

Partie 5

Cas cliniques



Histoire (1)

Mr X., 38 ans se présente aux urgences pour des céphalées, vertiges, photophobie et vomissements

Histoire (1)

Une PL est réalisée en urgence !

- Aspect : **hémorragique**
- Cellularité :
20 éléments / μ L
1400 hématies / μ L
- **Protéïnorachie : 1.2 g/L,**
- **Glycorachie : 2,8 mmol/L ,**
- Examen microscopique : négatif
- **Lactates (LCR) : 2 mmol/L**

LCR	Normal
• Aspect	«Eau de roche»
• Pression	4-18 cmH ₂ O
• Leucocytes	0-5/ml
• % de neutrophiles	0
• Protéines	150-450 mg/l
• Glucose	2,8-3,3 mmol/l
• Glycorachie/glycémie	> 0,5
• Lactate	1,2-2,1 mmol/l
• Germes à l'examen direct	Sans germe

* La turbidité correspond à > 200 leucocytes
** Si > 40 cmH₂O, haut risque de coma.
*** Moins bon pronostic si < 1000/ml.

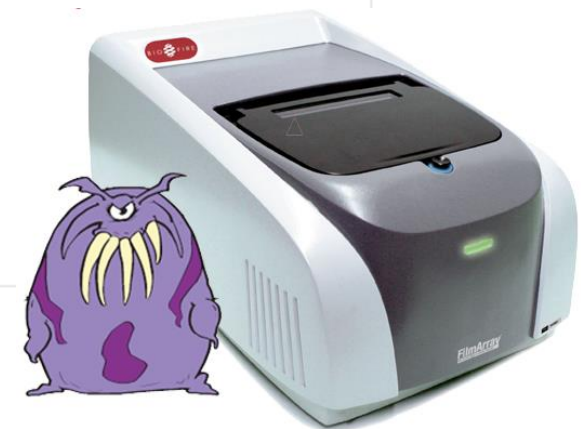
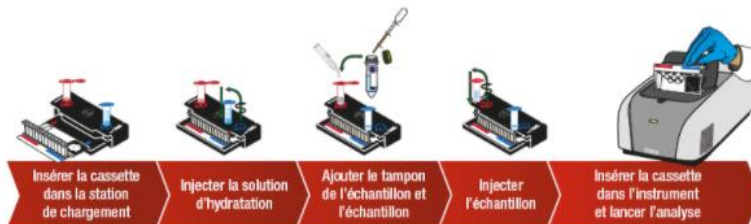
Histoire

Mon malade va très mal, j'ai besoin de quelque chose qui me donne une orientation rapide

Appel du labo pour réaliser une PCR multiplex sur le LCR

Virus	Bactéries	Levure
<ul style="list-style-type: none">● Cytomégalo virus (CMV)● Entérovirus● Virus herpès simplex 1 (HSV-1)● Virus herpès simplex 2 (HSV-2)● Herpès virus humain 6 (HHV-6)● Parécho virus humain● Virus varicelle-zona (VZV)	<ul style="list-style-type: none">● <i>Escherichia coli</i> K1● <i>Haemophilus influenzae</i>● <i>Listeria monocytogenes</i>● <i>Neisseria meningitidis</i>● <i>Streptococcus agalactiae</i>● <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none">● <i>Cryptococcus neoformans / gattii</i>

FilmArray® est facile à utiliser.
Insérez l'échantillon, obtenez les résultats.



<https://jcm.asm.org/content/jcm/54/9/2251.full.pdf>

Un petit mot sur les seuils de détection (peu de données...)

Table 2
Comparison of sensitivity between culture and FilmArray™ ME panel.

Target	Theoretical concentration (CFU/ml)	Culture, visually assessed growth (CFU)	FilmArray™ ME panel
		Result	Result
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (CCUG 33638)	> 1000	> 100	na ¹
	101–1000	21	na
	11–100	2	na
	1–10	0	Detected
<i>Neisseria meningitidis</i> (CCUG 8661)	> 1000	70	na
	101–1000	5	na
	11–100	0	na
	1–10	0	Detected
<i>Listeria monocytogenes</i> (CCUG 15527)	> 1000	> 1000	na
	101–1000	> 100	na
	11–100	50	na
	1–10	8	Detected
<i>Streptococcus agalactiae</i> (CCUG 4208 ^T)	> 1000	> 100	na
	101–1000	18	na
	11–100	3	na
	1–10	0	Detected
<i>Haemophilus influenzae</i> (CCUG 29539)	> 1000	> 100	na
	101–1000	16	na
	11–100	2	na
	1–10	0	Detected
<i>Escherichia coli</i> (CCUG 24 ^T)	> 1000	> 100	na
	101–1000	17	na
	11–100	2	na
	1–10	0	Detected
<i>Cryptococcus neoformans</i> (CCUG 33638 ^T)	> 1000	> 1000	na
	101–1000	100	na
	11–100	9	na
	1–10	0	Detected

Only the lowest concentration was analysed with Film Array™

¹ na = Not Applicable.

A partir de 2 UFC/mL

Pathogen	Dilution	FilmArray	Inhouse
<i>S. pneumoniae</i>	1:10 000	+	+
	1:20 000	+	NA ²
	1:100 000	-	+
<i>N. meningitidis</i>	1:100 000	+	+
	1:200 000	+	NA
	1:1 000 000	- ¹	+
<i>S. agalactiae</i>	1:1000	+	+
	1:10 000	+	+
	1:20 000	+	NA
	1:100 000	-	+
<i>L. monocytogenes</i>	1:10 000	+	+
	1:100 000	+	+
	1:200 000	-	NA
	1:1 000 000	-	+

¹When inspecting the melting curve, very weak signal, but reported negative

²Not applicable, all concentrations were not analysed in the Inhouse PCR

D. Nestor et al. Evaluation of the FilmArray™ Meningitis/Encephalitis panel with focus on bacteria and *Cryptococcus spp*, Journal of Microbiological Methods, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.01.003>.

Un petit mot sur les seuils de détection

- A partir de 2 UFC/mL $\approx 2 \cdot 10^6$ bactéries/mL
 - (Prise d'essai = 200µL ($4 \cdot 10^5$ bactéries))

Pathogen	Dilution	FilmArray	Prise d'essai	Nb bactéries/mL
<i>L. monocytogenes</i>	0,0001	1	2 000 000	200
<i>L. monocytogenes</i>	0,00001	1	2 000 000	20
<i>L. monocytogenes</i>	0,000001	0	2 000 000	1
<i>N. meningitidis</i>	0,00001	1	2 000 000	20
<i>N. meningitidis</i>	0,000005	1	2 000 000	10
<i>N. meningitidis</i>	0,000001	1	2 000 000	1
<i>S. agalactiae</i>	0,001	1	2 000 000	2000
<i>S. agalactiae</i>	0,0001	1	2 000 000	200
<i>S. agalactiae</i>	0,00005	1	2 000 000	100
<i>S. agalactiae</i>	0,00001	0	2 000 000	20
<i>S. pneumoniae</i>	0,0001	1	2 000 000	200
<i>S. pneumoniae</i>	0,00005	1	2 000 000	100
<i>S. pneumoniae</i>	0,00001	0	2 000 000	20

La PCR multiplex rend

- Positive à *Haemophilus influenzae* !
- Qu'en pensez-vous ?

La PCR multiplex rend

- Positive à *Haemophilus influenzae* !
- Qu'en pensez-vous ?
 - Le gold standard c'est la culture !
 - PL hémorragique (augmentation protéinorachie + éléments)
 - Leucocytes < 10 éléments
 - Lactates < 3.2 mmol/L (VPN excellente)

Contamination salivaire lors du prélèvement ou lors de la technique !

Qu'en pensez-vous ?

- Bon réflexe
- Mauvais réflexe

Histoire (2)

Mr X., 38 ans se présente aux urgences pour des céphalées, vertiges et une l'apparition d'une faiblesse progressive du côté droit

- Pas d'antécédents, pas de voyages récents
- Réflexes tendineux exagérés du côté droit
- Absence de fièvre

Imagerie

TDM et IRM → présence d'une lésion une lésion kystique droite évoquant un kyste épidermoïde intracrânien

PEC : Chirurgicale = Craniectomie + exérèse

Histoire (2)

- **Après deux jours, SFU traité sans par Ceftriaxone pour un *E.coli* Pase**
- Evolution favorable → Le patient a été transféré dans le service dans un état stable.
- Après deux jours, fièvre + maux de tête + détérioration de son niveau de conscience.

PL

- Aspect : trouble
- Cellularité :
2 200 éléments / μ L (98% PNN),
1 100 hématies / μ L
- **Protéïnorachie : 4 g/L,**
- **Glycorachie : 1,5 mmol/L ,**
- Examen microscopique : négatif
- **Lactates : 15 mmol/mL**
- Mise en culture

Traitement probabiliste

C3G + Vancomycine

Biological variable	Patients with bacterial meningitis (n = 21)	Patients with aseptic meningitis (n = 54)
Leukocyte count, mean leukocytes/mm ³ (range)	1560 (200–4500)	1511 (180–4200)
Erythrocyte count, mean erythrocytes/mm ³ (range)	2430 (20–8500)	2100 (15–6050)
Glycorrachia, mean mmol/L (range)	1.1 (0–3.8)	1.8 (0–7.3)
Proteinorrachia, mean g/L (range)	4.7 (1.6–1.7)	3.2 (1.2–12.5)

Virginie Zarrouk *et al.* , Evaluation of the Management of Postoperative Aseptic Meningitis, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 44, Issue 12, 15 June 2007, Pages 1555–1559, <https://doi.org/10.1086/518169>

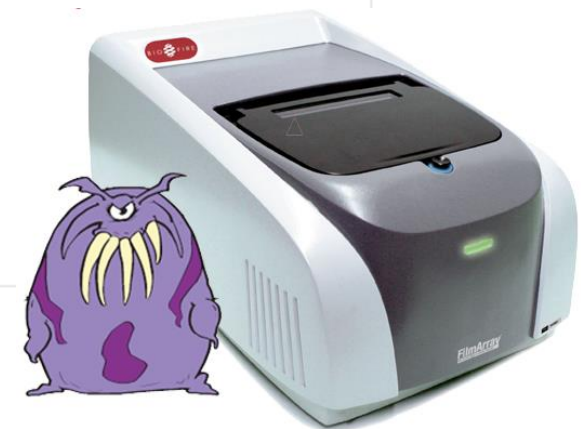
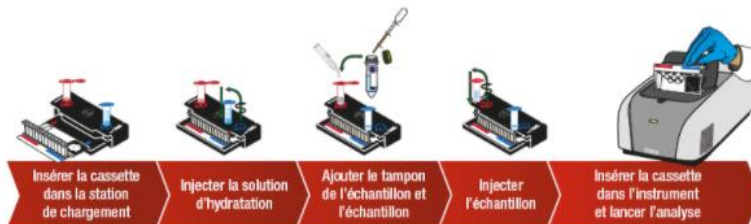
Histoire

Mon malade va très mal, j'ai besoin de quelque chose qui me donne une orientation rapide

Appel du labo pour réaliser une PCR multiplex sur le LCR

Virus	Bactéries	Levure
<ul style="list-style-type: none">● Cytomégalovirus (CMV)● Entérovirus● Virus herpès simplex 1 (HSV-1)● Virus herpès simplex 2 (HSV-2)● Herpèsvirus humain 6 (HHV-6)● Paréchovirus humain● Virus varicelle-zona (VZV)	<ul style="list-style-type: none">● <i>Escherichia coli</i> K1● <i>Haemophilus influenzae</i>● <i>Listeria monocytogenes</i>● <i>Neisseria meningitidis</i>● <i>Streptococcus agalactiae</i>● <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none">● <i>Cryptococcus neoformans</i> / <i>gattii</i>

FilmArray® est facile à utiliser.
Insérez l'échantillon, obtenez les résultats.



<https://jcm.asm.org/content/jcm/54/9/2251.full.pdf>

Qu'en pensez-vous ?

- Bon réflexe
- Mauvais réflexe

PCR multiplex

Biological findings in CSF samples from patients with bacterial or aseptic postoperative meningitis.

TABLE 3 Performance summary and characteristics of the FilmArray ME Panel versus those of the comparator assays^a

Analyte	Sensitivity/PPA ^b			Specificity/NPA ^b		
	TP/(TP + FN) ^c	%	95% CI	TN/(TN + FP) ^c	%	95% CI
Bacteria						
<i>E. coli</i> K1	2/2	100	34.2–100	1,557/1,558	99.9	99.6–100
<i>H. influenzae</i>	1/1	100		1,558/1,559	99.9	99.6–100
<i>L. monocytogenes</i>	0/0			1,560/1,560	100	99.8–100
<i>N. meningitidis</i>	0/0			1,560/1,560	100	99.8–100
<i>S. agalactiae</i>	0/1	0.0		1,558/1,559	99.9	99.6–100
<i>S. pneumoniae</i>	4/4	100	51.0–100	1,544/1,556	99.2	98.7–99.6

Leber AL *et al.*, Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. J Clin Microbiol. 2016 Sep;54(9):2251-61. doi: 10.1128/JCM.00730-16.

Bacterial isolate species	No. (%) of isolates (n = 21)
Staphylococci	8 (38)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5
Coagulase-negative staphylococci	3
Bacterial isolates from endogeneous upper respiratory origin	6 (29)
<i>Haemophilus influenzae</i>	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
Other <i>Streptococcus</i> species	2
Gram-negative bacilli	7 (33)
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Morganella morganii</i>	1
Unidentified ^a	1

^a Positive direct examination results and negative culture results.

Virginie Zarrouk *et al.*, Evaluation of the Management of Postoperative Aseptic Meningitis, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 44, Issue 12, 15 June 2007, Pages 1555–1559, <https://doi.org/10.1086/518169>

Panel adapté pour les méningites communautaires !

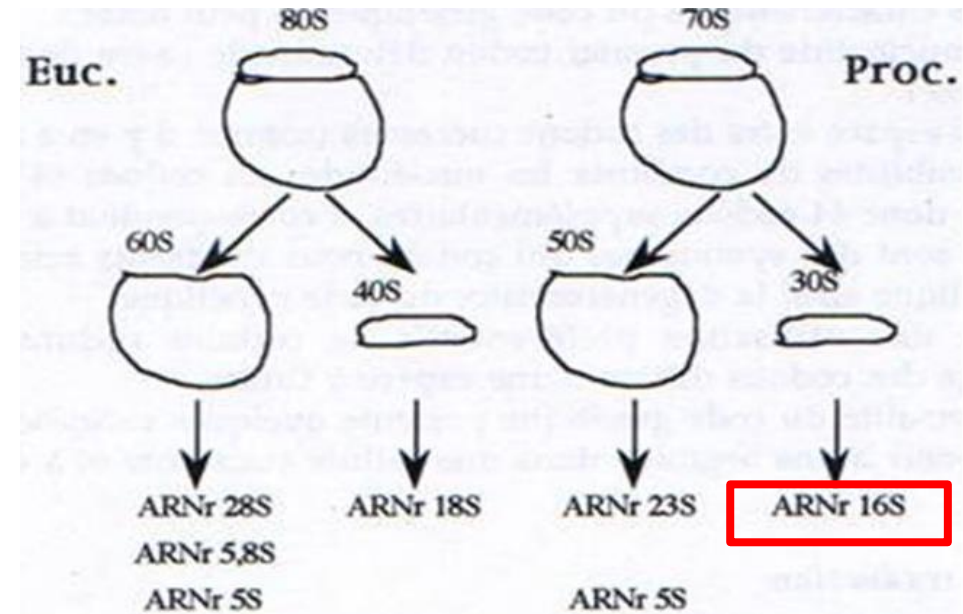
72h plus tard...

- Amélioration de l'état clinique du patient
- Recherche bactéries : cultures négatives
- **Demande PCR ADNr 16S**

Tableau 1. Comparaison entre la PCR spécifique et la PCR à large spectre

	PCR spécifique	PCR à large spectre
Amorces	Spécifiques, ciblant un gène présent que dans une espèce ou ciblant un gène très variable	Universelles, ciblant un gène conservé et commun
Technologie ^a	PCR en temps réel (TaqMan par exemple)	PCR traditionnelle ^b (visualisation des amplicons sur gel d'agarose et séquençage en cas de positivité)
Indications	<ul style="list-style-type: none">- Infection probable à un germe déterminé (par exemple : <i>Mycoplasma pneumoniae</i>)- Echec des autres approches diagnostiques (cultures négatives)- Traitement préalable par un antibiotique	<ul style="list-style-type: none">- Infection à un germe indéterminé- Pas de PCR spécifique disponible pour le germe suspecté- Echec des autres approches diagnostiques (cultures négatives)- Traitement préalable par un antibiotique
Avantages	Rapide, sensible, spécifique	Large spectre de pathogènes détectés
Limites de la méthode	Ne détecte que le pathogène recherché	Ne peut être effectuée que sur un prélèvement physiologiquement stérile
Inconvénients	Spectre étroit	Moins sensible, ^b risque de faux positifs ^c

^a Utilisée dans notre laboratoire ; ^b une nouvelle PCR eubactérienne de sensibilité accrue et utilisant la technologie TaqMan est en développement dans notre laboratoire ; ^c contamination des réactifs commerciaux fréquente avec des bactéries présentes dans l'eau (*Aeromonas*, *Sphingomonas*, etc.)
PCR : amplification des acides nucléiques.



PCR ANDr 16S

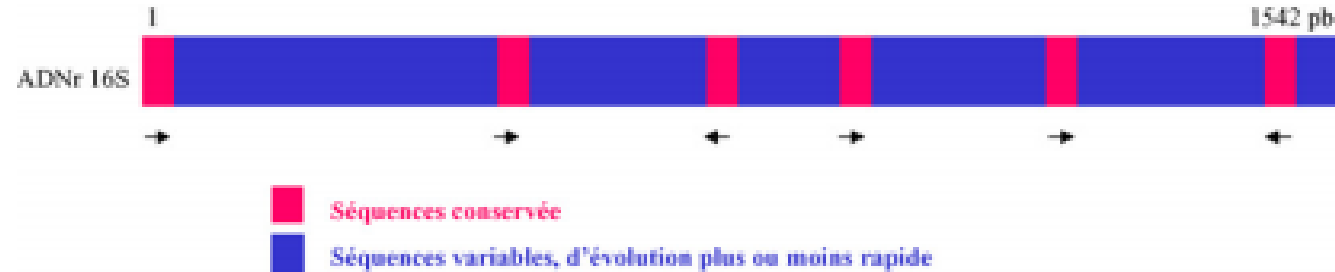


Figure 1 Représentation schématique des alternances de séquences conservées et variables dans les gènes codant pour l'ARN 16S. Les amorces universelles, permettant d'amplifier les gènes codant pour l'ARN 16S de quasiment toutes les bactéries, doivent être localisées dans les régions conservées (indiquées en rouge). Le séquençage du fragment amplifié (indiqué en bleu) est spécifique d'espèce, le plus souvent.

- Amplification des gènes de l'*ADNr 16S*
- Comparaison des séquences amplifiées avec les données de base de séquence (exemple BiBI Database, Ribosomal Database Project...)
- **Homologie de séquence ADNr 16S >98%**

Qu'en pensez-vous ?

- Bon réflexe
- Mauvais réflexe

Indications et performances PCR ANDr 16S

- **Forte suspicion clinique et biologique d'infection** (+/- imagerie)
 - Si patient sous ATBthérapie préalable au recueil de l'échantillon
 - Si patient sans ATBthérapie préalable et cultures négatives des échantillons recueillis
 - Attention aux infections polymicrobiennes
- Biopsies, échantillons de tissus et liquides d'aspiration provenant de **sites normalement stériles**
- **Discussion microbiologiste/clinicien**
- 0,1% du total des échantillons et taux de positivité de 17%

Table 1.

Broad-Range 16S rRNA Gene PCR Compared With Conventional Culture

		Culture	
		+	-
PCR	+	86 (21.8%)	18 (4.6%)
	-	19 (4.8%)	271 (68.8%)

- **90% de concordance** sur 394 échantillons
- provenant de sites normalement stériles
- **5% de discordance** (PCR + culture - et vice versa)

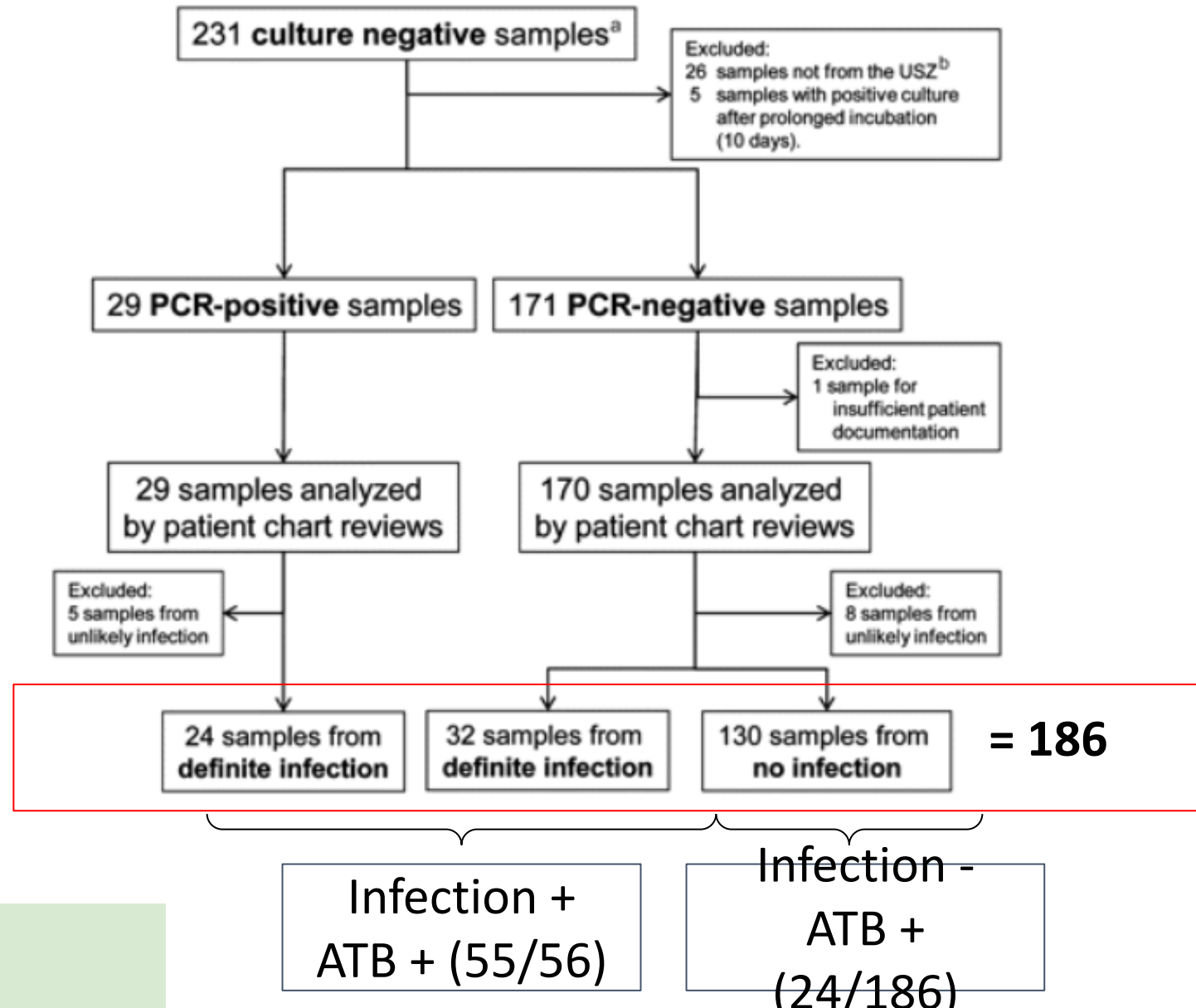
Indications et performances PCR PCR ANDr 16S

Patients culture négative (n=186) :

- Sensibilité : 42.9 %
- VPP : 100 %
- Spécificité : 100 %
- VPN : 80.2 %

Patients sous ATB (n = 55+24 = 79) :

- Sensibilité : 43,6 %
- VPP : 100 %
- Spécificité : 100 %
- **VPN : 43,6 %**



Mauvaise sensibilité et VPN

Indications et performances PCR PCR ANDr 16S

- 86 cas de méningite nosocomiale

TABLE 3. Summary of PCR and culture correlation ^a			
	Positive	Negative	
PCR (+)	18/86	43/86	VPP = 100 %
PCR (-)	0/86	24/86	VPN = 28%
	Sensibilité = 43 %	Spécificité = 100%	

Jason T. Banks, M.D. et al., Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection of Cerebrospinal Fluid Shunt or Ventriculostomy Infections, *Neurosurgery*, Volume 57, Issue 6, December 2005, Pages 1237–1243, <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000186038.98817.72>

Attention, ces méthodes dépendent de la méthode utilisée (extraction, qualité de l'ADN...)

5 jours après...

Résultats de la PCR ADNr 16S :

- présence d'ADN de *S. aureus*

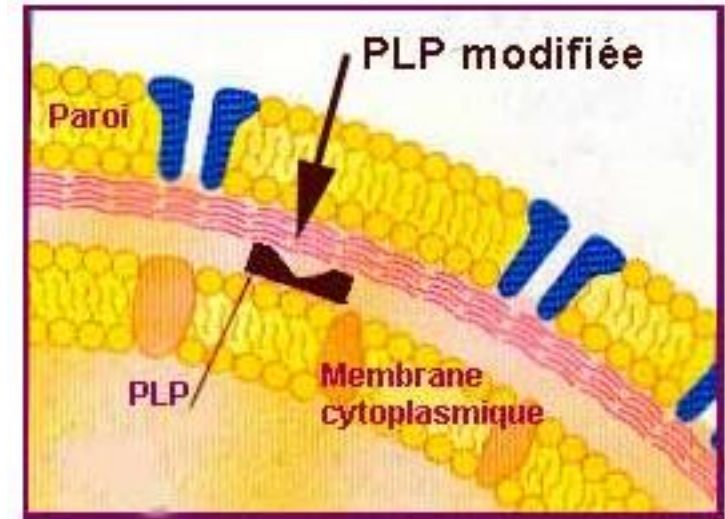
Résultats de la culture

- culture positive à *S. aureus*

Un SARM, c'est quoi ?

S.aureus Résistant à la Méricilline

- Test immunochromatographique
 - Technique moléculaire
- détection des SARM au laboratoire

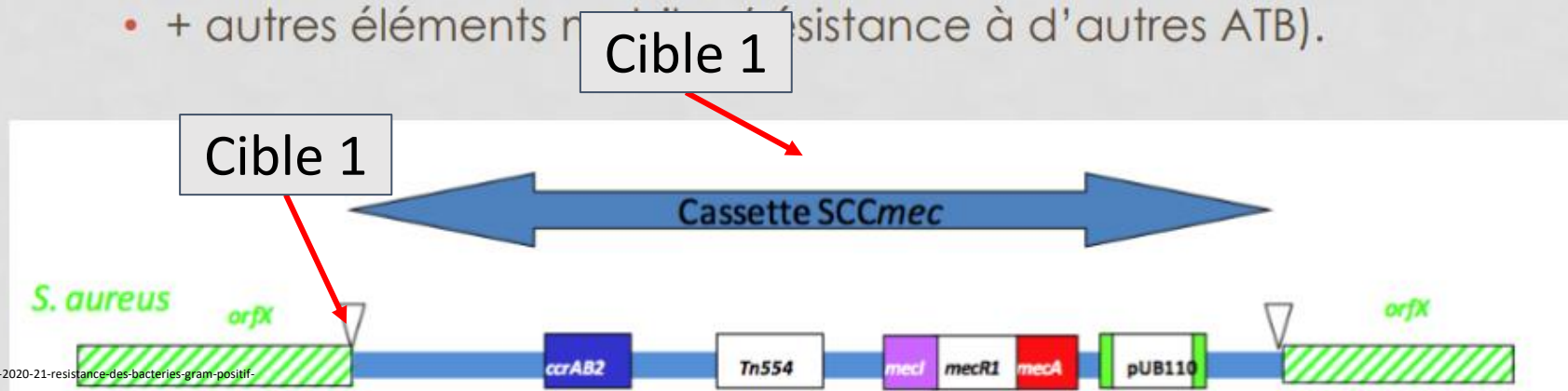


<http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio3.html>

SARM → acquisition du gène *mecA* qui code pour une PLP2a de faible affinité pour la plupart des β -lactamines

COMPOSITION DE LA CASSETTE

- La cassette SCCmec comporte deux éléments essentiels :
 - le complexe du gène *mecA* ou *mecC*
 - gène *mecA* (*mecC*) et gènes régulateurs *mecI* et *mecR1*
 - 5 classes (A, B, C1, C2, E) décrites chez *S. aureus*
 - le complexe de gènes codant des recombinaisons *ccr* (cassette chromosome recombinaison) qui assurent les phénomènes d'intégration et d'excision de la cassette
 - gènes *ccrA* et *ccrB* codant 2 recombinaisons → mobilité SCCmec
 - 9 types (1 à 9)
- + autres éléments (résistance à d'autres ATB).



Détection des SARM par PCR

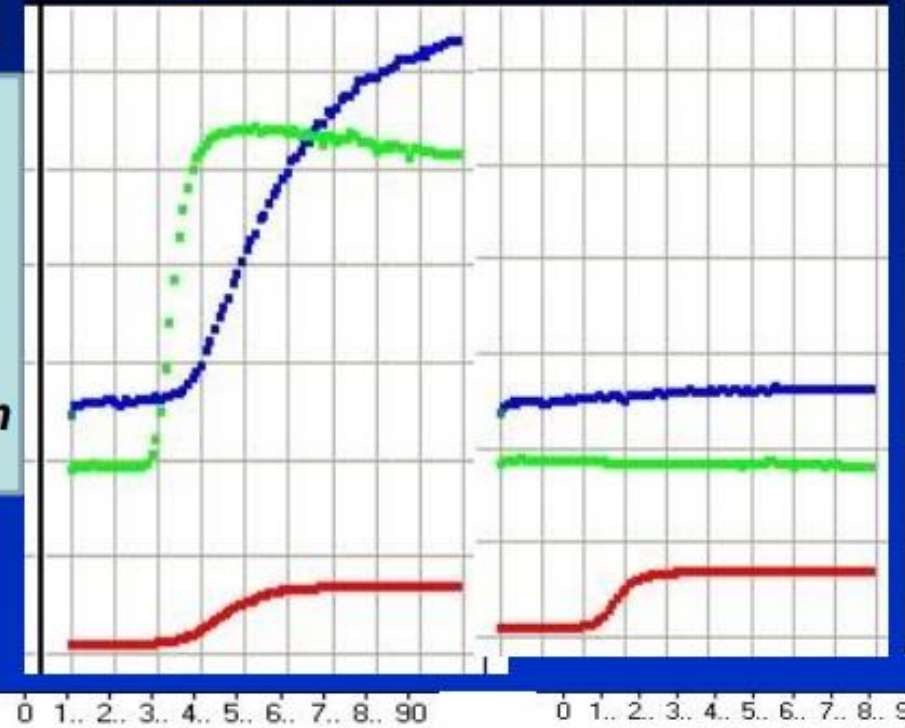


Détection de fluorescence

- 2 — *mecA*
- 1 — jonction
SCCmec cassette
- Contrôle d'inhibition

Echantillon avec
SARM

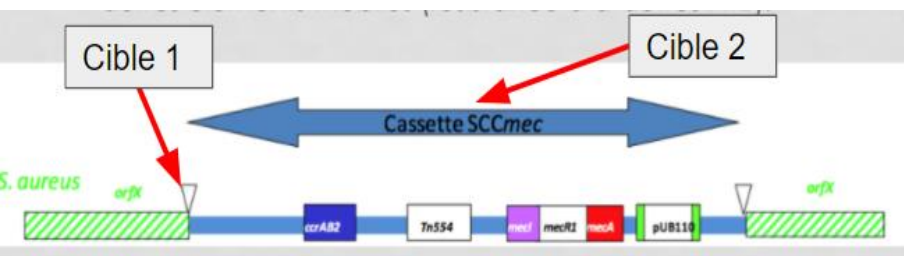
Echantillon avec
SASM



Résultats rendus :

“ SARM Pos ”

“ SARM Neg ”



<https://collegebvh.org/system/files/fichiers/document/fichiers/laurent.pdf>

Take home message

- Dialogue clinico-biologique +++
- La PCR avec les bonnes indications