

# **Confirmation en laboratoire et caractérisation de l'agent étiologique microbien chez l'humain en contexte d'éclosion de source hydrique**

Journée thématique

*Sonder la qualité de l'eau avant d'y plonger*

Réjean Dion, M.D.

Institut national de santé publique du Québec (INSPQ)

Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ)

Jeudi, 28 novembre 2019

# Cibles d'apprentissage

- ▶ Lister les principaux agents pathogènes microbiens pouvant causer des infections entériques (cas et éclosions), notamment celles de sources hydriques
- ▶ Comprendre les procédures générales d'identification des agents pathogènes microbiens dans les selles, lors d'éclosions d'infections entériques
- ▶ Appliquer les principes à respecter pour la confirmation en laboratoire des éclosions d'infections entériques
- ▶ Connaître les épreuves de caractérisation de certains microorganismes impliqués lors d'éclosions d'infections entériques de sources hydriques et en interpréter les résultats

# Plan de la présentation

- ▶ Définitions des principaux termes
- ▶ Étapes d'investigation d'éclosion de maladies infectieuses (MI)
- ▶ Indices orientant la recherche de l'agent étiologique microbien
- ▶ Agents pathogènes microbiens causant des cas ou des éclosions d'infections entériques
- ▶ Procédures générales d'identification des agents microbiens
- ▶ Principes à respecter pour la confirmation en laboratoire
- ▶ Rôles des laboratoires de microbiologie selon les domaines et paliers
- ▶ Épreuves de caractérisation phénotypique et génique de certains microorganismes
- ▶ Échanges et questions

## Document en incubation (2020):



Institut national  
de santé publique  
Québec   
Laboratoire de santé publique  
du Québec

Outils et conseils pour la confirmation en laboratoire  
des éclosions d'infections entériques

Auteur :

Réjean Dion, M.D.  
Médecin-conseil en santé publique (maladies infectieuses),  
Institut national de santé publique du Québec (INSPQ),  
Laboratoire de santé publique du Québec (LSPQ)  
Professeur adjoint de clinique,  
École de santé publique de l'Université de Montréal (ESPUM),  
Département de médecine sociale et préventive (DMSP)  
Tél. : (514) 457-2070 poste 2325  
Courriel : [rejean.dion@inspq.qc.ca](mailto:rejean.dion@inspq.qc.ca)

## Remerciements:

### LSPQ:

Sadjia Bekal  
Hugues Charest  
Judith Fafard  
Michel Roger  
Karine Thivierge

### CHUM:

Christiane Gaudreau

### CHUQ:

Jean Longtin

### HMR:

Louise Poirier

# Définitions des principaux termes (1/2)

- ▶ Écllosion:  $\geq 2$  cas de la même maladie ou du même syndrome et liés épidémiologiquement (c.-à-d. caractéristiques de temps, lieu et/ou personne [TLP] en commun) ou partageant une même exposition
- ▶ Infections entériques: MI transmises par voie fécale-orale \*:
  - ▶ par les véhicules alimentaires † ou hydriques ‡ (eau de consommation [de boisson] ou de baignade [récréative]) contaminés
  - ▶ par propagation de personne-à-personne (interhumaine) ou zoonotique (des animaux [sauvages, domestiques ou de compagnie] aux humains)

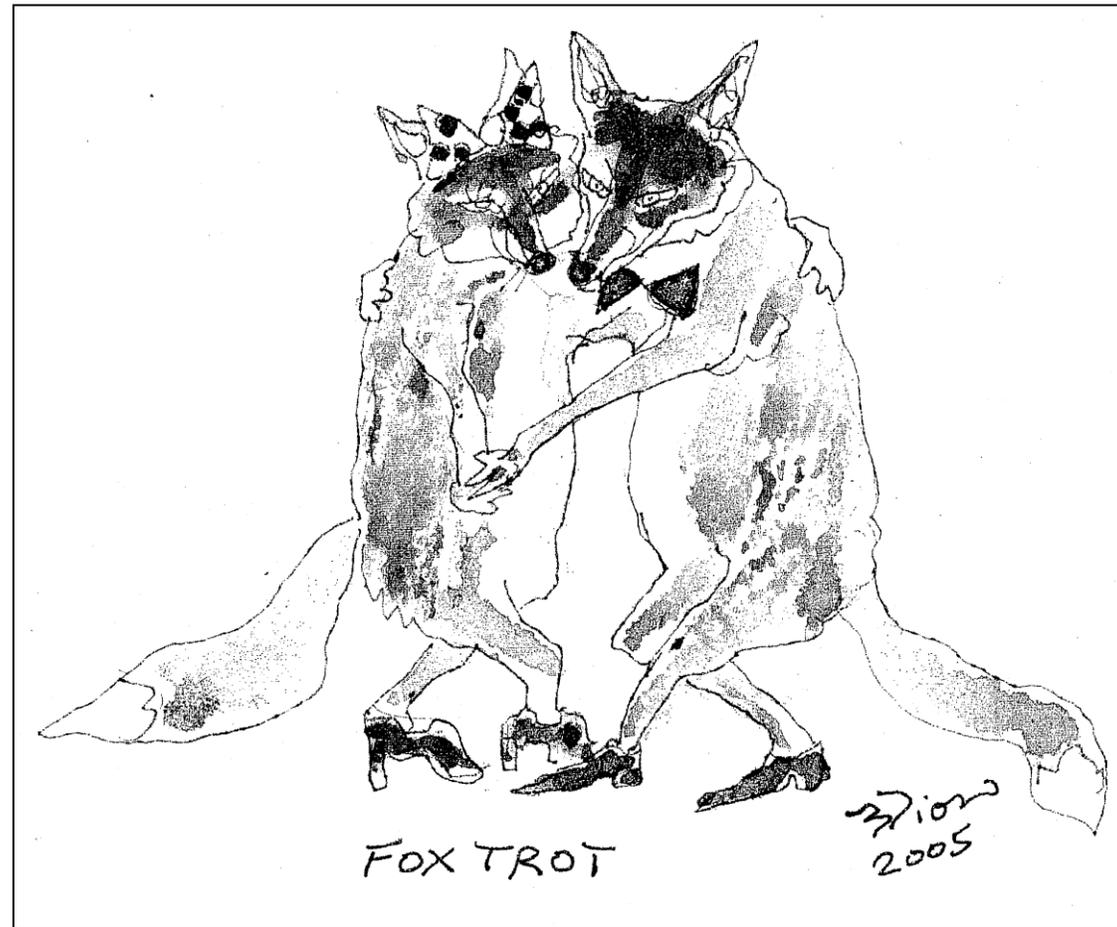
\* Gastroentérite et/ou autres manifestations cliniques.

† Toxi-infection alimentaire (TIA) et TIA collective (TIAC).

‡ Toxi-infection hydrique (TIH) et TIH collective (TIHC).

# Définitions des principaux termes (2/2)

- ▶ Identification: détermination de l'agent étiologique microbien (but: confirmation du diagnostic et orientation de la prise en charge [traitement et mesures de contrôle] d'un ou plusieurs cas)
- ▶ Caractérisation: typage (ou sous-typage) phénotypique (basé sur la morphologie et les propriétés biochimiques) et/ou génique (basé sur la composition des acides nucléiques [ADN ou ARN]) des microorganismes (but: différenciation et comparaison des profils des isolats [souches] afin d'établir des liens)



**MADO & LABO**

©Dion 2005

*« Laboratoire et épidémiologie, unis pour la vie. »*

- Denise Werker

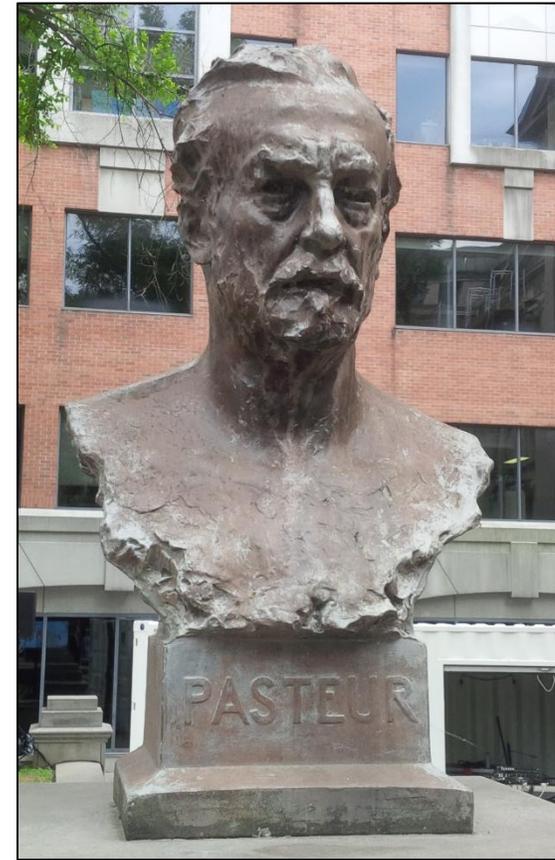
# Étapes pouvant être réalisées lors de l'investigation d'une écloison de MI (1/2)

- ▶ Déterminer la survenue de l'éclosion
- ▶ Confirmer le diagnostic chez les cas
- ▶ Créer une définition de cas et rechercher les cas
- ▶ Décrire l'événement selon les caractéristiques de TLP
- ▶ Circonscrire la population à risque d'être atteinte
- ▶ Formuler une ou plusieurs hypothèse(s) explicative(s) sur la source, le véhicule et/ou le mode de transmission de l'agent

# Étapes pouvant être réalisées lors de l'investigation d'une écloſion de MI (2/2)

- ▶ Vérifier et tester l'hypothèse ou les hypothèses explicative(s)
- ▶ Confronter les conclusions avec les faits établis et les connaissances
- ▶ Raffiner l'hypothèse explicative et procéder aux enquêtes ou études complémentaires pertinentes
- ▶ Développer et appliquer les mesures de contrôle et les moyens préventifs, et documenter leur impact
- ▶ Rédiger et diffuser les rapports provisoire(s) et final

Photographie de Louis Pasteur par  
Paul Nadar (Tournachon) (1856-1903); URL:  
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/42/Louis\\_Pasteur.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/42/Louis_Pasteur.jpg)



Sculpture en pierre peinte de Louis Pasteur (1973),  
Place Pasteur, rue Saint-Denis, Montréal

*« Souvenez-vous que dans les champs de l'observation  
le hasard ne favorise que les esprits préparés. »*

# Quels sont les indices (cliniques et épidémiologiques) pouvant orienter la recherche de l'agent étiologique d'une éclosion d'infections entériques?

▶ ...

▶ ...

▶ ...

▶ ...

▶ ...

# Indices cliniques et épidémiologiques orientant la recherche de l'agent étiologique d'une écloison d'infections entériques (1/2)

- ▶ Manifestations cliniques ou syndrome
- ▶ Résultats d'examens paracliniques (ex. : radiographie abdominale ou autre imagerie médicale, endoscopie, examens des frottis sanguins, des selles, anatomopathologiques, etc.)
- ▶ Gravité de la maladie (en termes de morbidité et de létalité)
- ▶ Durée de la maladie
- ▶ Période d'incubation (lorsque celle-ci peut être déterminée)

# Indices cliniques et épidémiologiques orientant la recherche de l'agent étiologique d'une écloison d'infections entériques (2/2)

- ▶ Présence ou absence d'évidence de transmission secondaire
- ▶ Période de l'année (saison) de survenue de l'écloison
- ▶ Lieu (altitude, latitude, longitude, géographie et endroit [communauté ou milieu de soins]) de survenue des cas
- ▶ Population affectée (classes d'âge, sexes, regroupements d'individus)
- ▶ Source, véhicule ou mode de transmission suspecté(e), expositions et facteurs de risque ou protecteurs liés à l'hôte



*La palme des microbes*  
©Dion 2015

# Agents pathogènes microbiens pouvant causer des cas ou des éclosions d'infections entériques (1/4)

## ► Bactéries:

Microorganisme	Maladie ou syndrome	Hydrique *
<i>Aeromonas hydrophila</i>	GE, autres	oui
<i>Bacillus cereus</i> (types 1 et 2)	TIA/TIAC	non
<i>Brucella</i>	brucellose	non
<i>Campylobacter</i>	campylobactériose	oui
<i>Clostridium botulinum</i>	botulisme	non
<i>Clostridium difficile</i> (toxines A et B)	diarrhée à <i>C. difficile</i>	non
<i>Clostridium perfringens</i>	TIA/TIAC	non
<i>Cronobacter</i> (anciennement <i>Enterobacter sakazakii</i> )	GE, autres	?
<i>Edwardsiella tarda</i>	GE, autre	?
<i>Escherichia coli</i> (ECEA, ECEH/ECST, ECEI, ECEP, ECET)	GE, colite hémorragique, SHU, PTT	oui

# Agents pathogènes microbiens pouvant causer des cas ou des éclosions d'infections entériques (2/4)

## ► Bactéries (suite & fin):

Microorganisme	Maladie ou syndrome	Hydrique *
<i>Leptospira</i> ( <i>L. interrogans</i> , autres)	leptospirose	oui
<i>Listeria monocytogenes</i>	listériose	oui
<i>Mycobacterium</i> (autres que <i>Mycobacterium</i> complexe <i>tuberculosis</i> )	mycobactériose	oui
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	GE, autres	oui
<i>Salmonella</i> (dont <i>S. Typhi</i> et <i>S. Paratyphi</i> )	salmonellose, fièvres entériques	oui
<i>Shigella</i>	shigellose	oui
<i>Staphylococcus aureus</i>	TIA/TIAC	non
<i>Streptococcus pyogenes</i> (streptocoque du groupe A)	TIA/TIAC	non
<i>Vibrio</i> ( <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> )	vibriose, choléra, GE, autres	oui
<i>Yersinia</i> ( <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> )	yersiniose	oui

# Agents pathogènes microbiens pouvant causer des cas ou des éclosions d'infections entériques (3/4)

## ▶ Virus:

Microorganisme	Maladie ou syndrome	Hydrique *
adenovirus	GE, autres	oui
astrovirus	GE	oui
<i>Caliciviridae</i> (norovirus, sapovirus)	GE	oui
entérovirus	GE, autres	oui
virus de l'hépatite A (VHA)	hépatite A	oui
virus de l'hépatite E (VHE)	hépatite E	oui
rotavirus	GE	oui

# Agents pathogènes microbiens pouvant causer des cas ou des éclosions d'infections entériques (4/4)

## ► Parasites (protozoaires & helminthes):

Microorganisme	Maladie ou syndrome	Hydrique *
<i>Blastocystis</i>	GE (pathogénicité controversée)	oui
<i>Cryptosporidium</i> ( <i>C. hominis</i> , <i>C. parvum</i> )	cryptosporidiose	oui
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	cyclosporose	oui
<i>Entamoeba histolytica</i>	amibiase	oui
<i>Giardia</i> ( <i>G. lamblia</i> , <i>G. duodenalis</i> ou <i>G. intestinalis</i> )	giardiase	oui
<i>Toxoplasma gondii</i>	toxoplasmose	oui
<i>Trichinella</i> ( <i>T. spiralis</i> , <i>T. nativa</i> , autres)	trichinose ou trichinellose	non

\* Selon les références suivantes (sans distinction entre eau de consommation et eau de baignade):

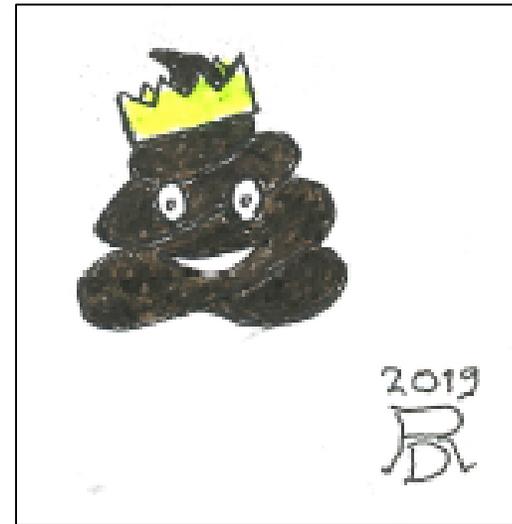
- *Control of communicable diseases manual* (APHA, 20<sup>e</sup> éd. 2015);

- Fiche technique santé-sécurité (URL:

<https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosurete-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques.html>);

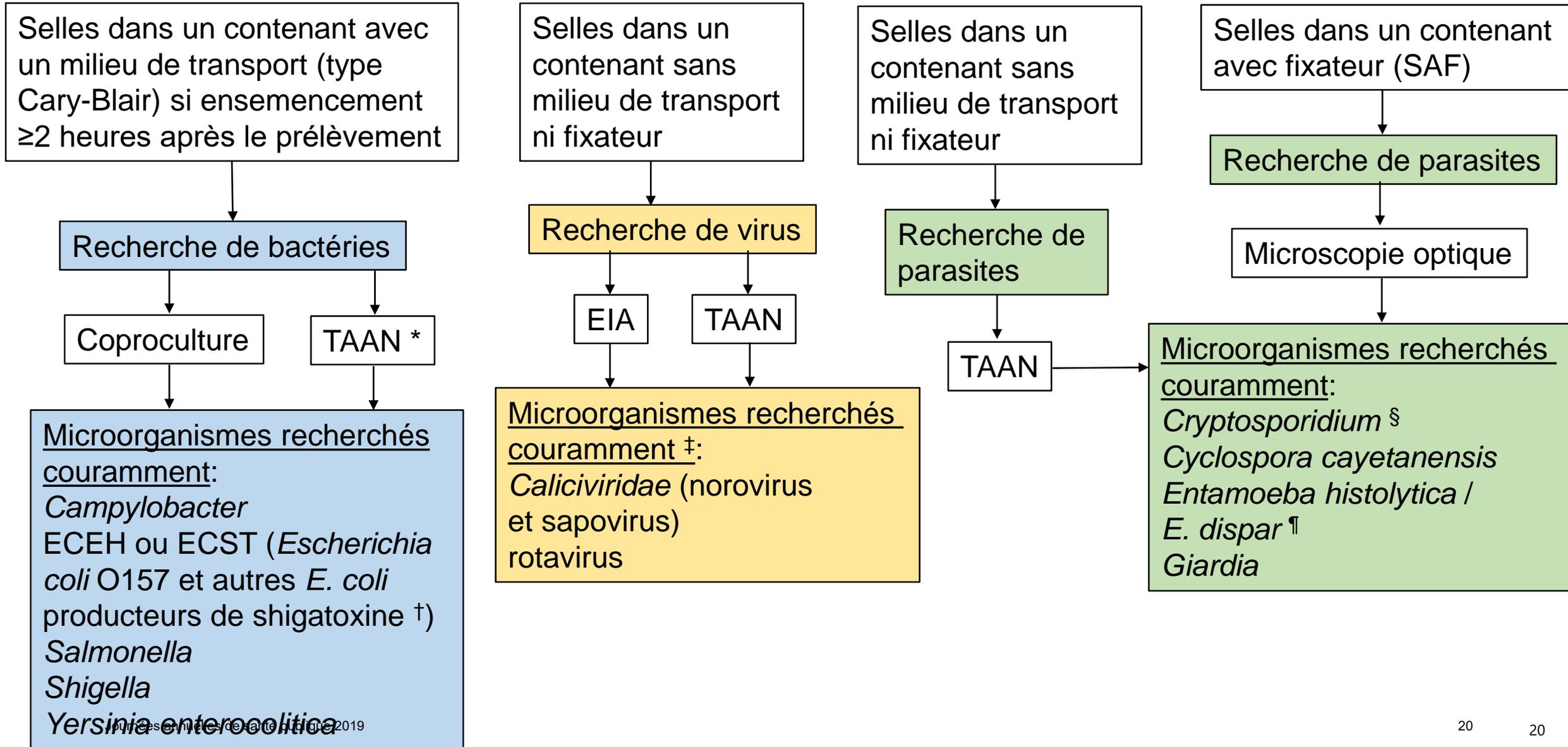
- *GIDEONonline* (URL: <https://www.gideononline.com/>).

Carte postale du château de *Selles-sur-Cher* (URL: <https://www.geneanet.org/cartes-postales/view/5012876#0>)



*Enteric 1<sup>er</sup>*, Roi des *Selles*,  
le plus noble des échantillons  
cliniques  
©Dion 2019

# Procédures générales d'identification des agents pathogènes microbiens dans les selles lors d'éclotions d'infections entériques (1/2)



# Procédures générales d'identification des agents pathogènes microbiens dans les selles lors d'éclotions d'infections entériques (2/2)

\* Lorsque le TAAN pour une des bactéries est positif, dans le contexte d'une éclosion, il est recommandé de procéder à la coproculture et d'acheminer ensuite la/les souche(s) au LSPQ pour caractérisation au besoin.

† L'échantillon de selles positive pour la présence du gène *stx1* ou *stx2* peut être acheminé au LSPQ dans un bouillon d'enrichissement (MacConkey ou GN) ou dans un milieu de transport entérique (type Cary-Blair) pour identification et caractérisation (URL:

<https://www.inspq.qc.ca/lspq/repertoire-des-analyses/escherichia-coli-producteurs-de-shigatoxines-stec>).

‡ Entre 5 et 10 échantillons de selles (un par cas) par éclosion de GE d'allure virale peuvent aussi être acheminés au LSPQ pour identification des *Caliciviridae*, d'adénovirus et d'astrovirus (URL:

<https://www.inspq.qc.ca/lspq/repertoire-des-analyses/gastroenterite-d-allure-virale-detection-d-acides-nucleiques-par-taan-multiplxes-sur-specimen-clinique>).

§ La différenciation à l'espèce et le typage de *Cryptosporidium* peuvent être effectués au LSPQ (échantillon[s] de selles congelé[s] et acheminé[s] sur glace sèche).

¶ La différenciation d'*E. histolytica* (confirmation) d'*E. dispar* (non pathogène) peut être effectués au LSPQ (échantillon[s] de selles congelé[s] et acheminé[s] sur glace sèche) (URL:

<https://www.inspq.qc.ca/lspq/repertoire-des-analyses/entamoeba-histolyticadispar-differenciation>).

# Éclosion d'infection entérique majeure, inhabituelle ou persistante, dont l'agent étiologique n'a pu être identifié par les épreuves habituelles

- ▶ Des échantillons de selles peuvent être acheminés (après entente) au LSPQ pour TAAN multiplexe \*
- ▶ Recherche des agents microbiens suivants:
  - bactéries: *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, ECEA, ECEH/ECST, ECEI/*Shigella*, ECEP, ECET, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* et *Vibrio*
  - virus: adenovirus, astrovirus, norovirus, rotavirus et sapovirus
  - parasites: *Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* et *Giardia lamblia*

# Principes à respecter pour la confirmation en laboratoire des éclosions d'infections entériques

- ▶ Types d'échantillons cliniques (selles, sang, LCR, autres) et d'analyses de laboratoire (microscopie, culture, DAN, détection d'antigène ou de toxine, sérodiagnostic, autres) variant selon le syndrome et l'agent étiologique suspecté
- ▶ Connaître les services et tests de laboratoire offerts de routine et ceux effectués sur demande spéciale, ainsi que les procédures à suivre (prévoir un protocole)
- ▶ 0,5 à 2 g ou 5 ml de selles par contenant (stérile); un contenant par type de test
- ▶ Positivité de culture bactérienne de selles plus élevée en phase aiguë de diarrhée
- ▶ Une culture bactérienne de selles par cas habituellement suffisante
- ▶ Viser empiriquement la confirmation en laboratoire de 15 à 20% des cas

# Toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*)

- ▶ Sérodiagnostic (sérums):
  - Ac IgM
  - Ac IgG
  - virage sérologique (passage de négatif ou équivoque à positif ou augmentation significative [ $\geq 4$  fois] du titre [sérums en phases aiguë et convalescente])
  - avidité des Ac IgG faible (infection récente)
- ▶ DAN (autres liquides biologiques ou tissus):
  - LCR, liquide oculaire, liquide pleural, lavage broncho-alvéolaire, urine, liquide amniotique, tissus de biopsie

# Rôles des laboratoires de microbiologie selon les domaines et paliers concernant les infections entériques (1/3)

- ▶ Microbiologie médicale (locaux, régionaux et suprarégionaux):
  - recherche et identification de l'agent étiologique chez l'humain
  - différenciation ou caractérisation de base des isolats de source humaine
  - acheminement des souches ou échantillons cliniques d'intérêt au LSPQ
  - déclaration des cas ou signalement des menaces à la santé de la population aux autorités de santé publique
  - participation à la labovigilance provinciale

# Rôles des laboratoires de microbiologie selon les domaines et paliers concernant les infections entériques (2/3)

- ▶ Inspection des aliments, santé animale et environnement \*:
  - recherche et identification de l'agent à partir de sources autres qu'humaine (aliment et eau, animaux et environnement)
  - différenciation ou caractérisation (habituellement de base) des isolats de sources autres qu'humaine
  - acheminement de certaines souches et au besoin d'échantillons (ex. : bouillon d'enrichissement) au LSPQ
  - signalement des menaces à la santé de la population aux autorités de santé publique

# Rôles des laboratoires de microbiologie selon les domaines et paliers concernant les infections entériques (3/3)

- ▶ De référence ou de santé publique (LSPQ de l'INSPQ) \*:
  - recherche, identification et confirmation de l'agent étiologique
  - caractérisation fine et comparaison des isolats humains et d'autres provenances
  - déclaration des cas et signalement des menaces à la santé de la population aux autorités de santé publique
  - coordination de la labovigilance provinciale et participation à la labovigilance pancanadienne

# Cryptosporidiose humaine (*Cryptosporidium*) (1/5)

## ► Confirmation du diagnostic:

### ○ examen direct \*:

- technique de sédimentation formol-acétate d'éthyle sur un échantillon de selles †† fixée au SAF
- coloration permanente au Kinyoun (ou autre), recherche et identification des oocystes (4 à 6 µm) par microscopie optique (1 000 x)
- détection d'antigènes par EIA ou par DFA dans les selles ††

### ○ DAN §:

- PCR ¶ dans les selles ††, sans milieu de transport ni fixateur

\* Ne permet pas de faire la différenciation de l'agent à l'espèce.

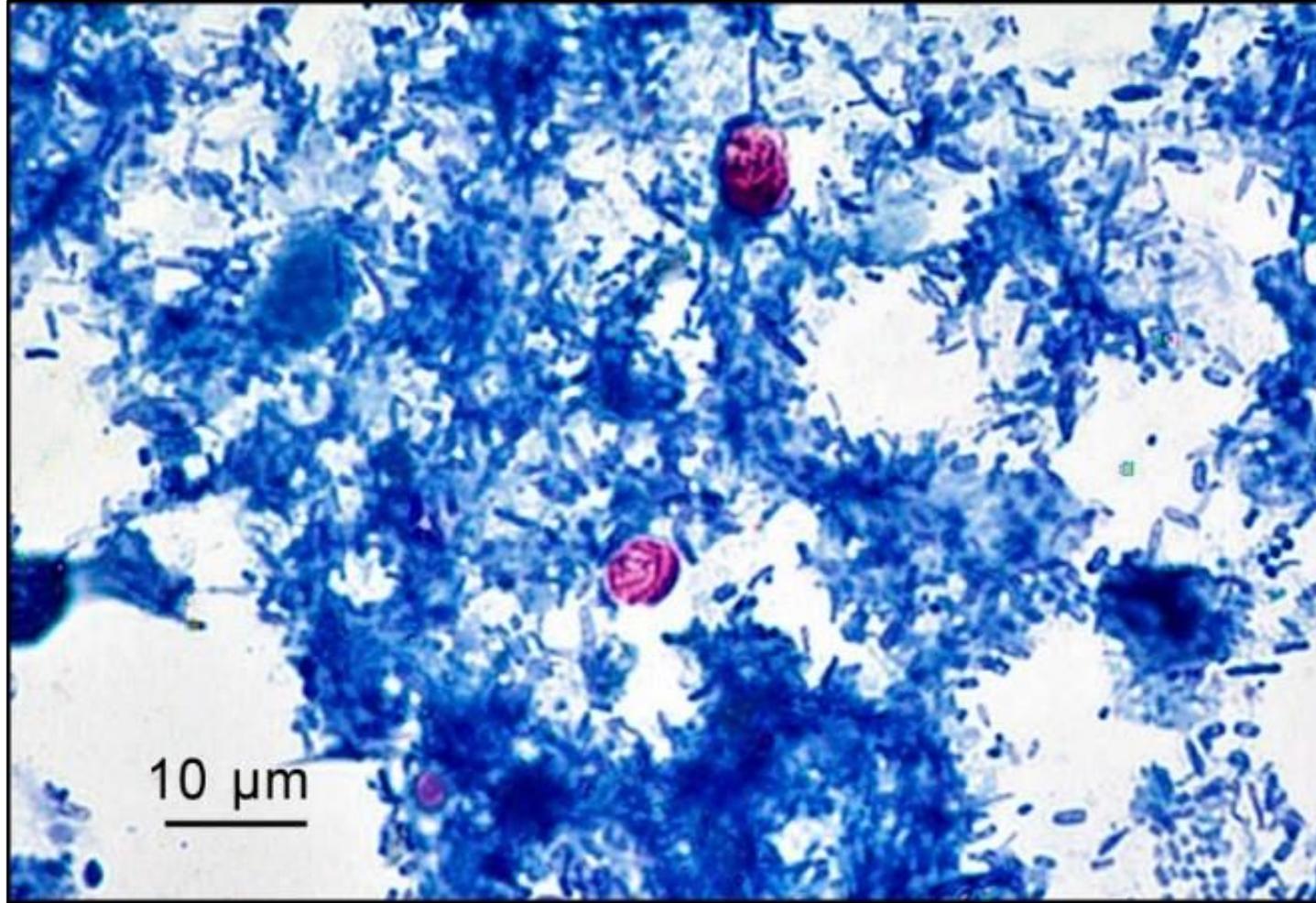
† Répéter au besoin les prélèvements jusqu'à 3 fois (intervalle de 2 à 3 jours).

‡ Au besoin liquide duodénal ou tissu de biopsie de l'intestin grêle ou des voies biliaires, expectoration ou lavage broncho-alvéolaire.

§ Peut permettre de faire la différenciation de l'agent à l'espèce, selon l'épreuve effectuée.

¶ Peut être effectuée en multiplexe (ne permet pas de faire la différenciation à l'espèce).

# Oocystes de *Cryptosporidium* sp. dans les selles, coloration au Kinyoun, 1000 x



Source: Dominique St-Pierre, LSPQ.

# Cryptosporidiose humaine (*Cryptosporidium*) (3/5)

## ▶ Génotypage:

- selles fraîches non fixées, congelées (à -20°C)
- amplification par PCR nichée et séquençage des portions du gène ciblées
- identification de l'espèce de *Cryptosporidium*
- différencie notamment *C. hominis* (réservoir presque exclusivement humain) de *C. parvum* (réservoirs humain et animal)
- non effectué de routine; peut être réalisé par le LSPQ lors d'une investigation d'éclosion

# Cryptosporidiose humaine (*Cryptosporidium*) (4/5)

## ▶ Sous-typage:

- permet de lier les cas entre eux en comparant leurs profils de séquences
- sous-type déterminé à partir de la séquence du gène codant pour la glycoprotéine de surface gp60
- sous-types désignés par la famille (ex.: Ia, Ib, Id, Ie, If, etc. pour *C. hominis*; IIa, IIb, IIc, IId, etc. pour *C. parvum*), suivie d'une série de lettres majuscules et de chiffres spécifiant le nombre de répétitions des tri-nucléotides (A pour TCA, G pour TCG et T pour TCT) au début du gène, par exemple:
  - *C. hominis* IbA10G2
  - *C. parvum* IIaA15G2R1

# Cryptosporidiose humaine (*Cryptosporidium*) (5/5)

## ▶ Sous-typage (suite & fin):

- si les profils géniques de deux isolats cliniques sont différents, il est fort probable qu'ils ne soient pas liés entre eux
- s'ils sont identiques (ou indiscernables), il est probable qu'ils soient liés:
  - caractérisation génique plus raffinée (ex.: séquençage du génome entier [SGE]) peut être requise pour une meilleure discrimination, particulièrement pour les sous-types dominants
- comparaison d'ADN d'isolats cliniques de *Cryptosporidium* et d'ADN du *Cryptosporidium* détecté dans une source ou un véhicule hydrique théoriquement possible, mais méthode à développer

# Virus de l'hépatite A (VHA) (1/4)

- ▶ Confirmation du diagnostic basée essentiellement sur le sérodiagnostic (Ac IgM anti-VHA)
- ▶ Sérums IgM anti-VHA positifs acheminés au LNM *via* le LSPQ
  - génotypage si ARN du VHA positif:
    - trois génotypes avec chacun deux sous-types:
      - génotype 1 (sous-types 1a et 1b)
      - génotype 2 (sous-types 2a et 2b)
      - génotype 3 (sous-types 3a et 3b)
  - détermination des profils de séquences à la demande

# VHA (2/4)

- ▶ Interprétation du génotypage:
  - si les génotypes des isolats de deux cas sont différents, on peut raisonnablement conclure qu'ils ne sont pas reliés entre eux
  - si les génotypes des isolats de deux cas sont les mêmes, ceci ne signifie pas forcément que ceux-ci sont reliés entre eux:
    - la comparaison des profils de séquences des souches est nécessaire afin de caractériser ce lien de façon plus fine

# Profils de séquences du VHA de l'éclosion nationale 2018-142.

# Comparaisons des profils de séquences du VHA de l'éclosion nationale 2018-142.

# *Mycobacterium chimaera* (1/3)

- ▶ Cas d'infections à *M. chimaera* chez des patients en phase post-opératoire de chirurgie cardiaque et exposés à des échangeurs thermiques pour circulation extracorporelle
- ▶ Lien épidémiologique corroboré entre les isolats au moyen du SGE
- ▶ Références:
  - EID 2019;25(3):559-63.; URL: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/3/pdfs/18-1282.pdf>
  - RMTC 2017;43(5):120-6.; URL: [https://www.canada.ca/content/dam/phac-aspc/migration/phac-aspc/publicat/ccdr-rmtc/17vol43/dr-rm43-5/assets/pdf/17vol43\\_5-ar-05-fra.pdf](https://www.canada.ca/content/dam/phac-aspc/migration/phac-aspc/publicat/ccdr-rmtc/17vol43/dr-rm43-5/assets/pdf/17vol43_5-ar-05-fra.pdf)





# Liste et signification des sigles (1/3)

- ▶ ACIA: Agence canadienne d'inspection des aliments
- ▶ ASPC: Agence de la santé publique du Canada
- ▶ CEAEQ: Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (MELCC)
- ▶ DAN: détection d'acides nucléiques
- ▶ DFA: immunofluorescence directe
- ▶ ECEA: *Escherichia coli* entéroaggrégatif
- ▶ ECEH ou ECST: *E. coli* entérohémorragique (synonyme d'*E. coli* producteur de shigatoxine ou de vérocytotoxine)
- ▶ ECEI: *E. coli* entéroinvasif
- ▶ ECEP: *E. coli* entéropathogène
- ▶ ECET: *E. coli* entérotoxigène

# Liste et signification des sigles (2/3)

- ▶ EIA: épreuve immunoenzymatique
- ▶ GE: gastroentérite
- ▶ GN: gélose nutritive
- ▶ INSPQ: Institut national de santé publique du Québec
- ▶ LCR: liquide céphalorachidien
- ▶ LNM: Laboratoire national de microbiologie (ASPC)
- ▶ LSPQ: Laboratoire de santé publique du Québec (INSPQ)
- ▶ MAPAQ: ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
- ▶ MELCC: ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques
- ▶ MI: maladie(s) infectieuse(s)

# Liste et signification des sigles (3/3)

- ▶ PCR: réaction de la polymérase en chaîne (DAN)
- ▶ PTT: purpura thrombocytopénique thrombotique
- ▶ SAF: *sodium acetate-acetic acid-formaldehyde*
- ▶ SGE: séquençage du génome entier (*whole-genome sequencing* [WGS])
- ▶ SHU: *syndrome hémolytique urémique*
- ▶ SNPs: single-nucleotide polymorphisms
- ▶ TAAN: test d'amplification d'acides nucléiques (DAN)
- ▶ TIA: toxi-infection(s) alimentaire(s); TIAC: TIA collective(s)
- ▶ TIH: toxi-infection(s) hydrique(s); TIHC: TIH collective(s)
- ▶ TLP: temps, lieu et personne



## *La lutte sans fin aux infections*

©Dion 1985