Groupe Hospitalier Universitaire
SAINT-LOUIS
LARIBOISIÈRE
FERNAND-WIDAL

LES JOURNEES DE L'INNOVATION 2013

LE PLEX ID

Une révolution en microbiologie

François SIMON
Séverine MERCIER-DELARUE
GH Saint Louis- Lariboisière-F Widal

POURQUOI LE PLEX-ID ?

- Identification large de microorganismes
  - Bacteries, Virus, Champignons, Protozoaires
- Plus besoin de culture dans certains cas
- Capacité de 300 échantillons par jour
  - Détection rapide : premiers résultats en 6-8 heures
- Permet une détection dans les mélanges complexes
- Test de résistance aux antibiotiques

Répond à la question : qu'y a t il dans mon échantillon ?

DÉTECTION DU NOUVEAU VARIANT H1N1

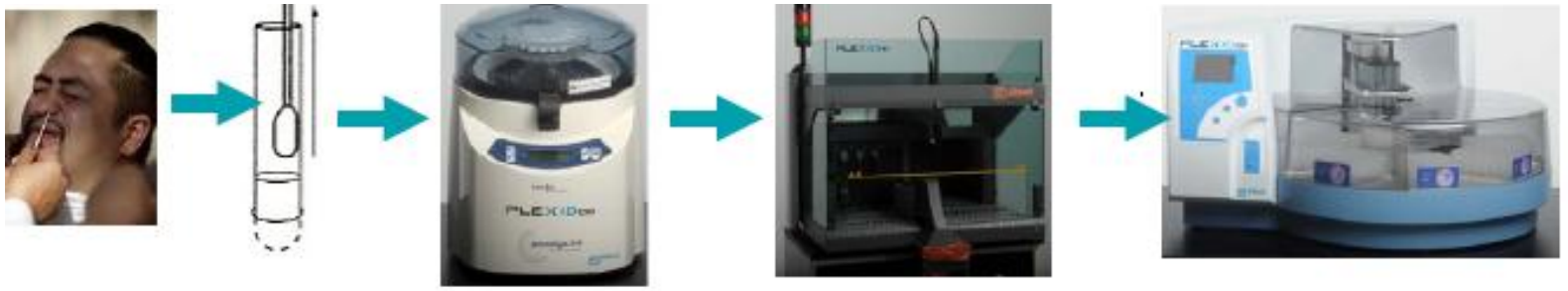
The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

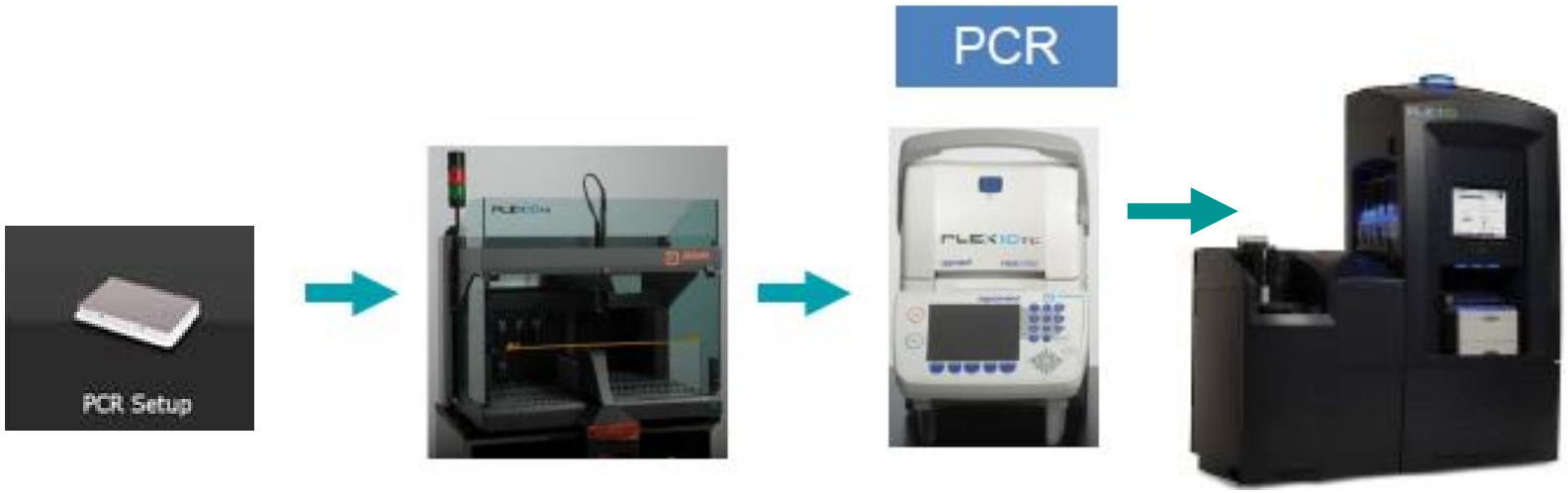
Rapid-Test Sensitivity for Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans

Le test PLEX-ID Flu a été capable le premier de détecter le nouveau variant H1N1

…Further characterization by **PCR assay and electrospray ionization mass spectrometry** indicated a swine-origin virus, and sequence data that were sent to the CDC revealed that the viruses in the two samples were identical…
– D Faix, et al. *New England Journal of Medicine 2009;.10.1056*

SYSTEME PLEX ID : PRELEVEMENT - PCR - SPECTROMETRIE DES AMPLICONS

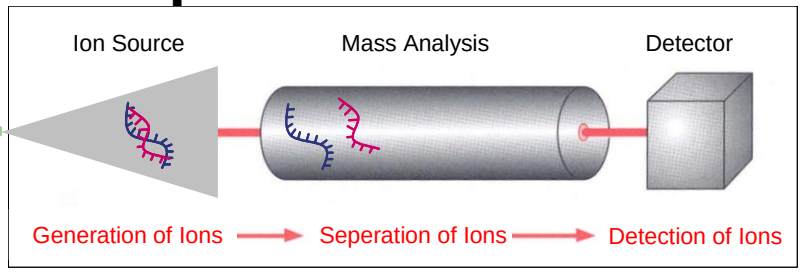


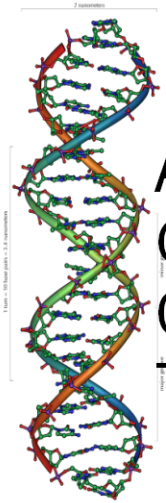


KIT recherche: viral IC, viral respiratory, BAC, Fungal

Analyse en spectrométrie de masse.

Mass Spectrometer



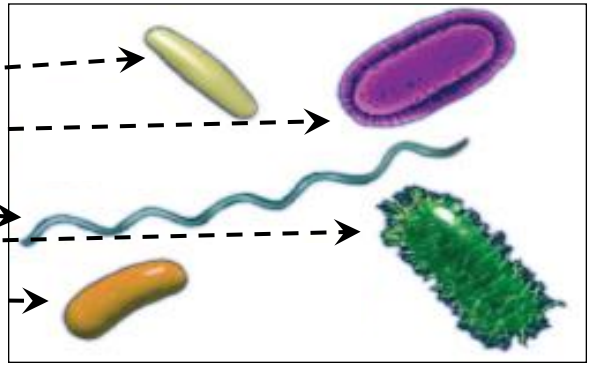


A = 313.0576 amu
G = 329.0526 amu
C = 289.0464 amu
T = 304.0461 amu

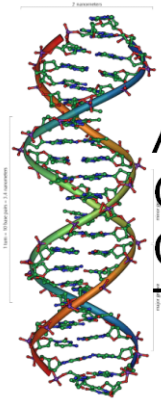
Signal Processing
Masses to Base Compositions

#	Mass	Base Count	Quantity
1	35875.03	A25G35C30T26	4260
2	35297.70	A29G33C27T25	1948
3	35619.87	A26G36C29T24	1555
4	36196.21	A23G37C31T26	1306
5	35297.70	A29G33C27T26	1949
6	33734.22	A19G21C17T27	1000

Base Compositions Map to Microbes

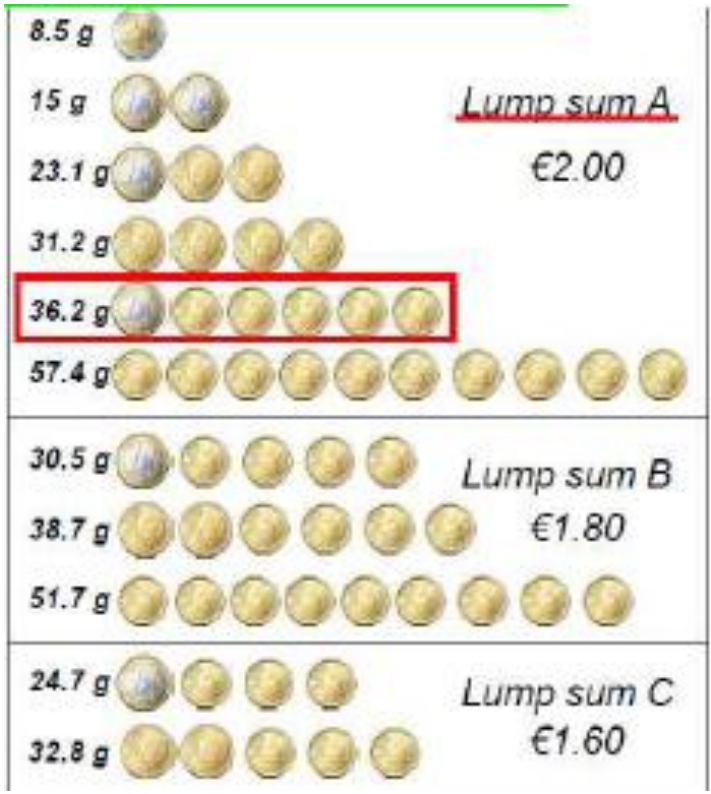


DE LA MASSE À LA COMPOSITION EN BASES



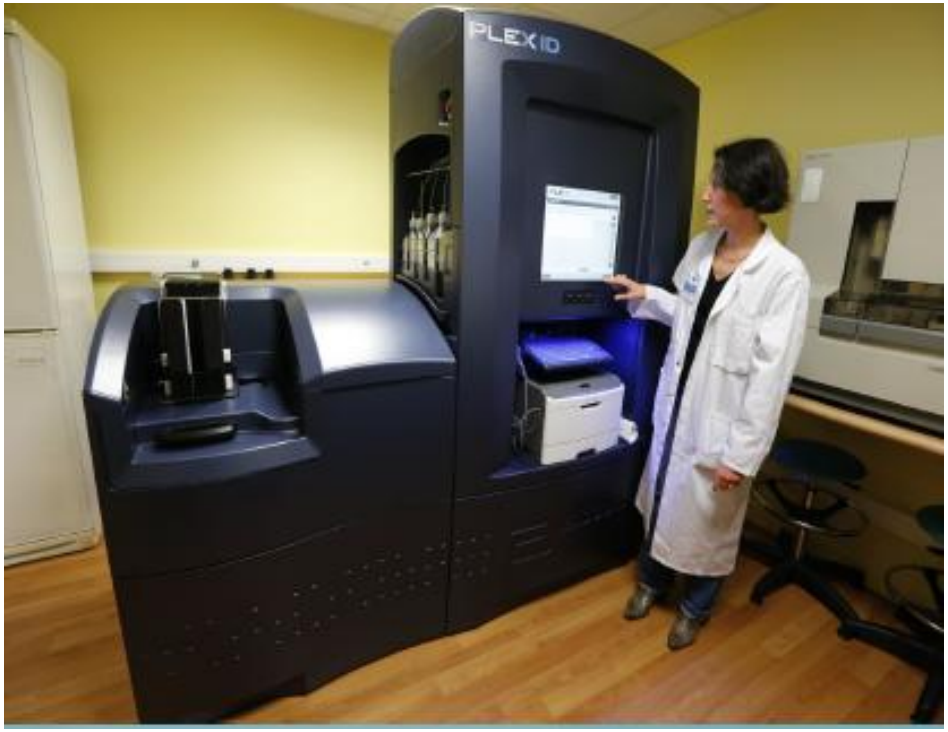
A = 313.0576 amu
G = 329.0526 amu
C = 289.0464 amu
T = 304.0461 amu

Poids: 36,2 g



1 x 1 Euro
5 x 20 Cent

PLATE FORME POST PCR DE BIOLOGIE MOLECULAIRE SAINT LOUIS
INSTALLATION DU PLEX ID AU PRINTEMPS 2012



Bactériologie -Virologie-Parasitologie- Biochimie- Anatomopathologie

LC450

PLEX ID ESI TOF

SEQUENCEUR 16 CAPILLAIRE

SEQUENCEUR PROFOND NGS ROCHE 454


PLEXID

PLEX-ID BAC-SPECTRUM

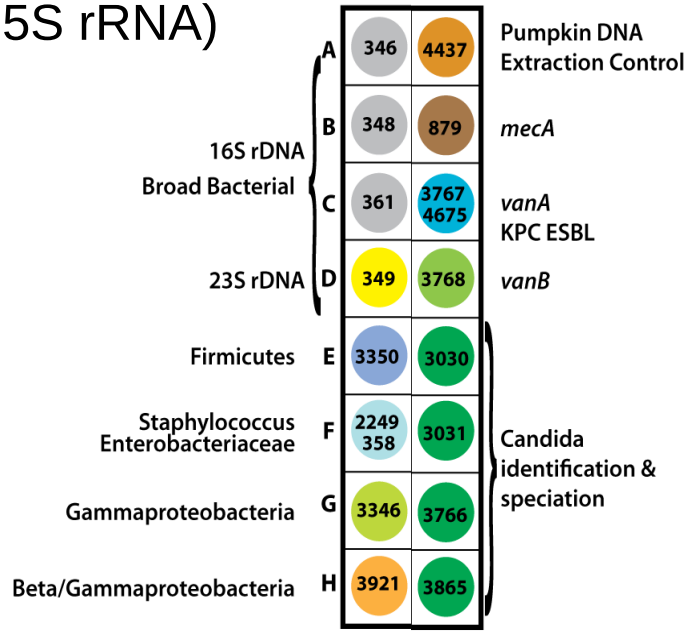
B(road Bacteria) , **C**(andida), **A**(ntimicrobial Resistance)

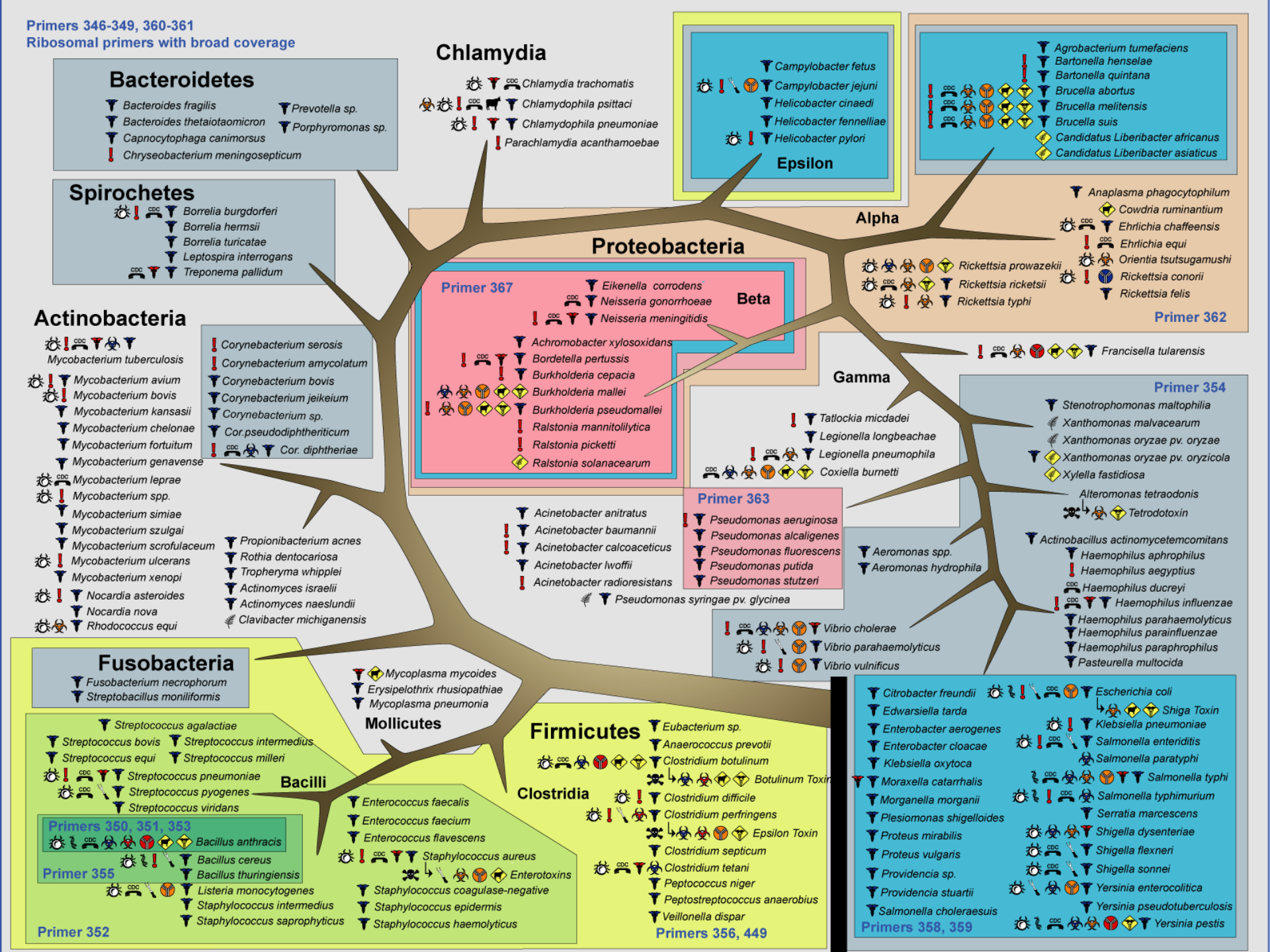
18 paires de primers

- **1:** controle d'extraction (pumpkin DNA)
- **4:** ensemble des groupes de bactéries (via 16S et 23S rRNA)
- **5:** groupes spécifiques, différenciation des espèces proches
- **4:** identification des espèces Candida (via 25S rRNA)
- **4:** resistance aux antibiotiques
- *2 puits sont multiplexés*

Temps par cycle de PCR: 2 heures

Temps total< 8 h




Primers 346-349, 360-361
Ribosomal primers with broad coverage
Bacteroidetes
Bacteroides fragilis
Bacteroides thetaiotaomicron
Capnocytophaga canimorsus
Chryseobacterium meningosepticum
Prevotella sp.
Porphyromonas sp.
Spirochetes
Borrelia burgdorferi
Borrelia hermsii
Borrelia turicatae
Leptospira interrogans
Treponema pallidum
Actinobacteria
Mycobacterium tuberculosis
Mycobacterium avium
Mycobacterium bovis
Mycobacterium kansasii
Mycobacterium chelonae
Mycobacterium fortuitum
Mycobacterium genavense
Mycobacterium leprae
Mycobacterium spp.
Mycobacterium simiae
Mycobacterium szulgai
Mycobacterium scrofulaceum
Mycobacterium ulcerans
Mycobacterium xenopi
Nocardia asteroides
Nocardia nova
Rhodococcus equi
Corynebacterium serosis
Corynebacterium amycolatum
Corynebacterium bovis
Corynebacterium jeikeium
Corynebacterium sp.
Cor.pseudodiphtheriticum
Cor. diphtheriae
Propionibacterium acnes
Rothia dentocariosa
Tropheryma whipplei
Actinomyces israelii
Actinomyces naeslundii
Clavibacter michiganensis
Fusobacteria
Fusobacterium necrophorum
Streptobacillus moniliformis
Chlamydia
Chlamydia trachomatis
Chlamydophila psittaci
Chlamydophila pneumoniae
Parachlamydia acanthamoebae
Proteobacteria
Epsilon
Campylobacter fetus
Campylobacter jejuni
Helicobacter cinaedi
Helicobacter fennelliae
Helicobacter pylori
Alpha
Agrobacterium tumefaciens
Bartonella henselae
Bartonella quintana
Brucella abortus
Brucella melitensis
Brucella suis
Candidatus Liberibacter africanus
Candidatus Liberibacter asiaticus
Anaplasma phagocytophilum
Cowdria ruminantium
Ehrlichia chaffeensis
Ehrlichia equi
Orientia tsutsugamushi
Rickettsia conorii
Rickettsia felis
Rickettsia prowazekii
Rickettsia ricketsii
Rickettsia typhi
Primer 362
Beta
Primer 367
Eikenella corrodens
Neisseria gonorrhoeae
Neisseria meningitidis
Achromobacter xylosoxidans
Bordetella pertussis
Burkholderia cepacia
Burkholderia mallei
Burkholderia pseudomallei
Ralstonia mannitolilytica
Ralstonia picketti
Ralstonia solanacearum
Gamma
Francisella tularensis
Tatlockia micdadei
Legionella longbeachae
Legionella pneumophila
Coxiella burnetti
Primer 354
Stenotrophomonas maltophilia
Xanthomonas malvacearum
Xanthomonas oryzae pv. oryzae
Xanthomonas oryzae pv. oryzicola
Xylella fastidiosa
Alteromonas tetraodonis
Tetrodotoxin
Primer 363
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas alcaligenes
Pseudomonas fluorescens
Pseudomonas putida
Pseudomonas stutzeri
Acinetobacter anitratus
Acinetobacter baumannii
Acinetobacter calcoaceticus
Acinetobacter lwoffii
Acinetobacter radioresistans
Pseudomonas syringae pv. glycinea
Aeromonas spp.
Aeromonas hydrophila
Actinobacillus actinomycetemcomitans
Haemophilus aphrophilus
Haemophilus aegyptius
Haemophilus ducreyi
Haemophilus influenzae
Haemophilus parahaemolyticus
Haemophilus parainfluenzae
Haemophilus paraphrophilus
Pasteurella multocida
Vibrio cholerae
Vibrio parahaemolyticus
Vibrio vulnificus
Mollicutes
Mycoplasma mycoides
Erysipelothrix rhusiopathiae
Mycoplasma pneumonia
Firmicutes
Bacilli
Streptococcus agalactiae
Streptococcus bovis
Streptococcus intermedius
Streptococcus equi
Streptococcus milleri
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes
Streptococcus viridans
Primers 350, 351, 353
Bacillus anthracis
Primer 355
Bacillus cereus
Bacillus thuringiensis
Listeria monocytogenes
Staphylococcus intermedius
Staphylococcus saprophyticus
Primer 352
Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Enterococcus flavescens
Staphylococcus aureus
Enterotoxins
Staphylococcus coagulase-negative
Staphylococcus epidermis
Staphylococcus haemolyticus
Clostridia
Eubacterium sp.
Anaerococcus prevotii
Clostridium botulinum
Botulinum Toxin
Clostridium difficile
Clostridium perfringens
Epsilon Toxin
Clostridium septicum
Clostridium tetani
Peptococcus niger
Peptostreptococcus anaerobius
Veillonella dispar
Primers 356, 449
Citrobacter freundii
Edwarsiella tarda
Enterobacter aerogenes
Enterobacter cloacae
Klebsiella oxytoca
Moraxella catarrhalis
Morganella morganii
Plesiomonas shigelloides
Proteus mirabilis
Proteus vulgaris
Providencia sp.
Providencia stuartii
Salmonella choleraesuis
Primers 358, 359
Escherichia coli
Shiga Toxin
Klebsiella pneumoniae
Salmonella enteriditis
Salmonella paratyphi
Salmonella typhi
Salmonella typhimurium
Serratia marcescens
Shigella dysenteriae
Shigella flexneri
Shigella sonnei
Yersinia enterocolitica
Yersinia pseudotuberculosis
Yersinia pestis

EXEMPLE PROFIL DE DETECTION *S. AUREUS*

16s rRNA (*S.aureus*)	**1**	S3/P1 346	**9**	mecA (positive)
		S3/P2 879		
16s rRNA (*S.aureus*)	**2**	S3/P3 348	**10**	vanA (calibrant only) kpc (calibrant only)
		S3/P4 3767 4675		
16s rRNA (*S.aureus*)	**3**	S3/P5 361	**11**	vanB (calibrant only)
		S3/P6 3768		
23s rRNA (*S.aureus*)	**4**	S3/P7 349	**12**	25srRNA (*Sacharomyces cerevisiae*)
		S3/P8 3030		
rplB (*S.aureus*)	**5**	S3/P9 3350	**13**	25srRNA (*Sacharomyces cerevisiae*)
		S3/P10 3031		
tufB (Calibrant only) valS (*S.aureus*)	**6**	S3/P11 358 2249	**14**	25srRNA (*Sacharomyces cerevisiae*)
		S3/P12 3766		
rpoB (calibrant only)	**7**	S3/P13 3346	**15**	mt SSU rRNA (calibrant only)
		S3/P14 3865		
rpoB (1 unknown amplicon)	**8**	S3/P15 3921	**16**	extraction control (positive)
		S3/P16 4437		

VIRAL IC v2.0 : virologie de l'immuno déprimé

Adenovirus
Human Adenovirus*****
(2-54, A-F)

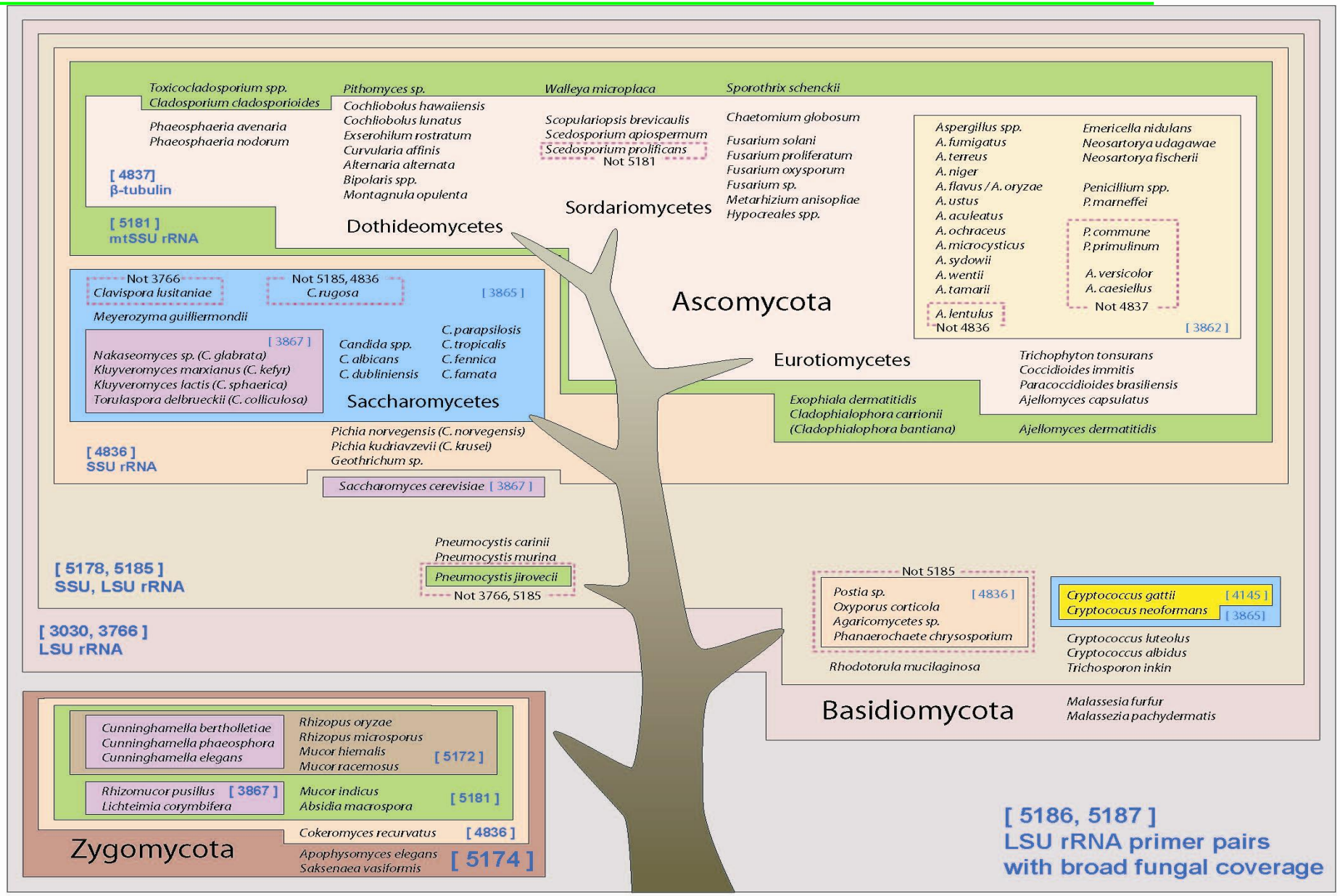
Enterovirus*
Human Coxsackievirus
Human Echovirus
Human Enterovirus
Human Rhinovirus

Herpesvirus
Cytomegalovirus (CMV, HHV-5*)
Epstein-Barr-Virus (EBV, HHV-4*)
Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1, HHV-1*)
Herpes-Simplex-Virus-2 (HSV-2, HHV-2*)
Kaposi-Sarcoma-Associated-Herpesvirus (KSHV, **HHV-8***)
Varicella-Zoster-Virus (VZV, HHV-3*)
HHV-6
HHV-7

Polyomavirus
BK-Virus*
JC-Virus*

Parvovirus
Human Erythrovirus V9
Human Erythrovirus VX
Human Parvovirus B19*

BROAD FUNGAL KIT



ETUDE VIROLOGIE SAINT LOUIS JUIN 2012

Objectives :

- Comparer sur des prélèvements de 79 patients greffés (moelle osseusse ou rein) les résultats routine versus Plex ID
  - Résultats biologiques
  - Temps de rendu des résultats

Méthodes

2 jours de mise en parallèle des échantillons

- Limités à 48 /jour sur PLEX-ID en juin , > 100 / j en novembre
- mesure d'exécution par auditeurs externes

TEST VIRAL IC

INFECTIONS VIRALES DÉTECTÉES DURANT L'ÉTUDE

Sur 79 demandes :

Corrélation parfaite avec les techniques de routine plus :

1 infection par Adénovirus +

1 infection par JC +

1 infection par Parvovirus

non demandées et retrouvés par PLEX ID

« WORKFLOW »

79 prélèvements en parallèlle PLEX ID versus routine

46 lundi Juillet 9th

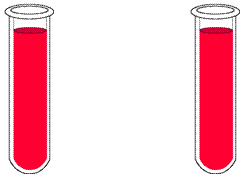
30 mardi Juillet 10th

3 mercredi Juillet 11th

Source : van de Geijn Partner report

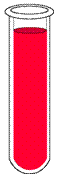
PROCEDURES DES ANALYSES EN ROUTINE (ST LOUIS)

CMV EBV



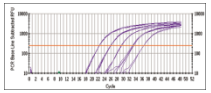
Integrated extraction amplification system

HHV6
HHV8



Extraction

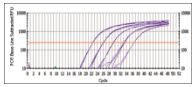
In house
Real time quantification



Adv, Parvo,
HSV1/2, VZV,
BK virus

Extraction

Commercial & In house
Real time assay quantification



Enterovirus

Integrated extraction amplification system

(Slide from F Simon)

Working with the PLEX-ID as a user: turnaround time

Reagents preparation, lysis and homogenization of the sample

40-50 min

Automated DNA extraction and purification

45 min

Automated PCR set-up (96 well plates)

10 min/plate

PCR amplification

2 hours 15 minutes

Mass spectrometry, data analysis and identification

NFDU Workstation

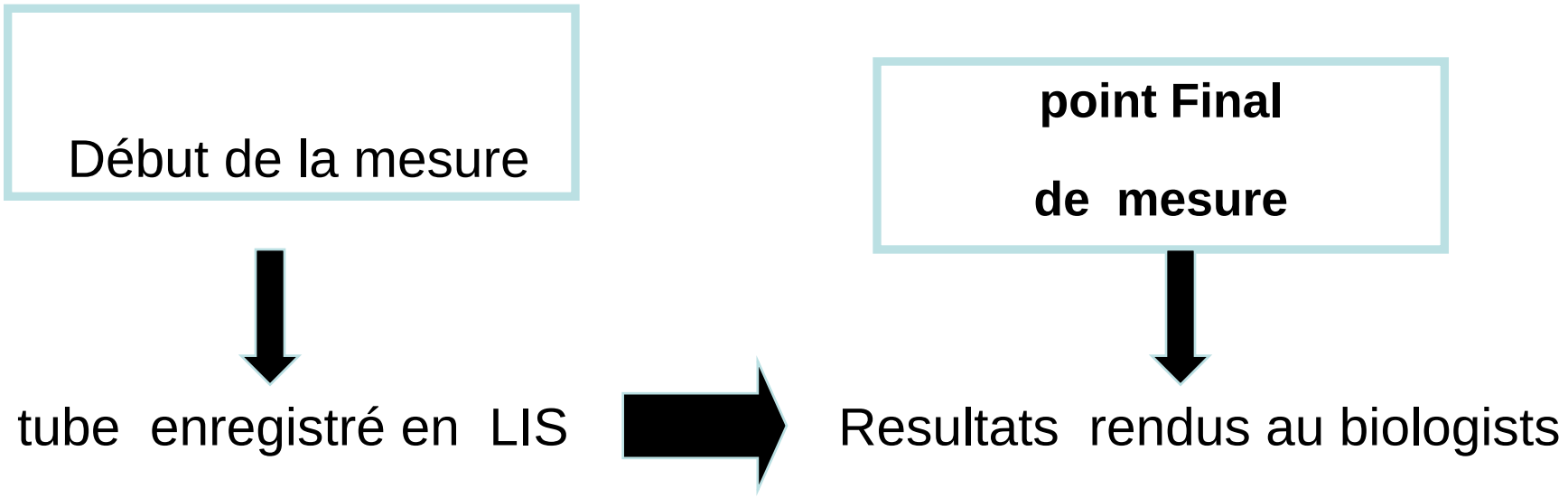
40'-1 hour/plate

Total time

~6-8 h

Set-up

Comparer le temps de rendu entre Routine & PLEX ID



Source : van de Geijn Partner report

ROUTINE PCR VS PCR – ESI - TOF – MS WORKFLOW POINT FINAL

PLEX ID = 28,16 Heures pour un ingénieur

VS

ROUTINE = 48,37 Heures pour 3 techniciens

PLEX ID EN BACTÉRIOLOGIE

- Juin 2012 Dossier Me Cam
  - Images nodulaires pulmonaires IMR état fébrile
  - Absence de cultures positives des LBA
  - Biopsie pulmonaire trans thoraxique

  - Plex ID identifie *Actinomyces Naeslundi*

PLEX ID EN MYCOLOGIE

- Juin 2012 LBA de Mme Je..
- Identifie directement sur le LBA : *Ajellomyces capsulatum* ('Histoplasma capsulatum)

- Le Plex ID permet de faire le diagnostic **19 jours avant** l'isolement en culture de rares colonies d'Histoplasmes

- Par ailleurs excellentes corrélations pour *P Jirovici, A fumigatus* sur des LBA congelés

PLEX ID - Case report

- Juin 2012 M. Vau , patient transplanté hépatique
  - une éruption cutanée fébrile + ulcérations muqueuses après un bain en piscine en Turquie

    - biopsie cutanée et fongémie positives à *Fusarium*

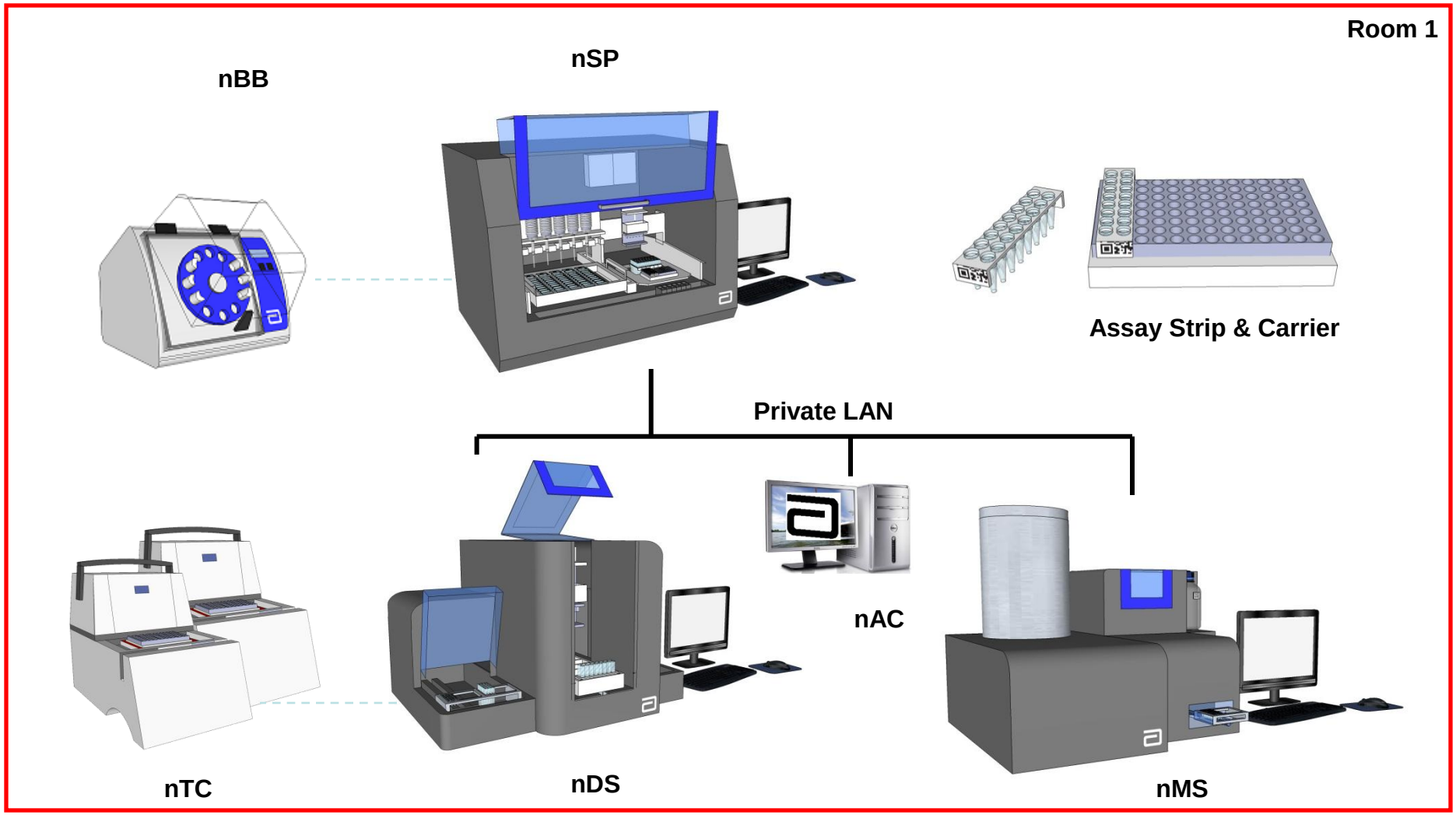
- Mai 2013 M r X : suspiçion K testiculaire

  - Syphilis

- Septembre Mme Y Salpingite isolement bactérien négatif

  - C Trachomatis

PERSPECTIVES : NEXT PLEX 2014



MULTIPLEXE EN MICROBIOLOGIE
A NEW DEAL FOR 2015

-**Vers une nouvelle approche microbiologique :**

- **Nouvelle organisation du suivi virologiq des immunodéprimés**

- **« pan-microbiologie «**
  Viro- Bactériologie – Mycologie directe sur tous les types de prélèvements

- **nouveaux kits avec approche « pan »microbienne : ie**
  - **infection broncho pulmonaire**
  - **SNC**

- **Intérêt majeurs pour la surveillance épidémiologique, particulièrement des résistances aux antibiotiques et antiviraux**