



Pour votre santé, Foch s'engage

Présentation de l'automate GeneXpert Cepheid® au laboratoire de microbiologie

**Journée professionnelle de l'AFTLM
Montpellier, 18 Novembre 2016**

Erwan Trochu
Technicien supérieur de laboratoire
Service de Biologie Clinique - Microbiologie
Hôpital Foch Suresnes

SOMMAIRE



- 1. Rappels et généralités en microbiologie**
- 2. Introduction**
- 3. Le GeneXpert**
- 4. Conclusions**
- 5. Questionnaire DPC**

1. Rappels et généralités en microbiologie

- Qu'est-ce que la microbiologie ?
 - la bactériologie
 - la mycologie / parasitologie
 - la virologie

- Plusieurs étapes avant un résultat définitif pour le médecin et le patient (bactériologie) :
 - J0 : - réception et vérification de la conformité du prélèvement
 - enregistrement du dossier
 - ensemencement du prélèvement et examen direct (coloration de Gram)

 - J1 : - obtenir une culture bactérienne plus ou moins longue (de 12 à 72h selon le germe et son exigence)

 - J2 : - réalisation des diverses techniques microbiologiques d'identification et réalisation d'antibiogramme si nécessaire

2. Introduction

2.1 Principe de La Polymérase Chain Reaction (PCR) en point final

Le but est d'amplifier de façon exponentielle un fragment d'ADN d'intérêt afin d'obtenir un très grand nombre de copies de ce fragment d'intérêt.

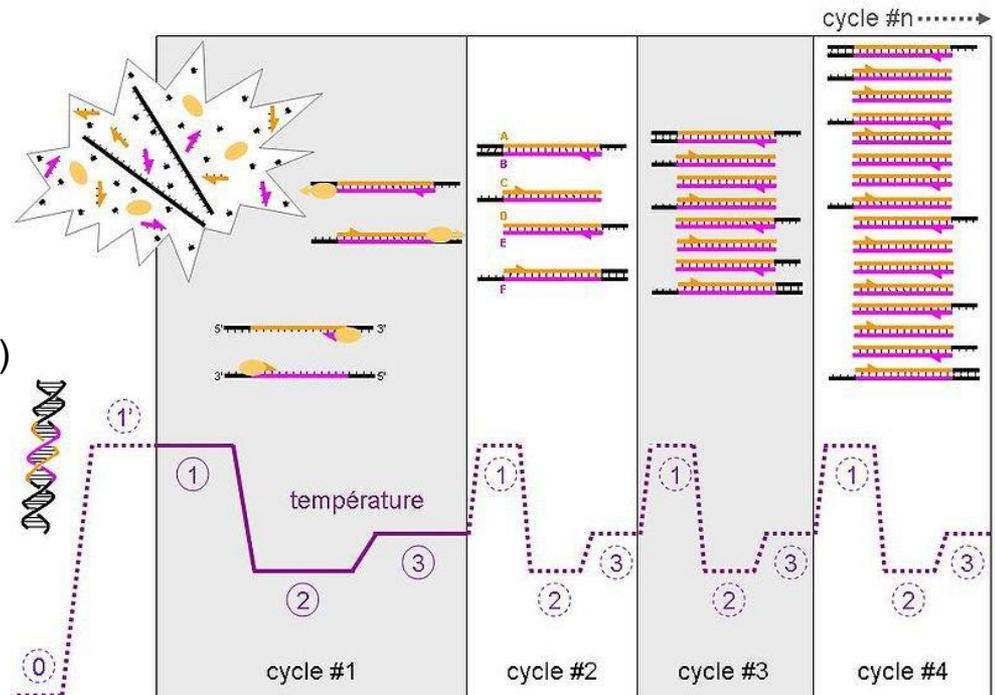
▪ Trois étapes principales :

1 : dénaturation (ouverture double hélice ADN)
2 : hybridation des amorces spécifiques
3 : élongation par ADN polymérase
= **1 cycle de PCR**

▪ Ce cycle est répété plusieurs fois (~30 cycles)
= ~ 2 h

▪ Révélation de l'amplification
par électrophorèse en gel d'agarose
= ~ 45 min

= délai relativement long



2. Introduction

2.2 Principe de la PCR en temps réel

- Le principe est identique au précédent à la différence que les amorces spécifiques de la région d'ADN d'intérêt sont **fluoromarquées**.
- Durant la phase d'élongation, la fluorescence émise par les amorces est mesurée par l'automate **GeneXpert**.
- La combinaison PCR + fluorescence permet de détecter rapidement la présence de l'ADN recherché.

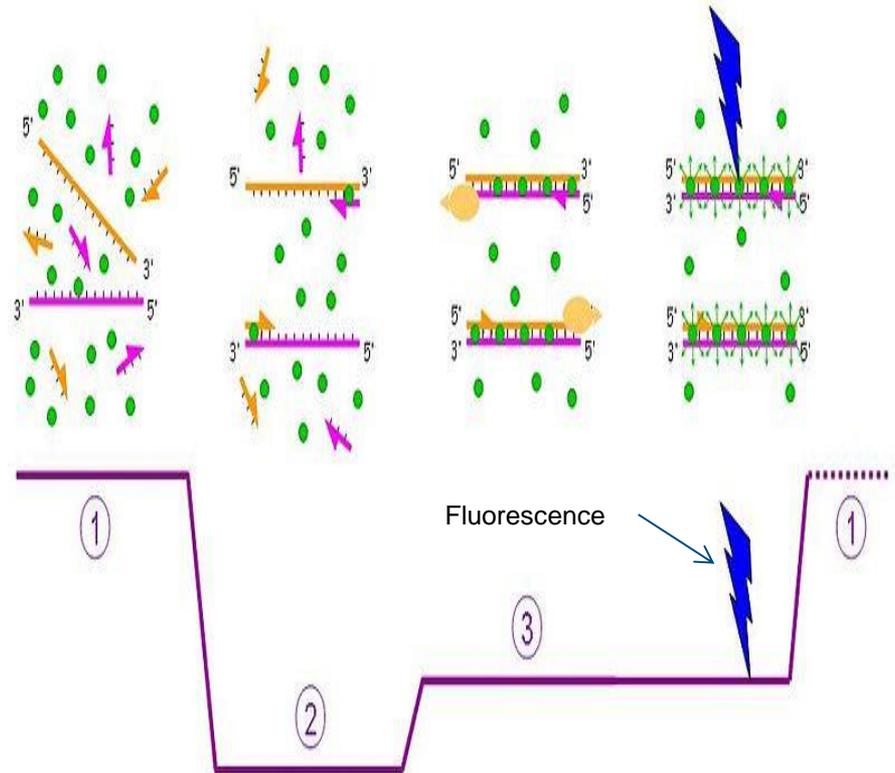


Illustration d'après Wikipédia.org
https://fr.wikipedia.org/wiki/Marqueur_fluorescent_en_PCR

3. Le GeneXpert

3.1 Présentation

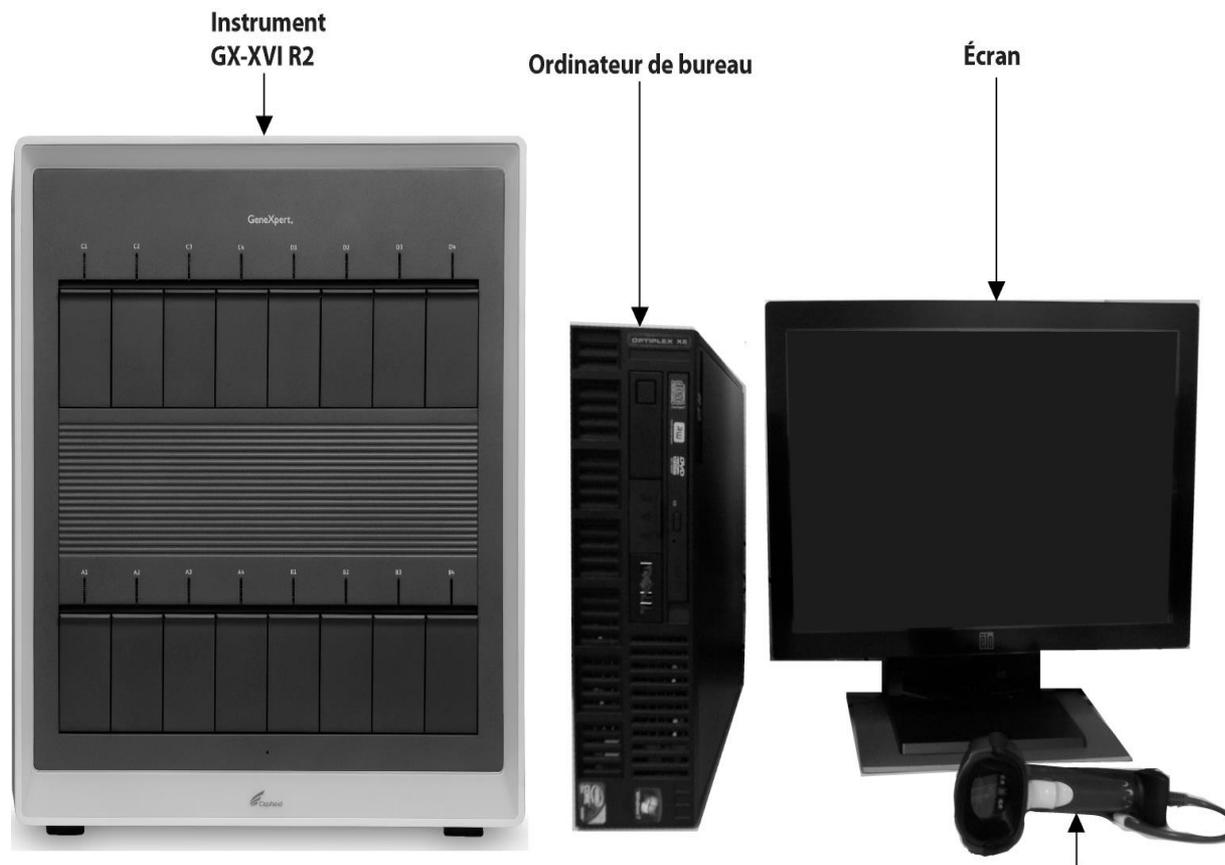


Image fournie par Cepheid®

Lecteur de codes barres

3. Le GeneXpert

3.1 Présentation

- Chaque module est :
 - indépendant et traite un échantillon
 - gère l'intégralité de l'analyse
- Un module se compose :
 - 1 : moteur de la valve** : fait pivoter le corps de la valve de la cartouche afin d'atteindre les différentes chambres de la cartouche.
 - 2 : moteur du piston de la seringue** : distribue les liquides dans les différentes chambres de la cartouche.
 - 3 : émetteur d'ultrasons** : lyse l'échantillon (le cas échéant).
 - 4 : module I-CORE®** : effectue l'amplification par PCR et la détection.

3. Le GeneXpert

3.2 Le module I-Core ®

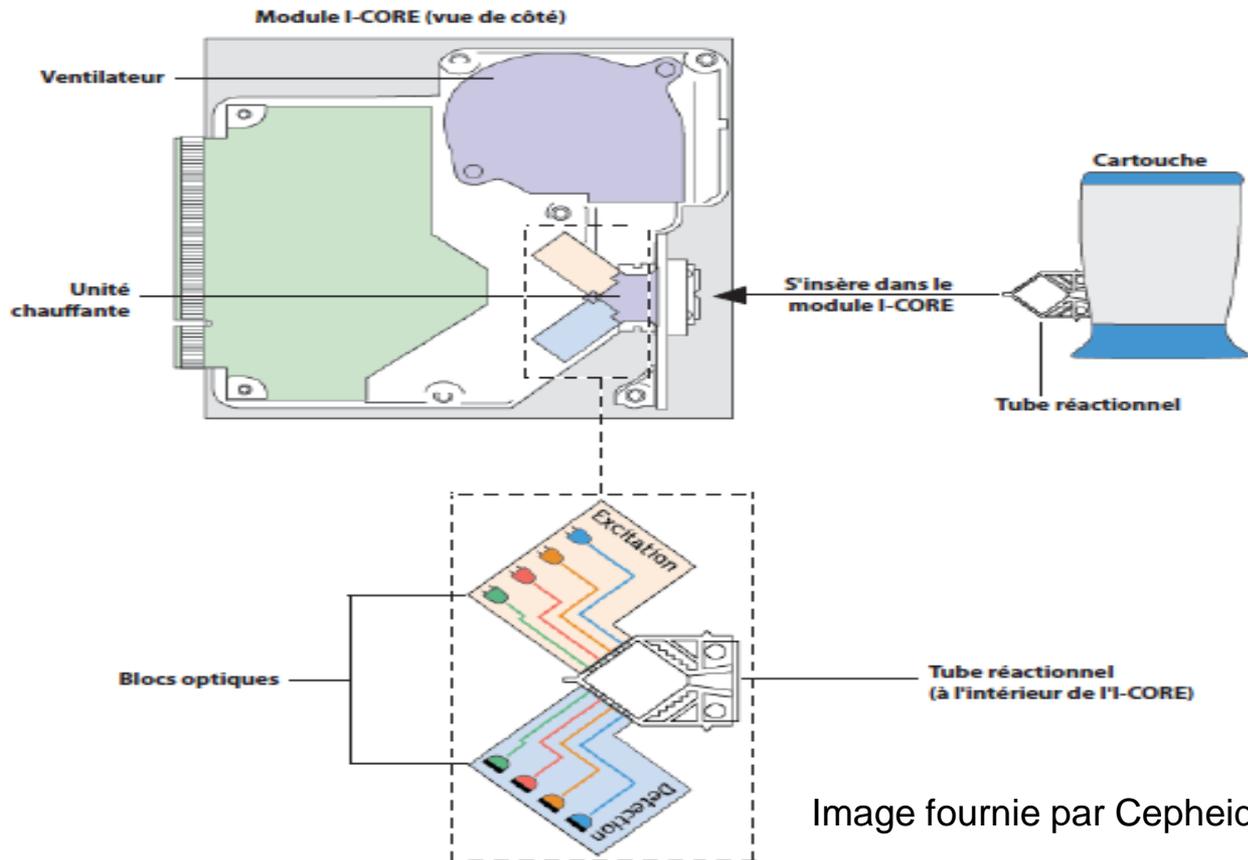
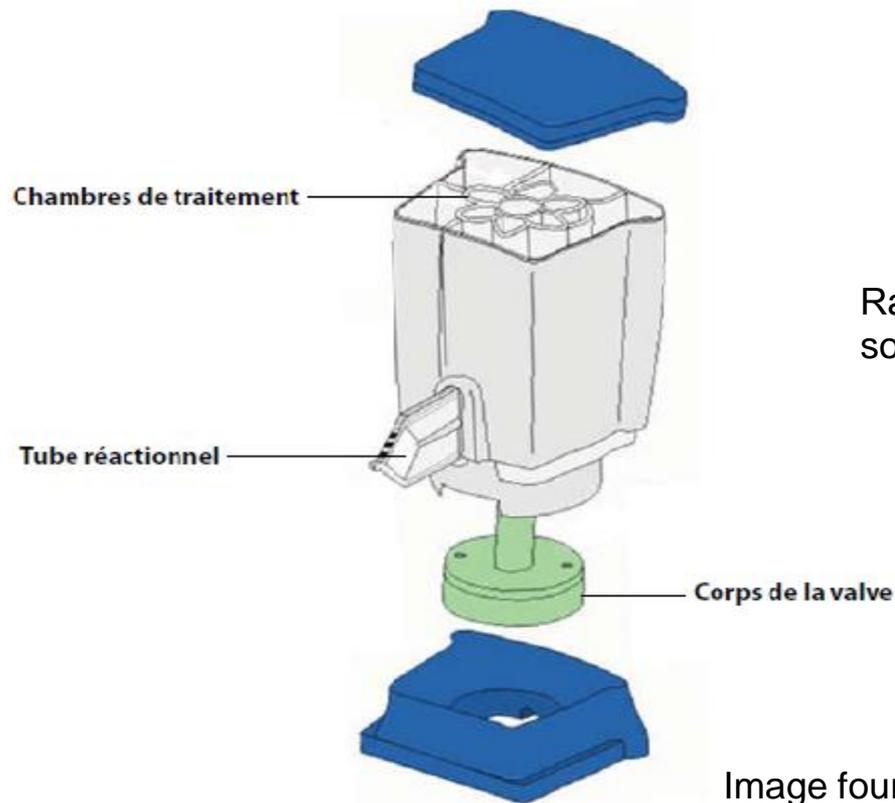


Image fournie par Cepheid®

Figure 3-2. Module I-CORE (module à 4 couleurs)

3. Le GeneXpert

3.3 La cartouche GeneXpert



Contient : - le tampon de PCR
- les amorces spécifiques
- ADN polymérase
- CQ internes (amorces et cellulaires)

Rajoute : l'échantillon biologique source

Image fournie par Cepheid®

3. Le GeneXpert

3.4 Le fonctionnement du système (film fourni par Cepheid®)

3. Le GeneXpert

3.5 Les avantages

- Travailler directement sur échantillon biologique source (pas de prétraitement) : urine, LCR, sphère génitale
- Champs d'application : bactériologie et virologie d'urgence
- Détection (diagnostic d'infection) de germes non cultivables ou difficilement cultivables : *Chlamydiae trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*
- Fiabilité (CQ internes cartouche), reproductibilité
- Traçabilité (opérateur, numéro de lot du test, ...)
- Rapidité des résultats pour le clinicien : 2h par test en moyenne
- Spécifique des germes recherchés

3. Le GeneXpert

3.6 Les inconvénients

- Travail au coup par coup non adapté aux séries d'échantillons
- Nécessite un volume primaire d'échantillon suffisant (LCR)
- Le prix du test (~45 € HN)

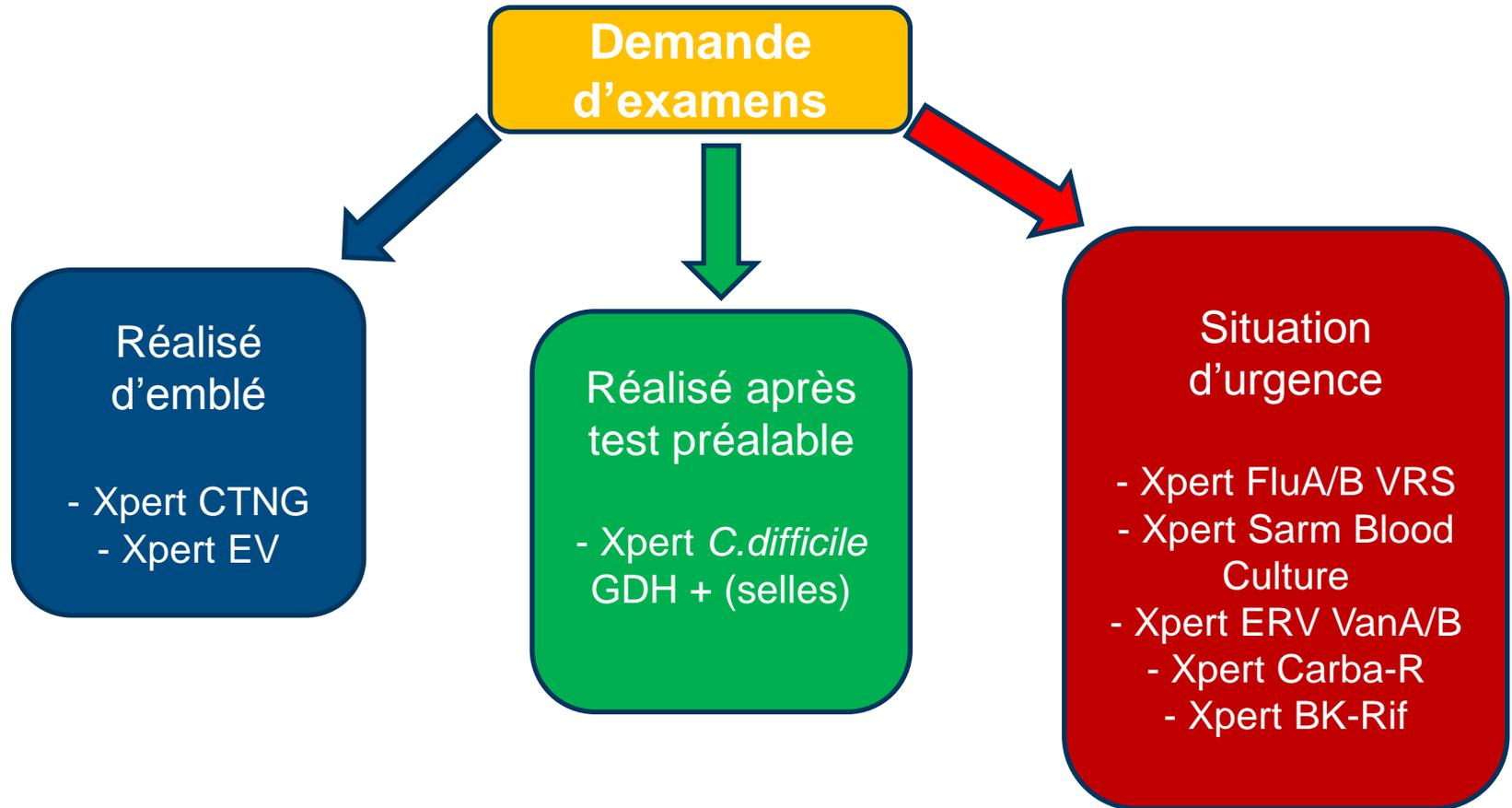
3. Le GeneXpert

3.7 Les tests réalisés à l'hôpital Foch

- **Xpert CTNG** (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*) = Diagnostic
- Xpert Flu/VRS = Diagnostic d'urgence grippe A/B et VRS
- Xpert EV = Diagnostic d'urgence Enterovirus LCR
- **Xpert MRSA Blood Culture** = Détection de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (**SARM**) et SCOA Méthi R ou S
- Xpert MTB Rif = Détection semi-quantitative de BK R ou S Rif
- **Xpert C.difficile** = Détection de *C.difficile* Toxinogène A/B ou sérotype O27 (Nap1/BI)
- Xpert ERV VanA/VanB = Détection ERV Vanco R type A ou B
- Xpert Carba-R = Détection des carbapénémases

3. Le GeneXpert

3.8 Arbre décisionnel d'utilisation du GeneXpert à l'hôpital Foch



3. Le GeneXpert

3.9 Exemples de résultats

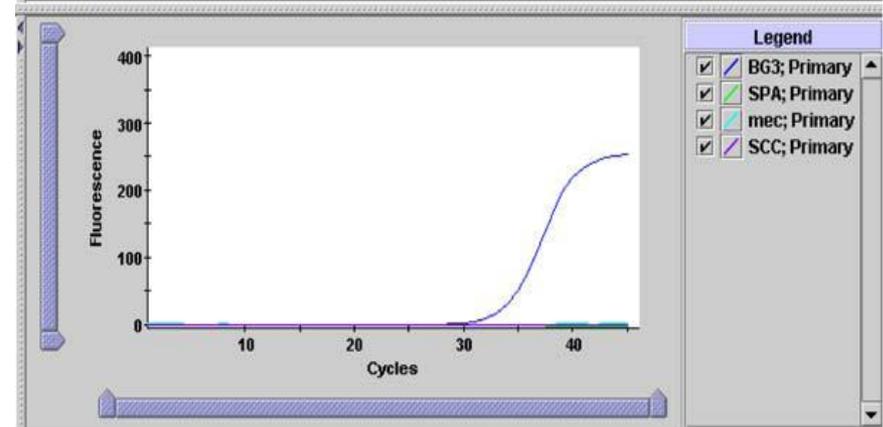
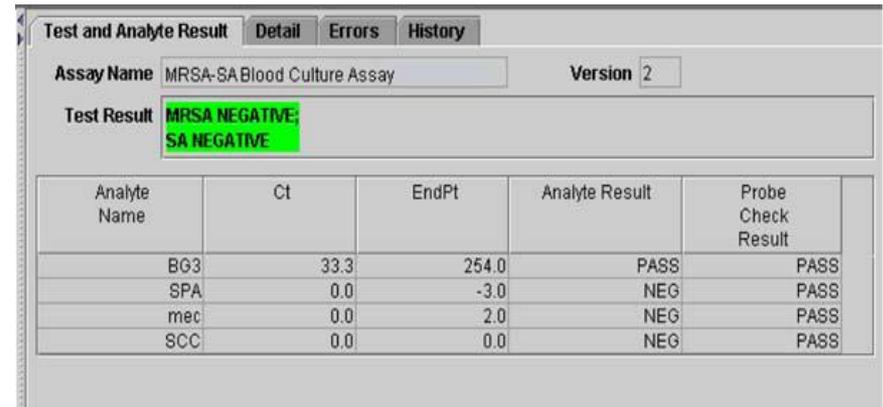
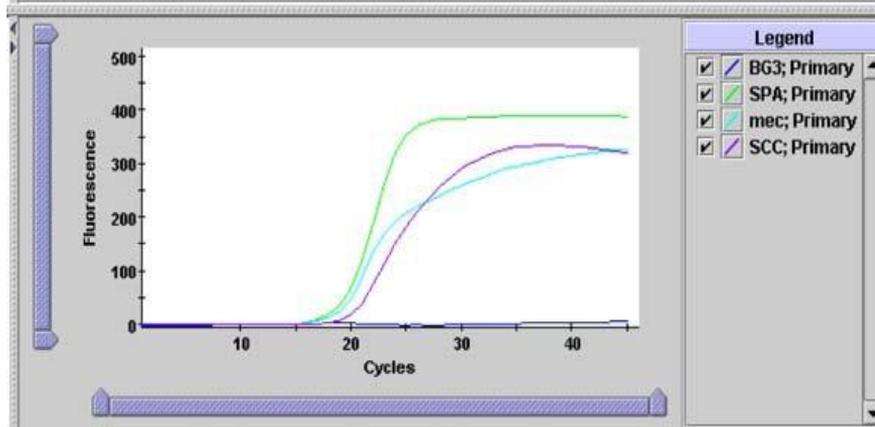
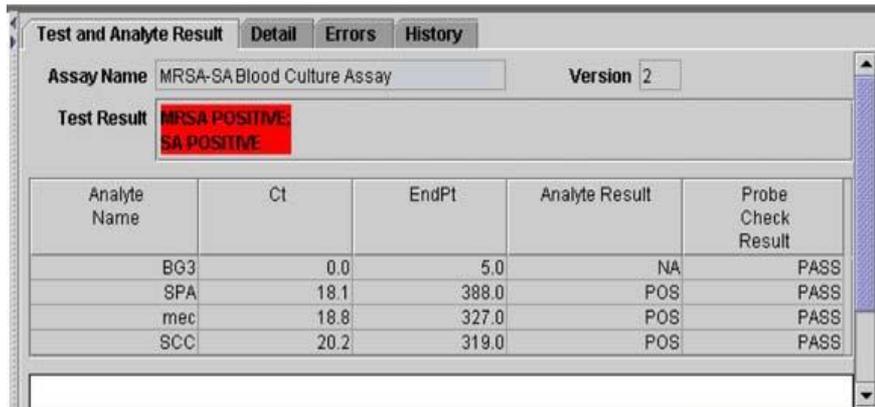
3.9.1 Xpert MRSA Blood Culture

- Se réalise à partir d'un flacon d'hémoculture positive à staphylocoques (à J0 de positivité à partir du Gram)
- Intérêt majeur : traitement du patient avec ATBthérapie adéquate et isolement du malade par le service clinique
- Les SARM sont des bactéries multirésistantes : problèmes pour traiter
- Plusieurs sondes spécifiques utilisées :
 - gène *spa* (code la protéine A de *S. aureus*)
 - gène *mecA*
 - gènes de la cassette *SCC mec*

3. Le GeneXpert

3.9 Exemples de résultats

3.9.1 Xpert MRSA Blood Culture



3. Le GeneXpert

3.9 Exemples de résultats

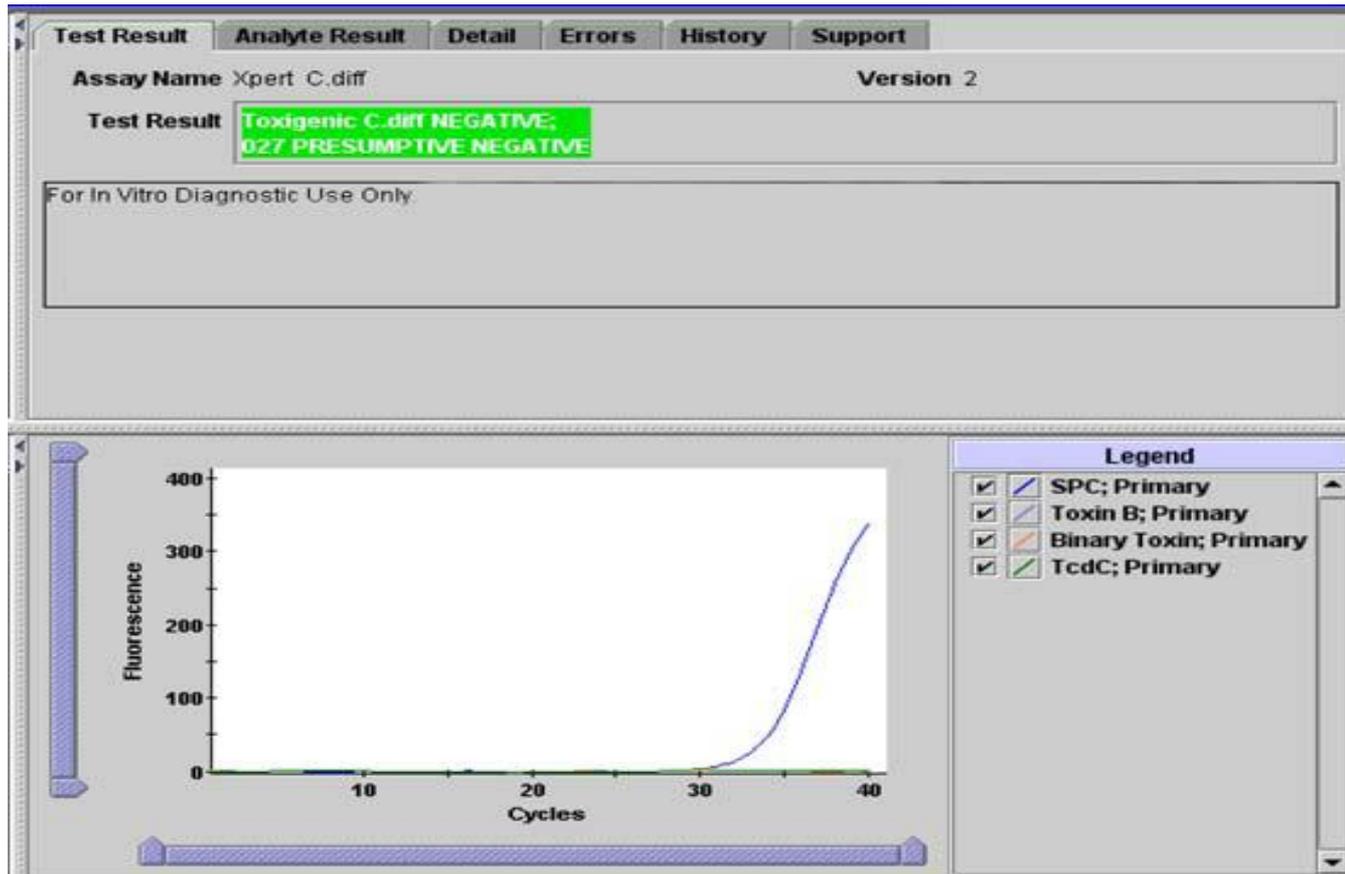
3.9.2 Xpert *C. difficile*

- *C. difficile* : bacille à Gram+, sporulé, toxigène, responsable de diarrhées aiguës et sévères pouvant entraîner le décès du patient.
- Infection très contagieuse, nécessitant l'isolement du patient (plusieurs cas d'infections nosocomiales avérés).
- La PCR est réalisée après un test immunochromogénique GDH (Gamma glutamyl DésHydrogénase) positif sur les selles.
- Ce test détermine le type de toxine produite ou non et s'il s'agit du sérotype O27 Nap1/BI (le plus pathogène = infections nosocomiales).

3. Le GeneXpert

3.9 Exemples de résultats

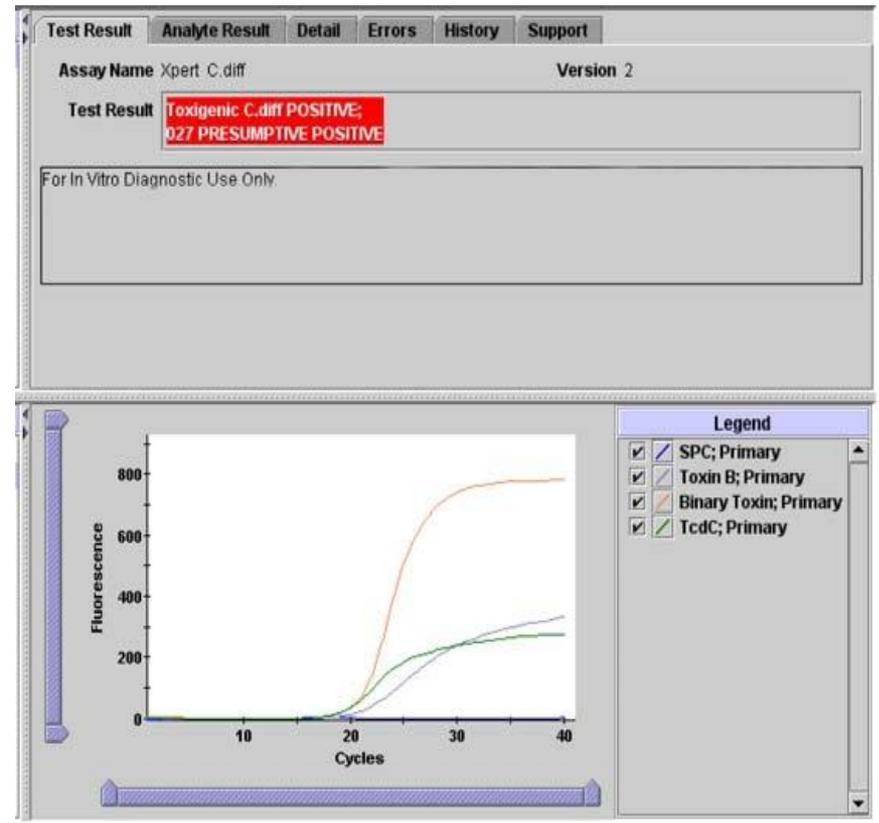
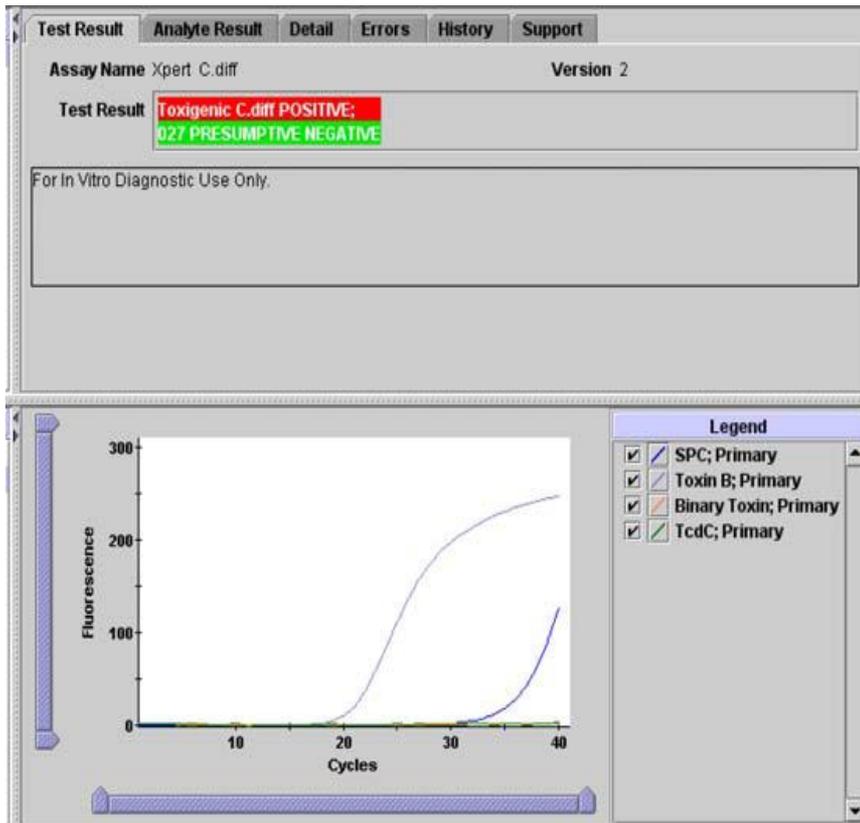
3.9.2 Xpert C. difficile



3. Le GeneXpert

3.9 Exemples de résultats

3.9.2 Xpert C. difficile



4. Conclusions

GeneXpert :

- **Automate rapide, fiable, spécifique.**
- **Double intérêt :**
 1. **Diagnostic** (labo)
 2. **Clinique** (médecin traitement ATB, isolement des patients le cas échéant)
- **Que peut-on faire de plus sur le GeneXpert ?**
 - Système fermé et breveté → aucune modification possible

MAIS possibilité d'utiliser d'autres matrices non validées par le fournisseur : portée B d'accréditation : LBA, aspi. bronchique, ganglion, biopsie, prélèvement péritonéal

5. Questionnaire DPC

Question 1 : Sur quel type de méthode d'analyse est basé le système GeneXpert?

- A PCR en temps réel
- B ELISA
- C Biologie cellulaire
- D Sérologie

Question 2 : Pour quels germes difficilement cultivables le GeneXpert est utile en vue du diagnostic?

- A *C. trachomatis*
- B *N. gonorrhoeae*
- C *S. aureus*
- D *E. coli*

Question 3 : Quels sont les avantages du système GeneXpert ?

- A Rapidité
- B Fiabilité
- C Spécificité
- D Travailler sur échantillon biologique

5. Questionnaire DPC

Question 4 : Que signifie le sigle SARM ?

- A *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline
- B *Staphylococcus aureus* résistant au mécillinam

Question 5 : Quels sont les intérêts principaux du test MRSA Blood Culture ?

- A Détecter ou non les SARM dans les hémocultures positives
- B Quantifier la présence de SARM dans une hémoculture positive
- C Mettre en place l'antibiothérapie adéquate en cas de SARM avéré

MERCI