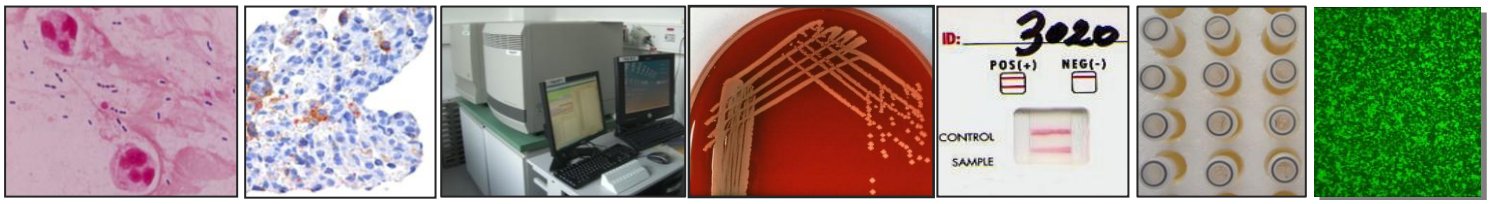
Octobre 2014

NEWSLETTER 2014 – Microbiologie diagnostique, Lausanne

Institut de Microbiologie, Dpt. des Laboratoires, CHUV-UNIL, Lausanne



Introduction

La microbiologie diagnostique est en constante évolution, et parmi les mandats des spécialistes FAMH et des techniciens œuvrant dans les laboratoires de microbiologie, la recherche et développement (R+D) est essentielle pour offrir une technologie de pointe et des méthodes diagnostiques fiables, de haute sensibilité et spécificité, aux demandeurs. Ce 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 spécialisés en bactériologie, mycologie et virologie.

La présente Newsletter de la microbiologie diagnostique lausannoise présente de manière succincte les principaux développements effectués ces deux dernières années dans ce cadre. Par ailleurs il est essentiel, pour que les analyses soient faites dans des conditions optimales, que la pré-analytique et la post-analytique correspondent aux besoins. L'interprétation des résultats est un élément crucial. Ainsi, quelques textes présentent ces aspects pré- ou post-analytiques ; par exemple, un résultat positif de PCR effectuée sur la salive et les selles pour la maladie de Whipple ne signifie pas toujours infection.

Afin que ces courts textes, s'appuyant sur notre expérience récente et la littérature, soient le plus intéressant que possible, nous avons choisi de les illustrer par quelques images. N'hésitez pas à nous faire part de vos commentaires éventuels.

Nous nous réjouissons par avance de vous retrouver lors des prochains colloques de formation continue en microbiologie diagnostique, prévus sur une base mensuelle.

Bonne lecture.

Pour l'ensemble de l'équipe de microbiologie diagnostique de Lausanne :

Gilbert Greub, médecin-chef des laboratoires de microbiologie
Directeur de l'Institut/ Chef de service a.i.
Institut de Microbiologie - CHUV
Rue du Bugnon 48
1011 Lausanne
☎ 021 314 4979
gilbert.greub@chuv.ch

Prochains colloques de formation continue en microbiologie diagnostique

en **2014** : les **mardi**, de **11h30** à **12h30** (organisés par le DL)
en **2015** : les **mardi**, de **12h00 à 13h00** (organisés par l'IMU)

2014			
16	septembre	*TB or not TB : les nouveaux défis dans le diagnostic microbiologique de la tuberculose*	K. Jaton
7	octobre	JOURNEE DE FORMATION DE MICROBIOLOGIE	cf. programme
28	octobre	*Les tiques attaquent*	G. Greub
18	novembre	*Les IST : ça chatouille ou ça gratouille ?*	P. Meylan, K. Jaton
2	décembre	*Parasites au retour de voyage*	A. Croxatto
16	décembre	*Quizz de microbiologie*	O. Opota
2015			
3	février	*Biologie moléculaire*	K. Jaton
3	mars	*Les virus*	P. Meylan
12	mai	*Les entérobactéries*	G. Prod'hom
2	juin	*Comment développer une PCR diagnostique*	O. Opota

La réception des laboratoires

Christian Durussel, Marica Galazzo et Gilbert Greub

Accrédité depuis 2001 selon la norme 17025, l'institut de Microbiologie du CHUV de Lausanne offre un panel analytique complet et varié dans les domaines de la bactériologie, de la mycologie, de la parasitologie, de la biologie moléculaire, de la mycobactériologie et de la sérologie infectieuse. Afin d'assurer une réalisation analytique de qualité, le délai d'acheminement des échantillons cliniques reste un des facteurs déterminants.

Dans le but de faciliter l'envoi des échantillons et d'en centraliser leurs réceptions, le Département des Laboratoires du CHUV a mis en service, dès juillet 2010, une unité de réception destinée à l'ensemble de nos demandeurs internes et externes. Cette unité fonctionnelle permet une prise en charge optimalisée et un transfert rapide de l'échantillon clinique vers le laboratoire spécialisé.

Pour tous renseignements complémentaires concernant la réception des laboratoires, merci de les contacter directement à l'adresse ci-dessous.

Réception des laboratoires

CHUV, BH18-100
Rue du Bugnon 46
CH - 1011 Lausanne
☎ 021 314 42 83

Heures d'ouverture :
Lundi au vendredi :
06 :30 – 18.30
Samedi :
06 :30 – 14 :00
Dimanche et jours fériés :
06 :30 – 14 :00

L'automatisation en diagnostic moléculaire

Katia Jaton, René Brouillet, Roland Sahli et Gilbert Greub

L'automatisation devient nécessaire en microbiologie, que ce soit pour la microbiologie dite classique ou pour le diagnostic moléculaire. En effet, l'augmentation de l'activité est constante ces dernières années et il faut rationaliser et devenir efficient pour faire face à cette réalité. De plus pour que le diagnostic moléculaire soit une vraie valeur ajoutée et non pas « un test de plus » en microbiologie, le temps de rendu du résultat doit être de plus en plus court (<24H).

Dans notre laboratoire de diagnostic moléculaire, pour des raisons cliniques, logistiques et techniques, nous effectuons depuis 2005 des PCR couvrant tout le domaine microbiologique, (bactéries, virus, parasites ou champignons). Ces PCR sont pour 95% d'entre elles des PCR en temps réel mises au point et validées dans notre Institut. Le pré-requis principal de chaque développement étant sa compatibilité avec les paramètres d'amplification de notre plateforme. L'expertise des différents experts de chacun des domaines représentés dans notre Institut a permis cette transversalité. Une veille scientifique constante nous alerte si un polymorphisme ou un défaut de l'une ou l'autre de nos PCR sont mis en évidence. De même, nos liens étroits avec les cliniciens nous permettent de confronter nos résultats quotidiennement avec la clinique. Sur notre bon d'analyse nous avons regroupé nos nombreux tests par syndrome clinique, mais la plupart peuvent être demandés séparément sauf si le diagnostic clinique ne peut les différencier (par ex. *C. trachomatis/ N. gonorrhoeae* ou HSV/VZV).

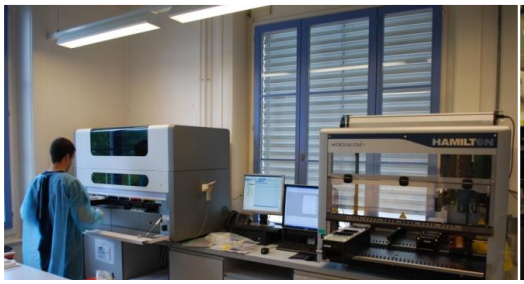
Un des buts de l'automatisation des PCR a été la traçabilité de l'échantillon, de la réception au résultat. Ceci est devenu possible entre autre grâce à l'emploi de robots de pipetage et d'automates capables de lire des code-barres de manière automatisée. Ainsi, dès son arrivée le prélèvement est tracé à chaque étape analytique: réception, extraction des acides nucléiques et PCR. De plus, un suivi semi-automatique des PCR par un logiciel ″qualité″ nous alerte en cas de déviation des tests par rapport à nos normes.

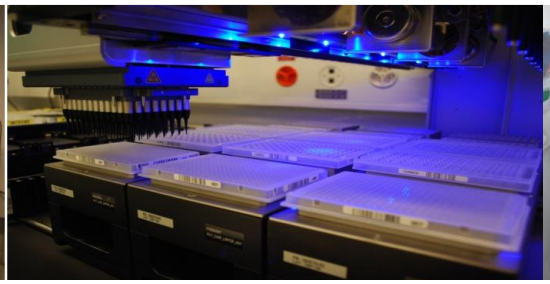
Lors de la première étape, c'est à dire l'extraction de l'ADN ou de l 'ARN des différents types de prélèvements (sang, liquide, biopsies, …), nous utilisons un robot Hamilton couplé au robot Roche Magnapure 96 capable d'exécuter 96 extractions en 1 heure (Figure 1A). Après extraction, 2 autres robots de pipetage Hamilton (Figure 1B) permettent la préparation rapide de plaques de PCR au format 384 puits. Les plaques sont ensuite transférées manuellement dans des thermocycleurs pour PCR en temps réel. L'ensemble des réactions sont réalisées avec les mêmes paramètres d'amplification (Applied Biosystems) (Figure 1C). L'automatisation du diagnostic moléculaire nous a permis d'augmenter la productivité, ainsi que la reproductibilité des tests PCR et de limiter drastiquement les contaminations, comme le montrent les chiffres ci-dessous: dans une analyse effectuée sur un total de 810 séries de PCR en 2013, soit 98'354 réactions, seules 2'718 (2.7%) étaient invalides pour diverses raisons, mais seulement 252 (0.25%) en raison de suspicion de contamination.

Les avantages principaux de l'automatisation du diagnostic moléculaire ont été financiers et également 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, de nous adapter aux nouveaux besoins des cliniciens (épidémies, nouveaux pathogènes). Ainsi, ce n'est que grâce à cette plateforme automatisée que nous avons pu tester rapidement des milliers d'échantillons sanguins provenant de donneurs de sang lors de l'épidémie vaudoise de fièvre Q (1) et que nous avons pu proposer des tests pour des pathogènes émergeants tels que Waddlia, dont le rôle a été récemment reconnu dans la fausse couche (2, 3). De plus, la versatilité du système nous permet de rapidement développer de nouveaux tests « home-made », par exemple lorsqu'un polymorphisme est associé à des résultats faussement négatifs (4).

Références

1. Jaton K, Peter O, Raoult D, Tissot JD, and 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 and new infections, 2013 (1): 6-12.
2. Baud D, Goy G, Osterheld MC, Croxatto A, Borel N, Vial Y, Pospischil A, Greub G. Role of Waddlia chondrophila placental infection in miscarriage. Emerg Infect Dis. 2014 Mar;20(3):460-4.
3. Baud D, Goy G, Osterheld MC, Borel N, Vial Y, Pospischil A, Greub G. Waddlia chondrophila: from bovine abortion to human miscarriage. Clin Infect Dis. 2011 Jun 15;52(12):1469-71.
4. Jaton K, Ninet B, Bille J, Greub G. False-negative PCR results due to gene polymorphism : The example of *Neisseria meningitidis*. J. Clin Microbiology48: 4590-4591.





Chlamydia psittaci

Onya Opota, Katia Jaton et Gilbert Greub

Les *Chlamydia* sont des bactéries intracellulaires dont plusieurs espèces peuvent induire des infections graves chez les adultes (hommes, femmes) et les enfants [1]. *Chlamydia trachomatis* est un agent majeur d'urétrites et de cervicites, maladies sexuellement transmissibles pouvant conduire chez la femme à l'infertilité, à des grossesses extra-utérines ou à des fausses couches, si elle n'est pas traitée [2]. *Chlamydia pneumoniae* est associé a des pneumonies communautaires et à de l'asthme chez l'enfant [3].

Chlamydia psittaci et *Chlamydia abortus* sont tout d'abord des pathogènes d'animaux. Ces deux espèces sont étroitement liées d'un point de vue phylogénétique, et donc difficiles à distinguer, mais elles ont une spécificité d'hôte et un tropisme tissulaire très distinct.

C. psittaci est principalement associé aux oiseaux (perroquets, perruches, pigeons etc…). Chez ces oiseaux, l'infection à *C. psittaci* concerne les voies aériennes et peut être asymptomatique ou causer la mort. On parle d'ornithose. Chez l'homme, *C. psittaci* est responsable d'infection des voies aériennes pouvant causer la psittacose, une zoonose grave des voies respiratoires (pneumonies atypiques). La transmission se fait lors de contacts rapprochés avec des oiseaux infectés ou leurs excréments.

C. abortus est un agent responsable d'avortement chez les petits ruminants, mais peut également coloniser le placenta des femmes enceintes et conduire à un avortement; la transmission à l'homme se fait lors de contact avec des placentas provenant d'animaux infectés.

Les infections à *Chlamydia psittaci* et *Chlamydia abortus* sont probablement sous-diagnostiquées. En effet, une large part des pneumonies demeure d'étiologie indéterminée et certaines d'entre elles pourraient être dues à *Chlamydia psittaci*, notamment si l'anamnèse révèle une exposition directe ou indirecte avec des oiseaux. La situation est identique pour les avortements d'origine indéterminée, dont certains pourraient être causées par des infections à *Chlamydia abortus*, notamment en milieu rural.

A Lausanne, nous avons développé une PCR en temps réel pour détecter et distinguer ces deux bactéries. Cette nouvelle PCR représente une méthode fiable (100% de sensibilité, 94% de spécificité) permettant d'optimiser le diagnostic des infections à *Chlamydia psittaci* et à *Chlamydia abortus* [4].

La recherche de *C. psittaci* se fait sur des expectorations ou des secrétions endotrachéales. La recherche de *C. abortus* se fait sur des prélèvements de la sphère génitale.

Références

1. Jaton K, Greub G (2005) [*Chlamydia*: diagnostic and treatment]. Rev Med Suisse 1: 895-898, 901-893.
2. Baud D, Goy G, Jaton K, Osterheld MC, Blumer S, et al. (2011) Role of *Chlamydia trachomatis* in miscarriage. Emerg Infect Dis 17: 1630-1635.
3. Asner SA, Jaton K, Kyprianidou S, Nowak AM, Greub G (2014) *Chlamydia pneumoniae*: possible association with asthma in children. Clin Infect Dis 58: 1198-1199.
4. Opota O, Jaton K, Branley J, Vanrompay D, Longbottom D, Greub G. New species-specific real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* from clinical samples (manuscrit soumis pour publication).

Des PCRs pour le diagnostic des champignons du genre *Candida*

Philippe Hauser et Katia Jaton

Les champignons du genre *Candida* sont des commensaux de l'humain qui peuvent causer des infections invasives chez les patients immuno-compromis. Ces infections sont potentiellement fatales et parmi les plus fréquentes: plus de 400'000 cas par année dans le monde. Plusieurs espèces sont impliquées, *C. albicans* dans environ 70% des cas, suivie de *C. glabrata* avec 15%, *C. dubliniensis* 5%, *C. parapsilosis* 5%, *C. krusei* 2.5%, et *C. tropicalis* 2.5 %. *C. glabrata* et *C. krusei* sont résistantes naturellement aux antifongiques de sorte que la distinction des espèces est élément crucial du diagnostic. Nous avons récemment développé six PCRs en temps réel, chacune spécifique à une des six espèces de *Candida*. Afin de pouvoir distinguer les six espèces simultanément, nous avons mis au point un système constitué de trois PCRs duplexes, modifiées par rapport au travail de M. Guiver. En combinaison avec une méthode efficace d'extraction de l'ADN fongique utilisant une agitation en présence de billes de verre, ces PCRs permettent la détection jusqu'à 5 copies de la cible par réaction. Etant donné leur grande sensibilité, ces PCRs permettent une détection précoce de ces champignons, ce qui contribue à un meilleur pronostic de ces infections.

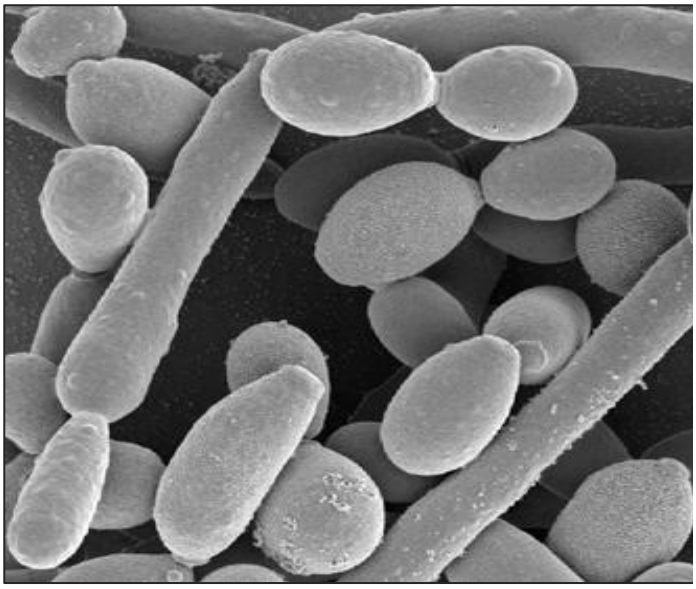


Figure : Cellules lévuriques et pseudo-hyphes de *Candida albicans* au microscope électronique (http://medicineworld.org).

Référence

Guiver M et al. J Clin Pathol. 2001 May;54(5):362-6.

Les tests rapides PCRs GeneXpert appliqués aux culots d'hémocultures positives

Guy Prod'hom et Gilbert Greub

Les tests rapides de type PCR (GeneXpert MRSA) sont couramment utilisés à partir de colonies isolées pour détecter les staphylocoques résistants à la méthicilline dans un but de gestion de la transmission de ce germe résistant au sein de l'hôpital.
Par ailleurs, nous avons démontré la plus-value clinique, dans le cadre d'une étude randomisée, de l'utilisation de ces tests rapides PCR sur le culot bactérien obtenu à partir d'hémocultures documentées positives pour staphylocoques dorés par MALDI-TOF. Le couplage du MALDI-TOF et de la PCR-POCT nous permet en quelques heures d'avoir les éléments essentiels aux décisions thérapeutiques pour toute bactériémie à staphylocoque doré.
Des approches rapides du même type seront développées ces prochaines années pour les autres espèces courantes causant des bactériémies.

Référence

Clerc O, Prod'hom G, Senn L, Jaton K, Zanetti G, Calandra T, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR-based rapid diagnosis of Staphylococcus aureus bacteraemia. Clin Microbiol Infect. 2014 Apr;20(4):355-60.

Approche diagnostique de la maladie de Whipple

Gilbert Greub et Katia Jaton

La maladie de Whipple est une maladie qui présente deux phases principales : une primo-infection, pouvant parfois passer inaperçue, ou se manifestant par une symptomatologie respiratoire ou intestinale (similaire aux symptômes d'une gastro-entérite virale). La maladie de Whipple peut également présenter une forme chronique subaigüe, qui peut être multi systémique, touchant plusieurs organes et souvent associée à une atteinte digestive avec perte de poids, syndrome de malabsorption, ou une forme chronique isolée se manifestant par exemple par une arthrite, une endocardite, une uvéite, ou une atteinte neurologique mal systématisée (1, 2). Enfin, il y a souvent des formes chroniques touchant plus d'un organe, par exemple, associant classiquement une arthrite et une atteinte digestive.

Cette maladie est due à un bacille hautement résistant aux désinfectants courants, appelé *Tropheryma whipplei*. Ce germe, fastidieux, ne pousse que très difficilement et n'a pu être isolé en culture cellulaire qu'après plusieurs semaines d'incubation. De plus, en raison de la glycosylation de ses protéines de surface, aucune sérologie n'est à ce jour utilisable pour le diagnostic.

Dans ce contexte, l'approche diagnostique se base principalement sur la PCR. La PCR peut être effectuée sur la salive ou les selles. Comme le montre le tableau ci-dessous, l'absence d'ADN de *Tropheryma whipplei* dans ces deux éléments est associée à une valeur prédictive élevée. Lorsqu'un ou deux de ces prélèvements est positif, le rôle causal du bacille de Whipple reste à confirmer puisqu'une certaine proportion de la population asymptomatique peut être colonisée et être positif par PCR sur l'un de ses échantillons cliniques (3). En fonction de la situation clinique, il est également possible de rechercher l'ADN de *T. whipplei* par PCR au niveau du sang (lors de suspicion d'infection endovasculaire, endocardite à hémoculture négative, par exemple, ou lors de primo-infection), ainsi qu'au niveau des valves cardiaques si disponibles (lors d'endocardite), d'une biopsie rétinienne (lors d'uvéite), d'une biopsie intestinale (lors de troubles de l'absorption, perte de poids considérée comme pouvant être due à des *whipplei*), sur le LCR (lors d'atteintes neurologiques centrales atypiques inexpliquées et subaigües, subjectives d'une possible maladie de Whipple), sur le liquide articulaire (lors d'arthrite ou polyarthrite). Quelle que soit la manifestation clinique de la maladie de Whipple, la recherche de *T. whipplei* dans les selles et la salive reste importante, malgré la difficulté d'interprétation (3).

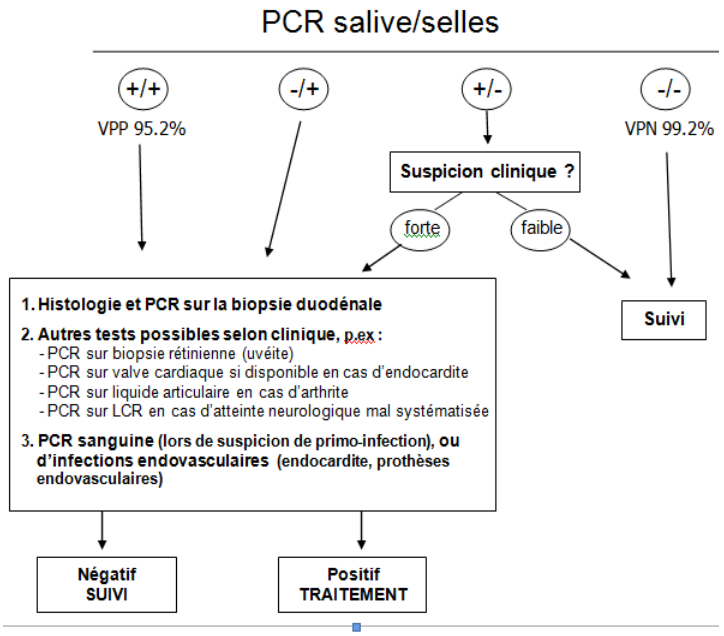


Figure 2 : Algorithme diagnostique

Adapté de Lagier et al. (2,3). VPP: valeur prédictive positive, VPN: valeur prédictive négative.

Références

1. Crisinel PA et Greub G. La maladie de Whipple chez l'enfant : mythe ou réalité ? Paediatrica 2012 ; 23(5) : 8-11.
2. Greub G. A new piece added to the whipple puzzle: Tropheryma Whipplei primary infection with bacteremia and cough. Clin Infect Dis. 2010 Sep 1;51(5):522-4.
3. Lagier JC, Fenollar F, Raoult D. De la maladie de Whipple à l'infection par Tropheryma whipplei. Med Mal Infect. 2010 Jul;40(7):371-82.

Automatisation en bactériologie

Antony Croxatto, Guy Prod'hom et Gilbert Greub

L'automatisation des laboratoires de diagnostique a déjà été instaurée dans de nombreux services tels que la chimie clinique et la biologie moléculaire (1), alors que la microbiologie était considérée durant de nombreuses années comme trop complexe et traitant un trop petit volume d'analyses pour y implémenter une automatisation coûteuse. Cependant, le développement de nouvelles technologies comme le MALDI-TOF et la consolidation de nombreux laboratoires de microbiologie a créer une nouvelle dynamique favorisant le développement de solution automatisée en bactériologie. De nos jours, plusieurs fournisseurs d'importance mondiale proposent différents systèmes en bactériologie incluant une automatisation de l'ensemencement (2), de la gestion et de l'incubation des plaques ainsi qu'une imagerie digitalisée permettant une lecture sur écran appelée télébactériologie (3). Ces systèmes automatisés améliorent la traçabilité, la qualité de l'ensemencement des échantillons et l'incubation des cultures permettant d'améliorer significativement les flux de laboratoire et donc le temps de rendu des résultats d'identification et de sensibilité aux antibiotiques (4). L'automatisation en bactériologie devrait donc influencer positivement le traitement des patients et donc les coûts hospitaliers et de laboratoire.

Références

1. Greub G, Prod'hom G. Automation in clinical bacteriology : what system to choose? Clin Microbiol Infect. 2011 May;17(5):655-60.
2. Mulatero F, Bonnardel V, Micolaud C. The way forward for fast microbiology. Clin Microbiol Infect. 2011 May;17(5):661-7.
3. Croxatto A, Dijkstra K, Prod'hom G, Greub G. 2014. Comparison of the Inoqula and the WASP automated systems with manual inoculation (manuscrit soumis pour publication).

Image de BD Kiestra
(The Netherlands)

Image de Copan
(Italy)

Détection de carbapénémase par MALDI-TOF

Guy Prod'hom et Gilbert Greub

Récemment, plusieurs méthodes de détection de carbapénémases des bacilles Gram négatif par MALDI-TOF, basées sur l'analyse des produits de dégradation des carbapénèmes en présence de l'enzyme, ont été publiées. Nous avons développé une méthode simplifiée, plus adaptée aux laboratoires cliniques (1). En effet, nous utilisons pour l'analyse une faible charge d'antibiotique, en l'occurrence 1 disque imprégné de 10 µg d'ertapénème. Cette méthode a été confrontée à d'autres méthodes : microarray, PCR et dosage d'ertapénème par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS). Les 2 méthodes basées sur la spectrométrie ont montré 100% de sensibilité et spécificité sur un collectif de 47 souches d'intérêt cliniques. Par comparaison, les méthodes génétiques (Check-MDR Carba PCR et Check-MDR CT103) ont montré une sensibilité de 90% et une spécificité de 100%. La méthode par MALDI-TOF représente donc une alternative simple pour la détection rapide de carbapénémase.

Référence

Vogne C, Prod'hom G, Jaton K, Decosterd L, Greub G. A simple, robust and rapid approach to detect carbapénémases in Gram negative isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: validation with triple quadripole tandem mass spectrometry, microarray and PCR. Clin Microbiol Infect. 2014 Jun 14.

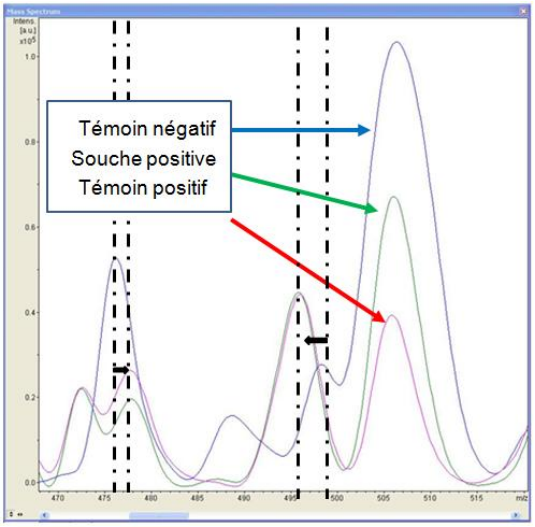


Figure : Spectre de MALDI-TOF après incubation de 1h en présence d'ertapénème : i) bleu témoin négatif, ii) rouge *Klebsiella pneumoniae* KPC, iii) vert : souche de *Morganella morganii* productrice de carbapénémase. Lors de dégradation de l'ertapénème, on observe un déplacement des pics 476 Da et 498 Da indiquées par les flèches noires.

Chlamydia pneumoniae et asthme

Gilbert Greub et Katia Jaton

Chlamydia pneumoniae est une bactérie intracellulaire connue depuis les années 80 comme un agent de pneumonie communautaire. Cette bactérie infecte la plupart des êtres humains, puisque la séroprévalence est supérieure à 70% chez les adultes en bonne santé. Cependant, la plupart des infections passent inaperçues, et malgré la PCR, qui permet un diagnostic sensible et spécifique à partir d'échantillons respiratoires et nasopharyngés, peu de pneumonies communautaires dues à *Chlamydia pneumoniae* sont documentées. A Lausanne, sur une période de 9 ans, seulement 4 échantillons provenant de 2 patients se sont révélés positifs pour *Chlamydia pneumoniae* sur un total de 2'244 échantillons provenant de 1'583 patients (1). Ce taux de 2 ‰ contraste avec le taux plus élevé de 3,4 % pour *Mycoplasma pneumoniae*, qui reste l'agent le plus fréquent de pneumonie atypique communautaire (1).

Il faut noter que les 2 cas n'étaient pas suspectés par le médecin traitant en charge, et que le diagnostic étiologique n'a été fait que grâce à l'approche duplex de la PCR dans notre laboratoire, combinant *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*. De manière intéressante, l'un des deux patients souffrait d'un asthme et le diagnostic a été totalement fortuit, puisque le médecin en charge souhaitait exclure une tuberculose. Ayant écrit « myco » sur l'ordre infirmier, le médecin a été surpris de recevoir le résultat d'une PCR Mycoplasma (en lieu et place de mycobactérie), ce qui finalement a été bénéfique au patient qui a vu son asthme s'améliorer grâce au traitement antibiotique de clarithromycine.

Ce premier cas suggérait un rôle de *Chlamydia pneumoniae* dans l'asthme. Plus récemment, entre septembre et décembre 2013, nous avons documenté une petite épidémie d'infection à Chlamydia pneumoniae chez 8 enfants. De manière intéressante, 5 d'entre eux souffraient d'une exacerbation aiguë d'un asthme ou d'une bronchite asthmatiforme (2). Six de ces 8 patients présentaient une toux chronique sans fièvre et sans symptômes systémiques (2). Cette épidémie supporte le rôle de Chlamydia pneumoniae dans l'exacerbation de l'asthme, et montre l'importance de dépister les enfants asthmatiques pour exclure une éventuelle infection à *Chlamydia pneumoniae*, facilement traitable par macrolides, et permettant ainsi d'éviter un traitement lourd d'un asthme. Mentionnons enfin que ces deux observations lausannoises sont confirmées par des données indirectes sérologiques de Hahn et al., qui ont montré la présence d'IgE spécifique anti-Chlamydia pneumoniae chez les patients souffrant d'asthme (3).

Références

1. Senn L, Jaton K, Fitting JW, Greub G. Does respiratory infection due to Chlamydia pneumoniae still exist? Clin Infect Dis 2011;53:847-8.
2. Chlamydia pneumoniae: possible association with asthma in children. Asner SA, Jaton K, Kyprianidou S, Nowak AM, Greub G. Clin Infect Dis. 2014 Apr;58(8):1198-9.
3. Hahn DL, Schure A, Patel K, Childs T, Drizik E, Webley W. Chlamydia pneumoniae-specific IgE is prevalent in asthma and is associated with disease severity. PLoS One 2012;7:e35945.

Les rickettsies et le diagnostic PCR

Katia Jaton et Gilbert Greub

Les rickettsioses sont des zoonoses transmises par des arthropodes et causées par de petits bacilles Gram négatif intracellulaires obligatoires. Ils sont traditionnellement divisés en 2 groupes :

1) Le groupe typhus avec *R. typhi* et *R. prowazekii*, qui sont responsables du typhus murin (transmis à l'homme par la puce du rat) et du typhus épidémique (transmis par les poux du corps humain), respectivement. Ces 2 espèces sont responsables de ce que l'on appelle le typhus caractérisé par un début brutal, une fièvre importante, un rash cutané dans 25-50% des cas et sont associées à une mortalité élevée.
2) Le groupe boutonneux dans lequel plus d'une quinzaine de *Rickettsia* sont reconnues comme des pathogènes humains. Le plus souvent ces rickettsies sont transmises par des tiques. Ces espèces sont responsables également de fièvre, céphalées, arthralgies, et sont associées à une éruption cutanée, ou à des escarres d'inoculation. Ces fièvres boutonneuses ont une mortalité variable selon les espèces.

Le diagnostic microbiologique des rickettsioses est généralement établi par la sérologie ; cependant, comme l'augmentation des IgM prend de 15 à 26 jours, le diagnostic sérologique est généralement rétrospectif, avec peu de valeur ajoutée dans la phase aigue. De plus, l'identification des espèces par sérologie est difficile et limitée du fait de réactions croisées.

Le diagnostic moléculaire permet un diagnostic plus précoce et également une identification au niveau de l'espèce. Nous avons donc développé une PCR en temps réel duplex qui amplifie l'ADN de toutes les espèces de rickettsiae (PCR *Rickettsiae sp)*, ainsi qu'une autre PCR amplifiant les 2 espèces du groupe typhus, c'est à dire *R. typhi* et *R. prowaseki* (2). En effet, la différentiation entre ces 2 groupes est importante tant du point de vue épidémiologique que du point de vue clinique.

La sensibilité analytique des 2 PCR est de 10 copies par réaction et la spécificité est excellente. Depuis sa mise au point, cette PCR duplex a permis un diagnostic de rickettsiose pour 3 patients. Le diagnostic de typhus murin a pu être posé pour un patient pour lequel la PCR du groupe typhus s'est révélée positive dans une biopsie de pétéchies, et la séroconversion a été documentée dans un second temps. Deux autres patients, pour lesquels la PCR du groupe typhus était négative alors que la PCR *Rickettsia* sp. s'est révélée positive, étaient atteints respectivement de la fièvre boutonneuse méditerranéenne et de la fièvre boutonneuse africaine. Dans les 2 cas, la PCR s'est révélée positive sur un prélèvement provenant des escarres au niveau de la piqure de tique.

Référence

Giulieri S, Jaton K, Cometta A, Trellu LT, Greub G. Development of a duplex real-time PCR for the detection of Rickettsia spp. and typhus group rickettsia in clinical samples. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012 Feb;64(1):92-7.

Fièvre Q et le diagnostic PCR

Katia Jaton et Gilbert Greub

La fièvre Q est une zoonose répandue dans le monde entier causée par une bactérie intracellulaire *Coxiella burnetti*. Les animaux domestiques tels que les bovins, les ovins et les caprins représentent le réservoir principal et la transmission à l'homme se fait généralement par inhalation d'aérosols contaminés. La fièvre Q aiguë est le plus souvent bénigne mais peut se manifester de manière aigüe (pneumonie/hépatite granulomateuse) ou chronique (endocardite le plus souvent).

Le diagnostic de la fièvre Q repose sur la sérologie et la PCR. Nous avons développé une PCR en temps réel et l'avons testée sur différents échantillons cliniques afin de la valider (1). La sensibilité analytique de cette PCR est de < 10 copies/réaction. Un total de 183 échantillons provenant du Prof. Raoult de Marseille ont été testés et ont montré une spécificité de la PCR de 100% (142/142) et une sensibilité de 71% (29/41). Plus précisément la sensibilité était de 88% (7/8) sur les échantillons provenant de valves, de 69% sur les échantillons de sang et de 50% (2/4) sur des échantillons urinaires. De plus, des sérums provenant de l'épidémie de 1983 du Val de Bagne nous ont été donnés par le Dr. Olivier Peter de Sion et 4 sérums initiaux négatifs par sérologie se sont révélés positifs par PCR, alors que les 4 sérums convalescent positifs par sérologie se sont révélés négatifs par PCR. Ces sera ont été congelés pendant 20 ans et, malgré tout, ont donné des résultats relevants. Ceci montre que nous sommes dans un processus dynamique, c'est à dire qu'au niveau sanguin la PCR détecte le germe ou l'ADN circulant au début de la maladie puis, que la montée des anticorps est contemporaine de la négativité du sang par PCR. A ce stade, la sérologie devient alors la méthode de diagnostic de choix et la PCR perd de son intérêt. Pour compléter cet outil diagnostic, un kit de détection des anticorps par IF indirecte (Q fever dual spot IFA®, Focus) a été évalué (travail de Diplôme, Sébastien Carron) et mis en service au laboratoire de sérologie.

Finalement, il a été démontré que *C. burnetii* peut survivre et rester infectieux dans les produits sanguins (2). En effet, cet agent pathogène peut être présent dans le sang au cours des premières semaines d'infection et donc pourrait être présent dans le sang humain donné (3). C'est pour cela que nous avons décidé, lors d'une épidémie de fièvre Q qui a eu lieu près de Lausanne en février – juin 2012 (4), de tester tous les sangs de donneurs (130 PCRs) durant une période de 2 mois. Tous les tests se sont révélés négatifs, confirmant à nouveau la grande spécificité de notre PCR et ce dépistage à large échelle a empêché l'exclusion des dons de sang et a montré l'utilité du format automatisé de notre plate-forme PCR.

Références

1. Jaton K, Peter O, Raoult D, Tissot JD, and 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 and new infections, 2013 (1): 6-12.
2. Kersh GJ, Priestley R, Massung RF. Stability of Coxiella burnetii in stored human blood. Transfusion 2012; 53: 1493–1496.
3. Hogema, BM, Slot E, Molier M et al Hogema BM, Slot E, Molier M et al. Coxiella burnetii infection among blood donors during the 2009 Q-fever outbreak in the Netherlands. Transfusion 2012; 52: 144-150.
4. Bellini C, Magouras I, Chapuis-Taillard C, Clerc O, Masserey E, Peduto G, Péter O, Schaerrer S, Schuepbach G, and Greub G. Q fever outbreak in the terraced vineyards of Lavaux, Switzerland. New microbes and new infections, 2014, DOI: 10.1002/2052-2975.37.

Les PCR large spectre

Katia Jaton et Gilbert Greub

Il existe jusqu'à présent 2 principales approches de la PCR :

L'approche ciblée sur un microorganisme, utilisant des amorces spécifiques c'est à dire que « l'on sait ce que l'on cherche ». Dans cette Newsletter, nous décrivons le développement de nouvelles PCR spécifiques que nous avons développées dans notre laboratoire : PCR *Coxiella burnetii* et PCR *Rickettsiae*, PCR *Chlamydia psittaci* et *abortus*.

L'autre approche est une approche large spectre, car « l'on ne sait pas ce que l'on cherche ». Le principe étant d'amplifier une région de l'ADN ribosomal commun à toutes les bactéries (ou champignons) puis en cas de PCR positive, les zones amplifiées sont séquencées et comparées à des millions de séquences présentes dans des bases de données afin d'identifier les micro-organismes. Ces PCR sont appelées PCR large spectre bactérienne, mycobactérienne, fongique, lorsque les amorces permettent la détection des bactéries, des mycobactéries, des champignons, respectivement. Actuellement il n'existe pas de test équivalent pour les virus, leur variabilité génétique étant trop importante.

Il est à noter que ce type de PCR se fait principalement sur des prélèvements normalement stériles (sauf pour la PCR large spectre ciblant les mycobactéries) et qu'elles sont environ 100 fois moins sensibles et moins spécifiques que les PCR ciblées. En conséquence il vaut toujours mieux effectuer une PCR ciblée si l'on sait ce que l'on cherche. De plus, certains résultats peuvent être difficiles à interpréter du fait de contaminants qui peuvent se trouver dans les réactifs ou lors de manipulations pré-analytiques non optimales (transfert d'aliquot sous conditions non DNA free). De plus, ces PCR ne sont généralement pas automatisées et ont en conséquence un temps de rendu de résultat supérieur (48-72 heures).

Malgré leurs limitations, les PCR large spectre ont leur place dans le diagnostic microbiologique lors de situations cliniques particulières, comme 1) lors de suspicion d'une infection causée par des bactéries fastidieuses, difficilement ou non cultivables, et lorsque l'on ne sait pas cibler (Mycobactéries, *Coxiella*, *Bartonella*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Francisella tularensis*, *Mycoplasma* spp, *Tropheryma whipplei*, etc…) 2) lors de forte suspicion d'une infection, mais que le prélèvement a été effectué après le début de l'antibiothérapie, et 3) lorsqu'un prélèvement est positif à l'examen direct mais que les cultures restent négatives.

Pour ce type de PCR, un dialogue entre le clinicien et les microbiologistes est indispensable afin de valider les indications, d'assurer une pré-analytique adéquate et d'interpréter le résultat.

Référence :

K. Jaton and G. Greub. PCR en microbiologie: de l'amplification de l'ADN à l'interprétation du résultat. Revue Médicale Suisse. 2007 : 3 :931-938.

Evaluation économique des identifications des microorganismes par MALDI-TOF

Guy Prod'hom et Gilbert Greub

L'introduction du MALDI-TOF pour l'identification des microorganismes est une révolution pour les laboratoires de microbiologie. Elle permet l'identification à l'espèce de >95% des germes courants (1), de 50% des germes nécessitant avant le MALDI-TOF une identification par PCR et séquençage (2), et de 80% des germes à partir des culots d'hémocultures (3). Lors de l'évaluation de cette technique pour les germes courants (1), nous avons recensé l'ensemble des consommables et des tests biochimiques ou moléculaires nécessaires à l'identification. Ces données ont été exploitées lors d'une étude économique pour un travail de Master en médecine de Samuel Heiniger (4). Samuel Heiniger a comparé les coûts de l'identification par une approche standard avec l'identification par MALDI-TOF. Paramètres évalués dans les coûts: i) les consommables, ii) le temps de technicien (1.-/min), iii) l'amortissement, iv) la maintenance. Globalement, le MALDI-TOF permet de réduire de 2.4x le coût de l'identification. La réduction varie de 1.8 à 5.1, selon l'espèce et les tests biochimiques appliqués. Un modèle mathématique montre que le MALDI-TOF est économique si >5'300 identifications sont réalisées par année.

Références

1. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G and Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1549-54.
2. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. J Clin Microbiol. 2011 Feb;49(2):693-6.
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):1481-3
4. Heiniger S, Prod'hom G, Durussel C, Wasserfallen JB, and Greub G. Saving reagents and technician time using MALDI-TOF MS: a detailed economical evaluation (soumis pour publication).

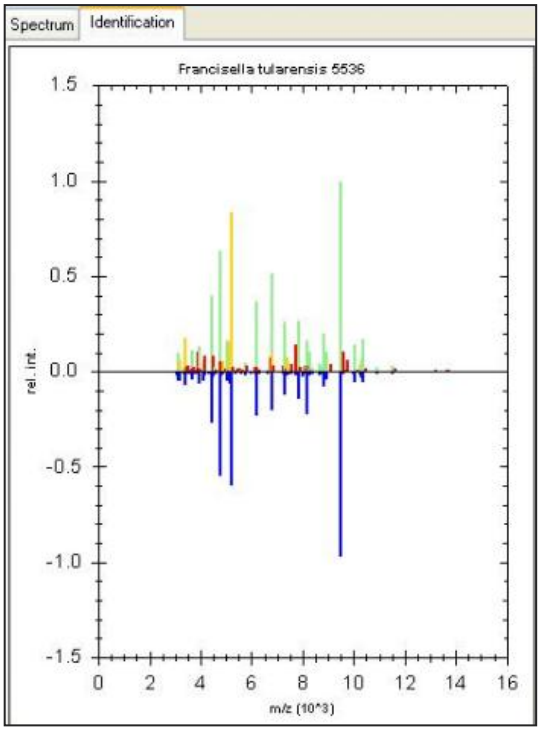


Figure 1 : Souche de *Francisella tularensis* identifiée par MALDI-TOF.

Aspects spécialisés du diagnostic des hépatites virales

Roland Sahli et Darius Moradpour

Un effort collaboratif de l'Institut de Microbiologie et du Service de Gastroentérologie et d'Hépatologie du CHUV a permis le développement de tests diagnostics spécialisés pour les hépatites virales, avec le soutien non restreint de Bristol-Myers Squibb, Gilead, Merck Sharp & Dohme, Novartis et Roche et avec l'approbation de l'Association Suisse pour l'Etude du Foie. Ces tests concernent les patients infectés par les virus de l'hépatite B (HBV, génotypage et test de résistance génétique), delta (HDV, quantification de l'ARN viral) et E (HEV, quantification de l'ARN viral). En outre nous avons introduit le test de génotypage du polymorphisme IL28B *(IFNL3)* rs12979860 qui prédit la réponse en termes d'élimination spontanée du virus de l'hépatite C (HCV) et de réponse au traitement basé sur l'interféron alpha. Ils ont été portés à notre accréditation en octobre 2013. Cette collaboration apporte une valeur ajoutée au résultat microbiologique par une interprétation médicale et conseil de traitement le cas échéant. Des informations détaillées concernant ces prestations sont fournies dans notre page web (http://www.chuv.ch/imul/imu_home/imu-collaborations-viral_hepatitis.htm) et ci-dessous en particulier pour HEV.

Quantification d'HEV

HEV est un virus à ARN qui se transmet par la voie fécale-orale et qui peut causer une hépatite aiguë similaire à l'hépatite A. On connaît 4 génotypes d'HEV. HEV-1 est endémique en Asie, avec transmission interhumaine. Il n'est détecté en Suisse que chez des patients présentant une hépatite aiguë au retour d'un voyage dans ces régions. HEV-3 cause des hépatites aiguës autochtones ou des hépatites chroniques chez des patients immuno-compromis en Europe. L'origine zoonotique de ces infections est reconnue, avec pour réservoir divers animaux domestiques ou sauvages tels que le porc, le sanglier ou le cerf. La détection de l'ARN viral dans le plasma/sérum est utile pour confirmer une infection aiguë et pour suivre la charge virale chez les patients immuno-compromis infectés de manière chronique. A cette fin nous utilisons une PCR en temps réel à large spectre dérivée de Jothikumar et al. (1), que nous avons adaptée sur la base des séquences publiées dans les bases de données de GenBank. Parmi les échantillons que nous avons analysés, la plupart des positifs correspondent à des infections autochtones à génotype 3 (2) (Figure 1). Tous les cas de génotype 1 ont été associés à un voyage récent dans les régions endémiques à HEV-1.

Références

1. Jothikumar, N., T. L. Cromeans, et al. (2006). J Virol Methods **131**(1): 65-71.
2. Doerig C, Moulin H, Müllhaupt B, Pache I, Bihl F, Telenti A, Sahli R, Moradpour D. The International Liver Congress 2014. 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. London, UK, April 9-13, 2014. (Abstract published in J Hepatol 2014;60 Suppl 1:S302).

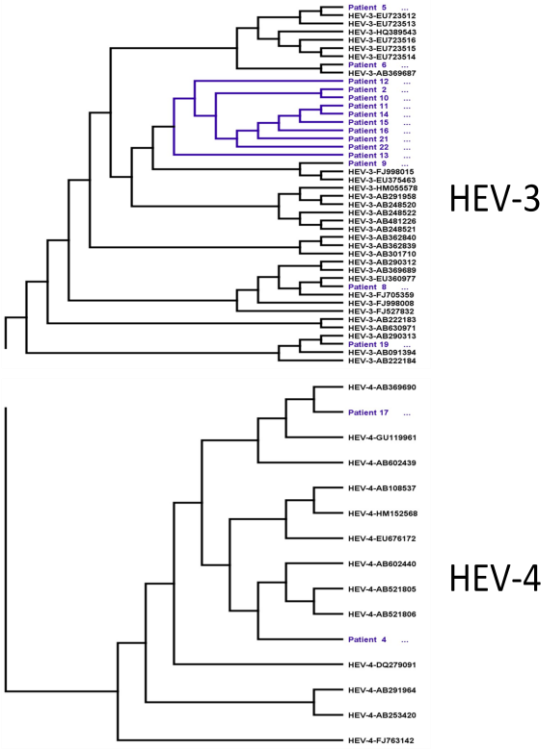


Figure 1: Arbre phylogénétique des isolats HEV dérivés d'infections autochtones (colorés en bleu)

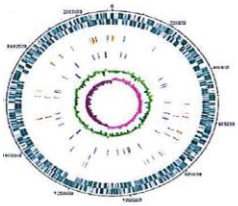
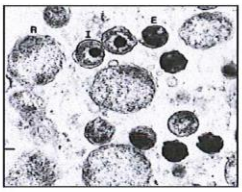
Journée de formation en Microbiologie diagnostique

Organisée par K. Jaton et G. Greub – Institut de Microbiologie, CHUV, Lausanne

Mardi 7 octobre 2014, de 9h00 à 16h15

Auditoire Charlotte Olivier, zone auditoires CHUV, BH-08

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

	09h00	**Introduction**	**Gilbert Greub,** Lausanne
LES BACILLES GRAM POSITIFS	**09h10**	**Les bacilles Gram positifs : quelques généralités**	**Guy Prod'hom,** Lausanne
	09h30	Questions & discussion	
	09h35	***Actinobaculum* : diagnostic et rôle pathogène**	**Reto Lienhard,** La Chaux-de-Fonds
	09h50	Questions & discussion	
	09h55	**Corynebactéries**	**Onya Opota,** Lausanne
	10h10	**Questions, discussion**	
	10h15	***Bacillus anthracis* : les laboratoires régionaux face à une alerte d'anthrax**	**Michael Bel,** Berne
	10h25	Questions & discussion	
LA GENOMIQUE BACTERIENNE			
	**11h00**	**Application de la génomique en microbiologie diagnostique : à propos d'un cas**	**Trestan Pillonel,** Lausanne
	11h10	Questions & discussion	
	11h15	**Métagénomique : impact des antibiotiques sur la flore endogène**	**Vladimir Lazarevic,** Genève
	11h45	Questions & discussion	
LES INFECTIONS SEXUELLEMENT TRANSMISSIBLES			
	**13h30**	***Chlamydia trachomatis***	**Gilbert Greub,** Lausanne
	13h50	Questions & discussion	
	13h55	***Neisseria gonorrhoeae***	**Katia Jaton,** Lausanne
	14h15	Questions & discussion	
	14h20	**Sérologie : syphilis**	**Antony Croxatto,** Lausanne
	14h40	Questions & discussion	
	15h15	**Herpès**	**Pascal Meylan,** Lausanne
	15h35	Questions & discussion	
	15h40	**HPV : dépistage et enjeux**	**Martine Jacot-Guillarmod** Lausanne
	16h00	Questions & discussion	**Roland Sahli,** Lausanne
	16h10	**Mot de conclusion**	**Katia Jaton,** Lausanne

Formation continue en bactériologie

La prochaine **Journée de formation en microbiologie diagnostique** aura lieu le **6 octobre 2015**

Les thèmes suivants y seront abordés :

- L'automatisation, le MALDI-TOF et la télébactériologie
- Résistance aux antibiotiques et bacilles Gram négatifs multi-résistants
- Les zoonoses
- Les tests rapides