

# Les nouveaux outils, vers une détection plus précoce ?

K. Jeannot

*CNR de la Résistance aux Antibiotiques,  
Laboratoire de Bactériologie, CHRU Jean Minjoz, Besançon*

# Déclaration de liens d'intérêt

---



# Evolution de la colonisation bactérienne trachéo-bronchique

oral

*S. pneumoniae*  
*H. influenzae*  
*S. aureus*

environnemental

*B. cepacia*  
*S. maltophilia*  
*Aspergillus sp.*  
*Mycobacterium sp...*

Mois ou années

✓ La colonisation s'accompagne d'une détérioration de la fonction pulmonaire = étape importante dans l'**évolution** de la maladie

*P. aeruginosa*

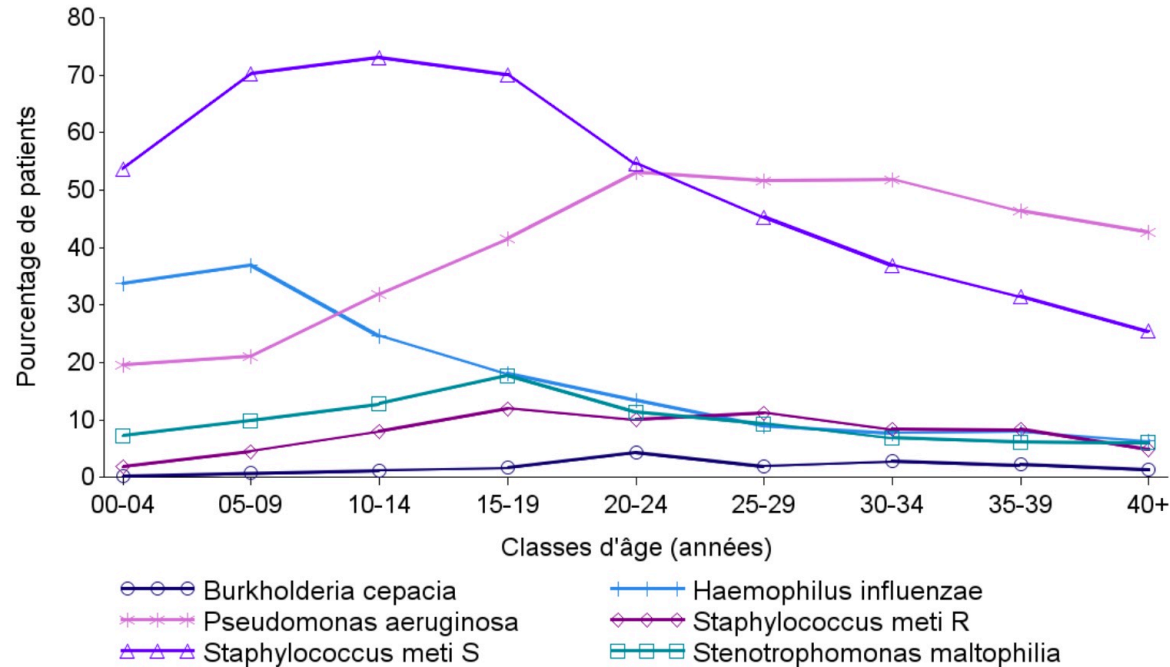
*P. aeruginosa mucoïde (alginate)*



Photo: Dr. Jean-François Guay, Université de Montréal

Organismes	Fréquence isolement (%)	Population CF	Rôle dans la maladie respi.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59	tous	<b>prouvé</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	48	surtout enfants et adolescents	<b>prouvé</b>
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	3	surtout adolescents et adultes	<b>prouvé</b>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	10	surtout adolescents et adultes	non prouvé
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	9	surtout adolescents et adultes	vraisemblable
<i>Burkholderia gladioli</i>	<1	surtout adolescents et adultes	peu probable
<i>Ralstonia</i> sp.	<1	surtout adolescents et adultes	peu probable
<i>Pandora</i> sp.	<1	surtout adolescents et adultes	possible
<i>Mycobacterium</i> sp.	13	surtout adolescents et adultes	<b>prouvé</b>
<i>Haemophilus influenzae</i>	15	enfants	vraisemblable
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	enfants	inconnu
<i>Enterobacteriaceae</i>	<5	enfants	inconnu
<i>Aspergillus fumigatus</i>	9	tous	<b>prouvé</b>
VRS	?	enfants	<b>prouvé</b>
Influenza virus	?	tous	<b>prouvé</b>

# Colonisation trachéo-bronchique par *P. aeruginosa*



Registre français de la mucoviscidose 2015

- ✓ Age moyen d'acquisition : **8 ans** (écarts extrêmes)
- ✓ Plus de **50%** des patients finissent par être colonisés par *P. aeruginosa*
- ✓ L'apparition de *P. aeruginosa* bouleverse la prise en charge des patients sur le plan de l'**antibiothérapie**

# Evolution de la colonisation à *P. aeruginosa*

## Contamination

Primo-colonisation

≥ 1 souche



Succès d'éradication de *P. aeruginosa* au stade de primo-colonisation dans les 12 semaines à partir de sa détection

## Adaptation

Colonisation intermittente

1 souche

*Accumulation  
de mutations*

## Implantation

Colonisation chronique

1 souche, sub-populations

- *Production d'alginate*
- *Hypermuteurs*
- *Diversité des phénotypes*
- *Perte de propriétés métaboliques*
- *perte de caractère de virulence*
- *Small colony variants*
- *Souches multi-résistantes*

- ✓ La plupart du temps, les patients sont colonisés par une **souche unique** de *P. aeruginosa* pouvant se diversifier en plusieurs morphotypes ou en sous-populations

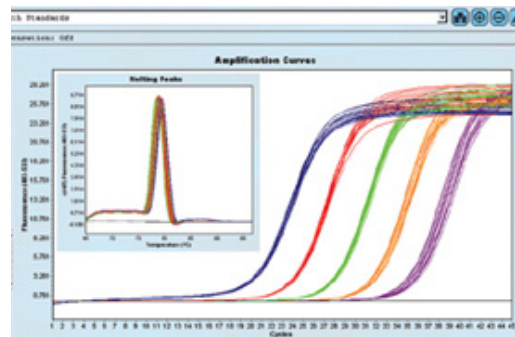
# Détection de *P. aeruginosa* chez les patients CF

- ✓ Au stade de la primo-colonisation (détection précoce de *P. aeruginosa* et détermination de la sensibilité aux antibiotiques)
- ✓ Après une antibiothérapie, évaluation d'une éradication

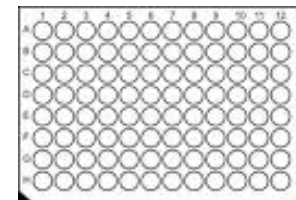
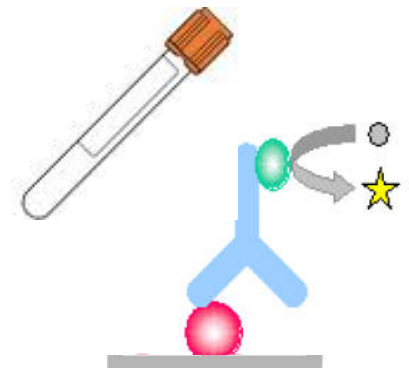
## Culture



## Biologie moléculaire



## Sérologie



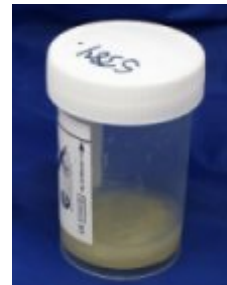
# ECBC (gold standard)

- ✓ Harmonisation des pratiques, **Consensus Microbiologique dans la mucoviscidose** (REMIC 2015)
- ✓ Au moins 1 ECBC dans l'année chez 98% enfants et 79,6% des adultes (MucoRegistre 2015)



- Expectoration spontanée,
- Aspiration pharyngée après Kiné et/ou nébulisation de sérum  $\phi$
- Ecouvillonnage pharyngé

Dilution  $1/2$  agent mucolytique



Examen direct

10 uL



Milieu non sélectif,  
gélose au sang

Détection **200 UFC/mL**

10 uL



Milieu sélectif,  
gélose drigalski

100 uL

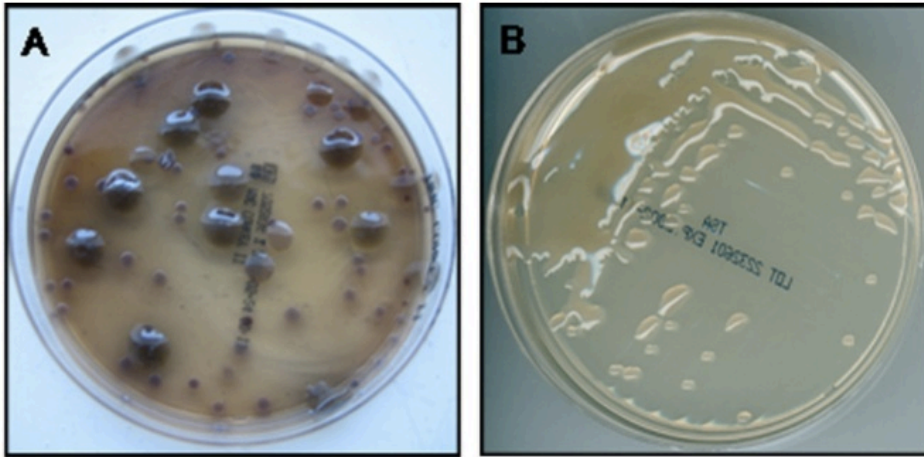


+/-  
Milieu sélectif,  
gélose cétrimide

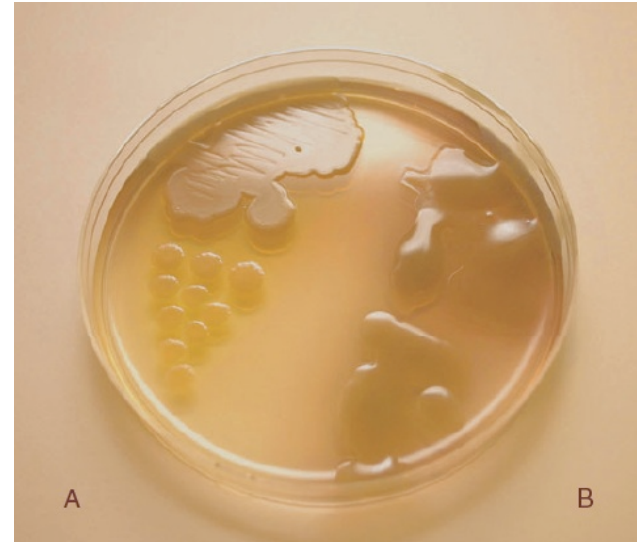
Détection **20 UFC/mL**



# Production d'alginate: mucoïdie



Production d'exopolysaccharides *in vitro*



Souche muqueuse alginate<sup>++</sup> *in vitro*

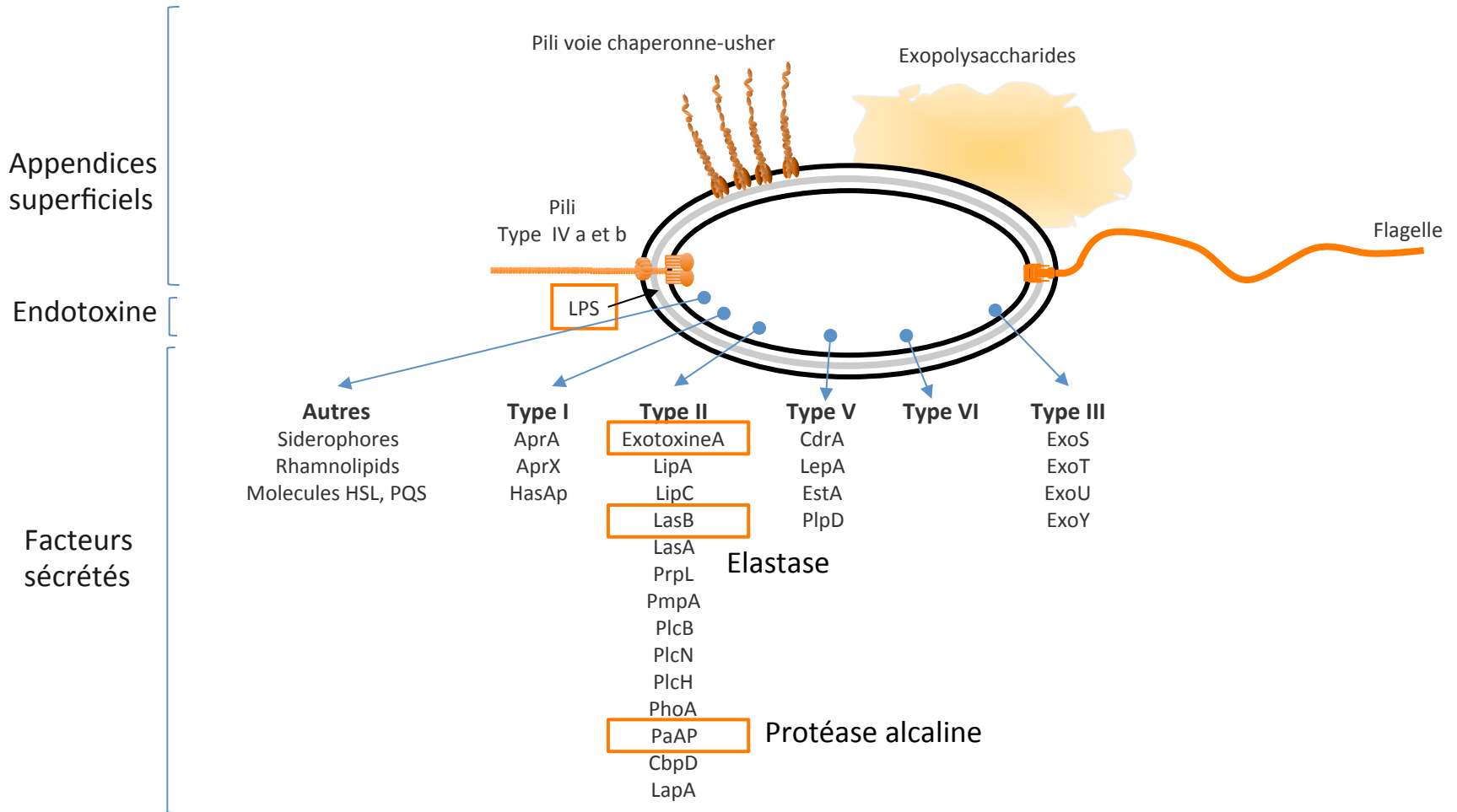
- ✓ Exopolysaccharides visqueux d'ac. mannuronique/ac. guluronique
- ✓ Hyperproduction en réponse à un stress (déshydratation des sécrétions, présence de peroxydes, molécules inflammatoires...)
- ✓ Produit par un plus grand nombre de souches au stade de colonisation chronique (phénomène complexe)

## Sérologie *P. aeruginosa*

---

- ✓ Problème de la culture chez les jeunes enfants (prélèvements oro-pharyngés) et les patients non-expectorants
- ✓ Place de la sérologie chez ces patients pour la **détection précoce** d'une primo-colonisation à *P. aeruginosa*
- ✓ Place de la sérologie pour évaluer l'**éradication** et la survenue d'une **nouvelle colonisation**

# Antigènes cibles



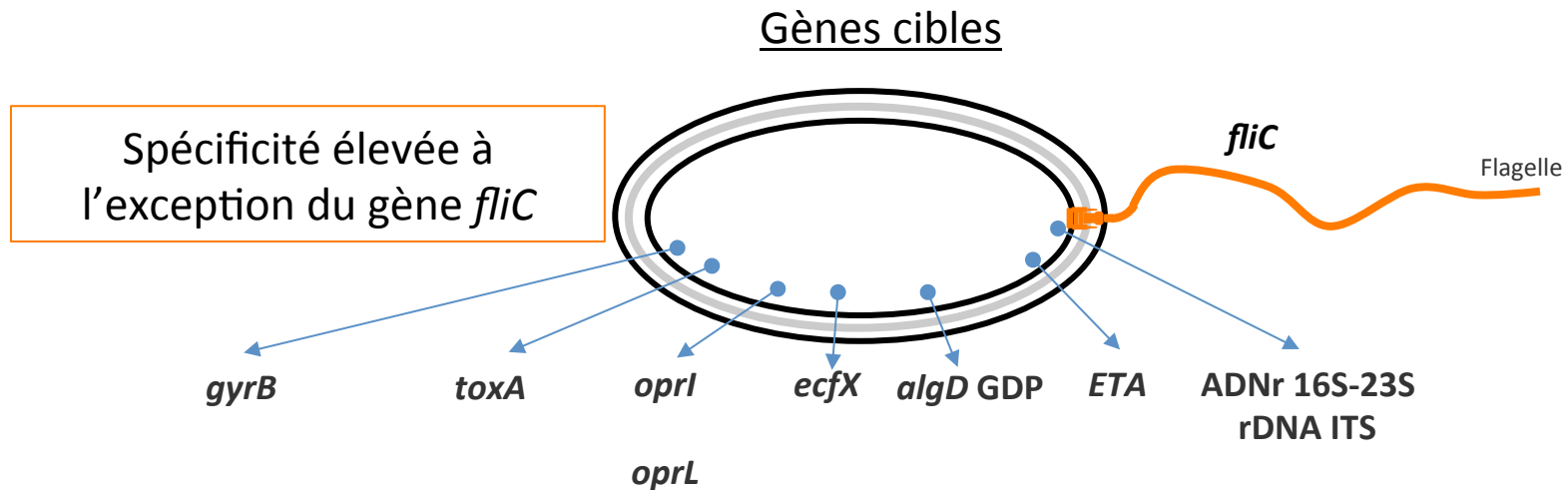
# Impact de la sérologie *Pseudomonas*

---

- ✓ **U**ne sérologie **positive** chez un patient **naïf** ne prédit pas une primo-colonisation à *P. aeruginosa* dans les 6-12 mois (*West SE et al. JAMA. 2002; Daines C et al. J of Cyst Fibros, 2014; Douglas TA et al. Thorax, 2010*)
  - Taux Ac également élevé chez des individus non CF
  - Difficulté pour déterminer un seuil de positivité significatif en fonction de l'âge
  
- ✓ **F**acteur pronostic de l'efficacité de l'antibiothérapie anti-*Pseudomonas* (*Ratjen et al. Pediatr Pulmonol 2007; Anstead M et al. J Cyst Fibros 2013; Dolce D et al. J of Cyst Fibros, 2014, Kappler et al. J Cyst Fibros 2014*)
  - Une augmentation du taux des Ac après 6 mois de traitement est associé avec une forte probabilité d'isoler *P. aeruginosa* par culture et par conséquent d'échec thérapeutique

- ✓ Titres élevés d'Ac anti-Exotoxine A et anti-protéase alcaline après antibiothérapie sont associés avec un plus grand risque de récurrence de *P. aeruginosa* (Anstead M et al. *J Cyst Fibros* 2013)
- ✓ Sérologie pourrait être un **complément** de la culture pour le suivi des récurrences à *P. aeruginosa*
- ✓ La sérologie **ne permet pas de prédire une primo-colonisation**

- ✓ Amplification génique classique (PCR)
- ✓ PCR en temps réel
  - Qualitative et/ou quantitative
  - Sondes d'hydrolyse
  - Agent intercalant, SybrGreen



De Vos D *et al.* 1997; da Silva Fihlo *et al.* 1999 et 2004; Jaffe RI *et al.* 2001; Quin X *et al.* 2003; Lavenir R *et al.* 2007; Motoshima M *et al.* 2007; Anuj SN *et al.* 2009.

# Sensibilité de détection de *P. aeruginosa*

Culture and PCR positivity for the detection of *P. aeruginosa* in clinical (and environmental) samples in cross-sectional studies.

Author	Sample type	PCR target	Number of samples	Culture positive	PCR positive	Extraction method
Lavenir et al. [11]	Environmental	<i>gyrB</i>	41	5	3	FastDNA SPIN Kit (qBiogene)
		<i>ecfX</i>	41	5	8	
		16S-23S rDNA ITS	41	5	7	
De Vos et al. [12]	Sputum	<i>oprL</i>	49	40	44	Phenol–chloroform or boiling
	Skin biopsies	<i>oprL</i>	14	7	9	
Motoshima et al. [16]	Sputum	<i>gyrB</i>	108	54	56	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
Karpati et al. [17]	Sputum	16S rDNA	90	40	45	Amplicor Sputum Specimen Preparation Kit (Roche)
da Silva Filho et al. [18]	Sputum	<i>algD</i> GDP mannose	10	5	5	Freezing–boiling
	Throat	<i>algD</i> GDP mannose	5	2	2	
da Silva Filho et al. [19]	Sputum, OS <sup>b</sup>	<i>algD</i> GDP mannose	257	144	200	Phenol–chloroform
da Silva Filho et al. [20]	Sputum, OS <sup>b</sup>	<i>algD</i> GDP mannose	87 <sup>a</sup>	42	53	Phenol–chloroform
Zemanick et al. [21]	Sputum	16S rDNA	82	40	44	Phenol–chloroform
	OS <sup>b</sup>	16S rDNA	40	16	10	

<sup>a</sup> Patients, number of samples not specified.

<sup>b</sup> Oropharyngeal swab.

Deschaght P *et al.* 2011, Journal of Cystic Fibrosis

Le Gall F *et al.* 2013, BMC Microbiology

- ★ Bonne sensibilité de détection de *P. aeruginosa*, équivalente ou supérieure à la culture
- ★ Sensibilité 100%, *oprL* (10 UFC/mL)

# Détection précoce de *P. aeruginosa*

---

- ✓ Etude Xu, J *et al.* 2004 (Irlande, monocentrique)
  - Adultes **non colonisés** *n*=57 (expectorations 1 mL)
  - Cibles ***oprL*** et **exotoxine A**, PCR classique
  - Culture CBA, MacConkey, PAI (seuil de détection 200 UFC/mL)
  - PCR positive, culture- chez 10 patients
  - Culture positive pour **5 patients entre 4 et 17 mois.**



Etude			Cible	C +/ PCR -	C+/ PCR+	C-/ PCR-	C-/ PCR+
Xu J <i>et al.</i> , 2004	n=57, Adultes	Expectorations	<i>oprL</i>	5	25	17	10 (5)
			<i>exoA</i>	5	22	17	3 (0)

# Détection précoce de *P. aeruginosa*

---

- ✓ Etude Xu, J *et al.* 2004 (Irlande, monocentrique)
  - Adultes **non colonisés** *n*=57 (expectorations 1 mL)
  - Cibles ***oprL*** et **exotoxine A**, PCR classique
  - Culture CBA, MacConkey, PAI (seuil de détection 200 UFC/mL)
  - PCR positive, culture- chez 10 patients
  - Culture positive pour **5 patients entre 4 et 17 mois.**
  
- ✓ Etude Deschaght P *et al.* 2010 (Belgique, multicentrique)
  - Adultes et enfants de 1 -53 ans, ***n*=397** (expectorations, aspiration nasopharyngée, écouvillonnage)
  - **Free *P. aeruginosa***
  - Cible ***oprL***, quantitative PCR sondes d'hydrolyse
  - Culture MacConkey, cétrimide (seuil de détection 200 UFC/mL)
  - PCR positive, culture- chez 26 patients
  - Culture positive pour **5 patients entre 2 et 5 mois.**

Etude			Cible	C +/ PCR -	C+/ PCR+	C-/ PCR-	C-/ PCR+
Xu J <i>et al.</i> , 2004	n=57, Adultes	Expectorations	<i>oprL</i>	5	25	17	10 (5)
			<i>exoA</i>	5	22	17	3 (0)
Deschaght <i>et al.</i> , 2010	n= 397 (852) Adultes / Enfants	Expectoration, NA, écouvillons	<i>oprL</i>	10	89	729	26 (5)

# Détection précoce de *P. aeruginosa*

---

- ✓ Etude Logan C *et al.* 2010 (Irlande, monocentrique)
  - Enfants  $n=$  1363 expectorations et 1337 écouvillons
  - Cibles ***algD*** et ***gyrB***, Real time PCR
  - Culture CBA, MacConkey, (seuil de détection 200 UFC/mL)
  - PCR positive, culture négative pour 80 échantillons
  - Culture positive pour 26 échantillons.

Etude			Cible	C +/ PCR -	C+/ PCR+	C-/ PCR-	C-/ PCR+
Xu J <i>et al.</i> , 2004	n=57, Adultes	Expectorations	<i>oprL</i>	5	25	17	10 (5)
			<i>exoA</i>	5	22	17	3 (0)
Deschaght <i>et al.</i> , 2010	n= 397 (852) Adultes / Enfants	Expectoration, NA, écouvillons	<i>oprL</i>	10	89	729	26 (5)
Logan <i>et al.</i> , 2010	n=183 (1363) Enfants	Expectorations	<i>gyrB, algD</i>	6	260	452	52 (20)
	n=183 (1367) Enfants	Ecouvillons	<i>gyrB, algD</i>	14	80	945	28 (6)

# Détection précoce de *P. aeruginosa*

---

- ✓ Etude Logan C *et al.* 2010 (Irlande, monocentrique)
  - Enfants  $n= 1363$  expectorations et 1337 écouvillons
  - Cibles *algD* et *gyrB*, Real time PCR
  - Culture CBA, MacConkey, (seuil de détection 200 UFC/mL)
  - PCR positive, culture négative pour 80 échantillons
  - Culture positive pour 26 échantillons.
  
- ✓ Etude Billard-Pomares *et al.* 2011 (France, monocentrique)
  - Enfants  **$n=33$** (5-18 ans, moyenne 12 ans), 72 expectorations
  - $n=23$  **never** *P. aeruginosa*,  $n= 10$  **intermittent**, 31 expectorations
  - Culture CBA, cétrimide, (seuil de détection 20 UFC/mL)
  - Cible ***oprL***, quantitative real time PCR

Etude			Cible	C +/ PCR -	C+/ PCR+	C-/ PCR-	C-/ PCR+
Xu J <i>et al.</i> , 2004	n=57, Adultes	Expectorations	<i>oprL</i>	5	25	17	10 (5)
			<i>exoA</i>	5	22	17	3 (0)
Deschaght <i>et al.</i> , 2010	n= 397 (852) Adultes / Enfants	Expectoration, NA, écouvillons	<i>oprL</i>	10	89	729	26 (5)
Logan <i>et al.</i> , 2010	n=183 (1363) Enfants	Expectorations	<i>gyrB, algD</i>	6	260	452	52 (20)
	n=183 (1367) Enfants	Ecouvillons	<i>gyrB, algD</i>	14	80	945	28 (6)
Billard-Pomares <i>et al.</i> , 2011	n=23 (72) Enfants	Expectorations	<i>oprL</i>	0	0	17	6

# Détection précoce de *P. aeruginosa*

---

- ✓ Etude Mc Culloch et al. 2011 (Ecosse, monocentrique)
  - Enfants (0 à 15 ans) (n=25; 42 expectorations) et n= 161, 500 écouvillonnages pharyngés)
  - Cible ADNr 16S, real time PCR, sondes d'hydrolyse Taqman (se. 85 CFU/mL)
  - Culture MacConkey, blood
  - **4 patients ont présenté une PCR positive avant la culture (médiane de 8 mois)**



Etude			Cible	C +/ PCR -	C+/ PCR+	C-/ PCR-	C-/ PCR+
Xu J <i>et al.</i> , 2004	n=57, Adultes	Expectorations	<i>oprL</i>	5	25	17	10 (5)
			<i>exoA</i>	5	22	17	3 (0)
Deschaght <i>et al.</i> , 2010	n= 397 (852) Adultes / Enfants	Expectoration, NA, écouvillons	<i>oprL</i>	10	89	729	26 (5)
Logan <i>et al.</i> , 2010	n=183 (1363) Enfants	Expectorations	<i>gyrB, algD</i>	6	260	452	52 (20)
	n=183 (1367) Enfants	Ecouvillons	<i>gyrB, algD</i>	14	80	945	28 (6)
Billard-Pomares <i>et al.</i> , 2011	n=23 (72) Enfants	Expectorations	<i>oprL</i>	0	0	17	6
McCulloch <i>et al.</i> , 2011	N=25 (42) Enfants	Expectorations	<i>ADNr 16S (rrl)</i>	0	22	10	10 (1)
	N=161 (500) Enfants	Écouvillons	<i>ADNr 16S (rrl)</i>	0	26	446	28 (3)

# Détection précoce de *P. aeruginosa*

---

- ✓ Etude Mc Culloch et al. 2011 (Ecosse, monocentrique)
  - Enfants (0 à 15 ans) (n=25; 42 expectorations) et n= 161, 500 écouvillonnages pharyngés)
  - Cible ADNr 16S, real time PCR, sondes d'hydrolyse Taqman (se. 85 CFU/mL)
  - Culture MacConkey, blood
  - **4 patients ont présenté une PCR positive avant la culture (médiane de 8 mois)**
  
- ✓ Etude Héry-Arnaud *et al.* 2017 (France, multicentrique)
  - Adultes et enfants (médiane 11 ans) **n= 96** dont **never** (n=45) ou **free** (n=51) (707 expectorations)
  - Cibles ***oprL*, *ecfX* et *gyrB*** real time PCR
  - Culture CBA, cétrimide (seuil de détection 20 UFC/mL)
  - **20 patients ont présents une PCR positive avant la culture (médiane de 8 mois)**
  - Sensibilité 94.3%, spécificité 86.3%

Etude			Cible	C +/ PCR -	C+/ PCR+	C-/ PCR-	C-/ PCR+
Xu J <i>et al.</i> , 2004	n=57, Adultes	Expectorations	<i>oprL</i>	5	25	17	10 (5)
			<i>exoA</i>	5	22	17	3 (0)
Deschaght <i>et al.</i> , 2010	n= 397 (852) Adultes / Enfants	Expectoration, NA, écouvillons	<i>oprL</i>	10	89	729	26 (5)
Logan <i>et al.</i> , 2010	n=183 (1363) Enfants	Expectorations	<i>gyrB, algD</i>	6	260	452	52 (20)
	n=183 (1367) Enfants	Écouvillons	<i>gyrB, algD</i>	14	80	945	28 (6)
Billard-Pomares <i>et al.</i> , 2011	n=23 (72) Enfants	Expectorations	<i>oprL</i>	0	0	17	6
McCulloch <i>et al.</i> , 2011	N=25 (42) Enfants	Expectorations	<i>ADNr 16S (rrl)</i>	0	22	10	10 (1)
	N=161 (500) Enfants	Écouvillons	<i>ADNr 16S (rrl)</i>	0	26	446	28 (3)
Héry-Arnaud <i>et al.</i> 2017	N=96 (707) Adultes et enfants	Expectorations	<i>oprL, ecfX, gyrB</i>	0	16	28	52(20)

- ✓ **Absence de consensus** pour un protocole standard de qPCR
- ✓ **Nécessité d'utiliser plusieurs cibles** (augmentation de la sensibilité *oprL* et de la spécificité *ecfX*, *gyrB*)
- ✓ Statut des patients étudiés Free, Never
- ✓ Les résultats discordants entre la qPCR (+) et la culture (-) peuvent être attribués à la présence de très faibles inocula, de bactéries quiescentes ou non viables
- ✓ Les résultats positifs de qPCR sont à confronter avec ceux de la culture
- ✓ La qPCR est **complémentaire** à la culture pour la **détection précoce** de *P. aeruginosa* chez les patients naïfs ou free
- ✓ Impact du diagnostic précoce par qPCR de *P. aeruginosa* et de son antibiothérapie sur l'évolution de la colonisation ?

- ✓ **M**éthode d'amplification génique (PCR) permettant d'évaluer la diversité microbienne des expectorations
- ✓ **R**ibosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) détection de la variation de taille de l'espace intergénique (ITS) entre les gènes codant l'ARN ribosomal 16S et 23S
  - ✓ **E**tude WG. Flight 2015 *J. Clinical Microbiology* (United Kingdom)
    - ✓ Utilisation en routine de RISA pour évaluer la diversité microbienne dans les expectorations CF par comparaison avec la culture et l'étude du microbiote (16S rRNA pyroséquençage)
    - ✓ Adultes CF (n=93; 200 expectorations)
    - ✓ RISA (1406F-23SR)
    - ✓ *P. aeruginosa* est fréquemment associé à une diminution de la diversité microbienne
- ✓ **M**étagénomique, Méthode de séquençage des amplicons (SHD)

- ✓ **Détection de la production de **pyocyanine** dans les expectorations**
  - Senseurs électrochimiques (ampérométrie, AlZahra'a F. *et al.* Nanomedicine 2016; Webster TA, Biosensors Bioelectronics, 2014; Alatraktchi FA *et al.* Sensors 2016) . Méthode rapide et très sensible (détection de 125 nM à 100 µM), validée dans un milieu artificiel CF
  - Spectroscopie d'impédance électrochimique (Ward AC. *et al.* Plos One 2014)
- ✓ **Détection d'**hydrogène cyanide** (composé organique volatil) dans l'air expiré** (Analyse par spectrométrie de masse des composés organiques présents dans l'air (SIFT-MS))
  - Etude **Enderby B et al.** Pediatric Pulmonology, 2009
    - La concentration HCN est significativement plus élevée chez les enfants CF colonisés à *P. aeruginosa* / enfants asthmatiques
  - Etude **Smith D et al.** J of Breath Research, 2013
    - Les souches de *P. aeruginosa* testées produisent de HCN (n=150)
    - La concentration HCN est à la limite de détection chez les individus sains
    - La concentration HCN est significativement augmentée chez les patients infectés par *P. aeruginosa*
  - Etude de **Gilchrist Fj et al.** J of Breath Research, 2013
    - La concentration HCN expirée par le nez était significativement supérieure chez les patients colonisés chroniquement par *P. aeruginosa* / patients free

- ✓ La **culture** reste la méthode de **référence**
- ✓ **Harmonisation** des méthodes d'analyse microbiologique permettant de fournir des prestations équivalentes dans tous les centres prenant en charge les patients atteints de mucoviscidose
- ✓ La sérologie peut-être un **complément** de la culture pour le suivi des **réurrences** à *P. aeruginosa*
- ✓ Les outils de biologie moléculaire sont actuellement **complémentaires** à la culture pour la **détection précoce** de *P. aeruginosa* chez les patients naïfs ou *free*

# Remerciements



## CNR & Research group

- Patrick Plésiat
- Charlotte Richardot
- Damien Fournier
- Aurélie Noguès
- Catherine Llanes
- Caroline Bréchet
- Emeline Müller
- Pauline Garnier
- Amélie Mille
- Paulo Juarez

