DIAGNOSTIC DES INFECTIONS RESPIRATOIRES CHEZ LES ENFANTS

De la technique à la clinique

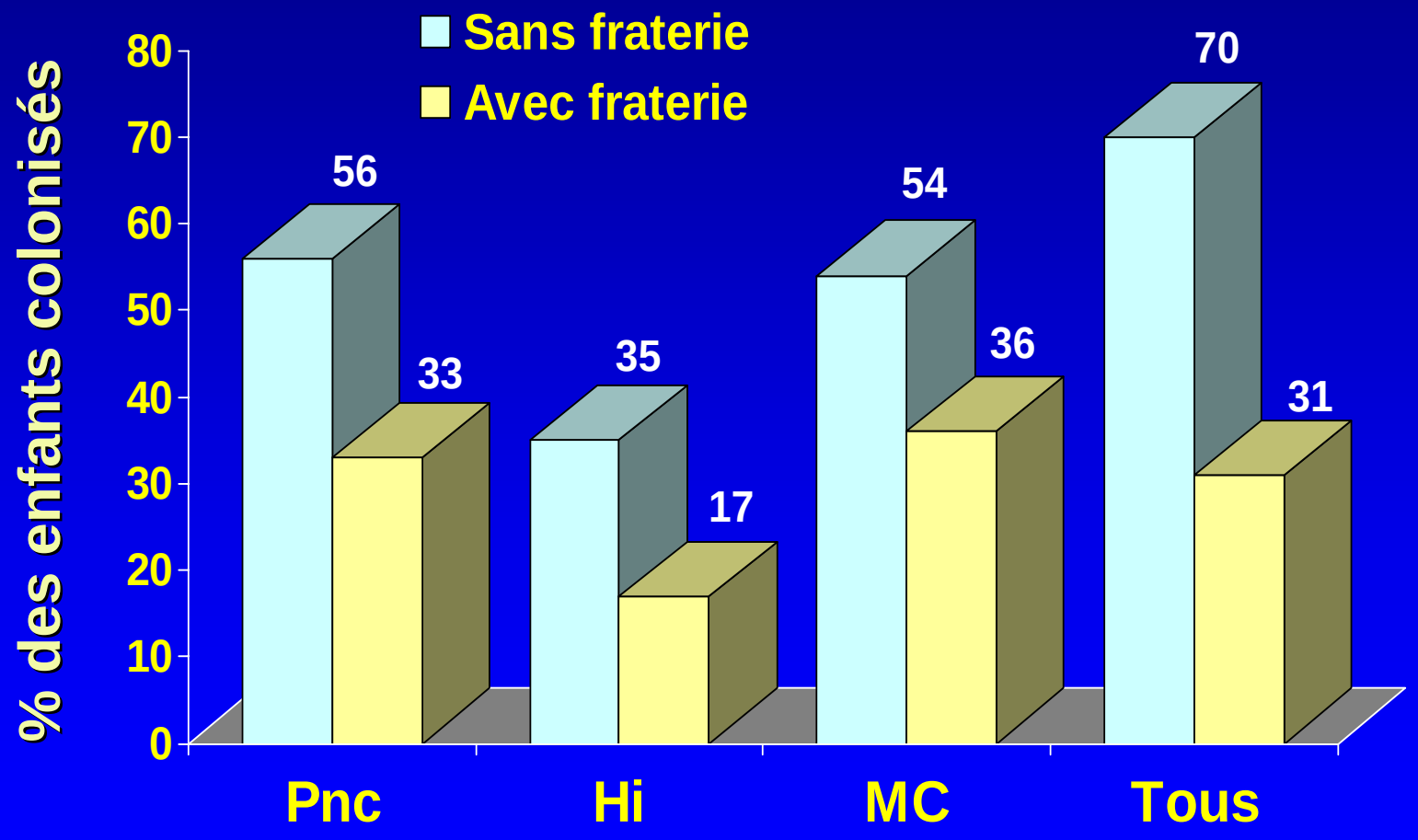
Dr. J-M Senterre
Laboratoire de microbiologie - CDM
CHR de la Citadelle Liège

Voies respiratoires = continuum

- Souvent infection concomitante des V.R.Sup.
- Certains agents pathogènes font parties de la flore de l'oropharynx
- l'arbre respiratoire est théoriquement stérile en dessous du larynx (! Muco)
- Certains agents pathogènes peuvent se retrouver dans les V.R. plusieurs mois après l'infection (Adénovirus, Mycoplasme, Chlamydia)

Portage de pathogènes potentiels chez les enfants de 3 mois à 3 ans

P < 0.001 pour tous



Varon et al, Clin Infect Dis 2000; 31:477 - 81

Diagnostic étiologique

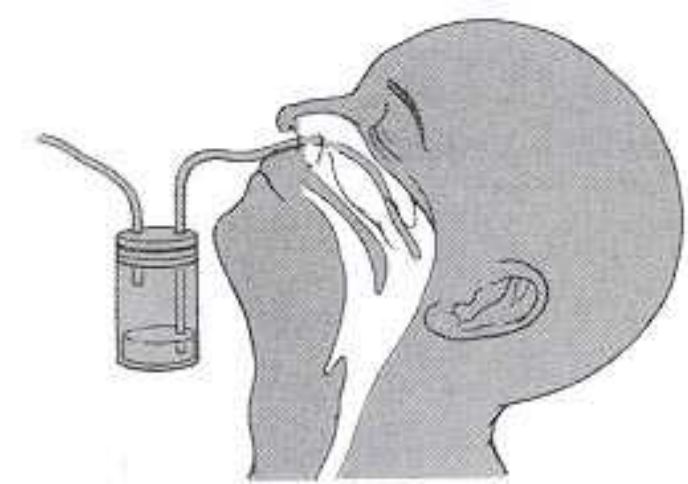
- Clinique Svt non contributive
- Epidémiologie: Prfs
- Biologie générale
  - GBL < ou > 15000 /mm³
  - Lymphocytose
  - CRP < ou > 40mg/dl
  - VS élevée
  - Transaminases

Diagnostic microbiologique

- Importance capitale du prélèvement
  - Choix du site
  - Technique
  - Milieu
  - Acheminement

Techniques de prélèvement

- **Aspiration/lavage naso-pharyngé**
  - Virus (Chlamydia, Mycoplasme, Bordetella)



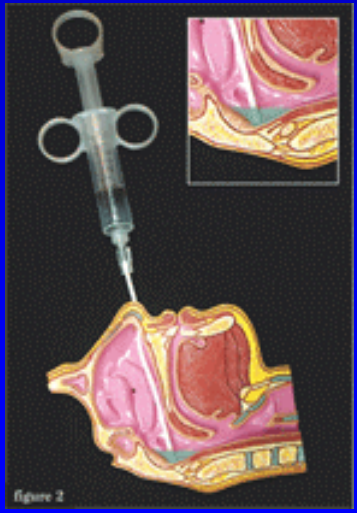


Table 3 Sensitivity and specificity according to clinical setting, mode of sample collection, and place of analyses

Setting	No. of positive samples/ total no. of samples (%)	Sensitivity (positive samples identified)			
		NPA-DK*	NPA-GB*	NS-DK*	NS-GB*
Hospital	19/162 (11.7%)	100% (19)	94.7% (18)	73.7% (14)	73.7% (14)
Health centre	28/213 (13.1%)	100% (28)	92.9% (26)	75.0% (21)	64.3% (18)
Community	37/260 (14.2%)	94.6% (35)	89.2% (33)	67.6% (25)	56.8% (21)
Total	84/635 (13.2%)	97.6% (82) (CI: 91.7–99.7)†	91.7% (77) (CI: 83.6–96.6)†	71.4% (60) (CI: 60.5–80.8)†	63.1% (53) (CI: 51.9–73.4)†
	No. of negative samples	Specificity (negative samples identified)			
		NPA-DK	NPA-GB	NS-DK	NS-GB
Total	551	98.9% (545) (CI: 97.7–99.6)†	98.9% (545) (CI: 97.6–99.6)†	99.5% (548) (CI: 98.4–99.9)†	98.4% (542) (CI: 96.9–99.3)†

* NPA-DK nasopharyngeal aspirate specimens analysed in Denmark; NPA-GB nasopharyngeal aspirate specimens analysed in Guinea-Bissau; NS-DK nasal swab specimens analysed in Denmark; and NS-GB nasal swab specimens analysed in Guinea-Bissau.
† Clopper-Pearson 95% confidence intervals for binomial distribution.

Techniques de prélèvement

- Expectorations
  - Pas -> enfant
  - Rarement post Kiné
- Aspiration endotrachéale / sonde d'intubation
  - Bactéries classiques
  - 80% sensibilité et spécificité

Techniques de prélèvements /...

- Bronchoscopie + biopsies
  - 80% sensibilité et spécificité
  - Brossage protégé ? Cher, efficacité ?
- LBA
  - Chez I.D. et cas difficiles
  - 95% sensibilité et spécificité chez I.D. (culture quantitative, germes Intracellulaires)
- Biopsie pulmonaire
  - 20% faux négatifs, 25% morbidité

Pathogens in CAP*

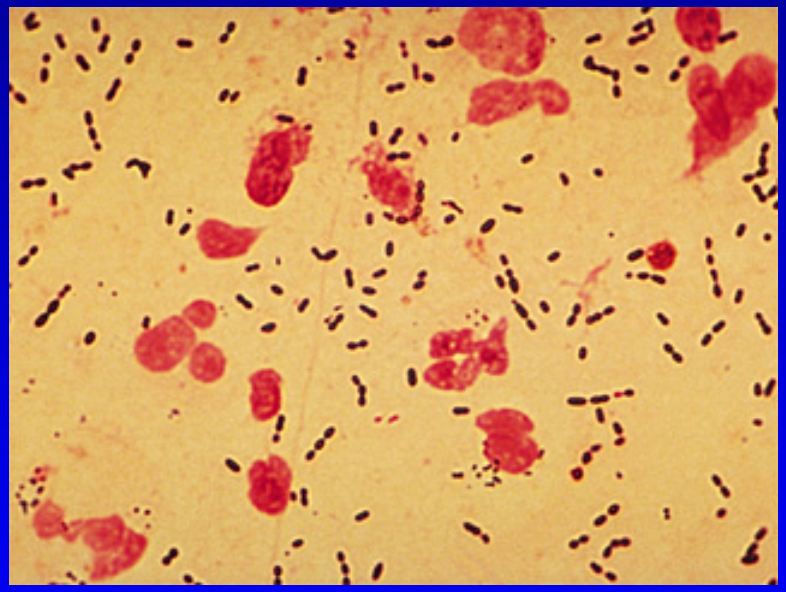
	CAP I	CAP II	CAP III	CAP IV
S. pneumoniae	frequent	frequent	frequent	frequent
M. & C. pneumoniae	?	?	?	?
Respiratory viruses	?	?	?	?
H. influenzae	rare	frequent	frequent	frequent
Aerobic G-neg rods		frequent	frequent	frequent
S. aureus		rare	rare	frequent
L. pneumophila				frequent

*** no etiological agent identified in 50 % of patients**

Les techniques et leurs limites

- Gram
- Tests rapides
- Biologie moléculaire
- Sérologie
- Culture

Le poids du Gram



1844, Hans Christian Gram

Classification of Gram-stained Specimens

Bartlett R.C., 1974, In Medical Microbiology. Wiley J. & Sons, NY

Squamous Cells

Neutro Cells Per LPF	Reported Value	0	1-9	10-24	>25
		0	-1	-2	-3
0	0	0	-1	-2	-3
1-9	1	1+	0	-1	-2
10-24	2	2+	1+	0	-1
>25	3	3+	2+	1+	0

Composite Q Score

Sputum Gram Stain Assessment in Septic CAP

Gleckman R., et al. 1988, J. Clin. Microbiol. 26(5):846-849

- 59 septic patients with valid (>25 WBCs, <10 sec) sputum

  >10 organisms/oil field = significant

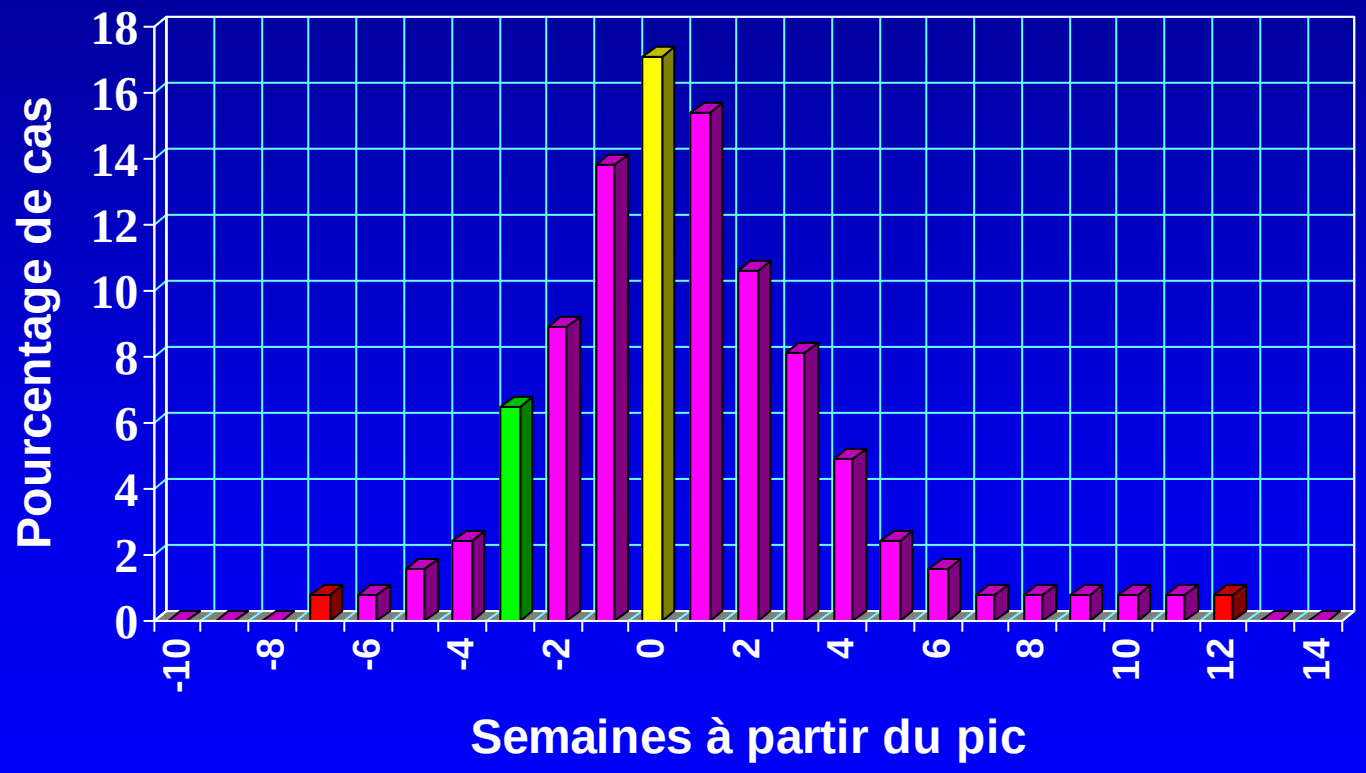
- 12/59 not helpful results in guiding therapy.
- **47/59 Gram-stained sputum precisely predicted the blood culture isolate with sensitivity of 85.1%.**

Tests rapides

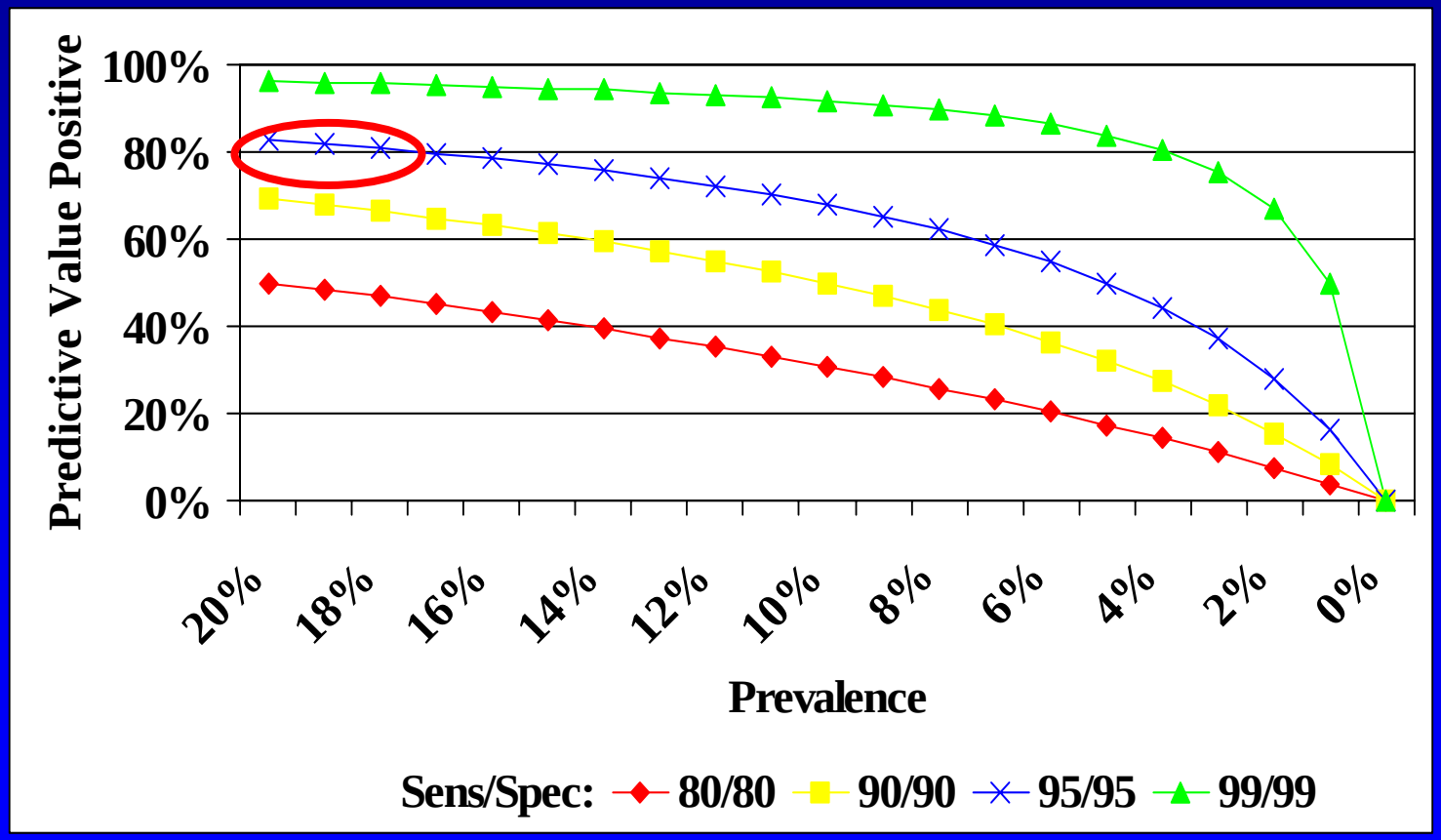
- **Usage approprié si connaissance**
  - des performances du test
  - des caractéristiques épidémiologiques de l'agent infectieux

"testing is as easy as closing a book"

Caractéristiques d'une épidémie virale:
premiers cas - transition - pic – derniers cas



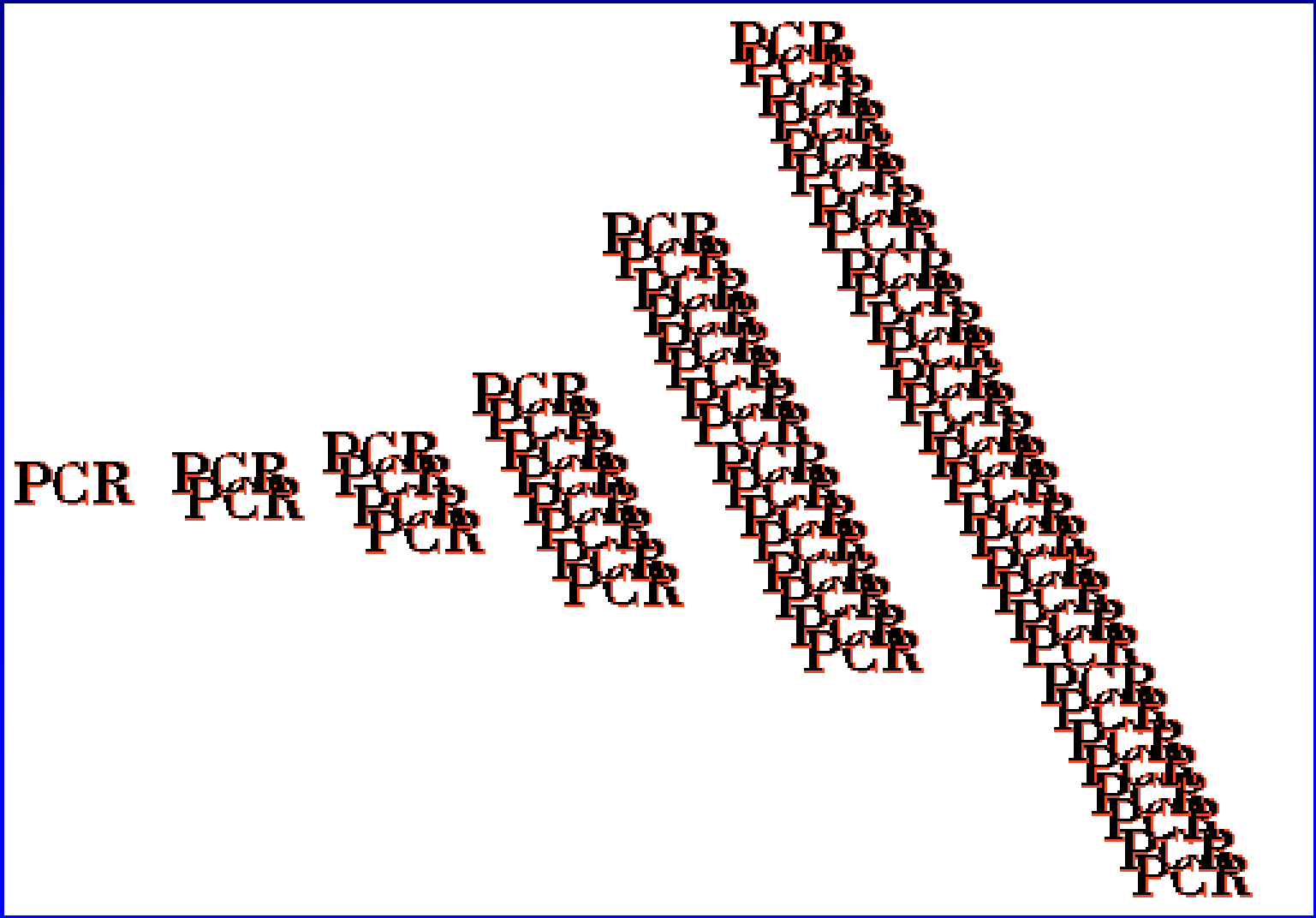
La Valeur Prédictive Positive d'un test dépend de sa spécificité, de sa sensibilité et de la prévalence de la maladie



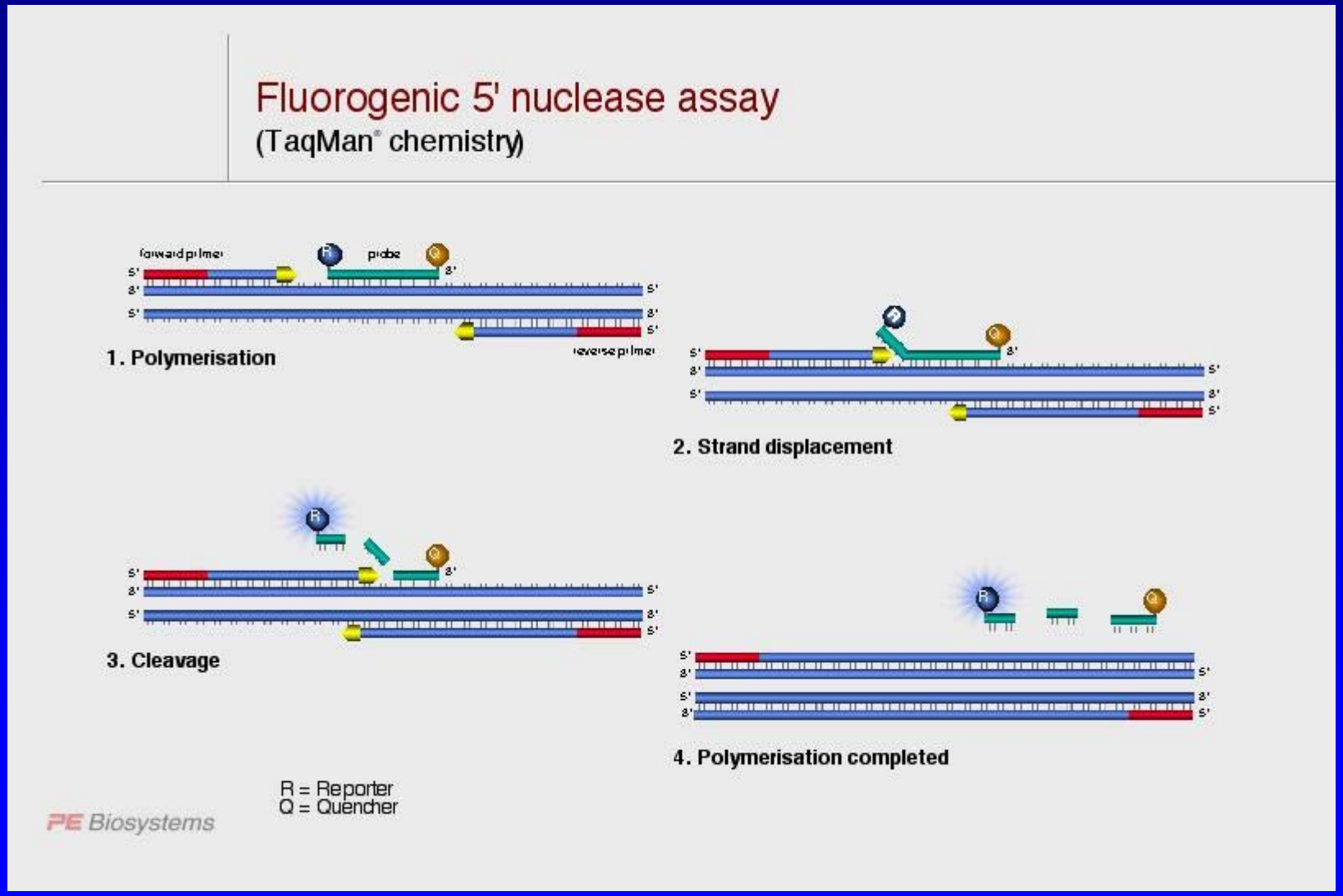
BIOLOGIE MOLECULAIRE ET PATHOLOGIE RESPIRATOIRE

Desert tortoise with severe upper respiratory tract disease (tenacious discharge from the nares).
A PCR was developed to detect nucleotide sequences of the 16s rRNA gene of *Mycoplasma agassizi* in nasal flush

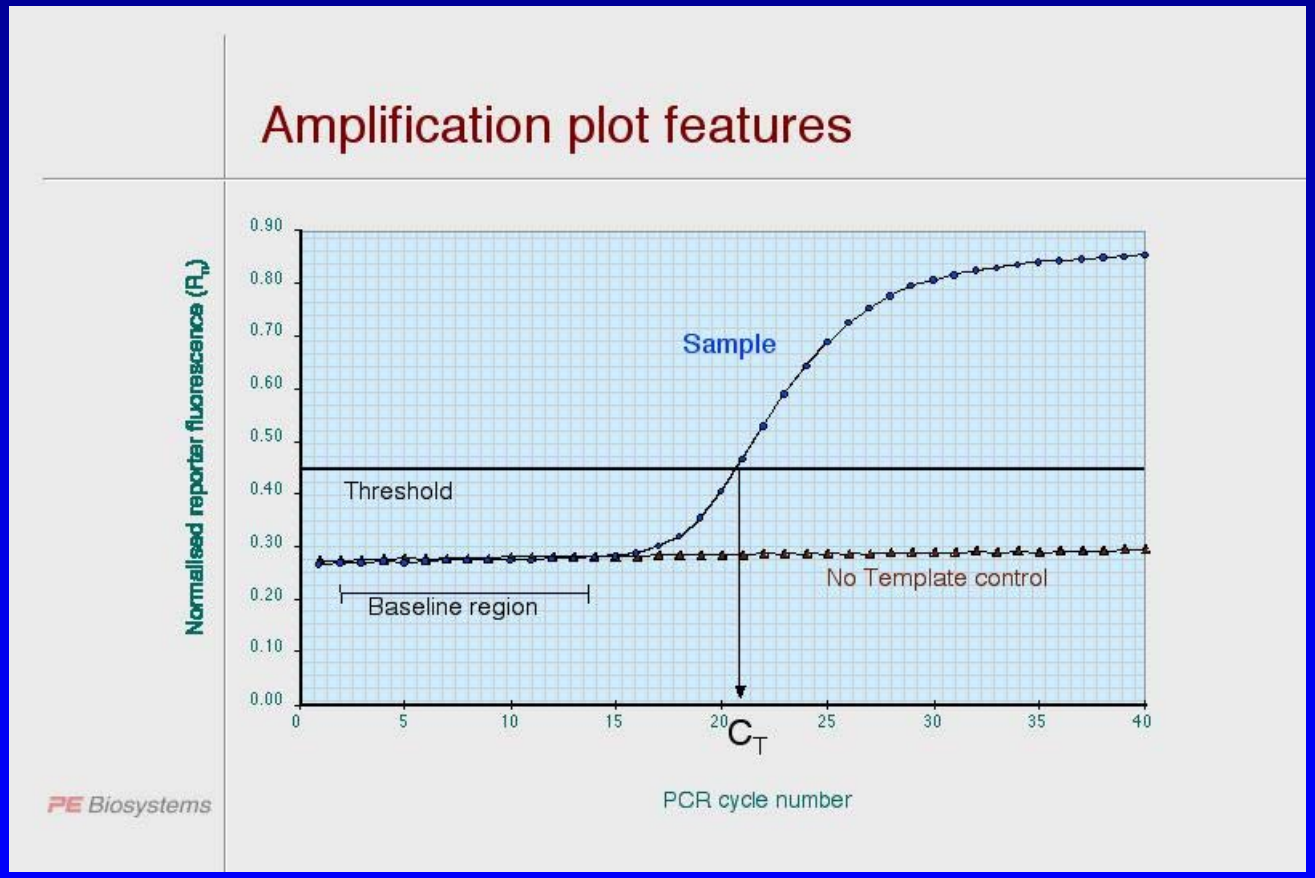
« Retrouver une aiguille dans une botte de foin et en faire une botte d'aiguilles »



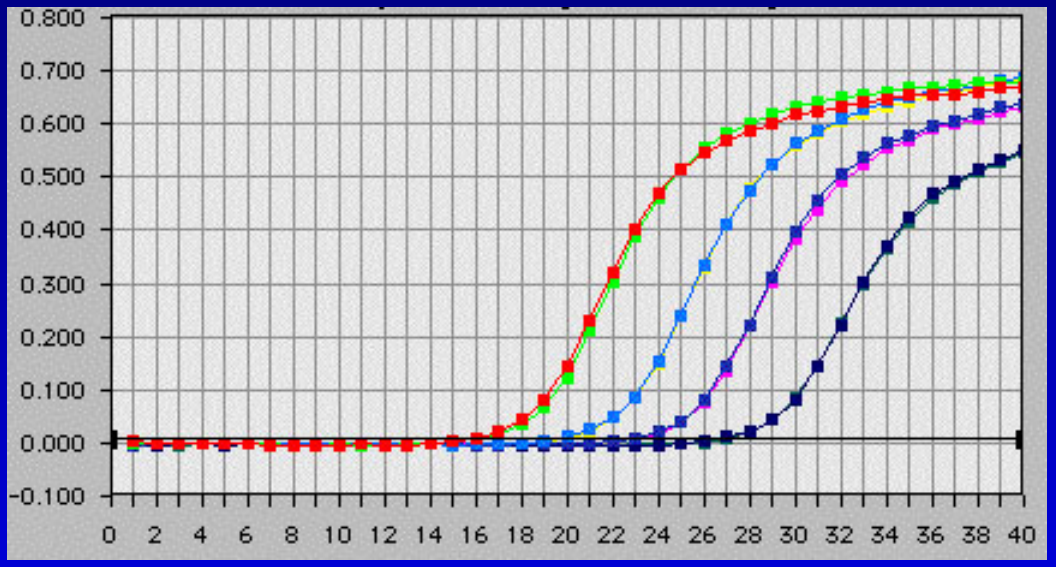
TaqMan

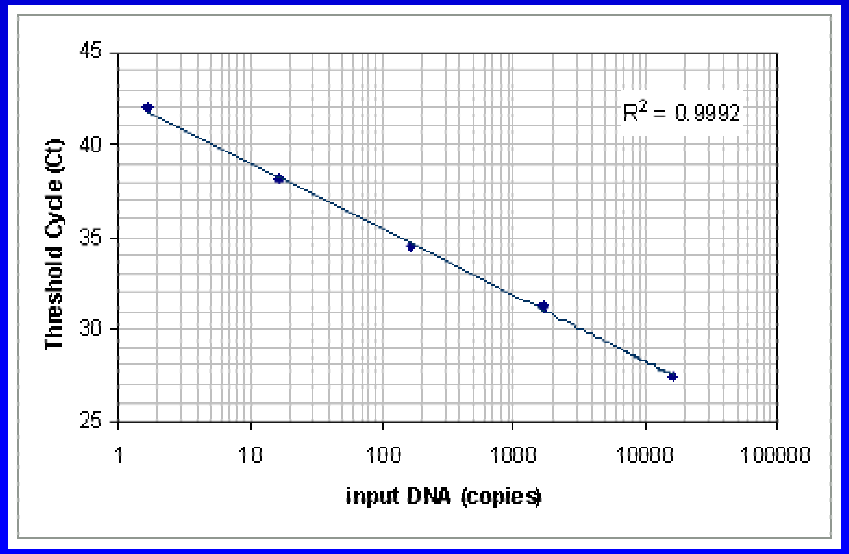

Fluorogenic 5' nuclease assay
(TaqMan® chemistry)
forward primer
probe
reverse primer
1. Polymerisation
2. Strand displacement
3. Cleavage
4. Polymerisation completed
R = Reporter
Q = Quencher
PE Biosystems

Traitement du signal



Traitement du signal





Avantages des RT-PCR

- Rapidité (<2H + extraction)
- Réduction du temps de manipulation
- Reproductibilité
- Réduction risque de contamination (amplification et détection dans le même tube)
- Contrôle de l'inhibition
- Quantification + linéarité
- Même protocole pour tous les tests
- Possibilité de réaliser des tests home-made
- PCR multiplex

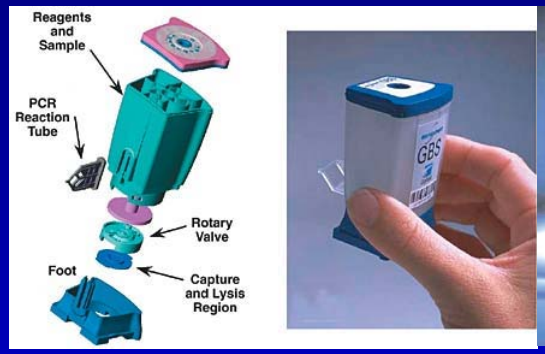
Interprétation des résultats

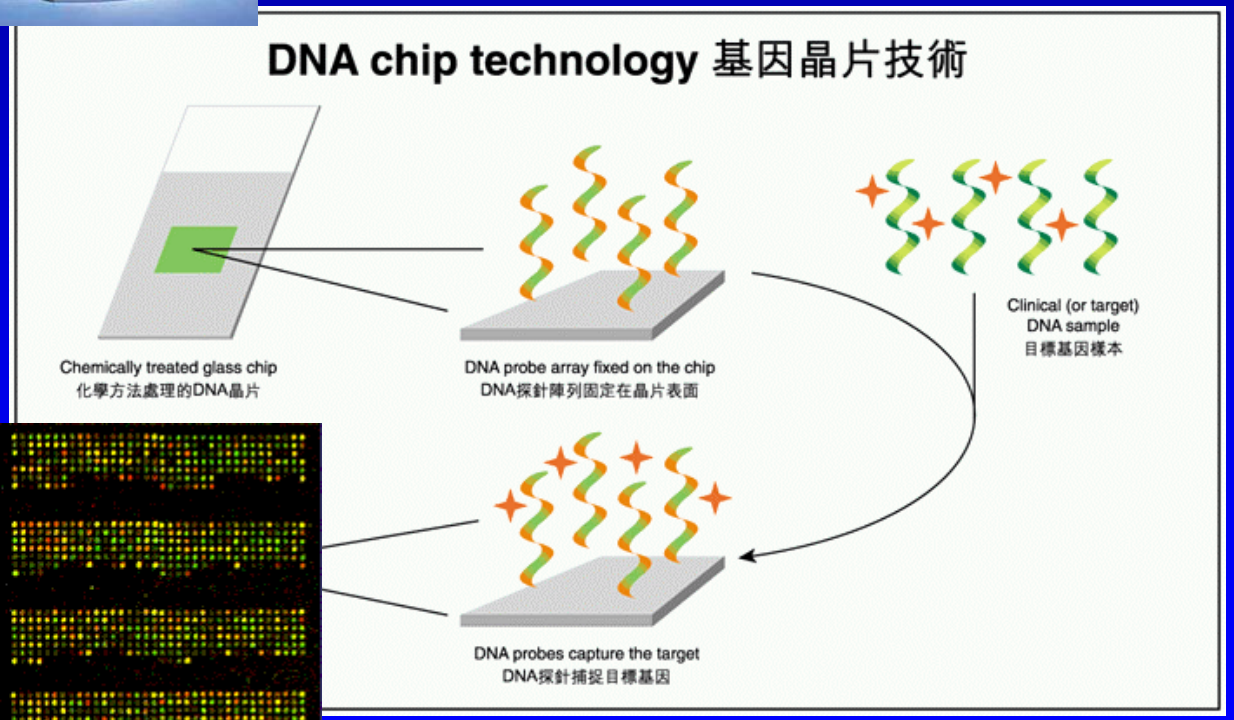
- Toujours
  - Exclure une contamination
  - Exclure une inhibition
  - En fonction des renseignements biologiques et cliniques

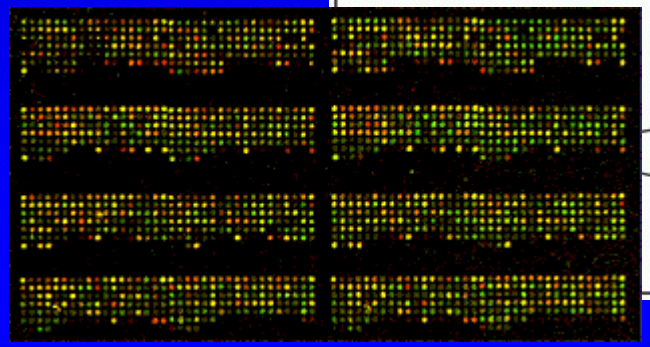
La PCR et ses limites

- Extraction des acides nucléiques
- Sensibilité / spécificité
  - Nombre de copies de départ
  - Inhibition et témoin d'amplification interne
  - Choix de la cible
- Méthode de détection des produits amplifiés
- Temps de réalisation : automatisation
- Standardisation limitée (tests home-made)

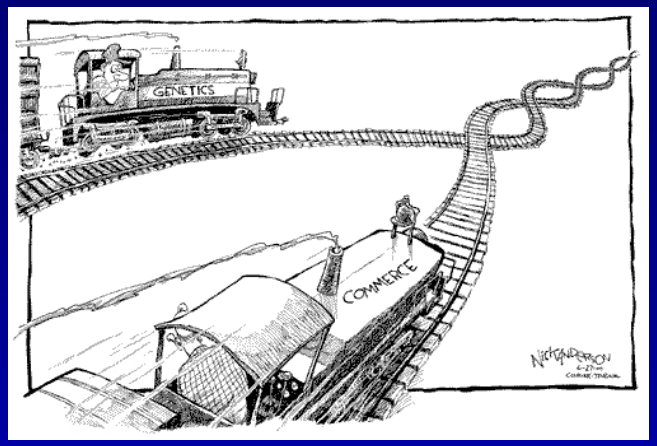
Futur proche…







Coût des analyses



- Très variable
  - Microbiologie (15 à 150 euros / analyse)

En Belgique

- Pas de financement à l'acte hors nomenclature
- Pas de ticket modérateur
- Prise en compte UNIQUEMENT dans les indications proposées par le Comité National pour les Centres de Diagnostic Moléculaire

La case de l'oncle $am

TABLE 7. Reimbursement

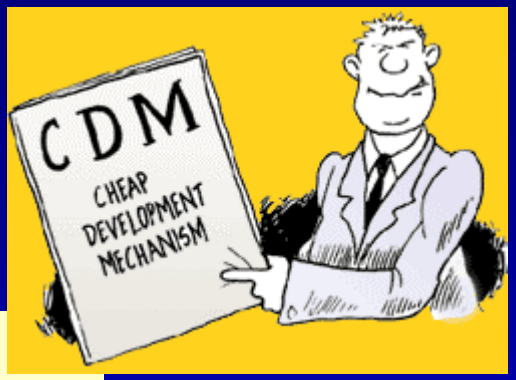
Technique	Organism	CPT code	Medicare reimbursement (U.S. dollars)	2005 Mayo Clinic list price (U.S. dollars)
Amplified probe	CMV	87496	27–49	228
	EBV	87798	27–49	228
	HSV	87529	27–49	228
	VZV	87798	27–49	228
	Enterovirus	87798	27–49	228
	JC and BK virus	87798	27–49	228
	Group A streptococci	87651	27–49	NA[a]
	Bordetella pertussis/Bordetella parapertussis	87801	55–98	271
	Borrelia burgdorferi	87476	27–49	320
	VRE	87798	27–49	271
	Tropheryma whipplei	87798	27–49	321
	Ehrlichia spp.	87798	27–49	222
Quantification	CMV	87497	39–59	307
	EBV	87799	27–59	221

[a] NA, not available through the Mayo Clinic reference laboratory.

CDM
Centre de Diagnostic Moléculaire

- Historique: → A.R. 09/1998
- But: tests → nomenclature biologie clinique
- Définition: centre pluri-disciplinaires
- 1998: Dossiers INAMI sur base de <u>l'activité passée</u>
- 11 CDM et 7 CDM associés => Procès
- < 01/02/2000 18 CDM
- 27 janvier 2005, le Conseil d'Etat rejetait la base légale relative aux CDM et leur financement.

http://webhost.ua.ac.be/cmd



Center for Molecular Diagnostics (CMD)

National Committee for Molecular Biology

Reports of the Meetings of the National Committee for Molecular Biology
(only accessible for members of the National Committee for Molecular Biology)

What

Tests

Working groups

FAQ's

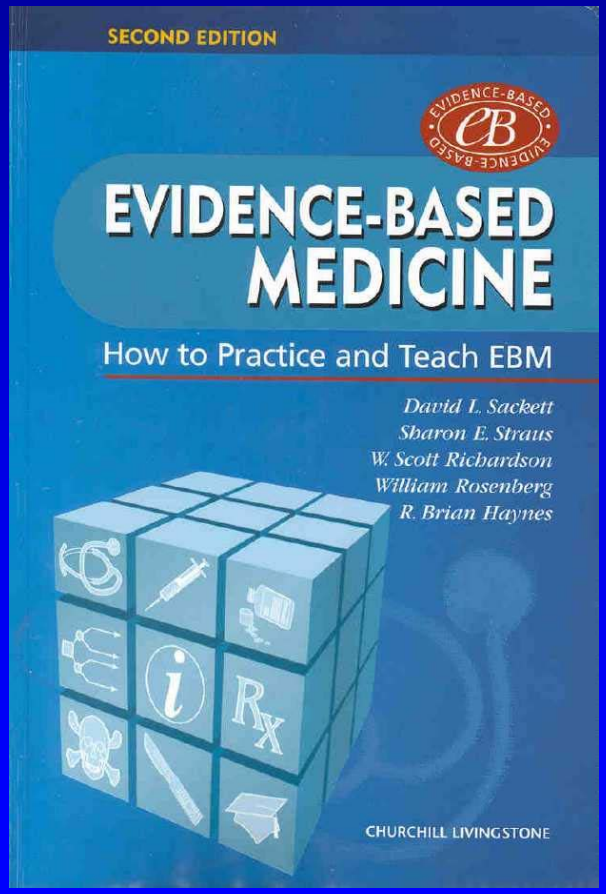
[Homepage] [National Committee] [Reports meetings] [What] [Tests] [Working groups] [FAQ's]

Un exemple à ne pas suivre …

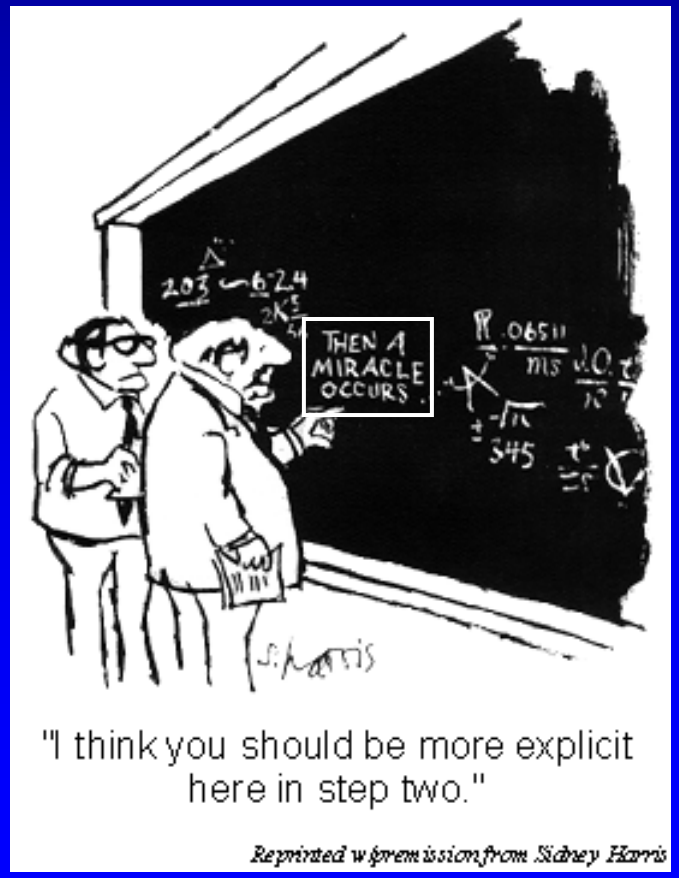
HTA Diagnostic Moléculaire en Belgique. 2005 Octobre. KCE reports 20 B. (D2005/10.273/24)

- Centre Fédéral d'Expertise des Soins de Santé 2005
- Frank Hulstaert (KCE), Michel Huybrechts (KCE), Ann Van Den Bruel (KCE), Irina Cleemput (KCE), Luc Bonneux (KCE), Kris Vernelen (IPH, Bruxelles), Jean-Claude Libeer (IPH, Bruxelles), Dirk Ramaekers (KCE).
- Web : http://www.centredexpertise.fgov.be (226 pages)

La nouvelle Bible



Versus les anciennes pratiques



CDM: C D Mauvais !

- Méthodes maison: 79%
- Dite validée dans 33% des cas seulement
- Procédure seulement pour 60% des méthodes non validées
- Raisons invoquées:
  - performance insuffisante des trousses diagnostiques existantes
  - coût élevé
- Pas rapports d'évaluation sur valeur diagnostique des tests

KCE reports 20 B

- Le nombre de tests de biologie moléculaire croît de plus de 20% par an.
- Le coût total d'une exécution en double: +/- 33€
- La grande variation entre CDM s'explique par les frais de personnel.
- INAMI n'a pas encouru de risque financier grâce à une enveloppe budgétaire fermée.

  (Ouf ! Le but principal est atteint)

Point de vue du KCE

Test	Indication	Niveau d'efficacité diagnostisque	Référence
HCV qualitatif, quantitatif et génotypage	Sélection et suivi du traitement basé sur le peg-interféron	Niveau 6: coût-efficace	Evaluation pilote
Mycobacterium *tuberculosis*	Echantillon positif	Niveau 6: coût-efficace si les tests sont centralisés	Dowdy, 2003[1]
Borrelia *burgdorferi*	Maladie de Lyme	Niveau 2 : sensibilité diagnostique modérée, pas pour le diagnostic primaire	Dumler, 2001[2]
PCR Herpes simplex virus	Méningo-encéphalite	Niveau 1: étude supplémentaire nécessaire	Linde, 1997[3]
PCR Entérovirus	Méningite	Niveau 1: précision analytique insuffisante	Evaluation-pilote

Niveau 1 : l'efficacité technique

Niveau 2 : l'efficacité diagnostique

Niveau 3 : le bénéfice diagnostique

Niveau 4 : l'effet sur la gestion ultérieure du patient

Niveau 5 : l'effet sur le résultat chez le patient (outcome)

Niveau 6 : le rapport coût-efficacité

Recommandations du KCE

- Les tests dont l'utilité clinique n'a pas encore été documentée ne peuvent être exécutés que dans le contexte de protocoles d'étude.
- Les tests moléculaires en microbiologie d'utilité clinique documentée:
  - volume important: nomenclature biologie clinique…

  - volume faible: laboratoires de référence

    Service et vitesse d'exécution garantis.

Quelques exemples de toutes ces PCR inutiles

Bactéries

- Bartonella sp.
- Borrelia sensu lato
- Coryne; diphteriae (Toxi. A/B)
- **Legionella pneumophila**
- **Mycoplasma pneumoniae**

Bordetella pertussis
Chlamydia pneumoniae

Haemophilus influ. b/c
Listeria monocytogenes

- Neisseria meningitidis + Typage B / C (A, W135, Y)
- Pseudomonas aeruginosa
- Staphylocoque doré + Gène mec A
- Streptocoque agalactiae (SBB)
- **Streptocoque pneumoniae**
- Treponema pallidum
- Chlamydia trachomatis* Neisseria gonorrhoeae* Confirmation
- **Mycobactérium tuberculosis***
- ID. Mycobactéries

VIRUS

- CMV qualitatif
- HSV ½
- VZV
- Enterovirus
- HBV qualitatif
- HCV
- Qualitative*
  - quantitative
  - Génotype
- Parvovirus B19
- **Influenza A et B**
- **Adénovirus (A à F) + typage**
- **Métapneumovirus**
- **RSV**

PARASITES
LEVURES /CHAMPIGNONS

- Toxoplasma gondii
- Plasmodium falciparum
  vivax
  malariae
- Trichomonas vaginalis

- Candida albicans, glabrata, tropicalis
  parapsilosis, krusei
- **Aspergillus fumigatus**
- **Pneumocystis jiroveci**

PCR ET PATHOLOGIES RESPIRATOIRES

- Virus
  - VSR, Metapneumovirus, Adenovirus
  - Influenza A et B (Parainfluenza)
  - *Rhinovirus* - *Coronavirus*
- Bactéries « atypiques »
  - Mycoplasma pneumoniae
  - Chlamydia pneumoniae (psittaci)
  - Bordetella pertussis
  - *Legionella*

PCR, un réel intérêt ?

- Pas d'examen microbiologique dans 60% des cas d'infection en milieu hospitalier
- Dans 50% des cas les résultats de microbio ne sont pas utilisés par le prescripteur
- Quand ils le sont c'est dans 50% des cas après 72 heures

Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction

- 105 patients LRTI
- Conventional techniques 52 (49.5%)
  Real-time PCR 80 (76%)
  - viral infections 15 (14.2%) / 59 (56.2%)
  - mixed infections 3 (2.8%) / 28 (26.5%)
- Mixed infection was significantly associated with severe pneumonia (P=.002).
- Human rhinoviruses and coronaviruses, OC43 and 229E, were frequently identified pathogens

Templeton KE, Scheltinga SA Clin Infect Dis. 2005 Aug 1;41(3):345-51

Impact of rapid detection of viral and atypical bacterial pathogens by real-time polymerase chain reaction for patients with lower respiratory tract infection

- 107 patients admitted for antibiotic treatment of LRTI
- randomized controlled trial, nasopharyngeal and oropharyngeal swab
- 55 patients
  - influenza virus (14 patients)
  - Streptococcus pneumoniae (8)
  - coronavirus (6)
  - Staphylococcus aureus (5)
  - rhinoviruses (5).

Oosterheert JJ, van Loon AM, Clin Infect Dis. 2005 Nov 15;41(10):1438-44.

Impact of rapid detection of viral and atypical bacterial pathogens by real-time polymerase chain reaction for patients with lower respiratory tract infection

- Real-time PCR increased the diagnostic yield from 23 cases (21% of patients) to 47 cases (43% of patients),
- Use of real-time PCR results resulted in partial or total cessation of antibiotic treatment for 6 patients (11%)
- overall antibiotic use was comparable in the intervention group and the control group
- real-time PCR increased treatment and diagnostic costs with 318 Euros per patient

Du bon usage des PCR:

- Ses indications tu respecteras
- Leur Coût/bénéfice clinique tu évalueras
- Un prélèvement de qualité tu réaliseras
- Ses limites tu connaîtras
- Avec ton biologiste préféré les résultats tu interpréteras
- Selon tes convictions pour un remboursement tu prieras

Diagnostic des infections respiratoires:

Quels tests en pratique ?

NOW® *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae is the leading cause of community-acquired bacterial pneumonia world-wide.

- Antigen is found in the cell wall (C-polysaccharide) of all 90 Serogroups within the species.
- Bacteria present in the lung die and pass into blood stream. Antigen is processed by the kidneys and excreted into the urine.

NOW® *S.pneumoniae* Comparative Performance

Methods	Sample Type	Sensitivity	Specificity	Time
Binax NOW®	Urine	86%	94%	15 mins
Blood Culture	Blood	10-30%	>95%	24-48 hrs
Sputum Culture	Sputum	50-60%	50-85%	24-48 hrs
Sputum Gram Stain	Sputum	50-60%	50-85%	15 mins
PCR	Blood	?	?	4 heures

DIAGNOSTIC VALUE OF URINARY ANTIGEN TEST FOR PNEUMOCOCCAL PNEUMONIA.

	Sb	Sp	PPV	NPV
Domínguez et al Chest 2001	Overall 80.4% BPP 82% nBPP 78%	97.2%		
Murdoch et al J Clin Microb 2001	BPP 80 % nBPP 52%	100 %		
Marcos et al Eur Resp J 2003	BPP 100% nBPP 70%	90 %		
Gutiérrez et al Clin Infect Dis 2003	Overall 70.4 % BPP 77% nBPP 64%	89.7 %	54 %	95%
Butler et al J Infect Dis 2003	Overall 77%	71 %	37%	81 %
Burel et al Eur J Clin Microb 2001	Overall 82 %	77 %	62 %	90 %
Yu et al IDSA 2000	BPP 86 %	90 %		
OVERALL	70-80 %	70-100 %	≈ 50 %	≈ 90 %

BPP: Bacteremic pneumococcal pneumonia
nBPP: nonBacteremic pneumococcal pneumonia
Sb: Sensitivity, Sp: Specificity, PPV: Positive predictive value, NPV: Negative predictive

Rapid Detection of Urinary Streptococcus pneumoniae Antigen (Binax NOW): Does is Help in LRTI Other than Pneumonia?

- 127 patients (age 21-98)
  - 93 cases of pneumonia
  - 27 LRTIs without infiltrates, (AECB, COLD)
  - 7 patients with non-infectious lung disease

- AG + dans 44 cas des pneumonies (47.3%)
  Culture + dans 35 des AG + (74.5%)
- **AG + dans 3 cas des LRTIs + Non inf.**
  Culture + dans 23 cas (67.6%)

Evaluation of Binax NOW Assay for Detection of *Streptococcus pneumoniae* Urinary Antigen among Children with Suspected Pneumococcal Disease

- **Methods:** A total of 134 children with suspected pneumococcal disease (89 pneumonia, 43 fever without source, and 2 meningitis) aged 1-60 months and 139 age-matched healthy controls were prospectively enrolled. Blood samples

Conclusions: Binax NOW assay appears to be useful for excluding pneumococcal infection but not for distinguishing patients with pneumococcal disease from those who were merely colonized.

were nasopharyngeal carriers of pneumococci than for those who were not. This was true for patients with negative blood culture (51.5% vs 9.3%; $p<0.0001$) and for healthy controls (30.2% vs 9.7%; $p=0.009$).

ICAAC 2004 S. ESPOSITO[1], R. COLOMBO [2], P. CARLUCCI [1], N. FAELLI [1], S. BOSIS [1], E. FOSSALI [1], N. PRINCIPI [1];

Diagnostic microbiologique des infections respiratoires virales

- Possible et utile dans les infections basses
- Généralement pas pour Rhino/Coronavirus
- Aspiration (lavage) nasopharyngée
  - ! **PAS D'ECOUVILLON**
    (peu de cellules et souvent écouvillon pour culture bactéries)
- Toujours prélever dès les 1ers symptômes

Virus Recherche directe

- Immunofluorescence directe

VSR, Influenza A/B Parainfluenza 1-3, Adéno.

  - Rapide (1 heure)
  - Bonne visualisation de la qualité du prélèv.
  - Utilisation possible d'un pool d'AC monoclonaux

  - Sensible et spécifique VSR: >90%, Influenza-Para-Adéno 80%
  - ! lecteur entrainé
  - Peu onéreux

Recherche directe

- ELISA rapides sur membrane
  - VSR, Influenza A/B
  - Sensible et spécifique (90%)
  - Pas de notion de la qualité du prélèvement
  - Réactions douteuses assez fréquentes
  - Cher

Recherche directe /...

- ELISA automatisé:VSR (Influ. A)
  - Peu répandu
  - Traitement différé du prélèvement possible
  - Préparation prfs longue de l'échantillon
  - Plus sensible que l'immunofluorescence
  - Cher
- Amplification moléculaire
  - Pas en routine

Rapid EIA and "EIA-Like" Test Comparison: Performance Characteristics*

Test	Sensitivity*	Specificity*	PV-Positive	PV-Negative
Directigen Flu A	91% (A)	95% (A)	Not Stated	Not Stated
Directigen Flu A+B	86% (A) 81% (B)	91% (A) 99.5% (B)	Not Stated	Not Stated
ZstatFlu	58-65% (A/B)	98-100% (A/B)	94-100%	51-90%
FLU OIA	62-88% (A/B)	52-80% (A/B)	Not Stated	Not Stated
QuickVue Influenza	73-81% (A/B)	96-99% (A/B)	92-96%	85-93%
NOW Flu A	78-82%	92-94%	Not Stated	Not Stated
NOW Flu A/B	78-82% (A) 58-71% (B)	92-94% (A) 97% (B)	Not Stated	Not Stated
Xpect Flu A/B	92% (A) 98% (B)	100% (A) 100% (B)	Not Stated	Not Stated

* Per kit insert

Culture de virus

- Sur aspiration (lavage) nasopharyngée
- Sur lignées cellulaires spécifiques (Hep2, MK2,+ MRC5)
- Acheminer rapidement le prélèvement ou le mettre sous glace
- Théoriquement plus sensible que l'examen direct
- Réponse rapide (48 h) ("bijoux") et classique 3 semaines

Evaluation of the Binax NOW RSV, FLU A, and FLU B Rapid Chromatographic Immunoassays

	BD Directigen Assays				Conventional Viral Culture			
	Sens %	Spec %	PPV %	NPV %	Sens %	Spec %	PPV %	NPV %
NOW RSV	93.9	95.0	96.7	90.5	86.4	95.8	88.0	95.2
NOW FLU A	98.4	96.5	96.8	98.2	60.	99.1	90.1	94.8
NOW FLU B	94.0	95.7	94.0	95.7	64.1	99.4	80.6	98.7

Sharon L. Barton and R.L. Hodinka
Departments of Pediatrics, The Children's Hospital of Philadelphia and University of Pennsylvania

Diagnostic de la grippe aviaire

Côte d'Ivoire: danse de la grippe aviaire.
Les danseurs, tout en sautillant, imitent les gestes d'un poulet agonisant, balançant les deux bras en arrière comme pour mimer les ailes du volatile

Metapneumovirus hMPV

- Paramixovirus, 2 génotypes
- Symptômes Cf RSV, dyspnée ++

  Jartti (Finlande) N = 132
  8% des obstructions respi aiguës (10 patients)
  5 bronchiolites, 4 bronchites, 1 asthme
  3 co-infectés
- 50% infections avant l'âge de 1 an
  Tous été en contact à 5 ans,
- Pic épidémique = RSV (D, J, F)
- Culture difficile => RT-PCR et test rapide

Sérologies virales

- Fixation du complément (IgG + IgM)
  - Technique la plus répandue
  - Technique délicate, peu sensible si < 5ans (pas toujours réaction croisée)
  - Pas de seuil de positivité, nécessite 2 prélèvements à 15 jrs d'intervalle
  - Existe pool d'Ag Influenza et Parainfluenza
  - Diagnostic rétrospectif (épidémiologique)

Sérologies virales /...

- ELISA IgA/IgM (IgG)
  - Plus sensible, surtout chez le jeune enfant
  - Diagnostic possible sur un prélèvement
  - Pool d'Ag
  - Automatisable
  - Un peu plus cher
  - Corrélation très moyenne avec la FC

C. M. 2 mois

- 12/02/2005
  Bronchiolite RSV + (test rapide)
  Hospitalisé
- 13/02 matin Pétéchies
- 13/02 soir Décès SI
- 14/02 pm PCR sang +++ meningo. B

Enquète par inspecteur hygiène

Pneumopathies atypiques

- Virus
  - VSR, Metapneumovirus, Adenovirus
  - *Influenza et Parainfluenza*
- Bactéries
  - Mycoplasma pneumoniae
  - Chlamydia pneumoniae (psittaci)
  - Legionella
  - *Coxiella burnetii*
  - *Bordetella pertussis*

Chlamydia pn. Recherche directe

- Gram / culture Non
- Immunofluorescence Non
- Amplification Moléculaire Oui, mais
  - Prélèvement optimal ?
    Aspiration naso-pharyngée, Expectoration / LBA
  - Peu répandu (pas -> psittaci)
  - Non standardisé / Onéreux
  - Porteurs « sains »
  - Faux négatifs

Chlamydia pn. Sérologie

- ! Réponse sérologique différée
  - - IgM 2 à 4 semaines
  - - IgG 6 à 8 semaines
  - - IgA pour réinfection

    => contrôle après 1 mois
- Interprétation difficile

Chlamydia Sérologie…

- MIF IgG/A (M)
  - spécificité espèce / réaction croisée
  - Interprétation ? (IgG > 1/512)
- rLPS IgG/A (M)
  - Spécificité de genre
  - Intérêt controversé
- FC
  - Sensibilité faible
  - Réactions croisées

PCR Chlamydia pneumoniae

! Erreurs de séquence

```
DEFINITION  Pst1 fragment [Chlamydia pneumoniae, Genomic, 474 nt].
Grayston,J.T.

CCATTATTCA  CCGTCGTACA  GCAGAAATCG  TTGTTCATGA  AGGCCTACTC  50
TTTGATCAAG  AGACAATAGA  ACGGATAGAA  CAAGAAGATT  TAGTGGATCT  100
TTTAATGCCT  AACTGTGAAA  TGTATGAAGT  GTTGAAAGGA  CTTCTATCAG  150
ATTACGAAAC  GGCATTACAA  CGGCTAGAAA  TCAATTATAA  GACTGAAGTT  200
GAGCATATTC  GTGAGGGAGA  TGCAGATTTA  GATCATGGTG  TCATTCGCCA  250
AGGTTAAAGT  CTACGTTGCC  TCTAAGAGAA  AACTTCAAGT  TGGAGATAAA  300
! BASE EN TROP
ATGGCTGGAC  GACACGGAAA  TAAAGGTGTT  GTTTCCAAAA  TCGTTCCCGA  350
AGCGGATATG  CCATATCTCT  CTAACGGAGA  AACTGTACAA  ATGATCCCTG  400
AACCCCCCCT  CGG!!TGCCTTC  AAGGATGAAC  CTTGGACAGG  TATTAGAAAC  450
    2 BASES EN TROP   MANQUE 2 G
ACACCGTAGG TTATGCAGCA AAAC                                  474
 UNE BASE G EN TROP
```

Chlamydia pneumoniae PCR

- Prélèvement Aspiration NP, gorge
  Expectoration / LBA
- CHR 01/06/01 - 31/01/02 pédiatrie
  493 prél. 439 patients
  2 positifs (2 et 6 ans) 0.4%

- Prévalence 06/2000 - 03/2001
  0/90 CAP hospitalisés (Anvers)
  0/212 LRTI (Anvers, louvain, hasselt, Charleroi)

PCR et sérologies C. pneumoniae

- Sérologie décevante: Cf ré-infections
- IgA > 160 IgG +/- PCR Pos++
- IgA < 160 IgG +/- PCR Neg/Pos
- IgA < 100 IgG + PCR Neg

IgA résiduelles très fréquentes si > 60 ans

- **Intérêt PCR:**
  - Confirmation sérologie positive en IgA
  - Diagnostic infection récente si consultation précoce

Mycoplasma pneumoniae
Recherche directe

- Gram / culture — Non
- Technique « ELISA » — Non
- Amplification Moléculaire — Oui, mais
  - Prélèvement optimal ?
    Aspiration naso-pharyngée, Expectoration / LBA
  - Peu répandu / Non standardisé / Onéreux
  - Porteurs « sains »
  - Faux négatifs

Sérologie non spécifique

- Recherche d'agglutinines froides (IgM Anti-I)
  - 1/32 = titre significatif
  - Apparition 7 à 10 jrs après infection persistent 2 à 3 mois
  - peu sensible (30 à 60% de positivité)
  - peu spécifiques (Virus groupe Herpes)

  => peu utile

Sérologie spécifique

- ! pas réponse sérologique avant 8 jrs
  => toujours répéter en cas de doute
- Recherche d'IgG, IgM et IgA par différentes techniques (ELISA, Hémaglutination, FC)

Hémaglutination (Ig totales)

- technique la plus répandue
- plus de 90% de spécificité et sensibilité
- titre significatif : > 1/320

PCR et sérologies Mycoplasme

- IgM </= 320 IgG < 50 U/ml PCR Neg / Pf
- IgM > 320 IgG < 50 U/ml PCR Pos++
- IgM > 320 IgG > 50 U/ml PCR Neg / Pf

- + de 10 ans (ré-infection)
  IgM < / > 320 IgG > 50 U/ml PCR Pos++

- **Intérêt PCR:**
  - Confirmation sérologie résiduelle
  - Diagnostic infection récente si consultation précoce

D.T. 8 mois

- 10/06 CRP 0.7 mg/dl
  MP IgM- / IgG 2
  CP IgA- / IgG <64
  Séro virus -
- 11/06 Adeno + / PCR MP +
- 19/06 MP IgM d / IgG 51
  Séro Adeno d

Bordetella pertussis

- PCR spécifique de B. pertussis mais réaction croisée avec B. holmesii (bronchiseptica)
- Echantillon nasopharynx, autres ?
- Sensibilité +++ (> 50 copies / bactérie)
- Toujours avec culture en parallèle sur milieu de transport spéciaux (pol. pédiatrie)

- VUB
  N = 188

39%	PCR + culture +
49%	**PCR + culture -**
12%	PCR - culture +

C. R. 2 mois

- Transfert SI 20/01/2005
- Diag. Présumé: Coqueluche
- 20/01 pm
  PCR Bordetella pertussis +++
  Adenovirus groupe C ++
- 21/01
  - Décès
  - Enquète par inspecteur hygiène

Recommendations prescription des PCR

- **Infections Respiratoires:** *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Legionella* *Bordetella*
  - Maximum 2
  - ne pas cumuler Bordetella avec d'autres demandes

Coxiella burnetii

- Zoonose
- Contamination respiratoire
- Début brutal, svt + hépatite, pharyngite
- Evolution chronique possible
- Diagnostic: sérologie
  - ! après 15 jrs et prfs positive +sieurs années
  - IFI IgM (IgG) > 1/20
  - FC (Ag phase 2) > 1/64

    Sens. >90% après 1 mois

    très bonne spécificité

PCR Pneumocoque
Haemophilus influenzae b/c
Staphylocoque doré
+ Gène mec A (MRSA)
Pseudomonas aeruginosa

- LBA ?
- DNA circulant si infection profonde (sérum)
- Sur liquide pleural ?

Z. C. 2 ans

- 14/02/2005 Bronchopneumonie
- 14/02 pm PCR 1+ Chlam. Pneumoniae
- 15/02 Empyème - thoracotomie
- 16/02 PCR Strepto. Pneumoniae +++
  PCR Chlam. Pneumoniae neg.

Jamais eu de culture positive pour S. pneumoniae

Grand-mère: SI depuis le 02/02 Culture pneumo +

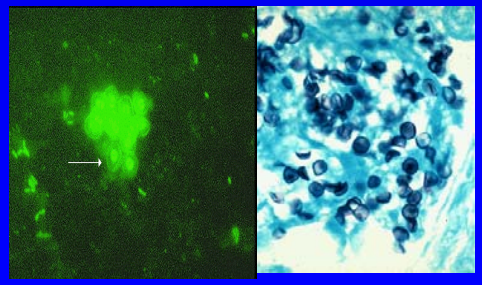
Mère: CAP + empyème 18/02
Culture pneumo neg
PCR +++ sur liquide pleural

Immunodéprimés: PCR

Prélèvement LBA

Interprétation clinique parfois difficile

- **CMV HSV ½ VZV**
- **Toxo. gondii**
- **Aspergillus fumigatus (+ AG)**
- **Pneumocystis jiroveci (carinii)**
  ! Colonisation
  => quantifier



Legionella pneumophila

- L. pneumophila = 95% infections

44%	ID (3/4 = nosoc.)
24%	autres pathologies
32%	« sains » (3/4 = voyage)

Sensitivity of Urinary Antigen Test Associated With Clinical Severity in a Large Outbreak of Legionella Pneumonia in Murcia, Spain

- 325 patients
- Biotest "Legionella" urinary antigen EIA
- Sensibilité 51%
  - Pneumonie peu sévère 43%
  - Pneumonie sévère 90%

ICAAC 2004 M. BLÁZQUEZ, F. J. ESPINOSA, C. GUERRERO, L. ALEMANY, C. GARCIA-ORENES, M. SEGOVIA

An Outbreak of Community-Acquired *Legionella pneumophila* Pneumonia. Usefulness of Different Laboratory Test for Diagnosis

- Results: Diagnosis of LP disease was definitive in 113 patients (78%), presumptive in 10 (7%) and possible in the remaining 21 patients.
-
- LP urinary antigen was positive in 109/144 **(76%)**
  severe symptoms: 88% vs 65%, $p<0.005$

- sputum culture in 10/20 **(50%)**

- IIF IgG fourfold rise in titer in 22/102 **(22%)**
- IIF IgG $\geq$256 without seroconversion in 23/129 **(18%)**
  Single high IgG ELISA level was observed in 7/40 cases (18%).
- IgM by IIF was positive in 86/135 patients (64%) and was the only positive test in 10 cases. **(!!! Positif très longtemps…)**

ICAAC 2004 L. FORCE[1], G. SAUCA [1], P. BARRUFET [1], F. DE ORY [2], P. RETH [1], D. SALAT [1], J. CAPDEVILA [1]

Legionella pneumophila PCR

- Prélèvement Expectoration / LBA
- Tous les séro-groupes
- Sensibilité PCR 500 copies /ml

Diagnostic Légionellose

Test	Sensibilité	Spécificité	Délai
Ag Urine	52 – 99% L.pneum. S1	97 – 100%	En heures
~~PCR urine~~	73 – 86 %	> 95%	1 jrs
PCR exp.	68 – 100%	> 95%	1 Jrs
Culture	70-80% Ttes espèces	100%	3 – 10 Jrs
Sérologie (2 sérums)	46 – 100%	96 – 99%	50% 15 jrs 90% 30 jrs 100% 60 jrs

Mycobacterium tuberculosis

- Prélèvement tout type
- Sensibilité 50% si ED négatif et culture positive
- Non validé sur prélèvements non respiratoires

Critères de remboursement

- Mycobactérium tuberculosis
  - Echantillon respiratoire dont l'examen direct est positif
  - Culture positive pour une Mycobactérie
  - **Conditions**
  - Pas de traitement pendant plus de 7 jours au moment du prélèvement
  - Pas de traitement durant les 12 derniers mois
  - Maximum 2 fois par an
- Mycobacterium avium
  - Remboursé si test négatif !

Mycobacterium tuberculosis

PCR

		SS	SP	VPP	VPN
Respi	ED+	95,4	90,9	97,7	83,3
	ED-	50,0	99,3	60,0	98,9
Autres*	ED+	100	100	100	100
	ED-	61,5	98,4	53,3	98,4

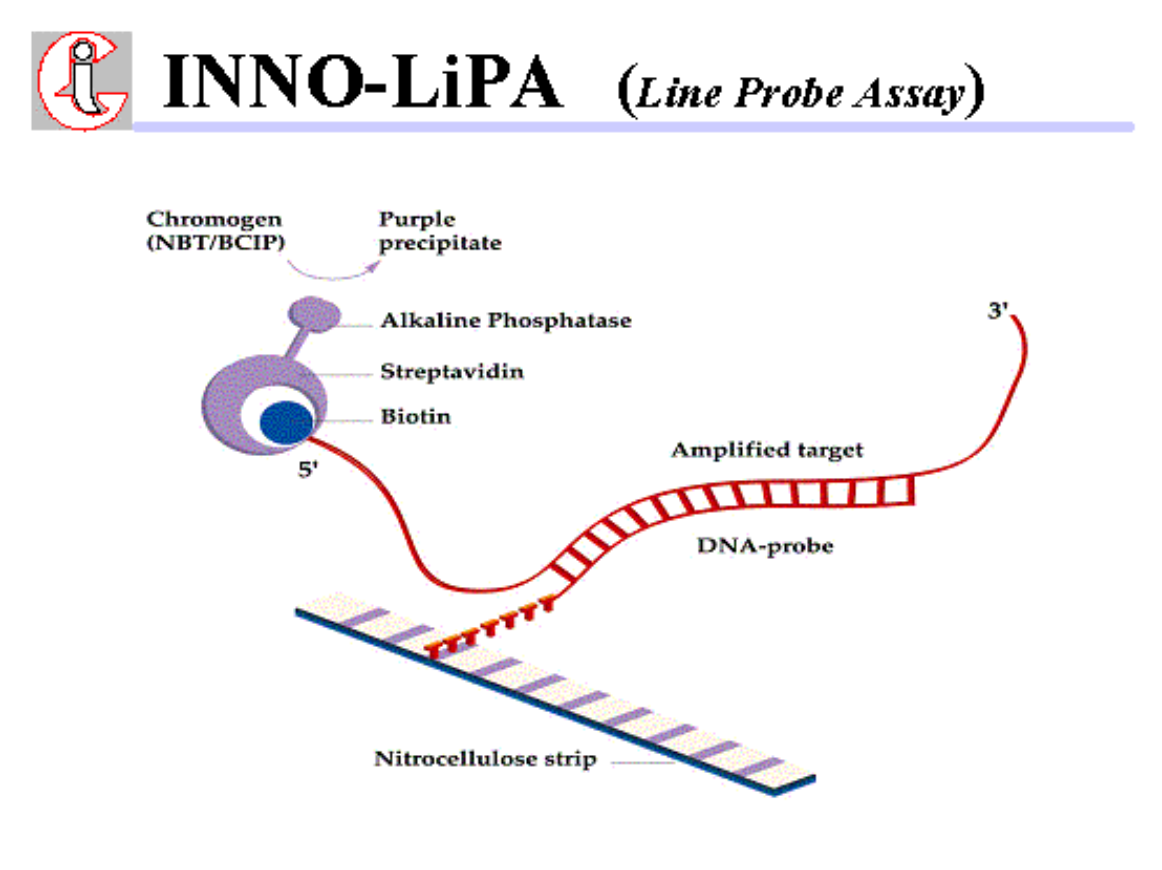
*Non validé sur prélèvements non respiratoires

- Examen direct et culture très peu sensibles chez enfant

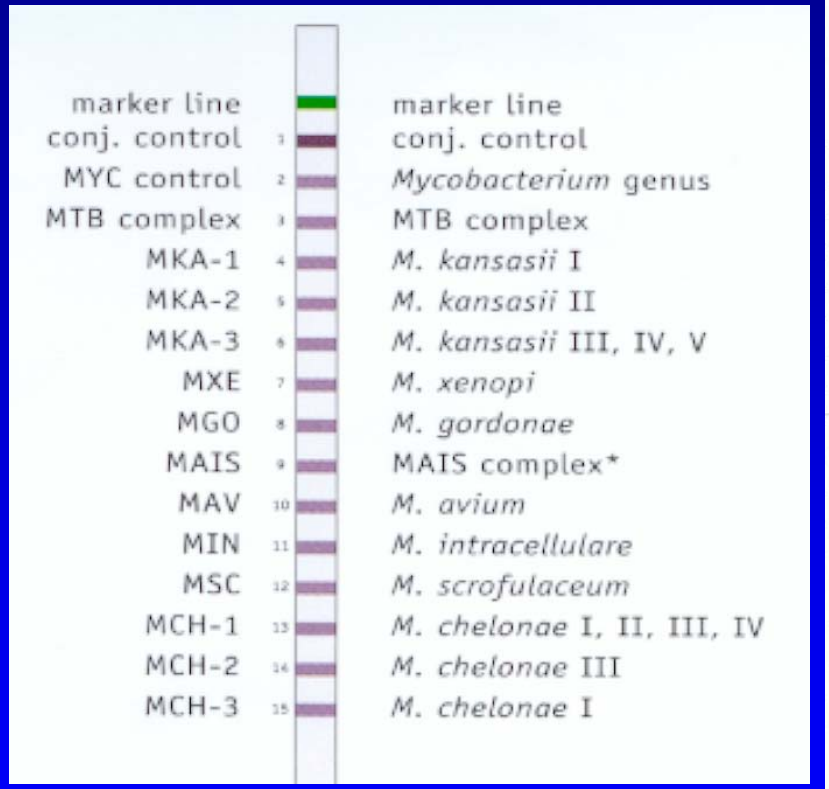
PCR Mycobactéries atypiques

- ID sur culture
- Sur ED positif et PCR BK négative (?)

Mycobactéries atypiques



Application



INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2

Interpretation chart

Line	Probe names	*Mycobacterium* genus	*M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*)	*M. kansasii* group I	*M. kansasii* group II	*M. kansasii* groups III, V, IV (*M. gastri*)	*M. xenopi*	*M. gordonae*	*M. genavense*	*M. simiae*	*M. marinum* + *M. ulcerans*	*M. celatum*	*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *MAC*, *M. malmoense*	*M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. silvaticum*	*M. intracellulare* (sequevars *Min-A*, *-B*, *-C* and *-D*)	*M. intracellulare* (sequevar *Mac -A*)	*M. scrofulaceum*	*M. malmoense*	*M. heamophilum*		*M. chelonae* complex (groups I, II, III, IV, *M. abscessus*)	*M. chelonae* complex (group III, *M. abcessus*)	*M. chelonae* (group I)	*M. fortuitum* - *M. peregrinum* complex	*M. smegmatis*
1	Conj. control	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	MYC genus	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	MTB		3																						
4	MKA-1			4																					
5	MKA-2				5																				
6	MKA-3					6																			
7	MXE						7																		
8	MGO							8																	
9	MGV								9																
10	MSI									10															
11	MMU										11														
12	MCE											12													
13	MAIS												13	13	13	13	13	13	13						
14	MAV													14											
15	MIN-1														15										
16	MIN-2															16									
17	MSC																17								
18	MML																	18							
19	MHP																		19	19					
20	MCH-1																				20	20	20		
21	MCH-2																					21			
22	MCH-3																						22		
23	MFO																							23	23
24	MSM																								24

Conclusion

- Importance
  - Qualité / délai des prélèvements
  - Discussion avec le biologiste

• Virus respi.	Examen direct / tests rapides (PCR)
• MP / CP	Sérologie / (PCR)
• Legionella	Antigénurie / (PCR)
• Bordetella	PCR
• Mycobactéries	ED / culture / (PCR)
• Aspergillus	Culture / antigène / (PCR)

Idéal = combinaison des tests