

Aportació de les tècniques moleculars pel serotipat de *S. pneumoniae* a l'era de la vacuna conjugada

Laura Selva Jové
Departament de Microbiologia i Epidemiologia Molecular
Hospital Universitari Sant Joan de Déu

Introducció

- La malaltia pneumocòccica invasiva (MPI) causada per *Streptococcus pneumoniae*, causa important de morbi-mortalitat a nivell mundial.
- >1M nens menors de 5 anys, moren cada any en països en vies de desenvolupament [OMS].

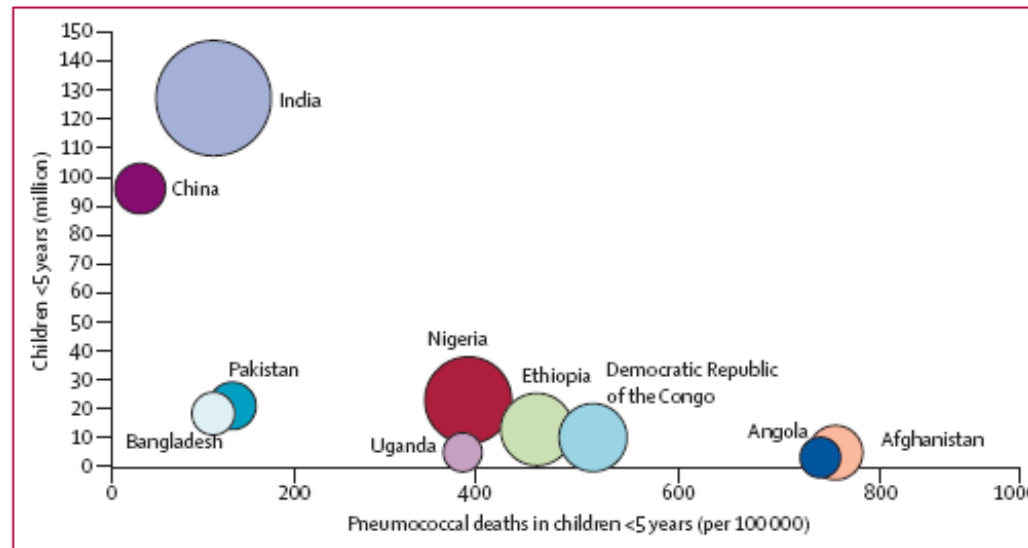
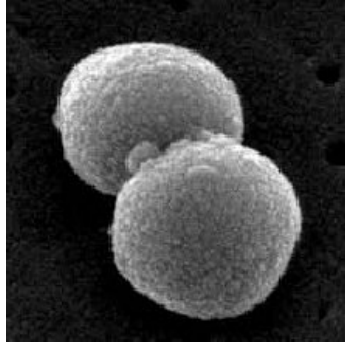


Figure 3: Ten countries with the greatest number of pneumococcal deaths in children aged 1-59 months*
Bubble size indicates the number of pneumococcal deaths. *Country (number of deaths): India (142 000), Nigeria (86 000), Ethiopia (57 000), Democratic Republic of the Congo (51 000), Afghanistan (31 000), China (30 000), Pakistan (27 000), Bangladesh (21 000), Angola (20 000), and Uganda (19 000).

O'Brien KL, Lancet, 2009

Introducció

- *S.pneumoniae*, patogen comú a l'espècie humana. Hàbitat: Nasofaringe



Càpsula polisacàrida: Principal factor de virulència

92 tipus diferents amb diferent capacitat d'invasió

- 30-50% colonització en nens sans; colonització 2-3 vegades superior en països en vies de desenvolupament [1]
- Portadors asimptomàtics, pas previ per a desenvolupament MPI

[1]Rodrigues F, Microb Drug Resist, 2009

Introducció

- 2000: Autorització vacuna conjugada heptavalent (PCV7) a EEUU
- Reducció de la taxa de MPI causada per serotips inclosos a la vacuna [2]

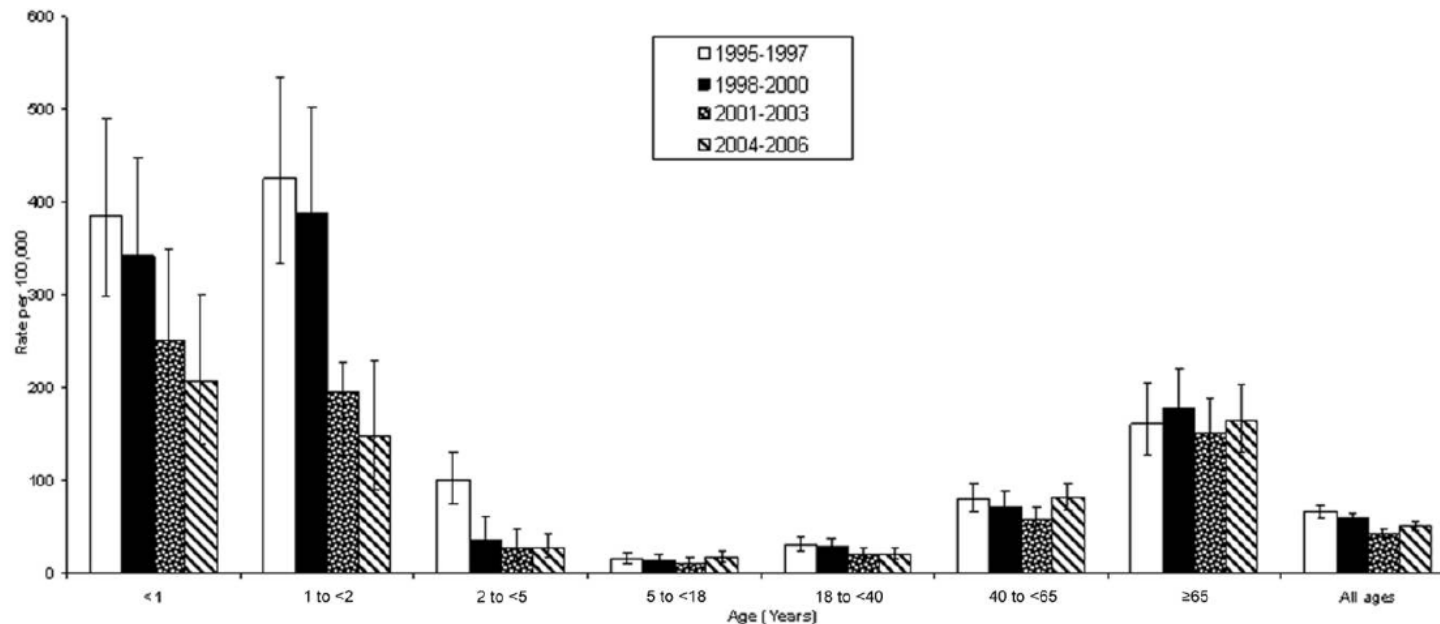
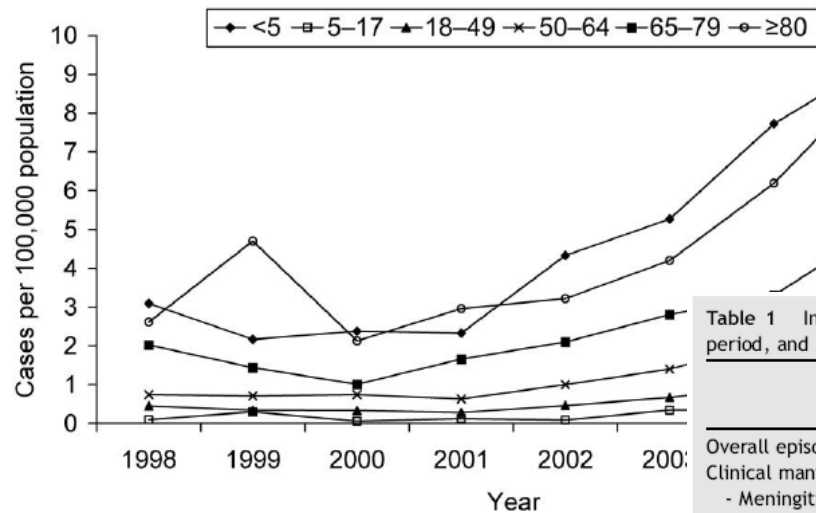


Figure 1. Rate of all-serotype invasive pneumococcal disease among Navajo, by age and time period. *White bars*, 1995–1997; *black bars*, 1998–2000; *dotted bars*, 2001–2003; *striped bars*, 2004–2006.

[2] Weatherholtz R, Clin Infect Dis, 2010

Introducció

- Augment de la malaltia en nens menors de 5 anys produïda per serotips no inclosos a la vacuna [3,4]; augment del serotip 19A a EEUU [5] i també a la nostra àrea geogràfica [6].



EEUU

Table 1 Invasive Pneumococcal Disease (IPD) caused by serotype 19A in three periods (pre-vaccine period, early vaccine period, and late vaccine period).

	Serotype 19A episodes/Total episodes (%)			P value ^a
	Pre-vaccine (1997–2001)	Early vaccine (2002–2004)	Late vaccine (2005–2007)	
Overall episodes	1/58 (1.7)	8/54 (14.8)	27/123 (21.9)	0.002
Clinical manifestations				
- Meningitis	0/18 (0)	1/8 (12.5)	4/24 (16.6)	0.198
- Pneumonia (overall)	1/15 (6.6)	1/22 (4.5)	11/58 (18.9)	0.169
without empyema	1/8	0/9	5/24	
with empyema	0/7	1/13	6/34	
- Bacteremia/sepsis	0/17 (0)	6/16 (37.5)	9/32 (28.1)	0.024
- Others ^b	0/8 (0)	0/8	3/9 (33.3)	0.048

Figure 1. Age-specific incidence of invasive pneumococcal disease caused

[3] Dagan R, Clin Microbiol Infect, 2009

[4] Tsigrelis C, Mayo Clinic Proc, 2009

[5] Moore MR, J Infect Dis, 2008

[6] Muñoz-Almagro C, J Infect, 2009

Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona)

Introducció

- 2010: Avaluar l'impacte de la PCV7, abans de la introducció de les vacunes 10 i 13-valent

Vacuna	Serotips inclosos
PCV7	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
PCV10	PCV7 + 1, 5, 7F
PCV13	PCV10 + 3, 6A, 19A

- Major incidència de la malaltia en països com Àfrica o Àsia, accés a vacunes i tractament limitat
- Escassetat de recursos, dificultat de realitzar estudis a nivell local, enviar mostres a centres de referència

Vigilància epidemiològica de la malaltia invasiva pneumocòccica, amb l'objectiu de conèixer les característiques epidemiològiques i l'evolució d'aquests processos

Introducció

CULTIU MICROBIOLÒGIC

- Diagnòstic clàssic de la malaltia
- Tècnica molt específica, baixa sensibilitat.
- Necessitat de mantenir el microorganisme viu.
- Dificultat recollir volum adequat de mostra en pacients pediàtrics, antibioteràpia prèvia → falsos negatius



PCR EN TEMPS REAL

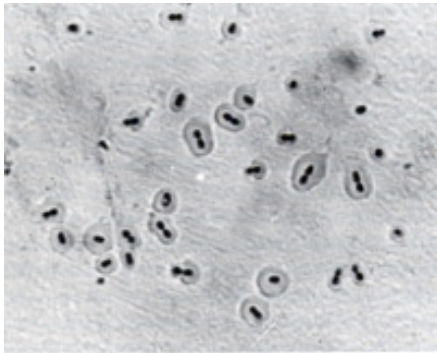
- Identificar i quantificar fragments de DNA del pneumococ en <3hores
- Elevada especificitat i sensibilitat
- Rapidesa del mètode i detecció del patogen present a baixa concentració
- Detecció dels gens *ply*, *lytA*, *wzg* en mostra directa de plasma, líquid pleural, LCR entre altres.



Introducció

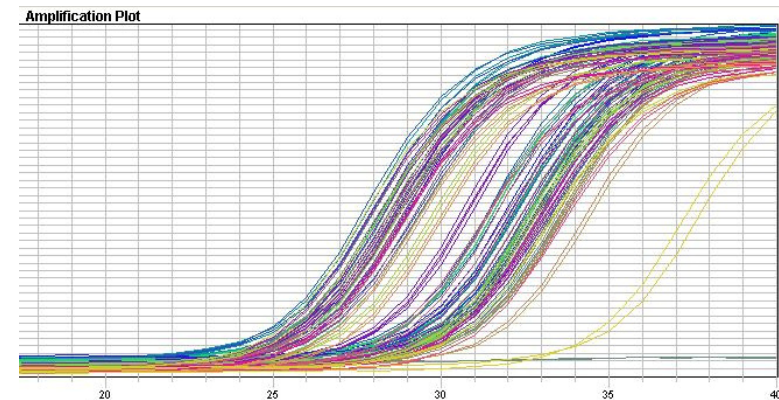
SEROTIPAT

■ Reacció de Quellung



Precipitació entre antisèrums específics i l'antigen del polisacàrid del bacteri que fa visible, microscòpicament, la seva càpsula.

■ PCR en temps real



ORIGINAL ARTICLE

10.1111/j.1469-0691.2008.02028.x

Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR

D. Tarragó¹, A. Fenoll¹, D. Sánchez-Tatay², L. A. Arroyo², C. Muñoz-Almagro³, C. Esteva³, W. P. Hausdorff⁴, J. Casal¹ and I. Obando²

¹Spanish Reference Laboratory for Pneumococci, Servicio de Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, Madrid, ²Fundación Reina Mercedes y Servicio de Infectología Pediátrica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, ³Servei de Microbiologia, Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues, Barcelona, Spain and ⁴GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium

Tècniques moleculars

Serotip	Gen	Sonda TaqMan MGB
1	udg	CAGTTATGAAATATAATCCTGATGC
5	udg	ATTGCGGTTAATTTGAAG
3	wchE	TTGCTGAAGCCTTTTGT
4	wciJ	CAGGAGATGCTAAAATA
6A	wciP	CTGGCTATGATAGTT
6B	wciP	ACTGTCTCATGATAATT
7F/A	wcwA	CTATTCCAGAAGAATCTC
8	udg	CACGAATCGGCTCTC

Serotip	Gen	Sonda TaqMan MGB
9V/A/N/L	udg	CCACGTATAGGAAATCAT
14	wzy	AATGGAATGGAAATGTTAC
15B/C	wzy	TAATGGGCTGGGAATT
19A	wchO	ATGCAAATGCTCACCTAG
19F/B/C	wchO	ATGCAAAGTCAAATTTAGA
18C/B	gct	AAAGTCAGATGTTAAAGACTAC
23F	wchV	TTGCTCTTCGAAAATGT
23A	wchV	TTGCTCCTCGAAAAGTGT

Tarragó et al, CMID 2008

Tècniques moleculars

- **Mostres conservades en paper de filtre o dried-spot**
 - DNA/RNA atrapat i estabilitzat a la matriu
 - Conservació de les mostres a T ambient
 - Mostres de sang seca
 - Desenvolupament de tècniques moleculars (CMV, HIV, VHC)



Paper Whatman®



DETECCIÓN Y SEROTIPADO DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* A PARTIR DE MUESTRAS INOCULADAS EN PAPEL DE FILTRO (DRIED-SPOT) MEDIANTE PCR MULTIPLEX

L.Selva, M.F. de Sevilla, F. Aguilo, X. Krauel, D. Tarrago, C. Muñoz-Almagro

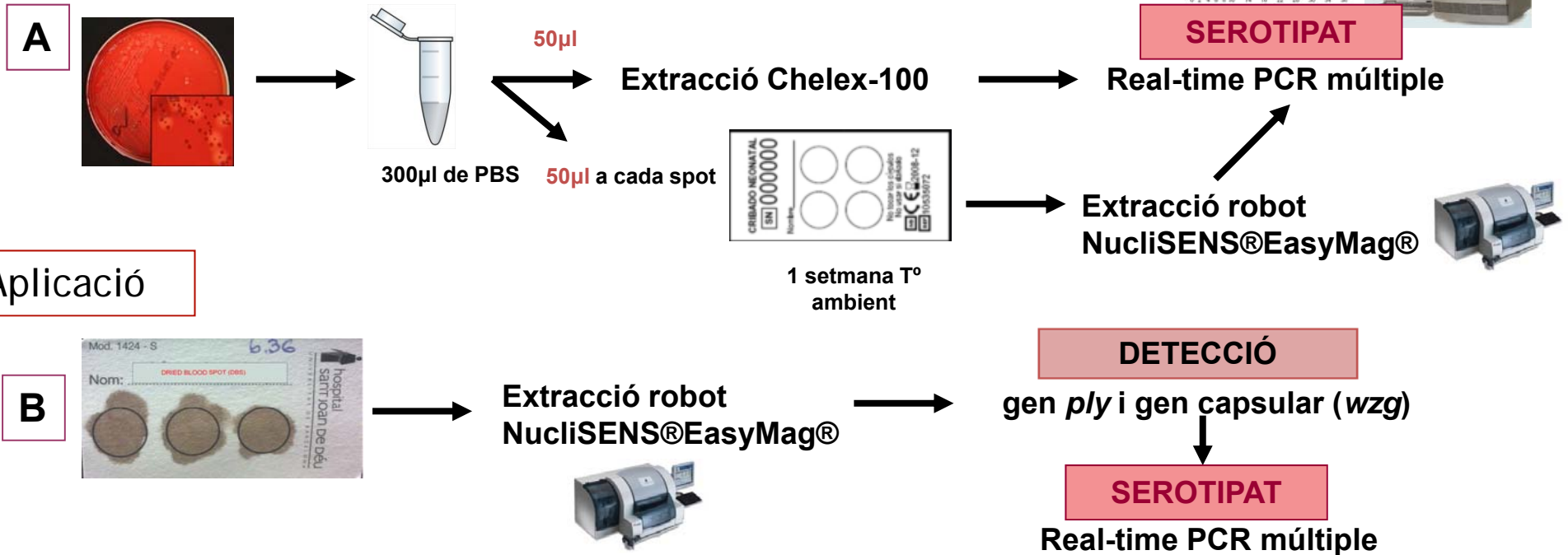
OBJETIVO: Evaluar la utilidad de la detección y serotipado de *Streptococcus pneumoniae* por Real-Time PCR Multiplex a partir de cepas y muestras de sangre de pacientes con enfermedad invasiva neumocócica conservadas a temperatura ambiente sobre papel filtro (dried spot).

Tècniques moleculars

- Mostres conservades en paper de filtre o dried-spot

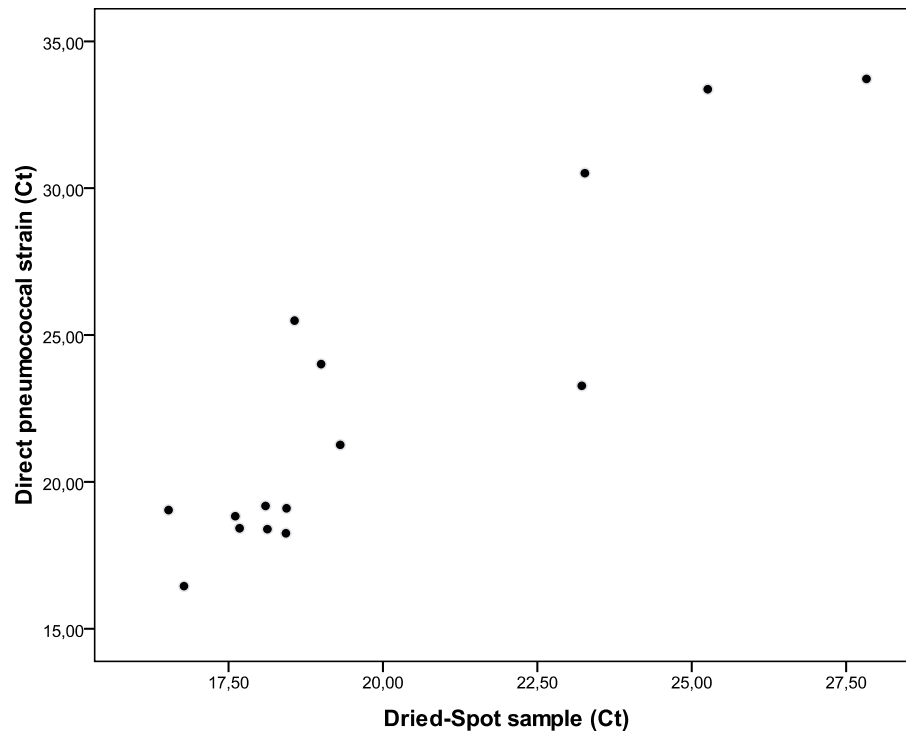
Validació

SOQUES (1, 5, 19A, 19F, 14, 3, 7F, 4, 6A, 6B, 8, 9N, 18C, 23A, 23F)



Tècniques moleculars

Dried-spot: Resultats validació



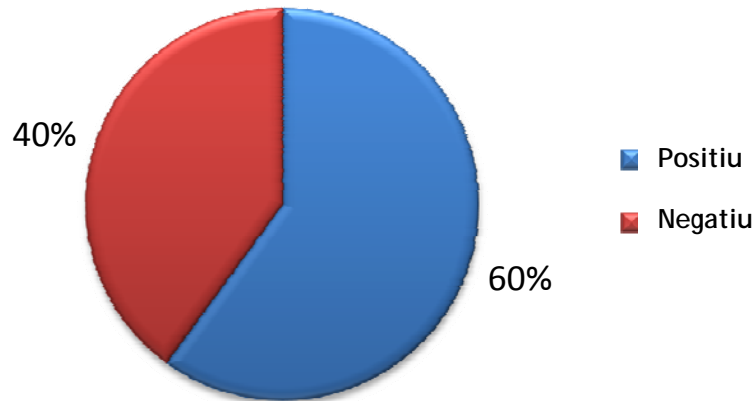
Spearman's rho: 0,9; $P < .0001$

Comparació del Ct (threshold cycle) de les soques control de *S.pneumoniae* conservades a temperatura ambiente sobre paper de filtre (dried spot) i les soques fresques extretes directament.

Tècniques moleculars

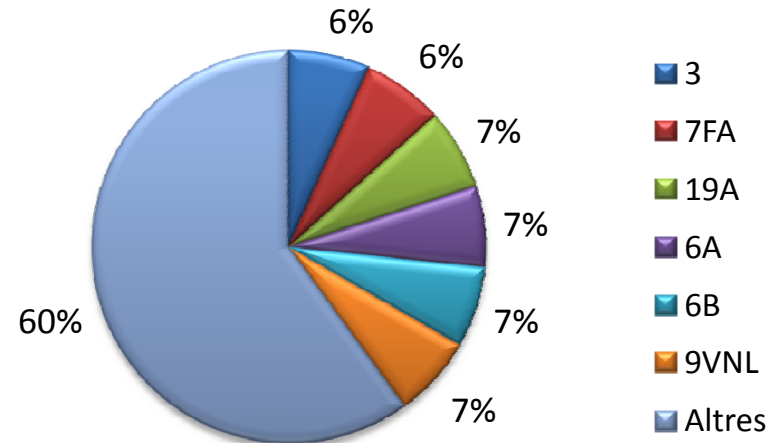
Dried-spot: Resultats aplicació

25 pacients amb sospita de MPI



Resultat de la identificació de *S. pneumoniae* en mostres de sang seca (DBS) de Sierra Leone

Resultats de la detecció i serotipat de *S. pneumoniae* de les mostres positives procedentes de Sierra Leona.



Nota: *Altres*: no tipa per cap dels serotips testats per PCR (1, 5, 19AFBC, 14, 3, 7FA, 4, 6AB, 8, 9VNL, 18CB, 23AF)

Tècniques moleculars



Available online at www.sciencedirect.com



Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 66 (2010) 204–206

DIAGNOSTIC
MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS
DISEASE

www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Notes

Direct detection of *Streptococcus pneumoniae* in positive blood cultures by real-time polymerase chain reaction

Laura Selva^a, Cristina Esteva^a, Amadeu Gené^a, Maria Fernández de Sevilla^b, Susanna Hernandez-Bou^b, Carmen Muñoz-Almagro^{a,*}

^aMolecular Microbiology Department, University Hospital Sant Joan de Déu, 08950 Esplugues-Barcelona, Spain

^bPaediatrics Department, University Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues-Barcelona, Spain

Received 19 December 2008; accepted 11 May 2009

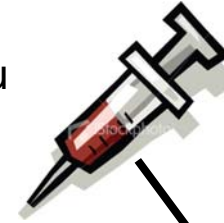
Abstract

We developed a real-time polymerase chain reaction specific for *Streptococcus pneumoniae* to be applied directly from blood culture bottles without previous DNA extraction step. For the 128 blood culture bottles tested, the assay had 94% and 98.4% sensitivity and specificity, respectively. This assay provides rapid and accurate identification of this pathogen.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Real-time PCR; Blood culture bottles; *Streptococcus pneumoniae*

Hemocultiu
positiu



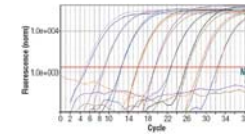
NO extracció DNA

DETECCIÓ

gen *ply* i gen capsular (*wzg*)

SEROTIPAT

Real-time PCR múltiple



Tècniques moleculars

Hemocultius: Resultat

Table 1

Comparative microbiologic study of culture and real-time PCR in blood cultures of 128 patients

Gram stain result	Pathogen isolated in blood culture	No. of patients	Real-time PCR result	
			Positive	Negative
GPC	<i>S. pneumoniae</i>	18	17	1
GPC	<i>S. agalactiae</i>	3	0	3
GPC	<i>S. mitis</i>	8	1	7
GPC	<i>S. viridans</i> group	4	0	4
GPC	<i>E. faecalis</i>	3	0	3
GPC	<i>E. faecium</i>	1	0	1
GPC	<i>Micrococcus</i> spp.	1	0	1
GPC	<i>S. aureus</i>	1	0	1
GPC	<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	0	1
GPC	<i>S. epidermidis</i>	1	0	1
GPC	<i>S. simulans</i>	2	0	2
GPC	Coagulase-negative staphylococci	4	0	4
GPC	<i>Corynebacterium</i> spp.	1	0	1
GPC	Non detected	2	1	1
GNB	<i>E. coli</i>	4	0	4
GNB	<i>A. lwoffii</i>	1	0	1
GNB	<i>E. cloacae</i>	1	0	1
GNB	<i>K. pneumoniae</i>	1	0	1
GNB	Enteric salmonella	1	0	1
GNB	Non detected	1	0	1
GNC	<i>N. meningitidis</i> group B	1	0	1
Negative	Nondetected	68	0	68
	Total	128	19	109

Sensitivity and specificity of *pneumolysin* real-time PCR according to culture results: 94% and 98.4%, respectively.

GPC = Gram-positive cocci; GNB = Gram-negative bacilli; GNC = Gram-negative cocci.

Resultats

Distribució de serotips



**Sant Joan
de Déu**

HOSPITAL MATERNOINFANTIL
UNIVERSITAT DE BARCELONA

SEROTYPE DISTRIBUTION INCLUDING CULTURE NEGATIVE EPISODES OF INVASIVE PNEUMOCOCCAL DISEASE (IPD) AMONG CHILDREN < 5 YEARS IN CATALONIA (SPAIN) 2007-2008

C.Muñoz-Almagro¹, L.Selva¹, P.Ciruela², MF de Sevilla¹, G.Codina³, S.Hernandez², F.Moraga³, C.Esteva¹, JJ.Garcia-Garcia¹, F.Coll³, N.Cardeñosa^{2,5}, A.Planes³, I.Jordan¹, J.Batalla², L.Salleras^{4,5} and A.Dominguez^{4,5}

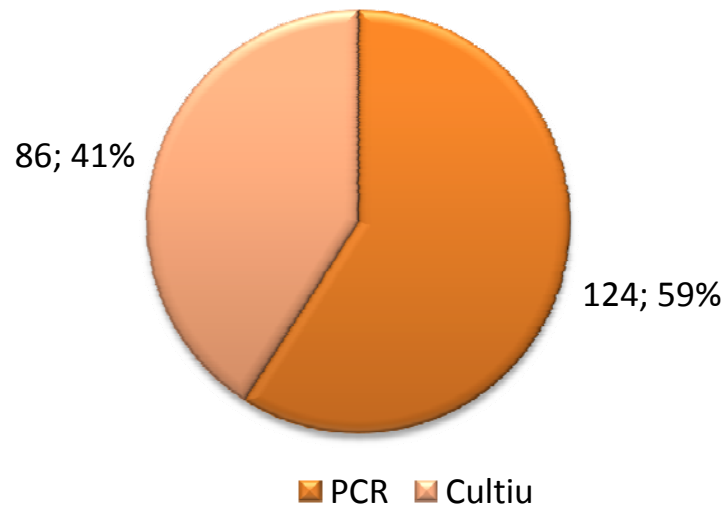
¹Hospital Universitari Sant Joan de Déu, ²General Directorate of Public Health, Generalitat de Catalunya, ³Hospital Universitari Vall d'Hebron, ⁴CIBER Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Spain, Barcelona, ⁵Health Department, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

Resultats

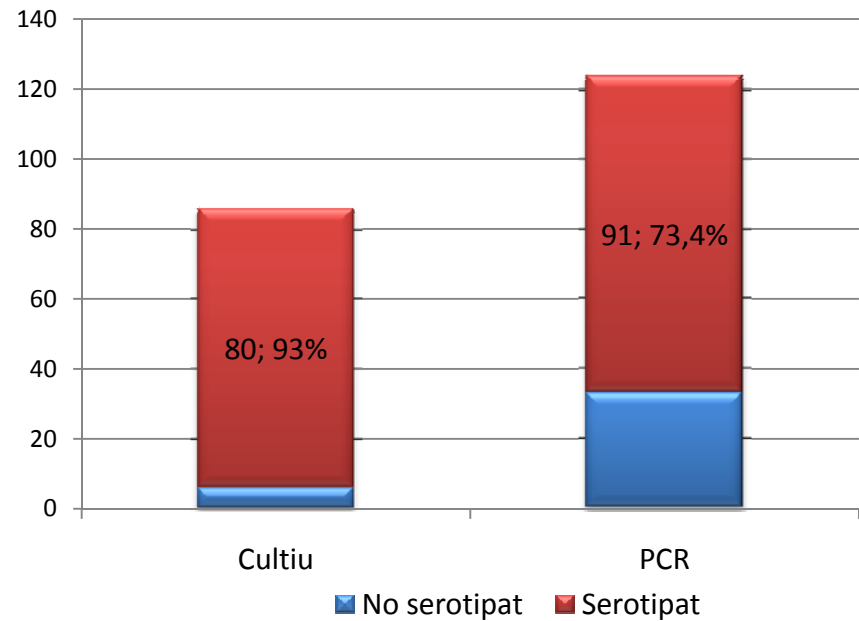
210 casos de MPI en 210 pacients

- 52.4% nenes
- mitjana edat: 29 mesos (3 a 49m)

Distribució de casos per cultiu i PCR

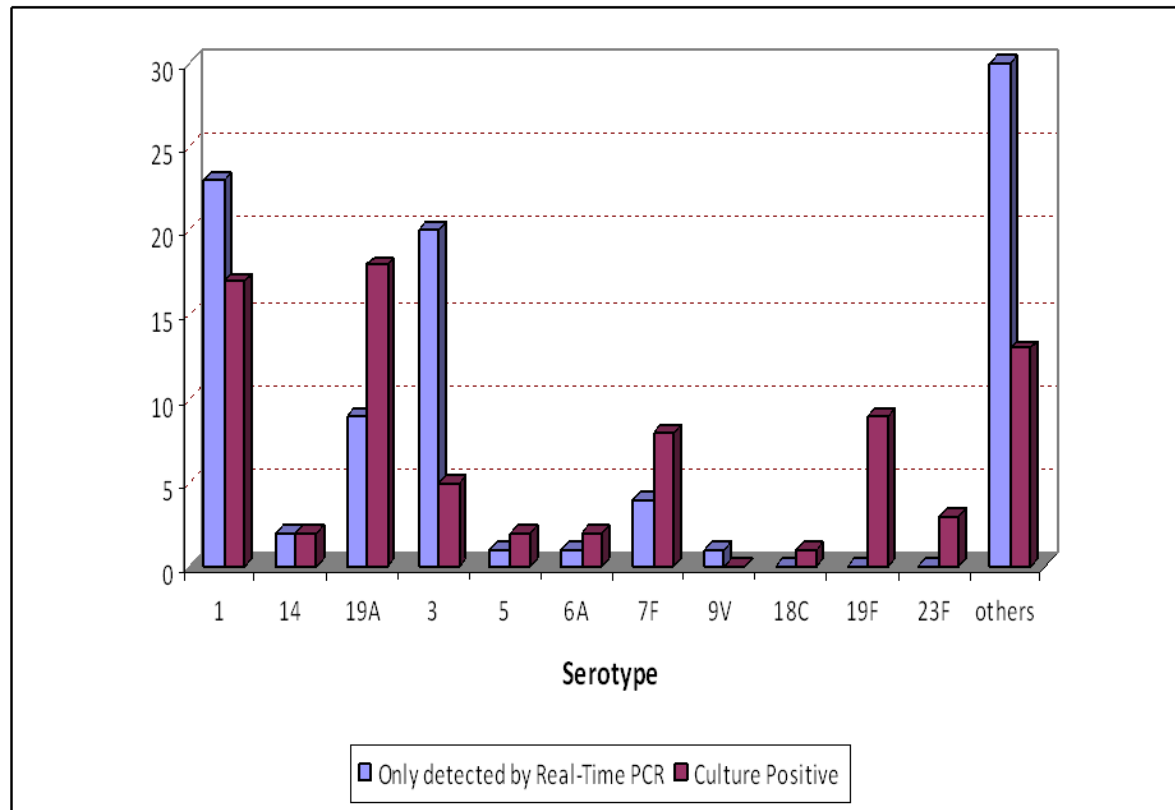


Serotipat



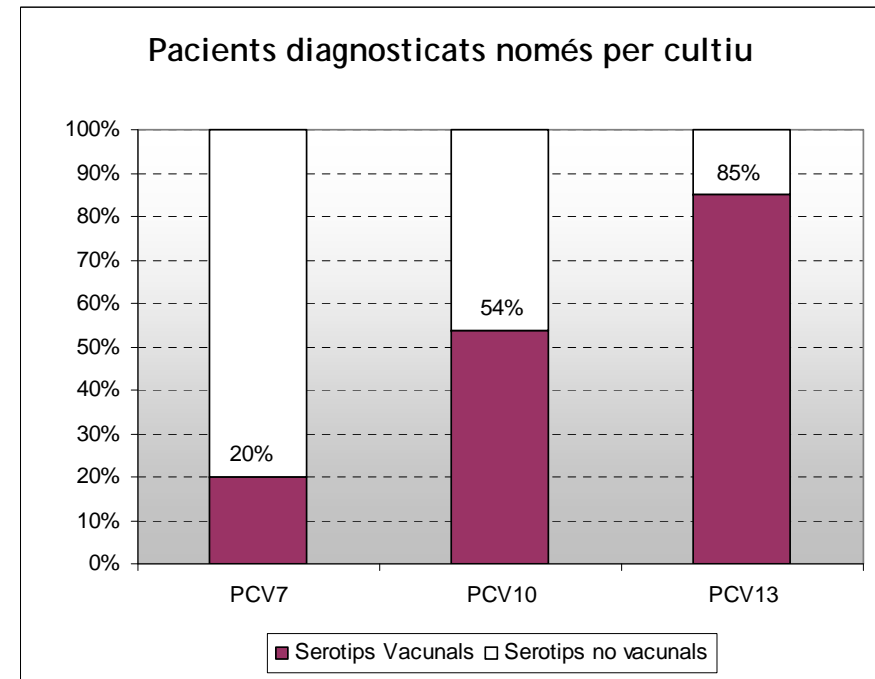
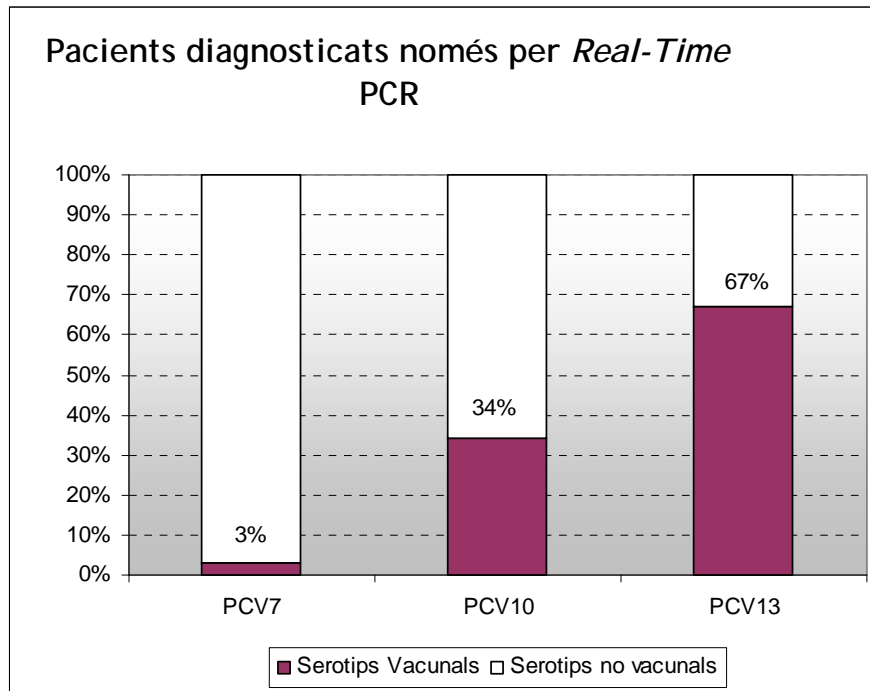
Resultats

Diferències en la distribució de serotips en pacients amb cultiu positiu vs pacients amb cultiu negatiu



Resultats

Cobertura de les vacunes conjugades PCV7, PCV10 i PCV13





CLINICAL CHARACTERISTICS OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SEROTYPE 3 AMONG CHILDREN IN CATALONIA, SPAIN

P. Ciruela¹, N. Cardeñosa^{1,2}, S. Hernández¹, L. Selva³, C. Muñoz-Almagro³, M. Fernandez de Sevilla³, C. Esteva³, G. Codina⁴, F. Moraga⁴, J.J. García-García³, F. Coll⁴, A.M. Planes⁴, I. Jordan³, J. Batalla¹, L. Salleras^{2,5}, A. Domínguez^{2,5}

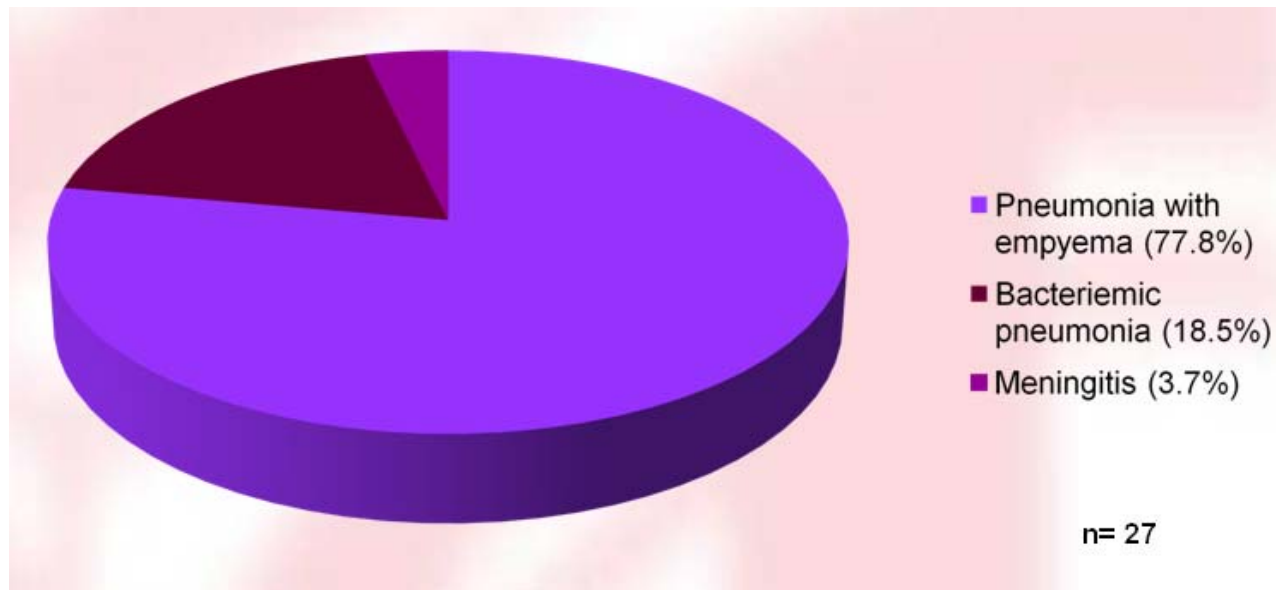
¹General Directorate of Public Health, ²CIBER Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Barcelona, ³Hospital Universitari Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, ⁴Hospital Universitari Vall d'Hebron, ⁵Health Department, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Resultats

263 casos de MPI, 207 casos serotipats

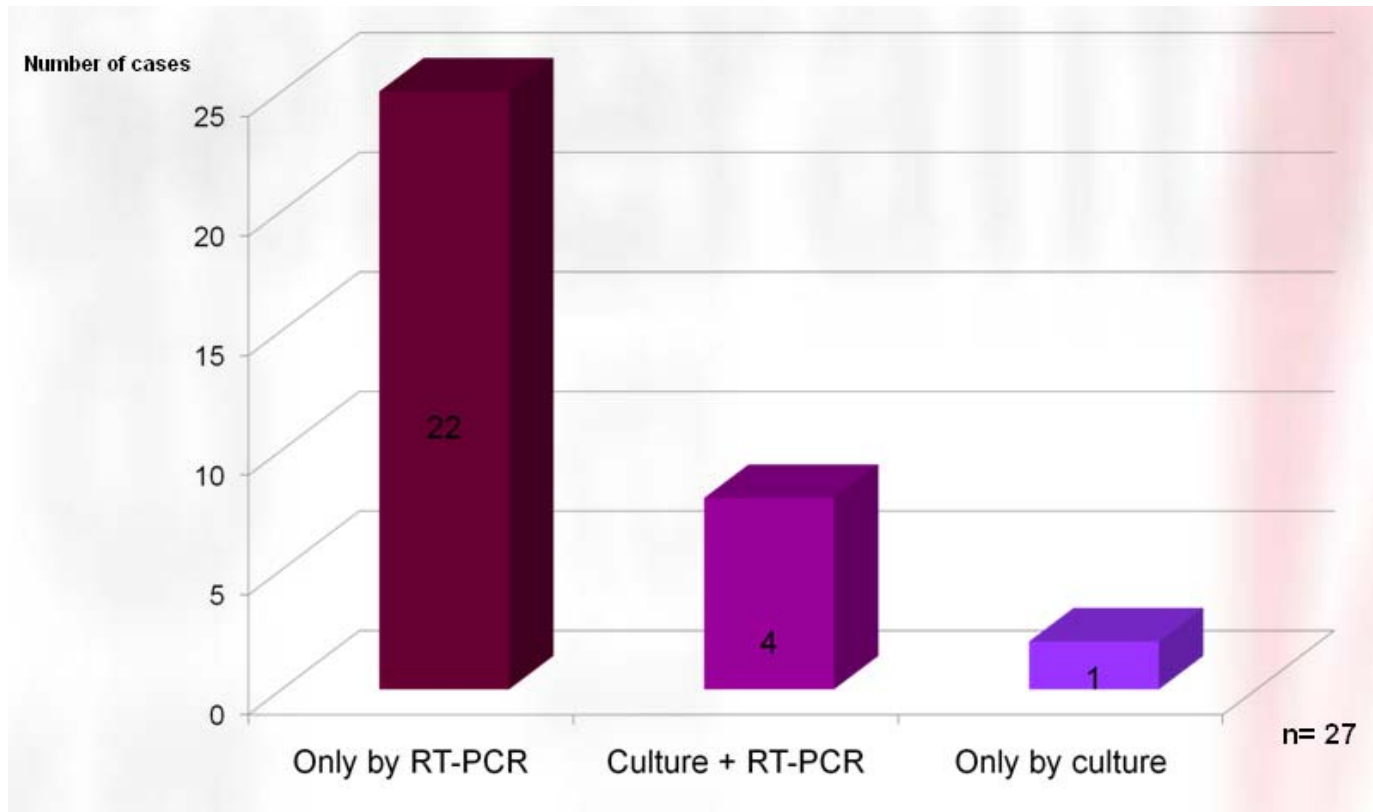
- SEROTIP 3: 27 casos (13.0%)
- mitjana edat: 29 mesos

Manifestació clínica de les soques de pneumococ serotip 3



Resultats

Mètode d'identificació de les soques de pneumococ serotip 3



Conclusions

- L'ús de paper de filtre o dried spot és un sistema de recollida i transport de mostres útil per la detecció i serotipat del pneumococ. Permet conservar la mostra a temperatura ambient.
- La PCR multiplex en temps real és molt útil per a estudis de vigilància epidemiològica de la MPI, principalment, en pacients que han estat exposats a tractament antibiòtic previ.
- El serotip 3 del pneumococ s'infradiagnostica per cultiu i té un paper important en la MPI en nens.
- La PCR en temps real és una eina per al diagnòstic i identificació de la MPI, exemple, serotip 3.

Moltes gràcies per la vostra atenció!