'Université de Lausanne, de techniciens, biologistes et médecins spécialisés en microbiologie médicale diagnostique et de chercheurs actifs en recherche fondamentale. L'ensemble de l'équipe R&D se réunit sur une base hebdomadaire afin de partager les difficultés et de valider les développements. Ainsi, le groupe R&D participe activement à atteindre les objectifs de nos laboratoires de microbiologie qui sont :

- D'assurer des prestations de qualité comprenant : fiabilité, contrôle de qualité, indicateurs de qualité, formation continue des TABs et des universitaires, et veille technologique.
- De veiller au contrôle budgétaire, comprenant : efficience, analyse de coûts/efficacité, adaptation des prestations aux dotations et réciproquement, autofinancement partiel des activités R&D (génomique et métagénomique, p.ex.), et accroissement de la clientèle externe.
- De favoriser le rayonnement national et international par des innovations et une offre de prestations uniques en Suisse et une valorisation des activités R&D par des publications internationales.

« Assurer des prestations de qualité, innover et favoriser le rayonnement de l'institution ! »

NOUVEAU SITE INTERNET DE L'INSTITUT DE MICROBIOLOGIE

Vous trouverez cette newsletter ainsi que les précédents numéros sur notre site internet à l'adresse ci-dessous.

<http://www.chuv.ch/microbiologie>

CHUV Les activités du CHUV

Institute of Microbiology

The Institute of Microbiology is devoted to the laboratory diagnosis of infectious diseases, to applied and basic research, and to teaching. [LEARN MORE...](#)

DIAGNOSTICS TEACHING RESEARCH

Careers About us

WELCOME

The Institute of Microbiology of the University of Lausanne (IMUL) is an academic center with about 120 collaborators. It is devoted to the laboratory diagnosis of infectious diseases, to applied and basic research, and to teaching. The Institute is located on the campus of the Lausanne University Hospital (CHUV). [Learn more](#)

NEED HELP

- ▶ Research groups
- ▶ Associate research groups
- ▶ Collaborative research
- ▶ Find us

CONTACTS

Direction
Pr Gilbert Greub
Tel. +41 21 314 4979
Secretariat
Ms Nathalie Péry-Gérard
Tel. +41 21 314 4684
Ms Raquel Fernandez
Tel. +41 21 314 4056
Reception
Ms Carla Maceda
Tel. +41 21 314 4058
Fax +41 21 314 4060

About us

Département des laboratoires