

Détection moléculaire des entéropathogènes bactériens par PCR multiplexe

Évaluation pour la mise à jour du *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*

Une production de l'Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS)

Direction des services de santé et de l'évaluation des technologies

Le contenu de cette publication a été rédigé et édité par l'INESSS.

Membres de l'équipe projet

Auteure principale

Emmanuelle Tchekanda, Ph. D.

Soutien administratif

Annabelle Suire

Coordonnateur scientifique

Éric Potvin, Ph. D.

Directrice

Michèle de Guise, M.D., FRCPC

Équipe de l'édition

Patricia Labelle

Denis Santerre

Hélène St-Hilaire

Sous la coordination de

Renée Latulippe, M.A.

Avec la collaboration de

Josée De Angelis, révision linguistique

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2020

Bibliothèque et Archives Canada, 2020

ISSN 1915-3104 INESSS (PDF) ISBN 978-2-550-86363-2 (PDF)

© Gouvernement du Québec, 2020

La reproduction totale ou partielle de ce document est autorisée à condition que la source soit mentionnée.

Pour citer ce document : Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Détection moléculaire des entéropathogènes bactériens par PCR multiplexe Évaluation pour la mise à jour du *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*. Rapport rédigé par E. Tchekanda. Québec, Qc : INESSS; 2020. 11 p.

L'Institut remercie les membres de son personnel qui ont contribué à l'élaboration du présent document.

DÉTECTION MOLÉCULAIRE DES ENTÉROPATHOGÈNES BACTÉRIENS PAR PCR MULTIPLÈXE (RÉFÉRENCE – 2017.01.007AV)

Avis - validité analytique

1. INFORMATION GÉNÉRALE

1.1. Demandeur : Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information fournie par les personnes responsables de l'analyse dans les laboratoires concernés ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflits d'intérêts

Tous les membres ont participé à la délibération et aucun ne s'est retiré au moment de formuler la recommandation.

2. INTRODUCTION

L'avis intitulé Détection moléculaire des entéropathogènes bactériens par PCR multiplexe a été transmis au ministre de la Santé et des Services sociaux le 10 janvier 2018 et publié le 12 mars 2018 [INESSS, 2018]. Cet avis avait pour objectif d'évaluer l'ajout au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale*, ci-après nommé *Répertoire*, d'une nouvelle analyse permettant de détecter l'agent causal d'une gastroentérite bactérienne à partir d'un échantillon de selle du patient. Les bactéries visées sont les *Salmonella*, *Shigella*, bactéries productrices de Shiga-toxines, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter*, *Vibrio* spp. et *Aeromonas* spp.

Dans son avis, l'INESSS a recommandé l'introduction de l'analyse au *Répertoire* en précisant que cette introduction était conditionnelle à la production d'un plan complet et détaillé de validation analytique. L'INESSS demandait également de fournir les résultats lorsqu'ils seraient disponibles.

Suite à la publication de l'avis, le centre demandeur a transmis à l'INESSS des données de validation et l'objectif du présent avis est de présenter ces données.

3. RÉSUMÉ DE L'ÉVALUATION PRÉCÉDENTE

Un survol de l'évaluation menée en phase I par l'INESSS est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1 Résumé exécutif de l'évaluation de l'utilité clinique en phase I

	Détection moléculaire des entéropathogènes bactériens par PCR multiplexe
Demandeur	Centre hospitalier universitaire (CHU) Sainte-Justine
Objectif de l'analyse	L'analyse permettrait la détection des entéropathogènes bactériens par PCR multiplexe en identifiant des agents étiologiques des diarrhées sanglantes ou chroniques.
Situation actuelle	Actuellement, les entéropathogènes bactériens sont principalement détectés par culture. Le délai de réponse est de 4 à 7 jours et nécessite plusieurs géloses. Les souches d' <i>E. coli</i> productrices de Shiga-toxines, aussi connues sous le nom d' <i>E. coli</i> entérohémorragique (ECEH), sont recherchées de routine dans les selles au Québec.
Nombre d'analyses prévues	Il a été estimé que 2 150 analyses seraient réalisées au CHU Sainte-Justine au cours des trois prochaines années.
Utilité clinique	Une revue de la documentation scientifique a permis de recenser cinq études traitant de la détection d'entéropathogènes bactériens à l'aide d'une technique de PCR multiplexe en temps réel développé en laboratoire (LDT). Selon les résultats présentés, la PCR multiplexe est plus rapide et procure un taux de positivité significativement plus élevée (8,6 % à 19,2 %) que la culture conventionnelle (5,0 % à 7,5 %). C'est une technique sensible, spécifique et robuste.
Impact budgétaire	Advenant que l'analyse soit implantée pour répondre aux besoins de l'ensemble de la province, cela pourrait générer une réduction de coûts allant de 264 000 \$ à 1,7 M \$ par année pour un total de 792 000 \$ à 5,1 M\$ pour les trois premières années.
Positions et orientations d'organismes d'intérêt	L'Association of Public Health Laboratories [APHL, 2015] stipule que les tests moléculaires : <ul style="list-style-type: none"> • sont indépendants de la culture, • sont plus rapides, • sont basés sur une approche syndromique, • offrent de l'information sur les pathogènes difficiles à cultiver, • sont plus économiques que les techniques microbiologiques classiques. <p>Selon le Public Health England [PHE, 2013], les méthodes moléculaires peuvent être supérieures aux méthodes conventionnelles et devraient être considérées lorsqu'elles sont disponibles afin d'assurer une interprétation clinique appropriée.</p>
Enjeux particuliers	<ul style="list-style-type: none"> • En limitant l'analyse aux patients présentant des symptômes gastro-intestinaux graves, le risque de faux positifs associé à une trop grande sensibilité de la méthode est négligeable. • Bien que les gènes de virulence ciblés soient généralement des régions fortement conservées, les amorces pourraient ne pas détecter de nouvelles variantes et produire des faux négatifs. • Des analyses supplémentaires devraient être réalisées en cas de résultats négatifs malgré des symptômes cliniques clairs comme la présence de sang dans les selles.

4. ANALYSE ÉVALUÉE

4.1. Description de la méthode

En 2017, la demande adressée à l'INESSS portait sur le développement d'une analyse « maison » consistant en l'amplification par PCR multiplexe en temps réel d'acides nucléiques spécifiques d'entéropathogènes bactériens dans le but d'augmenter sa sensibilité, raccourcir son temps de réalisation et diminuer les coûts lui étant associés. Cependant, cette démarche n'exclut pas la possibilité d'utiliser une trousse commerciale. Cette analyse vise l'identification des entéropathogènes bactériens suivants :

- *Salmonella*;
- *Shigella*;
- Bactéries productrices de Shiga-toxines;
- *Yersinia enterocolitica*;
- *Campylobacter*;
- « *Vibrio spp* »;
- *Aeromonas spp.*

Les pathogènes entériques bactériens sont nombreux. Certains sont rares (ex. *Vibrio spp*) alors que d'autres sont très fréquents, pouvant même parfois entraîner des difficultés d'interprétation (ex. *E. coli* producteur d'entérotoxine). Après consultation de la littérature, le demandeur exclut la cible *Vibrio spp* du multiplex afin de maximiser le rapport coût/bénéfice.

Les conditions d'amplification choisies sont les mêmes que celles utilisées pour tous les autres tests en bactériologie moléculaire au CHU Sainte-Justine.

4.2. Homologation

L'analyse proposée n'est pas homologuée par Santé Canada ou la Food and Drug Administration (FDA).

5. DONNÉES DE VALIDITÉ ANALYTIQUE

5.1. Données fournies par le demandeur

Cibles retenues pour effectuer l'analyse

Les échantillons acceptés pour cette technique sont des selles fraîches de patients symptomatiques reçues dans un pot stérile ou dans le milieu de transport Cary-Blair. Les conditions d'amplification choisies sont les mêmes que celles utilisées pour tous les autres tests en bactériologie moléculaire au CHU Sainte-Justine à savoir : une dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C suivie de 45 cycles d'amplification de 95°C pendant 10 secondes et 60°C pendant 30 secondes.

La sélection des protocoles a été effectuée à partir d'articles qui avaient été publiés sur des cibles validées pour chaque bactérie. À la conclusion de la comparaison de ces cibles, celles offrant la meilleure performance dans les conditions établies par le laboratoire demandeur étaient retenues :

- *Aeromonas* sp. dans *aérolysine*. [Liu *et al.*, 2012];
- *Aeromonas* sp. dans *gyrB*. [Uchiyama *et al.*, 2012];
- *Campylobacter coli* (*C. coli*) et *jejuni* (*C. jejuni*) dans *cadF*. [Liu *et al.*, 2012];
- *C. coli* et *jejuni* dans *glyA*. et *hipO*. [Leblanc-Maridor *et al.*, 2011];
- *Salmonella* sp. dans *invA*. [Liu *et al.*, 2012];
- *Salmonella* sp. dans *ttr*. [De Boer *et al.*, 2010];
- *Shigella* sp./ *E.coli* entéroinvasif, dans *ipaH*. [De Boer *et al.*, 2010];
- *Shigella* sp./ *E.coli* entéroinvasif, dans *ipaH*. [Cremonesi *et al.*, 2014];
- *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) dans *ail*. [Van Lint *et al.*, 2015];
- *Y. enterocolitica* dans *yst*. [Cremonesi *et al.*, 2014];
- Pour *Campylobacter jejuni*, une troisième cible a été testée, car les résultats escomptés n'étaient pas atteints avec les deux cibles précédemment choisies : *Campylobacter jejuni* dans *mapA*. [Van Lint *et al.*, 2015]

Agencement des réactions PCR et RT-PCR en multiplex

Pour chaque cible, différentes concentrations d'amorces (100, 300, 500, et 900 nM final) et de sondes (100, 200, 300 et 400 nM final) ont été comparées. Les cibles offrant les meilleures performances du test sont les suivantes :

- *gyrB* pour *Aeromonas*,
- *glyA* pour *C. coli*,
- *mapA* pour *C. jejuni*,
- *ttr* pour *Salmonella*,
- *ipaH* (design de De Boer *et al.*) pour *Shigella*,
- *ail* pour *Y. enterocolitica*.

Il est à noter que le gène *ail* code une protéine d'attachement et d'invasion qui est présente uniquement dans les souches pathogènes de *Yersinia enterocolitica*.

Traitement de l'échantillon

Dans le but de diminuer le coût de cette analyse, le demandeur a évalué la possibilité d'éliminer l'étape d'extraction d'ADN. Pour ce faire, différents tests ont été effectués avec l'analyse « maison » de PCR en temps réel pour la détection de *Clostridium difficile*, celle-ci étant une technique de routine du laboratoire utilisant le même type d'échantillon. La méthode sans extraction d'ADN s'est avérée dix fois moins sensible que la technique avec extraction d'ADN. Toutefois, elle a permis d'avoir une corrélation de 100 % par rapport aux résultats obtenus avec la culture bactérienne (22 échantillons positifs et 49 échantillons négatifs testés).

Comparaison entre les résultats issus de culture bactérienne et ceux de la réaction PCR

En prévision de la validation de cette technique, 64 aliquotes (1 ml) de selles positives en culture ont été congelés. Il est à noter que ces aliquotes congelés pourraient ne pas être représentatifs des échantillons complets car ayant été prélevés dans le surnageant (la partie liquide) du pot.

Au total, 150 échantillons analysés en culture ont été testés par PCR. En raison du faible nombre d'échantillons positifs en routine pour certains pathogènes, les 17 échantillons positifs pour *Y. enterocolitica* sont des souches précédemment isolées de selles qui ont été inoculées dans des selles négatives en culture et PCR. Il en a été de même pour cinq échantillons positifs pour *C. coli*. Pour 10 échantillons, le contrôle interne n'a pas donné de signal positif (probablement à cause de la présence d'inhibiteurs) et ces échantillons ont été repris après une étape de purification sur colonne (Zymo-Spin IV-HRC). En définitive, 57/150 échantillons étaient négatifs en culture et PCR. Les résultats des 93 autres échantillons sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 Résultats de 93 échantillons qui n'étaient pas négatifs en culture ni en PCR

BACTÉRIES	PCR positive et culture positive	PCR positive et culture négative	PCR négative et culture positive
<i>C. coli</i>	5	2	0
<i>C. jejuni</i>	15	2	0
<i>Y. enterocolitica</i>	14	0	3
<i>Aeromonas</i>	11	2	1*
<i>Salmonella</i>	29	0	3*
<i>Shigella</i>	10	0	0

* : Surnageant de selles congelées à -80°C

Il est à noter que parmi ces 93 échantillons, quatre étaient positifs pour deux pathogènes, à savoir : trois échantillons positifs pour *C. jejuni* et *Salmonella* (dont 1 *C. jejuni* détecté par PCR uniquement) et un échantillon positif pour *Aeromonas* et *Salmonella* (*Aeromonas* détecté par PCR uniquement). Des trois échantillons négatifs en PCR pour *Y. enterocolitica*, deux sont du biotype 1A qui est un biotype non pathogène (donc ne contient pas le gène *ail*) et le troisième a été envoyé au LSPQ pour un typage (résultats non disponibles au moment d'écrire ceci).

Comparaison entre les résultats issus de culture bactérienne, de PCR et d'une technique commerciale

Les 150 échantillons ont également été testés avec une technique commerciale (BDmax, de BD) permettant la détection des mêmes bactéries, à l'exception de la souche *Aeromonas* spp. Tous les résultats ont été concordants, en dehors de cinq échantillons positifs pour *Salmonella* sp., en culture et par la réaction PCR « maison », qui ont donné des résultats négatifs avec la technique commerciale. De plus, la technique commerciale n'a pas fonctionné pour deux échantillons négatifs, malgré la répétition du test.

Limite de détection

Pour déterminer la limite de détection, différentes souches ont été diluées dans des selles négatives (en culture et PCR). La quantification a été effectuée par étalement des souches diluées sur des géloses. Cette expérience a été faite pour trois souches différentes pour chaque espèce ciblée et la limite de détection a été déterminée comme étant un Cp inférieur à 40. La limite de détection est d'environ 1 000 unités formant les colonies par millilitre de selle.

Évaluation prospective

Le demandeur a réalisé une étude prospective au courant de laquelle les échantillons de selles recueillis sont analysés à l'aide de l'analyse PCR multiplexe qui a été développée (tableau 3).

Tableau 3 Résultats de l'étude prospective menée au CHUSJ depuis mars 2019

PARAMÈTRES ÉVALUÉS	DURÉE DE L'ÉTUDE PROSPECTIVE	
	25 mars – 25 juin 2019	26 juin – 31 août 2019
Échantillons analysés (n)	440	354
Échantillons positifs PCR seule ou PCR et culture	61 (14 %)	68 (19 %)
Positifs PCR et culture	40	49
<i>Aeromonas</i>	8	9
<i>Campylobacter</i>	9*	21
<i>Salmonella</i>	11†	10
<i>Shigella/E. coli entéroinvasif</i>	5	5
<i>Yersinia</i>	0	4
Positifs PCR et Négatifs culture	21	19
<i>Aeromonas</i>	12‡	9
<i>Campylobacter</i>	2	2
<i>Salmonella</i>	0	1
<i>Shigella/E. coli entéroinvasif</i>	6§	7
<i>Shigella/E. coli entéroinvasif + Aeromonas</i>	1	0

* Un échantillon positif pour *C. jejuni* l'était aussi pour *Aeromonas* par PCR

† Un échantillon positif pour *Salmonella* l'était aussi pour *C. coli* par PCR

‡ Sur 9 patients – un patient avec deux échantillons positifs par PCR, seulement un positif par culture

§ Sur quatre patients, un patient avait eu une culture positive pour *Shigella* quatre mois plus tôt

|| Un patient avait deux selles positives le 21 juillet pour *Shigella* par PCR et culture et deux selles positives le 1^{er} août par PCR seulement.

Les épreuves de PCR multiplexe développées au CHUSJ en 2018 ont montré une bonne sensibilité et spécificité lorsque comparées à la culture bactérienne sur 150 échantillons. Elles sont optimisées pour les plateaux technologiques en usage dans ce laboratoire et utilisent le même type de réactifs. Elles s'intègrent donc harmonieusement aux autres épreuves PCR de détections bactériennes. La préparation de mélanges réactionnels est simplifiée pour éviter les erreurs de pipetage et standardiser les essais. L'analyse est utilisée depuis le 26 juin 2019 et seuls les échantillons positifs par PCR sont mis en culture.

6. RÉSUMÉ DE LA DÉLIBÉRATION

Les membres du comité soulignent le coût très raisonnable de l'analyse et sont en accord avec le choix des cibles et la décision d'exclure le *Vibrio* en raison de sa rareté. La possibilité de faire une recherche de *Vibrio* par culture sur demande pour les patients habitants sur la côte ou en contexte d'éclosion, par exemple, est une approche judicieuse.

Le nombre d'échantillons validés de chaque cible est jugé insuffisant. Toutefois, les experts du comité sont conscients que pour la plupart des cibles, sauf *Campylobacter* et *Salmonella*, il est difficile de cumuler des échantillons de patients en raison de la faible prévalence de ces maladies. Le comité recommande toutefois d'augmenter les nombres avec des spécimens synthétiques étant donné que c'est peu coûteux et rapide.

Il a également été mentionné qu'il est nécessaire de faire les expériences pour préciser un seuil de détection analytique ou du moins d'en avoir une idée, sur plusieurs spécimens, surtout dans un contexte où il est prévu de ne pas faire d'extraction d'ADN.

Aussi, vérifier la robustesse (test/retest) pour les échantillons frais mais aussi ceux qui devront voyager à partir d'un autre centre. Cette démonstration est d'autant plus vraie pour la *Shigella*, une MADO très importante et dont les quantités de bactéries peuvent être très faibles et donc, souffrir de la compétition avec les autres bactéries pendant le temps de transport.

7. RECOMMANDATION DE L'INESSS

DÉTECTION MOLÉCULAIRE DES ENTÉROPATHOGENES BACTÉRIENS PAR PCR MULTIPLEXE

La recommandation de l'INESSS

Considérant que l'utilité de l'analyse a déjà été reconnue et qu'il s'agit d'une évaluation en phase II, les données de validation analytique ont été jugées :

- Complètes
- Incomplètes

Précisions accompagnant la recommandation

- Augmenter le nombre d'échantillons minimalement pour les cibles plus fréquentes (*Campylobacter*, *Shigella* et *Salmonella*);
- Calcul de sensibilité/spécificité avec un intervalle de confiance par cible au lieu d'un calcul global;
- Préciser un seuil de détection analytique;
- Vérifier la robustesse (test/retest) surtout pour les échantillons provenant de l'externe;
- Se référer aux normes CLSI MM03, Cumitech 31A et CSA Z316.8-F18;
- L'INESSS ne demandera pas à recevoir ce dossier.

RÉFÉRENCES

- Association of Public Health Laboratories (APHL). Culture-independent diagnostic tests: Paving the way for improved diagnostics and the future of foodborne disease surveillance. CIDT Fact Sheet. Silver Spring, MD : APHL; 2015. Disponible à : https://www.aphl.org/AboutAPHL/publications/Documents/FS_CIDTFactSheet_Feb2015.pdf.
- Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. Cumitech 31A: Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. Coordinating ed., S. E. Sharp. Washington, DC : ASM Press; 2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Molecular diagnostic methods for infectious diseases (MM03). 3rd Edition. Wayne, PA : CLSI; 2015.
- Cremonesi P, Pisani LF, Lecchi C, Cecilian F, Martino P, Bonastre AS, et al. Development of 23 individual TaqMan® real-time PCR assays for identifying common foodborne pathogens using a single set of amplification conditions. *Food Microbiol* 2014;43:35-40.
- De Boer RF, Ott A, Kesztyus B, Kooistra-Smid AM. Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach. *J Clin Microbiol* 2010;48(11):4140-6.
- Groupe CSA. Exigences concernant la conception, le développement et la validation d'essais conçus en laboratoire pour le dépistage, le diagnostic et la gestion des conditions cliniques – Z316.8-F18. Toronto, ON : Groupe CSA; 2018.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Détection moléculaire des entéropathogènes bactériens par PCR multiplexe. Québec, Qc : INESSS; 2018. Disponible à : https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Analyse_biomedicale/Mars_2018/INESSS_Avis_Detection-moleculaire-enteropathogenes-bacteriens-PCR-multiplexe.pdf.
- Leblanc-Maridor M, Beaudeau F, Seegers H, Denis M, Belloc C. Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by real-time PCR in pure cultures and in complex samples. *BMC Microbiol* 2011;11:113.
- Liu J, Gratz J, Maro A, Kumburu H, Kibiki G, Taniuchi M, et al. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. *J Clin Microbiol* 2012;50(1):98-103.
- Public Health England (PHE). UK Standards for Microbiology Investigations: Gastroenteritis and diarrhoea. S7 Issue 1. Londres, Angleterre : PHE; 2013. Disponible à : https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/344110/S_7i1.pdf.
- Uchiyama T, Kakizaki E, Kozawa S, Nishida S, Imamura N, Yukawa N. A new molecular approach to help conclude drowning as a cause of death: Simultaneous detection of eight bacterioplankton species using real-time PCR assays with TaqMan probes. *Forensic Sci Int* 2012;222(1-3):11-26.

Van Lint P, De Witte E, De Henau H, De Muynck A, Verstraeten L, Van Herendael B, Weekx S. Evaluation of a real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp./EIEC, and *Yersinia enterocolitica* in fecal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34(3):535-42.

*Institut national
d'excellence en santé
et en services sociaux*

Québec 

Siège social

2535, boulevard Laurier, 5^e étage
Québec (Québec) G1V 4M3
418 643-1339

Bureau de Montréal

2021, avenue Union, 12^e étage, bureau 1200
Montréal (Québec) H3A 2S9
514 873-2563

inesss.qc.ca

