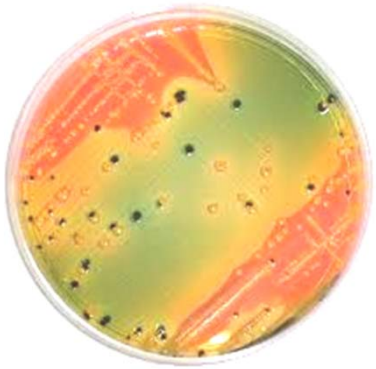
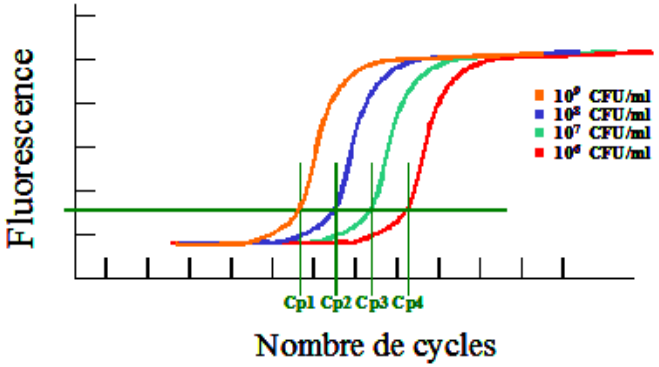
Diagnostic rapide des salmonelles, shigelles, *Campylobacter* dans les diarrhées, place de la biologie moléculaire, intérêts, avantages, inconvénients



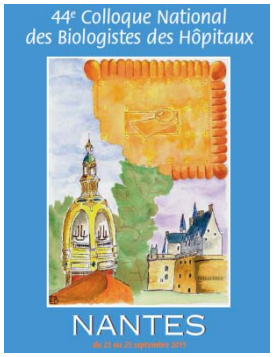


CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES

S.Gibaud
CHU de Nantes

ACNBH

ODPC N° 1495



44ème Colloque National
des Biologistes des Hôpitaux
Nantes, 23-25 septembre 2015

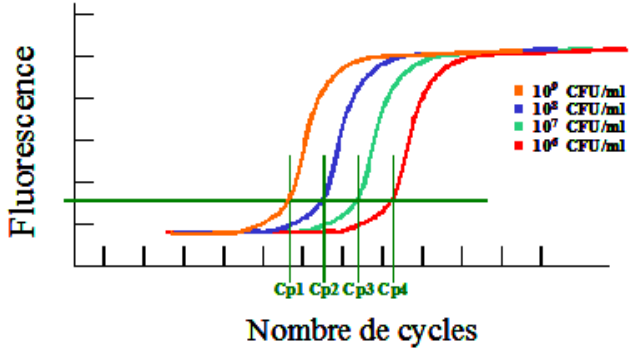
ODPC habilité à dispenser des programmes de DPC

DECLARATION D'INTERET
DANS LE CADRE DE MISSIONS DE FORMATION
REALISEES POUR L'ACNBH

Dr S. Gibaud
Exerçant au CHU de Nantes
déclare sur l'honneur

ne pas avoir d'intérêt, direct ou indirect (financier) avec les entreprises pharmaceutiques, du diagnostic ou d'édition de logiciels susceptible de modifier mon jugement ou mes propos, **concernant le DMDIV et/ou le sujet présenté**.

De la coproculture aux techniques moléculaires…



- Introduction sur les diarrhées bactériennes
- La coproculture
- Techniques moléculaires
- Kits commercialisés disponibles
- Tableau comparatif
- Evaluation du kit de BD sur le BD Max
- Revue bibliographique
- Discussion

Les diarrhées aigües bactériennes

Organisation mondiale de la santé

«La diarrhée aigue est une émission d'au moins 3 selles molles à liquides par jour depuis moins de 2 semaines, ou à une fréquence anormale pour l'individu»

eau

Les mains

aliments

voyages

Diarrhées aiguës

Toxines
(bactéries entérotoxinogènes)

Processus invasif
bactéries entéropathogènes
virus - parasites

Maladies inflammatoires

Médicaments

Les diarrhées aigües bactériennes

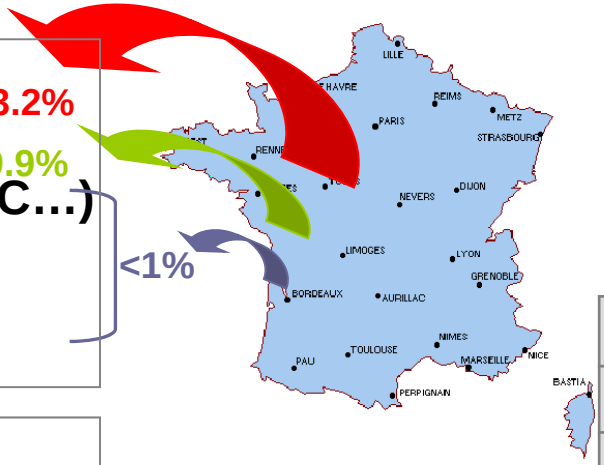
Diarrhées INVASIVES
Selles glairo-sanglantes
Germes entéropathogènes
Syndrome dysentérique

Diarrhées TOXINIQUES
Selles aqueuses
Germes entérotoxinogènes
Syndrome cholériforme

- ***Salmonella*** 13.2%
- ***Campylobacter*** 9.9%
- ***E. coli* (EIEC,EHEC…)**
- ***Shigella***
- ***Yersinia***

<1%

- ***C. difficile***



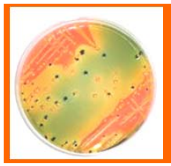
- ***Vibrio cholerae***
- ***E. coli* ETEC**
- ***S. aureus***

Sentinelles 2013

12 717 diarrhées déclarées
222 coprocultures prescrites
58% résultats transmis
67% négatifs

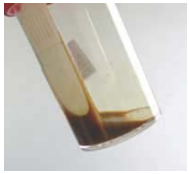
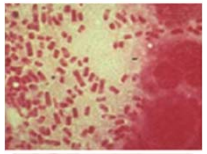
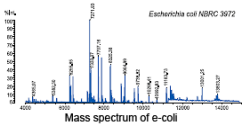
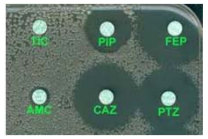
CHU de Nantes - Coprocultures			
	2013	**2014**	**2015**
Nb total de coprocultures	1027 **92% -**	1087 **90%-**	(775) **89%-**
***Salmonella* +**	**2.5%**	**3.0%**	***3.0%***
***Campylobacter* +**	**4.5%**	**6.0%**	***8.2%***
***Shigella*+**	**0.5%**	**0.5%**	***0.5%***
***Yersinia* +**	**<0.5%**	**<0.5%**	***0%***

Diarrhées aiguës : taux d'incidence annuel estimé à 7 305 cas/100 000 habitants



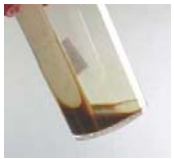
La coproculture

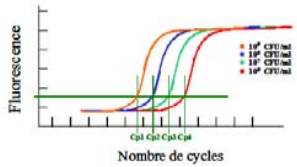
«La coproculture comprend la recherche de ***Samonella*** spp., ***Shigella*** spp., ***Campylobacter*** spp.,. La recherche de ***Yersinia*** spp. est recommandée chez l'enfant, l'adulte de moins de 20 ans et sur prescription spécifique chez l'adulte. Les autres pathogènes ne sont recherchés que dans certaines circonstances…» *S. Bonacorsi*

		Coproculture **négative**	Coproculture **positive**
	Examen macroscopique	☑	☑
	Examen microscopique	☑	☑
	Mise en culture (enrichissement)	☑	☑
	Identification typage	+/-	☑
	Antibiogramme		☑

PCR en temps réel

«…plusieurs kits de diagnostic par PCR multiplexée ont été développés…leur place dans la stratégie du diagnostic moléculaire reste à définir. » ***S. Bonacorsi***



		PCR
	Extraction ADN bactérien	☑
	**Amplification détection** séquences cibles spécifiques	☑

Systèmes entièrement automatisés

Un pathogène ciblé

?

Systèmes semi-automatiques ou manuels

Plusieurs pathogènes (panel)

Systèmes automatisés

Commercialisés

Sociétés	Automate-kits	Références	Pathogènes	Marquage	Descriptifs
BIOMÉRIEUX	**FilmArray**	FilmArray GI Panel	**22 pathogènes** (bactéries, virus, parasites)	CE **IVD**	**PCR temps réel** **automatisation totale** 6 tests - T.amb
BD	**BD Max**	Kit Enteric Bacterial Panel Assay	**5 pathogènes** *Salmonella* sp *Shigella* sp *Campylobacter coli/jejuni* *E.coli* à Shiga toxines *(Yersinia enterocolitica)*	CE **IVD**	**PCR temps réel** **automatisation totale** 24 tests - T. amb

En cours de développement

NOVODIAG MOBIDIAG		Gastrointestinal infections	**Panels Bactéries+virus**	**Fin 2016**	**PCR temps réel** **automatisation totale**
GenMark Dx	ePlex	Gastrointestinal Pathogen Panel (GI)	**Nombreux pathogènes** - bactéries - virus - parasites	**2016**	**PCR détection eSensor (électrochimie)** **automatisation totale**

Systèmes semi-automatisé ou manuels (1)

Commercialisés

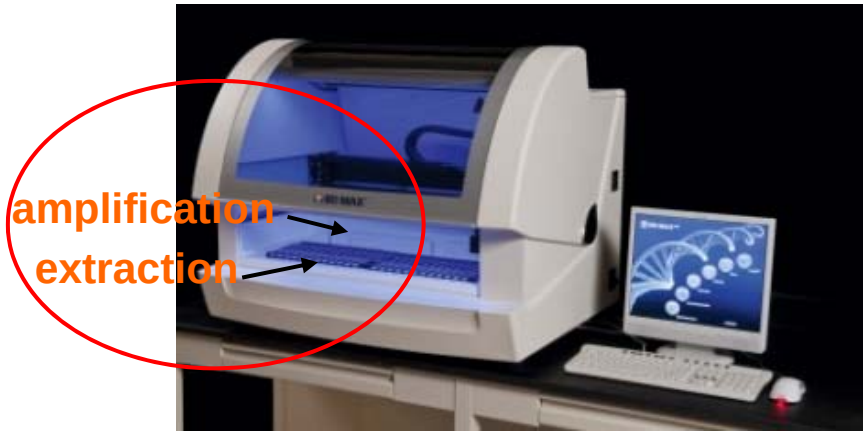
Sociétés	Automate-kits	Références	Pathogènes	Marquage	Descriptifs
fast-track DIAGNOSTICS TRUE POSITIVES. TRUE NEGATIVES. LAUNCH DIAGNOSTICS	 	Gastroenteritis panel : FTD-Bacterial gastroenteritis	**6 pathogènes**(2 multiplex) *Salmonella* sp *Shigella* sp *Campylobacter coli/jejuni* *Yersinia enterocolitica* VTEC *Clostridium difficile*	CE **IVD** *Validé pour de nombreux extracteurs et thermocycleurs*	**PCR temps réel** (mastermix optionnel) 32 réactions 64 réactions (-20° C)
Seegene eurobio AbCys		GI bactéries I GI bactéries II	**13 pathogènes(2 panels)** (*Aeromonas*, *Vibrio* sp, *E.coli* O157, …	CE **IVD** *easyMAG* *CFX96 (fluo)*	**PCR temps réel** 50 réactions (-20° C)
AMPLIDIAG MOBIDIAG		Bacterial GE	**9 pathogènes**(3 multiplex) *Salmonella* sp *Shigella*/EIEC *Campylobacter coli/jejuni* *Yersinia enterocolitica* EHEC,EPEC,EAEC,ETEC	CE **IVD** *Validé pour de nombreux extracteurs et thermocycleurs*	**PCR temps réel** Amplidiag analyser software
Sacace BIOTECHNOLOGIES ORGENTEC		Intestinal Infections triplex *(autres kits multiplex avec virus)*	**3 pathogènes** *Shigella* *Salmonella* *Campylobacter*	**IVD** CE *Validé pour de nombreux extracteurs et thermocycleurs*	**PCR temps réel** 50 tests
Theradiag INNOVATION FOR BIOTHERAPIES	 Luminex100/200	xTGA Gastrointestinal Pathogen Panel	**15 pathogènes** bactéries (9), virus (3) parasites (3)	CE **IVD**	**PCR technologie xMAP luminex** 96 tests

Systèmes semi-automatisé ou manuels (2)

Commercialisés

Sociétés	Automate-kits	Références	Pathogènes	Marquage	Descriptifs
r-biopharm		· Bacterial stool (3) · Panel EHEC/EPEC · STEC · EAEC ETEC/EIEC · E.coli stool panel (stx1, stx2,eae)	**5 pathogènes** *Salmonella* sp *Campylobacter* sp *Yersinia enterocolitica* *Shigella* spp EHEC,STEC,EPEC,EIEC,EAEC	CE **IVD** *Validés pour de nombreux extracteurs et thermocycleurs*	**PCR temps réel** 100 tests -20° C
 Liferiver™	19 kits simplex		**9 pathogènes (19 kits)** *Salmonella* sp *Shigella*/EIEC *Campylobacter coli/jejuni* *Yersinia enterocolitica* EHEC,EPEC,EAEC,ETEC	CE **IVD** *Validés pour de nombreux extracteurs et thermocycleurs*	**PCR temps réel** 25 tests -20° C
diagenode www.diagenodediagnostics.com	2 kits		· *Salmonella sp* *Campylobacter jejuni* · *Shigella sp*	CE **IVD** *Validés pour de nombreux extracteurs et thermocycleurs*	**PCR temps réel** 100 tests -20° C

Le BD Max™ System



▶ **Système entièrement automatisé**

▶ **Système ouvert** → **- Extracteur**
- Thermocycleur
- Kits BDMax
- Kits commercialisés
- Techniques « maison »

▶ **2 blocs d'extraction**
12 échantillons → **- 24 extractions** possibles simultanément

▶ **2 blocs chauffants**
12 mini-thermocycleurs → **- 24 PCR différentes** possibles simultanément

▶ **5 canaux de lecture** → - Multiplex à **5 cibles**

Evaluation au CHU de Nantes
kit *Enteric Bacterial Panel* sur le BD Max

Objectif : Évaluation du **kit Enteric Bacterial Panel Assay** de BD sur le BD Max™ à partir **85 échantillons de selles liquides** adressées pour une coproculture.

▶ **Les échantillons** : 1/4➞ selles positives en cultures, congelées à -80° C

▶ **Pathogènes ciblés par le kit :**

Bactéries recherchées	Cibles
Campylobacter jejuni et *coli*	**Gène *tuf*** (facteur d'élongation)
Salmonella sp	**Gène *spaO*** (surface presentation of antigens protein SpaO)
Shigella sp	**Gène *ipaH*** (invasion plasmid antigen)

Toxines recherchées	Cibles
STEC et *S. dysenteriae* (Shiga toxines)	**Gène *stx1a* et *stx2a*** (Shiga toxines)

kit *Enteric Bacterial Panel*

Contenu du kit

▶ 24 tests

Extraction →

- **Barrettes d'extraction**
- **Tubes d'extraction** (billes magnétiques, CI ADN de mouche)
- **Tubes échantillons et bouchons pré-perforés**

Amplification →

-**Tubes de Mastermix**
(tampon, nucléotides, Taq, sonde/primers du CI et sondes/primers des ADNs cibles)

(Réactifs déshydratés, Conservation du kit à T ambiante)

Non fournis dans le kit

Plaques pour amplification →

- **Boîtes de 24 plaques**
(commande séparée, conservation à T amb)

Les contrôles →

Suspensions de souches de référence
(à chaque nouveau lot seulement)

Protocole

1

Traitement des selles

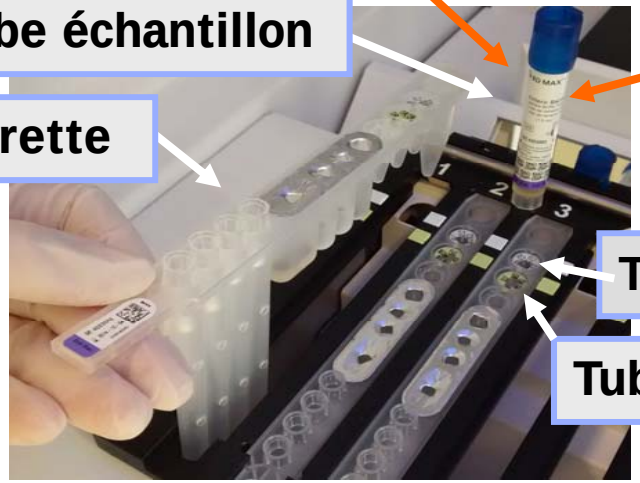
Prélèvement de **10 µL de selles** à l'aide d'une anse

Mise en suspension dans le tube échantillon du kit

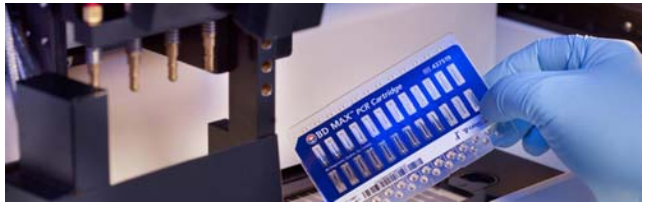
Préparations des souches bactériennes pour CQ

Mise en suspension dans un tube de NaCl 0.85% 3mL ➞ DO = 0.5

Prélèvement de **10 µL de suspension** à ajouter au tube échantillon du kit



2



Mise en place de la Plaque d'amplification

3

- **Saisie de la liste de travail**
- **Lancement du test**

Résultats (1)

Souches contrôle	Culture				BD Max				
	Campylo	**Salmonelle**	**Shigelle**	**Shiga toxine**	475/520 **Campylo** (Ct)	530/565 **Salmonelle** (Ct)	585/630 **Shigelle** (Ct)	630/665 **Shiga Tox** (Ct)	680/715 **CI extraction** (Ct)
ATCC Salmonelle		**Positif**		NR		**23.57**			27.58
ATCC Shigelle			**Positif**	NR			**21.11**		27.68
Campylo confirmée par CNR	**Positif**			NR	**22.21**				27.56
5	**Positif**	-	-	NR	**21.78**	-	-	-	27.68
6	-	**Positif**	-	NR	-	**20.52**	-	-	27.64
7	**Positif**	-	-	NR	**26.91**	-	-	-	29.62
8	-	**Positif**	-	NR	-	**31.67**	-	-	27.72
9	-	-	-	NR	-	-	-	-	28.71
10	-	-	**Positif**	NR	-	-	**19.46**	-	27.95
11	**Positif**	-	-	NR	**27.2**	-	-	-	27.93
12	-	-	**Positif**	NR	-	-	**17.53**	-	27.82

Résultats (2)

Etude rétrospective

20 selles
(congelées positives)

Salmonella		PCR +	PCR -
Culture	+	5	0
	-	0	0

Shigella		PCR +	PCR -
Culture	+	5	0
	-	0	0

Campylo		PCR +	PCR -
Culture	+	10	0
	-	0	0

Shiga toxines		PCR +	PCR -
Culture	+	0	0
	-	0	20

Concordances : 100%

Etude prospective

65 selles

Salmonella		PCR +	PCR -
Culture	+	3	0
	-	1	61

Discordances : 1/65 (1.5%)

Shigella		PCR +	PCR -
Culture	+	1	0
	-	1	63

Discordances : 1/65 (1.5%)

Campylo		PCR +	PCR -
Culture	+	5	0
	-	0	60

Discordances :0/65

Shiga toxines		PCR +	PCR -
Culture	+	0	0
	-	3	62

Discordances : 3/65 (4.5%)

➡ **51/65 selles négatives en culture et en PCR**

Discordances

Aspect	Culture				BD Max				
	Campylo	**Salmonelle**	**Shigelle**	**Shiga toxine**	475/520 **Campylo** (Ct)	530/565 **Salmonelle** (Ct)	585/630 **Shigelle** (Ct)	630/665 **Shiga Tox** (Ct)	680/715 **CI** (Ct)
pâteuse	-	-	-	NR	-	-	-	**34.42**	28.75
Liquide	-	-	-	NR	-	**39.44**	-	-	30.51
molle	-	-	-	NR	-	-	-	**31.60**	29.30
Liquide	-	-	-	NR	-	-	**19.19**	-	27.81

Sensibilité et spécificité

▶ Neil W. Anderson, Blake W. Buchan, Nathan A. Ledeboer. 2014. Comparison of the BD MAX Enteric Panel to routine culture methods for detection of *Campylobacter*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* (O157), *Salmonella*, and *Shigella* isolates in preserved stool specimens. **J Clin Microbiol. 52 : 4 : 1222-1224.**

Comparative sensitivity of culture to the BD MAX EBP assay :

Isolate type (from prepared stool samples)	Sensitivity (%) by organism concentration and measurement method									
	10^7 CFU/ml		10^6 CFU/ml		10^5 CFU/ml		10^4 CFU/ml		10^3 CFU/ml	
	BD MAX	Culture	BD MAX	Culture	BD MAX	Culture	BD MAX	Culture	BD MAX	Culture
Campylobacter	NA	NA	100	100	100	100	100	63.8	100	43.8
EHEC (O157)	100	100	100	75	100	75	87.5	12.5	13.3	0
Salmonella	100	100	100	100	100	81.3	68.8	31.3	43.8	0
Shigella	100	100	100	100	100	75	100	38	81	25

▶ Richard F. de Boer, Alewijn Ott, Barbara Kesztyüs, Anna M. D. Kooistra-Smid. 2010. Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach. **J Clin Microbiol. 48 : 11 : 4140-4146.**

▶ C. F. L. Amar, C. L. East, J. Gray, M. Iturriza-Gomara, E. A. Maclure, J. McLauchlin. 2007. Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4627 faecal samples : re-examination of the english case-contril infectious intestinal disease study (1993-1996). **Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 26 : 311-323.**

Revue bibliographique

2013

Journal of Clinical Microbiology

Clinical Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Identification of *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni* and *C. coli*), and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates in Stool Specimens

Blake W. Buchan,a,b Wendy J. Olson,a,b Michael Pezewski,b Mario J. Marcon,c Thomas Novicki,d Timothy S. Uphoff,d
Lakshmi Chandramohan,e Paula Revell,e Nathan A. Ledeboera,b
Medical College of Wisconsina and Dynacare Laboratories,b Milwaukee, Wisconsin, USA
Dec 2013 Volume 51 Number 12 Journal of Clinical Microbiology

2014

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

A parallel diagnostic accuracy study of three molecular panels for the detection of bacterial gastroenteritis

J. S. Biswas & A. Al-Ali & P. Rajput & D. Smith & S. D. Goldenberg
Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2014) 33:2075–2081

Multiplex Polymerase Chain Reaction Tests for Detection of Pathogens Associated with Gastroenteritis

Hongwei Zhang, Scott Morrison, Yi-Wei Tang
Clinics in Laboratory Medicine, Volume 35, Issue 2, Pages 461-486

2015

Journal of Clinical Microbiology

Multicenter Evaluation of the BD Max Enteric Bacterial Panel PCR Assay for Rapid Detection of *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. (*C. jejuni* and *C. coli*), and Shiga Toxin 1 and 2 Genes

S. M. Harrington,a B. W. Buchan,b C. Doern,c R. Fader,d M. J. Ferraro,e D. R. Pillai,f J. Rychert,e L. Doyle,a A. Lainesse,g T. Karchmer,h J. E. Mortenseni
Department of Laboratory Medicine, Cleveland
May 2015 Volume 53 Number 5 Journal of Clinical Microbiology

Avantages - Inconvénients

	Technique conventionnelle (Culture)	PCR sur BD MAX™
Délai de réponse	résultat en 48 à 72 hrs	résultat en **2 hrs**
Sensibilité	+	**+++**
Temps technique	environ 30 mn / selle	**5 mn** / échantillon
Accréditation	à valider	marqué CE IVD
Technique	Simple	Simple
Souche	Antibiogramme - typage	/
Coût / Cotation	1,40 € / B180 (code5207)	10 à 15 € / HN

Systèmes automatisés

Commercialisés

Sociétés	Automate-kits	Références	Pathogènes	Temps technicien par test	Temps réaction (amplificaton)	Coût test HT
BIOMÉRIEUX	**FilmArray**	FilmArray GI Panel	**22 pathogènes** (bactéries, virus, parasites)	2 mn	1 h	**140** €
BD	**BD Max**	Kit Enteric Bacterial Panel Assay	**5 pathogènes** *Salmonella* sp *Shigella* sp *Campylobacter coli/jejuni* E.coli à Shiga toxines *(Yersinia enterocolitica)*	5 mn	2h05 (4 éch) 2h40 (24 éch)	**10** € **15** €

En cours de développement

NOVODIAG MOBIDIAG		Gastrointestinal infection	**Panels Bactéries+virus**	2 nm	1h30	NC
GenMark Dx	**ePlex**		**Nombreux pathogènes** - bactéries - virus - parasites	2 mn	1h30	NC

Systèmes semi-automatisé ou manuels (1)

Commercialisés

Sociétés	Automate-kits	Références	Pathogènes	Temps technicien (hors extraction)	Temps réaction	Coût test HT
fast-track DIAGNOSTICS TRUE POSITIVES. TRUE NEGATIVES. LAUNCH DIAGNOSTICS		Gastroenteritis panel : FTD-Bacterial gastroenteritis	**6 pathogènes** Salmonella sp Shigella sp Campylobacter coli/jejuni Yersinia enterocolitica VTEC Clostridium difficile	30 mn	1h20	**17.50** €
Seegene eurobio AbCys		GI bactéries I GI bactéries II	**13 pathogènes(2 panels)** (*Aeromonas*, *Vibrio* sp, *E.coli* O157, …	30 mn	1h40	**30.00** €
AMPLIDIAG MOBIDIAG		Bacterial GE	**9 pathogènes** Salmonella sp Shigella/EIEC Campylobacter coli/jejuni Yersinia enterocolitica EHEC,EPEC,EAEC,ETEC	30 mn	1h10	**25.00** €
Sacace BIOTECHNOLOGIES **ORGENTEC**		Intestinal Infections triplex *(autres kits multiplex avec virus)*	**3 pathogènes** *Shigella* *Salmonella* *Campylobacter*	30 mn	1h30	**25.00** €
Theradiag INNOVATION FOR BIOTHERAPIES			**15 pathogènes** bactéries (9), virus (3) parasites (3)	30 mn	3h45	…….. €

Systèmes semi-automatisé ou manuels (2)

Commercialisés

Sociétés	Automate-kits	Références	Pathogènes	Temps technicien (hors extraction)	Temps réaction	Coût test HT
r-biopharm		· Bacterial stool (3) · Panel EHEC/EPEC · STEC · EAEC ETEC/EIEC · E.coli stool panel (stx1, stx2,eae)	**5 pathogènes** *Salmonella* sp *Campylobacter* sp *Yersinia enterocolitica* *Shigella* sp EHEC,STEC,EPEC,EIEC,EAEC	15 - 30 mn	< 2 h	< **20** €
 Liferiver™	19 kits simplex	**9 pathogènes** Salmonella sp Shigella/EIEC Campylobacter coli/jejuni Yersinia enterocolitica EHEC,EPEC,EAEC,ETEC	2h50 (extraction incluse)			NC
diagenode www.diagenodediagnostics.com	2 kits	① *Salmonella sp* *Campylobacter jejuni* ② *Shigella sp*	15 - 30 mn	**1 h 20**		① **6.04** € ② **4.93** €

De la coproculture aux techniques moléculaires…

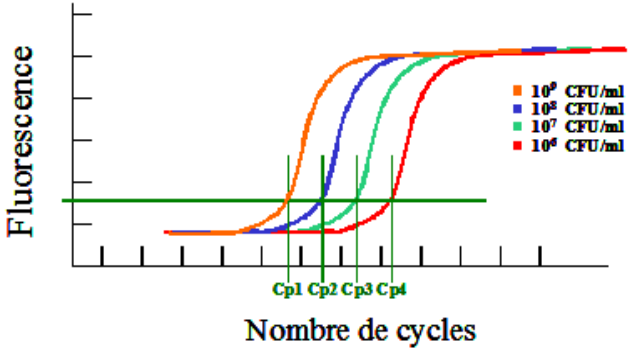
↗ Performances
↗ Rapidité
↗ Confort d'utilisation

↗↗ Coût / test

↗ Sensibilité : 10^3CFU/mL
↗ Pouvoir discriminant
↗ Nb pathogènes décelables

↘Tp. Technicien : 30 mn→ 5 mn
↘ Délai de réponse : 72 h→ 1-2 h

- Lecture code barre
- Connexion informatique
- logiciel d'interprétation



Techniques moléculaires : surcoût ?

↘ durée d'hospitalisation

↘ Temps technicien

↗ du coût

↘ Examens complémentaires

↘ médicaments

Rapidité
sensibilité

Développement de l'ambulatoire
Réduction du coût en personnel
Maîtrise des examens biologiques
Maîtrise des ATB et du risque d'émergence de résistances

- ▶ **Evaluations médico-économiques (Coût/bénéfice patient)**
- ▶ **Etudes d'impact (coût)**
- ▶ **Cotation (NABM) ????**

Evaluation du kit *Enteric Bacterial Panel* sur le BD Max CHU de Nantes

Démarche d'accréditation →

- Validation de méthodes
- Traçabilité

Politique de rationalisation et d'économie →

- Rationalisation des moyens
- Gain de temps technique

Amélioration de la prise en charge →

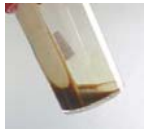
- Gestions des urgences
- Réponse rapide
- Automatisation
- ↗ sensibilité

Projet de mutualisation →

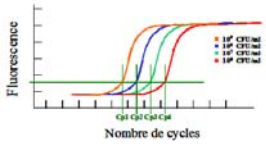
Unité de Diagnostic Moléculaire « Microbiologique »

Stratégie …

j1



PCR →



→ **PCR négative** → **Réponse validation**

90 %

PCR positive

↓

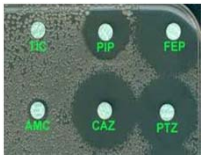
Culture

↓

→ **Réponse partielle**

j2

Identification Antibiogramme



↓

j3

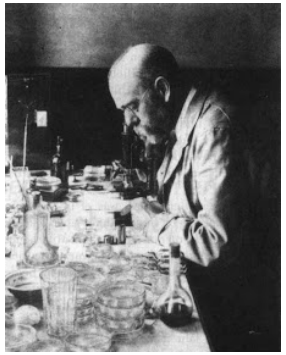
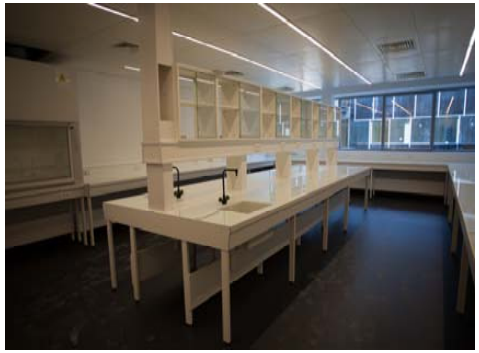
Résultat final → **Réponse validation**

Réorganisation →

- ▶ Étude de flux
- ▶ Optimisation des locaux
- ▶ Redistribution du personnel technique

Perspectives …

Clinical Microbiology in the Year 2025

W. Michael Dunne, Jr.,1* J. Keith Pinckard,1 and Lora V. Hooper2

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2002, p. 3889–3893 Vol. 40, No. 11