

COMPARAISON DES PERFORMANCES DE SIX COFFRETS DE PCR POUR LA DÉTECTION D'AGENTS IMPLIQUÉS DANS LES PNEUMOPATHIES ATYPIQUES COMMUNAUTAIRES

Sibel BERGER, Julie DESROCHES, Alain LOZNIOWSKI, Corentine ALAUZET

LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE, PLATEFORME DE GÉNOMIQUE MICROBIENNE, CHU DE NANCY

Introduction

- ❖ Pneumopathies aiguës communautaires (PAC) = problème majeur de santé publique
- ❖ Pathogènes fréquemment impliqués = *Streptococcus pneumoniae* +++ et bactéries atypiques (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* et *Legionella pneumophila*)
- ❖ Bactéries atypiques =
 - tableau clinique peu évocateur
 - diagnostic direct difficile
 - diagnostic indirect rétrospectif
- ❖ Approche moléculaire = méthode de choix pour optimiser le diagnostic des PAC à germes atypiques (rapidité et sensibilité)

Difficulté dans le choix d'une antibiothérapie adaptée et dans la prise en charge des patients

Objectif

Évaluer et comparer les performances diagnostiques de six coffrets de PCR commercialisés pour la détection dans les échantillons respiratoires des principales bactéries impliquées dans les pneumopathies atypiques communautaires :

- Mycoplasma pneumoniae* (Mp)
- Chlamydomphila pneumoniae* (Cp)
- Legionella pneumophila* (Lp)

Méthodes

Extraction des échantillons :

QIAamp DNA minikit (QIAGEN)

Automate d'amplification utilisé :

ROTORGENE (QIAGEN)

Tests de confirmation :

En cas de discordance entre les techniques

Pathogènes cibles	Cp	DIAGENODE	BIOMERIEUX	SEEGENE		FAST-TRACK	ELITECH
		Dia-MCpn	Chla/Myco pneumo r-gene	Anyplex™ II RB5 Detection (+ <i>Bordetella pertussis</i> + <i>Bordetella parapertussis</i> + <i>Haemophilus influenzae</i> + <i>Streptococcus pneumoniae</i>)	Seeplex Pneumobacter ACE (+ <i>Bordetella pertussis</i> + <i>Haemophilus influenzae</i> + <i>Streptococcus pneumoniae</i>)	FTD Atypical CAP	CHLAMYDOMPHILA pn. Q - PCR Alert kit MYCOPLASMA pn. Q - PCR Alert kit LEGIONELLA pn. Q - PCR Alert kit
Gènes cibles	Lp	Dia-Lpn	non testé				
	Cp	ribosomal RNA gene	omp2 (→ protéine de membrane externe)	murB (→ biosynthèse du peptidoglycane)	murB (→ biosynthèse du peptidoglycane)	rpoB	ompA (→ protéine de membrane externe)
	Mp	P1 cytoadhesin gene	P1 cytoadhesin gene	ITS1	ITS1	P1 cytoadhesin gene	P1 cytoadhesin gene
	Lp	mip (spécifique Lp) + rrs (spécifique Lsp*)	mip (spécifique Lp)	mip (spécifique Lp)	mip (spécifique Lp)	rrs (spécifique Lsp*)	mip (spécifique Lp)

* Lsp = *Legionella* spp.

Résultats

➤ Les performances des coffrets ont été évaluées sur 36 échantillons de contrôle qualité calibrés (Quality Control for Molecular Diagnostics = QCMD) :

Pour Cp et Mp

Spécificité	Sensibilité
100%	77%
100%	77%
100%	65%
100%	41%
100%	100%
100%	82%

Echantillon	Cp-Mp13.01	Cp-Mp13.02	Cp-Mp13.04	Cp-Mp13.06	Cp-Mp13.07	Cp-Mp13.08	Cp-Mp13.11	Cp-Mp13.12	Cp-Mp14.01	Cp-Mp14.02	Cp-Mp14.03	Cp-Mp14.04	Cp-Mp14.05	Cp-Mp14.06	Cp-Mp14.07	Cp-Mp14.08	Cp-Mp14.09	Cp-Mp14.10	Cp-Mp14.11	Cp-Mp14.12
Contenu	Mp	Cp	Cp	Mp	Mp	négatif	Mp	Cp	Cp	Mp	Mp	négatif	Cp	Cp	négatif	Mp	Cp	Cp	Mp	Mp
Quantité	faible +	très faible +	fort +	faible +	faible +	négatif	très faible +	fort +	fort +	faible +	faible +	négatif	fort +	faible +	négatif	faible +	moyen +	fort +	moyen +	faible +
Diagénod	Mp+	négatif	Cp+	Mp+	Mp+	négatif	négatif	Cp+	Cp+	Mp+	négatif	négatif	Cp+	négatif	négatif	Mp+	Cp+	Cp+	Mp+	Mp+
Biomérieux	Mp+	négatif	Cp+	Mp+	Mp+	négatif	négatif	Cp+	Cp+	Mp+	négatif	négatif	Cp+	négatif	négatif	Mp+	Cp+	Cp+	Mp+	Mp+
Anyplex	Mp+	négatif	Cp+	négatif	Mp+	négatif	négatif	Cp+	Cp+	Mp+	négatif	négatif	Cp+	négatif	négatif	Mp+	Cp+	Cp+	Mp+	négatif
Seeplex	négatif	négatif	Cp+	négatif	négatif	négatif	négatif	Cp+	Cp+	négatif	négatif	négatif	Cp+	négatif	négatif	négatif	Cp+	Cp+	Mp+	négatif
Fast-track	Mp+ Lsp+	Cp+ Lsp+	Cp+	Mp+	Mp+ Lsp+	Lsp+	Mp+ Lsp+	Cp+ Lsp+	Cp+	Mp+	Mp+	Lsp+	Cp+	Cp+ Lsp+	Lsp+	Mp+	Cp+	Cp+	Mp+	Mp+
Elitech	Mp+	Cp+	Cp+	Mp+	Mp+	négatif	négatif	Cp+	Cp+	Mp+	négatif	négatif	Cp+	négatif	négatif	Mp+	Cp+	Cp+	Mp+	Mp+

Pour Lp

Spécificité	Sensibilité
100%	100%
100%	100%
100%	82%
ND*	100%**
100%	100%

Echantillon	Lp13.01	Lp13.03	Lp13.04	Lp13.06	Lp13.08	Lp13.10	Lp14.01	Lp14.02	Lp14.03	Lp14.04	Lp14.05	Lp14.06	Lp14.07	Lp14.08	Lp14.09	Lp14.10
Contenu	Lp	Lp	<i>L. bozemanii</i>	Lp	Lp	Lp	Lp	Lp	Lp	<i>L. longbeachae</i>	Lp	Lp	négatif	négatif	négatif	Lp
Quantité	fort +	fort +	négatif	moyen +	moyen +	fort +	fort +	fort +	fort +	négatif	fort +	fort +	négatif	négatif	négatif	fort +
Diagénod	Lp+ Lsp+	Lp+ Lsp+	Lp- Lsp+	Lp+ Lsp+	Lp+ Lsp+	Lp+ Lsp+	Lp+ Lsp+	Lp+ Lsp+	Lp+ Lsp+	Lp- Lsp+	Lp+ Lsp+	Lp+ Lsp+	négatif	négatif	négatif	Lp+ Lsp+
Anyplex	Lp+	Lp+	négatif	Lp+	Lp+	Lp+	Lp+	Lp+	Lp+	négatif	Lp+	Lp+	négatif	négatif	négatif	Lp+
Seeplex	négatif	Lp+	négatif	négatif	Lp+	Lp+	Lp+	Lp+	Lp+	négatif	Lp+	Lp+	négatif	négatif	négatif	Lp+
Fast-track	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+	Lsp+
Elitech	Lp+	Lp+	négatif	Lp+	Lp+	Lp+	Lp+	Lp+	Lp+	négatif	Lp+	Lp+	négatif	négatif	négatif	Lp+

* non déterminable

** pour *Legionella* spp.

➤ Ces coffrets ont également été testés sur un panel de 53 prélèvements ($n=46$ prélèvements respiratoires; $n=7$ LCR) reçus au laboratoire sur une période de 3 mois dans le cadre d'un diagnostic de PAC ou de méningo-encéphalite :

- pour Cp : aucune amplification n'a été observée
- pour Mp : une amplification a été observée pour deux prélèvements (Anyplex, $n=1$; Elitech, $n=1$) → aucun argument clinique et sérologique ne confirme ces deux résultats
- pour Lp : une amplification a été obtenue dans un prélèvement pour l'ensemble de ces trousse (associée à une antigénurie et une culture positives). Un second prélèvement a été détecté positif avec le coffret Anyplex sans argument clinico-biologique pour étayer ce résultat
- la présence de *Legionella* spp. a été détectée dans 60% des prélèvements avec la trousse FTD Atypical CAP et dans 15% des prélèvements pour Dia-Lpn
- des problèmes de reproductibilité ont été observés pour les deux trousse commercialisées par Seegene (Anyplex et Seeplex)

Conclusions

- ❖ Aucun des coffrets testés ne présente les performances optimales pour la détection simultanée de Cp, Mp et Lp
- ❖ Le coffret FTD Atypical CAP de Fast-track présente les meilleures performances pour la détection de Cp et Mp alors que pour la recherche spécifique de Lp, les meilleurs résultats ont été obtenus avec les trousse Q-PCR Alert d'Elitech et Diagénod
- ❖ Cette étude a mis en évidence des problèmes d'interprétation des résultats :
 - liés à un manque de reproductibilité et la suspicion de faux-positifs (Ct tardifs) pour certaines trousse
 - liés à la présence de légionelles non pathogènes environnementales contaminant les prélèvements et/ou les réactifs d'extraction, et facilement détectables par les techniques de qPCR basées sur l'ADNr 16S

Remerciements :

Nous remercions particulièrement les sociétés Biomérieux, Diagénod, Elitech, Eurobio (Seegene), Launch Diagnostics (Fast-track Diagnostics) pour avoir gracieusement fourni les trousse testées dans cette étude.