

METHODES DE DIAGNOSTIC RAPIDES EN MICROBIOLOGIE

Pr. Emérite A. PHILIPPON
Faculté de Médecine Paris Descartes

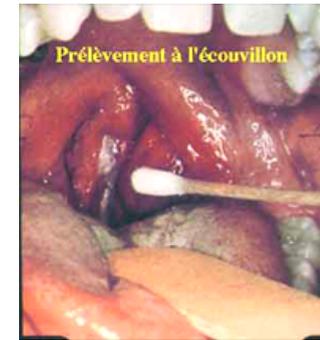


**Depuis au moins 30 ans, recherche continuelle
pour répondre plus vite et plus précis.**

**Comment y est-on parvenu, en particulier en
bactériologie ?**



DEFINITIONS



PST « patient self testing » ou « **home testing** » : tests réalisés par le patient lui-même

POL ou « physician office labs » ou « **doctor's tests** » : tests réalisés par le médecin

POCT ou « point of care testing » : tests prescrits au sein d'une institution médicale (hôpital, dispensaire, ambulance,...) mais pouvant être réalisés hors de l'enceinte du laboratoire (Biologie délocalisée)

Nombreuses dénominations anglo-saxonnes : bedside testing, near-patient testing, physician's office testing, extra-laboratories testing, decentralized testing, off-site testing,...

TDR EN FRANCE

A distinguer :

- Les TDR réalisés par le patient
- Les TDR réalisés chez le MG
- Les TDR réalisés dans les unités de soin (biologie délocalisée) **sous la responsabilité du biologiste**
- Les TDR effectués dans les laboratoires de biologie médicale **sous la responsabilité du biologiste**

Contrôle de qualité avec la marquage CE et réactovigilance

CARACTÉRISTIQUES INTRINSÈQUES D'UN TEST

Sensibilité = fréquence des tests positifs chez les malades

Sensibilité = a/n_1 = Vrais positifs chez les malades

Probabilité de mettre en évidence la maladie lorsqu'elle est présente

Si le test est très sensible (peu de FN), un résultat négatif exclut le diagnostic

Spécificité = fréquence des tests négatifs chez les sujets sains

Spécificité = d/n_2 = Vrais négatifs chez les non malades

Probabilité de bien déceler l'absence de la maladie

Si le test est très spécifique (peu de FP), un résultat positif implique le diagnostic

AUTRES VALEURS

VPP : probabilité d'avoir la maladie quand le test est positif

VPN : probabilité de ne pas avoir la maladie quand le test est négatif

Elles dépendent de la sensibilité, de la spécificité et de la prévalence

$$VPP = a/N1 = VP/(VP+FP)$$

$$VPN = d/N2 = VN/(VN+FN)$$

	Malades	Sains	
T+	a (VP)	b (FP)	N1 = a+b
T-	c (FN)	d (VN)	N2 = c+d
	n1=a+c	n2=b+d	N = a+b+c+d

- VP : Vrai Positifs
- VN : Vrai Négatifs
- FP : Faux Positifs
- FN : Faux Négatifs

- N1 : Tests positifs
- N2 : Test négatifs
- n1 : Malades
- n2 : Non malades

METHODES TRES RAPIDES (réponse < 30 minutes)

- . Bandelette urinaire (BU)
 - . Bandelette ou savonnette de type immuno-empainte
-

- . Examen direct (Microscope)

Etat frais

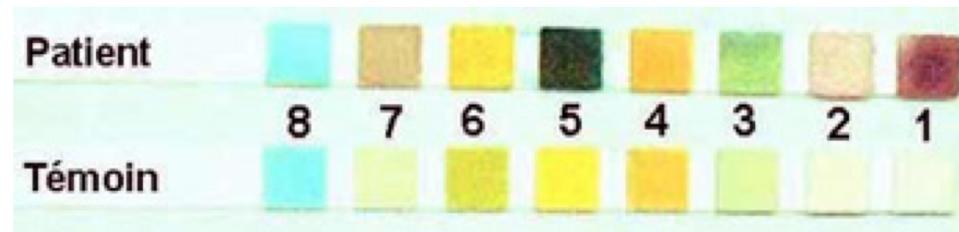
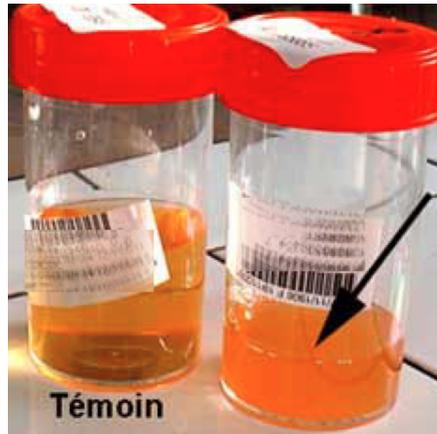
Colorations



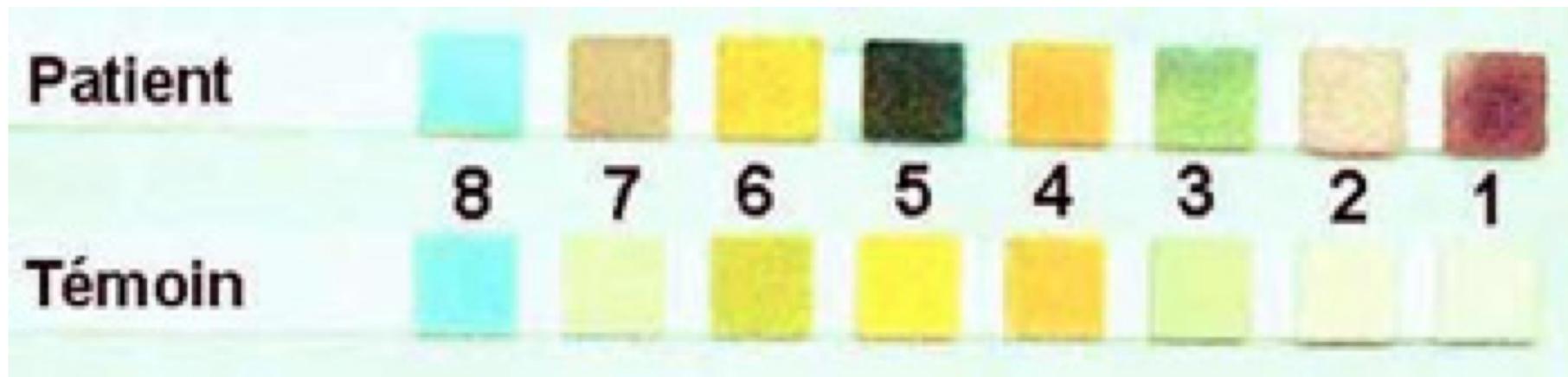
BANDELETTE URINAIRE (BU)

Test d'infection urinaire simple, rapide, peu onéreux

Intérêt limité : si urine limpide et test négatif → ECBU inutile



La bandelette immergée dans l'urine de la malade est comparée à une bandelette témoin. Les recherches suivantes peuvent être obtenues: **1, leucocytes; 2, nitrites; 3, protéines; 4, pH; 5, sang; 6, densité; 7, corps cétoniques; 8, glucose**



Dans cet exemple, la pyurie, la protéinurie et l'hématurie sont positives mais la recherche de nitrites est négative.

L'usage d'une bandelette urinaire multiréactive face à une femme ayant des symptômes urinaires obéit à diverses recommandations internationales. Elles ont une **sensibilité de l'ordre de 90%** et une **spécificité de 70%** (chez la jeune femme). De plus, la **valeur prédictive négative (VPN) est excellente, de l'ordre de 99%** en milieu ambulatoire et **valeur prédictive positive (VPP) de 40-90%**. Donc culture si présence de PPN.

TDR EN MICROBIOLOGIE

Introduction :

Réponse rapide aux autorités sanitaires et aux médecins dans un contexte d'urgence lié à la gravité de la maladie ou à la pression de l'opinion attisée par la médiatisation (SRAS, grippe aviaire...).

Les autorités sanitaires régionales, nationales et internationales peuvent déclencher une série de mesures visant à prévenir la diffusion du processus infectieux épidémique et à prendre en charge les malades.

Quelques exigences

- . diagnostic biologique de certitude ou de quasi-certitude*
- . dans un délai plus court que la technique de référence (qq min, qq heures)*
- . en dehors d'un LABM dans l'urgence avec des moyens réduits (services cliniques, domicile, maison de retraite, pays en voie de développement...).*
- . faciles à manipuler avec encombrement très faible (équipements lourds -)*
- . conservés à température ambiante*
- . minimum de réactifs complémentaires*

Inconvénients

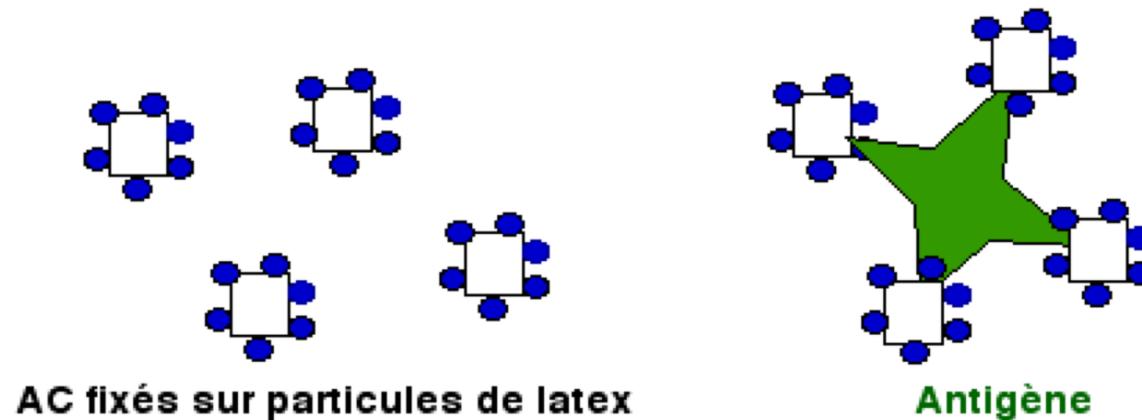
- . *Le résultat obtenu doit souvent être confirmé par une autre méthode*
- . *Un résultat positif n'exclut pas la présence d'autres pathogènes non ciblés par le test*
- . *Un résultat négatif n'exclut pas la présence du pathogène ciblée par le test (précocité de réalisation du test, variabilité inter-individuelle...).*
- . *Le test n'est souvent applicable à un type de prélèvement*
- . *L'infection est-elle en cours ou passée ?*
- . *Coût non négligeable , qualité des réactifs docn réactovigilance*
- . *Existence d'un problème du cadre juridique dont l'aspect réglementaire de l'utilisation des tests avec la notion de responsabilité si biologie délocalisée.*

Principes

1. Détection rapide d'antigènes : *Les antigènes recherchés sont pour la plupart des constituants de l'agent pathogène.*

Les principales techniques sont :

- **Agglutination de particules de latex** sensibilisées par des anticorps spécifiques monoclonaux ou non. Elle permet la détection des antigènes polyosidiques solubles dans les liquides biologiques (sérum, urines, LCR ...).



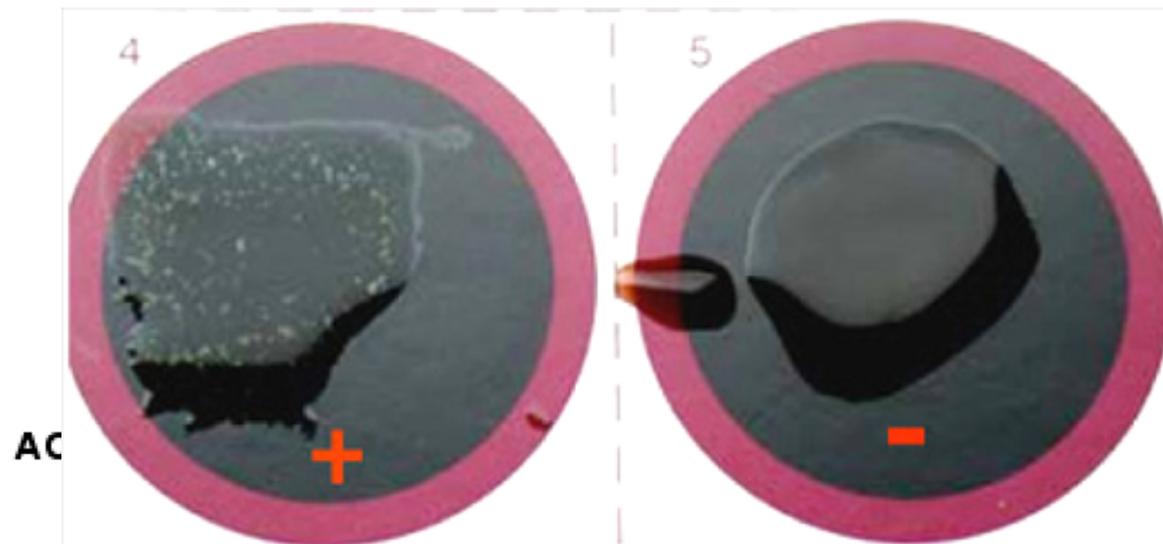
Agglutinat visible en 1 min

Principes - Méthodes

1. Détection rapide d'antigènes : *Les antigènes recherchés sont pour la plupart des constituants de l'agent pathogène.*

Les principales techniques sont :

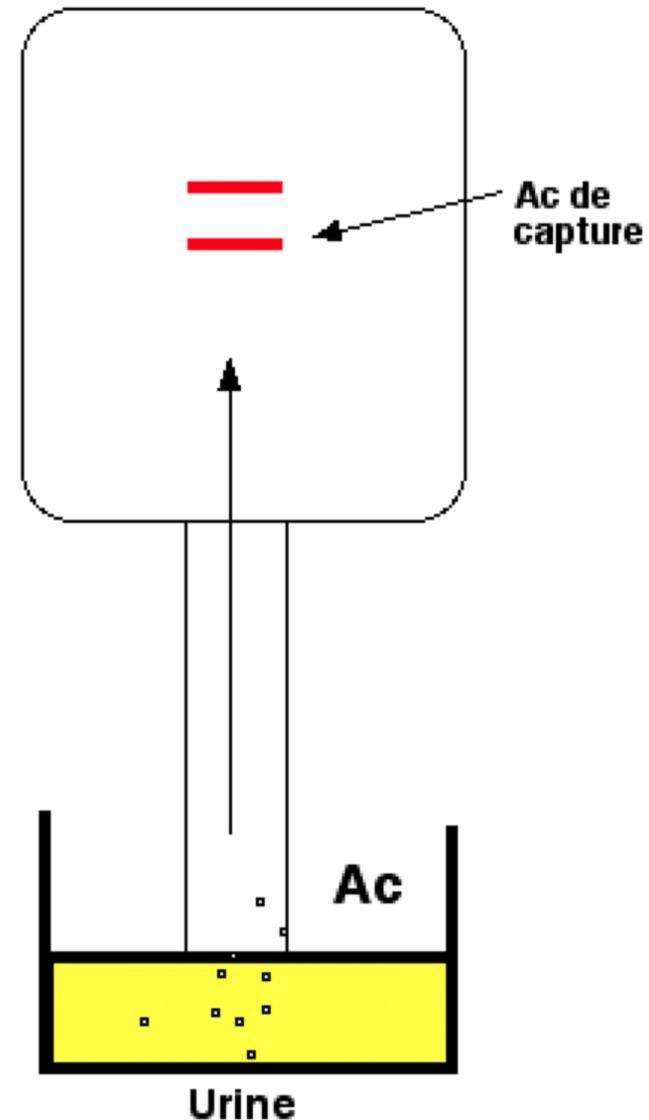
- **Agglutination de particules de latex** sensibilisées par des anticorps spécifiques monoclonaux ou non. Elle permet la détection des antigènes polysidiques solubles dans les liquides biologiques (sérum, urines...).



Agglutinat visible en 1 min

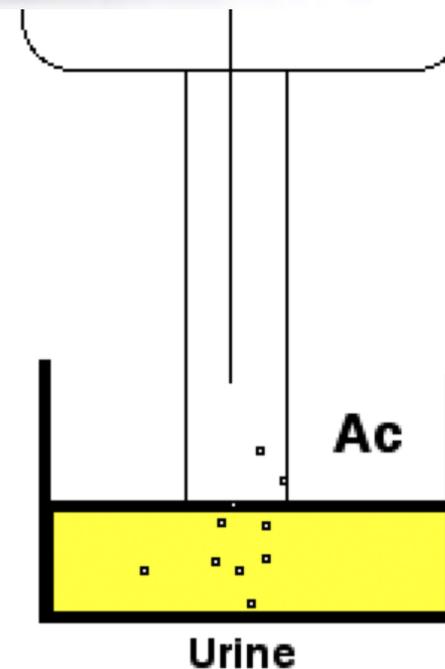
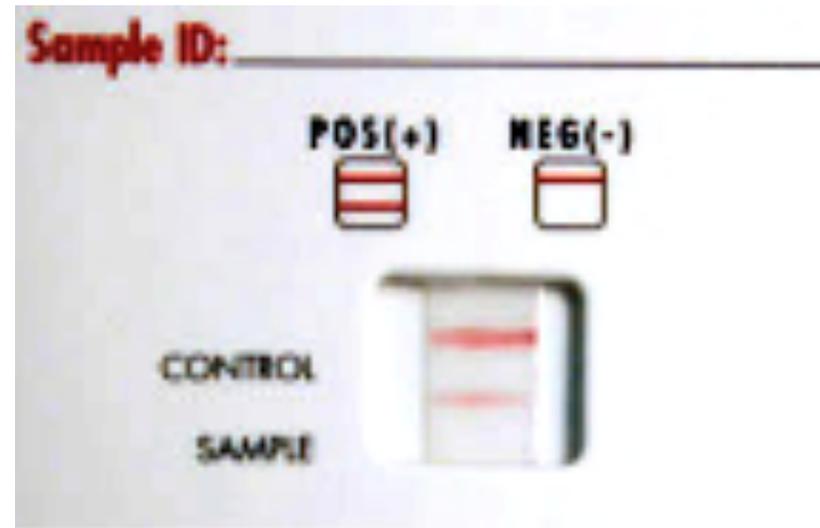
Immuno-chromatographie sur membrane/bandelette

L'échantillon testé (urine) est déposé à l'une des extrémités d'une membrane de nitrocellulose. Si l'antigène recherché est présent, il se lie avec des **anticorps spécifiques marqués à l'or colloïdal**. Sous l'effet d'un tampon de lyse-migration, les **complexes antigène-anticorps** migrent par capillarité et sont arrêtés par des **anticorps de capture** fixés sur la membrane. Un résultat positif se traduit par **l'apparition d'une ligne colorée**. Un contrôle interne permet de valider le test.



Immuno-chromatographie sur membrane/bandelette

L'échantillon testé (urine) est déposé à l'une des extrémités d'une membrane de nitrocellulose. Si l'antigène recherché est présent, il se lie avec des **anticorps spécifiques marqués à l'or colloïdal**. Sous l'effet d'un tampon de lyse-migration, les **complexes antigène-anticorps** migrent par capillarité et sont arrêtés par des **anticorps de capture** fixés sur la membrane. Un résultat positif se traduit par **l'apparition d'une ligne colorée**. Un contrôle interne permet de valider le test.



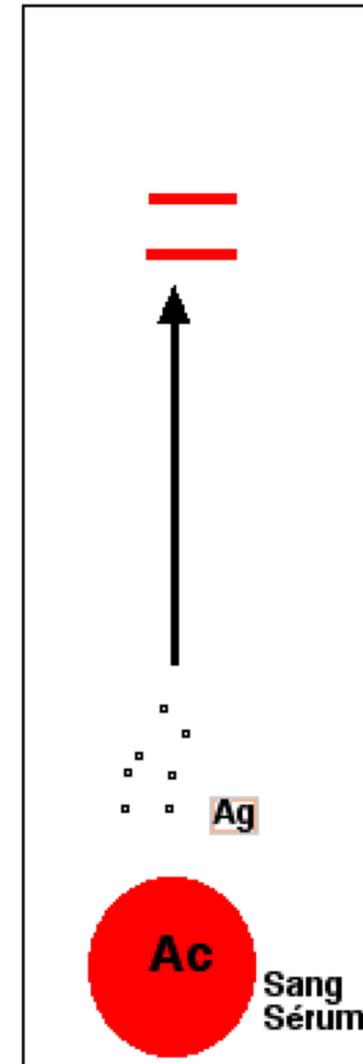
2/ Détection rapide d'anticorps(Ac)

Si D+, insuffisant pour établir le rôle du pathogène (FN). La séroconversion nécessite au minimum 15 jours !!!! La détection des IgM demeure intéressante pour la détection d'une épidémie. Plusieurs techniques :

. Immunochromatographie sur membrane.

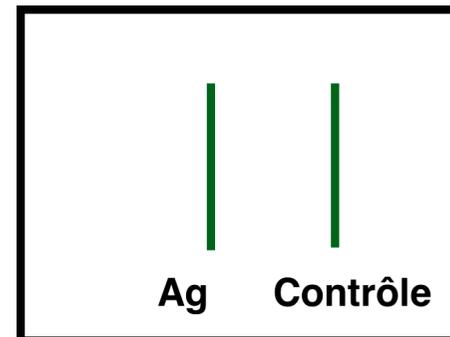
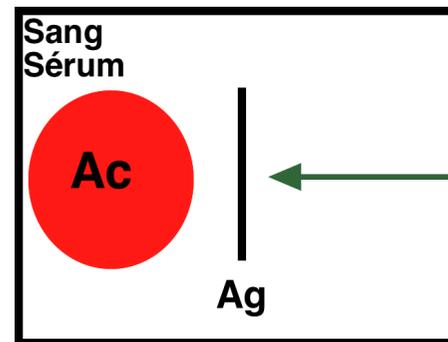
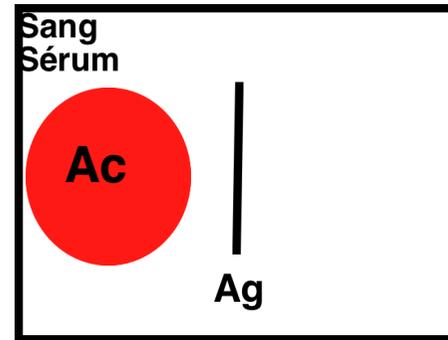
Sérum/sang déposé sur une extrémité, migration **Ac** se liant à un **Ag conjugué à un révélateur** de type colloïde de sélénium. Ce mélange continue de migrer jusqu'aux Ag immobilisés sur la membrane au niveau de la fenêtre de lecture. Les Ac conjugués au complexe Ag-révélateur se lient spécifiquement aux Ag et s'immobilisent en formant un **trait couleur**.

En l'absence d'Ac spécifiques, le conjugué antigène-colloïde traverse la zone de lecture sans produire de signal.



2/ Détection rapide d'anticorps(Ac)

- **Immunodot sur membrane**
technique ELISA sur une bande de nitrocellulose sur laquelle l'Ag natif ou purifié a été fixé. L'Ac spécifique reconnaît l'Ag, la révélation s'effectue avec un Ac monoclonal anti-IgG ou anti-IgM. Le résultat est qualitatif. Son interprétation est parfois difficile du fait de taux d'Ac trop faible.
- **Mesure d'une activité enzymatique** par une méthode de détection biochimique utilisant des tests ELISA.



TECHNIQUE ELISA

T. rapide , automatisable, sensible, quantifiable, automatisable mais technique de laboratoire délicate, donc réservé à des spécialistes





Recherche

OK

Votre caisse

Votre compte
ameli

Votre
convention

Gérer votre
activité

Votre caisse - Eure

En ce moment

Nous contacter

Nous rencontrer

Vous informer

Nos services et
imprimés

- Nouveau marché des ordonnanciers bi-zones
- Mon compte ameli
- Accès aux documents administratifs
- Vos réclamations en ligne

Professionnels de santé > Médecins > Votre caisse - Eure > Nos services
diagnostic rapide de l'angine

Test de diagnostic rapide de l'angine



Article mis à jour le 30 mars 2007

Le Test de Diagnostic Rapide de l'angine (TDR) permet d'optimiser la prescription d'antibiotiques. L'utiliser, c'est préserver l'efficacité des antibiotiques, menacée par le développement des résistances bactériennes.

Le TDR : Un outil d'aide à la prescription

Angine virale ou
Angine bactérienne ?



La réponse grâce au
TEST DE DIAGNOSTIC RAPIDE

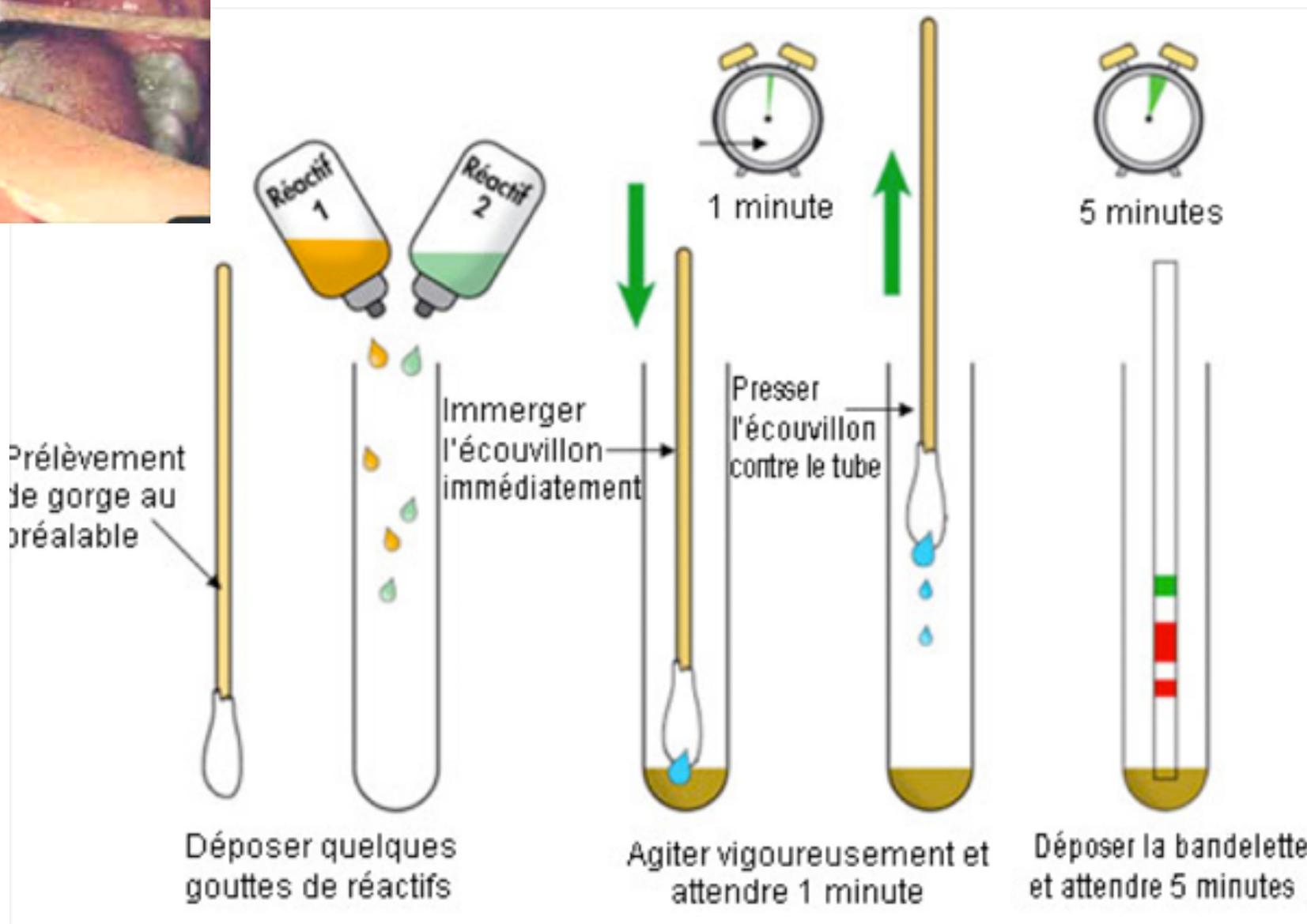
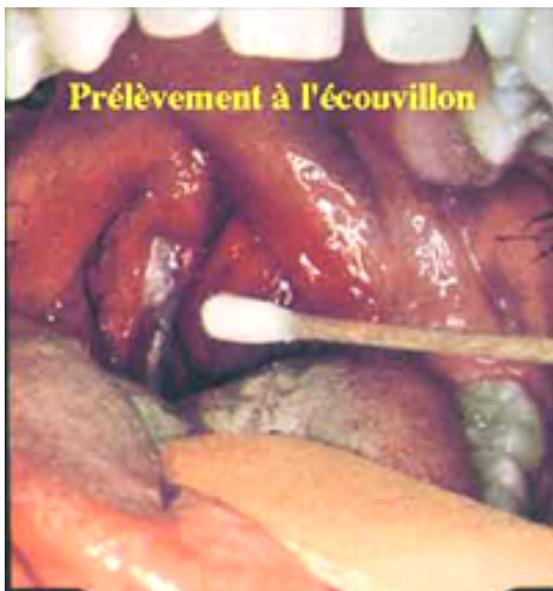
ANGINES À STREPTOCOQUES DU GROUPE A

TDR immunoenzymatique
de l'antigène de groupe A de Lancefield
réalisé par le praticien

- * Seuil de détection 10^5 UFC
- * Sensibilité 95%, Spécificité $\geq 95\%$
- * VPP $\geq 90\%$, VPN $\geq 96\%$

Intérêt : limiter antibiothérapie inappropriée







Positif



Négatif

25
STREPTAVIT
Stick

Détection immunologique rapide en une étape des antigènes streptococciques de groupe A dans les prélèvements de gorge

Réactif enregistré auprès de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) sous le n° 17 0103

N° de catalogue
25 tests / kit

Conserv. entre +4-20°C

COMPOSITION

- 25 pochettes épaissies contenant chacune :
 - 1 Stick - Streptavit protégé dans un sachet aluminé
 - 1 Tube d'aspiration simple
 - 1 Extension Dacron stérile
- 1 Flacon compte-goutte de Réactif A - E et (Sérum de Sodium 2 M)
- 1 Flacon compte-goutte de Réactif G - G et (ASCC sérique 0.4 M)
- 1 Flacon compte-goutte de Contrôle Négatif (0.5 ml)
- 1 Flacon compte-goutte de Contrôle Positif (0.5 ml)
- 1 Perforateur
- 1 Manuel d'utilisation

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les angines représentent une affection extrêmement courante. Bien que la majorité des cas chez les adultes et chez les enfants soit d'origine virale, les stratégies thérapeutiques sont généralement pour cible les angines causées par le streptocoque de groupe A, ou streptocoque A.

Le traitement précoce des angines à streptocoque A raccourcit la durée des symptômes, élimine l'incidence des complications suppuratives, et enfin diminue le risque de infection.

Le test - Streptavit est un test immunologique rapide en une étape avec des résultats très fiables en seulement cinq minutes.

Son utilisation dans le cadre de visites médicales à domicile ou au cabinet permet d'obtenir rapidement un diagnostic biologique, avec une orientation rapide et objective du traitement le plus adéquat.

PRINCIPE DU TEST

Le test Streptavit est un test immunochromatographique de type sandwich. Des réactifs immunologiques spécifiques sont pré-déposés le long de la bandelette et réagissent à mesure que l'échantillon migre.

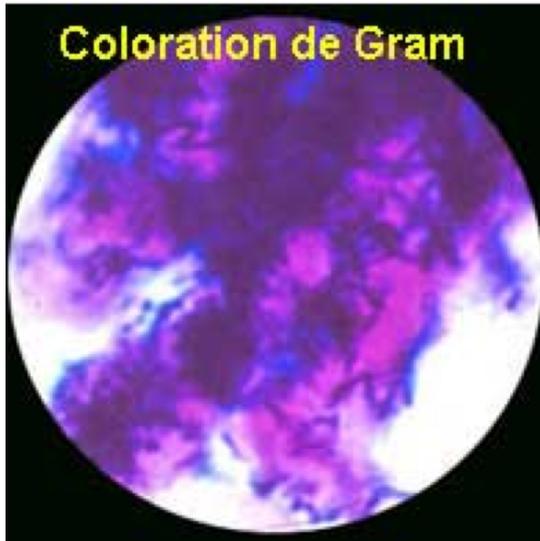
STREPTAVIT
BB 5/1/002

NOUVELLES RECOMMANDATIONS 2002 - 2005

- **Plus qu'un seul libellé d'AMM : angines documentées à SBHA. Implique la pratique du TDR.**
- **TDR à toute angine E ou EP chez enfants > 3 ans et adultes avec score de Mc Isaac > ou = à 2**
- **ATB si TDR +**
- **Amoxicilline 6j recommandée**
- **Possible (notamment si allergie péni sans CI aux Cp) : céfuroxime 4j, cefpodoxime ou cefotiam 5j**
- **Si CI aux bêta-lactamines : soit macrolides ou télithro (après culture) - azithro 3j, Clarithro, Josa, Télithro (> 12 ans) 5j, soit pristina (> 6 ans) au moins 8j**

Selon Pr. H. Portier

DIAGNOSTIC DE L'ANGINE DIPHTHERIQUE



IC Strip test for Diphtheria TM (HealthTech)

Exsudat pharyngé

Technique : ICB

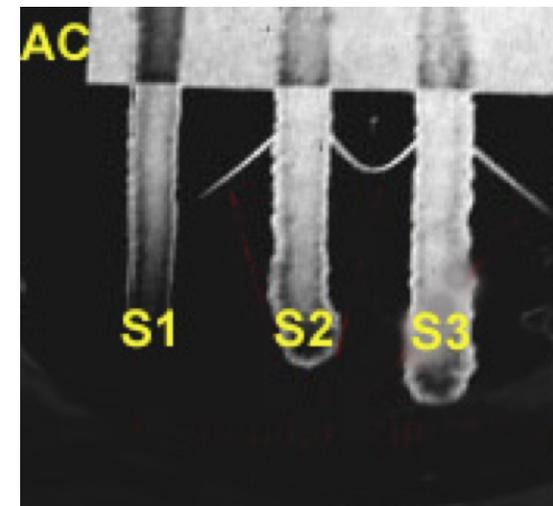
Toxine fragment A (0,5 ng)

Détection en 10-15 min

Concordance 99% (850 observations)

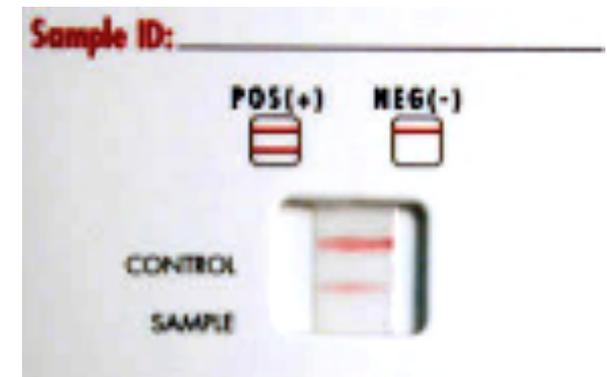
Sensibilité 98%

Spécificité 99%



ANTIGENES URINAIRES

Recherche de produits bactériens (lyse) ou d'antigène par une méthode immunologique
Les complexes formés antigène–anticorps sont détectés par une réaction colorimétrique.
Méthode rapide, spécifique, sensible, précoce **MAIS onéreuse** (plusieurs étiologies)



Intérêts ++++ : PAC à pneumocoque, à Legionella

PNEUMOPATHIES COMMUNAUTAIRES AIGUES (PAC) STRATEGIE DIAGNOSTIQUE

- **Prélèvements respiratoires**

- ECBC : Prélèvements sous fibroscopie (LBA, PDP, brosse)
- Aspiration nasopharyngée, écouvillon gorge, nez

- **Hémocultures** (+ 2-20% des PAC, pneumo++ 30-50%)

- **Antigénurie**

- Pneumocoque
- *Legionella pneumophila* 5%

- **Diagnostic moléculaire (PCR)**: *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*
Virus 5-10%

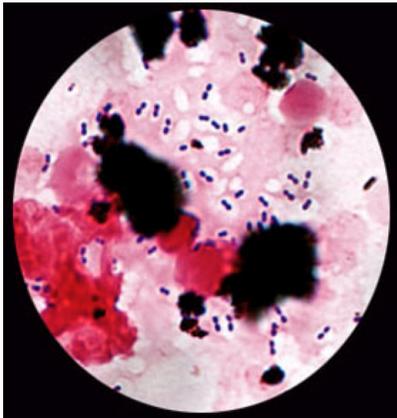
- **Sérologies** : *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*



ANTIGÉNURIE PNEUMOCOQUE

Test Binax NOW *S. pneumoniae* urinary antigen

- Test rapide (15 min) d'immunochromatographie sur membr.
- Dans les urines au cours des pneumopathies
- Tous les sérotypes détectés (polysaccharide C)
- Sensibilité variable suivant la gravité
- Excellente spécificité chez l'adulte (100%)
- **Non négativé par une antibiothérapie de 7 j**
- **Persistance de plusieurs semaines**
- Cependant coût élevé et non validé chez l'enfant



Binax NOW : Sensibilité selon gravité (PAC - *S. pneumoniae*)

PAC certaine (hémoculture +)

Nb. Patients Test + (%)

28	82
20	80
13	77
45	89

PAC probable (prélèvement respiratoire)

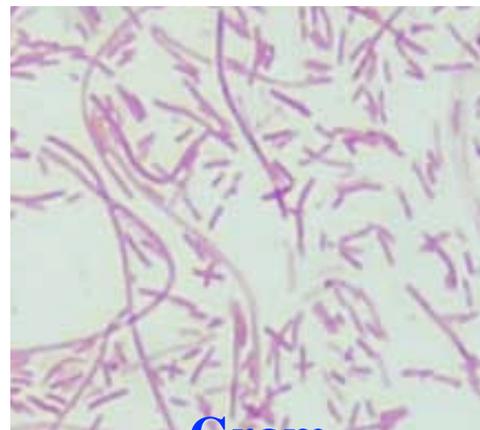
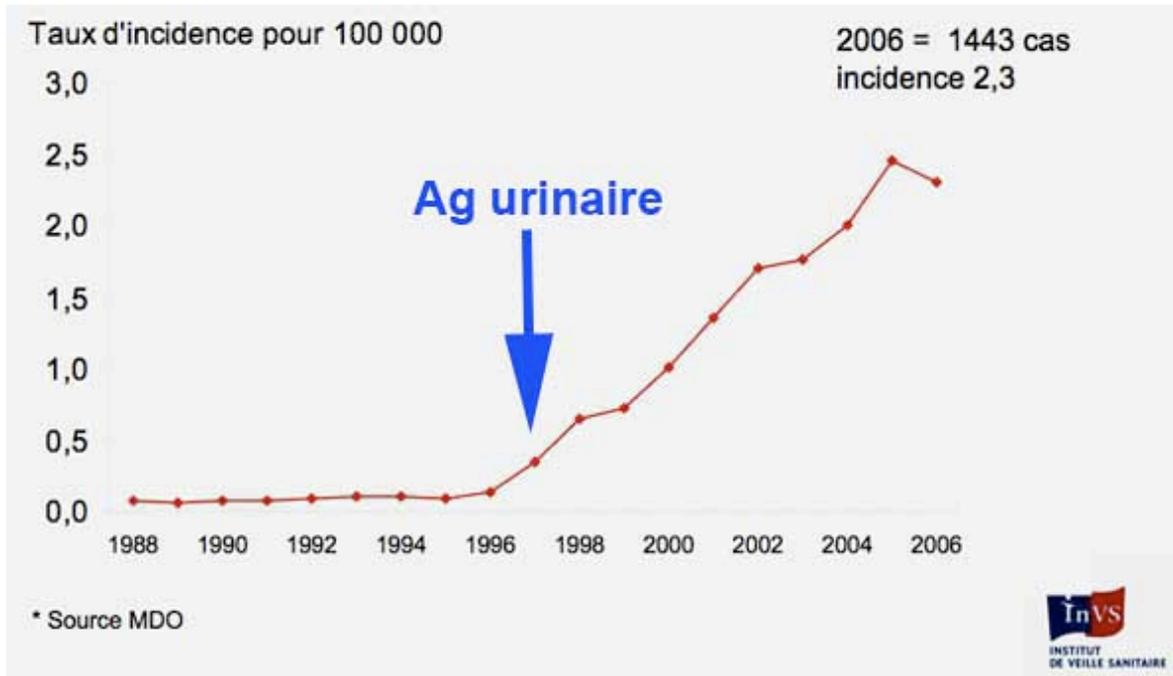
Nb. Patients Test + (%)

16	44
54	52
14	64
52	44

Selon données Bébéar C.

LA LÉGIONELLOSE (LEGIONELLA PNEUMOPHILA) 5%

Evolution de l'incidence de la légionellose - France ↴



Gram

Selon le contexte clinique
Donc demande précise



ANTIGÉNURIE LEGIONELLA

BinaxNOW L. pneumophila urinary antigen

- *Test rapide d'immunochromatographie sur membrane*
- *Dans urines lors de pneumopathies, 1-3 j - 1 an, 80% des malades*
- *Uniquement le sérotype 1 détecté (80% des légionelloses)*
- *Sensibilité 86-93%, spécificité > 95%*
- *Sensibilité accrue si concentration des urines*
- *Corrélation entre sévérité de l'infection et l'excrétion urinaire Lp*
- *Test non négativé par une antibiothérapie de 7 jours*

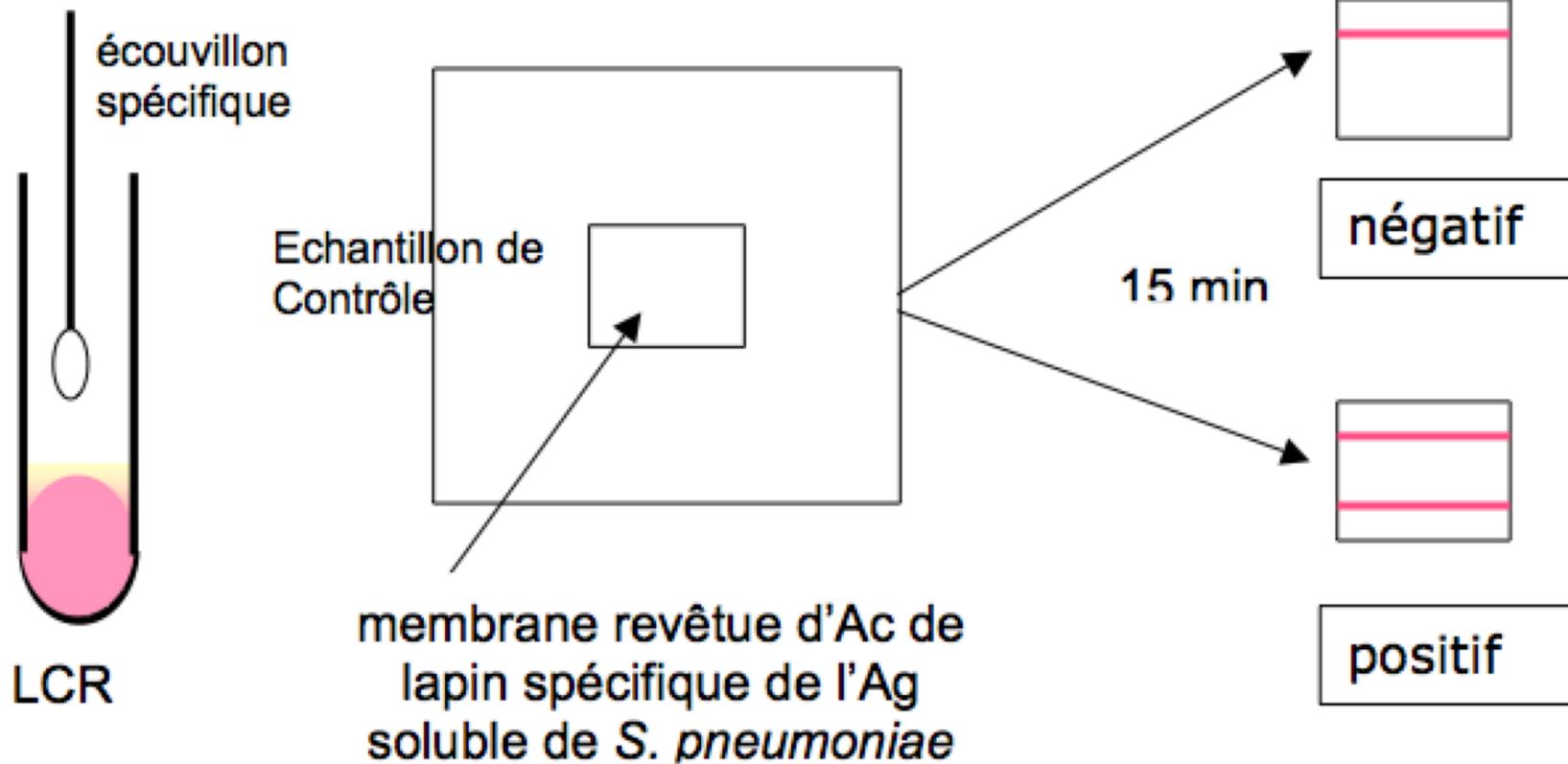


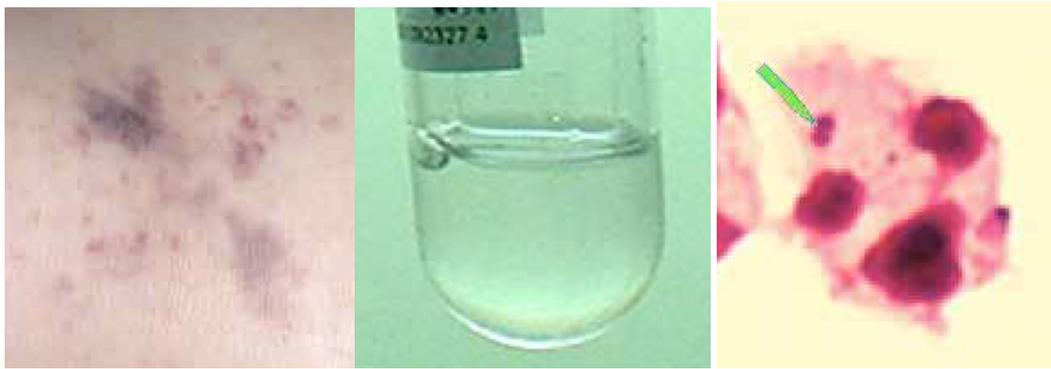
Milieu BCYE

*La culture est peu sensible et lente
Le diagnostic sérologique est rétrospectif,
donc plus épidémiologique*

MENINGITES

Méningocoques
Pneumocoques

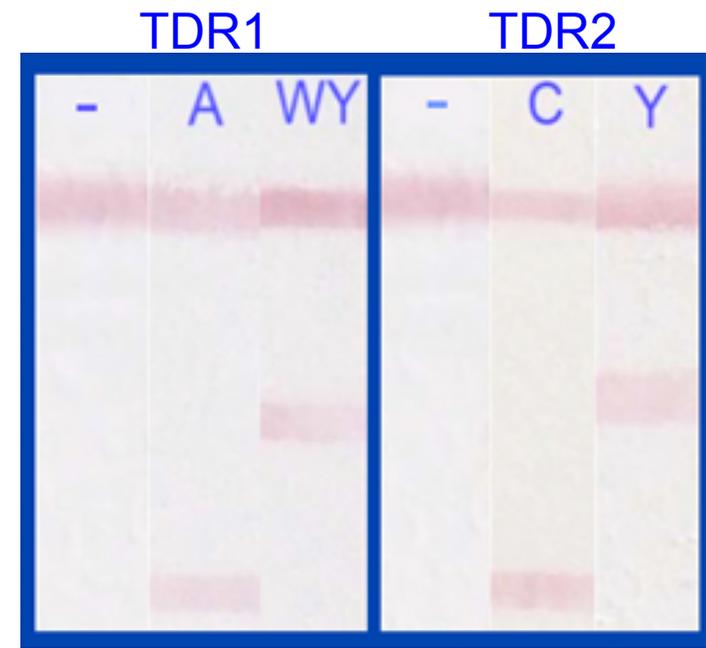




Méningites (*Neisseria meningitidis*)

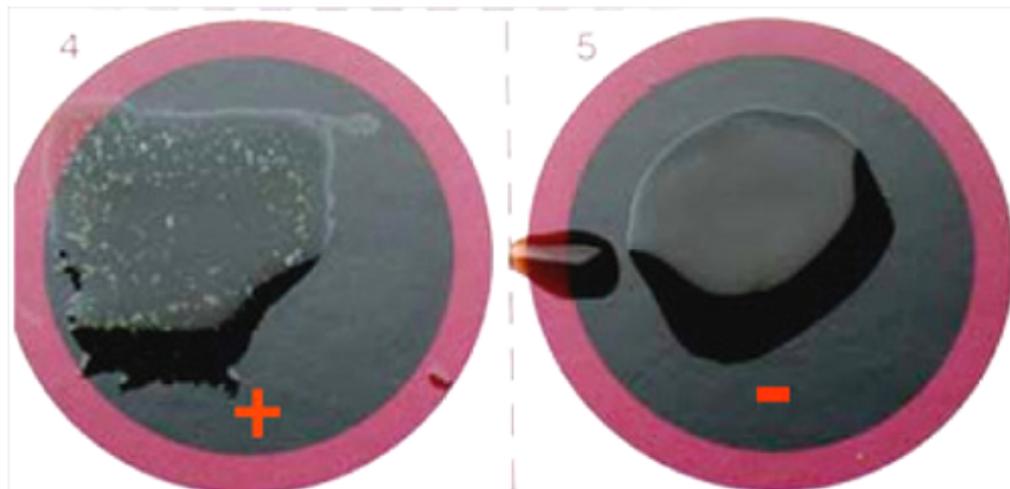
Chanteau S. et al. Plos Medecine 2006

ICB, Ac monoclonaux or colloïdal
 Ag polysaccharidique capsule A, C, Y, W135
 Au lit du malade
 Réactifs conservés à T°C ambiante



	LCR	Sang*	Urines
Sensibilité	93,9	66,7	46,2
Spécificité	62,5	31,3	92,3
VPP	83,8	66,7	92,3
VPN	83,3	31,3	48,1

* sang capillaire



TESTS AVEC PARTICULES DE LATEX

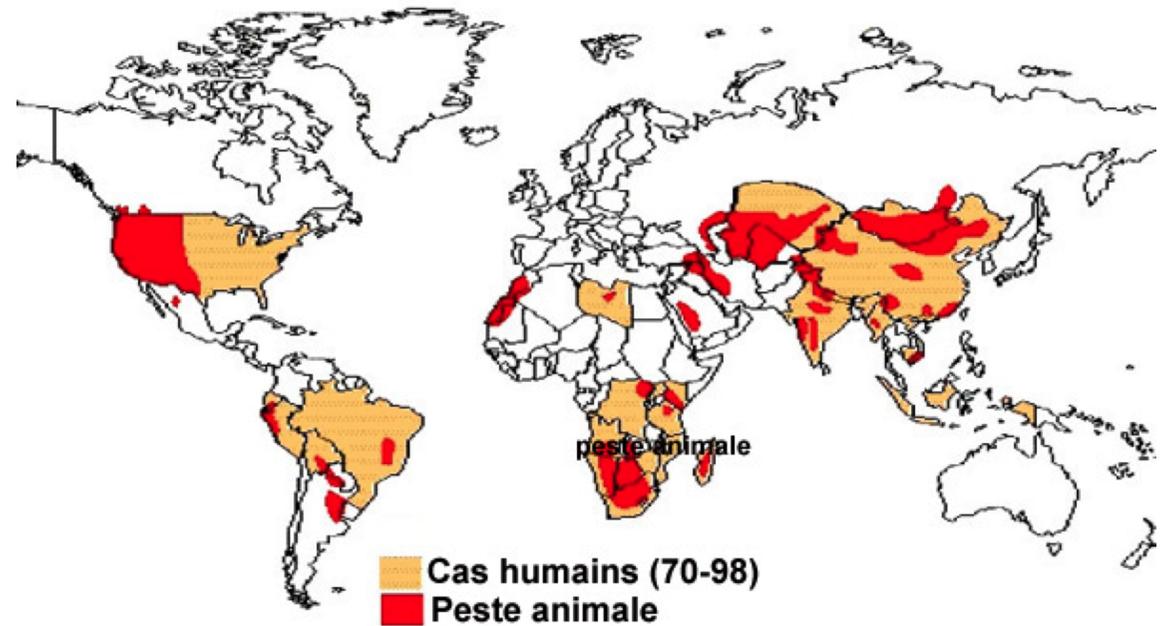
La sensibilité et la spécificité dans le sang sont inférieures à celle du kit Pastorex qui est de 84,9 à 88 % pour le sérotype A [9,18].

Mouari A. Thèse 2007 Cermes

9. **BOREL T, ROSE AMC, GUILLERM M, SIDIKOU F, GERSTL S, DJIBO A et al.** Sensitivity and specificity of the Pastorex latex agglutination test for *Neisseria meningitidis* serogroup A during a clinical trial in Niger. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2006 ; **100** : 964-9.
18. **DJIBO S, NJANPOP LAFOURCADE BM, BOISIER P, MOUSSA A, KOBO G, SIDIKOU F, et al.** Evaluation of the Pastorex Meningitis kit for the rapid identification of *Neisseria meningitidis* serogroups A and W135. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2006 ; **100** : 573-8.



PESTE



Maladie très contagieuse, surtout lors de peste pulmonaire

Au moins 4000 cas annuels dans 20 pays

Mortalité très réduite si traitement précoce à base de streptomycine (< 20%)

Détection surtout du réservoir (rongeurs)

Très rapide (< 15 min), spécifique et bonne conservation du réactif (brousse)

Plus sensible que méthodes classiques (> 60%)

Intérêt: excellent test d'alerte, paléobactériologie (pulpe dentaire)



Lancet 2003,361: 211-216.

Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague.

Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, Carniel E, Nato F.

Institut Pasteur de Madagascar, WHO Collaborating Centre for Plague, Antananarivo, Madagascar. schanteau@cermes.ne

FINDINGS: The RDT detected concentrations of F1 antigen as low as 0.5 ng/mL in up to 15 min, and had a shelf life of 21 days at 60 degrees C. Its sensitivity and specificity were both 100%. RDT detected 41.6% and 31% more positive clinical specimens than did bacteriological methods and ELISA, respectively. The agreement rate between tests done at remote centres and in the laboratory was 89.8%. With the combination of bacteriological methods and F1 ELISA as reference standard, the positive and negative predictive values of the RDT were 90.6% and 86.7%, respectively.

INTERPRETATION: Our RDT is a specific, sensitive, and reliable test that can easily be done by health workers at the patient's bedside, for the rapid diagnosis of pneumonic and bubonic plague. This test will be of key importance for the control of plague in endemic countries.



Un test de dépistage de la peste pour les archéologues

PALEOMICROBIOLOGIE

Détection de l'antigène F1 de *Yersinia pestis* dans les restes humains anciens à l'aide d'un test de diagnostic rapide

Raffaella Bianucci ^{a,*}, Lila Rahalison ^b, Ezio Ferroglio ^c, Emma Rabino Massa ^a, Michel Signoli ^{d,e}

Un test de diagnostic rapide par bandelette (RDT), qui détecte l'antigène F1 de *Yersinia pestis*, a été appliqué récemment sur les restes de dix-huit individus exhumés de quatre sites du Sud-Est de la France, correspondant à des sépultures de pestiférés contemporains des XVI^e, XVII^e et XVIII^e siècles. L'antigène F1 de *Y. pestis* a été détecté dans les restes de douze individus sur dix-huit testés (67%). Bien entendu, des témoins négatifs ont été utilisés et ont tous confirmé leur négativité à l'antigène pesteux (100%). Les résultats obtenus démontrent que le seuil de détection du RDT peste (0,5 ng/ml) est suffisant pour garantir une première diagnose rétrospective de l'infection pesteuse, même sur les restes humains anciens, témoignant à la fois de la grande sensibilité et de la haute spécificité du test. L'identification de la nature pesteuse de l'infection a eu lieu, en aveugle, en utilisant deux techniques différentes (RDT et « PCR suicide »). La double confirmation de la cause du décès a été obtenue en identifiant l'antigène F1 de *Y. pestis* ainsi que les gènes *Y. pestis* *pla* et *gplD*, ce qui nous permet d'émettre avec certitude un diagnostic sur l'étiologie de la maladie. *Pour citer cet article : R. Bianucci et al., C. R. Biologies 330 (2007).*

© 2007 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

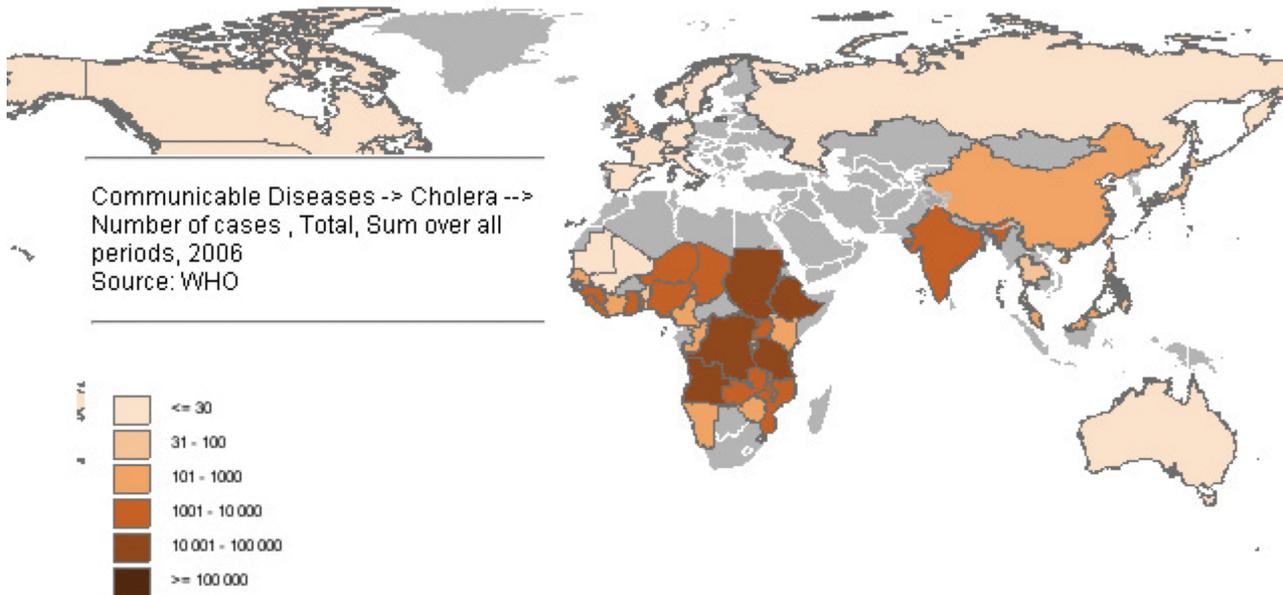
Development and Evaluation of Two Simple, Rapid Immunochromatographic Tests for the Detection of *Yersinia pestis* Antibodies in Humans and Reservoirs

Background: Tools for plague diagnosis and surveillance are not always available and affordable in most of the countries affected by the disease. *Yersinia pestis* isolation for confirmation is time-consuming and difficult to perform under field conditions. Serologic tests like ELISA require specific equipments not always available in developing countries. In addition to the existing rapid test for antigen detection, a rapid serodiagnostic assay may be useful for plague control.

Methods/Principal Findings: We developed two rapid immunochromatography-based tests for the detection of antibodies directed against F1 antigen of *Y. pestis*. The first test, SIgT, which detects total Ig (IgT) anti-F1 in several species (S) (human and reservoirs), was developed in order to have for the field use an alternative method to ELISA. The performance of the SIgT test was evaluated with samples from humans and animals for which ELISA was used to determine the presumptive diagnosis of plague. SIgT test detected anti-F1 Ig antibodies in humans with a sensitivity of 84.6% (95% CI: 0.76–0.94) and a specificity of 98% (95% CI: 0.96–1). In evaluation of samples from rodents and other small mammals, the SIgT test had a sensitivity of 87.8% (95% CI: 0.80–0.94) and a specificity of 90.3% (95% CI: 0.86–0.93). Improved performance was obtained with samples from dogs, a sentinel animal, with a sensitivity of 93% (95% CI: 0.82–1) and a specificity of 98% (95% CI: 0.95–1.01). The second test, HIgM, which detects human (H) IgM anti-F1, was developed in order to have another method for plague diagnosis. Its sensitivity was 83% (95% CI: 0.75–0.90) and its specificity about 100%.

Conclusion/Significance: The SIgT test is of importance for surveillance because it can detect Ig antibodies in a range of reservoir species. The HIgM test could facilitate the diagnosis of plague during outbreaks, particularly when only a single serum sample is available.

CHOLERA



OMS : 300 000 cas et 10.000 morts (1998)

Maladie très contagieuse épidémique

Sans traitement, mortalité 20 - 50%

Prise en charge rapide (24- 48 h)

Vibrio cholerae: sérogroupes O1 et O139 (nouveau)

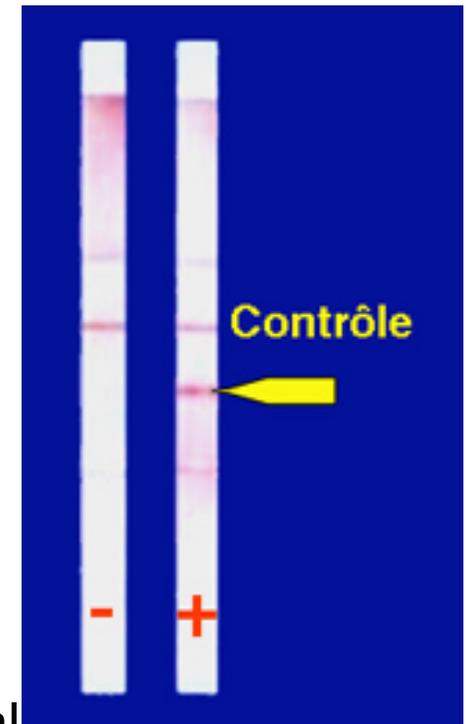
Pas de protection croisée entre ces groupes

Donc détection au début d'épidémie

Convaincre les autorités sanitaires

Risque d'explosion important si O139 (population naïve).

Nato F. et al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stools samples. Clin Diagn Lab Immunol. 2003



Principe

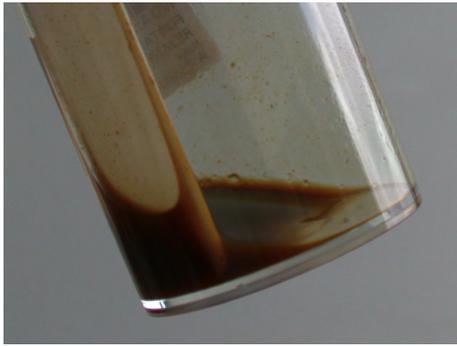
Immuno-chromatographie sur membrane classique
Ac monoclonaux anti-LPS *V.cholerae* O1/O139 + Or colloïdal,
Autre Ac immobilisé en ligne sur membrane de nitrocellulose.
Complexes Ac-Ag (technique **sandwich**) visualisés par ligne rouge.

Performances

Spécificité Ag souches 100%
Spécificité Selles 97% et 96% pour O1 and O139 dipsticks.
Bonne stabilité à température ambiante (pays développés)
Test rapide (15mn), simple, pratique au lit du malade
sur selles (diluées en PBS ou non) sur eau douteuse

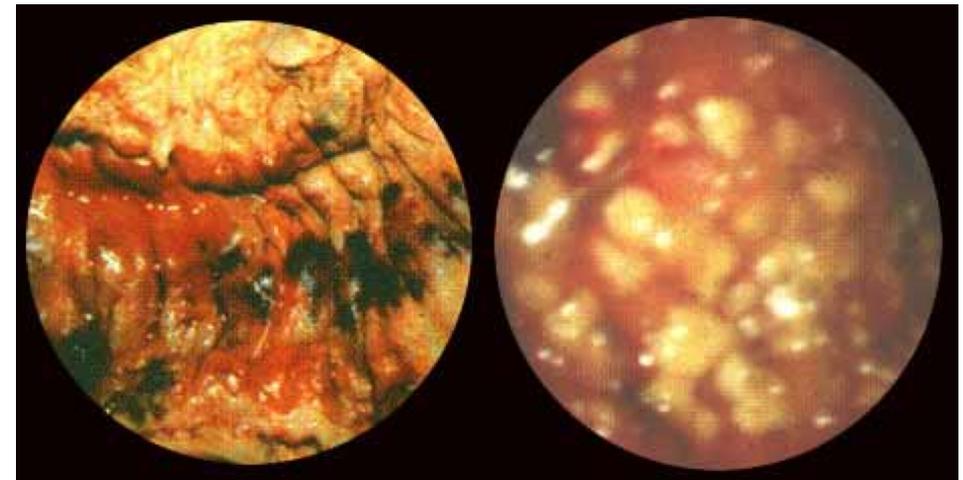
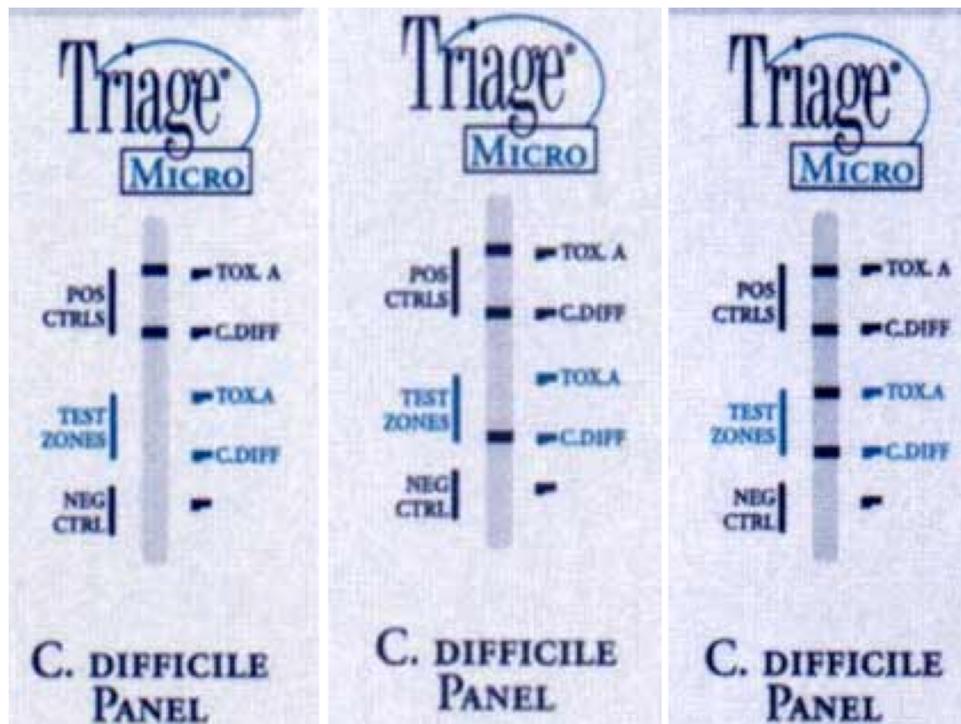
AUTRES DIARRHEES

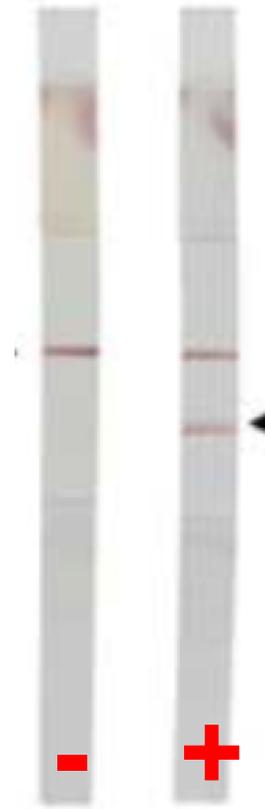
Sur selles



Shigella flexneri 2a agent d'une forme endémique (2007)
Shigella dysenteriae, agent d'une forme épidémique

Clostridium perfringens (entérotoxines) agglutination de particules de latex
Clostridium difficile (toxines) immunochromatographie sur membrane





DIPSTICK FOR RAPID DIAGNOSIS OF SHIGELLA FLEXNERI 2a IN STOOL Nato F. et al., PlosOne 2007

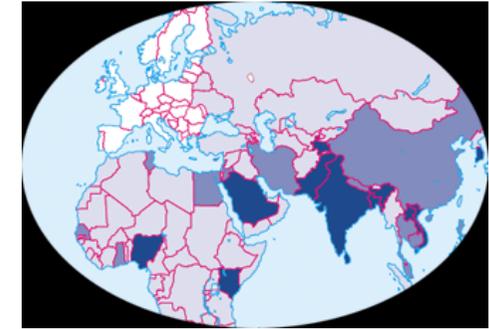
Background. Shigellosis or bacillary dysentery, an acute bloody diarrhoea, is a major public health burden in developing countries. In the absence of prompt and appropriate treatment, the infection is often fatal, particularly in young malnourished children. Here, we describe a new diagnostic test for rapid detection, in stool, at the bedside of patients, of *Shigella flexneri* 2a, the most predominant agent of the endemic form of the disease. Methodology/Principal Findings. The test is based on the detection of *S. flexneri* 2a lipopolysaccharide (LPS) using serotype 2a-specific monoclonal antibodies coupled to gold particles and displayed on one-step immunochromatographic dipstick. A concentration as low as 20 ng/ml of LPS is detected in distilled water and in reconstituted stools in under 15 minutes. The threshold of detection corresponds to a concentration of 5×10^7 CFU/ml of *S. flexneri* 2a, which provides an unequivocal positive reaction in three minutes in distilled water and reconstituted stools. The specificity is 100% when tested with a battery of *Shigella* and unrelated strains, in culture. When tested in Vietnam, on clinical samples, the specificity and sensitivity were 99.2 and 91.5%, respectively. A decrease of the sensitivity during the evaluation on stool samples was observed after five weeks at room temperature and was due to moistening of the dipsticks caused by the humidity of the air during the fifth week of the evaluation. This drawback is now overcome by improving the packaging and providing dipsticks individually wrapped in waterproof bags. Conclusion. This simple dipstick-based test represents a powerful tool for case management and epidemiological surveys.

TDR EVALUATION: C.DIFFICILE

IA	Sensitivity (%) ^a	Specificity (%) ^a	PPV (%) ^a	NPV (%) ^a
Cytoclone A/B	73.3	99.1	90.2	97.1
ICard antigen	80.2	92.5	54.4	97.7
ICard toxin A	56.4	99.7	95.0	95.3
ICard panel ^b	55.4	92.2	44.4	94.9
Prima A	82.2	98.3	84.7	98.0
Tox A/B	77.2	99.4	94.0	97.5
Triage antigen	89.1	89.7	49.2	98.7
Triage toxin A	59.4	99.6	93.8	95.6
Triage panel ^b	59.4	89.7	39.2	95.2
VIDAS A	70.3	98.9	87.7	96.8

^a Résultats en rapport avec la recherche d'ECP

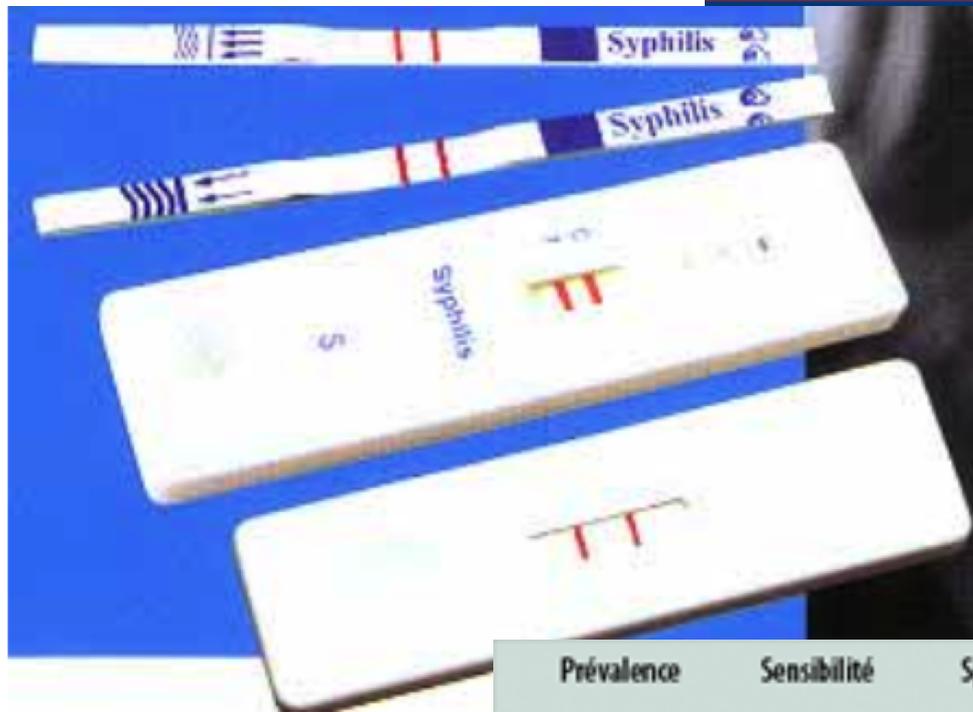
FIÈVRE TYPHOÏDE



	Antibodies	Country		Sensibilité	Spécificité	VVP	VPN
Tubex S typhi 09 antigen	Immunoglobulin M	Vietnam ^{229*}					
Dipstick S typhi Lipopolysacchride antigen	Immunoglobulin M	Vietnam ^{229*}	IgM	87	76	77	84
			IgM	48	98	99	65
	Immunoglobulin G	Vietnam ^{228†}	IgG	89	50	83	60
	Immunoglobulin M	Indonesia ^{130†}	IgM	65,3	100	100	61
	Immunoglobulin M	Indonesia ^{134†}	IgM	86,5	88,9	90,4	66,6
Typhidot Dot-ELISA S typhi 50 _r D OMP	Immunoglobulins G or M	Vietnam ^{228†}					
				Sensibilité	Spécificité	VVP	VPN
	Immunoglobulins G or M, alone or in combination	Pakistan ^{132*}	IgM, IgG	79	89	96	59
			IgM, IgG	94	77	88	87
	Immunoglobulins G + M	India ^{139†}	IgM, IgG	100	80	83,3	100
Typhidot M Dot-ELISA S typhi 50 _r D OMP	Immunoglobulin M	Pakistan ^{132*}	IgM ou IgG	73	89	95	55

Bhan MK et al, Lancet 2005, 366: 749-762

Tests diagnostiques rapides de la syphilis



Prévalence	Sensibilité	Spécificité	VPP*	VPN**
1%	85%	95%	15	100
1%	90%	95%	15	100
1%	95%	95%	16	100
5%	85%	95%	47	99
5%	90%	95%	49	99
5%	95%	95%	50	100
10%	85%	95%	65	98
10%	90%	95%	67	99
10%	95%	95%	68	99
15%	85%	95%	75	98
15%	90%	95%	76	98
15%	95%	95%	77	99

LEPTOSPIROSE



leptorapide[®]

Leptorapide: a simple, rapid, one step test that detects the presence of *Leptospira*-specific antibodies in less than 3 minutes.

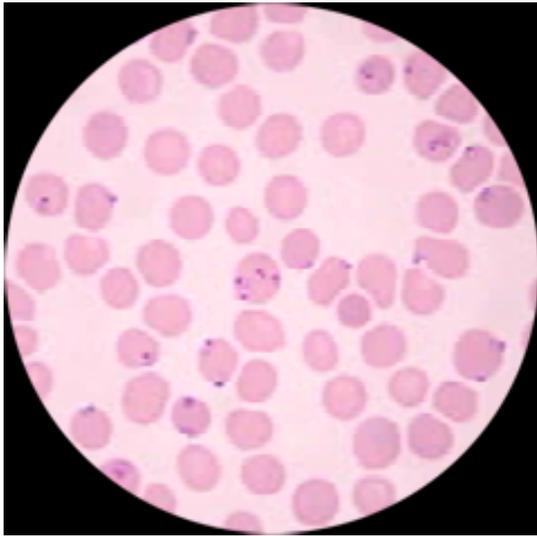
Assay Performance	Leptorapide
% sensitivity	90.91
% specificity	95.24
Kappa Index	0.864
Sensitivity: 90.91%	
Specificity: 95.24%	

Ann Trop Med Parasitol. 2004 Dec;98(8):843-50.

Rapid serological assays for leptospirosis are of limited value in southern Vietnam.

Wagenaar JF, Falke TH, Nam NV, Binh TQ, Smits HL, Cobelens FG, de Vries PJ.

TDR Paludisme



Goutte épaisse: Examen microscopique beaucoup plus long, compliqué

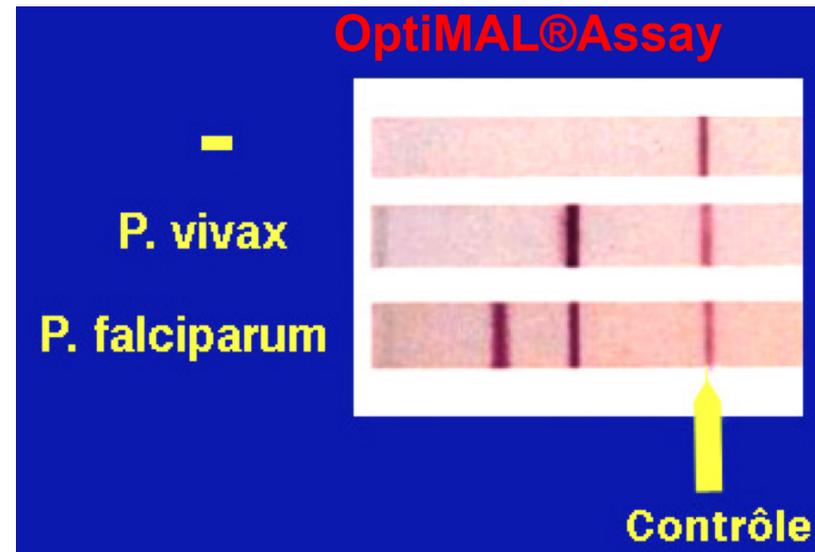
Immunocapture sur bandelette sur sang total

Binax NOW® ICT Malaria : Ag circulant (protéine HRP-II *P. falciparum*) + Ag antigène commun (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*) HRP-II secrété à tous les stades du parasite sauf gamétocytes circulants.

OptiMAL® : enzyme pLDH *P. falciparum*; enzyme pLDH *P. vivax*; pLDH commun aux Plasmodium. Enzyme produite par parasites vivants.

Intérêt

- . Réalisation facile en 10 minutes
- . Différenciation possible de chaque espèce
- . Sensibilité 83-100%, spécificité 96%, VPP 95%, VPN 100% (Binax).
- . Conservation de 2 à 30°C (plutôt en réfrigérateur)



Limites

- . Mis en défaut si faible parasitémie
- . Association possible avec un *P. vivax*
- . Résultat négatif de Binax NOW® n'exclut pas la présence éventuelle de *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae*.
- . HRP-II détecté lors d'un traitement alors que les parasites ne sont plus visibles *dans le sang*.

Ces TDR intéressants ne remplacent pas le frottis sanguin.

Autres maladies parasitaires

- **Leishmaniose viscérale (à l'étude):**
test immunochromatographique *IT-Leish*® : sensibilité et spécificité proches de 100% chez les sujets négatifs pour le VIH, sensibilité faible chez les sujets VIH positifs
- **Giardiose et Cryptosporidiose (pour mémoire):**
tests immunochromatographiques sur carte, permettant la détection simultanée de *Giardia intestinalis* et de *Cryptosporidium spp*

Selles, ICM ou EIA, conservation de 2 -8°C, 15 min

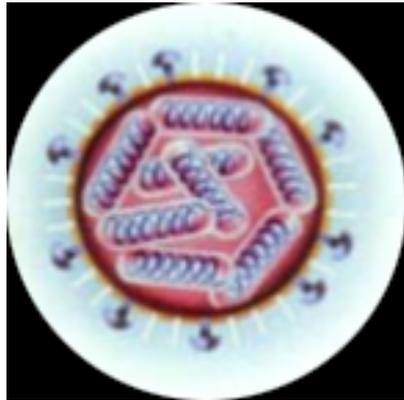
TDR EN VIROLOGIE

Rapid biological diagnosis in an epidemic context: present situation, prospectives

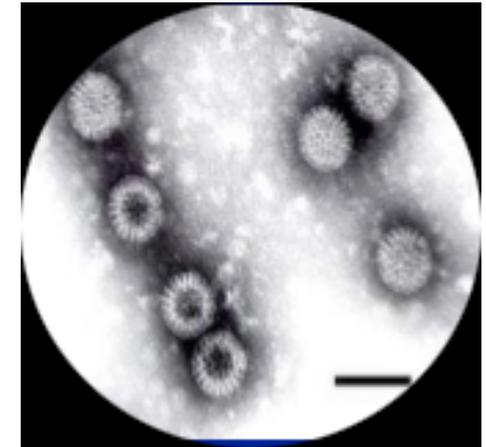
M. Chakour ^a, J.L. Koeck ^b, J. Maslin ^b, E. Nicand ^b, M. Chadli ^a, J.Y. Nizou ^b, Y. Buisson ^{b,*}

Med. Mal. Infect. 2003

Trousses commercialisées pour le diagnostic rapide des infections virales						
agents pathogènes	Nom du test et fabricant	Principe du test	Conservation du kit (°C)	Échantillon	Durée (min)	Équipement spécial
<i>Adénovirus</i>	Adenolex [®] K (Fumouze Diagnostics, France)	• Détection d'Ag par agglutination de particules latex sensibilisées	+4 °C	Selles	15 min	Néant
	Diarlex [®] /LA (Orion Diagnostica, Espagne)	• Détection d'Ag par agglutination de particules latex sensibilisées	+4 °C	Selles	15 min	Néant
	Diarlex [™] MB K (Fumouze Diagnostics, France)	• Détection d'Ag par immunochromatographie	+4 °C	Selles	15 min	Néant
	Diarlex [®] Rota-Adeno K (Fumouze Diagnostics, France)	• Détection d'Ag par agglutination de particules latex sensibilisées	+4 °C	Selles	15 min	Néant
	Rapid Diagnosis of Adenovirus (SA Scientific Inc, Royaume-Uni)	• Détection d'Ag par immunochromatographie	+4 °C	Prélèvement bronchique	15 min	Néant
	Sas Adenotest (SA Scientific Inc, Royaume-Uni)	• Détection d'Ag par immunochromatographie	+4 °C	Prélèvement conjonctival	15 min	Néant
	<i>Rotavirus</i>	Diarlex [™] Rota-Adeno K (Fumouze Diagnostics, France)	• Détection d'Ag par agglutination de particules latex sensibilisées	+4 °C	Selles	15 min
Rotalex [®] K (Orion Diagnostica, Espagne, distribué par Fumouze Diagnostics, France)		• Détection d'Ag par agglutination de particules latex sensibilisées	+4 °C	Selles	15 min	Néant
Diarlex MB K (Fumouze Diagnostics, France)		• Détection d'Ag par immunochromatographie	+4 °C	Selles	15 min	Néant
Rotastick One-Step Test (Novamed, Israël)		• Détection d'Ag par immunochromatographie	+4 °C	Selles	15 min	Néant
Combo Rota /adeno Dipstick (All Diae...)		• Détection d'Ag par	+4 °C	Selles	15 min	Néant



TDR EN VIROLOGIE



Agent	Ag	Techniques	Conservat	Echantillon	Durée	Sensibilité	Spécificité
Rotavirus	O	AGL ICM ICB	4°C	Selles	15'	96-100	97-99,3
Adenovirus	O	AGL ICM ICB	4°C	Selles	15'	90 -95	98,3-100
Orthomyxov influenzae AB	O	ICB ICM IE	4°C	Rhinopharynx, s.nasales	< 30'	39-76%	82-98%
Virus syncytial respiratoire	O	ICB ICM Dot	4/20-30°C	Rhinopharynx	15'	80-90%	95%
Epstein Barr Virus	O	ICM IE	4°C	Sang	5/2h	96-99%	96-99%
VIH	N	ICM	4°C	Sang, sérum, salive, urine	15'	95,2-99,3	>99%
Dengue	N	ICB	2-30°C	Sérum, plasma, sang	20'-2h	50-90%	100%(IgM)

VHA	N	IC		Salive (IgM), Sang (IgM)		80-100%	100%
VHC	O	IC					
VHB	ON	IC		Sang		100%	99,60%
VHE	N	IC		Sang		53%	98,60%
VHE	O	IC			2-3'	96,70%	98,60%

O, oui (Ag); **N** (Ac); **APL**, agglutination sur particules de latex; **ICM**, immunochromatographie sur membrane; **ICB**, immunochromatographie sur bande

Principaux avantages

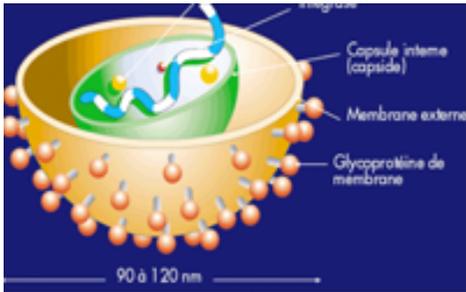
- Simplicité, rapidité (culture Adenovirus 2-7 J ME)
- Spécificité, Sensibilité
- Diminution du coût de la prise en charge
- Si +, gestion du risque avec une prise en charge précoce (Rotavirus, VRS, AES



Principaux inconvénients

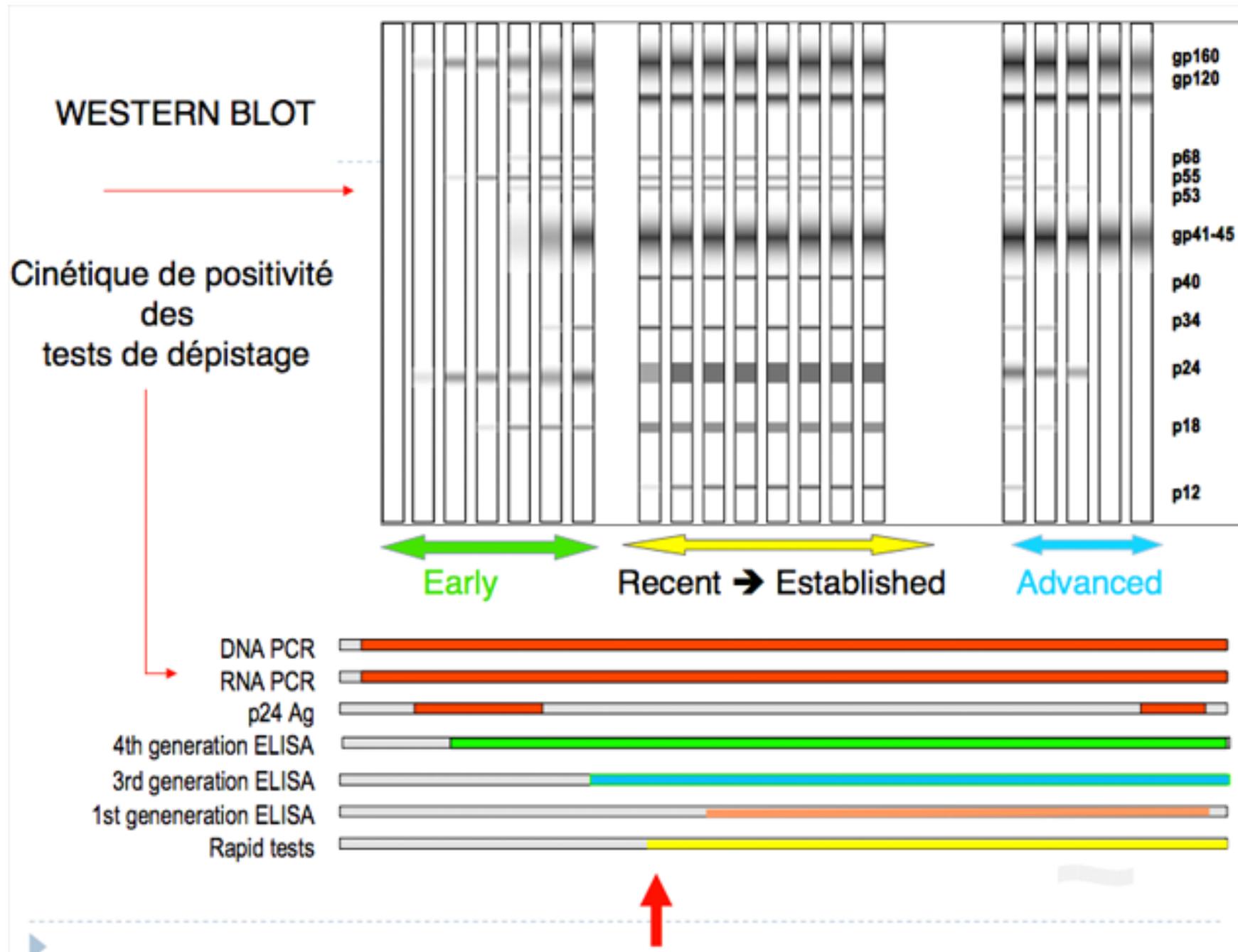
- Faux positifs : qualité du prélèvement (sang)
- 1 recherche à la fois, donc coût
- Faux négatifs (interférence avec sang)
- Si –, confirmer par tests conventionnels
- Si +, ne peut exclure un autre pathogène,
- Si +, confirmer par tests conventionnels (VIH, Dengue)

HIV



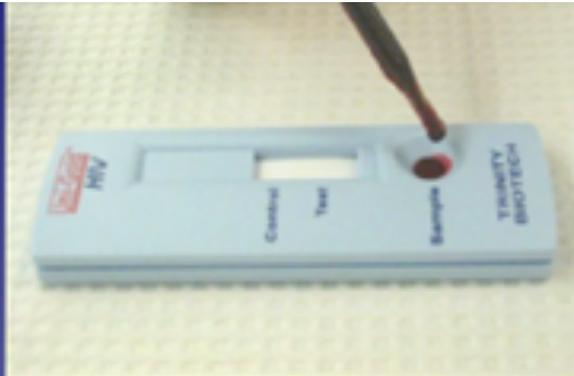
	Tests rapides	Tests ELISA 4^{ème} génération
Avantages	<ul style="list-style-type: none">➤ facilité d'emploi,➤ stockage à température ambiante,➤ réalisable en tout lieu, tout endroit➤ résultats satisfaisants en termes de sensibilité et de spécificité lors de la phase chronique de l'infection	<ul style="list-style-type: none">➤ grande sensibilité y compris en primo-infection➤ excellente spécificité➤ facilement évaluable sur les panels congelés,➤ automatisables à haut débit➤ Réalisés à 37°➤ prix avantageux➤ traçabilité et enregistrement informatique des résultats.
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none">➤ manque de sensibilité dans les phases précoces de l'infection➤ manque de traçabilité, les résultats ne pouvant être enregistrés,➤ subjectivité de lecture➤ problème d'élimination des déchets infectieux si utilisés en dehors des circuits de soins habituels➤ prix généralement élevé	<ul style="list-style-type: none">➤ nécessité de chaînes de froid d'électricité et de structures minimales de laboratoire

Selon note de Simon F.



Selon note de Simon F.

QUELS PRELEVEMENTS ?



Uni-Gold Recombigen



Multispot HIV-1/HIV-2



Clearview Complete HIV 1/2



Reveal
G3



OraQuick
ADVANCE



Clearview HIV 1/2 Stat Pak

Slide presented by Dr. Branson at
the 2007 HIV Diagnostics Conference

Quels réactifs ?

Marché mondial anarchique : > 80 tests, nombreux fabricants, vendeurs et revendeurs (voir du même test !)

€ 23.00 EUR

ORDER

DPP Reader

CHEMIO

HIV 1/2 SCREEN TEST KIT

Trinity BioTech

HomeTest Kit

RAPID HIV TEST

Buy Now

99.8%

Selon note de Simon F.

Tableau 16. Performances diagnostiques des TDR marqués CE et distribués en France au 1^{er} décembre 2007.

	Sensibilité	Spécificité
Core HIV1/2	98 ^E /100	50/50 100,0%
Determine HIV 1-2	100/100	49/50 98,0%
DoubleCheck II HIV 1+2	100/100	50/50 100,0%
ImmunoComb II HIH 1+2 BiSpot	100/100	50/50 100,0%
Immunoflow HIV1-HIV2	99 ⁺ /100	50/50 100,0%
INSTI HIV 1/2	100/100	50/50 100,0%
Retroscreen HIV	99 ⁺ /100	50/50 100,0%
Vikia HIV 1/2	100/100	50/50 100,0%

**Source Afssaps
Rapport HAS 2008**

la confirmation des infections par le Western Blot

**western blot VIH-1 avec les poids moléculaires des principaux antigènes
(New Lav blot 1, Biorad-Pasteur).**



EVALUATION DES 6 TESTS CE SANG TOTAL ET SALIVE ST LOUIS - AFSSAPS

n =200	Oraquick Oral fluid Ac	Oraquick Blood Ac	Vikia blood	Determine Blood Ac	Determine Ag +Ac 4 th blood	INSTI Blood Ac
Negatif	27	11	3	10	7	2
Douteux	10	6	1	1	7	4
Invalide	0	0	0	4	33	2
Positif	163	183	196	185	153	192
Sensibilité	86.5% p = 0.02	94.5%	98.5%	94.9%	95.8%	99%

Molina JM, Simon F. 2010

LIMITES DES TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDE SUR SANG CAPILLAIRE ET SALIVE EN SITUATION HORS LABORATOIRE en 2010

- ▶ 1- Difficulté d'évaluation sur sang total et salive des primo infections
- ▶
- ▶ 2- Sensibilité moindre (primo-infection) que les tests Elisa y compris dans les mois suivants la séroconversion en EIA
- ▶ 3- Lecture subjective ; fréquence des faux positifs
- ▶ 4- Archivage difficile (photo ?), DBS ?
- ▶ 5- Négligence des autres IST, absence de TDR pour HBV/HVC obligeant à EIA, Σ ,

Mais souvent le choix n'est pas au rendez vous !!

Il faut être exigeant sur la sélection du test et montrer aux bailleurs qu'un bon diagnostic est le premier pas de la prise en charge et que :

« Reduce the cost but not all price »

PLACE DES TDR



Microscopie	0,5 E
Culture	10-20 E
Sérologie	10-15 E
PCR	4-10 E
TDR	0,8-3 E

Chanteau S. Nato F.

Tests de diagnostic rapide : succès et réserves S. Chanteau, F. Nato

Bull Soc Pathol Exot, 2006, 99, 5, 409-417

Diagnostic biologique souvent inexistant (PED), même microscopie, chronicité problèmes (rupture stock, panne équipements, coupure électricité.....)
Donc TDR simples à réaliser par non biologiste, pas d'équipement, faciles à conserver, peu coûteux et rapides.

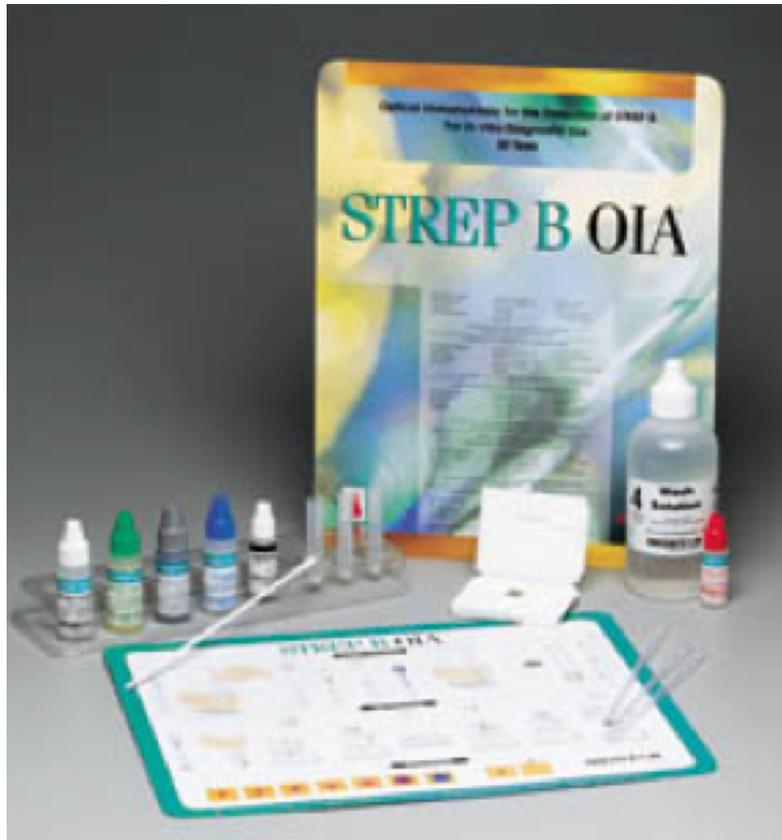
- * IMB/P avec particules or - Ac monoclonaux pour détecter Ag spécifique
- * Spécificité, sensibilité très satisfaisantes
- * Facilité de transport, de conservation et d'utilisation.
- * Contrôle de qualité intégré, 0 préparation échantillons (Sg capillaire)
- * Temps de formation court (qq heures), aucun équipement
- * Coût abordable, plus bas que tests de référence (culture, PCR)
- * Coût similaire aux tests « rapides »: microscopie, agglutination.

Leurs limites

- * Simplicité n'exclut la nécessité de CQ externes
- * Supervisions régulières au niveau régional ou central.
- * Disponibilité d'AC monoclonaux très spécifiques*
- * Confirmation quelquefois par culture ou tests de référence (PCR, ELISA)
si traitement long, onéreux, mesure prophylactique de masse, déclaration MDO

Recommandation des TDR en première ligne en zone tropicale

Strep B OIA (ThermoBioStar)



GBS colonization level ^a	TEST INUTILISABLE	
	Sensitivity	Specificity
Light	13.3 (7.1, 22.9)	98.4 (97.5, 99.0)
Heavy	41.5 (29.7, 54.4)	97.7 (96.6, 98.4)
Dense	68.4 (43.5, 86.4)	96.5 (95.2, 97.5)

GBS colonization level ^a	Positive predictive value	Negative predictive value
	Light	37.9 (21.3, 57.6)
Heavy	48.2 (34.8, 61.8)	97.0 (95.8, 97.8)
Dense	24.5 (14.2, 38.6)	99.5 (98.8, 99.8)

Thinkhamrop et al., J Clin Microbiol. 2003

TDR : conclusions

Très nombreux réactifs.

Comparaison, contrôle, réactovigilance ?



AFSSAPS 2009 H. pylori Ac totaux/ IgG, 29 réactifs (17 ELISA, 9 ICB, 3 agglutin)

Code	Dénominations commerciales (Fabricant)	Conforme		Résultats performances Contrôle du marché Mode de calcul 1	
		Notice	Performances	Sensibilité %	Spécificité %
R18	Assure H.Pylori rapid test(MP Biomedical Asie)	oui	non***	93,2	69,2
R19	H.pylori rapid test device (WB,S,P)= Cassette test rapide de H.Pylori (sang total/S/P) ref IHP 402(ACON USA)	oui	non	82,1	95,4
R20	One Step H.Pylori (S/P) = Cassette test de H.pylori 1 étape (S/P) ref IHP-302 (ACON USA)	oui	oui	97,7	84,8
R21	Immunocard H.Pylori (Meridian Bioscience Europe Italie)	oui	non	66,6	97,9
R22	H.Pylori rapid test strip (WB/S/P) ref IHP-401 (ACON USA)	non	non	81,4	95,6
R23	Aurodex H.Pylori (Dexall Biomedical USA)	oui	non	75,6	95,7
R24	ImmunoComb II H.Pylori (Orgenics Israel (Inverness))	oui	non	97,8	70,2
R25	Pyloritop Ab (AlIDiag)	oui	non	55,6	97,7
R26	Clearview H.pylori ((Unipath Ltd)	oui	oui	92,9	85,1
R27	One step H pylori rapid card serum insta test (Dg Automation Cortez USA)	non	non	59,5	84,8
R28	Pylori test ref DR0130M lot 1(Oxoid)	oui	non	84,4	97,9
	Pylori test ref DR0130M lot 2 (Oxoid)	oui	non	47,7	100
R29	Pyloriset Dry ref 5030 lot 1 (Orion Finlande)	oui	non	66,7	97,9
	Pyloriset Dry ref 5030 lot 2 (Orion Finlande)	oui	non	47,7	100

*** **Nouvel essai**

91,1

84,8

TDR vs techniques rapides ELISA au laboratoire

Résultats : Tableau 1: Bilan Initial des « conformités - non conformités » par rapport aux performances annoncées dans les notices [avant la période de concertation des fabricants]

Code	Dénominations commerciales (Fabricant)	Conforme		Résultats performances Contrôle du marché Mode de calcul 1	
		Notice	Performances	Sensibilité %	Spécificité %
ELISA Automates fermés (n=2)					
R14	H.pylori IgG Immulite 2000 (Siemens Allemagne)	oui	oui	95,6	95,5
R15	Vidas H.pylori IgG (BioMerieux)	oui	oui	95,6	89,1
ELISA (n=15)					
R1	Helicobacter Pylori IgG Elisa (IBL Hamburg, Allemagne)	oui	oui	92,9	100
R2	NovaLisa Helicobacter Pylori IgG (Novatec, Allemagne)	oui	non	93,2	87,2
R3	Ridascreen H.Pylori IgG (R.Biopharm Allemagne)	non	non	100	88,9
R4	Premier H.Pylori ref 606096 (Meridian Bioscience Europe Italie)	oui	non	97,8	85,1
R5	Bioelisa H.Pylori IgG (BioKit Espagne)	oui	oui	97,8	91,5
R6	Pyloriset EIA-G III (Orion Finlande)	oui	oui	97,8	91,5
R7	Helicobacter Pylori IgG (Virion Serion Allemagne)	oui	non***	100	73,7
R8	Enzygnost anti Helicobacter pylori II IgG (Siemens Allemagne) lot 1 (retiré du marché suite à réactovigilance)	oui	non***	100	87,2
R9	Captia H.Pylori IgG (Trinity Biotech)	oui	oui	100	81,8
R10	Gap IgG Helicobacter Pylori (Biomerica USA)	oui	non	95,2	82,3
R11	Helicobacter pylori IgG ELISA (MP Biomedical Allemagne)	oui	oui	100	97,4
R12	Platelia H.Pylori IgG (BioRad)	oui	oui	97,7	88,9
R13	Helicobacter pyloriTest system (Zeus Scientific Allemagne)	non	non	100	64,3
R16	Helicobacter Pylori IgG (BioHit Finlande)	non	oui	93,3	95,7
R17	Helicobacter pylori IgG ELISA (Dg Automation Cortez USA)	non	non	66,7	97,9

*** Oui au 2 ème essai

ELISA 11/17 (65%) vs TDR 3/12 (25%)

TESTS TRES RAPIDES (réponse < 30 minutes) **SI EQUIPEMENT**

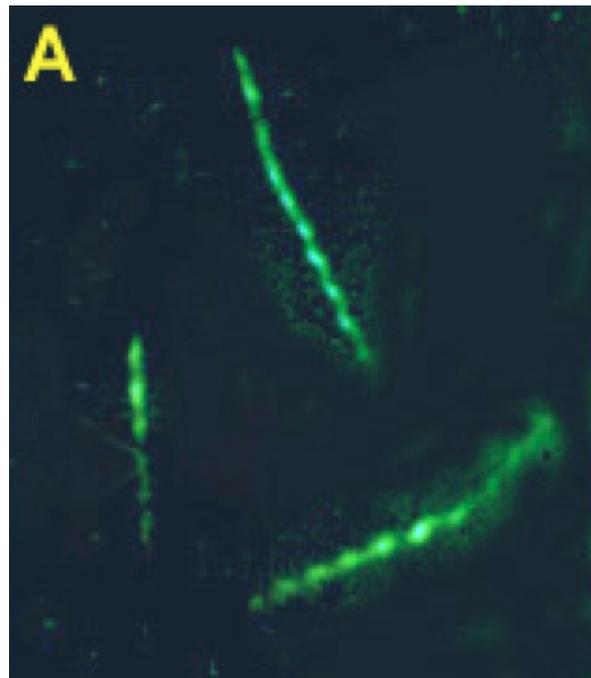
Tests simples, moins spécifiques, moins sensibles, peu onéreux, donc diagnostic d'orientation

Examen direct (ED)

- * Etat frais
- * Fonds noir
- * Coloration simple (Bleu de méthylène)
- * Coloration de Gram
- * Colorations spéciales (commémoratifs)
 - . Ziehl-Neelsen

ED : ETAT FRAIS = diagnostic bactérioscopique

Syphilis (*Treponema pallidum*)



Fonds noir

ED : DIAGNOSTIC BACTERIOSCOPIQUE

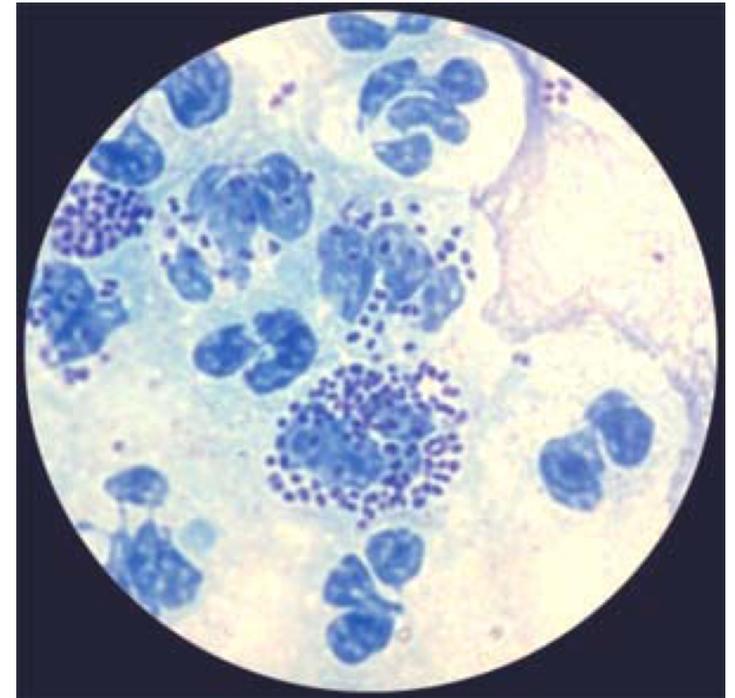
Coloration simple en un temps

Gonococcie (*Neisseria gonorrhoeae*)



pus urétral

Bleu de méthylène



COLORATION EN DEUX TEMPS : GRAM

Coloration au violet de gentiane

Fixation au Lugol

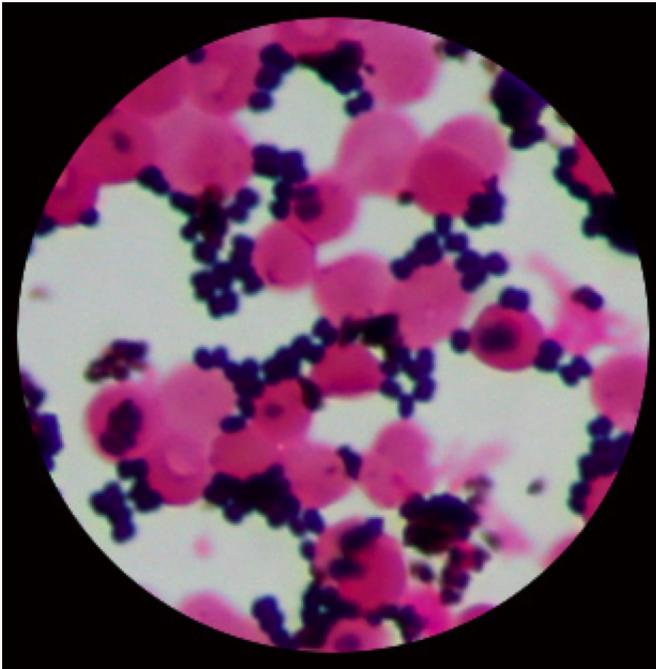
Décoloration à l'alcool

Recoloration à la fuschine

Lavage

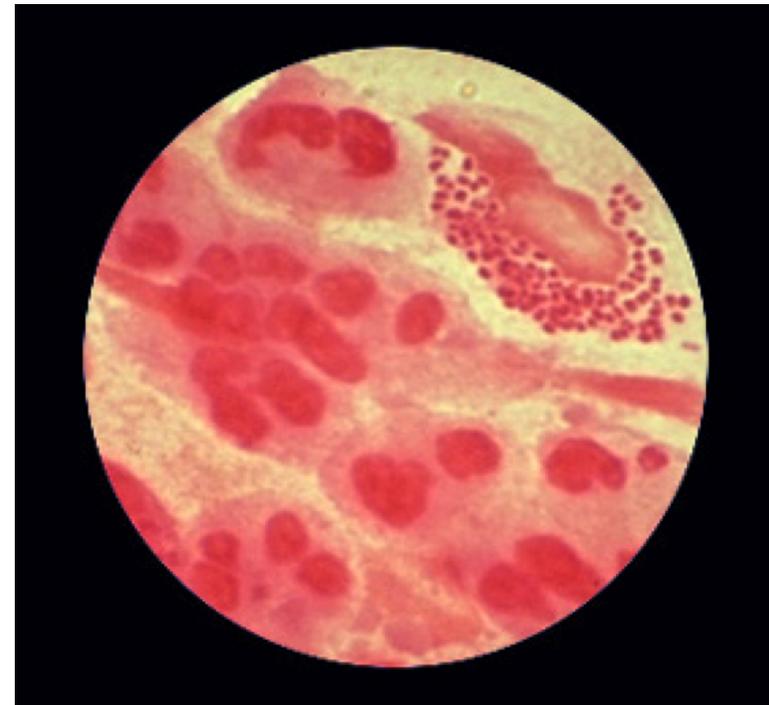


Gram +



Staphylocoque

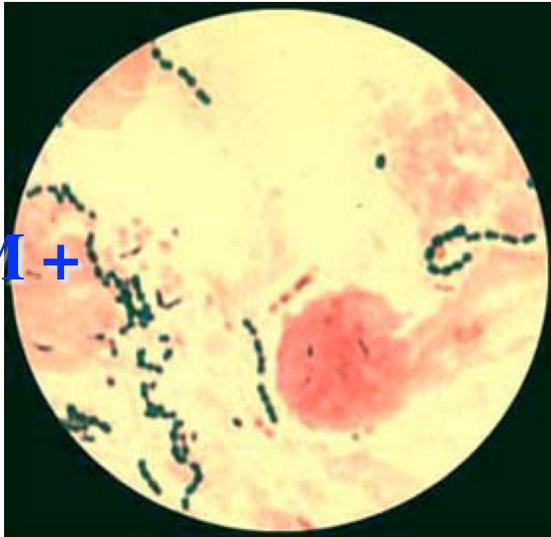
Gram -



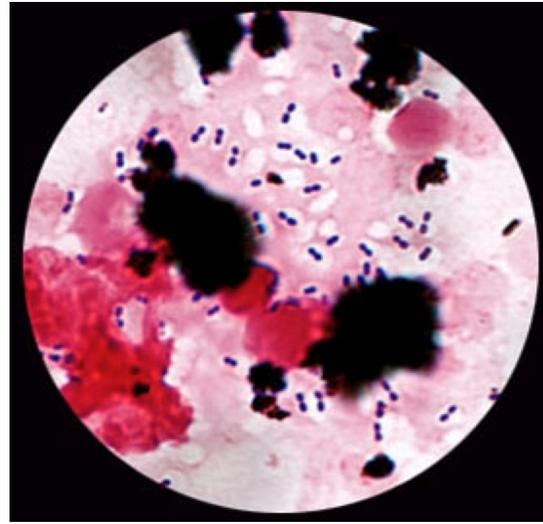
Gonocoque

COLORATION DE GRAM : MORPHOLOGIE

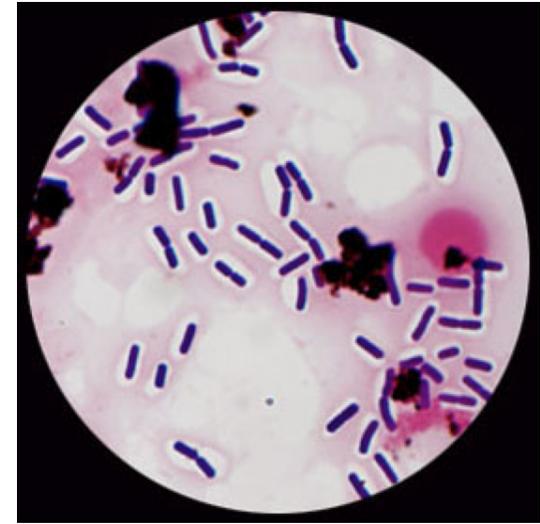
GRAM +



Streptocoques

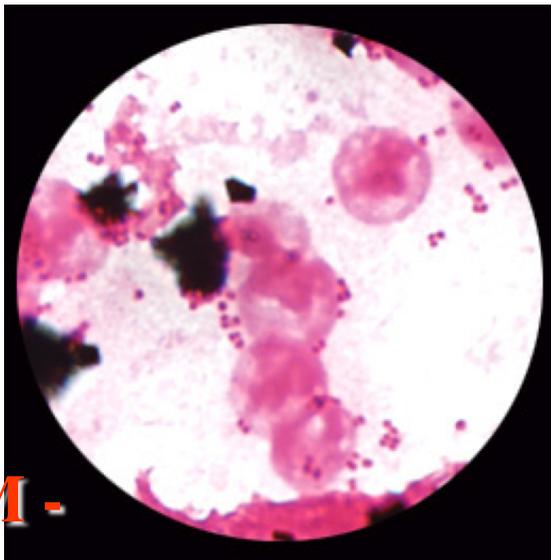


Pneumocoques

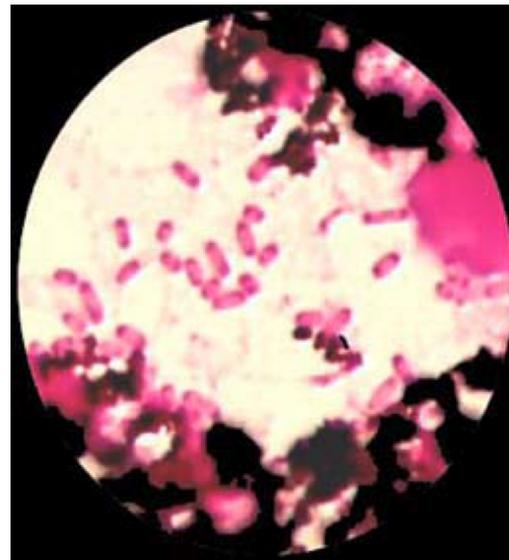


Clostridium

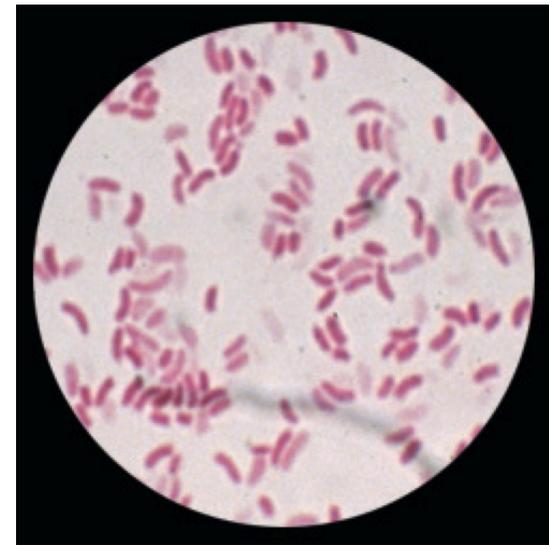
GRAM -



Méningocoque



Entérobactéries



Vibron

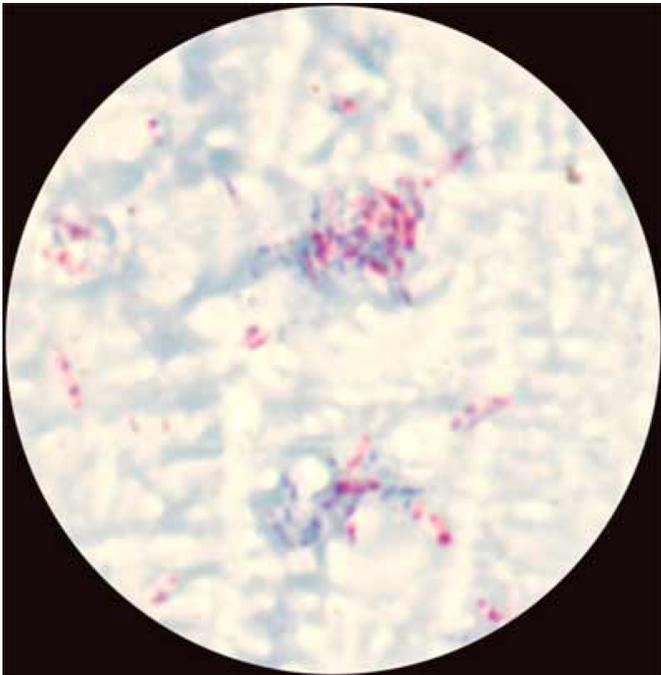
Diagnostic d'orientation , mais petit laboratoire nécessaire

ORIENTATION DIAGNOSTIQUE

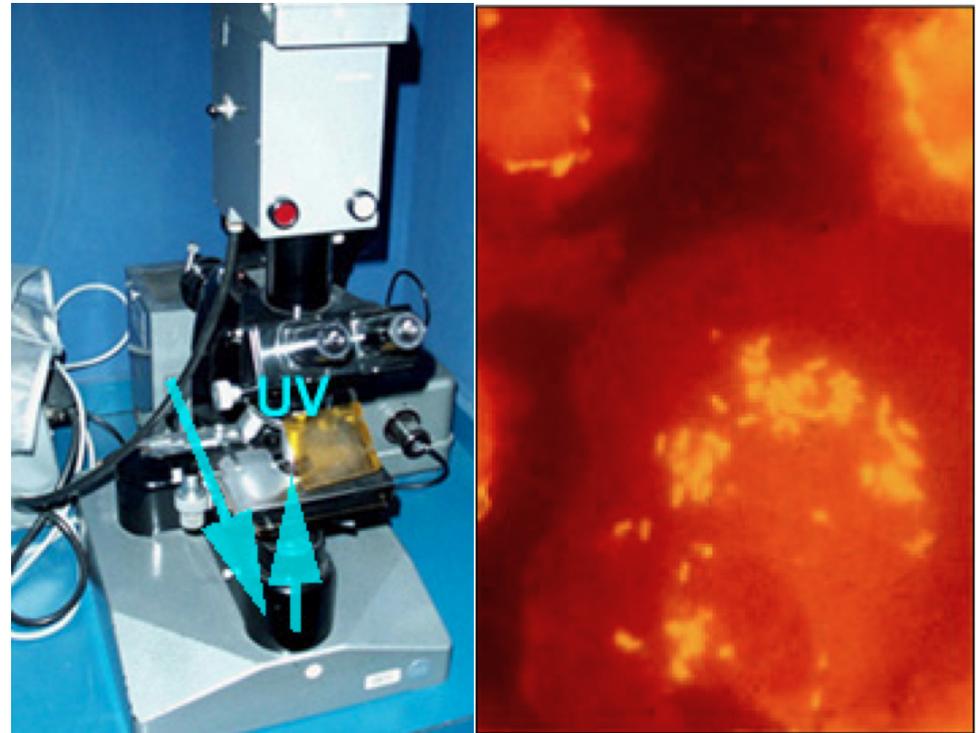
Colorations spécifiques : **BAAR**

Examen spécialisé non fait en routine donc demande spécifique

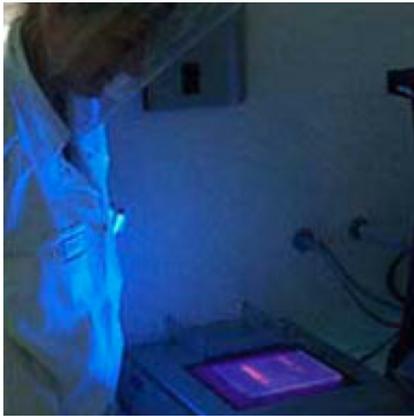
Tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*)



Coloration de Ziehl-Neelsen

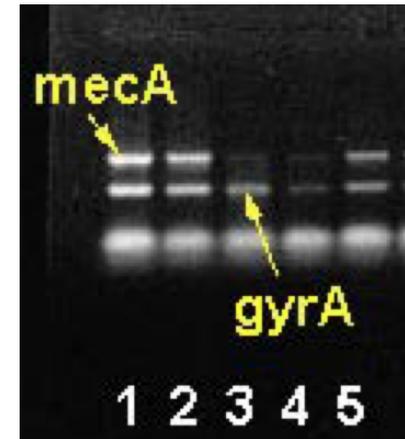


Auramine (Fluorescence)



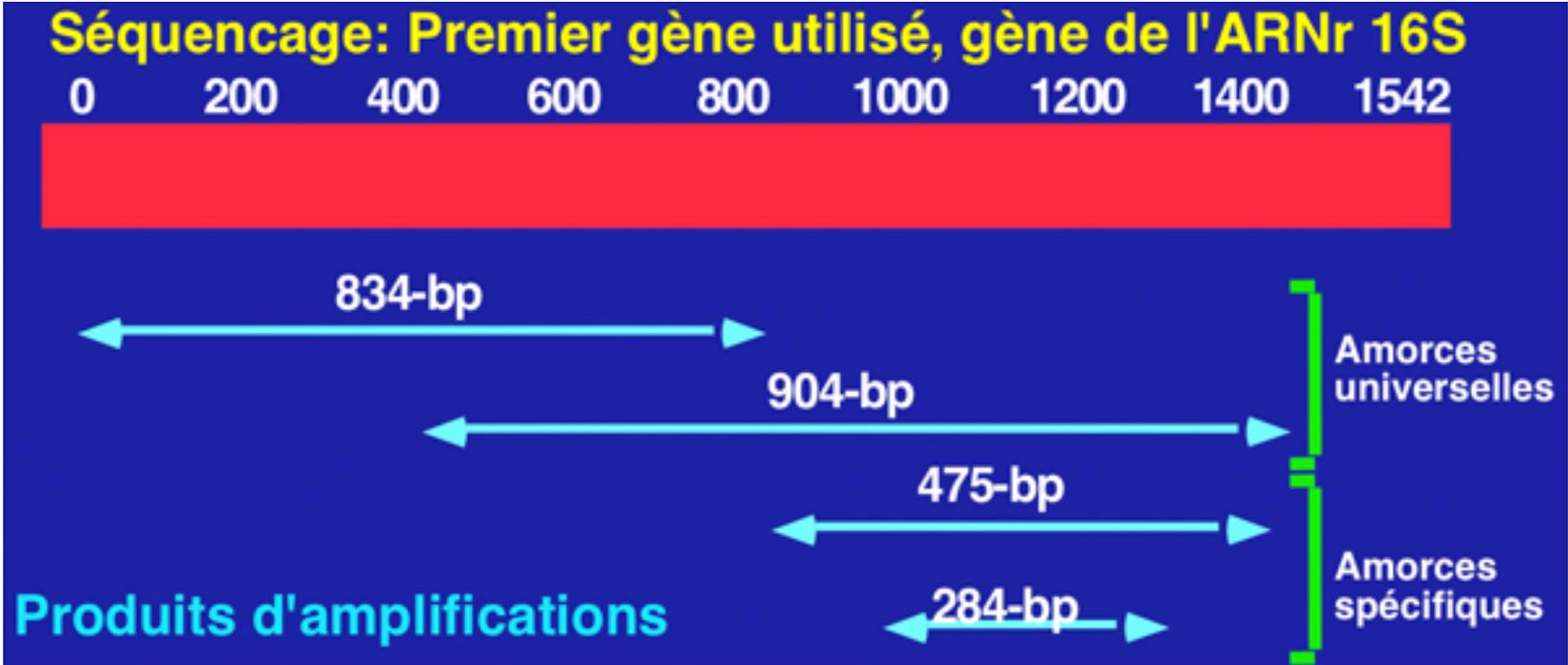
PCR : TEST RAPIDE

(réponse < 2 heures)



- PCR (Polymerase Chain Reaction), approche moléculaire
- Méthode rapide, universelle (tout micro-organisme) diversité des gènes (ARN16S, virulence, résistance aux antibiotiques...)
- Technique très spécifique, complexe, onéreuse.....
- Sensibilité moyenne en fait (LCR-BK)
- ID de germes de culture lente (plusieurs jours, semaines.....)
- ID de germes inconnus (*Rochalimea*)
- Nouvelles améliorations : automation.....(Tuberculose)
- Nombreuses modalités techniques : RT-PCR

Taxonomie moléculaire et critères génomiques (> 1985)



Amplificateur

Electrophorèse

Révélation

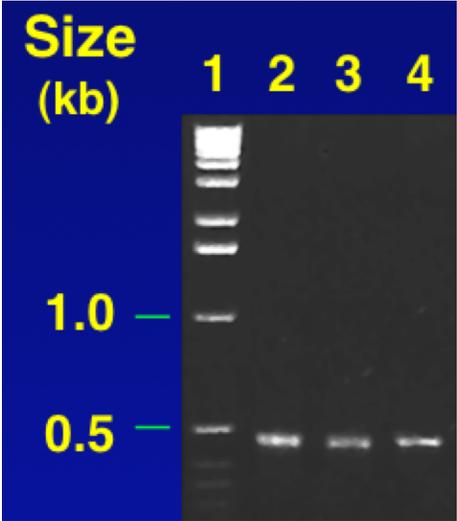
“Forward primer”

CGTGGAGGCGATCACACCGCAGAC



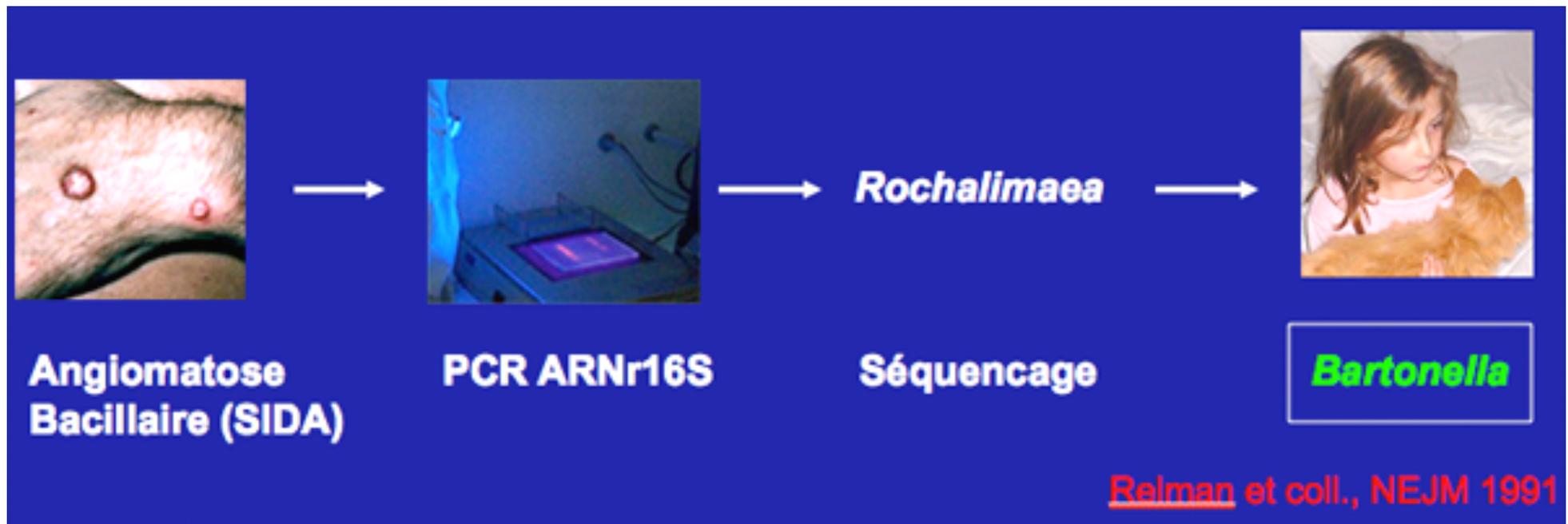
AGCTCCAGCCCCGGCACGCTCACGT

“Reverse primer”





Découverte de nouvelles bactéries non cultivables (1991)



BARTONELLA: POUVOIR PATHOGÈNE, RÉSERVOIRS



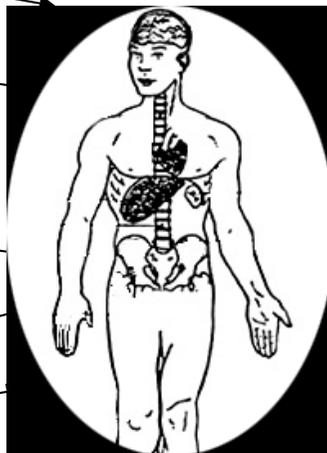
B. henselae — puce

B. clarridgeiae
B. koehlerae



B. vinsonii subsp.
berkhoffii

B. elizabethae



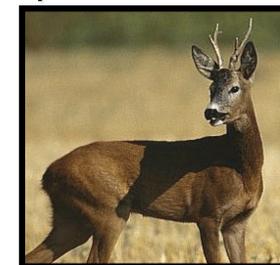
Manifestations

- . cutanées
- . hépatiques
- . cardiaques

B. bovis
B. chomelii



B. schoenbuchensis
B. capreoli



poux phlébotome



B. alsatica



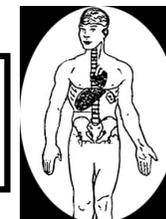
B. grahamii
B. vinsonii subsp. *arupensis*
B. vinsonii subsp. *vinsonii*

B. phoceensis
B. rattimassiliensis
B. tribocorum

B. washoensis
B. birtlesii
B. doshiae
B. peromisci
B. talpae
B. taylorii

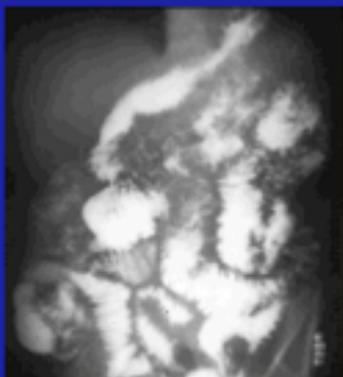


B. bacilliformis
B. quintana

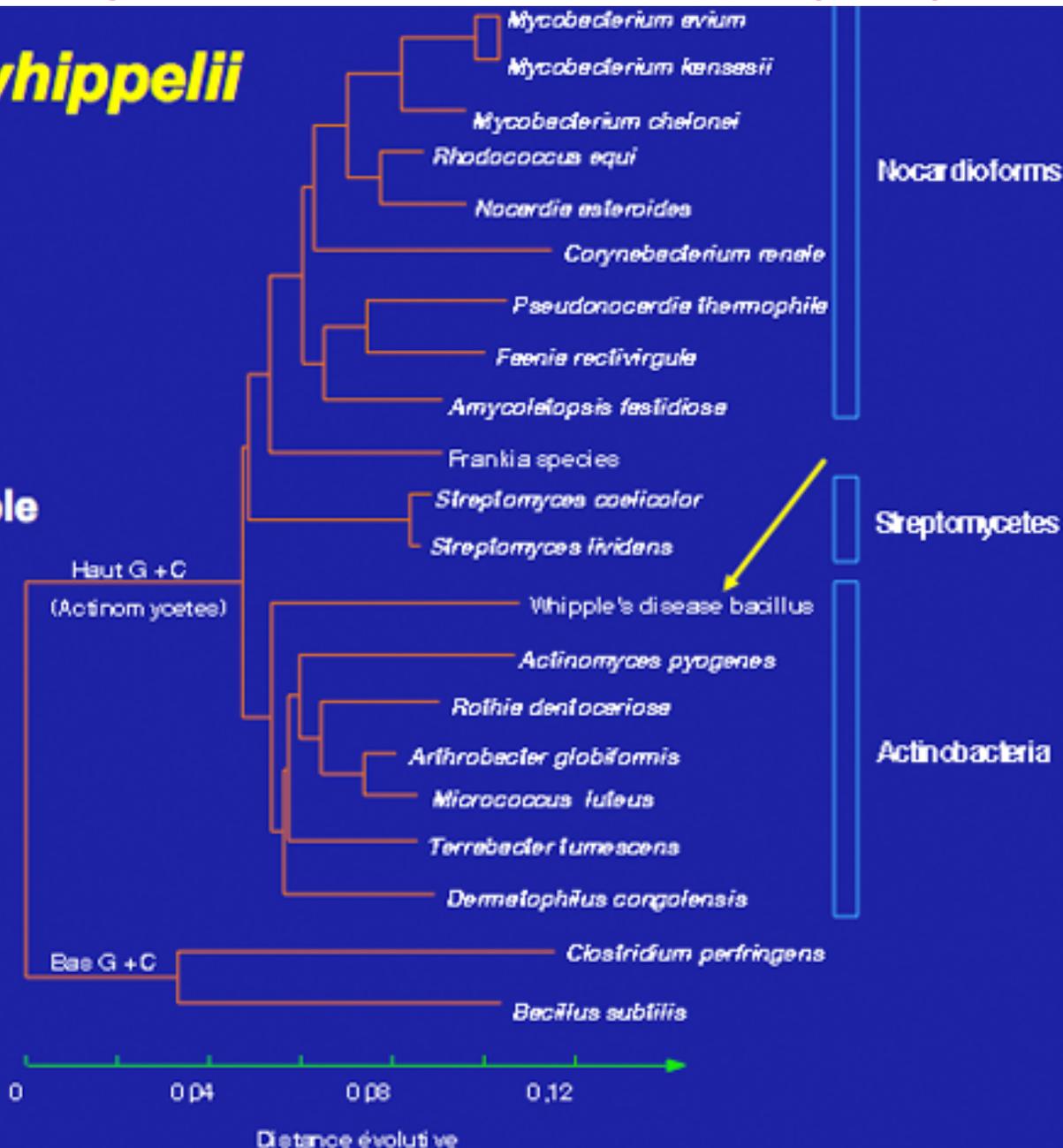


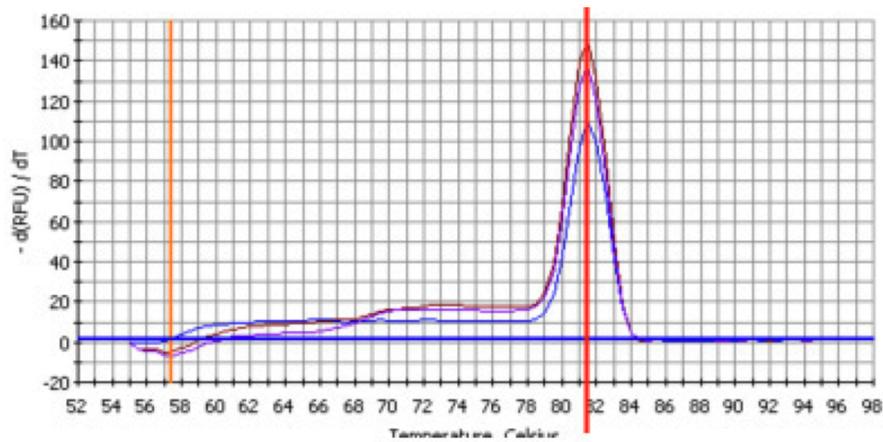
Découverte de l'agent de la maladie de Whipple (1992)

Tropheryma whippelii



Maladie de Whipple





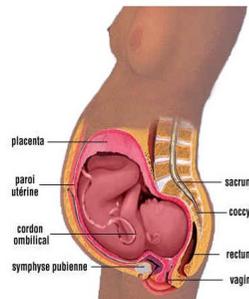
PCR EN TEMPS REEL (RT) A S. AGALACTIAE (B)

Clone hypervirulent ST17

Mère

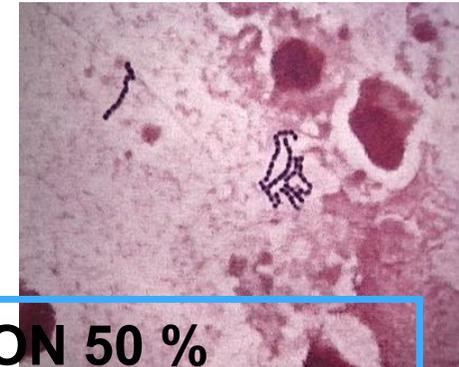
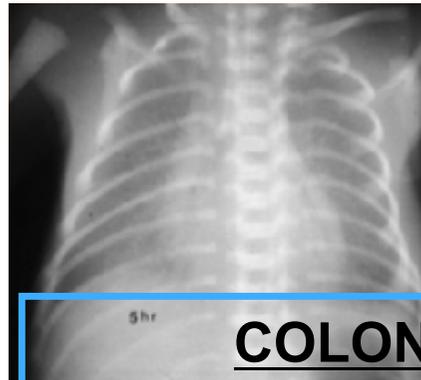
accouchement

Nouveau-Né



Colonisation vaginale
10 à 30 % des femmes
enceintes

Selon Poyart C.



COLONISATION 50 %
ASYMPTOMATIQUES 98 %
MANIFESTATIONS CLINIQUES 2 %

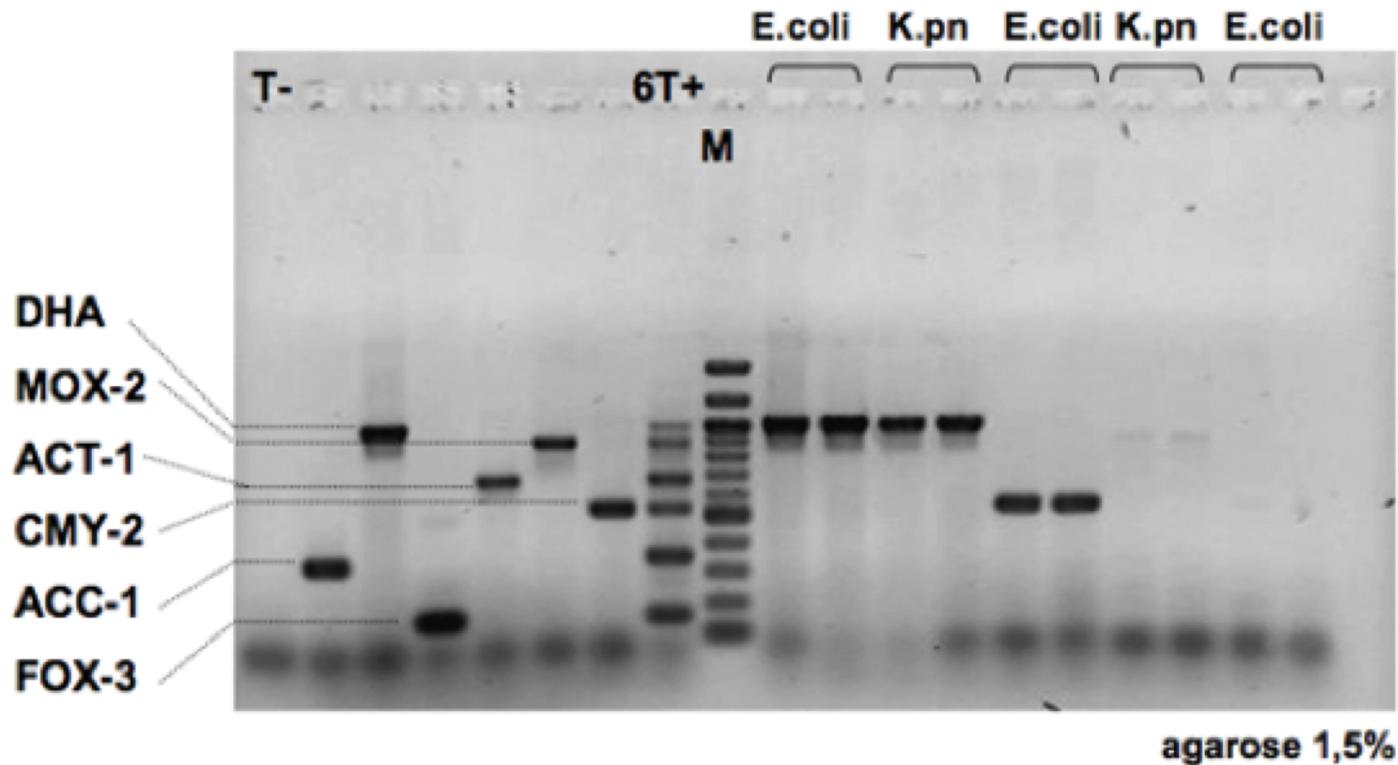
Pneumonie
Invasion
Passage épithélium
pulmonaire

Septicémie / Méningite
Dissémination

PCR MULTIPLEX

- Pneumoplex ®
- Chlamylege ®
 - *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Bordetella pertussis*

Détection rapide de céphalosporinases plasmidiques chez les Entérobactéries (Dallenne C. et al. J Clin Microbiolo, 2010)



Santé

Tuberculose : l'OMS approuve un test novateur pour diagnostiquer la maladie



08.12.2010, 18h10

[Réagir](#)



L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a approuvé, mercredi 8 décembre, l'utilisation d'un test novateur pour le diagnostic de la tuberculose. Evalué sur le terrain pendant 18 mois, ce test "d'amplification des acides nucléiques" pourrait fournir un diagnostic précoce exact de la maladie en près de 100 minutes, contre trois mois actuellement. Le test sera notamment utilisé pour le diagnostic précoce de la tuberculose, de la tuberculose multirésistante et de la tuberculose associée au VIH.

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

SEPTEMBER 9, 2010

VOL. 363 NO. 11

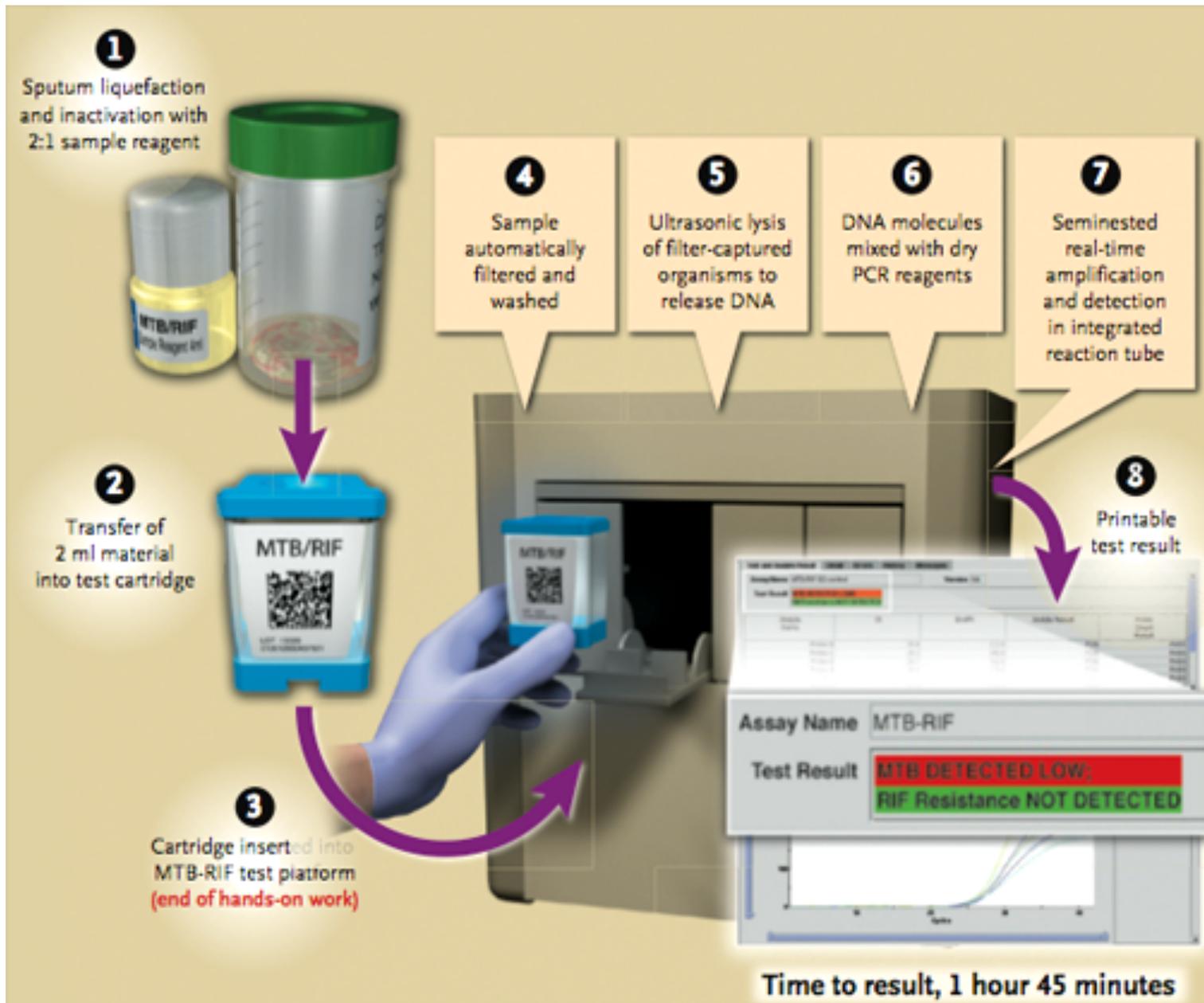
Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance

Catharina C. Boehme, M.D., Pamela Nabeta, M.D., Doris Hillemann, Ph.D., Mark P. Nicol, Ph.D.,
Shubhada Shenai, Ph.D., Fiorella Krapp, M.D., Jenny Allen, B.Tech., Rasim Tahirli, M.D., Robert Blakemore, B.S.,



90 min
Test « fermé »

RAPID MOLECULAR DETECTION OF TUBERCULOSIS AND RIFAMPIN RESISTANCE (BOEHM C. et al. NEJM, Sept)



MTB RIF : Enquête multicentrique

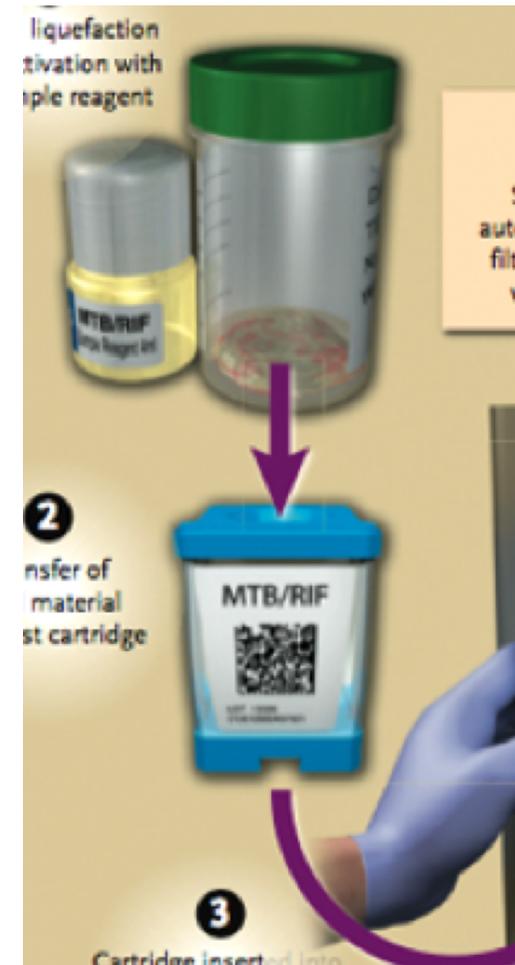
Sensibilité	F+ C+	F- C+	Total Culture +
ECBC1	98,2%	72,5%	92,2%
ECBC2	99,4%	85,1%	96,0%
ECBC3	99,8%	90,2%	97,6%

F, frottis; C, culture; ECBC, expectoration

Spécificité	Total Culture
ECBC1	99,2%
ECBC2	98,6%
ECBC3	98,1%

	Sensibilité	Spécificité
RIF R	99,1%	100%
RIF INH R	99,0%	

RIF, rifampicine; INH, isoniazide; R, résistant



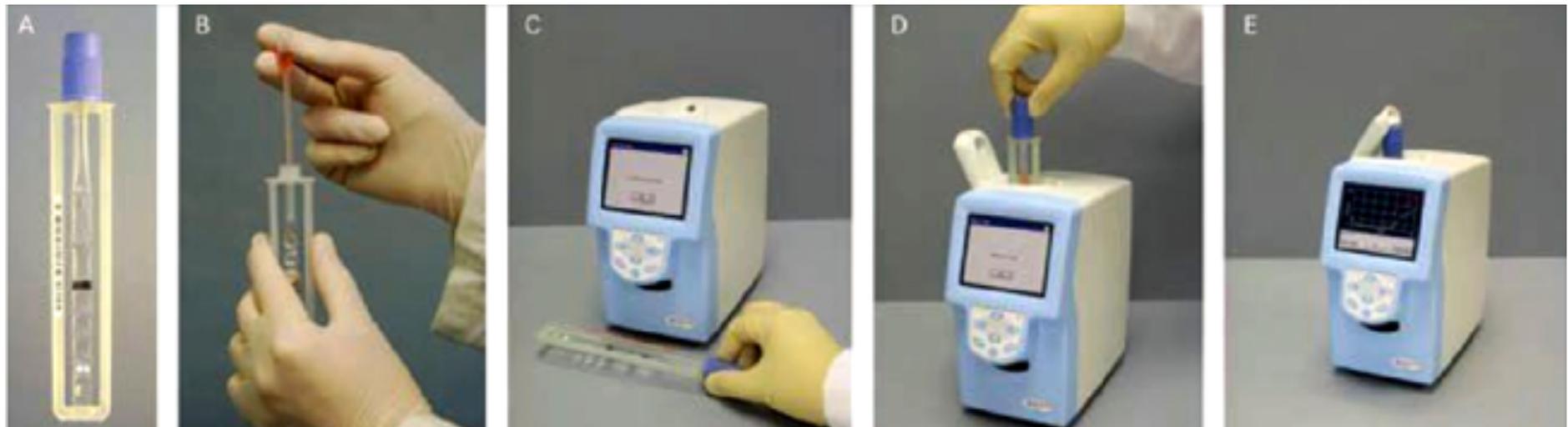
Sample-to-result Nucleic Acid Test Enables Accurate Detection of Influenza A/2009 H1N1 in 26 Minutes in Near-patient Settings

Eur. Infect. Dis. 2010, 4:26-30

Yu Tian, Kiran Madanahally, Hema Rao, Reena Mackwan and Lingjun Chen

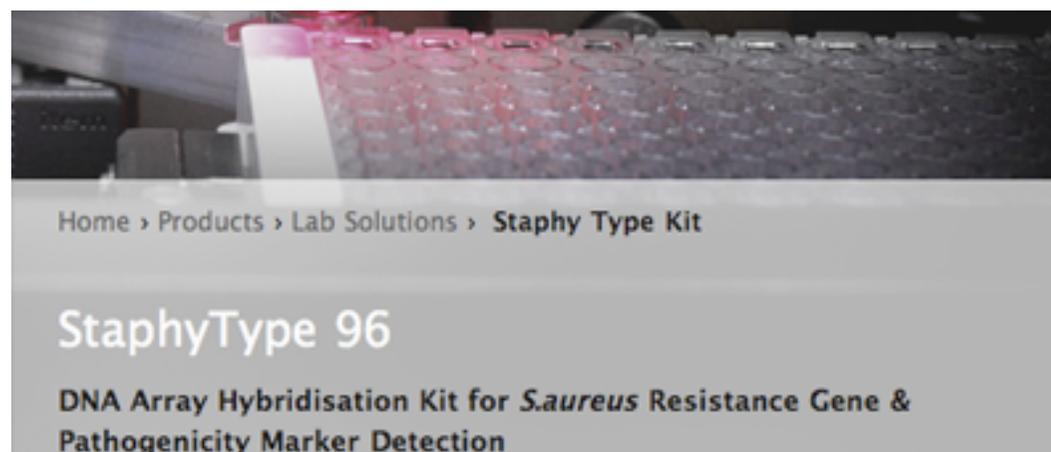
Abstract

The Liat™ Influenza A/2009 H1N1 Assay (iQuum, Inc., Marlborough, MA) is an automated molecular diagnostic test for the qualitative detection and differentiation of Influenza A and 2009 H1N1 viral ribonucleic acid (RNA) from nasopharyngeal swab samples in 26 minutes. Performed on the Liat™ Analyzer, the assay received the US Food and Drug Administration (FDA) Emergency Use Authorization (EUA, expired June 23, 2010) for 2009 H1N1 detection in laboratories certified under the Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) of 1988 to perform moderate- or high-complexity tests. In analytical studies, the assay demonstrated a limit of detection of 10²–10¹ TCID₅₀/ml of influenza virus depending on the strain. The assay further showed appropriate reactivity against all 23 influenza A strains tested, including seasonal influenzas and 2009 H1N1 viruses. No cross-reactivity with 16 bacteria, 15 non-influenza viruses and 10 influenza B viruses was also demonstrated. Clinical sample testing showed 100% positive and 100% negative agreement with comparator EUA assays or viral culture in 226 clinical samples tested (lower 95% confidence interval [CI] >94.4%). While maintaining substantially equivalent performance as high-complexity laboratory-based nucleic acid tests, the Liat Influenza A/2009 H1N1 Assay demonstrated the capability to bring nucleic acid testing to substantially the same speed and simplicity as lateral flow immunoassays.



PUCES DNA CHIP

CLONDIAG 



Hybridisation (Gene)	Result	Expected Resistance
mecA	positive	Methicillin, Oxacillin and all Beta-Lactams, d
blaZ	positive	Beta-Laktamase
ermA	positive	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
ermB	negative	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
ermC	negative	Macrolide, Lincosamide, Streptogramin
linA	negative	Lincosamides
msrA	negative	Macrolide
mefA	negative	Macrolide
mpbBM	negative	Macrolide
vatA	negative	Streptogramine
vatB	negative	Streptogramine
vga	negative	Streptogramine
vgaA	negative	Streptogramine
vgb	negative	Streptogramine
aacA-aphD	negative	Aminoglycoside (Gentamicin, Tobramycin)
aadD	positive	Aminoglycoside (Tobramycin, Neomycin)
aphA	negative	Aminoglycoside (Kanamycin, Neomycin)
sat	negative	Streptothricin
dfrA	negative	Trimethoprim
far	negative	Fusidic acid

mupR	negative	Mupirocin
tetK	negative	Tetracycline
tetM	negative	Tetracycline
cat	negative	Chloramphenicol
fexA	negative	Chloramphenicol
cfr	negative	Phenicols, Lincosamides, Oxazolidinones (Linezolid), Pleuromutilins, Streptogramin A
fosB	positive	Fosfomycin, Bleomycin
vanA	negative	Vancomycin
vanB	negative	Vancomycin
vanZ	negative	Vancomycin
mercury resistance locus	negative	Mercury resistance operon
qacA	negative	Unspecific efflux pump
qacC	negative	Unspecific efflux pump

StaphyType 96

DNA Array Hybridisation Kit for *S.aureus* Resistance Gene & Pathogenicity Marker Detection

Virulence Genotype

Hybridisation (Gene)	Result	Expected Virulence
tst-1	positive	Toxic Shock Syndrome Toxin
tst-RF122	negative	Toxic Shock Syndrome Toxin, allele from bovine strains
entA	positive	Enterotoxin A
entB	negative	Enterotoxin B
entC	positive	Enterotoxin C
entD	negative	Enterotoxin D
entE	negative	Enterotoxin E
entH	negative	Enterotoxin H
entJ	negative	Enterotoxin J
entK	negative	Enterotoxin K
entL	positive	Enterotoxin L
entQ	negative	Enterotoxin Q
entR	negative	Enterotoxin R
egc-cluster	positive	Enterotoxins seg/sei/sem/sen/seo/seu
PVL	negative	Pantone-Valentine Leukocidin
lukM/lukF-P83	negative	Bovine Leukocidin
etA	negative	Exfoliative Toxin A
etB	negative	Exfoliative Toxin B
etD	negative	Exfoliative Toxin D
edinA	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor A
edinB	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor B
edinC	negative	Epidermal cell differentiation inhibitor C
ACME-locus	negative	Arginine catabolic mobile element

LABORATOIRE - DELAI EN JOUR

Raccourcissement important des délais de détection

AUTOMATES DE CULTURE

Exemple des mycobactéries telle *M. tuberculosis* (3-12 j au lieu de 21 à 25 j en moyenne)

MGIT

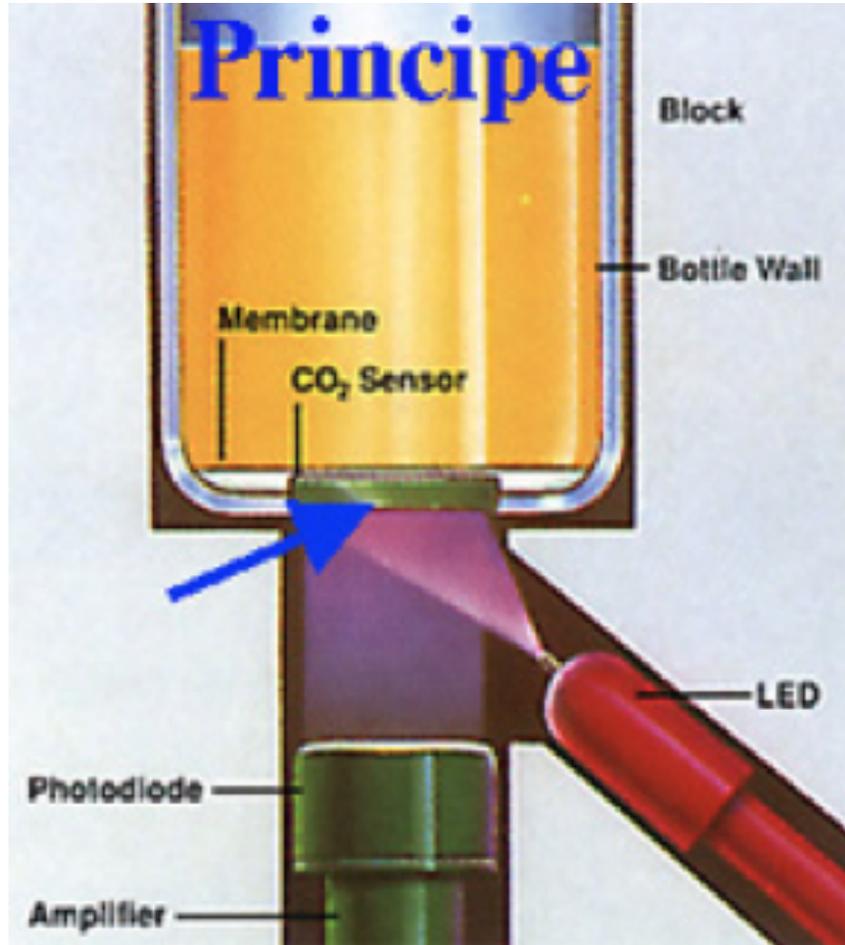


Milieu liquide



Le bouillon Middlebrook 7H9 contient un composé fluorescent (**sel de ruthénium**) dans du silicone au fond du tube. Il est sensible à la présence d'oxygène dans le bouillon. La fluorescence est détectée sur un transilluminateur UV à 365 nm.

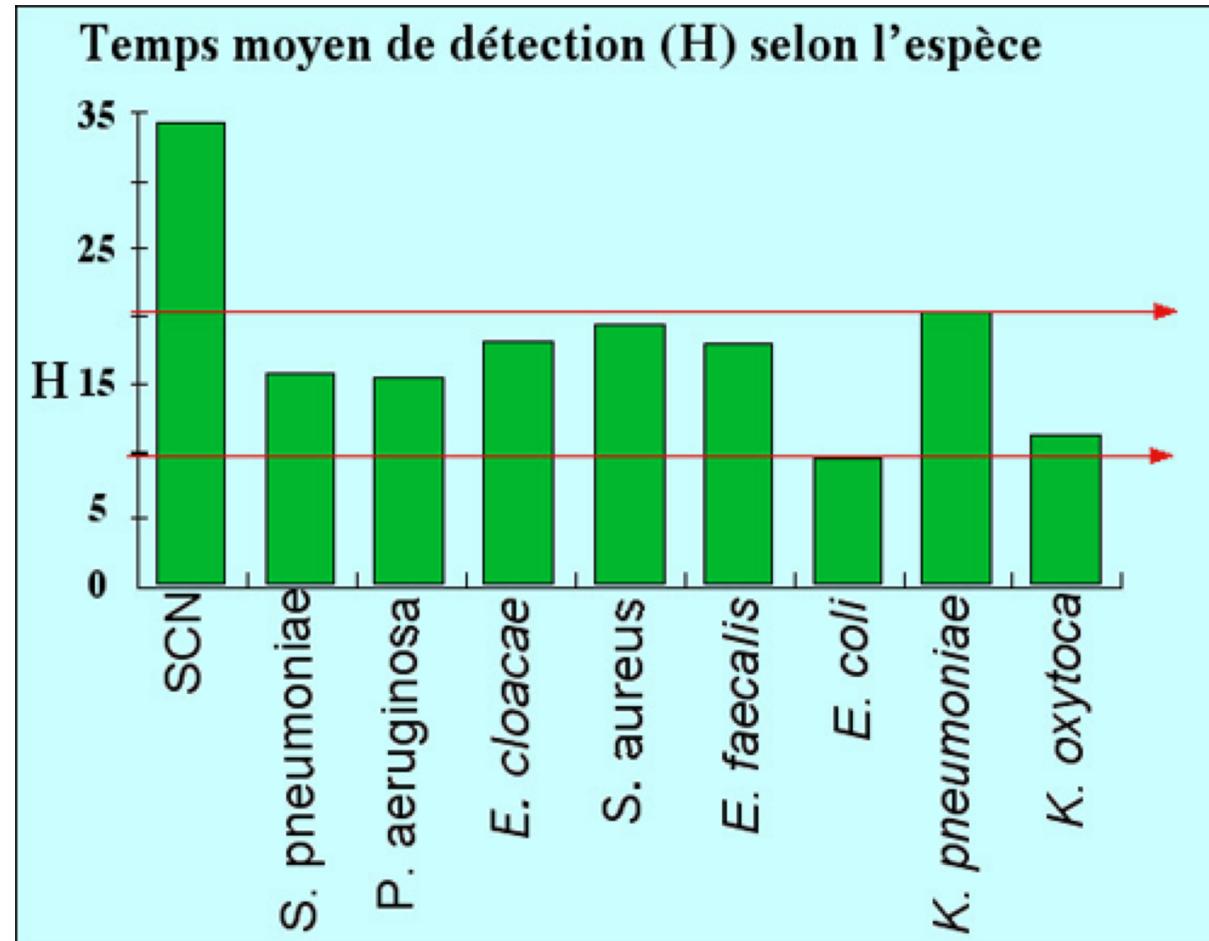
AUTOMATES D'HEMOCULTURE



Hémocultures pneumocoque possible en 5 h



La **réduction du délai de détection** des flacons positifs passe de **47,5 h** en moyenne pour les méthodes manuelles classiques à **10-18 h** en automatique.



Les délais de détection ont été précisés; Pour BacT/ALERT®, **90,6 % des hémocultures positives sont détectées en 24 h** et **96 % des hémocultures sont positives en 2-3 jours.**

AUTOMATES D'ENSEMENCEMENT



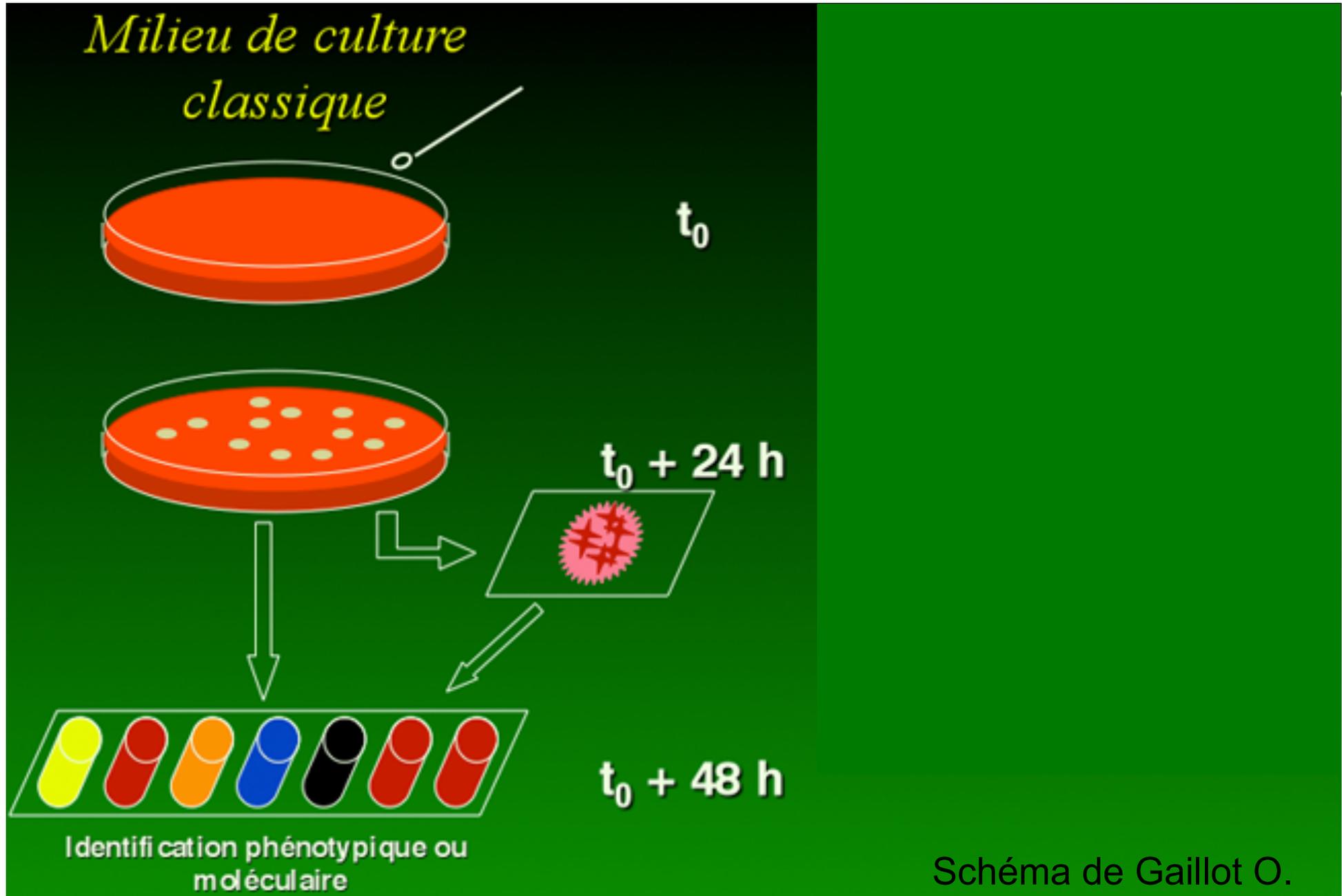
**Automate pour inoculation dans la masse
A2PS320®**



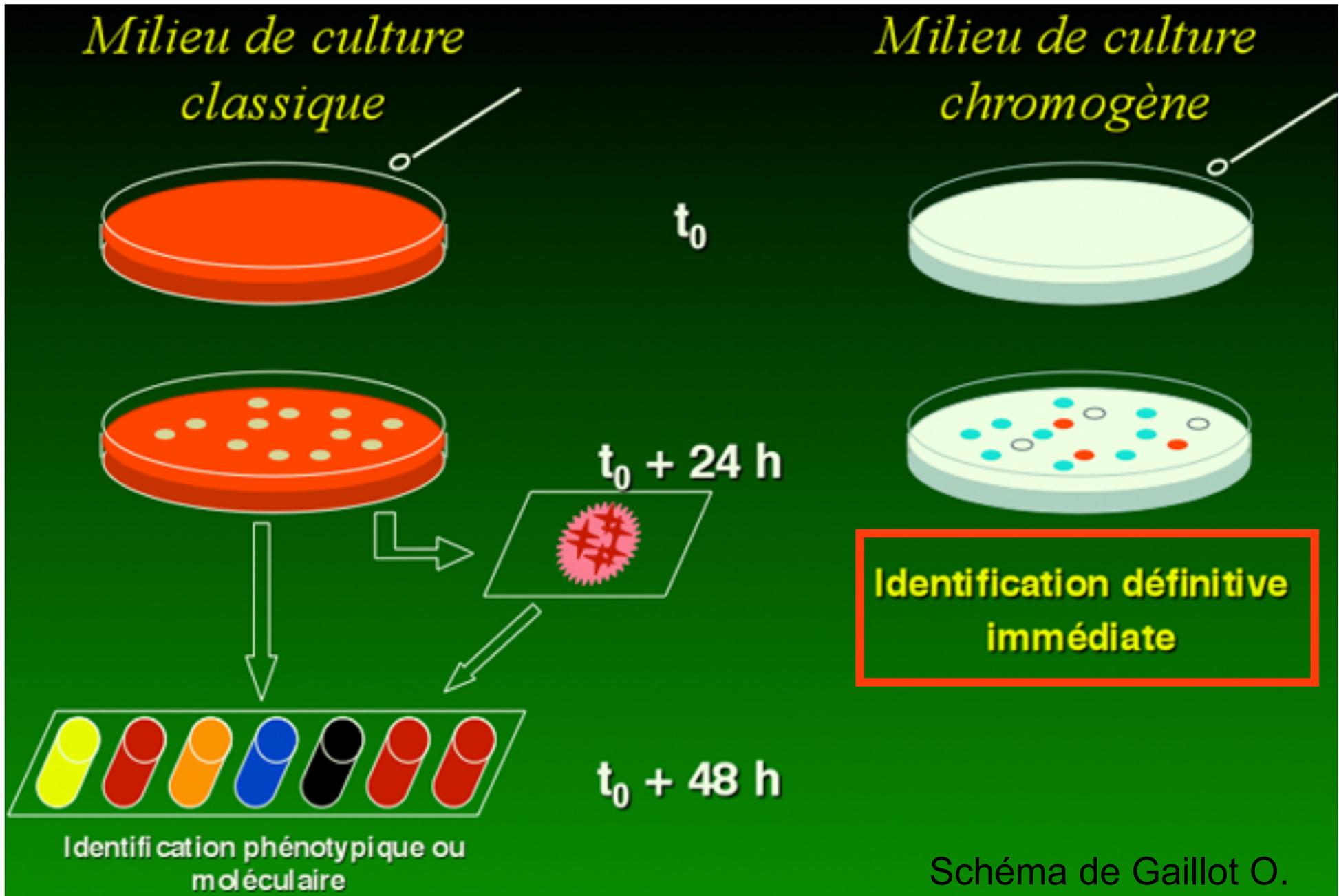
Ensemenceur automatique en spirale WASP II
- Ensemencement rapide et standardisé



CULTURES SUR MILIEUX CHROMOGENES

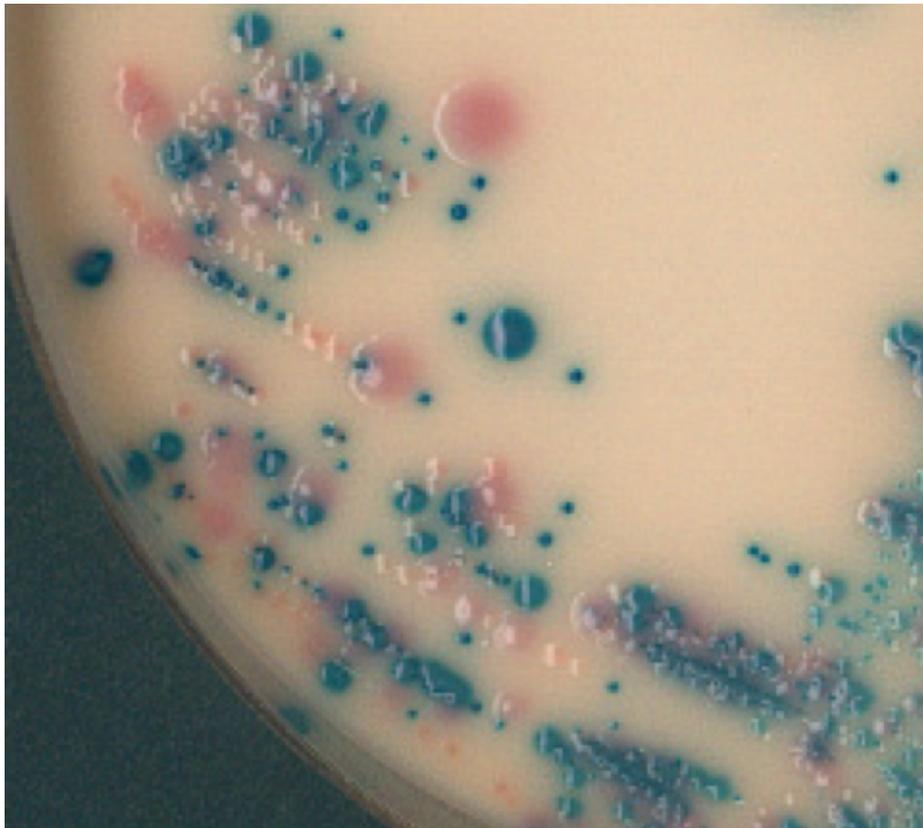


CULTURES SUR MILIEUX CHROMOGENES

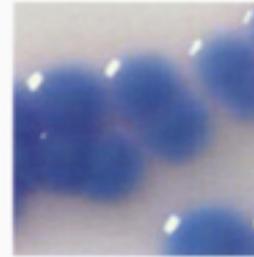


URINES

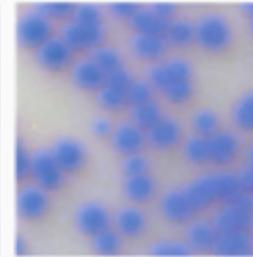
URISelect4



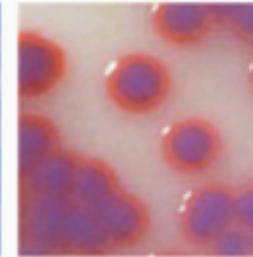
Orientation diagnostique : Entérobactéries du groupe KESC, Streptocoques, Staphylocoques



K.pneumoniae :
- indole (-)
- urea (+)



E.cloacae :
- indole (-)
- urea (-)



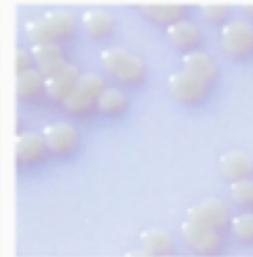
S.marcescens :
- indole (-)
- urea (-)



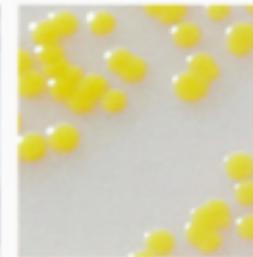
C.diversus :
- indole (+)
- urea (-)



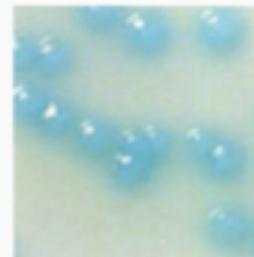
S.saprophyticus :
- Novobiocine (+)



S.epidermidis



S.aureus :
- Pastorex Staph Plus (+)



S.agalactiae :
- Pastorex Strep B (+)

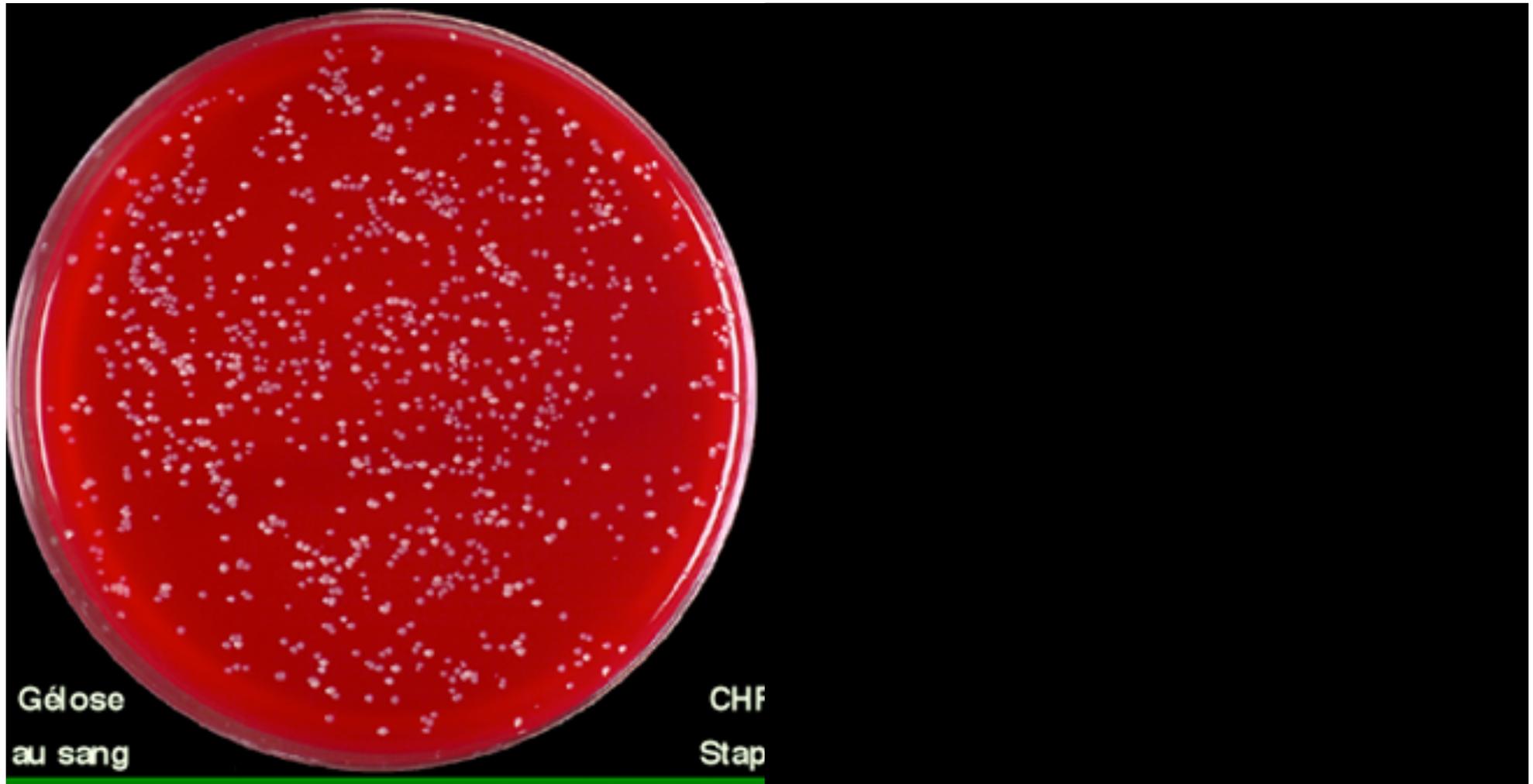


P.aeruginosa :
- Oxydase (+)



C.albicans :
- Auxacolor 2

PUS : DETECTION AU SEIN D'UNE FLORE

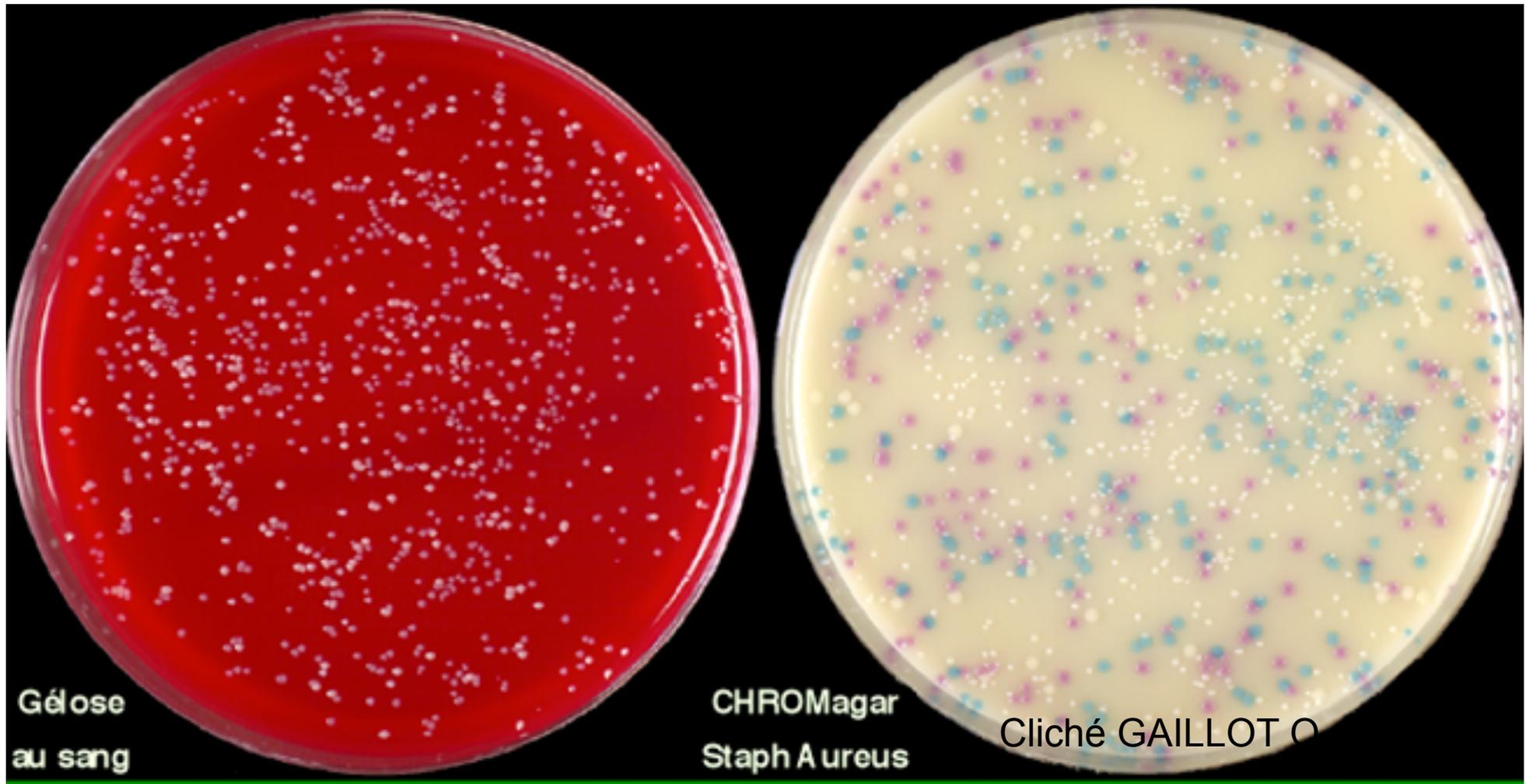


Pus de prothèse après 24 h de culture à 37°C

colonies bleues, *S. haemolyticus*; col.mauves, *S. aureus* ;

petites colonies blanches, *S. epidermidis*; grosses colonies blanches, *S. warneri*

PUS : DETECTION AU SEIN D'UNE FLORE

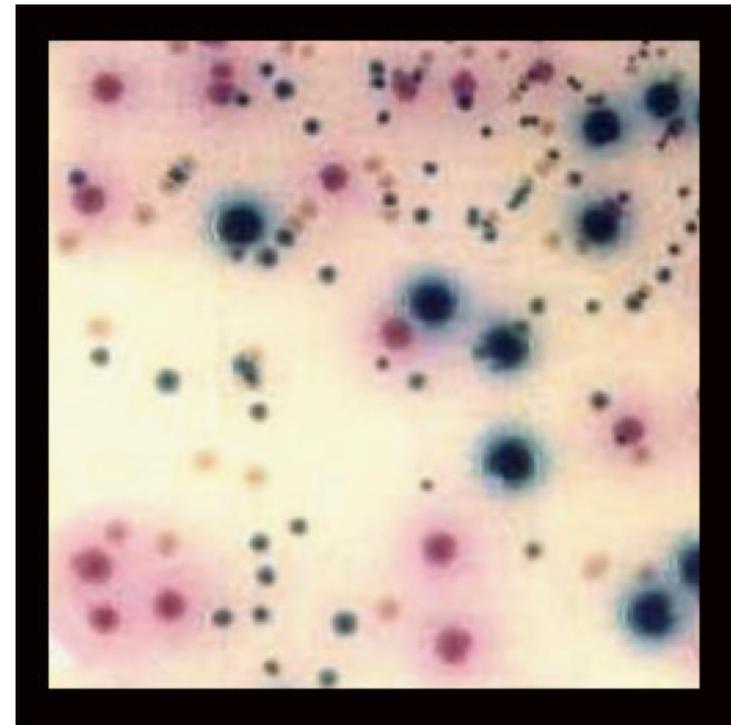
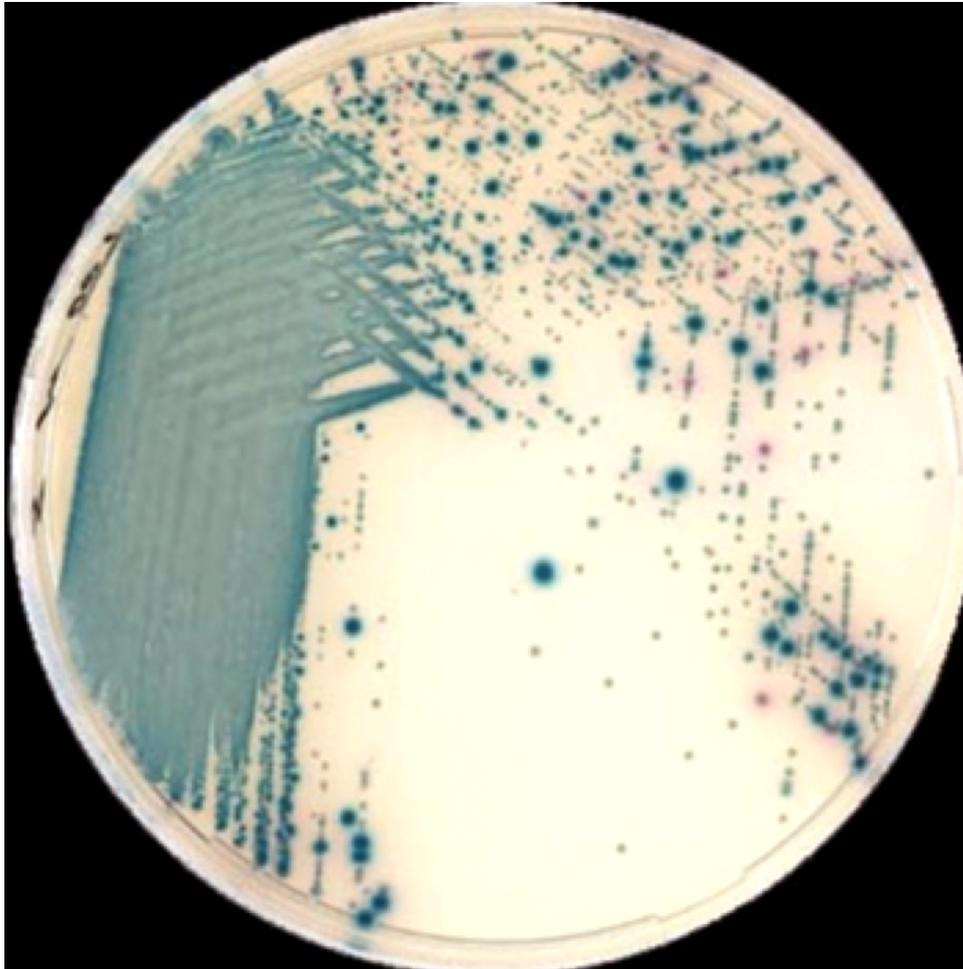


Pus de prothèse après 24 h de culture à 37°C

colonies bleues, *S. haemolyticus*; col. mauves, *S. aureus* ;

petites colonies blanches, *S. epidermidis*; grosses colonies blanches, *S. warneri*

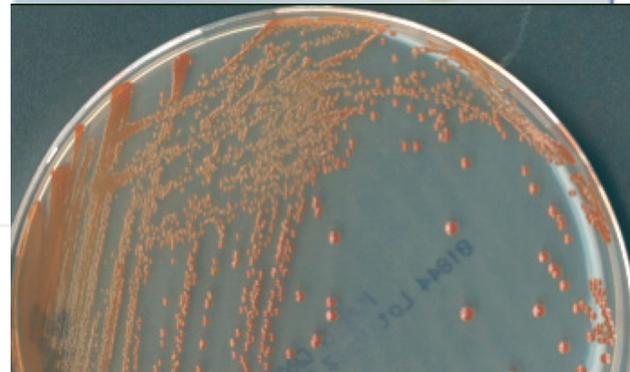
CHROMAGAR SALMONELLA



RECHERCHE DU STREPTOCOQUE DU GROUPE B

Utilisation du milieu Granada

- **Liquide ou solide**
- **24 h incubation 37°C en anaérobiose**
- **Seul les SGB apparaissent pigmentés en orange**
- **Sensibilité > milieu enrichissement**
 - (96% versus 82%)



Fraile R. J. Clin. Microbiol. 1999

MILIEUX SELECTIFS

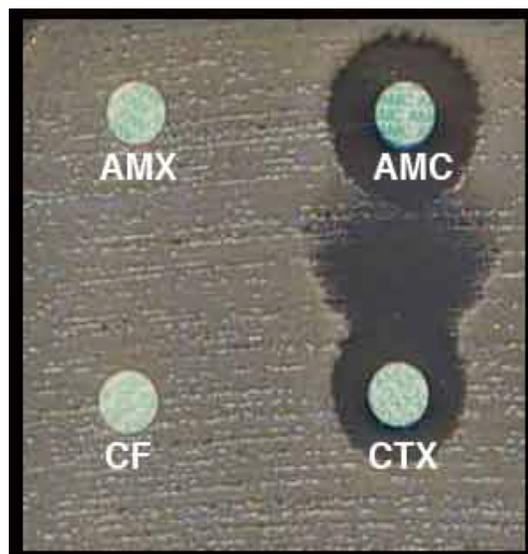
MRSA

Composition

Supplémenté en **céfoxitine**
Coloration caractéristique des
SARM producteurs d'**alpha**
glucosidase

Interprétation

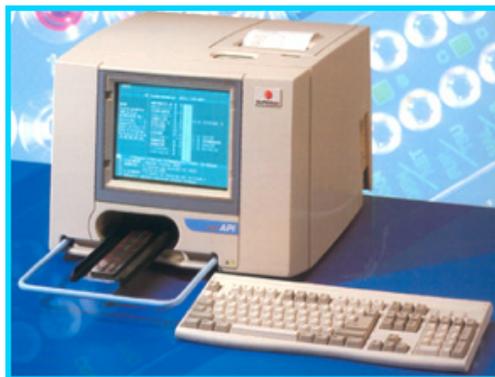
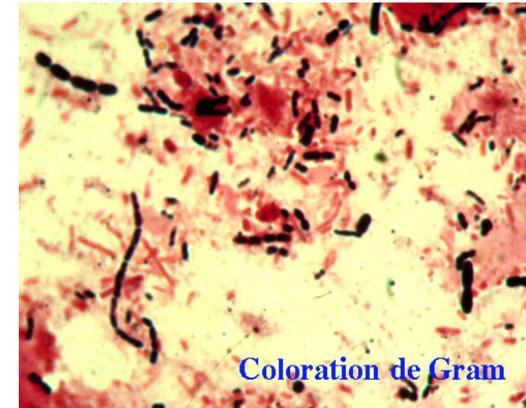
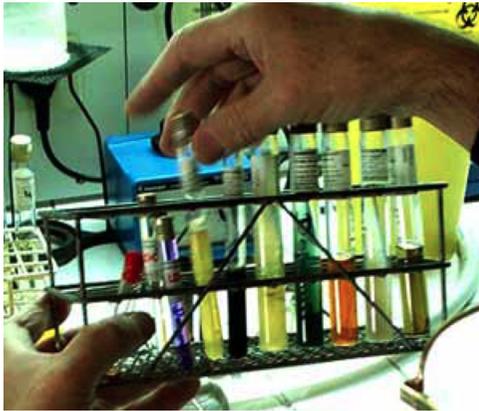
Colonies de SARM
apparaissent **vertes** en 24 à
48h



BLSE

Recherche d'entérobactéries
productrices d'une BLSE
Bêta-Lactamase à Spectre Elargi/Etendu

IDENTIFICATION BACTERIENNE ANTIBIOGRAMME



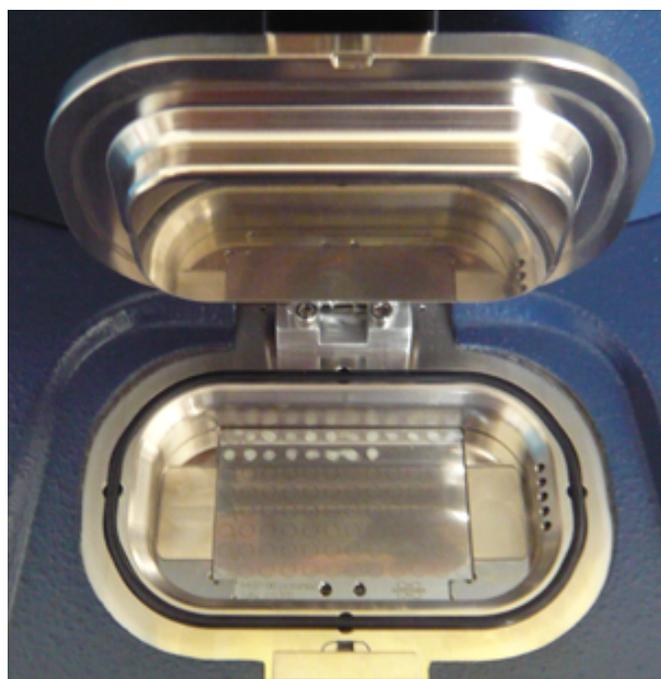
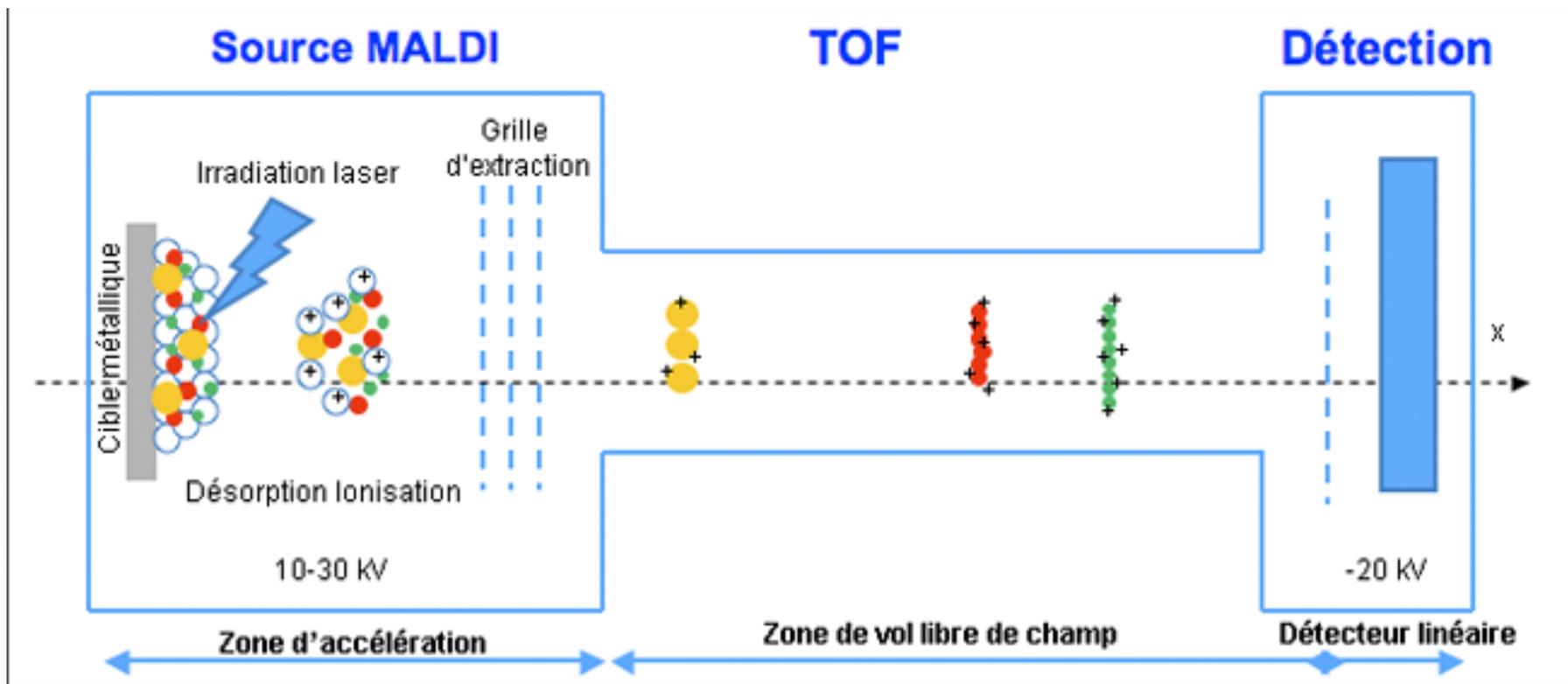
De < 1970 - 2000: 24h à 3-4 h et de 10 caractères à 50-60 caractères d'identification

Spectrométrie de masse ou MALDI-TOF

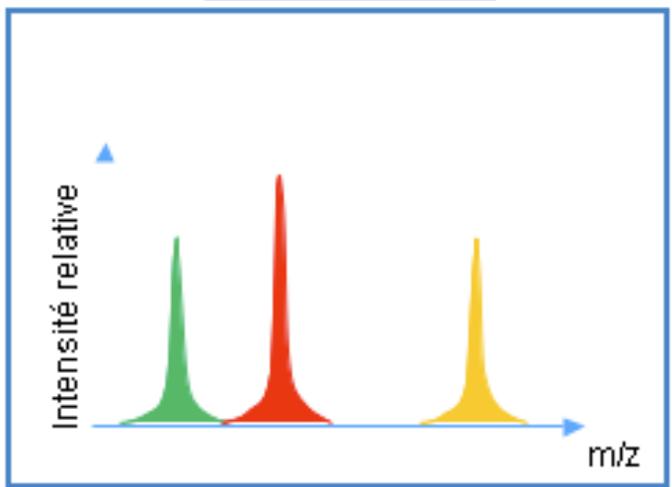
MALDI Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation

TOF Time Of Flight

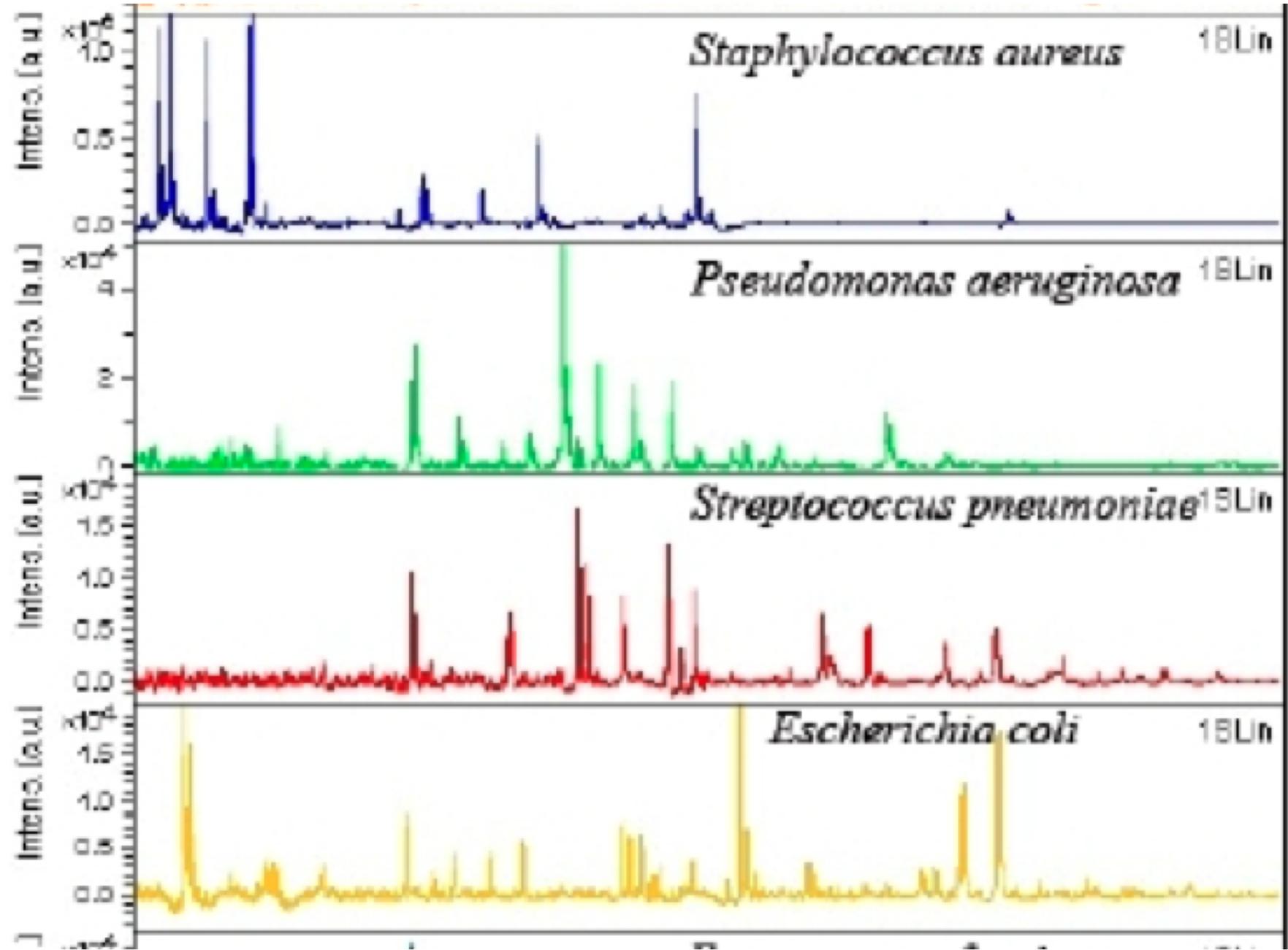




Analyseur TOF



Carbonnelle B. et al.
Feuillets Biol. 2010



MALDI-TOF : CONCLUSIONS

- . **Technique rapide, fiable, peu coûteuse** (API 2,5 -5 € vs 0,2 E)
- . **Tous micro-organismes**: Entérobactéries, *Pseudomonas* (mucoviscidose) , *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Neisseria*, HACCEK, Mycobactéries, Anaérobies, **Levures**, **Champignons**.

Améliorations nécessaires

- **Directement à partir des prélèvements** tels hémoculture, urine.....
- Comparaison de souches à visée épidémiologique
- Détection de mécanismes de résistance (TEM)
- Détection de facteurs de virulence (*S.aureus* et PVL)

CONCLUSIONS

En 20 ans, les **progrès** dans le diagnostic d'un microorganisme dont celui des bactéries ont été **étonnants** à plus d'un titre :

.

Mise au point de tests de diagnostic rapide (**TDR**) de grande sensibilité et spécificité, mais encore en nombre très insuffisant

Détection de maladies « épidémiques », mais contrôle des réactifs

. La **PCR** avec ses **multiples applications** va se « **vulgariser** » avec les nouveaux équipements.

. L'**automation** est devenue une réalité dans les laboratoires de bactériologie avec les automates de culture, les appareils de numération, les ensemenceurs automatiques.....

. Le champ d'application des **milieux chromogènes** est immense

. L'**ID en 2 heures** est possible avec la spectrométrie de masse

. Cependant encore quelques déceptions avec les puces

Un malade peut avoir maintenant dans certaines circonstances, son diagnostic bactériologique (ID, antibiogramme) en moins de 24 h

Remerciements

A tous les collègues français ou étrangers qui mettent leurs présentations en ligne ainsi qu'à Google® qui nous permet de les retrouver très facilement.

Nous leurs avons emprunté certaines illustrations.
Qu'ils en soient vivement remerciés.