



Université
de Lille

Apport diagnostique de la biologie moléculaire en bactériologie

Diagnostic: PCR spécifique

Quand demander PCR ?

■ Si bactéries de culture difficile ou impossible

1. Infections Sexuellement Transmissibles

Chlamydia trachomatis

Culture cellulaire très complexe sur cellules McCoy, révélation à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents, lecture au microscope à fluorescence.

-> Uniquement réalisée par le CNR des IST à Bordeaux, sur certains échantillons provenant du CHU de Bordeaux.

Donc culture non réalisée en pratique, **technique de référence = PCR.**

Quand demander PCR ?

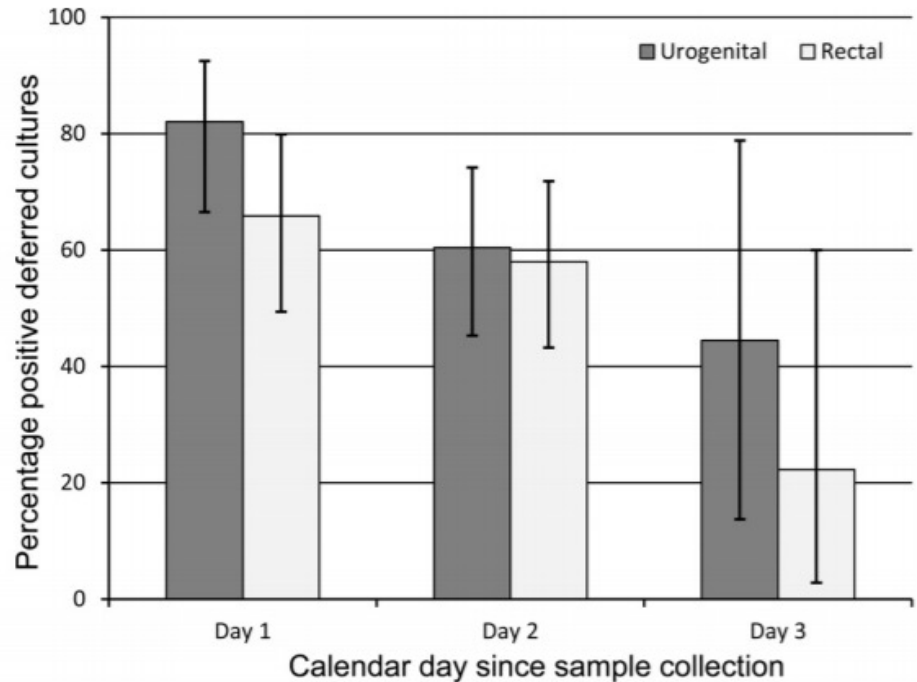
➤ **Si bactéries de culture difficile ou impossible**

1. Infections Sexuellement Transmissibles

Neisseria gonorrhoeae

Culture possible mais bactérie fragile donc sensibilité inférieure à la PCR (au mieux 80%).

Intérêt de la culture = obtention d'un antibiogramme.



	Day 1	Day 2	Day 3
Urogenital	32/39 (82%)	29/48 (60%)	4/9 (44%)
Rectal	27/41 (66%)	29/50 (58%)	2/9 (22%)

Wind et al., JCM 2015

Quand demander PCR ?

▀ Si bactéries de culture difficile ou impossible

1. Infections Sexuellement Transmissibles

▀ L'utilisation des tests multiplex *N. gonorrhoeae*/*C. trachomatis* doit être préconisée, compte tenu de la fréquence de ces co-infections, des avantages d'un point de vue économique et organisationnel (coût additionnel faible de la recherche simultanée des deux infections), et en raison de la prépondérance des tests multiplex sur le marché français.

Comme *C. trachomatis* = **uniquement PCR**, intérêt de réaliser une recherche de *N. gonorrhoeae* par PCR dans le même temps (**multiplex**).

Pour *N. gonorrhoeae*, la **culture** permet également d'obtenir un **antibiogramme** et de participer au **suivi épidémiologique**.

Dépistage et prise en charge de l'infection à *Neisseria gonorrhoeae*, HAS 2010

Quand demander PCR ?

■ Si bactéries de culture difficile ou impossible

2. Coqueluche

Bordetella pertussis = bactérie de culture difficile (milieu de Bordet-Gengou, contenant une infusion de pommes de terre + sang de mouton).

Sensibilité de la culture = 50 à 60%.

Autres espèces de *Bordetella*: *B. parapertussis*, *B. holmesii*

Peuvent donner symptômes similaires à coqueluche mais moins sévères

Existe PCR commerciales multiplex (= détection de plusieurs gènes) permettant la recherche simultanée des différentes espèces de *Bordetella* dans les prélèvements respi.

IS481 = séquence d'insertion présente chez *B. pertussis* à plus de 200 copies / génome (= très sensible).

➤ Si bactéries de culture difficile ou impossible

2. Coqueluche

PCR (bleu) = référence les 3 premières semaines.

Culture (vert) possible les 2 premières semaines

Diagnostic clinique/épidémiologique (orange) après 3 semaines

La sérologie (rouge) n'a plus d'indication et n'est plus remboursée.

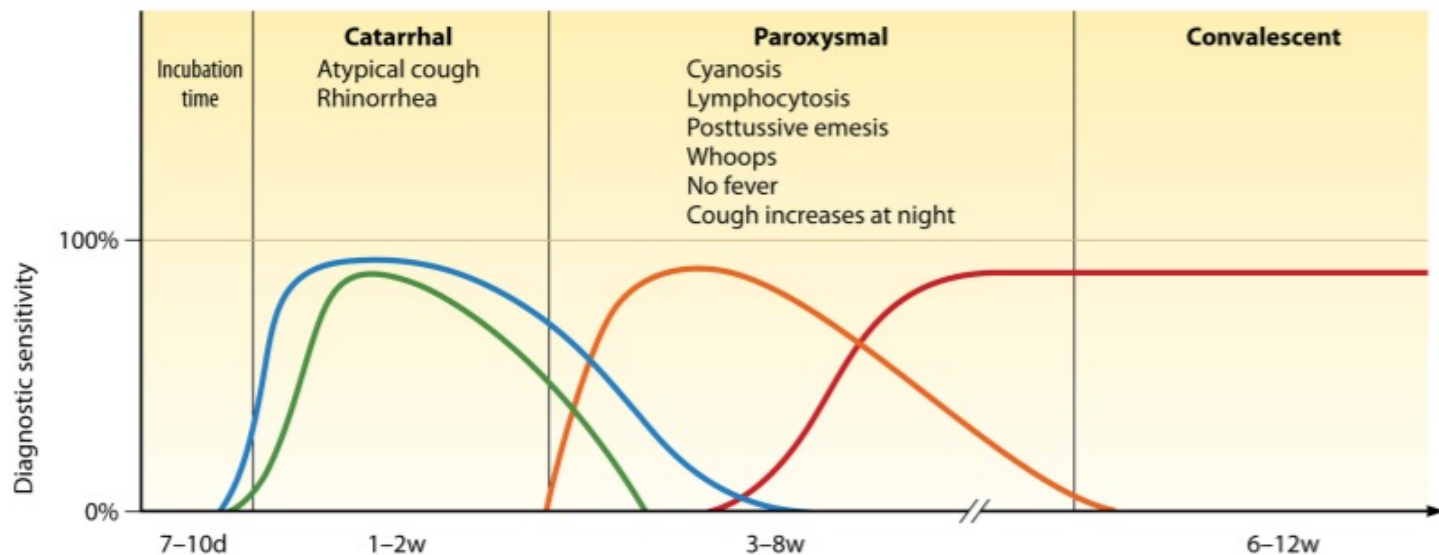


FIG 5 Relative diagnostic sensitivities of culture (green), PCR (blue), serology (red), and clinical diagnosis (orange) during different stages of *B. pertussis* infection. The represented sensitivities were idealized for clarity. As PCR may detect DNA of nonviable bacteria, positive PCR results may be obtained for 1 to 2 weeks longer than positive culture results.

Van der Zee, CMR 2015

Quand demander PCR ?

■ Si antibiothérapie préalable

1. Méningite à méningocoque

Coloration GRAM (examen microscopique): sensibilité < 80%

Neisseria meningitidis: si injection préalable d'antibiotiques avant la ponction lombaire (ex. purpura fulminans), peu probable d'obtenir la souche en culture.

Intérêt de la **PCR méningocoque** dans le LCR pour **améliorer la sensibilité**.

Si purpura fulminans, PCR sur biopsie purpurique = le plus sensible.

Possibilité d'obtenir un équivalent de sérotype par PCR également (intéressant pour l'ARS pour aider à l'investigation autour du cas)

Quand demander PCR ?

■ Si antibiothérapie préalable

1. Méningite à méningocoque

PCR plus sensible que la culture (surtout sur biopsie purpurique)

Table 2 Comparative results of rtPCR and culture for blood and skin biopsy, including only patients in which both culture and rtPCR were performed

		No. of samples analysed	No. of positive samples (%)
Blood	Culture	17	0/17 (0)
	PCR (serum)	17	10/17 (58.8) ^a
Skin biopsy	Culture	34	5/34 (14.7)
	PCR	34	34/34 (100) ^b

Staquet et al., Intensive Care Med 2017

Quand demander PCR ?

■ Si recherche d'un type de souche virulente

1. *Escherichia coli*

Recherche de facteurs de virulence associées à des souches pathogènes.

Exemple: en cas de diarrhée communautaire, coproculture standard va rechercher *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*.

E. coli présent dans le microbiote normal, donc non rendu. Il faut rechercher des gènes spécifiques de virulence correspondant aux EPEC, ETEC, EIEC, EHEC...

Surtout utile en cas de **suspicion de Syndrome Hémolytique et Urémique**. Possible de recherche **gènes *stx1* et *stx2*** présents chez les *E. coli* entéro hémorragiques (EHEC) par PCR directement dans les selles.

Quand demander PCR ?

■ Si recherche d'un type de souche virulente

2. *S. aureus* producteur de toxine de Panton Valentine

Abcès à répétition, pneumopathie nécrosante.

Transmettre les renseignements cliniques au laboratoire pour envoi de la souche de *S. aureus* isolée en culture en biologie moléculaire pour recherche du gène de la toxine de Panton Valentine (PVL).

Ainsi pour la seule année 2017, nous avons expertisé **610 souches de suppurations** (folliculites, furoncles, abcès, surinfections, érysipèle...) **hors épidémies**. La proportion de souches PVL+ est de 55% au total mais de **92.3%** lorsque l'on ne considère que **les infections primitives** (Figure 7).

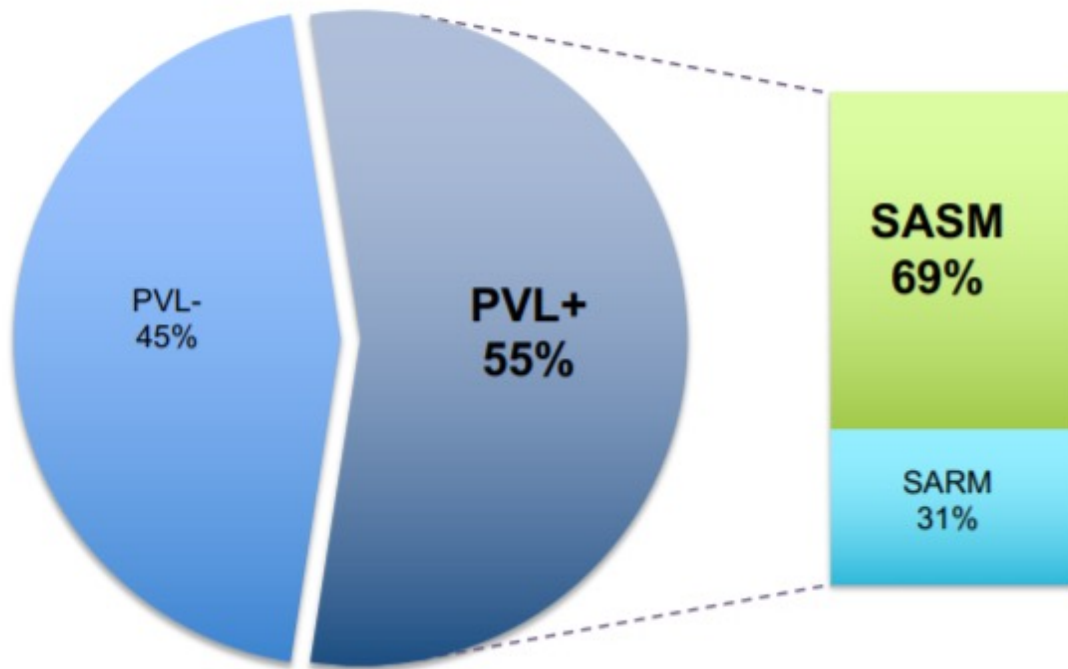


Figure 7- Caractéristiques des souches responsables d'infections suppuratives en 2017 (n=610).

Diagnostic: PCR ADNr 16S

PCR ADNr 16S

■ Principe

ADNr 16S = gène très conservé chez les bactéries, car code pour les ribosomes qui sont indispensables à la synthèse protéique.

Principe = choisir des amorces dans des régions conservées, pour amplifier une région hypervariable entre les deux amorces. Ensuite séquencer cette région hypervariable et la comparer à une base de données.

PCR ADNr 16S

▀ Problèmes

ADN bactérien présent partout (même dans réactifs d'extraction ou réactifs de PCR)

-> PCR ADNr 16S toujours positive à un contaminant si on augmente suffisamment le nombre de cycles de PCR.

De ce fait, on réduit le nombre de cycles de PCR pour que témoin négatif sorte négatif (ex. 32 cycles pour PCR ADN 16S contre 40 cycles pour une PCR spécifique d'une bactérie donnée).

C'est donc **moins sensible qu'une PCR spécifique.**

Sensibilité Examen microscopique = 10^5 CFU / mL

Sensibilité Examen ARN16S = 10^4 CFU / mL

Sensibilité PCR spécifique = 10^3 CFU / mL

PCR ADNr 16S

■ Avantages

Pas besoin d'hypothèse préalable, on peut trouver quelque chose auquel on n'avait pas pensé.

Exemple: médiastinite à *Mycoplasma hominis*

Bactérie qui ne possède pas de paroi -> invisible au GRAM

Pousse très mal en culture sur milieu usuels

Bactérie qui ne possède pas de paroi -> résistante naturellement à toutes les beta-lactamines

PCR ADNr 16S

■ Avantages

Amplifie ADN bactérien, même si bactéries mortes (traitement antibiotique).

Peut aussi être un inconvénient, PCR ADNr 16S peut rester positive des mois dans certains cas (ex. dans valves cardiaques).

**Métagénomique ciblée sur
ARN 16S ou métagénomique
non-ciblée**

Métagénomique

▀ Principe métagénomique ciblée sur ARN 16S (uniquement bactéries et archées)

Amplification d'un fragment d'ADNr 16S.

Séquençage de +/- 100 000 reads, matchés sur une base de données.

Obtention d'une répartition en pourcentage (abondance relative).

Existe également pour champignons (ARN 18S ou ITS2)

▀ Principe métagénomique non-ciblée

Séquençage direct de l'ADN contenu dans un échantillon.

Tous types de micro-organismes: Bactéries, archées, champignon, virus...

Plus coûteux et complexe à analyser

