

23^{es} JOURNÉES ANNUELLES
DE SANTÉ PUBLIQUE
HÔTEL BONAVENTURE, MONTRÉAL

PCI: quoi de neuf au LSPQ

Judith Fafard, md, FRCPC
Médecin microbiologiste-infectiologue
Laboratoire de Santé Publique du Québec

Conflits d'intérêts

- ▶ Aucun conflit d'intérêts

objectifs

- ▶ Se familiariser avec les nouvelles analyses disponibles au LSPQ en lien avec les infections nosocomiales
- ▶ Comprendre les résultats émis à la lumière des changements dans les algorithmes d'investigation
- ▶ Connaître les différentes modalités disponibles lors de l'investigation d'une éclosion

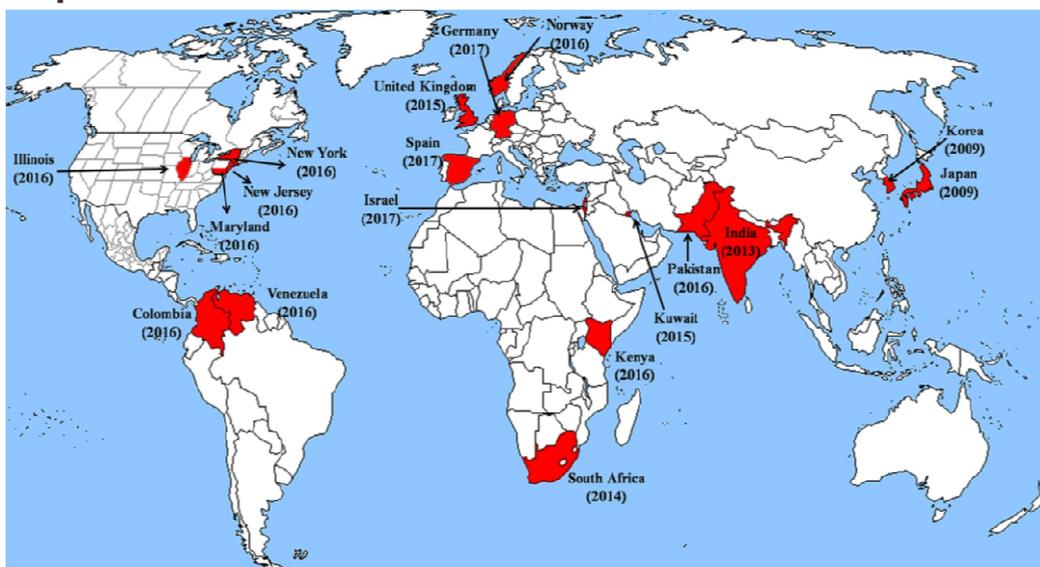
Pathogènes émergents

Candida auris



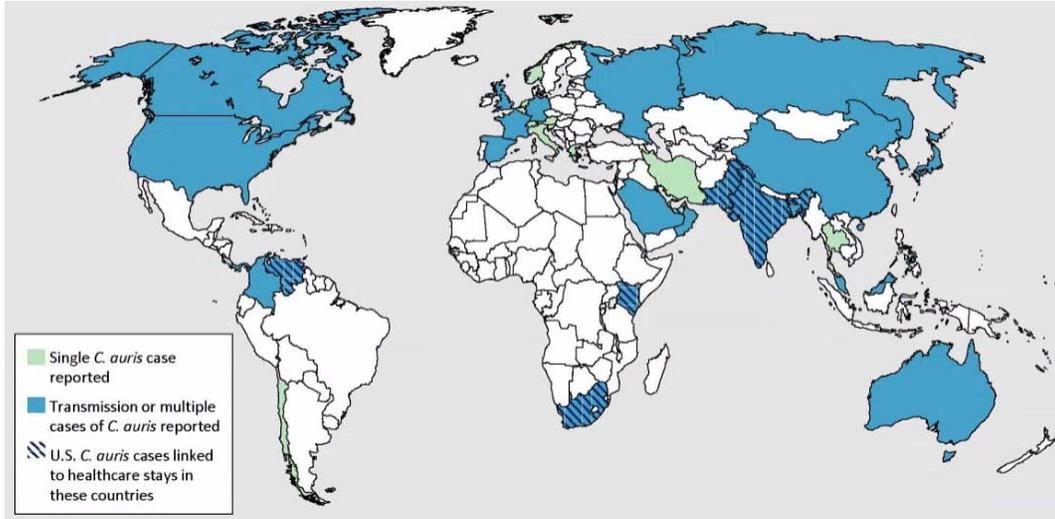
- ▶ Émergence au Japon et en Corée en 2009
- ▶ Distribution mondiale en 10 ans
 - ▶ 1^{er} cas multi-résistant au Canada mai 2017 (première souche isolée au LSPQ en 2012)
- ▶ Éclosions dans les unités de soins, infections invasives morbides
 - ▶ Mortalité fongémie 28-66%
- ▶ Capacité de former des biofilms
- ▶ Résistant à plusieurs antifongiques (Azoles /Amphotéricine/Échinocandins)
 - ▶ Échinocandins empiriques en attendant antifongogramme
- ▶ Difficile à identifier par méthodes biochimiques
 - ▶ Colonies rose pâle sur géloses chromogéniques
 - ▶ ID erronées possibles: *C. haemulonii*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *Candida* sp, *Rhodotorula glutinis*...

Répartition de *C. auris* au fil des années

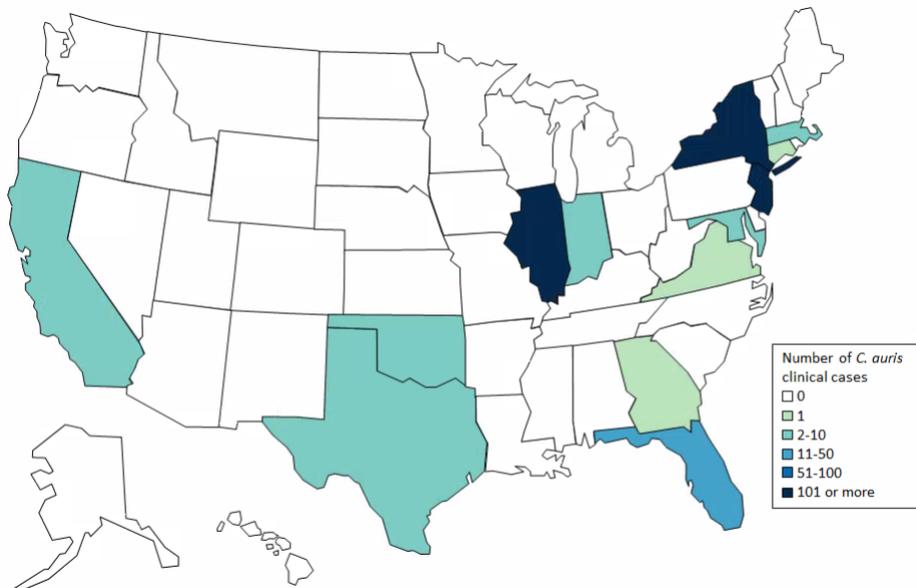


Répartition 30 sept 2019

CDC Centers for Disease Control and Prevention
CDC 24/7: Saving Lives. Protecting People™



31 août 2019



Au LSPQ



- ▶ Élaboration d'algorithme de dépistage et diagnostic pour le réseau en collaboration avec CINQ (disponible sur site du LSPQ – en bouillon ou sur géloses Chromogéniques)
- ▶ Mauvaise identification dans le réseau possible

Système d'identification	Identification erronée de <i>C. auris</i> ^{a,c}
Vitek 2 YST Version 8.01 (bioMérieux) ^a	<i>Candida duobushaemulonii</i> (principalement) Faible discrimination : <i>C. auris</i> / <i>C. duobushaemulonii</i> / <i>C. famata</i> / <i>C. lusitanae</i>
API 20C AUX (bioMérieux)	<i>Rhodotorula glutinis</i> (sans pigment rose - principalement) <i>Candida sake</i>
Yeast ID – Phoenix (BD)	<i>Candida haemulonii</i> (principalement) <i>Candida catenulata</i> (rare)
Microscan (Beckman Coulter)	Multiples ID erronées (méthode non-recommandée)

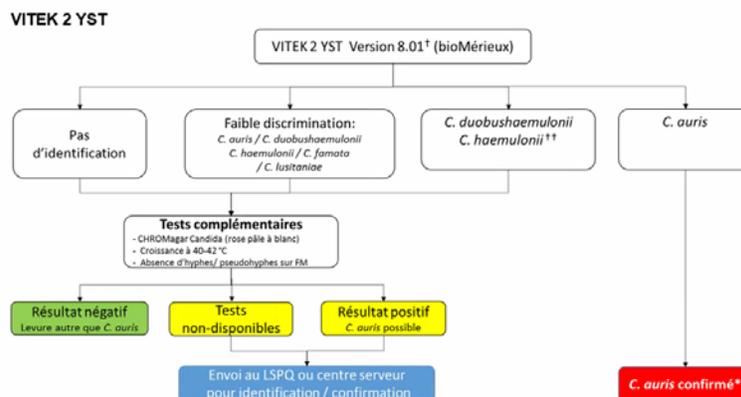
Système d'identification MALDI	Identification attendue pour <i>C. auris</i>
Vitek MS avec V3.2 clinique (bioMérieux)	<i>C. auris</i>
Vitek MS avec V3.0 clinique (bioMérieux)	Pas d'identification obtenue
Biotyper (Banque MBT 7854 MSP library, version 2014 ou plus récente)	<i>C. auris</i>

Méthodes biochimiques

MALDI
(bonne performance avec nouvelles BD cliniques)

Algorithme d'identification

- *C. auris* - Algorithme et recommandations pour l'identification (version du 3 mai 2019)
- *C. auris* - PON - Isolement et dépistage sur gélose chromogénique (version du 3 mai 2019)
- *C. auris* - PON - Isolement et dépistage à partir du protocole en bouillon du CDC (version du 3 mai 2019)



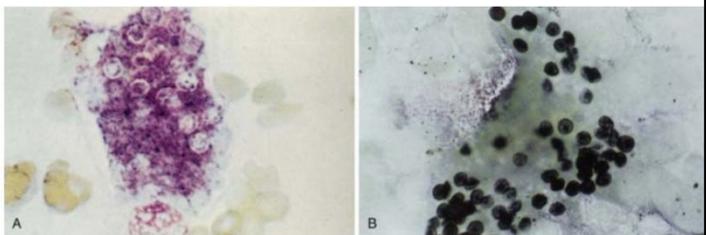
^{*}*C. auris* confirmé: instaurer mesures de contrôle des infections et faire suivre la souche au LSPQ
^a *C. auris* est inclus dans version 8.01, mais des identifications erronées à *C. duobushaemulonii* ou faible discrimination sont fréquemment obtenues, particulièrement avec les souches des clades de l'Asie de l'Est et de l'Afrique. ^{††} *C. haemulonii* ajouté par mesure de précaution (pas de fausse ID recensée lors des tests de vérification effectués).

C. auris

- ▶ Les souches confirmées, ainsi que les souches positives ou suspectes doivent être envoyées au LSPQ :
 - ▶ confirmer l'identification par séquençage de la région D1D2 ou ITS de l'ADNr
 - ▶ tests de sensibilité sur toutes les souches confirmées;
 - ▶ signaler les cas confirmés de *C. auris* à l'établissement concerné et à la direction de santé publique du territoire de l'établissement.
 - ▶ Programme canadien de surveillance des infections nosocomiales (PCSIN) de l'ASPC: le séquençage de génome complet, analyse phylogénétique, détermination du clade génétique des souches.

Pneumocystis

- ▶ Éclosions chez les patients immunosupprimés (greffe)
- ▶ Organisme non cultivable, détection par microscopie/immunofluorescence
- ▶ Problématique: faible charge fongique chez les non-VIH
- ▶ TAAN quantitatif maintenant disponible
 - ▶ Sens > 99% vs 75-90%
 - ▶ Cas suspect et immunofluorescence nég



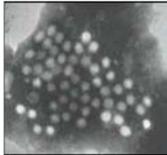
Pneumocystis: investigation d'éclosions

► Typage MLST disponible

CIBLES MLST	Gène
ADNr 26S mitochondrial	mt26S
région intergenic spacer 1	ITS1
Cytochrome B (résist.)	CYB
Superoxyde dismutase	SOD
Dihydropteroate synthase (résist.)	DHPS

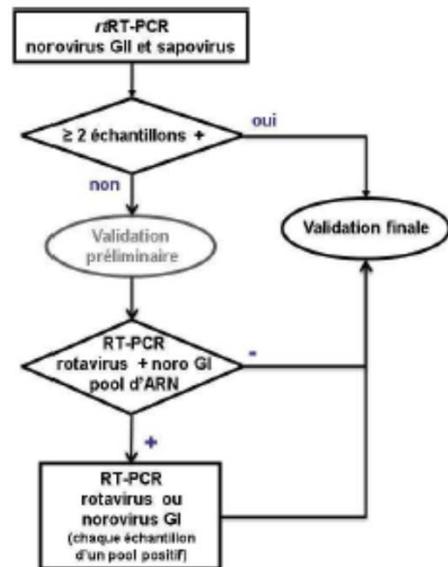
Investigation d'éclosions

Éclosion de gastro-entérite

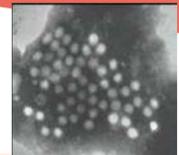


- ▶ 1991-2010: ME
- ▶ 1999: RT-PCR norovirus
- ▶ 2011-2019: algorithme

5 à 10 échantillons fécaux par éclosion



Éclosion de gastro-entérite



- ▶ Maintenant: Chaque échantillon est testé par trois RT-PCR multiplexes (5-10 spécimens/éclosion)
 - ▶ norovirus des génogroupes GI et GII
 - ▶ Astrovirus
 - ▶ Sapovirus
 - ▶ Rotavirus
 - ▶ Adénovirus
 - ▶ adénovirus entériques F40/41.

Été 2019: Panel GI de Biofire

Indications:

- Diarrhées chez GMO allogénique
- Donneur TMF
- **Éclosion sévère**

- ▶ Campylobacter
- ▶ Clostridium difficile
- ▶ Plesiomonas shigelloides
- ▶ Salmonella
- ▶ Yersinia enterocolitica
- ▶ Vibrio, Vibrio cholerae
- ▶ Enteroaggregative E. coli (EAEC)
- ▶ Enteropathogenic E. coli (EPEC)
- ▶ Enterotoxigenic E. coli (ETEC) lt/st
- ▶ STEC (stx1/stx2)
- ▶ E. coli O157
- ▶ Shigella/Enteroinvasive E. coli (EIEC)
- ▶ Cryptosporidium
- ▶ Cyclospora cayetanensis
- ▶ Entamoeba histolytica
- ▶ Giardia lamblia
- ▶ Adenovirus F40/41
- ▶ Astrovirus
- ▶ Norovirus GI/GII
- ▶ Rotavirus A
- ▶ Sapovirus (I, II, IV, and V)

TAT: 24h; faire parvenir dans Cary-Blair max 3 jours après prélèvement



Investigation d'agrégats de souches

Investigation épidémiologique de 2 infections nosocomiales causées par une bactérie au nom inquiétant

- ▶ 2 patientes infection de site chirurgical avec *Morganella morganii*
- Même hôpital
- même procédure chirurgicale
- chirurgiens différents
- chambres voisines
- ▶ *les souches sont-elles reliées?*



Critères d'évaluation des méthodes de typage moléculaire

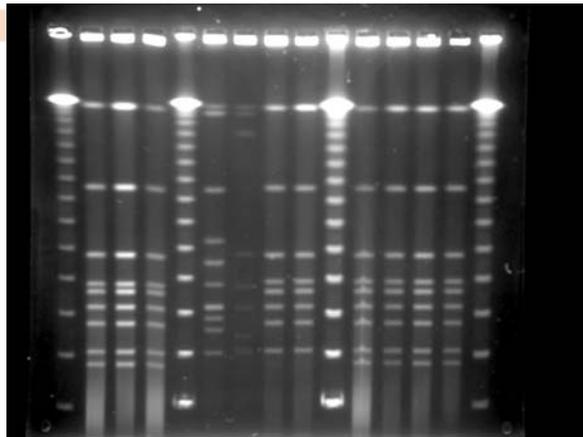
1. Résultat non ambigu pour chaque isolat
2. Reproductibilité
3. Pouvoir de discrimination
4. Facilité d'interprétation
5. Facilité de la technique
6. Étendue de l'utilisation
7. Coûts

Présentement, aucune méthode disponible ne remplit tous ces critères.

Investigation d'éclosion bactérienne

- ▶ Techniques traditionnelles
 - ▶ PFGE
 - ▶ Éclosion de *B. cereus* cet été
 - ▶ Protocole *Mycobacterium abscessus*, *M. chimaera* en développement
 - ▶ Historiques des éclosions et souches passées pour bonifier nouvelle éclosion
 - ▶ Sources environnementales incluses
 - Surveillance intégrée
 - ▶ Ribotypage
 - ▶ MLST
- ▶ Spa typing
- ▶ SBT
- ▶ F-TIR
- ▶ **Séquençage 2^e génération**

PFGE: encore d'actualité



Mais pas de protocole développé pour *Morganella sp*

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

- ▶ Méthode de typage phénotypique (polysaccharides)

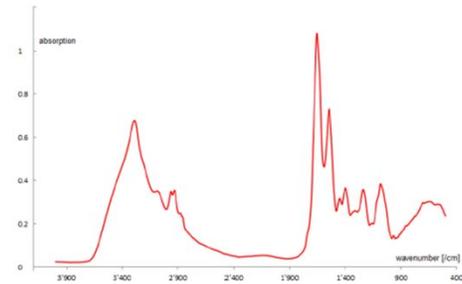
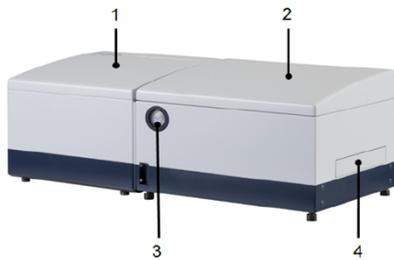


Figure 2-1 Typical bacteria spectrum (here Escherichia coli).

FT-IR Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

- ▶ Éclosions sans protocole de PFGE (germe rares)
- ▶ Technique constante d'un germe à l'autre
- ▶ Rapide
- ▶ Peu coûteux
- ▶ En développement
- ▶ Manque de stabilité des spectres dans le temps (Variabilité des résultats d'un essai à l'autre)
 - ▶ Utilisation de banques de données limitée

Évaluation: Investigations d'écllosion en bactériologie

	Bactérie	Résultats PFGE vs FTIR
BGNE	<i>Escherichia coli</i>	Comparable mais moins discriminant
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Conclusions différentes
	<i>Serratia marcesens</i>	Comparable
BGNNF	<i>Burkholderia cepacia compl</i>	Comparable
	<i>Legionella longbeachae</i>	Biotyper et PFGE ne peuvent différencier des isolats reliés épidémiologiquement d'isolats non reliés
	<i>Legionella pneumophila</i>	Comparable
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Comparable mais moins discriminant
BGP	<i>Bacillus groupe cereus</i>	Comparable
CGP	<i>Staphylococcus aureus</i>	Conclusions différentes
	<i>Streptococcus agalactia</i>	Comparable

25

Évaluation: Investigations d'écllosion en bactériologie

► Conclusions :

Lorsque les résultats sont comparables, le Biotyper est moins discriminant

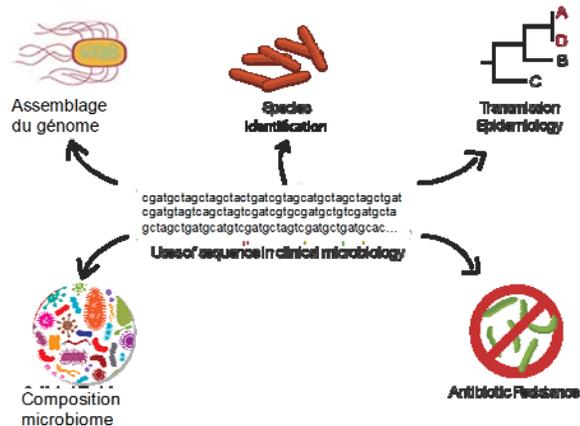
Certains résultats sont différents

- Le IR-Biotyper utilise des caractéristiques phénotypiques alors que l'EGCP des caractéristiques génotypiques
- Résultats encourageants mais nous devons apprendre à réfléchir avec ses nouvelles lunettes!



26

Génomique de deuxième génération en microbiologie clinique



Mise au point d'une plateforme opérationnelle de génomique et de bioinformatique pour le **diagnostic**, la **surveillance** et la **recherche translationnelle** au LSPQ

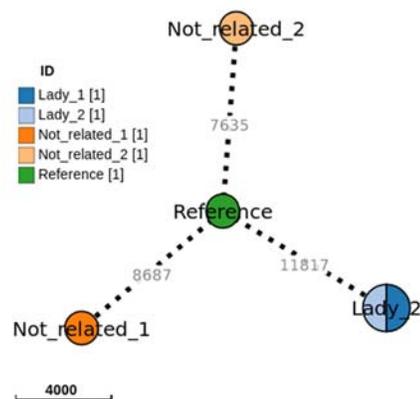
Résultats (après quelques jours)

1. Comparaison à une séquence de référence
2. Repérage des variants
3. Filtration des variants

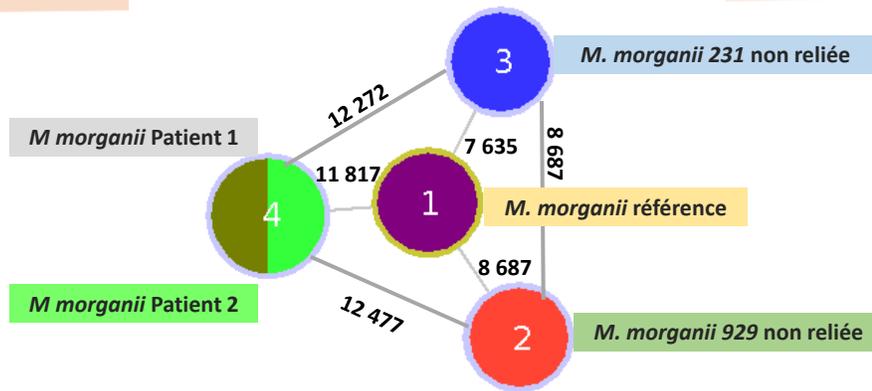


STRAINS	Not_related_1	Not_related_2	Lady_1	Lady_2	reference
Not_related_1	0	9230	12477	12477	8687
Not_related_2	9230	0	12272	12272	7835
Lady_1	12477	12272	0	0	11817
Lady_2	12477	12272	0	0	11817
reference	8687	7835	11817	11817	0

4. Arbre sous-tendant minimum (minimal spanning tree)



Morganella morganii : Phylogénie moléculaire basée sur les SNP



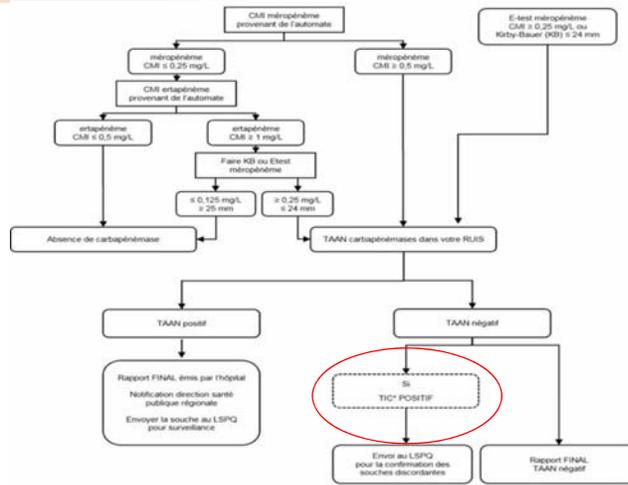
En collaboration avec Sandrine Moreira, Ph.D.
Génomique microbienne et Bio-informatique au LSPQ

Morganella morganii : Conclusion

- ▶ **Conclusion:**
 - ▶ Les résultats de IR-Biotyper et de la phylogénie moléculaire concordent: les deux souches sont reliées
- ▶ **Perspective:**
 - ▶ Si vous avez d'autres cas d'investigation où les espèces rencontrées sont rares et où les liens épidémiologiques sont forts, SVP nous contacter!

Surveillance

BGNPC: bacille gram négatifs producteurs de carbapénémases



BGNPC

- ▶ TAAN transféré dans 4 CHU mais LSPQ poursuit la surveillance
 - ▶ Protocole identique avec amorces et réactifs fournis par le LSPQ
- ▶ TAAN dans le RUIS détecte les enzymes les plus fréquemment rencontrées dans la littérature
 - ▶ **KPC** (allèles KPC-1 à KPC-24), **NDM** (allèles NDM-1 à NDM-16), **OXA-48** (famille OXA-48), **IMP** (allèles IMP-1, 4, 7, 13, 15, 18, 27), **SME** (allèles SME-1 à SME-3), **IMI** (allèles IMI-1 à IMI-3), **NMC** (allèles NCM-1 et NMC-2), **VIM** (allèles VIM-1, 2, 3, 4, 11, 14, 15, 17, 19, 20, 23, 24, 25, 27, 28) et **GES** (allèles GES 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17)
- ▶ Envoi des souches discordantes TIC + et TAAN neg au LSPQ
 - ▶ FRI au CHUM: Le gène FRI (French imipenemase) correspondant à une carbapénèmase de classe A a été identifié par séquençage du génome complet chez une souche d'*E. cloacae* complexe
 - ▶ WGS au LNM /LSPQ
- ▶ Investigation d'écllosion au LSPQ

Surveillance

- ▶ *C difficile*: au lieu des 10 premières AH; 5 AC + 5 AH début 1^{er} lundi janvier 2019
 - ▶ NAP déduit (PFGE)
 - ▶ Ribotypage (2016)
 - ▶ Moins discriminant que PFGE
 - ▶ Coût moindre et efficience
 - ▶ Nomenclature internationale
 - ▶ Modifie le rapport de surveillance des souches
 - ▶ Profil de toxine (PCR tcda, tcdb, cdta, cdtb, tcdc)

Résultats

- ▶ **De 2005 à 2015 (PFGE):**
 - ▶ **3671 souches analysées**
 - **2291 souches de pulsovar A et reliées (62,4 %)**
 - **Autres souches représentent \approx 400 pulsovars différents**
- ▶ **Depuis 2016 (Ribotypage):**
 - ▶ **Env. 1000 souches analysées**
 - **95 ribotypes différents**
- ▶ **PFGE: toujours utile pour les investigations d'éclosion**

37

En résumé

- ▶ Le LSPQ fait évoluer son panier de service en fonction
 - ▶ Des besoins du réseau
 - ▶ Des changements épidémiologiques
 - ▶ Des avancées technologiques
 - ▶ De la pertinence des analyses
- ▶ Il nous fera plaisir de discuter avec vous de vos problématiques diagnostiques en infections nosocomiales!

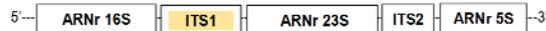
merci

- ▶ Toute l'équipe du LSPQ
- ▶ Sandrine Moreira
- ▶ Hugues Charest
- ▶ Cindy Lalancette
- ▶ Philippe Dufresne
- ▶ Florence Doualla-Bell
- ▶ Jean Longtin



Diapos supplémentaires

Ribotypage



- PCR ciblant la région polymorphique entre le gène 16S et 23S
- Les bactéries ont de multiples copies de ces gènes
- De 7 à 11 amplicons de tailles différentes (100 pb à 700 pb) sont obtenus
- La détection des amplicons est faite par une électrophorèse capillaire
- Les patrons de bandes obtenus sont ensuite comparés à ceux de la banque nationale grâce au logiciel BioNumerics
- Moins coûteux que PFGE
- Nomenclature internationale
- Risque:
 - Perte de la comparaison historique des souches québécoises analysées par PFGE dû au changement de nomenclature. La comparaison historique de NAP1 vs non NAP1 sera cependant maintenue
 - Comparaison des résultats de ribotype avec banque du LNM pour classer par NAP

De l'EGCP au ribotypage (2015-2016)

▶ PCR toxines et EGCP 2015 (n = 400 à 450 souches):

- ▶ 100% des souches de pulsovar A et de pulsovars possiblement et probablement reliés (e.g. A2-5, A5) portaient une délétion de 18 pb sur le régulateur négatif *tcdC* ainsi que les gènes de la toxine binaire (*cdtA* et *cdtB*).
- ▶ 96% des souches autres que A et ses pulsovars reliés, ne contenaient aucune délétion sur le régulateur négatif (*tcdC*) et étaient négatifs pour les gènes de la toxine binaire (*cdtA* et *cdtB*).

▶ PCR toxines et Ribotype 2016 (n = 400 à 450 souches):

- ▶ 143/149 (96 %) des souches NAP1 (LNM: ribotype 019, 027, 075, ns198) ont le profil toxigénique *tcdA*, *tcdB*, del18pb *tcdC*, positif pour la toxine binaire (*cdtA/cdtB*)
- ▶ 257/261 (98 %) des souches non NAP1 (LNM) ont le profil toxigénique positif pour *tcdA*, *tcdB*, une del 0 pb *tcdC*, négatif pour la toxine binaire (*cdtA/cdtB*)
- ▶ 147/410 (36%) des souches ont le profil toxigénique *tcdA*, *tcdB*, del18pb *tcdC*, positif pour la toxine binaire (*cdtA/cdtB*) associé à la NAP1 (ribotype: 027, 075, 080, 087, 176, ns198)

42

Investigation d'éclosion

- ▶ **Le IR-Biotyper est un outil simple à utiliser, flexible et efficace**
- ▶ **Les classifications faites avec l'EGCP (génomique) et le IR-Biotyper (phénotypique) concordent souvent mais pas toujours selon l'espèce bactérienne**
- ▶ **Le IR-Biotyper est moins discriminant que le PFGE**
- ▶ **Le IR-Biotyper est utile pour les espèces rares où il n'y a pas de protocole disponible**

43