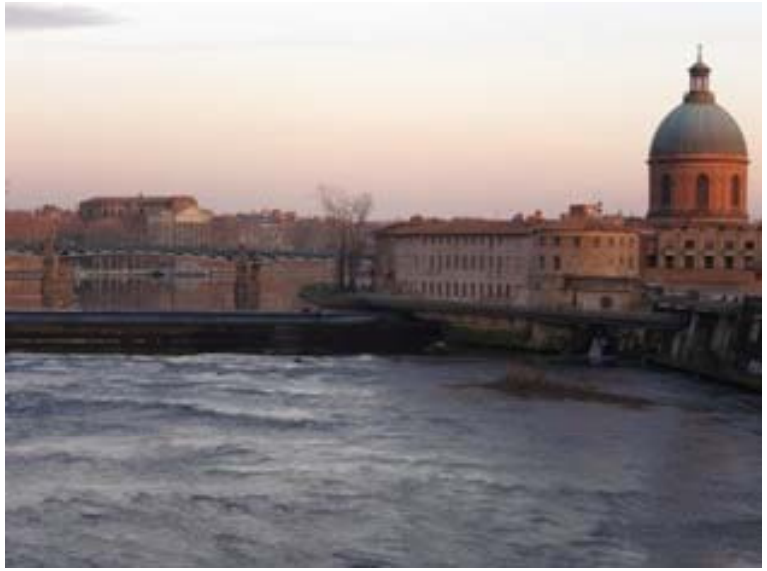
PLEX-ID, une nouvelle approche pour une identification microbienne rapide

Pr Jacques Izopet

Laboratoire de Virologie CHU de Toulouse

& INSERM U1043



Hôpitaux de Toulouse

Université de Toulouse

Inserm
Institut national de la santé et de la recherche médicale

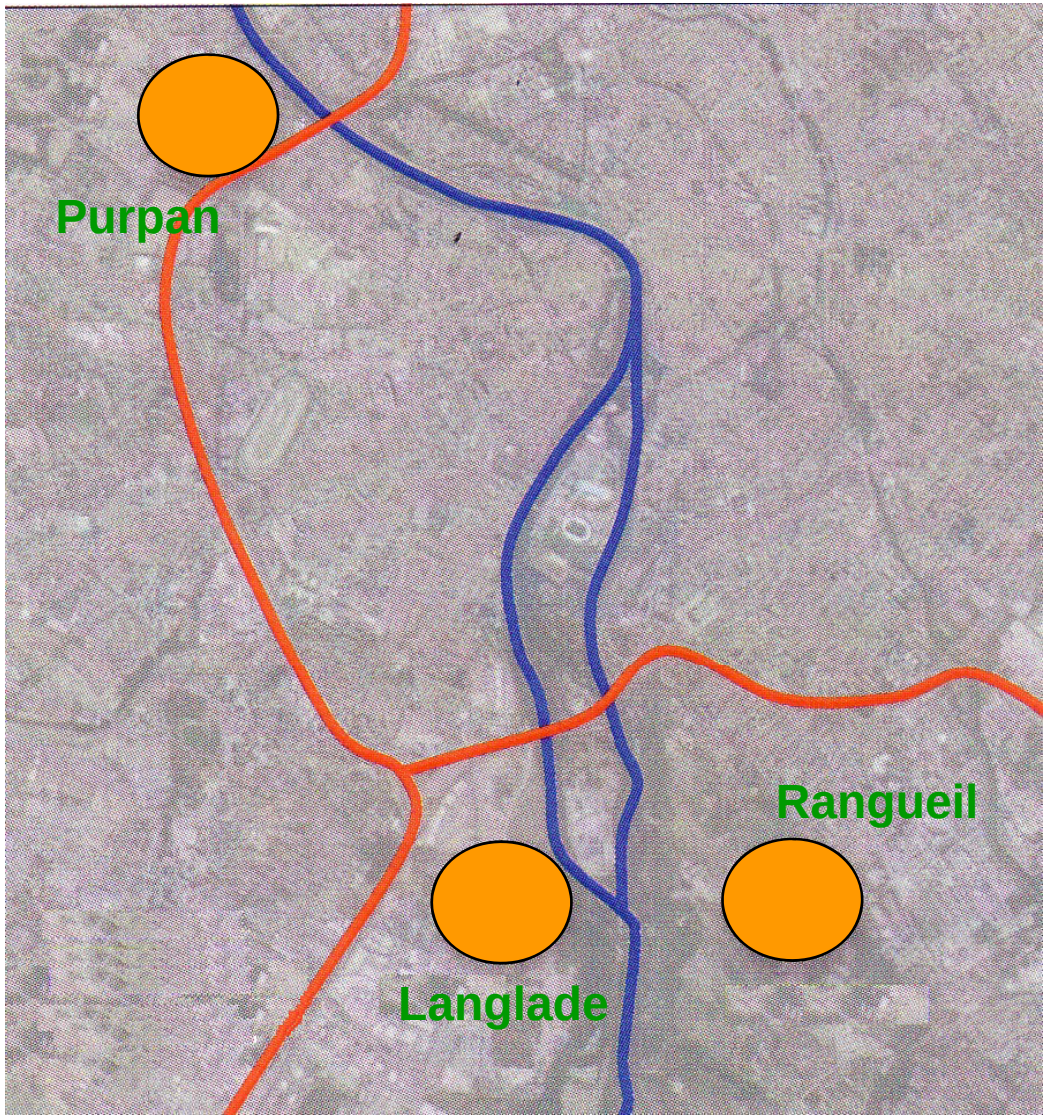
41ème Colloque National des Biologistes des Hôpitaux, Toulouse, 25/09/2012

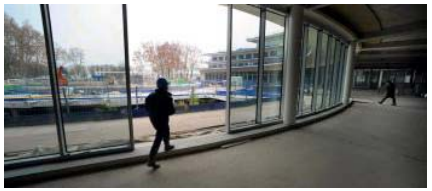
Avancées technologiques en Infectiologie

- ✓ **Evolution des stratégies diagnostiques**
  - **Approche syndromique**
  - **Personnalisation**
  - **Résultats attendus dans le temps du soin**
    - **plateaux techniques + logistique ↑**
    - **tests unitaires délocalisés**

- ✓ **Concepts de base**
  - **Miniaturisation**
  - **Automatisation**
  - **Parallélisation → multiplexage**

Pôle de biologie – CHU de Toulouse





Objectifs

- ✓ **Simplifier les organisations → Accréditation**
- ✓ **Mutualiser les équipements**
- ✓ **Réduire les coûts de production**
- ✓ **Favoriser l'innovation, la recherche et les activités pédagogiques**

Structuration en 5 plateaux techniques

Purpan	Rangueil	Langlade
PT Automatisé PT Spécialisé PT Infectiologie	PT Automatisé	PT Oncologie
CPTP	I2MC	CRCT
Centres de recherche INSERM/CNRS/INRA		

Le plateau technique d'infectiologie

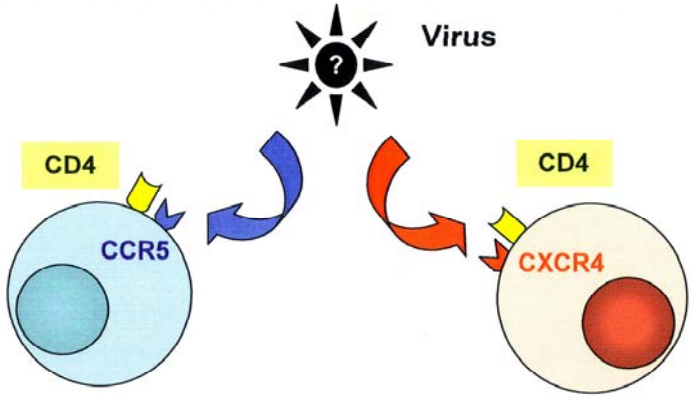
- ✓ **Regroupement de 3 services**
  - **Bactériologie-Hygiène**
  - **Virologie**
  - **Parasitologie-Mycologie**

- ✓ **3 plateformes**
  - **Sérologie**
  - **Biologie moléculaire**
  - **Morphologie & culture**

IFB - CHU de Toulouse

Innovations en infectiologie

Test de tropisme HIV : TTT 2007

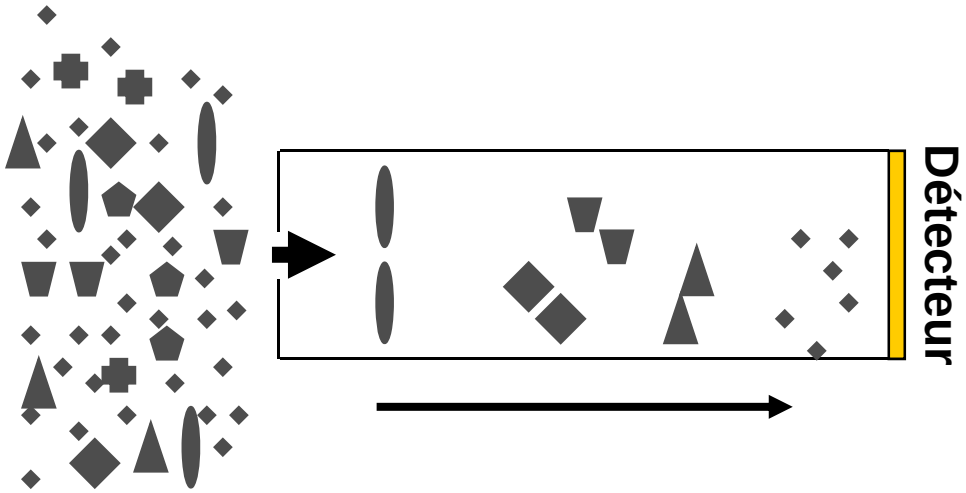


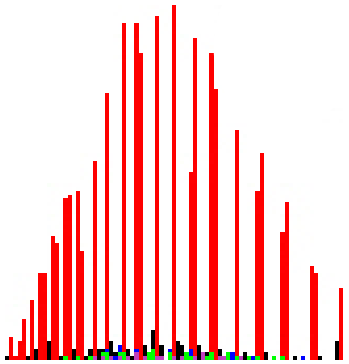
Séquençage haut débit 2010

Spectrométrie de masse 2011

Spectrométrie de masse

Détermination du poids des molécules





Echantillon ionisé

Temps de vol
Champ électrique

Analyse des données

Spectrométrie de masse en microbiologie

MALDI-TOF MS

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

Protéines

Identification de bactéries et champignons après isolement en culture

Acides nucléiques

Produits de clivages ARN obtenus après PCR et transcription

Identification par MLST Multi Locus Sequence Typing

PCR + ESI – TOF MS

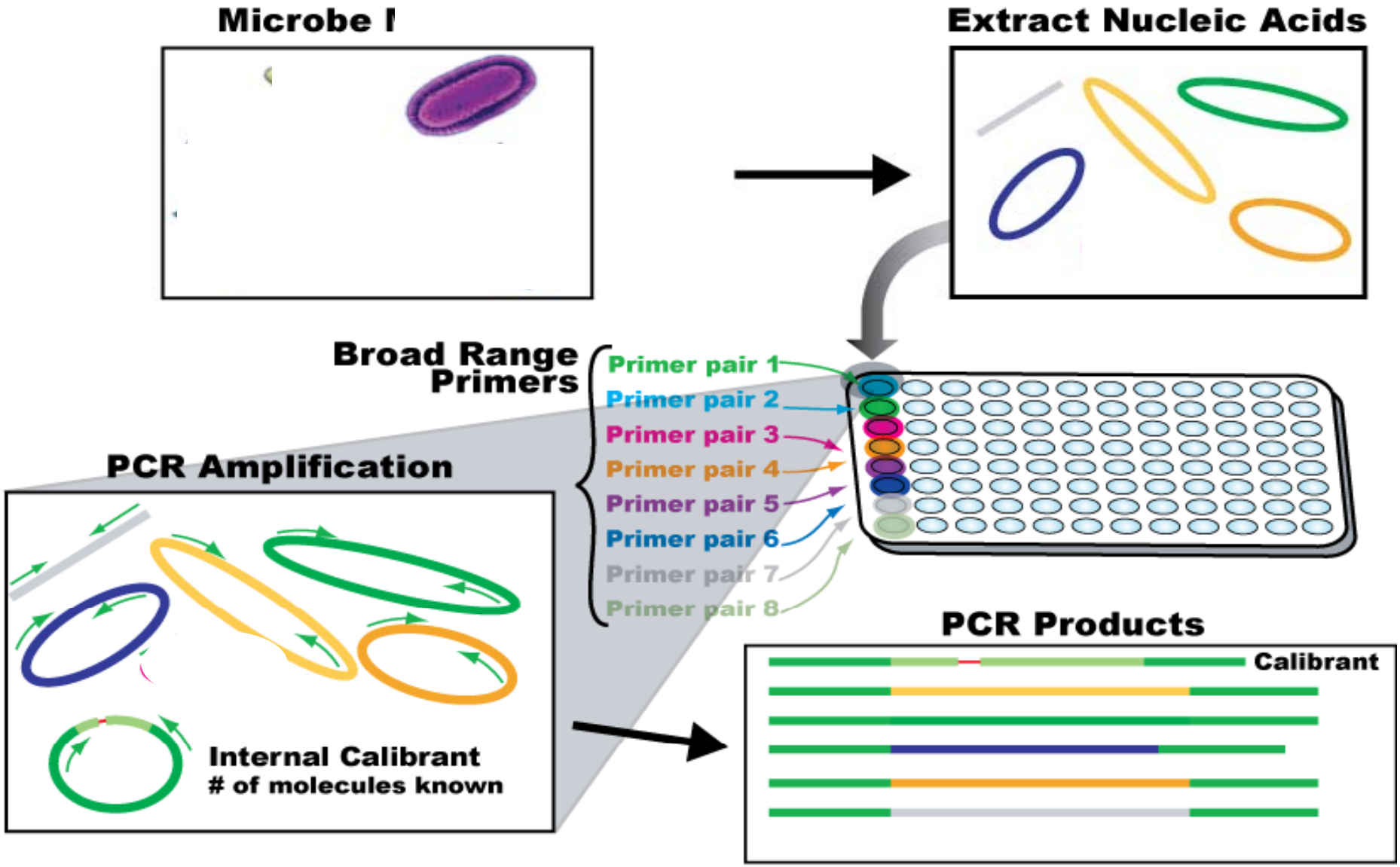
Electro Spray Ionization

Acides nucléiques

Amplicons ADN

Détection directe dans les échantillons biologiques et identification de bactéries, champignons et virus

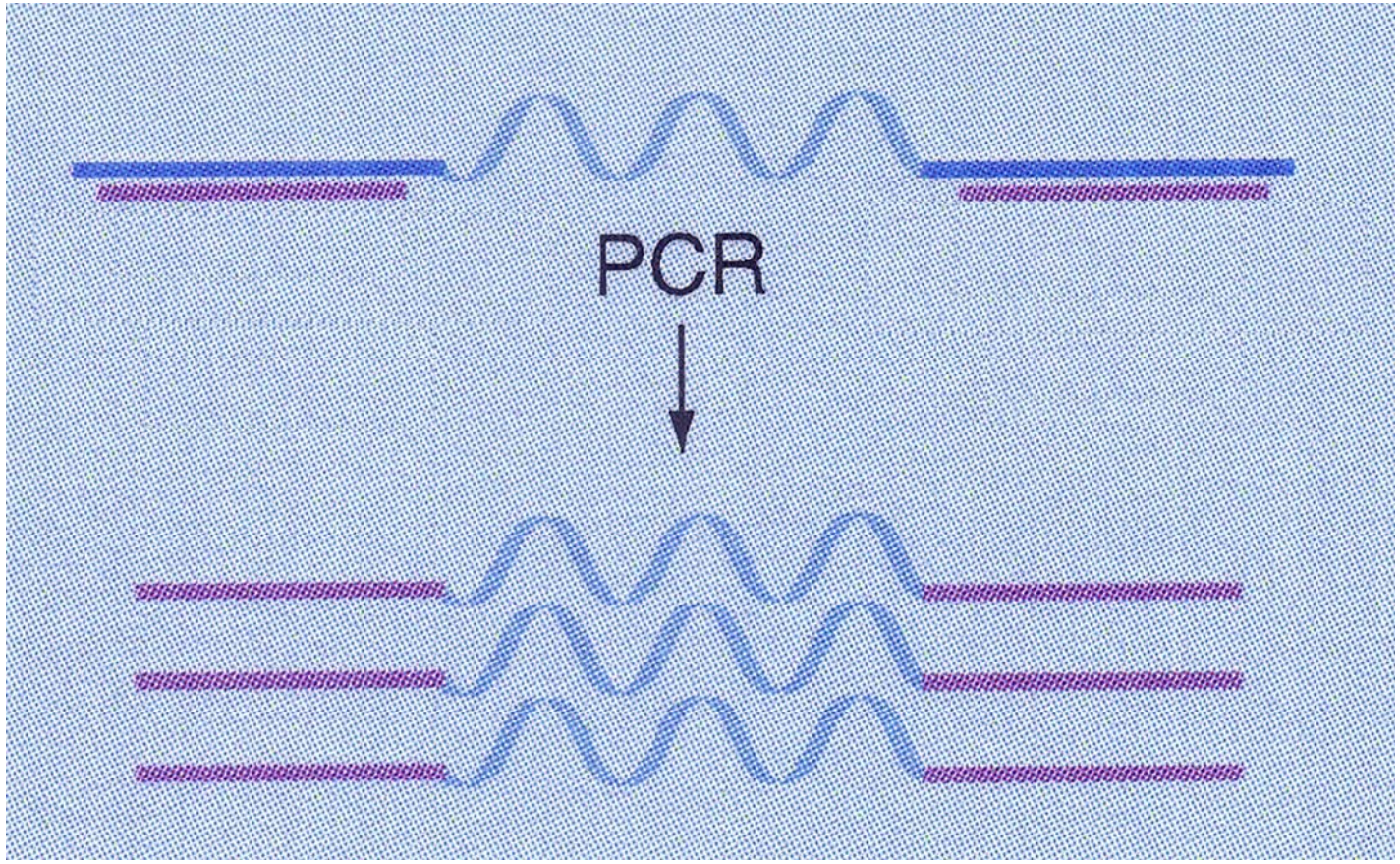
Processus PLEX-ID



PCR – ESI – TOF MS

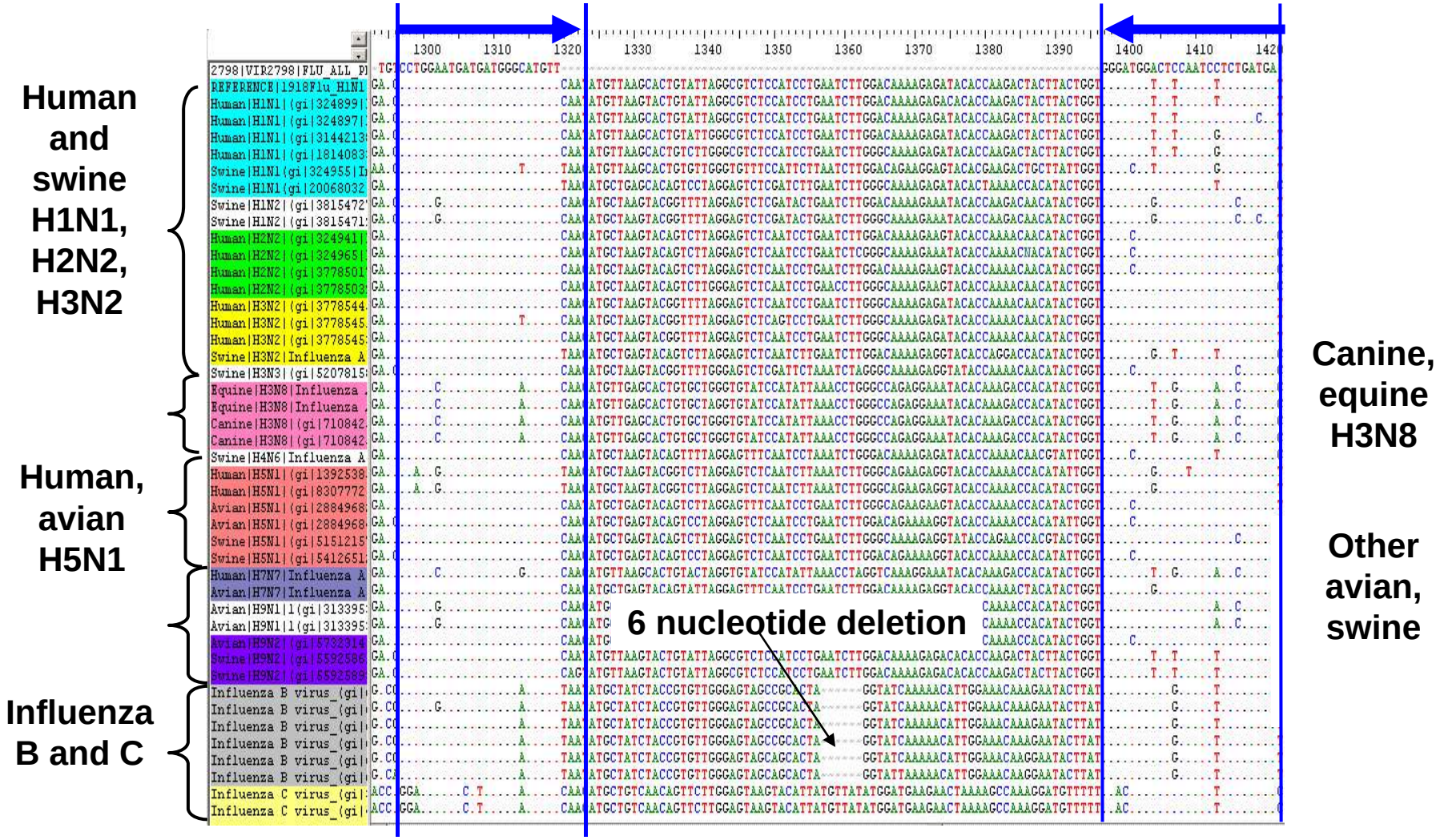
Etape 1

Amplification par PCR



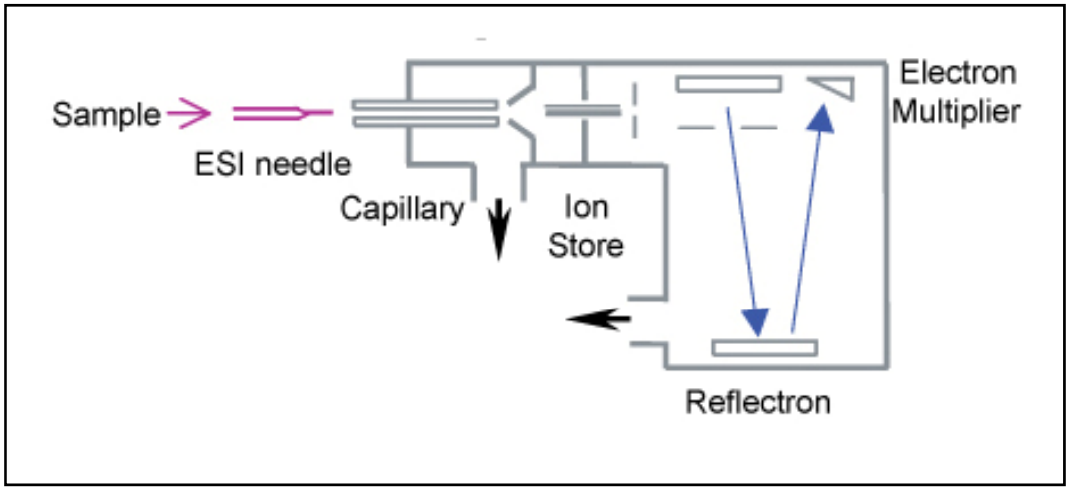
Amorces large spectre

Amorces influenza PB1

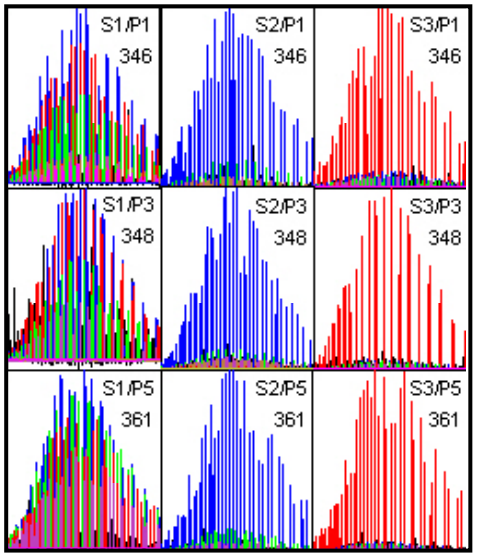


PCR – ESI – TOF MS

Etape 2



Etape 3



Mass detection

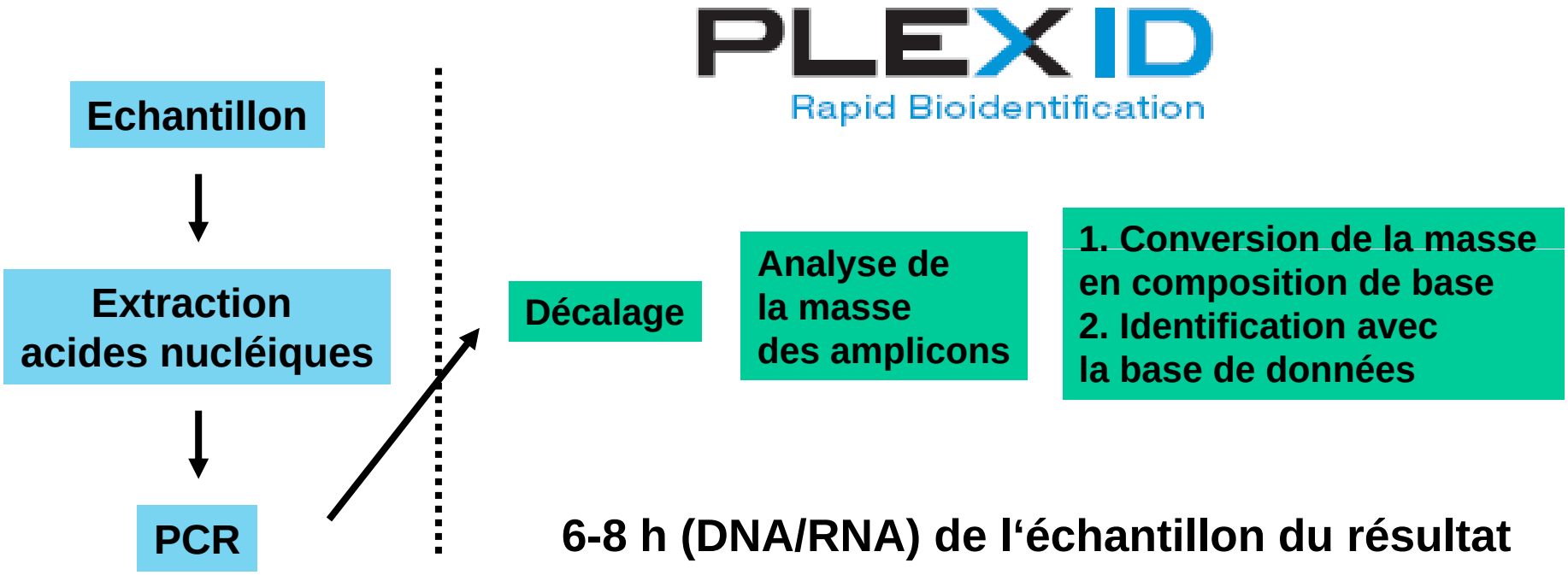
Signal processing
masses to base compositions

Etape 4

#	Mass	Base Count	Quantity
1	35875.03	$A_{25}G_{35}C_{30}T_{26}$	4260
2	35297.70	$A_{29}G_{33}C_{27}T_{25}$	1948
3	35619.87	$A_{26}G_{36}C_{29}T_{24}$	1555
4	36196.21	$A_{23}G_{37}C_{31}T_{26}$	1306
5	35297.70	$A_{29}G_{33}C_{27}T_{26}$	1949

Workflow

Echantillons :
Sang, LCR, sécrétions respiratoires, urine, biopsies tissulaires,...
Eau, aliments, échantillons de l'environnement

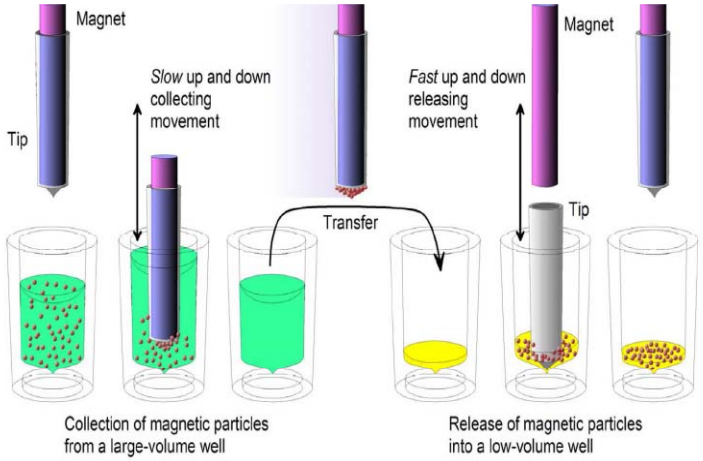


6-8 h (DNA/RNA) de l'échantillon du résultat

Extraction : PLEX-ID SP

Extraction automatisée fondée sur des billes magnétiques

1 heure / 96 échantillons



Pipetage : PLEX-ID FH

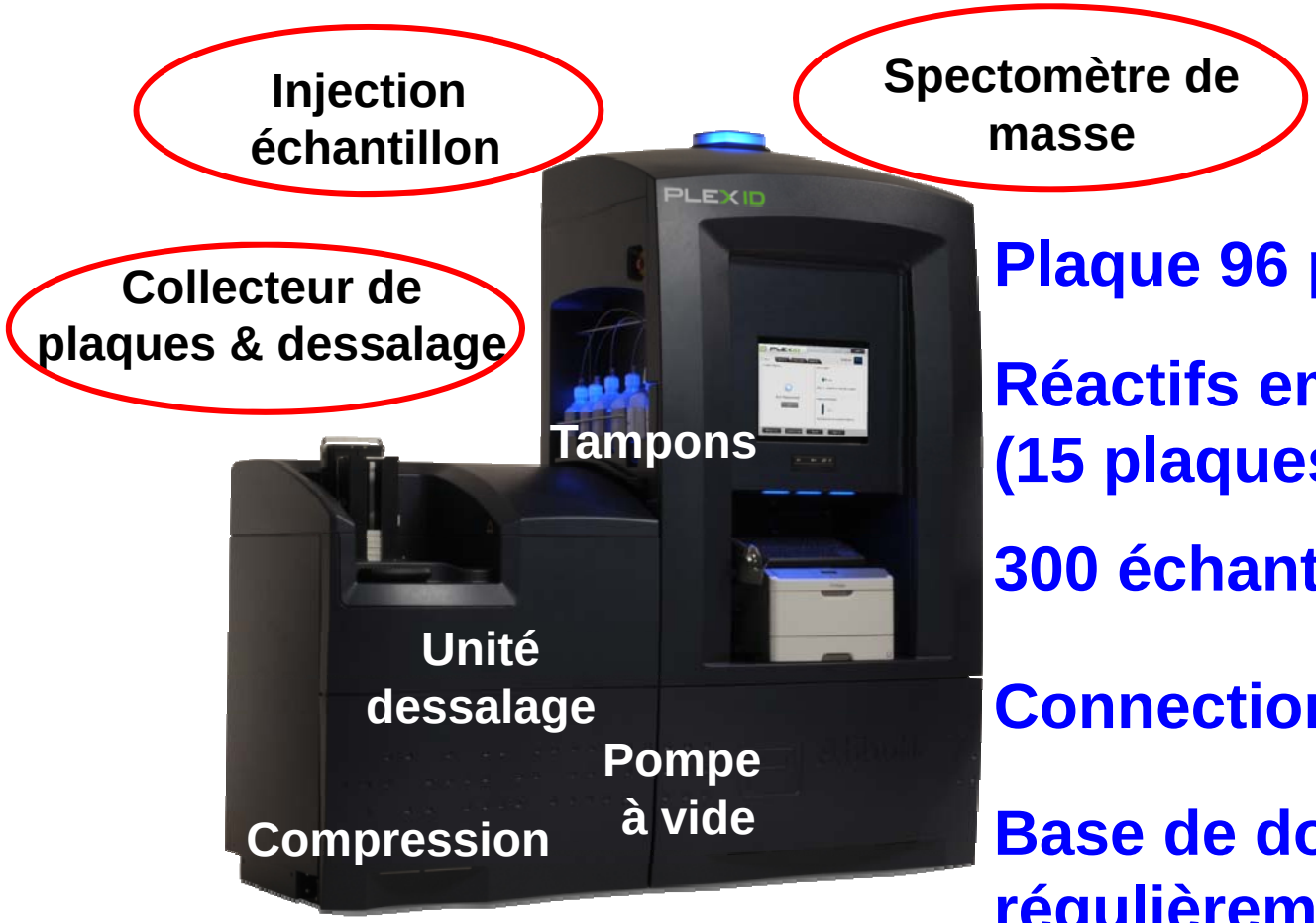
Automatisation :
échantillon et billes magnétiques
➔ plaques d'extraction

ARN extrait ➔ plaques PCR

Thermocycleurs : PLEX-ID TC

PCR dans des plaques
96 puits

Instrument PLEX-ID



Plaque 96 puits (48 min)

Réactifs embarqués (15 plaques en 12 h)

300 échantillons/jour

Connection Abbott Link

Base de données mise à jour régulièrement

Panels adaptés à une approche syndromique et/ou épidémiologique

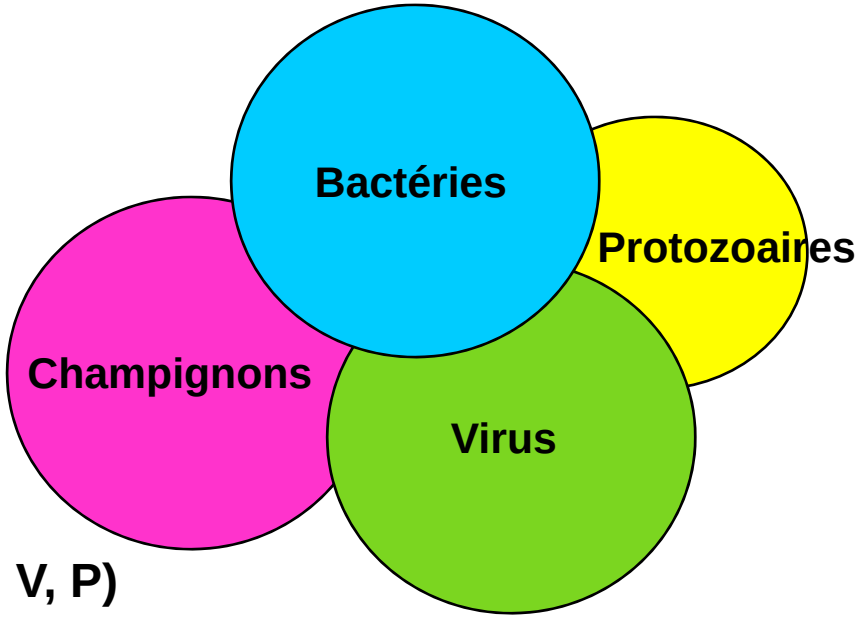
Infections respiratoires (B, V)

Infections entériques (B, V, P)

Infections de l'immunodéprimé (V)

Infections du système nerveux central (V)

Infections transmises par des vecteurs (B, V, P)



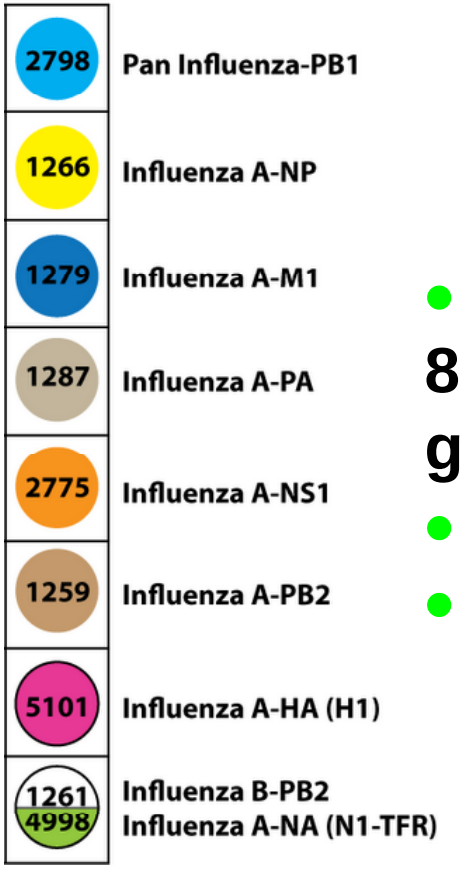
Génotypage
Facteur de virulence
Marqueurs de résistance

Système Plex-ID Flu

- ✓ **Détection Influenza A, B & C**
- ✓ **Identification du sous-type Influenza A**

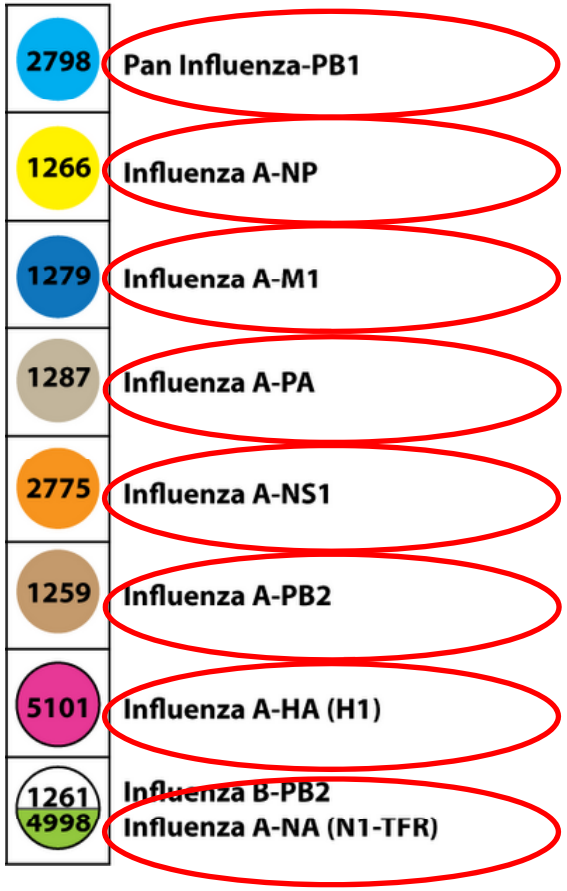
Système Plex-ID Flu

➔ **Détection Influenza A, B et C & génotypage Influenza A**



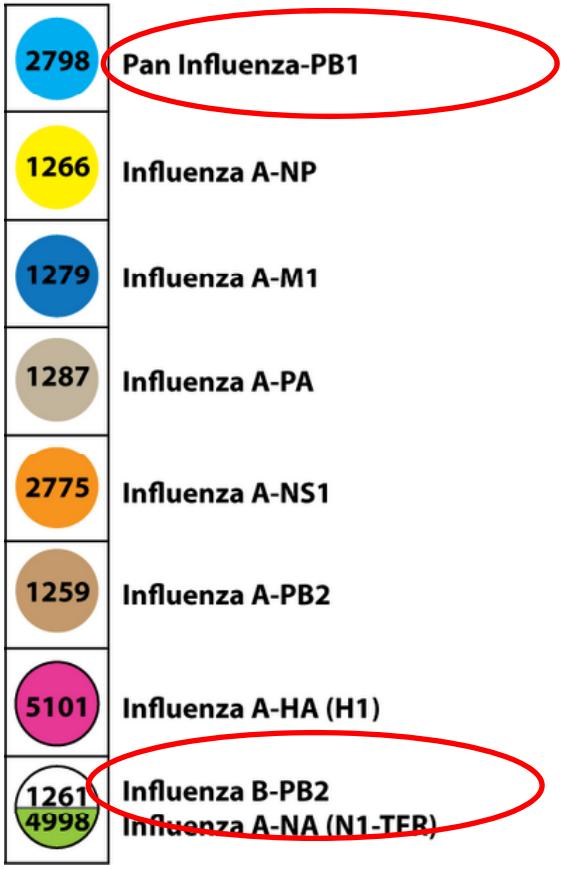
- **9 paires d'amorces réparties dans 8 puits couvrant tous les segments génomiques**
- **9800 souches dans la base de données**
- **détection des souches connues & inconnues**

Système Plex-ID Flu



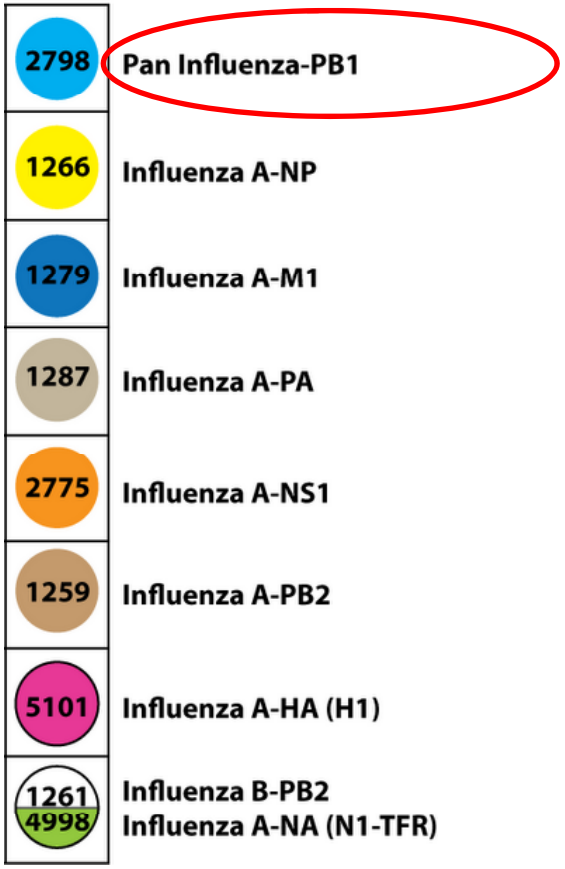
Influenza A

Système Plex-ID Flu



Influenza B

Système Plex-ID Flu



Influenza C

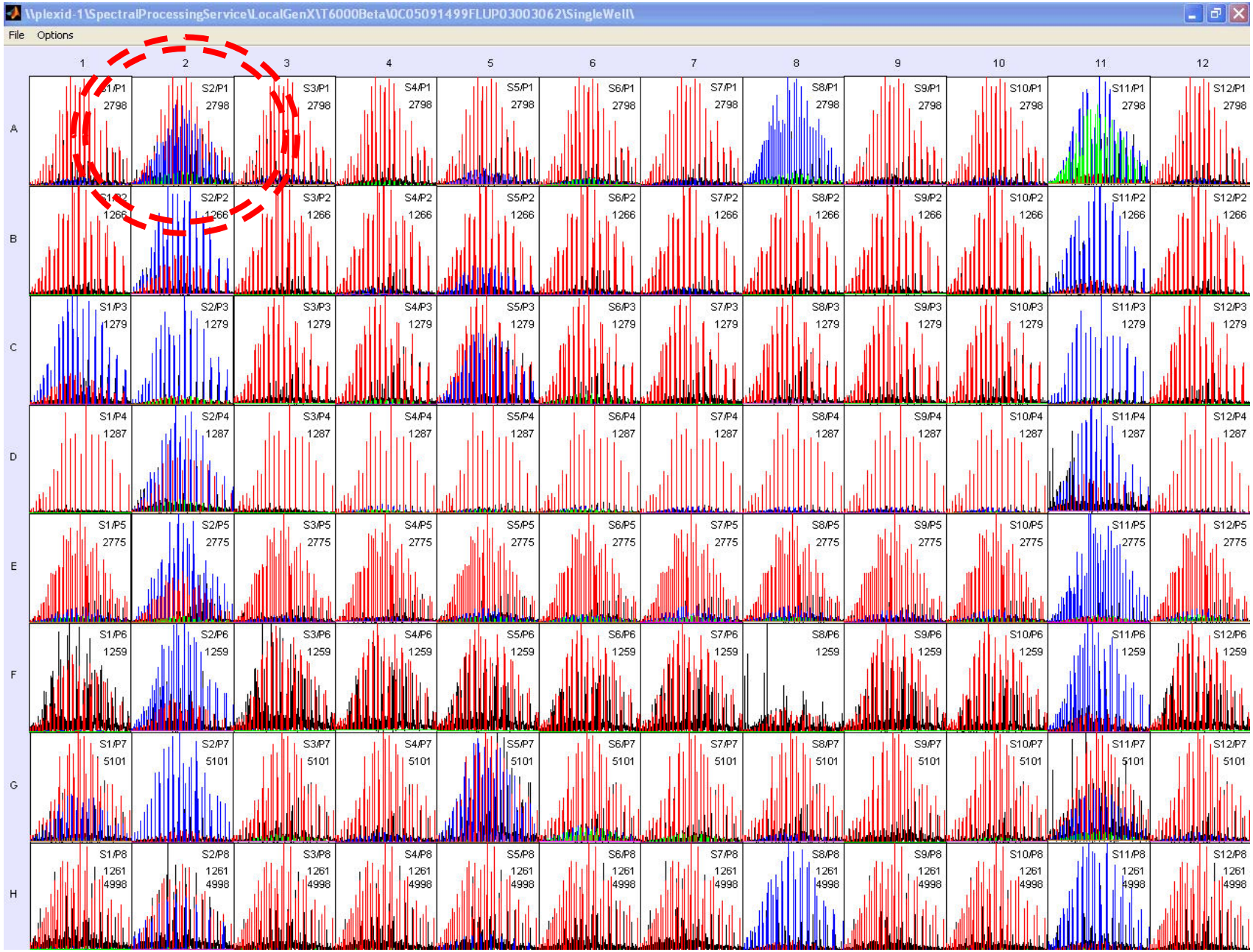
Etude comparative

- **Echantillons respiratoires collectés au cours de la saison hivernale**
- **Enfants / Adultes**
- **PLEX-ID Flu vs RespiFinder & PCR temps réel**

Respifinder & PCR temps réel

- **Respifinder® kit PathoFinder™:**
  PCR multiplex détectant et différenciant 15 virus dont Influenza A et B

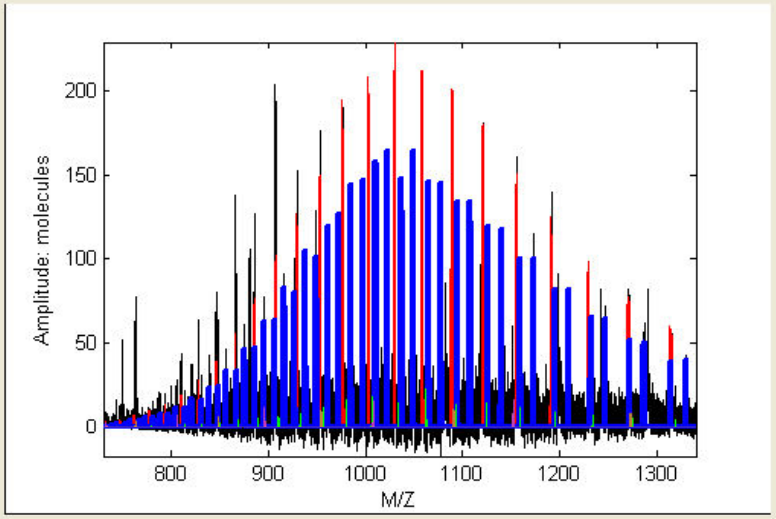
- **Influenza A/H1N1 Detection® kit Roche™:**
  PCR temps réel détectant Influenza A (M2) & H1N1 pdm 2009 (HA)

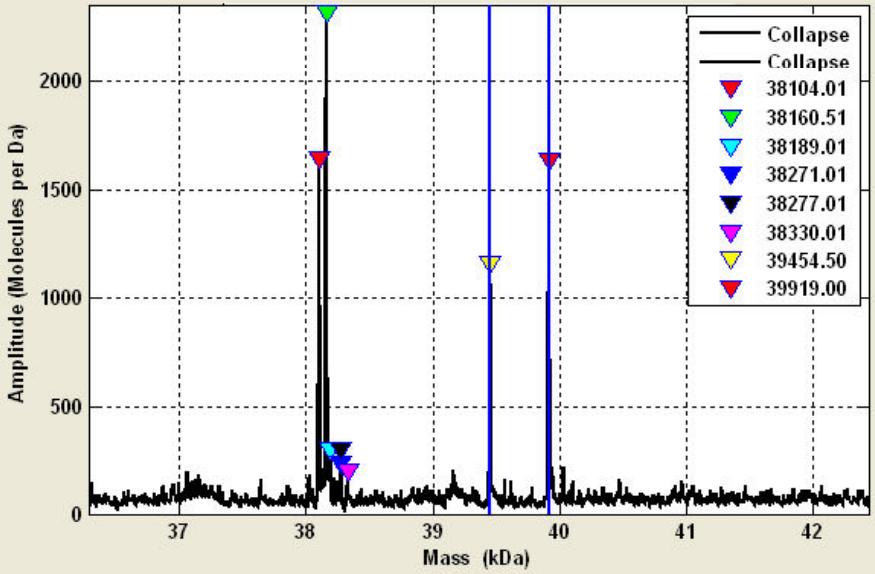

\\plexid-1\SpectralProcessingService\LocalGenX\T6000Beta\0C05091499FLUP03003062\SingleWell\
File
Options
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
A
B
C
D
E
F
G
H
S1/P1 2798
S2/P1 2798
S3/P1 2798
S4/P1 2798
S5/P1 2798
S6/P1 2798
S7/P1 2798
S8/P1 2798
S9/P1 2798
S10/P1 2798
S11/P1 2798
S12/P1 2798
S1/P2 1266
S2/P2 1266
S3/P2 1266
S4/P2 1266
S5/P2 1266
S6/P2 1266
S7/P2 1266
S8/P2 1266
S9/P2 1266
S10/P2 1266
S11/P2 1266
S12/P2 1266
S1/P3 1279
S2/P3 1279
S3/P3 1279
S4/P3 1279
S5/P3 1279
S6/P3 1279
S7/P3 1279
S8/P3 1279
S9/P3 1279
S10/P3 1279
S11/P3 1279
S12/P3 1279
S1/P4 1287
S2/P4 1287
S3/P4 1287
S4/P4 1287
S5/P4 1287
S6/P4 1287
S7/P4 1287
S8/P4 1287
S9/P4 1287
S10/P4 1287
S11/P4 1287
S12/P4 1287
S1/P5 2775
S2/P5 2775
S3/P5 2775
S4/P5 2775
S5/P5 2775
S6/P5 2775
S7/P5 2775
S8/P5 2775
S9/P5 2775
S10/P5 2775
S11/P5 2775
S12/P5 2775
S1/P6 1259
S2/P6 1259
S3/P6 1259
S4/P6 1259
S5/P6 1259
S6/P6 1259
S7/P6 1259
S8/P6 1259
S9/P6 1259
S10/P6 1259
S11/P6 1259
S12/P6 1259
S1/P7 5101
S2/P7 5101
S3/P7 5101
S4/P7 5101
S5/P7 5101
S6/P7 5101
S7/P7 5101
S8/P7 5101
S9/P7 5101
S10/P7 5101
S11/P7 5101
S12/P7 5101
S1/P8 1261 4998
S2/P8 1261 4998
S3/P8 1261 4998
S4/P8 1261 4998
S5/P8 1261 4998
S6/P8 1261 4998
S7/P8 1261 4998
S8/P8 1261 4998
S9/P8 1261 4998
S10/P8 1261 4998
S11/P8 1261 4998
S12/P8 1261 4998

spectrumDetails: RequestID R837, Plate 0C05091499FLUP03003062, Well 2, Sample 2

File UserGuide Tools

Sample:2, Plate 0C05091499FLUP03003062, Well: 02
Primer:2798 (2798), Coverage = unknown





BaseCount	Amp	Masses		LLHR	Organism
[36A 28G 27C 32T]	29492.0	38160.62	38104.25	58.4	CALIBRANT_FLU5102CAL(CALIBRANT_FLU5102CA
[38A 33G 24C 33T]	21231.0	39918.99	39454.58	54.3	Influenza A virus(A/AMERICAN WIGEON/CALI
[14A 42G 39C 28T]	2025.0	38270.32	38276.44	33.4	unknown
[5A 9G 3C 9T]	1545.0	8072.22		63.8	Primer()
[6A 6G 7C 6T]	975.0	7641.96		59.8	Primer()

Système Plex-ID Flu vs RespiFinder

		RESPIFINDER			
		Flu A	Flu B	Négatif	Total
PLEX-ID	Flu A	65	0	5**	70
	Flu B	0	18	2	20
	Négatif	10	2	188	200
	Echec*	0	0	3	3
	Total	75	20	198	293

* : échec > 2 points pour 1 échantillon

** : 3 H1N1 2009 / 1 H1N1 seasonal / 1 H3N2

Système Plex-ID Flu vs RespiFinder

		RESPIFINDER			
		Flu A	Flu B	Négatif	Total
PLEX-ID	Flu A	65	0	5	70
	Flu B	0	18	2	20
	Négatif	10	2	188	200
	Echec*	0	0	3	3
	Total	75	20	198	293

Concordance = 93,8 %
Sensibilité = 87,4 %

Plex-ID Flu vs Influenza A/H1N1

		PCR temps réel		
		A H1/pdm2009	A non H1	Total
PLEX-ID	A H1/pdm2009	55	0	55
	A H3	0	6	6
	Négatif	1	2	3
	Echec	0	0	0
	Total	56	8	64

Plex-ID Flu vs Influenza A/H1N1

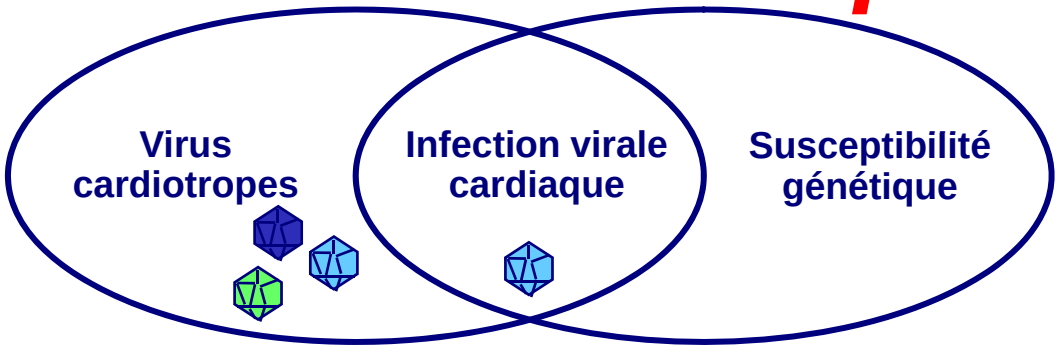
		PCR temps réel		
		A H1/pdm2009	A non H1	Total
PLEX-ID	A H1/pdm2009	55	0	55
	A H3	0	6	6
	Négatif	1	2	3
	Echec	0	0	0
	Total	56	8	64

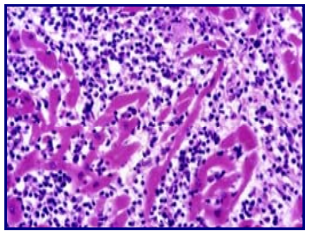
Sensibilité = 95,3 %

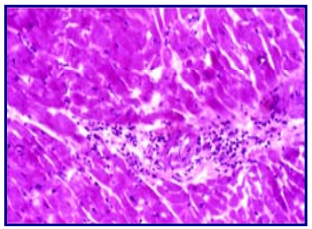
Développements attendus

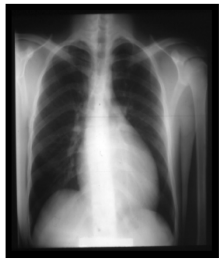
- ✓ **Analyse de la résistance avec des amorces adaptées ciblant NA**
- ✓ **Enrichissement de la base de données**

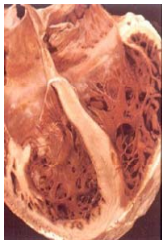
Infection virale cardiaque humaine et résultats cliniques











Myocardite aiguë
5-10/Million/an → Guérison clinique

↓ 10-20%

Myocardite chronique

↓ 9%

Cardiomyopathie dilatée
prevalence: 7 /100 000 → 20% → Mort subite

↓ 80%

Transplantation cardiaque

12-42% → Mort subite

Andreoletti et al. ACDV 2009

Causes virales de cardiomyopathies dilatées

Human cardiotropic viruses	Active myocarditis (%)	Dilated cardiomyopathy (%)
Coxsackie virus type B	14–32.6	8–35
Parvovirus B19	< 1–36.6	51.4
Human herpesvirus 6	10.5	21.6
Adenovirus	8.1–23	1.6–12
Multiple infections (60% of cases = parvovirus B19 + human herpesvirus 6)	12.2	27
Rare viral causes (non-restrictive list)[a]		
Cytomegalovirus[a]	3	0.8
Epstein-Barr virus[a]	< 1	2
Herpes simplex virus[a]	< 1	NA
Influenza viruses	< 1–2	NA

NA: not available.
[a] Except in cases of cardiac transplantation.

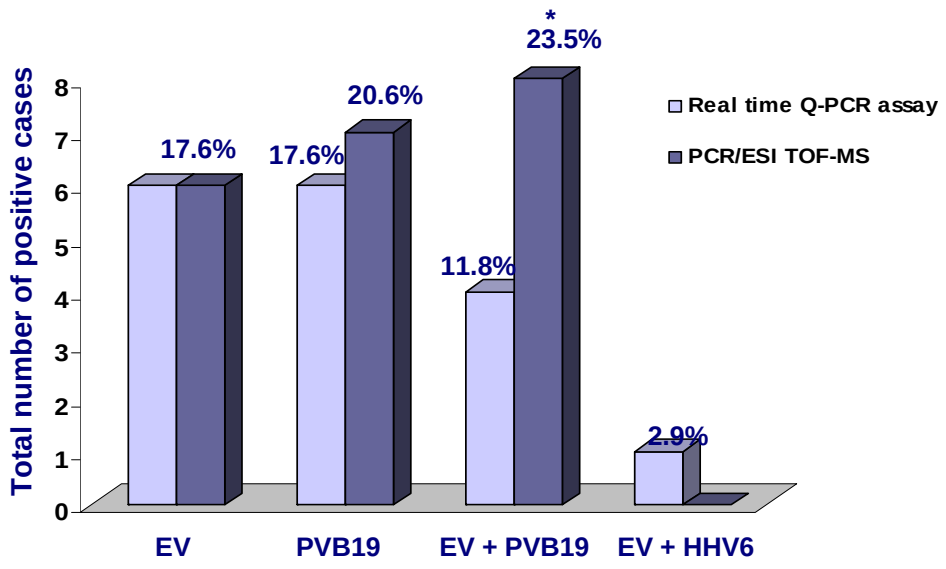
→ **Différents virus pourraient jouer un rôle dans la pathogénèse des cardiomyopathies dilatées**

Kuhl et al. Circulation 2005

Andreoletti et al. ACDV 2009

Détection virale dans le tissu cardiaque PLEX-ID vs RT PCR

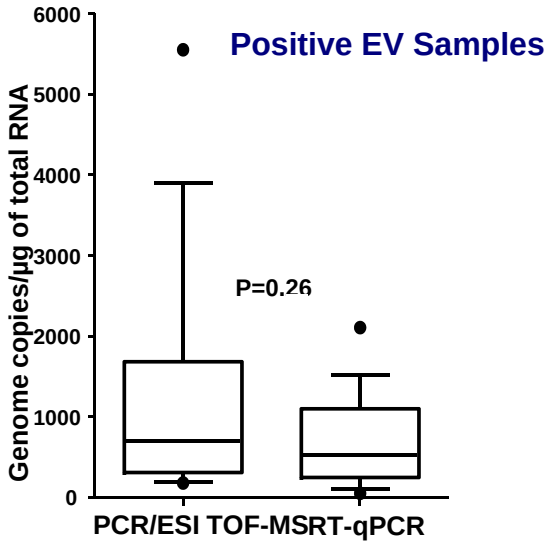
Enterovirus	RT-qPCR +	RT-qPCR -
PCR/ESI TOF-MS +	12	4
PCR/ESI TOF-MS -	4	48
PVB19		
PCR/ESI TOF-MS +	13	8
PCR/ESI TOF-MS -	2	45
HHV6		
PCR/ESI TOF-MS +	0	0
PCR/ESI TOF-MS -	2	66



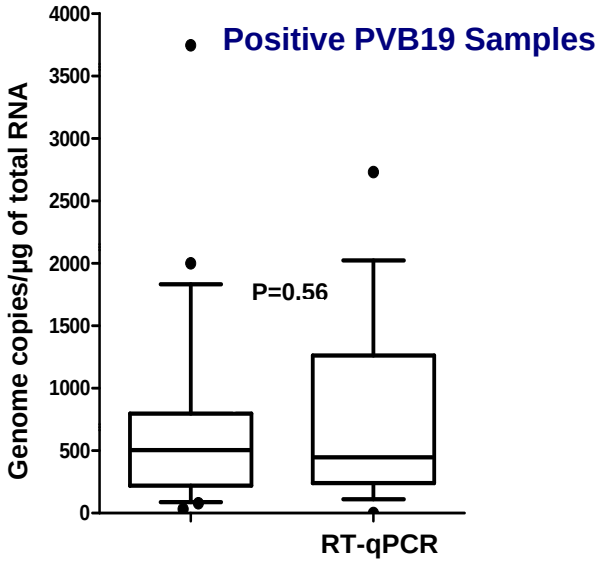
EV, PVB19 and EV+PVB19 semblent être les principales infections virales impliquées dans le développement de cardiomyopathies dilatées chez l'adulte

Andreoletti ECCMID 12

Charges virales dans le tissu cardiaque PLEX-ID vs RT PCR



EV positive samples by PCR/ESI-TOF MS and RT-qPCR



PVB19 positive samples by PCR/ESI-TOF MS and RT-qPCR

Andreoletti ECCMID 12

Viral IC : Virus de l'immunodéprimé

Adenovirus Human Adenovirus* (2-54, A-F)

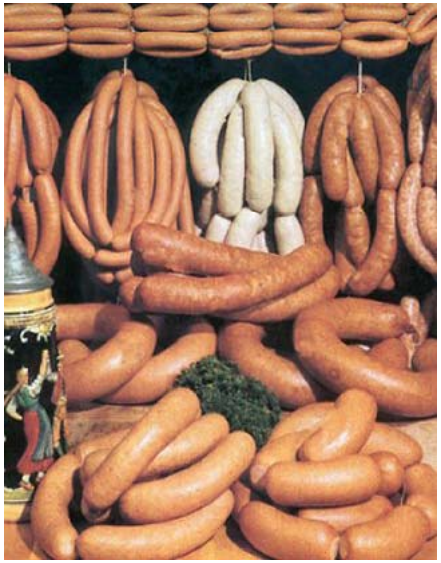
Enterovirus* Human Coxsackievirus
Human Echovirus
Human Enterovirus
Human Rhinovirus

Parvovirus Human Erythrovirus V9
Human Erythrovirus VX
Human Parvovirus B19*

Herpesvirus Cytomegalovirus (CMV, HHV-5*)
Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV-4*)
Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1, HHV-1*)
Herpes-Simplex-Virus-2 (HSV-2, HHV-2*)
Varicella-Zoster-Virus (VZV, HHV-3*)
Kaposi-Sarcoma-Associated-Herpesvirus (KSHV, HHV-8*)
HHV-6 A et B

Polyomavirus BK-Virus*
JC-Virus*

HEV : alimentation & environnement

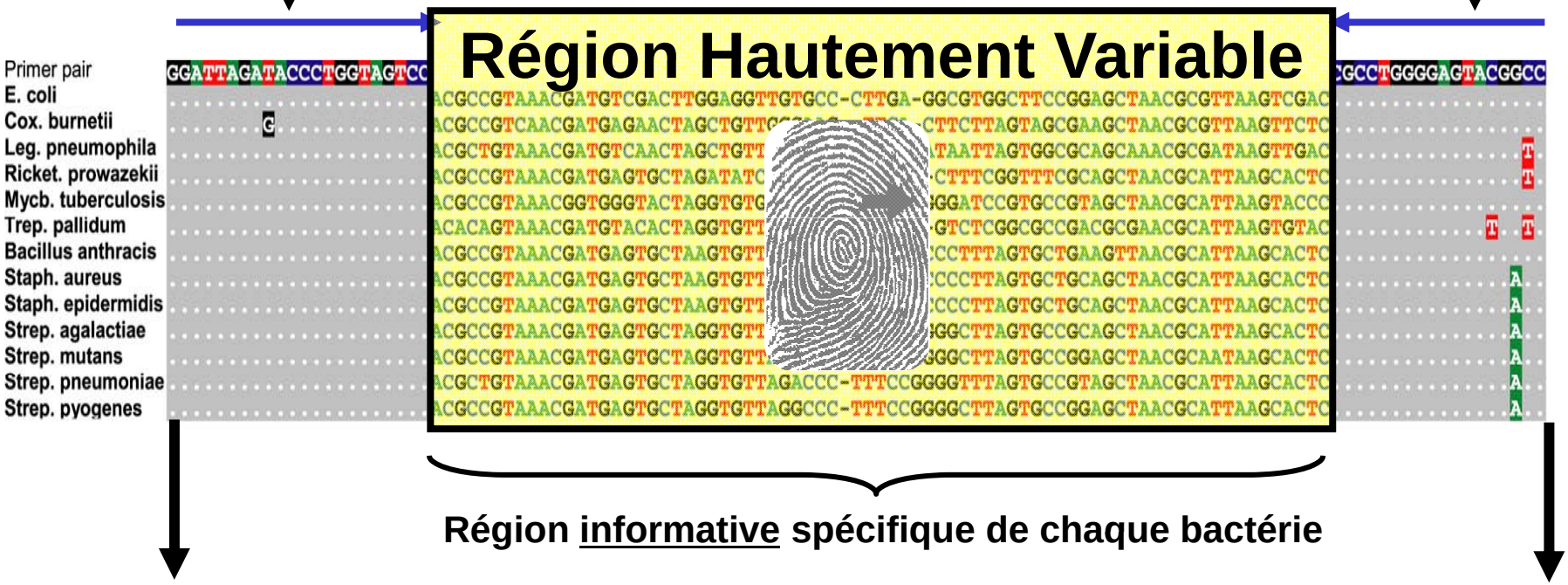


Pig liver sausage sample	Market*	HEV RNA	HEV RNA concentration (copies/g)
1	A1	Negative	-
2	A2	Negative	-
3	A3	Negative	-
4	A4	Positive	4,100
5	A5	Positive	175
6	A6	Positive	240
7	A7	Negative	-

Mansuy EID 2011

Identification bactérienne par amplification d'une région génomique variable

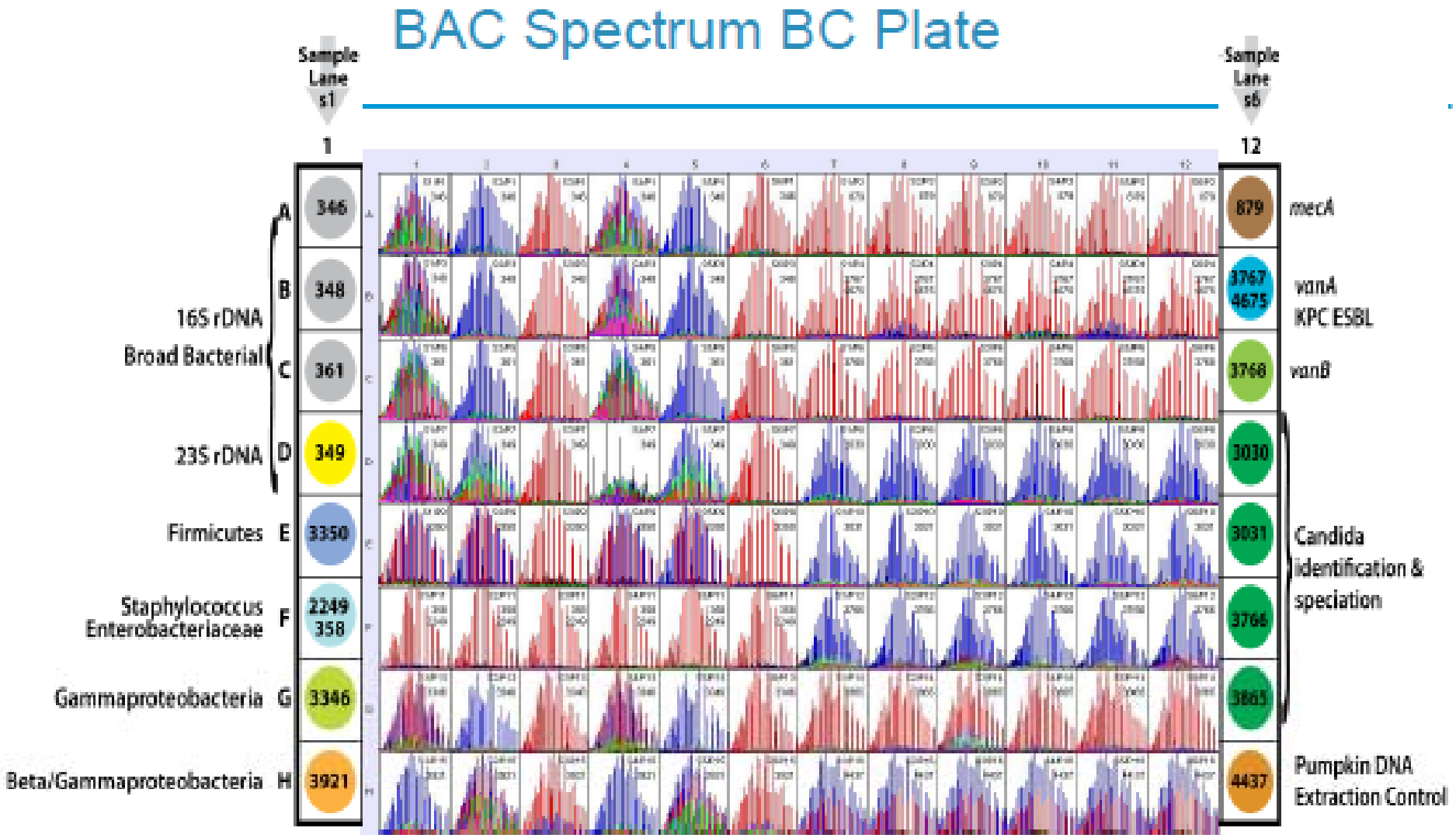
Les amorces de PCR ciblent des <u>régions conservées</u> des génomes bactériens.



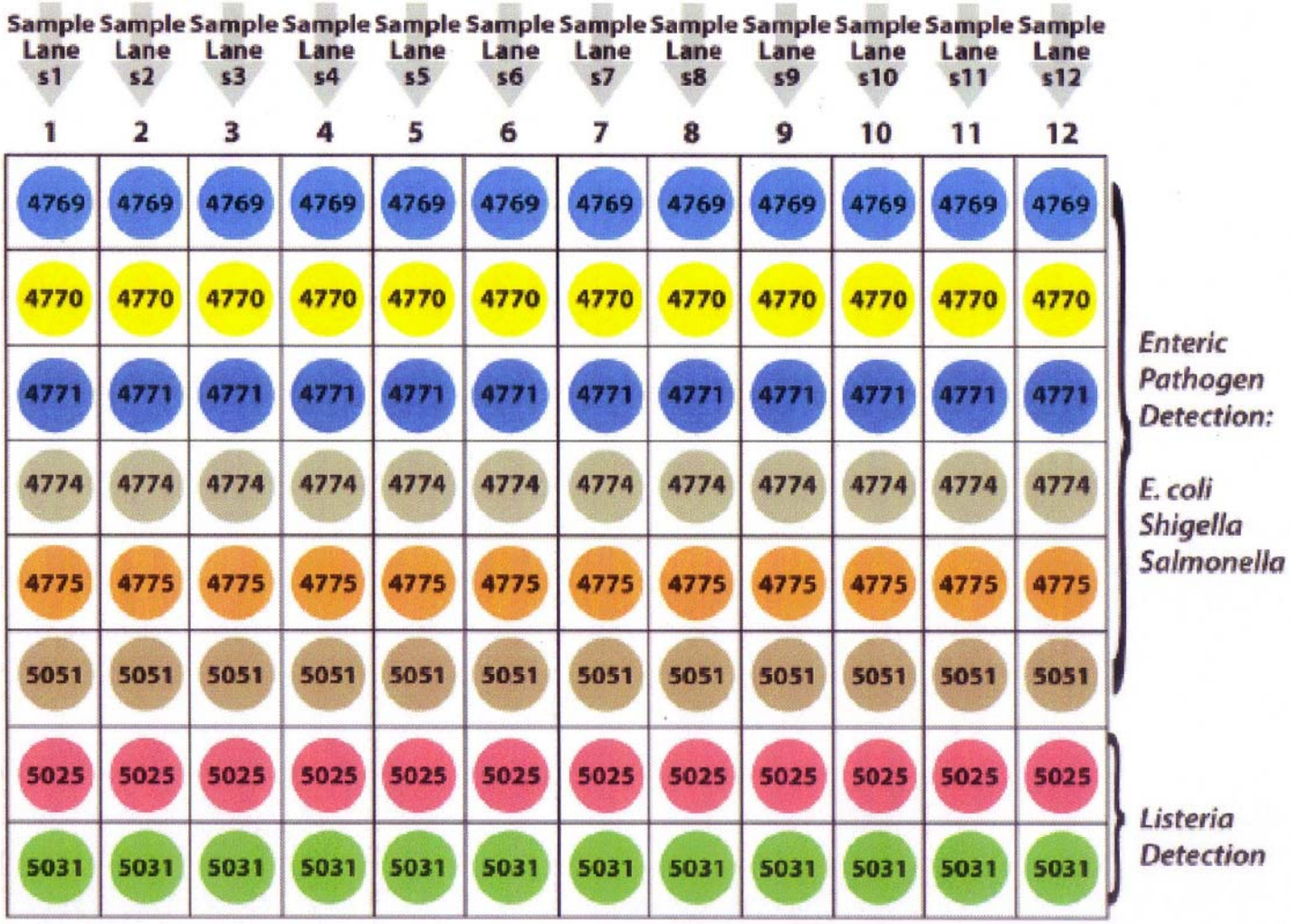
Région <u>informative</u> spécifique de chaque bactérie

La <u>signature moléculaire</u> du produit PCR permet l'identification bactérienne

Panel Bactéries / Candida



Panel Bactéries responsables d'intoxications alimentaires



Identification des STEC 0157:H7 & non 0157

				mutS Primer Pairs			indh Primer Pairs	
ORGANISM	Representative Serotype	Number of DB Entries	PLEX-ID BC Cluster	4769	4770	4771	4774	4775
Escherichia coli O157:H7	O157:H7	8	1	A34 G37 C39 T30	A29 G35 C33 T28	A31 G40 C34 T35	Does Not Amplify	A21 G41 C40 T37
Escherichia coli	O103:H2	18	2	A32 G38 C39 T30	A29 G35 C32 T29	A34 G37 C32 T37	A37 G35 C33 T34	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	O103:H11	8	3	A32 G38 C39 T30	A31 G33 C33 T28	A34 G37 C34 T35	A37 G35 C33 T34	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	O44:H18	1	4	A34 G36 C39 T30	A31 G33 C33 T28	A32 G40 C35 T33	No Data	No Data
Escherichia coli	UMN026	1	5	A34 G36 C39 T30	A31 G33 C33 T28	A34 G38 C34 T34	No Data	A23 G41 C39 T36
Escherichia coli	O145:NM	5	7	A34 G37 C39 T29	A29 G35 C33 T28	A34 G37 C34 T35	A37 G35 C33 T34	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	O6:K15:H31	1	8	A35 G35 C38 T31	A28 G37 C31 T29	A33 G38 C31 T38	No Data	A23 G40 C39 T37
Escherichia coli	O45:H4	1	9	A35 G35 C38 T31	A28 G37 C31 T29	A33 G38 C32 T37	A37 G35 C32 T35	A22 G41 C39 T37
Escherichia coli	IAI39	1	10	A35 G35 C39 T30	A28 G37 C32 T28	A35 G37 C33 T35	No Data	A23 G41 C38 T37
Escherichia coli	O111:H8	1	12	A36 G34 C37 T32	A28 C37 C31 T29	A34 G37 C34 T35	No Data	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	O111:H9	1	13	A36 G34 C37 T32	A31 G33 C33 T28	A34 G37 C32 T37	No Data	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	O111:H8	16	16	A36 G34 C37 T32	A31 G33 C33 T28	A34 G37 C34 T35	A37 G35 C33 T34	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	O111:H8	2	16	A36 G34 C37 T32	A31 G33 C33 T28	A35 G36 C34 T35	A37 G35 C33 T34	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli serotype O104_German Outbreak strain TY-2482	O104:H4	6	17	A36 G34 C37 T32	A31 G33 C33 T28	A34 G37 C34 T35	A37 G35 C32 T35	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	O104:H21	3	18	A36 G34 C37 T32	A31 G33 C33 T28	A34 G37 C34 T35	A37 G35 C33 T34	A23 G41 C38 T37
Escherichia coli	O26:H6	4	19	A36 G34 C38 T31	A28 G35 C32 T29	A33 G38 C35 T34	No Data	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	IAI1	1	20	A36 G34 C38 T31	A28 G35 C32 T29	A34 G37 C34 T35	No Data	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	ECOR34	1	23	A36 G34 C40 T29	A26 G39 C31 T29	A33 G38 C33 T36	No Data	No Data
Escherichia coli O157:not H7	O157:not H7	1	24	A36 G34 C40 T29	A29 G35 C33 T28	A34 G38 C35 T33	No Data	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	K-12	5	25	A36 G34 C40 T29	A31 G33 C33 T28	A34 G38 C34 T34	A37 G35 C33 T34	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	O143:H-	8	26	A36 G34 C40 T29	A31 G33 C33 T28	A34 G38 C35 T33	A37 G35 C33 T34	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	OH07/07885	1	27	A36 G34 C41 T28	No Data	A34 G37 C34 T35	No Data	A22 G41 C38 T38
Escherichia coli	CFT073	4	28	A37 G33 C38 T31	A28 G37 C31 T29	A33 G38 C33 T36	A37 G35 C32 T35	A22 G41 C39 T37
Escherichia coli	O1:K1	3	29	A37 G33 C41 T28	A26 G39 C31 T29	A33 G38 C33 T36	A37 G35 C32 T35	A22 G41 C39 T37
Escherichia hermannii	NE920	1	30	A32 G35 C42 T30	A24 G38 C35 T30	A33 G39 C35 T33	A38 G37 C37 T27	Does Not Amplify
Escherichia fergusonii	ATCC35469	1	31	A33 G37 C40 T29	A28 G35 C33 T28	A32 G40 C35 T33	A41 G31 C34 T33	Does Not Amplify
Escherichia albertii	Albert_10457	2	32	A34 G36 C41 T28	A28 G35 C33 T28	A34 G39 C35 T32	A37 G34 C30 T38	Does Not Amplify

Synthèse

- ✓ **Le système PLEX-ID offre une nouvelle approche de diagnostic moléculaire multiplex : virus, bactéries & champignons**
- ✓ **Analyse directe sur échantillons sans culture ou séquençage**
- ✓ **Identification possible de nouvelles souches ou espèces émergentes**
- ✓ **Amélioration de l'instrumentation attendue dans les 2 prochaines années**

Remerciements

Laboratoire de Virologie
Institut Fédératif de Biologie
CHU de Toulouse

I. Dasilva
C. Mengelle
JM. Mansuy

Abbott

D. Favy
M. Picard-Maureau
JB. Smith
P. Leroux
M. de Graff