

Apport des techniques de biologie moléculaire dans la prévention du risque infectieux chez les professionnels de santé

K Zerouali

Laboratoire de Bactériologie & Virologie et Hygiène

CHU Ibn Rochd – Casablanca

Faculté de Médecine et de Pharmacie - Casablanca

Casablanca le 10 Novembre 2016



Introduction

- Le risque de transmission de maladies infectieuses chez le personnel de santé est bien réel
- Certains risques de transmission sont bien connus des personnels soignants:
 - Tuberculose,
 - maladies transmissibles par voie sanguine (Hépatites B et C, HIV),
 - Infections invasives à méningocoque

Introduction

- D'autres risques semblent moins bien pris en compte, Ex la coqueluche, probablement par défaut d'information
 - la prévention de ces risques doit être organisée et l'information des personnels soignants reste la clef de la réussite
- 

Introduction

- L'organisation de la prévention du risque de transmission d'agents infectieux chez les personnels soignants est sous la responsabilité du CLIN.



- C'est une partie intégrante de la lutte contre les infections associées aux soins.

AES (VIH/ VHB/ VHC)

Contact avec du sang ou un liquide biologique

- ✓ Piqure
- ✓ Coupure
- ✓ Contact sur peau lésée
- ✓ Contact sur muqueuse



Conduite à tenir: soignant

- Arrêter le geste (Si possible)
- Lavage à l'eau et au savon
- Immersion dans du dakin 5 à 10 minutes.
- **NE PAS FAIRE SAIGNER!!!!!!**
- En cas de projection, rinçage abondant au Sérum physiologique.
- Consultation avec le médecin référent (SAU, Maladies Infectieuses).
- Déclarer!!!!!!

VHB

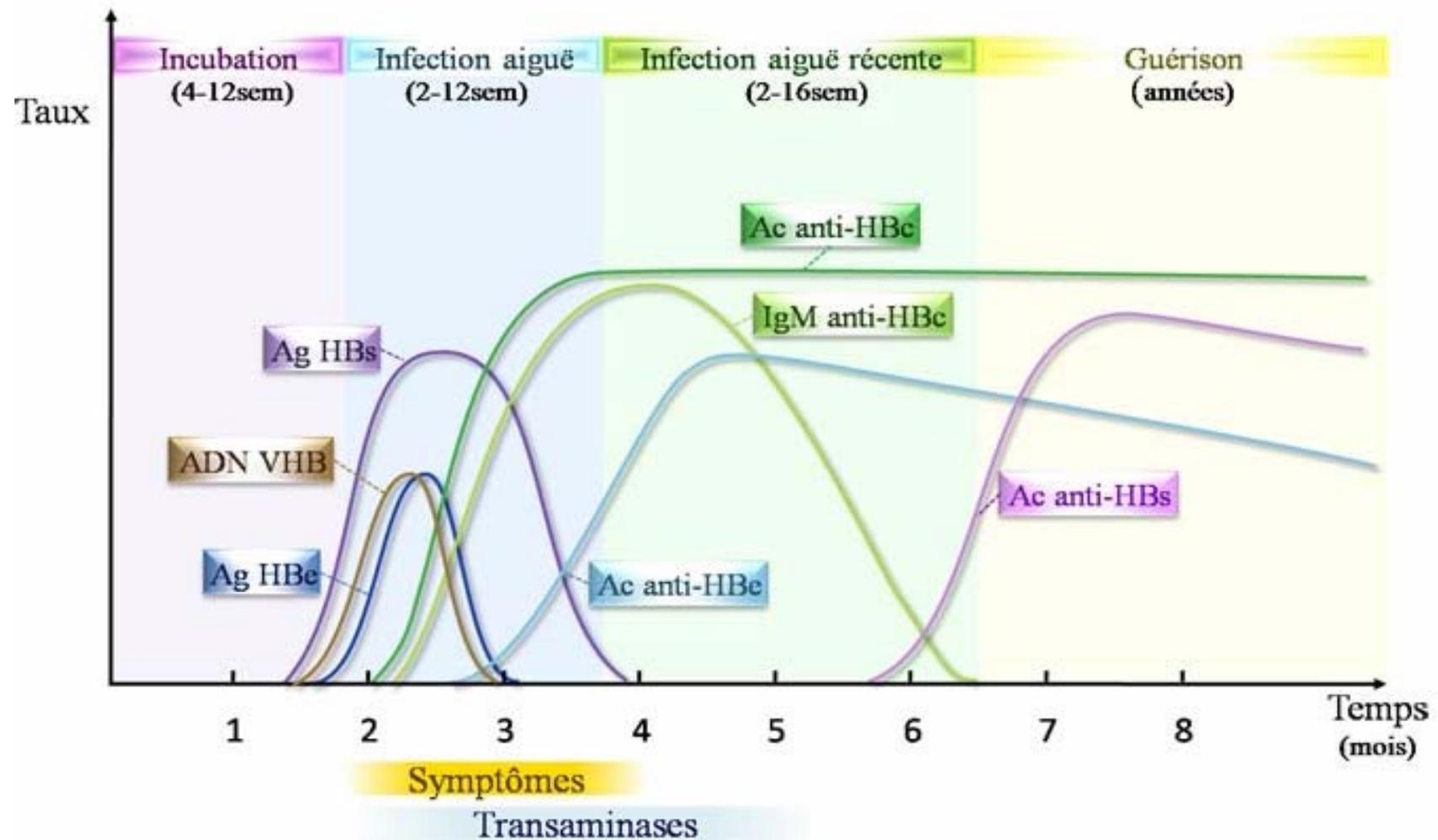
- Transmission: 2 à 40% en cas d'exposition percutanée
- Prévention grâce à la vaccination
- Obligatoire chez les professionnels de la santé +++

AES :les risques professionnels

(Pr RAPELANORO et coll)

- Profondeur de la blessure
- Type de l'aiguille
- Geste en cause
- Virus responsable
 - VIH < 0,3%
 - VHC : 1-10%
 - VHB : 20-35 %

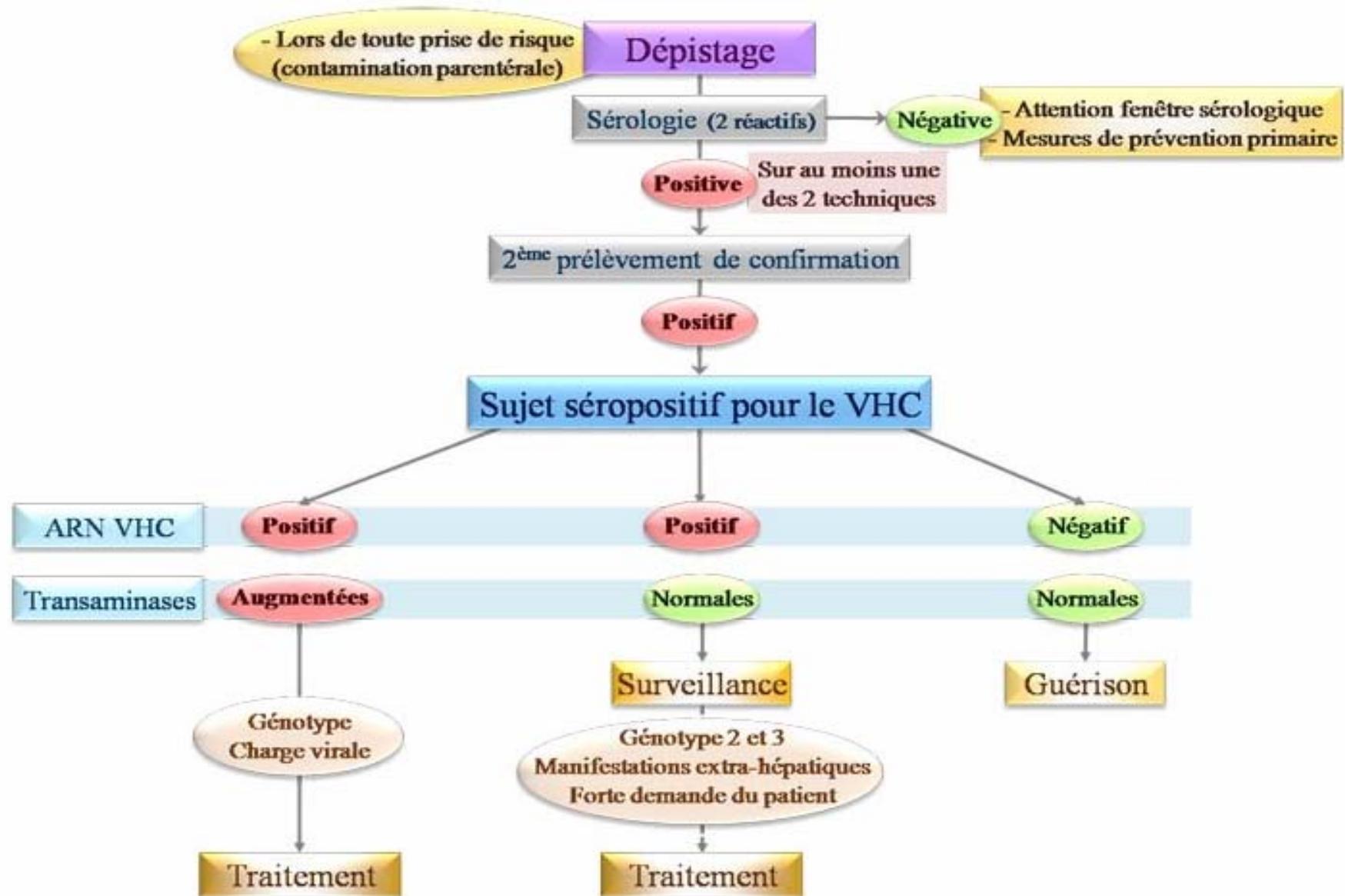
Marqueurs biologiques de l'Hépatite B



VHC

- Transmission: 1,8% en cas d'exposition percutanée
- Exemple en France: entre 1997 et 2012: 70 séroconversions de personnels de santé

VHC: Diagnostic biologique



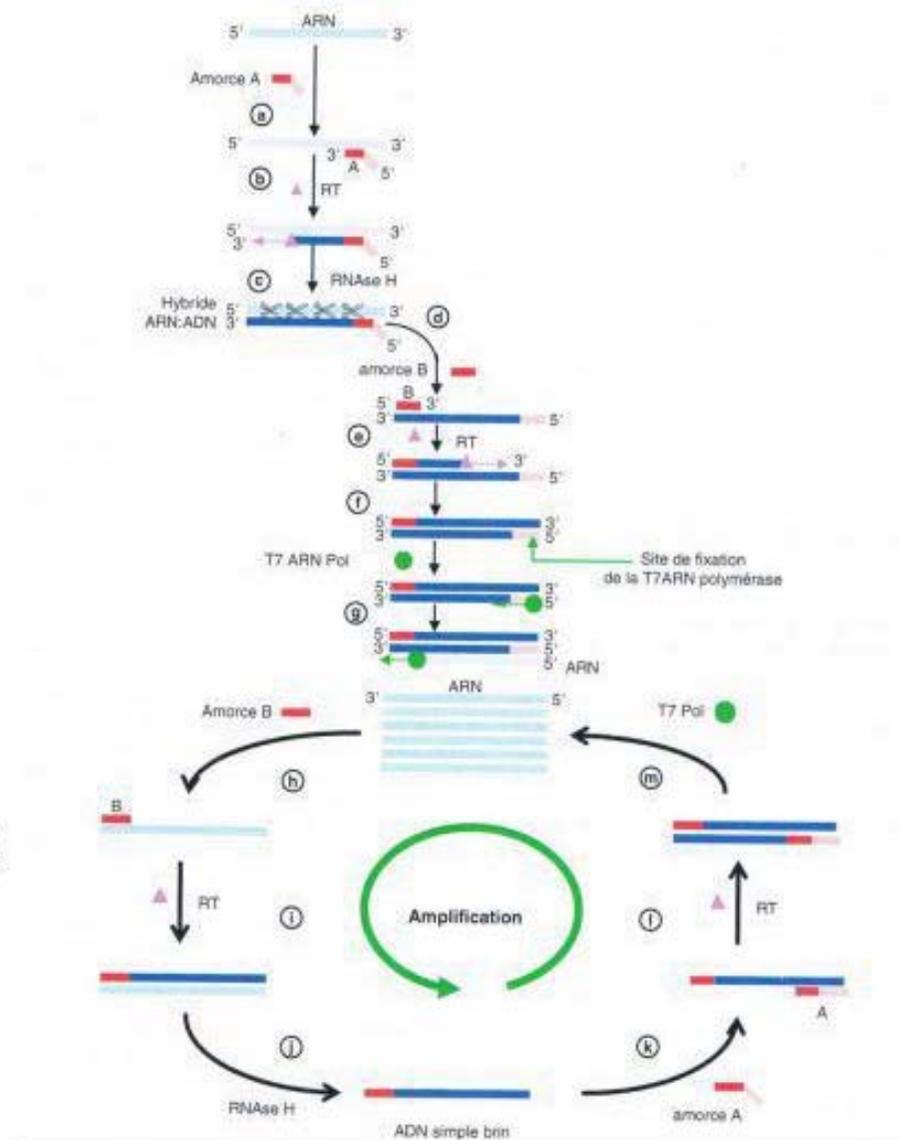
VHC

- Le 1er marqueur biologique de l'infection par le virus de l'hépatite C est l'apparition de l'ARN viral
- Détectable dans le sérum par PCR ou TMA.
- Technique très fiable et met en évidence dans le sang le génome du virus (ARN).
- La PCR est positive dès la première semaine après la contamination.
- Sensibilité: seuil de détection d'environ 50 copies/ml.

TMA

(Transcription Mediated Amplification)

- Amplification isothermique d'**ARN** (via un intermédiaire ADN)
- 2 enzymes :
 - ARN polymérase
 - transcriptase inverse (+ RNase)
- synthèse d'un ADN double brin transcriptible en ARN par la transcriptase inverse
- amplification par l'ARN polymérase : transcription d'une série d'ARNs (50 à 100 copies)
- Les ARNs synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse d'un ADNdb.



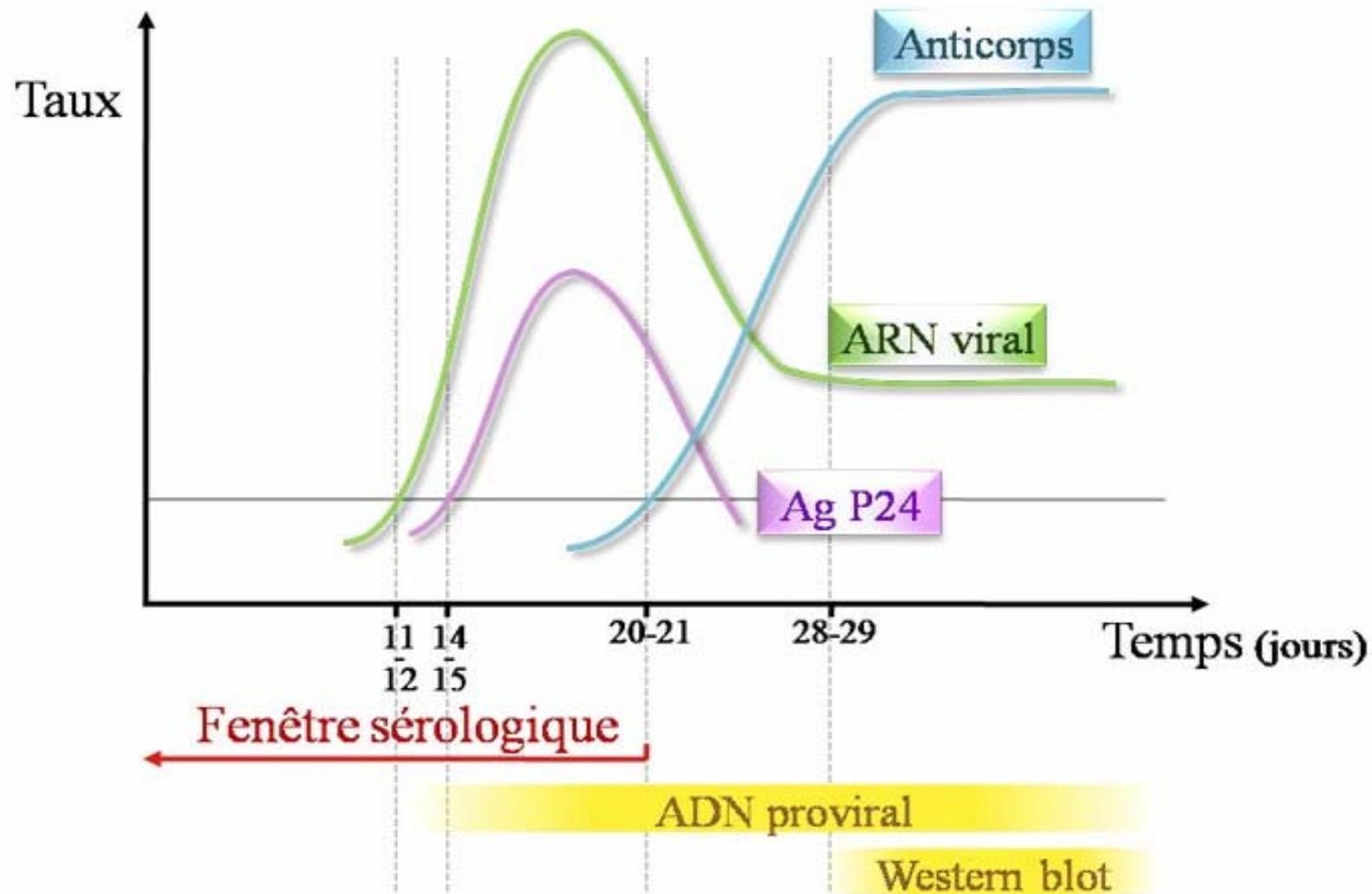
VHC

- **Les anticorps anti-VHC:** mis en évidence par les tests ELISA
Détectent un mélange d'anticorps dirigés contre les protéines constitutives du virus de l'hépatite C.
- Détectables plus tardivement, 50 à 70 % des cas à partir de la 6eme semaine après la contamination.
- **Les transaminases (ALAT et ASAT)** s'élèvent avant l'apparition des symptômes à partir de la 4eme semaine après la contamination, pic vers la 6eme semaine. Le pic des transaminases est le plus souvent supérieur à dix fois la normale.

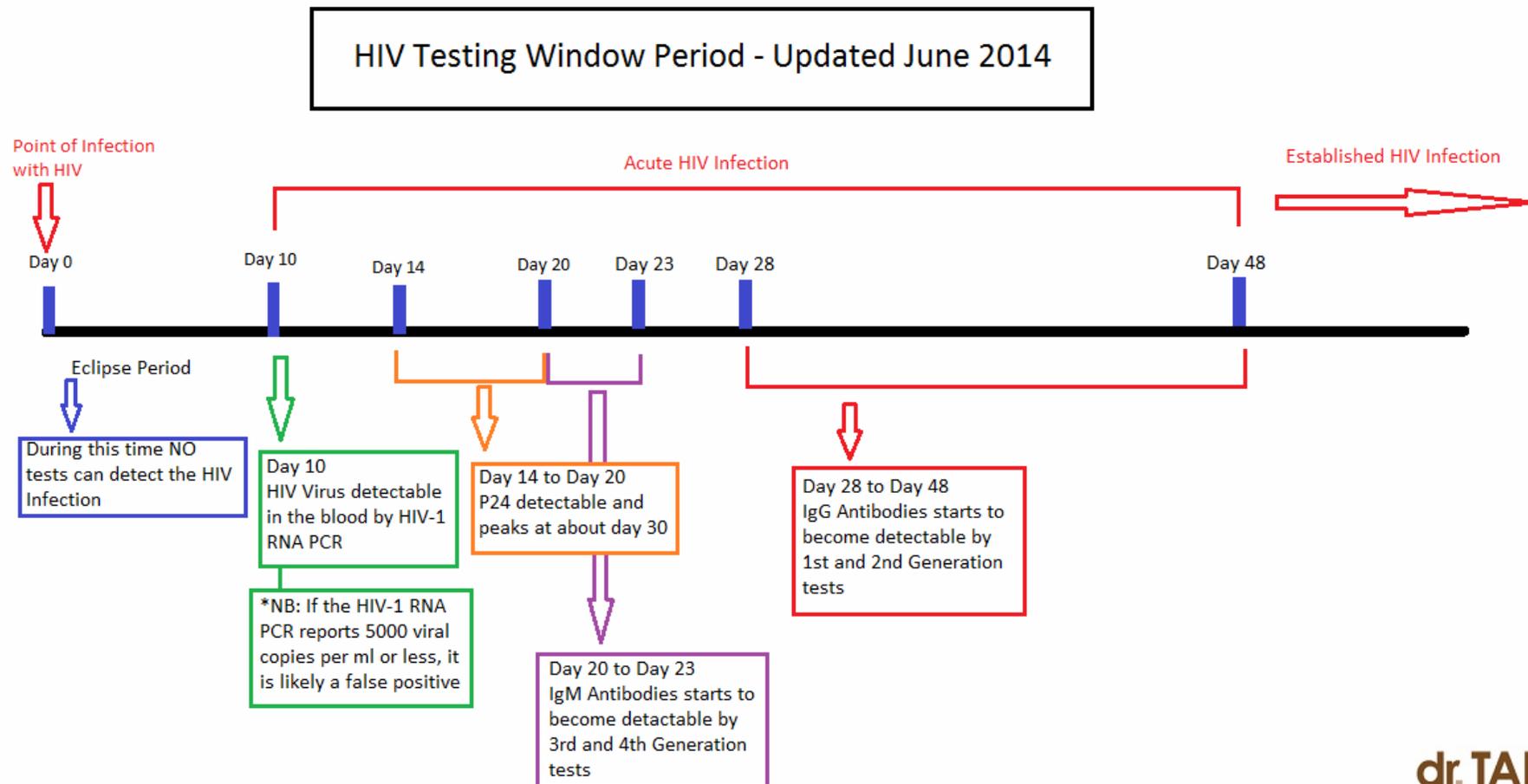
VIH

- Risque de transmission:
 - Pique: 0,32%
 - Projection: 0,04%
- Facteurs influençant les risques de transmission
 - Blessure profonde
 - Instrument souillé
 - Aiguille creuse utilisée en intravasculaire
 - Patient source (CV élevée)

VIH: cinétique d'apparition des marqueurs biologiques



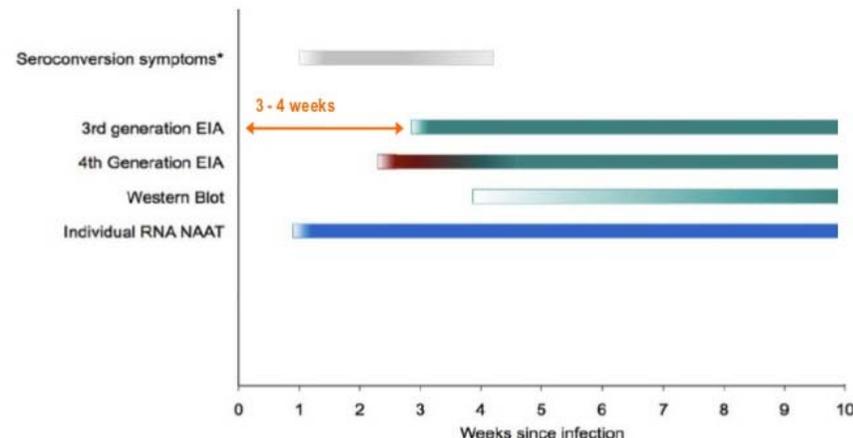
Chronologie des tests pour détection de l'infection à VIH



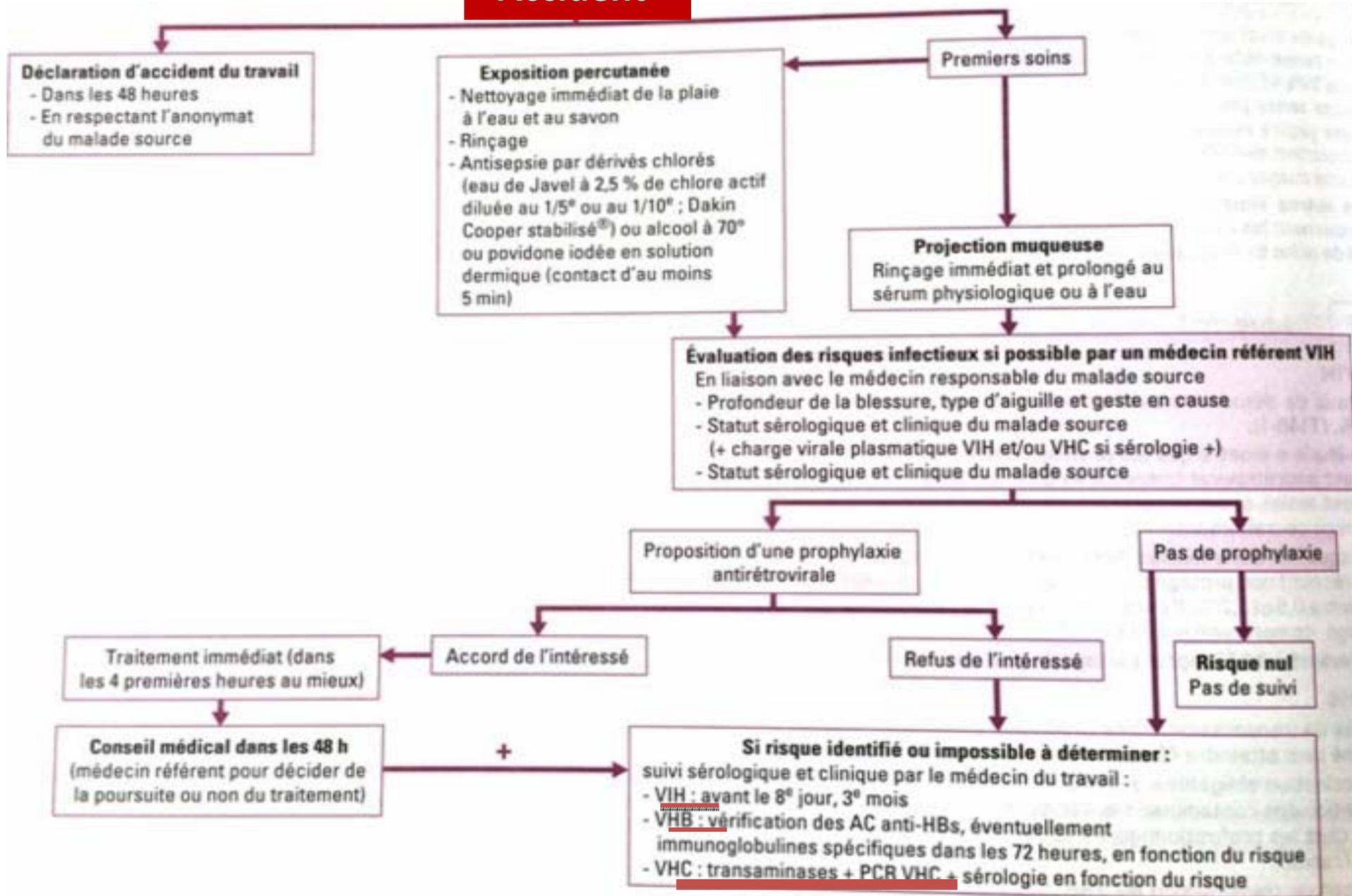
Test d'amplification d'acides nucléiques

- TAAN-VIH est un test très sensible qui permet de déceler la présence de l'acide ribonucléique (ARN) du VIH dans le sang.
- TAAN-VIH peut déceler l'ARN du VIH très tôt, 7 à 14 jours suivant l'infection

Window period – “standard testing”



Accident





La Grippe

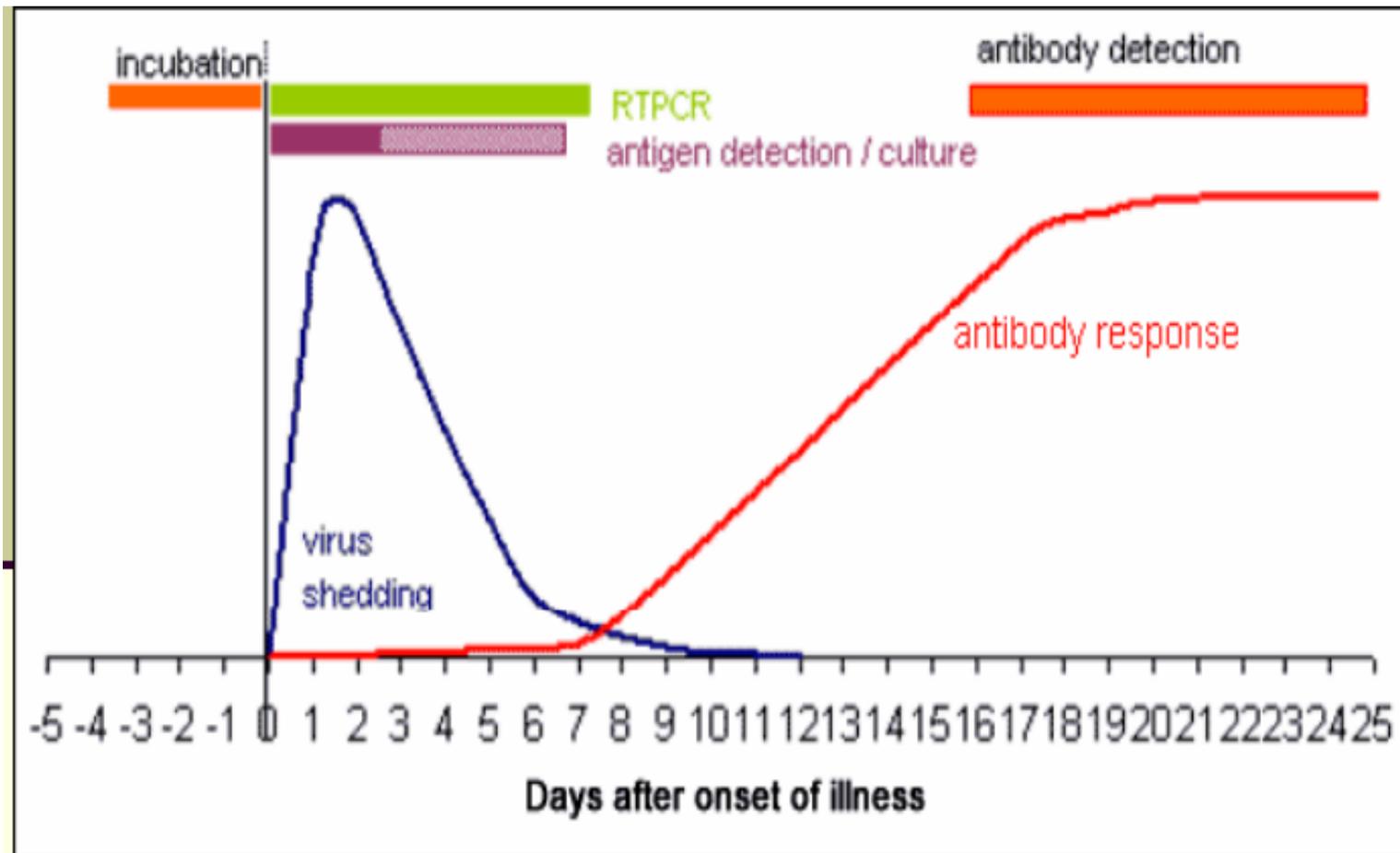
La Grippe

Quels tests utiliser pour le diagnostic?

- Techniques classiques: (en % de positivité) *
 - Cultures: 56%
 - Sérologie: 61%
- Tests rapides:
 - Sur membrane: 50-65%
 - Immunofluorescence: 60-70 %
 - RT-PCR: 73%

* Zambon et coll, 2003: 1033 patients , période épidémique annuelle

Cinétique d'évolution des marqueurs biologiques de la grippe

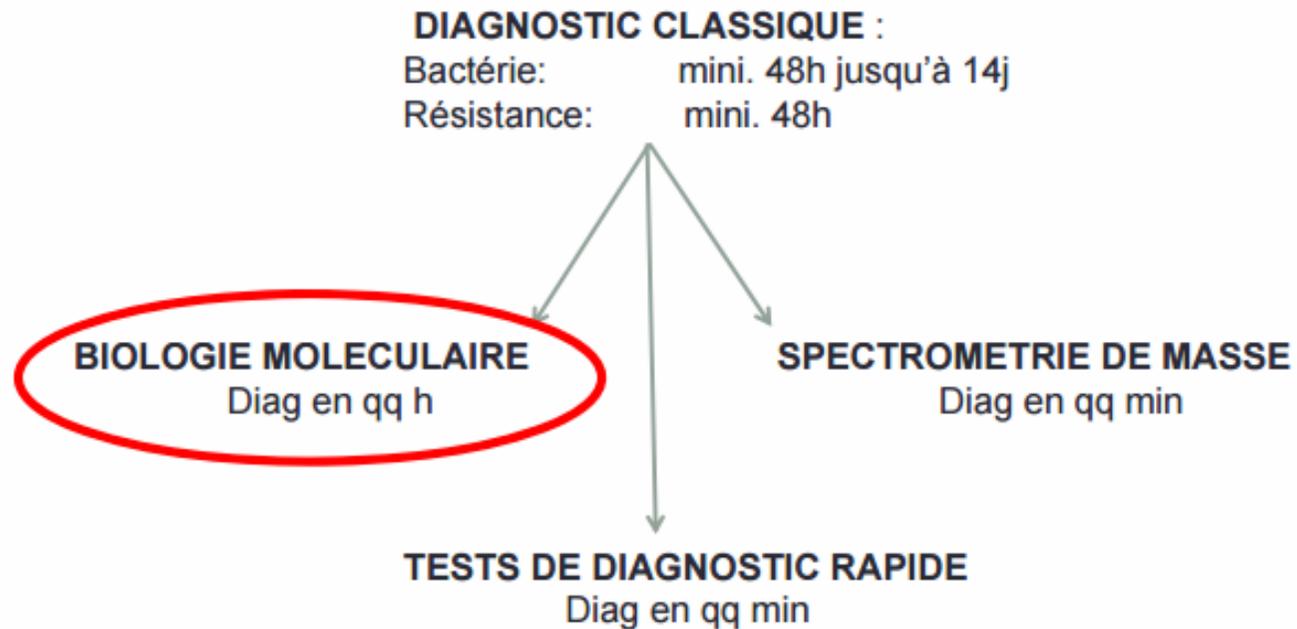


RT-PCR grippe

- À partir d'un échantillon respiratoire,
- Extraction de l'ARN viral
- Transcription inverse
- PCR (en temps réel) : la PCR peut être spécifique grippe A ou B ou différencier les sous-types viraux de grippe A.
- Gain de sensibilité, / Gain de spécificité,
- Typage A/B possible en utilisant des sondes spécifiques A ou B, différenciation des sous-types viraux.
- Cependant, technique coûteuse, nécessite un équipement de laboratoire particulier, du personnel spécialisé.

Diagnostic d'une infection bactérienne

Comment améliorer la rapidité du diagnostic?

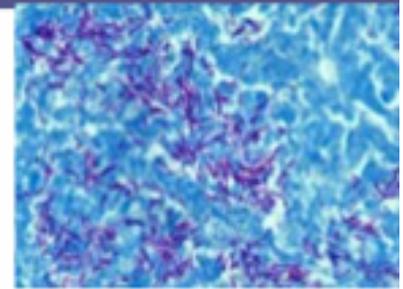


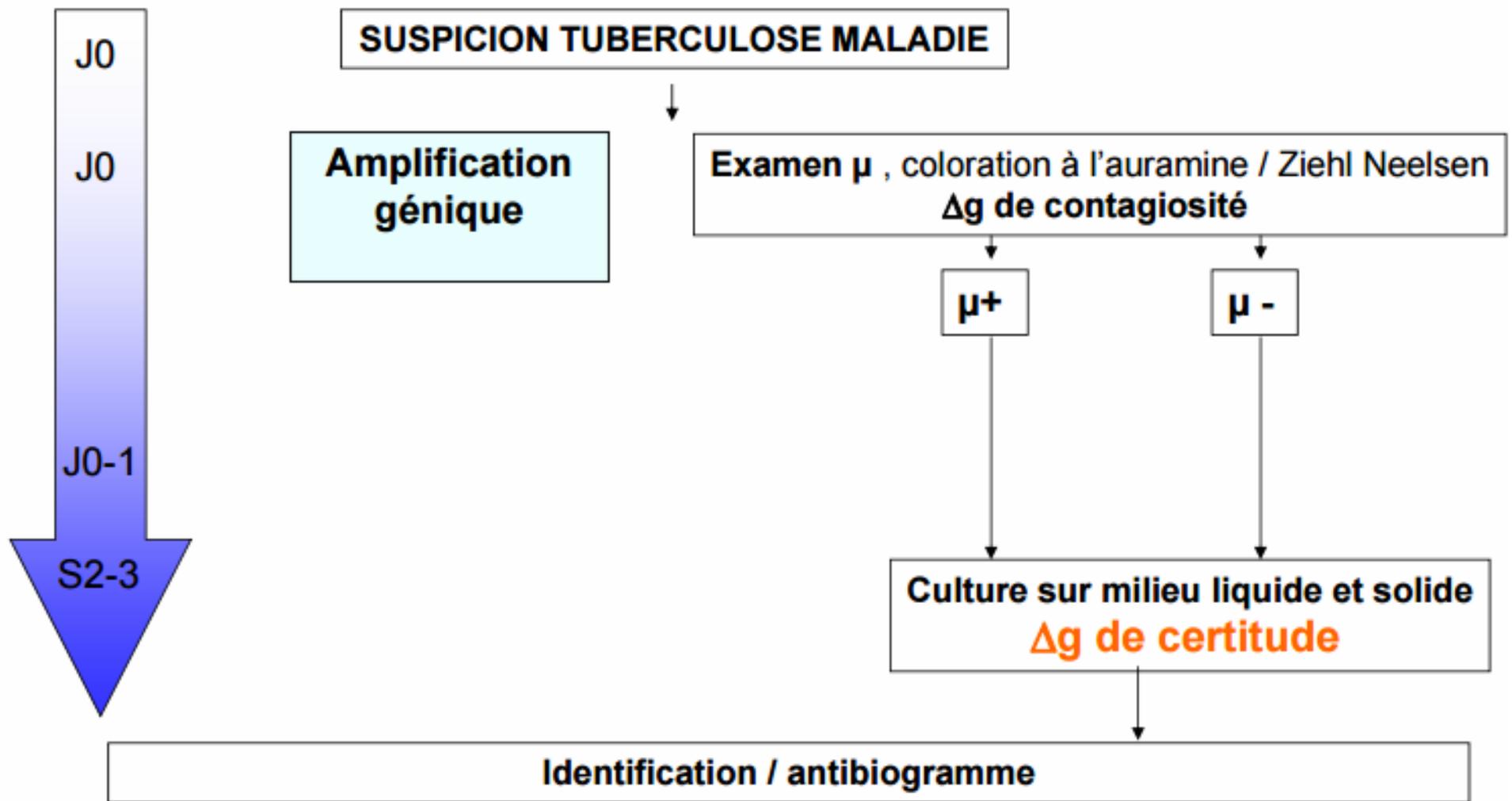


La Tuberculose

Tuberculoses respiratoires

- Complexe *Mycobacterium tuberculosis*
 - ▣ *M. tuberculosis* (bacille de Koch (1882) ou BK)
 - ▣ rarement *M. africanum* et *M. bovis*
- Bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR)
- Réservoir exclusivement humain
- Transmission est essentiellement inter- humaine et se fait par voie aérienne directe par l'intermédiaire de fines particules de 1-5 microns (qui restent en suspension)
- Rôles de la promiscuité et de la durée d'exposition





Amplification génique
 Identification
 Résistance génotypique
 1-2 J

Test immunochromato
 TB Ag MPT64
 15 min

ATB
 milieu liquide ou solide
 S2-6

Test Xpert MTB/RF[®] Genexpert

- PCR temps réel



- Détection des mycobactéries du complexe tuberculosis
- Détection de la résistance à la rifampicine
Synonyme de Multirésistance
- Détection moléculaire aisée (gène rpoB)

The Xpert MTB/RIF Molecular Beacon Assay

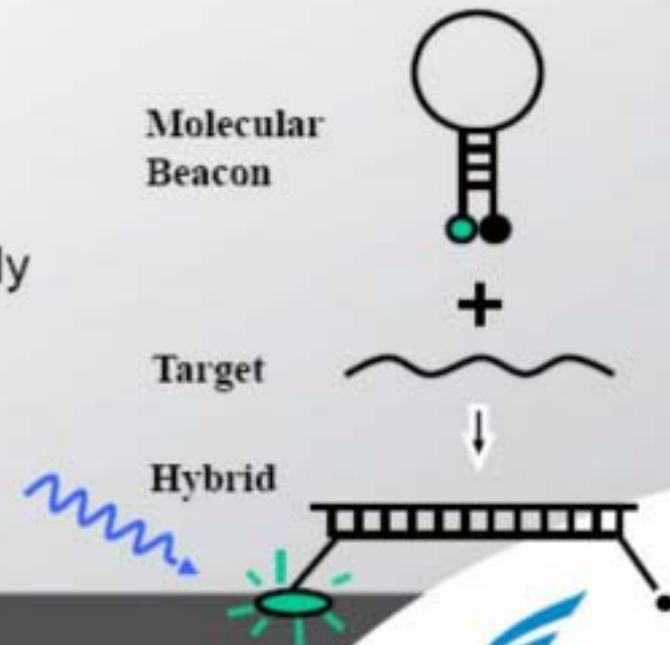


5 Probes bind to wild type

Probes do not bind to mutant sequence

1 Probe for SPC (*B. globigii*)

6 fluorescent dyes detected simultaneously



Diagnosis of tuberculosis and drug resistance : What can new tools bring us ?

The International Journal of Tuberculosis and Lung disease
State of Art de Drobniewski F et al

Performance du test Xpert MTB/RIF dans la tuberculose pulmonaire

pour la détection de <i>M.tuberculosis</i> dans les prélèvements cliniques culture +						
Examen microscopique	Sensibilité	95%IC	Spécificité	95%IC	Nb Etudes	Nb patients
μ+	98 %	98-99	99 %	99-99	7	4896
μ-	75%	72-78	99 %	99-99	7	4466
pour la détection de la résistance à la rifampicine de <i>M. tuberculosis</i> dans les prélèvements cliniques culture +						
PCR+	98 %	97-99	99 %	98-99	7	2831

Détection de la résistance à la rifampicine

Sensibilité : 98% ; Spécificité : 99%



Table 1: Comparison of the overall sensitivity of a single LJ culture, a single MGIT culture and a single, direct Xpert MTB/Rif test using the results of 3 smears and 4 cultures per patient as a reference standard.

Patient group	Single LJ*	Single MGIT*	Single, direct Xpert †
Smear-positive, Culture-positive	93.0% (1016/1092)	97.7% (1104/1130)	98.2% (551/561)
Smear-negative, Culture-positive	69.3% (205/296)	84.4% (276/327)	72.5% (124/171)
All Culture-positive	88.0% (1221/1388)	94.7% (1380/1457)	92.2% (675/732)

* Calculated as the proportion of individual cultures that agrees with the reference standard of 3 smears and 4 cultures. Contaminated cultures are excluded. Patients with two valid cultures appear in the calculation twice.

† Results are shown for the direct MTB/RIF test performed on unprocessed sputum. For details, see manuscript, table 2.

Le test Xpert MTB/RF (GeneXpert[®])

- Test unitaire, sécurisé, automatisé, facile à utiliser, rapide et fiable
- Permet de confirmer ou infirmer le diagnostic de TB avec une sensibilité variable / de l'origine des prélèvements et / de la charge bactérienne
- Conforter ou imposer l'isolement respiratoire
- Ajuster le traitement antituberculeux plus rapidement

Autres tests moléculaires

- ❖ RT-PCR et TMA sont rapides et sensibles,
- ❖ mais un résultat négatif ne permet pas d'exclure une infection
- ❖ Des tests moléculaires ont été développés pour déceler la résistance à la rifampicine (mutation du gène *rpoB*) et à l'isoniazide mutation des gènes (*inhA* ou *katG*)
- ❖ Tests pour détecter la résistance aux fluoroquinolones, aux aminoglycosides, et à l'ethambutol
- ❖ Tests moléculaires pour identification des différentes espèces au sein du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

PCR / RT-PCR / TMA et Tuberculose

- Les techniques de PCR, de PCR en temps réel et d'amplification isotherme sont rapides et sensibles, mais un résultat négatif ne permet pas d'exclure une infection.
- Des tests moléculaires ont été développés pour déceler des résistances à la rifampicine (mutations du gène *rpoB*) et à l'isoniazide (mutations des gènes *inhA* ou *katG*).
- D'autres tests viennent d'être commercialisés pour détecter la résistance aux fluoroquinolones, aux aminoglycosides et à l'éthambutol.
- Enfin, des tests moléculaires permettent d'identifier rapidement les différentes espèces au sein du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.



Coqueluche

Généralités

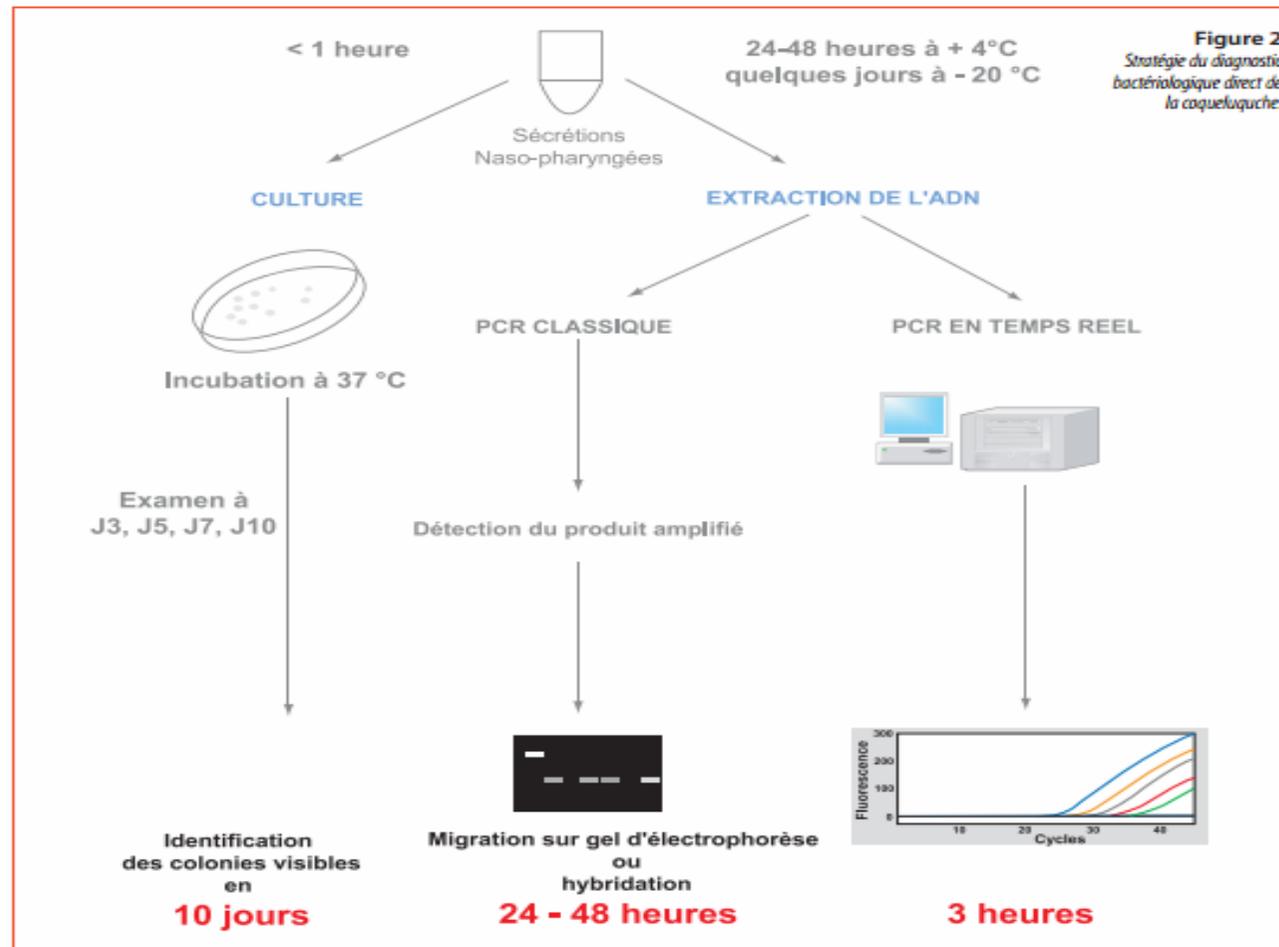
- Maladie respiratoire contagieuse liée à un BGN aérobic stricte:
 - *Bordetella pertussis*
 - *Bordetella para-pertussis*
- Réservoir humain strict.
- Transmission aérienne au cours de la toux.
- Taux d'attaque 70-80%
- Prévention = vaccination.

Contagiosité



- Sans traitement: 21 jours
- Maximale pendant la phase catarrhale
- Diminue avec le temps
- Nulle après 5 jours d'antibiotiques

Intérêt de la PCR en temps réel dans le diagnostic biologique de la coqueluche



la sensibilité de la PCR pour le diagnostic de coqueluche varie entre 80 et 100% selon les auteurs.

PCR coqueluche

- L'utilisation en routine de la PCR pour le diagnostic de coqueluche offre un diagnostic rapide, fiable, tant par sa sensibilité que par sa spécificité.
- Nécessite qu'un seul prélèvement non invasif.
- La précocité du diagnostic qu'apporte la PCR peut permettre de repérer une coqueluche avant que le tableau clinique ne soit complet

Conclusion

- ✓ Le risque infectieux chez le personnel soignant est un fait réel.
- ✓ Les tests de biologie moléculaire restent les seuls à apporter un diagnostic rapide dans un certain nombre de situations, mais ils restent restreints à quelques pathogènes.
- ✓ Actuellement ces tests sont variables, mais très concurrencés par les tests de diagnostic rapide.
- ✓ Leur application et leur utilisation dépendent également de la baisse du coût pour leur vulgarisation.