

# CHUV NEWSLETTER 2012 – Microbiologie diagnostique, Lausanne

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



## Naissance d'une newsletter

Cette newsletter, destinée à l'ensemble des demandeurs de prestations envoyant des échantillons aux laboratoires de microbiologie diagnostique du CHUV, est née de notre volonté d'accroître la communication avec nos clients, qui sont surtout des partenaires essentiels à une pré-analytique et une post-analytique de qualité.

Cette newsletter 2012 a pour objectif de présenter de manière succincte les innovations 2012 effectuées à Lausanne dans le secteur de la microbiologie diagnostique, et de mettre en évidence quelques prestations diagnostiques particulières spécialisées dans un but d'information et de formation.

Cette newsletter présente également les prochains rendez-vous en termes de formation.

Bonne lecture.

**Gilbert Greub**

## Institut de Microbiologie: dualité entre diagnostic et recherche

**Gilbert Greub et Amalio Telenti**

L'Institut de microbiologie de l'Université de Lausanne (IMUL) est un service du Département des Laboratoires du Centre hospitalier universitaire vaudois (CHUV). Il a trois missions principales : le diagnostic, l'enseignement, et la recherche.

Le Professeur A. Telenti, chef de service, est responsable des secteurs enseignement et recherche, alors que le Professeur G. Greub, successeur du Professeur J. Bille, est, depuis le 1<sup>er</sup> septembre 2011, médecin-chef du secteur diagnostique.

Offrir des prestations de qualité, à la pointe de la technologie, est une priorité. Pour atteindre ce but, il est essentiel d'innover constamment, et ceci se fait au quotidien par les cadres du diagnostic (K. Jatton, P. Meylan, G. Prod'hom, D. Blanc, Ph. Hauser et R. Sahli), qui signent la plupart des textes de cette newsletter.

Nos activités R+D, résumées dans cette newsletter, illustrent bien l'importance de la recherche appliquée en microbiologie diagnostique. Cependant, l'IMUL a également une recherche active, notamment dans les secteurs suivants :

- Infection VIH : Prof. A. Telenti et Dr A. Ciuffi, MER
- Bactéries intracellulaires : Prof. G. Greub
- Virus hémorragiques : Prof. S. Kunz
- Résistance aux antifongiques : Prof. D. Sanglard
- Infection chez les patients greffés : Prof. P. Meylan
- *Pneumocystis carinii* : Dr Ph. Hauser, MER

Cette recherche plus fondamentale apporte parfois des innovations diagnostiques utiles, telles la PCR spécifique *Pneumocystis*, ou diverses PCRs pour le diagnostic des infections dues aux bactéries intracellulaires, montrant l'importance d'une dualité de recherche et de diagnostic dans un institut universitaire.

## Prochains colloques de formation continue en microbiologie diagnostique:

15.11.2012	Approche diagnostique en microbiologie	Prof. G. Greub
13.12.2012	Diagnostic moléculaire	Dr K. Jatton
10.01.2013	Sérologie	Prof. P. Meylan
14.02.2013	Coccis Gram positif	Dr G. Prod'hom
28.03.2013	Bacilles Gram positif	Dr G. Prod'hom

## Une nouvelle PCR permettant de détecter *Pneumocystis jirovecii*

**Philippe Hauser**

*Pneumocystis jirovecii* est un champignon causant des pneumonies graves chez les patients immunocompromis. Cette maladie est souvent révélatrice d'une immunosuppression liée à une infection par le VIH, et représente l'infection opportuniste la plus fréquente chez ce type de patients. La seconde catégorie de patients susceptibles à cette pneumonie regroupe les personnes immuno-supprimés dans le contexte de transplantation, cancer, ou traitement d'une maladie auto-immune. Chez ces patients, la charge fongique est souvent plus faible que chez les patients VIH positifs de sorte que certains cas ne sont pas détectés par la méthode d'argentation, coloration généralement utilisée pour le diagnostic de *P. jirovecii*. Afin d'améliorer la sensibilité diagnostique, nous avons récemment mis au point une PCR en temps réel spécifique pour *P. jirovecii* qui permet de détecter jusqu'à 5 copies de la cible par réaction (180 points OFAS, résultat en 24h sauf weekend). Etant donné que cette méthode détecte également les patients colonisés par *P. jirovecii* sans pneumonie avérée, sa valeur prédictive positive pour la pneumonie à *P. jirovecii* est mauvaise (57%). En revanche, cette PCR présente une excellente valeur prédictive négative (100%), de sorte qu'elle est particulièrement utile lorsque la suspicion clinique est forte mais que le diagnostic par coloration est resté négatif et qu'aucune autre étiologie n'a pu être établie.

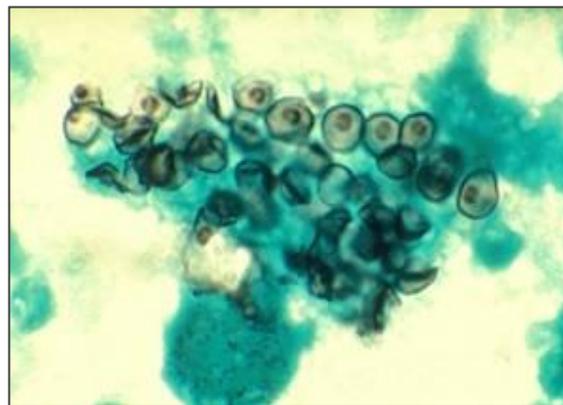


Figure : Kystes de *P. jirovecii* colorés par argentation.

## Identification par MALDI-TOF

Guy Prod'hom et Gilbert Greub

Laboratoire de Bactériologie

Ces 2 dernières années ont été marquées par une avancée technologique majeure dans le laboratoire de bactériologie. Il s'agit de l'introduction de la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) appliquée à l'identification bactérienne. Jusqu'à ce jour, l'identification était basée sur l'analyse d'un ensemble de tests biochimiques et phénotypiques des colonies bactériennes. Le MALDI-TOF analyse le spectre protéique de la bactérie notamment les protéines ribosomales et compare le spectre protéique obtenu à une base de données regroupant plus de 3'000 spectres de bactéries d'importance clinique ou environnementale (1). L'avantage principal de cette méthode est la rapidité car l'identification peut être obtenue en 2 minutes à partir de colonies en lieu et place des 24h à 48h nécessaire pour l'identification traditionnelle.

Nos efforts se sont concentrés sur l'évaluation des performances du MALDI-TOF. Ainsi dans une première étude, nous avons comparé l'identification biochimique et l'identification par MALDI-TOF de plus de 1300 souches bactériennes. L'identification concordait au niveau de l'espèce pour 95% des identifications. La majorité des cas discordants ont été attribués à des problèmes de la base de données du MALDI-TOF, à des problèmes taxonomiques ou à des erreurs de l'identification biochimique (2). La seconde étude a analysé la place du MALDI-TOF pour l'identification de germes rares isolés dans le laboratoire sur plusieurs années et dont l'identification avait nécessité le recours à l'analyse moléculaire du gène ribosomal 16S rRNA. Sur 410 souches, près de 50% ont pu être identifiés par le MALDI-TOF en quelques minutes en lieu et place des 2 jours nécessaires pour l'analyse moléculaire, dans 18% de souches additionnelles l'identification au niveau du genre proposé par le MALDI-TOF était correct. Le MALDI-TOF n'a pas proposé d'identification pour le solde des souches en raison notamment de l'absence de profils bactériens correspondants dans la base de données du MALDI-TOF (3). Ces deux études ont montré le potentiel extraordinaire de cette méthode pour l'obtention d'une identification rapide de germes potentiellement pathogènes et ainsi mettre à disposition des médecins une information importante pour le suivi clinique des patients.

### Références

- 1 Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. FEMS Microbiol Rev. (2011) Jul 13 :1-28
- 2 Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. J Clin Microbiol. (2010) 48(5):1549-54
- 3 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. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. J Clin Microbiol. 2011 49(2):693-6.



## Confusions diagnostiques entre herpès et zona

Pascal Meylan

Les lésions élémentaires (rash vésiculeux localisé) ne permettent pas en principe de distinguer entre une récurrence d'herpès et un zona. Le diagnostic différentiel se fonde sur le nombre anamnestique d'épisodes et leur localisation, voire leur congruence avec certains dermatomes (e.g. thoraciques). Cependant, l'expérience montre qu'en l'absence d'herpès récidivant fréquemment, et dans les territoires oral ou génital, il n'est pas rare de confondre les deux étiologies (voir e.g. figure). Pour cette raison, à partir de 2007, nous avons systématiquement testé pour HSV et VZV les spécimens qui nous étaient soumis avec une demande isolée pour HSV ou VZV. Ceci nous a permis de déterminer à quelle fréquence on trouvait HSV-1, HSV-2, ou VZV selon que le clinicien demandait ou non ce test (table). On constate à la lecture de cette table qu'il est beaucoup plus fréquent pour un clinicien de demander HSV seul plutôt que VZV seul. Cette observation est probablement consistante avec l'hypothèse que les cliniciens sont plus confiants dans un diagnostic clinique de varicelle ou de zona, sans ressentir le besoin de le confirmer par un test. Parmi les tests non demandés, près de 2% donnent un résultat positif pour VZV ou HSV, alors que parmi les tests demandés par le clinicien, 20.4% sont positifs pour VZV et 24.8% pour HSV. La vaste majorité des résultats positifs insoupçonnés correspondent à des VZV trouvés dans des spécimens pour lequel le clinicien ne demandait qu'un test pour HSV (49/52). Quelles peuvent être les raisons de ces résultats inattendus ? Un examen de 27 dossiers cliniques disponibles donne les pistes suivantes, concernant 26 cas avec des zones non suspectés. D'une part, dans les 24 cas de zona où un diagnostic clinique initial était mentionné, 6 faisaient mention de l'hypothèse d'un zona, suggérant qu'une erreur de nomenclature (voir le terme de « *Herpès zoster* » !) ou de transcription expliquait la demande d'analyse mal ciblée. Au contraire, dans 10 cas, le diagnostic initial faisait état d'une suspicion d'herpès. Les lésions étaient situées dans 5 cas au niveau génital et dans 3 cas au niveau céphalique. Il est donc relativement courant de confondre dans ces territoires un zona du nerf facial ou des racines sacrées avec un herpès respectivement oral ou génital. Quoiqu'il en soit, ces observations supportent notre politique d'offrir un test combiné pour les deux virus, d'autant plus si le test multiplexé permet de l'offrir sans surcoût par rapport au test simple.

Table : fréquence de HSV ou VZV non suspectés<sup>a</sup>

Tests effectués	Total	dont positifs	(%)
VZV demandés :	n=1536	313	(20.4%)
VZV non demandés :	n= 2670	49	(1.8%)
HSV-1 demandés :	n=4406	630	(14.3%)
HSV-1 non demandés :	n=228	1	(0.4%)
HSV-2 demandés :	n=4409	376	(8.5%)
HSV-2 non demandés :	n=228	2	(0.9%)
Total non demandés :	n=3126	52	(1.7%)

<sup>a</sup> Le nombre de tests effectués et positifs est analysé selon que le clinicien avait demandé ou non l'analyse pour chacun des virus

Ref : P Meylan, Infections à virus de l'Herpès simplex : mise à jour pour le praticien. Revue Médicale Suisse, 2011 ;7 :886-93.



Figure : Zona sacré nécessitant un diagnostic de laboratoire afin de le différencier d'une récurrence herpétique, chez un hôte immunocompromis.

## PCR duplex pour la détection simultanée de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* dans les prélèvements uro-génitaux : valeur ajoutée de cette approche

Katia Jatou et Gilbert Greub

Une PCR quantitative en temps réel a été développée dans notre laboratoire pour la détection simultanée de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae* et est proposée. Une région spécifique du gène *porA* pour *N. gonorrhoeae* et le plasmide cryptique pour *C. trachomatis* sont ciblés par cette PCR (1). Il est à noter que notre PCR *C. trachomatis* détecte également les mutants décrits par les Suédois (2,3).

Depuis 2006, nous avons analysé par cette approche duale 11'470 échantillons dont 78% provenaient de femmes et 22% d'hommes. Le taux de positivité est de 5.8% pour *C. trachomatis*, 1.1% pour *N. gonorrhoeae*, et 0.2% d'infections mixtes. Ces taux sont restés stables durant ces années mais par contre le nombre de demandes est en augmentation constante.

Parmi 130 prélèvements positifs pour *N. gonorrhoeae* (31 femmes et 99 hommes), 12 (9.2%) ont été testés grâce à l'approche « duplex » et n'avaient pas été demandé à être testés par le clinicien. De plus, dix de ces prélèvements provenaient de femmes ce qui ramène à 32% (10/31) le taux de prélèvement positifs pour *N. gonorrhoeae* chez les femmes pour qui la recherche de *N. gonorrhoeae* n'avait pas été demandée.

Cette étude montre qu'il est vraiment difficile de distinguer ces 2 entités cliniques. Nous recommandons de tester systématiquement chez l'homme et chez la femme *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* dans le contexte d'IST.

### Références

1. Jatou, K., J. Bille, and G. Greub. 2006. A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs. *J Med Microbiol* 55:1667-1674.
2. Ripa, T. and P. Nilsson. 2006. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Euro Surveill* 11:E061109.
3. Ripa, T. and P. A. Nilsson. 2007. A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. *Sex Transm Dis* 34:255-256.

## Automatisation en bactériologie

Gilbert Greub et Guy Prod'hom

Le laboratoire de bactériologie inocule quotidiennement plus d'un millier de géloses. Cette activité répétitive peut être automatisée, ce qui permet (i) un gain en ressources de personnel, et (ii) une qualité accrue en obtenant des ensemencements reproductibles, dans une atmosphère confinée, et avec des colonies bien isolées.

Il existe actuellement sur le marché principalement 4 systèmes d'inoculation automatisée :

- WASP (Copan)
- Previ-Isola (BioMérieux)
- Inoqula (Kiestra)
- Innova (Becton-Dickinson)

Chaque système a ses propres avantages et inconvénients. Cependant, le choix d'un tel appareil dépend aussi de la taille (variété et nombre d'analyses) et du mode de fonctionnement du laboratoire, ainsi que du type d'échantillons qui y sont traités. Dans un article récent (1), nous avons résumé les points principaux qui peuvent guider le choix d'un système d'ensemencement.

A Lausanne, notre choix s'est porté sur le WASP (Copan), cf. photo, après une analyse minutieuse des besoins de notre laboratoire. Fonctionnel depuis début octobre 2011, le WASP inocule actuellement plus de 500 géloses par jour, à la plus grande satisfaction des techniciens en analyses biomédicales et des cadres.

**Référence:** Greub & Prod'hom. Automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 655-660.



**Figure.** Le WASP, un des 4 principaux systèmes d'inoculation automatisée disponibles sur le marché.

## Traitement des hémocultures

Guy Prod'hom et Gilbert Greub  
Laboratoire de Bactériologie

Le traitement des hémocultures positives est une activité déterminante du laboratoire pour guider le clinicien dans le traitement des sepsis et bactériémies. Jusqu'à ce jour, l'impact majeur est l'annonce au clinicien de la morphologie à la coloration de Gram des bactéries isolées du sang qui permet d'introduire, de modifier ou d'adapter le traitement empirique. L'identification bactérienne et l'antibiogramme ont peu d'impact en raison du délai pour l'obtention de ces résultats. Le MALDI-TOF ayant fait ses preuves dans l'identification microbienne (1), nous avons exploré le MALDI-TOF pour l'identification des bactéries isolées directement dans les hémocultures positives. L'écueil majeur de l'analyse directe des bactéries à partir des hémocultures est la présence de protéines variées (cellules sanguines, protéines sanguines) qui altèrent le spectre des protéines bactériennes à identifier. Nous avons donc développé la préparation d'un culot bactérien à partir des bouillons d'hémoculture basé sur des centrifugations différentielles et l'utilisation de chlorure d'ammonium comme agent de lyse des érythrocytes. Afin de valider cette procédure originale, nous avons comparé l'identification à partir du culot bactérien à l'identification finale du germe sur 126 hémocultures positives. Une identification à l'espèce par MALDI-TOF a été obtenue dans près de 80% des cas et 99% des identifications étaient congruentes avec l'identification finale (2). La méthode est appliquée quotidiennement dans notre laboratoire depuis septembre 2009 et nous pouvons ainsi dès le premier jour transmettre au clinicien l'identification finale du germe.

Dans notre démarche pour accélérer la transmission de résultats pertinents au clinicien nous utilisons également les culots bactériens des hémocultures positives décrits ci-dessus pour la détermination de l'antibiogramme. Dans la technique usuelle, l'antibiogramme est obtenu au moyen d'un automate le VITEK 2 de bioMérieux à partir de colonies. Afin de valider l'utilisation des culots bactériens pour la détermination de la sensibilité des bactéries, nous avons comparé les résultats des tests de sensibilités obtenus à partir de culots bactériens et à partir des colonies de ces mêmes bactéries notamment pour les enterobactéries et les staphylocoques. Le taux d'erreur pour ces 2 types de germes était inférieur à 1% (3). Nous exploitons donc dorénavant le culot bactérien en routine pour l'identification et l'antibiogramme de la majorité des germes isolés d'hémoculture.

### Références

- 1 Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. *FEMS Microbiol Rev.* (2011) Jul 13 :1-28.
- 2 Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1481-3.
- 3 A simple blood culture bacterial pellet preparation for faster accurate direct bacterial identification and antibiotic susceptibility testing with the VITEK 2 system. G. Prod'hom, Ch. Durussel, G. Greub (soumis pour publication)

**Figure :** Culots d'hémocultures avec (gauche) et sans lyse des globules rouges (droite).



## Quels sites anatomiques faut-il échantillonner pour un dépistage MRSA par culture ou par test rapide ?

**Dominique S. Blanc, Laboratoire d'épidémiologie**

*Staphylococcus aureus* résistant à la métilicine (MRSA ou SARM) est responsable d'une grande partie des infections associées aux soins. Le dépistage des porteurs fait partie intégrante de la lutte contre sa dissémination dans les institutions de soins. Un diagnostic rapide et précis est un élément essentiel pour cette lutte. Le développement récent de méthodes basées sur la PCR permet de confirmer ou de réfuter le portage MRSA chez un individu dans un délai de moins de 2h.

Bien qu'un frottis des fosses nasales soit l'échantillon qui figure dans toutes les recommandations nationales pour le dépistage des MRSA, l'ajout d'autres sites anatomiques reste controversé. En Hollande, les sites anatomiques suivants sont recommandés: le nez, la gorge, les plis de l'aîne, les plaies, et l'urine si un cathéter est en place. Par contre, les français recommandent de tester le nez et au moins un autre site.

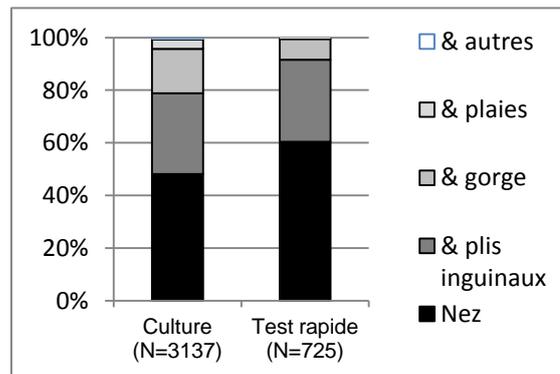
L'analyse des résultats de notre laboratoire de ces dernières années nous a permis de répondre à cette question (voire référence 1 pour une information détaillée). Au CHUV, les prélèvements de nez, gorge, plis inguinaux, plaies si présentes, urine si cathéter en place, et autres sites potentiellement infectés sont effectués lors d'un dépistage MRSA. Sur plus de 12'000 dépistages effectués par culture, nos résultats montrent que le frottis de nez n'a qu'une sensibilité de 48% (Tableau). L'ajout des frottis de gorge et des plis inguinaux élève cette sensibilité à 96%. Concernant le test rapide (Xpert MRSA, Cepheid), les chiffres ne sont pas très différents: une sensibilité de 62% est atteinte avec le frottis de nez seul, et de 99% en incluant la gorge et les plis de l'aîne. Les conclusions que nous faisons sont les suivantes:

1. Par culture ou méthode PCR rapide, un prélèvement de nez seul ne suffit pas pour un dépistage de portage MRSA. Il faut inclure les frottis de gorges et de plis inguinaux.
2. Les autres sites anatomiques (plaies, urines, etc.) n'augmentent pas de beaucoup la sensibilité de détection, il n'est pas nécessaire de les inclure. Par contre, si un de ces sites s'est révélé contaminé par du MRSA lors de prélèvements cliniques, il est important de les inclure lors de dépistage de contrôle de décolonisation.

Cette prestation peut être demandée en utilisant le bon d'analyse du laboratoire d'épidémiologie : <http://www.hpci.ch/files/dam/cir101052.pdf>

### Référence

1. Laurence Senn, Patrick Basset, Immaculée Nahimana, Giorgio Zanetti and Dominique S. Blanc. Which anatomical sites should be sampled for screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage by culture or by rapid PCR test? Clin. Microbiol. Inf. In press. (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2011.03724.x/abstract>)



**Figure.** Sensibilités cumulées des différents sites anatomiques pour le dépistage des MRSA par culture ou par test rapide.

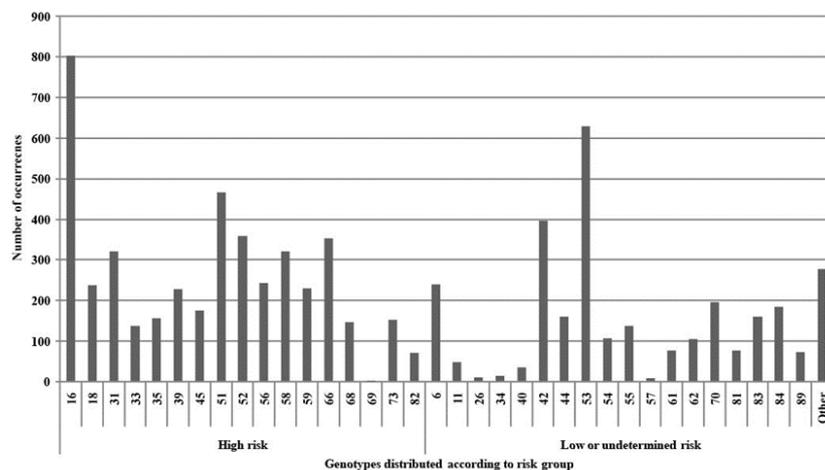
## Diagnostic des papillomavirus humains (HPV)

**Roland Sahli**

Une quarantaine de génotypes d'HPV infectent la muqueuse anogénitale, causant l'une des maladies sexuellement transmissibles les plus fréquentes (condylome acuminé, verrue anogénitale). Alors que la plupart des verrues anogénitales régressent spontanément en l'espace de 2 ans, une minorité d'infections persistent à long terme (>10-15 ans) et peuvent provoquer le cancer du col utérin selon le génotype d'HPV. On distingue ainsi des génotypes à haut risque oncogène (HPV16, 18, 31, etc) et d'autres à bas risque (HPV6, 11, 42, etc).

Le diagnostic HPV est utilisé actuellement dans notre laboratoire comme complément à la cytologie pour estimer le risque de progression vers une maladie sévère chez des patientes de plus de 30 ans qui présentent au moment de l'examen cytologique des lésions cervicales atypiques de signification indéterminée (ASC-US) ou d'autres anomalies. Pour identifier le génotype d'HPV, nous avons développé le test PGMV-CHUV basé sur l'amplification en chaîne (PCR) à large spectre de l'ADN d'HPV utilisant les amorces PGMV (1). Après PCR, le génotype des amplicons est déterminé par hybridation réverse contre un panel de sondes spécifiques couvrant l'ensemble des virus à haut risque et les plus fréquents virus à bas risque. Nous avons décrit cette méthode dans le chapitre 5 du manuel de laboratoire HPV de l'OMS (2) en notre qualité de laboratoire régional de référence HPV de l'OMS pour l'Europe (3).

Les patientes présentant une cytologie de type ASC-US peuvent être HPV-négatives ou infectées par des virus à bas risque, auquel cas la probabilité d'une lésion sévère sous-jacente est très basse. Ces femmes peuvent retourner à un suivi gynécologique de dépistage à intervalle habituel, car la valeur prédictive négative du test HPV est très élevée (> 97%). Au contraire, les patientes avec ASC-US et infectées par un virus à haut risque, en particulier HPV16 ou HPV18, ainsi que les patientes infectées de manière persistante par le même virus à haut risque sur plusieurs visites de dépistage ont besoin d'une prise en charge immédiate, car elles sont susceptibles d'avoir une lésion sévère sous-jacente qui nécessite un traitement. Les résultats de génotypage sont intégrés à notre base de données HPV pour faciliter la décision de prise en charge par les gynécologues. Les résultats sont exprimés soit comme HPV négatif soit comme HPV positif en précisant le groupe de risque, le génotype et sa durée de persistance s'il y a lieu. Les HPV les plus observés dans les échantillons qui nous ont été soumis sur une période de 11 ans furent HPV16, 51, 52, 66 et 59 pour le groupe à haut risque et HPV53, 42 et 6 pour le groupe à bas risque (voir figure ci-dessous).



Pour effectuer cette analyse dans notre laboratoire, les échantillons suivants sont valides: frottis cervicaux résiduels en milieu de transport pour cytologie en phase liquide ainsi que biopsie fraîches ou fixées et incluses en paraffine. La demande d'analyse doit être effectuée à l'aide du bon N° 151 de l'Institut de Microbiologie qui peut être obtenu sur demande à notre laboratoire central (021-3144107). Les points clés tels que site anatomique, date de prélèvement et interprétation cytologique doivent accompagner la demande pour une prise en charge optimale. Veuillez noter que cette analyse n'est pas destinée au dépistage primaire du cancer du col utérin.

Pour toute information biomédicale vous pouvez vous adresser au Dr Roland Sahli, par courriel ([roland.sahli@chuv.ch](mailto:roland.sahli@chuv.ch)) ou par téléphone (021-3144082).

### References

1. Estrade, C., P. A. Menoud, D. Nardelli-Haeffliger, and R. Sahli. 2011. Validation of a low-cost HPV genotyping assay based on PGMV-PCR and reverse blotting hybridization with reusable membranes. Journal of clinical microbiology 49:3474-3481.
2. Unger, E. R., J. Dillner, and T. Zhou (ed.). 2009. HUMAN PAPILLOMAVIRUS LABORATORY MANUAL, 1 ed. WHO.
3. [http://www.chuv.ch/imul/imu\\_home/imu\\_collaborations/imu\\_collaborations\\_who\\_hpv.htm](http://www.chuv.ch/imul/imu_home/imu_collaborations/imu_collaborations_who_hpv.htm)

## PCR méningite : Faux négatif due à un polymorphisme, l'exemple de *Neisseria meningitidis*.

Katia Jaton et Gilbert Greub

La méningite bactérienne est une urgence vitale, motivant un traitement antibiotique empirique qui peut négativer les cultures de LCR. Par conséquent la détection de l'ADN de *Neisseria meningitidis* par PCR est largement utilisée lors de suspicion de méningite et notamment lorsque les cultures restent négatives.

Depuis 5 ans nous utilisons les amorces et la sonde décrite par Corless et al. (2) ciblant 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.

Dans ce contexte nous avons été interpellés par un isolat clinique de *N. meningitidis* du séro groupe B qui n'a pas été détecté par la PCR en temps réel ciblant le gène *ctrA*. Nous avons séquencé ce gène et montré que cette souche présentait un très haut polymorphisme au niveau du gène cible, et que notre PCR ne pouvait la détecter. De manière intéressante, à la même période, le groupe de Cavrini et al. (1) en Italie a montré le même phénomène mais pour une souche de *N. meningitidis* du séro groupe C.

Dans ce contexte, nous avons modifié notre PCR en ajoutant des primers et une sonde nouvellement développés ciblant cette souche particulière et tenant compte de ce polymorphisme. Nous avons testés toutes les souches de *N. meningitidis* à notre disposition (N=38) et également tous les LCR reçus entre janvier 2009 et juin 2010 provenant de patients avec suspicion de méningite mais culture négative. Aucune souche ni aucun LCR ne s'est révélé positif attestant la rareté de cette souche (4).

Cet exemple rappelle aux microbiologistes que les cibles de nos PCR peuvent être sujettes à des mutations ou délétions. Des phénomènes similaires ont d'ailleurs été observés pour d'autres agents dont *Chlamydia trachomatis* (7), *Streptococcus pneumoniae* (3,5,8), *Bordetella pertussis* (6).

### Références

1. Cavrini, F., G. Liguori, A. Andreoli, and V. Sambri. 2010. Multiple Nucleotide Substitutions in the *Neisseria meningitidis* Serogroup C *ctrA* Gene Cause False-Negative Detection by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* **48**:3016-3018.
2. Corless, C. E., M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, A. J. Fox, and E. B. Kaczmarski. 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.
3. El Aila, N. A., S. Emler, T. Kajjalainen, B. T. De, B. Saerens, E. Alkan, P. Deschaght, R. Verhelst, and M. Vanechoutte. 2010. The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays. *BMC Infect Dis* **10**:104.
4. Jaton, K., B. Ninet, J. Bille, and G. Greub. 2010. False-negative PCR result due to gene polymorphism: the example of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* **48**:4590-4591.
5. Jefferies, J., L. Nieminen, L. A. Kirkham, C. Johnston, A. Smith, and T. J. Mitchell. 2007. Identification of a secreted cholesterol-dependent cytolytic (mitilysin) from *Streptococcus mitis*. *J Bacteriol* **189**:627-632.
6. Riffelmann, M., C. H. Wirsing von Konig, V. Caro, and N. Guiso. 2005. Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol* **43**:4925-4929.
7. Ripa, T. and P. A. Nilsson. 2007. A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. *Sex Transm Dis* **34**:255-256.
8. Whatmore, A. M., A. Efstratiou, A. P. Pickerill, K. Broughton, G. Woodard, D. Sturgeon, R. George, and C. G. Dowson. 2000. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of "Atypical" pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect Immun* **68**:1374-1382.

## PCRs diagnostiques pour les *Chlamydia*

Gilbert Greub et Katia Jaton

Les *Chlamydia* sont des bactéries intracellulaires obligatoires qui par définition restent non-détectées lors de recherche par culture sur géloses. L'utilité de la sérologie reste limitée par des cross-réactions fréquentes inter-espèces et par la montée tardive des anticorps, ne permettant souvent pas un diagnostic en phase aiguë. Dans ce contexte, la PCR est l'approche diagnostique idéale pour les infections dues aux *Chlamydia*.

**Pour *Chlamydia trachomatis***, agent commun d'infections urogénitales à l'origine d'infertilité tubaire, de grossesses extra-utérines et de fausses couches (1, 2), nous proposons à Lausanne une PCR spécifique en temps réel, dont la sensibilité est de 10 copies environ (3). Cette PCR est effectuée en duplex avec *N. gonorrhoeae* (cf. paragraphe sur ce thème). La PCR *C. trachomatis* peut se faire, pour le diagnostic d'urétrites et cervicites, sur des frottis urétraux, cervicaux, vaginaux, ou sur l'urine de 1<sup>er</sup> jet, riche en cellules. Le prélèvement vaginal peut être effectué par la patiente elle-même ; cependant, si un médecin effectue le prélèvement, un frottis cervical devrait être préféré au vu de sa sensibilité accrue. Lors de rectite, la PCR se fait sur frottis rectal. En cas de positivité, un typage est effectué par PCR et séquençage (4), ce qui permet de différencier une rectite à *Chlamydia* d'un lymphogranulome vénérien (LGV) qui nécessite un traitement plus long. Rappelons ici que la prévalence de *C. trachomatis* lors de rectite chez des patients homosexuels ayant des relations anales réceptives s'élève en Suisse à 10.9 % (4).

Le coût de la PCR *C. trachomatis* est de 180.-

**Pour *Chlamydia pneumoniae***, nous proposons une PCR en temps réel TaqMan en duplex avec *Mycoplasma pneumoniae* (5, 6). La plupart des cas de *C. pneumoniae* documentés à Lausanne n'étaient pas suspectés par les cliniciens (6), ce qui justifie cette approche duelle. En effet, *C. pneumoniae* pourrait être parfois l'agent causal de toux chroniques sans fièvre ni pneumonie, faussement considérées comme des bronchites asthmatiformes (6). La PCR *C. pneumoniae* peut être effectuée sur des prélèvements provenant du tractus respiratoire inférieur (expectorations, aspirations bronchiques), même lorsqu'ils sont salivaires (forte quantité de cellules épithéliales). En l'absence de toux productive, un frottis nasopharyngé peut être effectué.

Le coût de la PCR duplex *Mycoplasma pneumoniae* + *Chlamydia pneumoniae* est de 180.-.

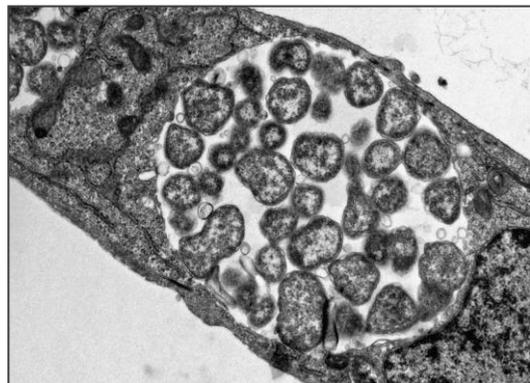
**Pour *Chlamydia psittaci***, agent de la psittacose, nous proposons à Lausanne une PCR pan-chlamydiales (7). Cette PCR permet de détecter n'importe quel membre de l'ordre des *Chlamydiales* et peut être effectuée sur divers types de prélèvements, y compris expectorations. En cas de positivité, un séquençage est effectué afin d'identifier l'espèce en cause.

Le coût de la PCR pour chlamydiales est de 180.-

### Références

1. Witkin SS. Testing for Chlamydia antibodies in recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*. 2000 Mar;**73**(3):656-7.
2. Baud D, Goy G, Jaton K, Osterheld MC, Blumer S, Borel N, Vial Y, Hohlfield P, Pospischil A, Greub G. Role of *Chlamydia trachomatis* in miscarriage. *Emerg Infect Dis*. 2011 Sep;**17**(9):1630-5.
3. Jaton K, Bille J, Greub G. A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs. *J Med Microbiol*. 2006 Dec;**55**(Pt 12):1667-74.
4. Dang T, Jaton-Ogay K, Flepp M, Kovari H, Evison JM, Fehr J, Schmid P, Boffi El Amari E, Cavassini M, Odorico M, Tarr PE, Greub G. High prevalence of anorectal chlamydial infection in HIV-infected men who have sex with men in Switzerland. *Clin Infect Dis*. 2009 Nov **15**;49(10):1532-5.
5. Welti M, Jaton K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003 Feb;**45**(2):85-95.
6. Senn L, Jaton K, Fitting JW, Greub G. Does respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae* still exist? *Clin Infect Dis*. 2011 Oct;**53**(8):847-8.
7. Lienard J, Croxatto A, Aeby S, Jaton K, Posfay-Barbe K, Gervais A, Greub G. Development of a new chlamydiales-specific real-time PCR and its application to respiratory clinical samples. *J Clin Microbiol*. 2011 Jul;**49**(7):2637-42.

**Figure :** *Chlamydia pneumoniae* visualisée par microscopie électronique à l'intérieur d'une cellule fibroblastique. Grossissement de 15000x.



## Formation post-graduée en microbiologie diagnostique

Dès le 11.10.2012 : formation mensuelle, chaque premier jeudi du mois, 12h00-13h00  
BH-08, Auditoire Mathias-Mayor (colloque Maladies infectieuses)

11.10.12	Notions de colonisation microbienne (flore physiologique, écologie microbienne)	Amalio Telenti
15.11.12	Approche diagnostique en microbiologie	Gilbert Greub
13.12.12	Diagnostic moléculaire	Katia Jatou
10.01.13	Sérologie	Pascal Meylan
14.02.13	Coccis Gram ⊕	Guy Prod'hom
28.03.13	Bacilles Gram ⊕	Guy Prod'hom
	Coccis Gram ⊖	Guy Prod'hom
	Bacilles Gram ⊖	Guy Prod'hom
	Anaérobies	Guy Prod'hom
	Bactéries intracellulaires	Gilbert Greub
	Mycobactéries	Katia Jatou
	Virus ARN	Amalio Telenti
	Virus ADN	Pascal Meylan
	Champignons filamenteux et levures	Philippe Hauser
	Protozoaires	Guy Prod'hom
	Vers (nématodes/cestodes et trématodes)	Guy Prod'hom
	Tests rapides (POCTs)	Gilbert Greub
	Résistance aux AB c/les bacilles Gram ⊖	Guy Prod'hom
	Résistance aux AB c/les bacilles Gram ⊕	Guy Prod'hom
	Epidémiologie moléculaire	Dominique Blanc
	Résistance en virologie	P.Meylan / A.Telenti
	Nouvelles technologies : génomique et métagénomique	Gilbert Greub

## Journée de formation continue en bactériologie

La prochaine journée de formation continue en bactériologie aura lieu le jeudi 3 octobre 2013 à l'auditoire César-Roux.

Les thèmes suivants seront abordés :

- le Staphylocoque doré
- le méningocoque
- les agents bactériens transmis par les tiques
- les tests rapides au lit du malade (POCTs)

