

Diagnostic rapide des méningites par PCR

L'expérience de l'hôpital Saint-Antoine

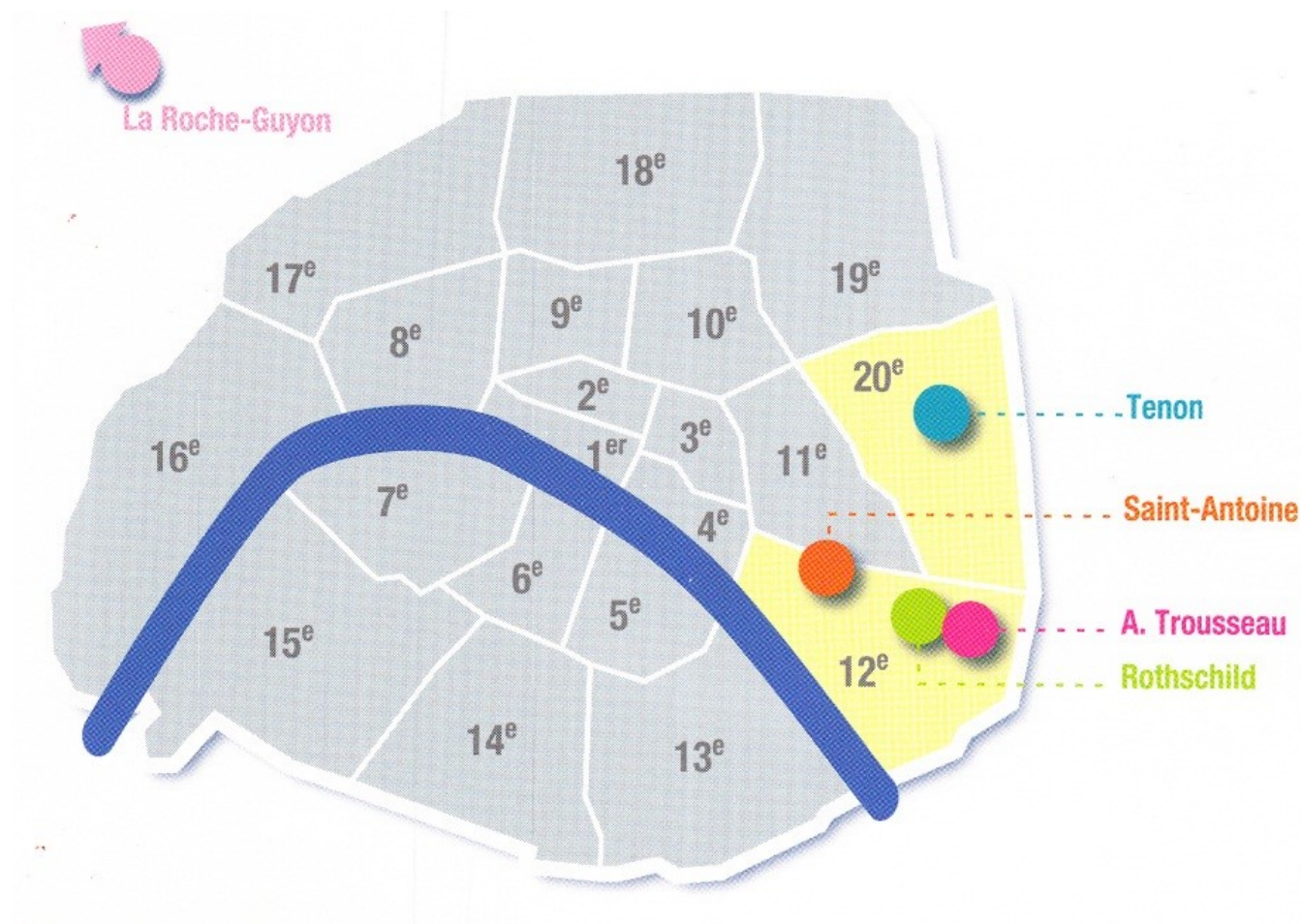
Christelle Hermand

Service d'Accueil des Urgences

Pascal Pernet

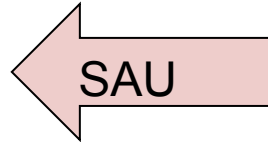
Laboratoire de Biologie d'Urgence
AP-HP - GH HUEP - Site Saint-Antoine, Paris

Groupe Hospitalier Hôpitaux Universitaires Est Parisien

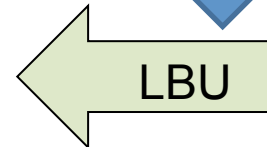


Pôles de l'hôpital Saint Antoine

- Urgences et aval
- Digestif
- Oncologie-Hématologie
- Spécialités
- Biologie médicale et pathologie
- Imagerie
- Prévention - Information - Médicaments et Évaluation



Service de
Bactériologie



FilmArray®

Environ 700 lits d'hospitalisation

L'hôpital Saint-Antoine



- 2 structures dédiées à la prise en charge de l'urgence :
- SAU : Service d'Accueil des Urgences
 - LBU : le Laboratoire de Biologie d'Urgence

Le LBU

- Créé en 2007
- Ouvert 24h/24 - 7J/7
- Surface technique : 100 m²
- Multidisciplinaire :
 - Biochimie, cytologie, hémostase,
 - EBMD
 - parasitologie (paludisme),
virologie, (VIH), hémobiologie
périnatale, bactériologie (LCR)
- Environ 400 dossiers/j
dont SAU : 27 %



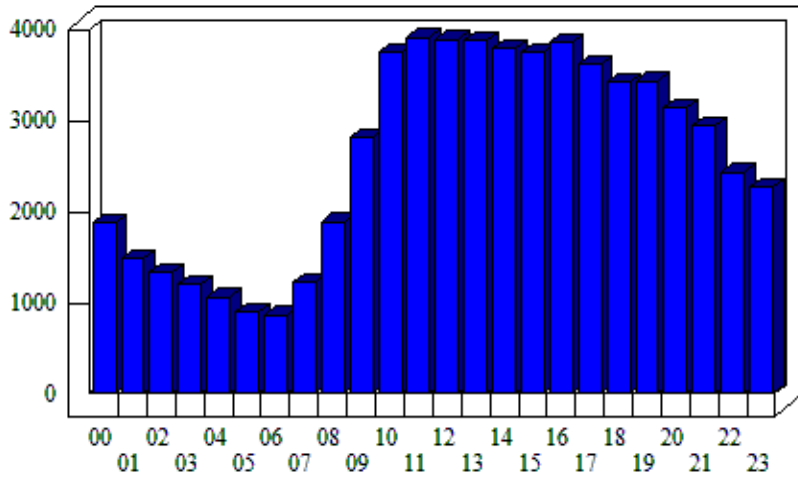
Le SAU

- Environ 65 000 passages annuels
- 3 lignes de garde par jour
- 22 Médecins équivalents temps-plein
- 66 IDE
- 56 Aides soignants

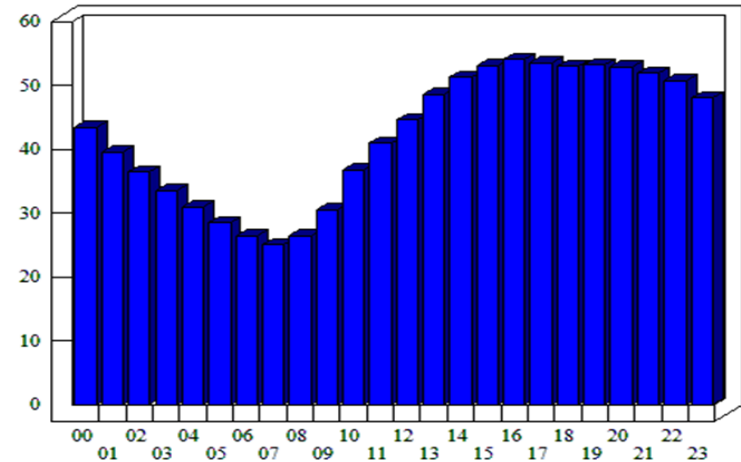


Activité du SAU

Nb d'inscription en fonction de l'heure (2017)



Nb de patients présents dans le service en fonction de l'heure



Indications de la ponction lombaire

- Syndrome méningé fébrile
- Crise convulsive fébrile
- Syndrome confusionnel
- Céphalées brutales à scanner normal
- Troubles de la conscience/vigilance inexpliqués
- Suspicion de Guillain Barré



Epidémiologie des méningites

- Méningite bactérienne
 - Urgence diagnostique et thérapeutique
 - 0,6 – 4 cas / 100 000 adultes / an
 - Mortalité : 10 à 30%
- Méningite aseptique
 - 7,6 cas / 100 000 adultes / an

Conduite à tenir devant un syndrome méningé fébrile (avant biologie)

- PL en l'absence de contre-indication au décours de l'examen clinique
- Aspect du liquide
 - Trouble : dexaméthasone et antibiothérapie à dose méningée sans attendre les résultats
 - Clair :
 - Critères de gravité clinique : idem liquide trouble
 - Signes d'encéphalite associés : + aciclovir à dose méningée
 - Examen clinique rassurant : attente résultats de LCR

Si LCR « positif »
avec ≥ 10 éléments/mm³

- Hospitalisation
- Antibiothérapie adaptée à l'examen direct
- Si examen direct négatif, en fonction de la clinique
 - Amoxicilline 12g/j
 - Cefotaxime 12g/j
 - Aciclovir 10 mg/kg/8 heures
- Jusqu'à récupération des cultures et éventuelles PCR virales

Cheminement du LCR (ouverture des labos centraux)

- Envoi immédiat des tubes au laboratoire de biochimie
- Envoi immédiat des tubes en bactériologie
 - Réalisation de l'examen cytologique
 - Si ≥ 10 éléments/mm³, réalisation d'une coloration de gram permettant l'examen direct
 - mise en culture
- Envoi de tubes en virologie pour réalisation de PCR
 - D'emblée si clinique orientée
 - Secondairement, en fonction de la cytologie et de l'examen direct

2017 - Prise en charge des LCR au LBU

- Avant : externalisation des LCR
- En collaboration avec le service de Bactériologie
- Suite au regroupement de la bactériologie du GH sur le site Saint-Antoine
- Prise en charge des LCR de SAT, RTH et TNN sur la période de garde
- Récupération d'une surface pour installation d'un PSM + microscope + étuve
- Ajout du FilmArray[®] (panel méningite-encéphalite):
 - Approche syndromique
 - recherche simultanée par PCR multiplexe de différents pathogènes pouvant être impliqués

En garde : organisation actuelle

- Envoi de tous les tubes de LCR au LBU
 - Biochimie
 - Cytologie
 - +/- Recherche d'agents pathogènes par PCR multiplexe (panel Méningite – Encéphalite FilmArray[®])
 - Si ≥ 10 éléments/mm³
 - Si justifié par clinicien (signes neuro)
 - Mise en culture
 - Pas de coloration de gram

L'approche syndromique

Pour le biologiste

- Approche diagnostique probabiliste qui cible un large éventail d'étiologies sur un même échantillon
 - Réduction du volume de l'échantillon
 - Mixité microbiologique (bactéries, virus, champignons pathogènes)
 - Détection des principaux pathogènes attendus
 - Réponse rapide
- Historiquement, laboratoires différenciés en sous-spécialités de microbiologie (techniques différentes)
- Interprétation coordonnée facilitée par une méthodologie unique sur panel (ME, pulmonaire, hémoculture...)
- Particulièrement indiquée à la période de garde
- Nécessite un interlocuteur en aval

L'approche syndromique

Pour le clinicien

- Apporte une réponse dès J0
- Adaptation de prescription :
 - Isolement
 - Antibiothérapie/antiviraux : plus rapide ou adaptés (arrêt)
- Impact potentiel sur les coûts et l'organisation (isolement, flux des patients)

L'espace « microbiologie » du LBU

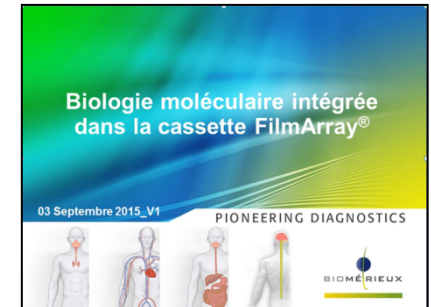
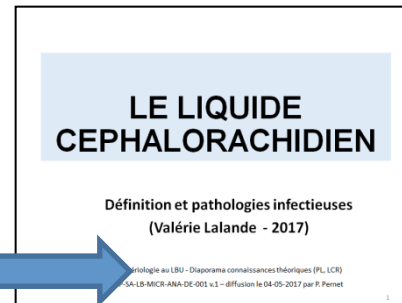


Poste de travail FilmArray®



Habilitation du personnel du LBU

- 18 seniors et 7 techniciens de garde
- LBU Formation théorique
 - Examen cyto bactériologique du LCR
 - L'organisation au LBU
- Formation/contrôle pratique : cytologie/ensemencement du LCR
- Formation PCR FilmArray®
 - Simple
 - Vidéo + démonstration en interne au LBU
 - Référents : formation BioMérieux



Formation pratique des Examens Cytologiques des LCR
Techniciens et biologistes LBU avril 2017

Date de formation	Formateur TLA bactério	Nom Prénom
25/04/17	ANGELIQUE VIDAL	CHELSEA BENOIST

Signature: [Signature]

Les LCR pathologiques étant rares, la formation pratique sera basée sur la manipulation d'échantillon d'inoculation externe de la qualité et/ou de liquides de sérum (saicite ou liquide pleuron) disponibles au laboratoire de bactériologie.

Etapes de la formation:

1. Bonne pratique d'utilisation d'un PSM et du matériel nécessaire à la manipulation de liquide biologique pour leur analyse cyto bactériologique.
2. Un ensemencement d'un liquide sur milieu au sang CDH et CHOC les et inoculation en sachet sous atmosphère et température adaptée.
3. montage de 4 cellules pour numération.
4. numération des éléments et des hématies
5. préparation d'une lame par projection un liquide par cytospin.
6. lecture de 2 frottis/ 2 formules.

Les numérations réalisées seront comparées avec celles réalisées par un TLA de bactériologie
Un liquide avec moins de 10 éléments/ (Numération acceptable 10 +/- 2 éléments ou GR)
Au moins 3 liquides pathologiques (> 10 éléments).

	Démonstration Ou/Non	Exécution Ou/Non
Bonne pratique d'utilisation d'un PSM	OUI	OUI
Désinfection du matériel nécessaire	OUI	OUI
Bonne pratique des manipulations	OUI	OUI
montage de cellules de comptage Kovatski	OUI	OUI
Ensemencement sur boîte	OUI	OUI
Numération (4)	OUI	OUI
Dilution	OUI	NON (GR)
Utilisation cytospin	OUI	OUI
Formule	OUI	OUI

Habilitation	Dr V. Lalande	Nom Prénom	OK
Signature	[Signature]		

Liquide n°1	Comptage	Comptage formateur
Dilution : oui non	NON	
Facteur de dilution		
Éléments/mm ³	50	10-50
Hématies/mm ³	21	5-55

Liquide n°2	Comptage	Comptage formateur
Dilution : oui non	NON	
Facteur de dilution		
Éléments/mm ³	167	60-180
Hématies/mm ³	30	5-55

Liquide n°3	Comptage	Comptage formateur
Dilution : oui non	NON	
Facteur de dilution		
Éléments/mm ³	540	72.5-585
Hématies/mm ³	30	5-55

Liquide n°4 (saicite ou autre)	Comptage	Comptage formateur
Dilution : oui non	NON	
Facteur de dilution		
Éléments/mm ³	17	20
Hématies/mm ³	31	30

Formules

Lame 1	Résultats	formateur
Formule sur 100 ou 50		
Neutrophiles %	17	10%
Lymphocytes %	33	33%
Autres %	50	53%

Lame 2	Résultats	formateur
Formule sur 100 ou 50		
Neutrophiles %	14	19%
Lymphocytes %	33	41%
Autres %	53	40%

Cibles du panel ME FilmArray®

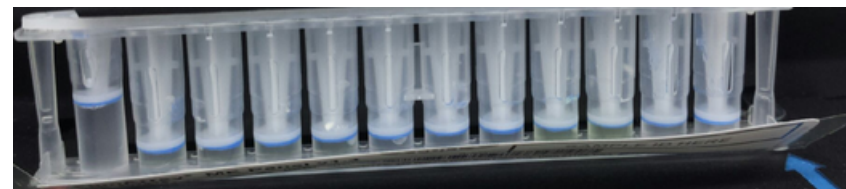
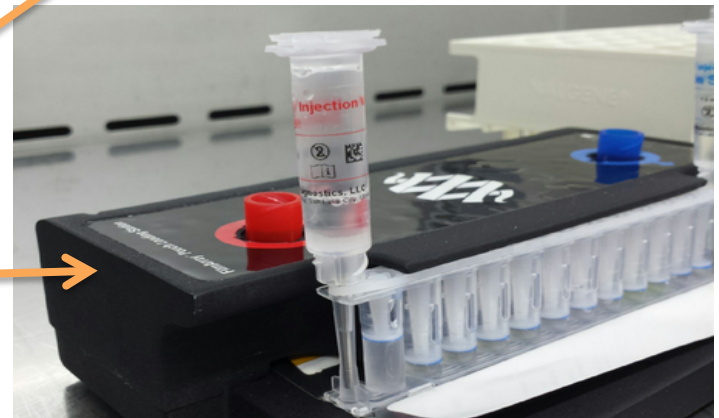
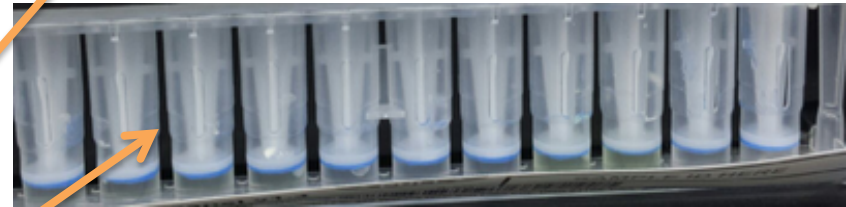
La cassette FilmArray® contient les réactifs lyophilisés nécessaires pour l'extraction, la PCR et la détection de 14 cibles :

VIRUS (7)	BACTERIES (6)	LEVURE (1)
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)	<i>Escherichia coli K1</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Cryptococcus neoformans / gattii</i>



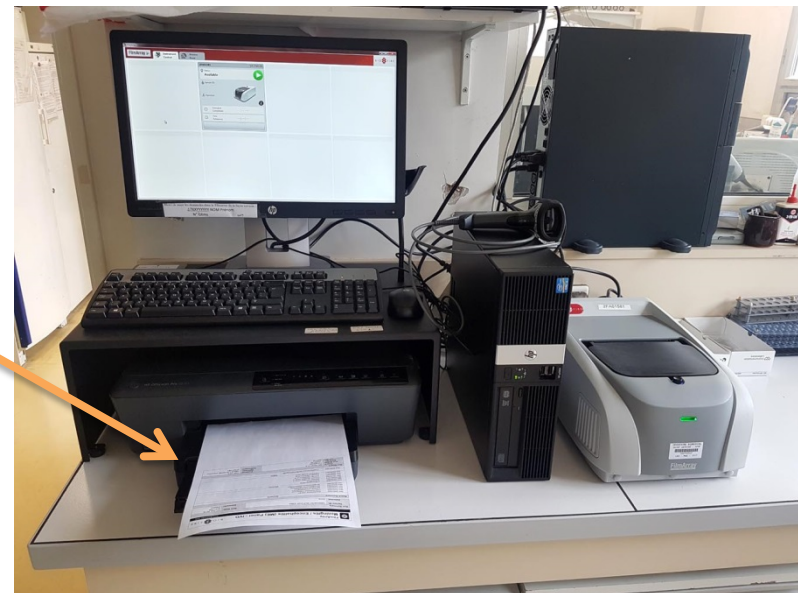
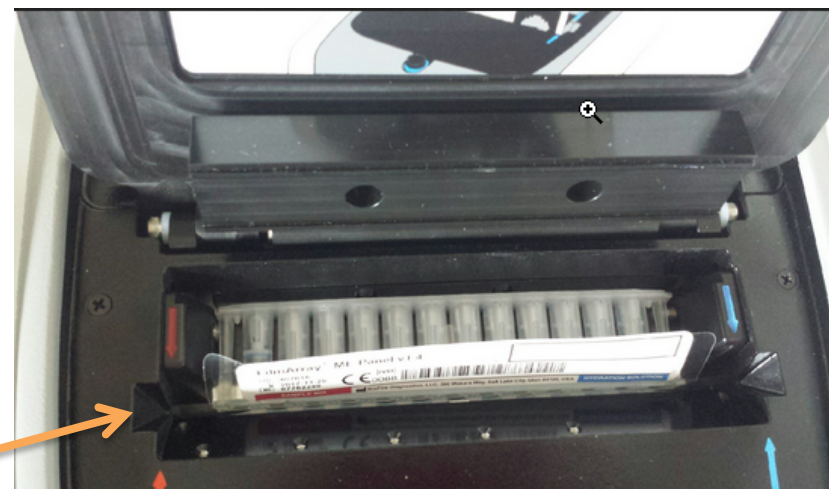
1. Préparation Kit ME FilmArray

- Kit de 6 ou 36 tests individuels sous vide
- Conservation : 15-25°C
- Un test à la fois (module)
- Sous PSM, 4 étapes :
 - Préparation de la cassette
 - Hydratation de la cassette
 - Préparation de l'échantillon (200 µl LCR)
 - Chargement et injection de l'échantillon
- 5 minutes
- Étapes critiques
 - Manipulation, timing



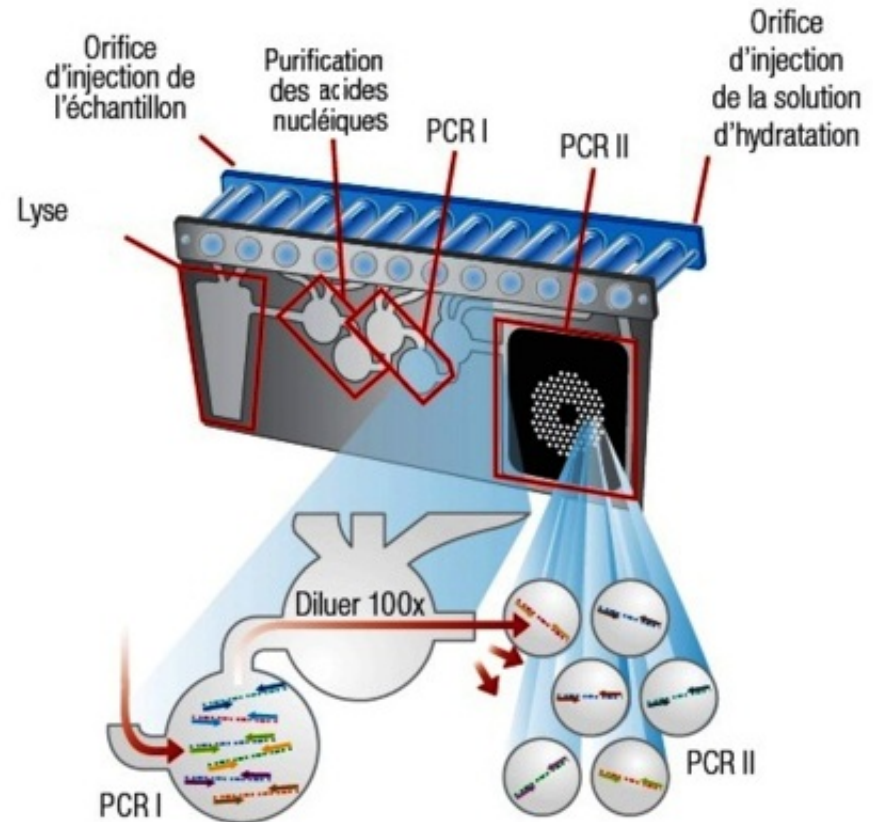
2. Analyse du LCR par PCR

- Chargement de la cassette dans le module de mesure
- Traçabilité opérateur, échantillon, réactif
- Lancement de l'analyse
- Résultat en 70 minutes avec édition du rapport
 - Détecté
 - Non détecté





PCR

- 1^{ère} étape : **extraction et purification** des acides nucléiques de l'échantillon.
- 2^{ème} étape : **PCR** «nichée» ("nested PCR") :
 - Une première **PCR** : réaction hautement multiplexée pour amplifier toutes les cibles du panel.
 - Une deuxième **PCR** : amplification individuelle de chaque cible dans un puit défini à l'aide d'un couple d'amorces situées à l'intérieur du produit de la première PCR.
- 3^{ème} étape : **analyse automatique des courbes de fusion** et génération du rapport de résultats



Exemple de rapport

	FilmArray Meningitis / Encephalitis (ME) Panel - IVD		BIO FIRE
		www.BioFireDx.com	
Run Summary			
Sample ID:	1803049467 FEM1234567890	Run Date:	14 Mar 2018 3:55 PM
Detected:	<i>Neisseria meningitidis</i>	Controls:	Passed
Result Summary			
Bacteria			
Not Detected	<i>Escherichia coli</i> K1		
Not Detected	<i>Haemophilus influenzae</i>		
Not Detected	<i>Listeria monocytogenes</i>		
✓ Detected	<i>Neisseria meningitidis</i>		
Not Detected	<i>Streptococcus agalactiae</i>		
Not Detected	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
Viruses			
Not Detected	Cytomegalovirus		
Not Detected	Enterovirus		
Not Detected	Herpes simplex virus 1		
Not Detected	Herpes simplex virus 2		
Not Detected	Human herpesvirus 6		
Not Detected	Human parechovirus		
Not Detected	Varicella zoster virus		
Yeast			
Not Detected	<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>		
Run Details			
Pouch:	ME Panel v1.4	Protocol:	CSF v3.0
Run Status:	Completed	Operator:	XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX
Serial No.:	12288887	Instrument:	2FA01581
Lot No.:	753517		

Dysfonctionnement FilmArray

- 1 épisode de panne (03/18)
- 2 patients en échec
 - Controls : invalid
 - Instrument Error (thermocycler)
- Etude de l'impact clinique
- Remplacement module sous 48h
- Tests remboursés (180€/test)

FilmArray		BIO FIRE	
Meningitis / Encephalitis (ME) Panel - IVD		www.BioFireDx.com	
Run Summary			
Sample ID:	1803008547	Run Date:	02 Mar 2018 11:51 PM
Detected:	▲ Invalid	Controls:	▲ Invalid
Result Summary			
Bacteria			
▲ Invalid	<i>Escherichia coli</i> K1		
▲ Invalid	<i>Haemophilus influenzae</i>		
▲ Invalid	<i>Listeria monocytogenes</i>		
▲ Invalid	<i>Neisseria meningitidis</i>		
▲ Invalid	<i>Streptococcus agalactiae</i>		
▲ Invalid	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
Viruses			
▲ Invalid	Cytomegalovirus		
▲ Invalid	Enterovirus		
▲ Invalid	Herpes simplex virus 1		
▲ Invalid	Herpes simplex virus 2		
▲ Invalid	Human herpesvirus 6		
▲ Invalid	Human parechovirus		
▲ Invalid	Varicella zoster virus		
Yeast			
▲ Invalid	<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>		
Run Details			
Pouch:	ME Panel v1.4	Protocol:	CSF v3.0
Run Status:	Instrument Error	Operator:	Mathieu GILBERT MATHIEU GILBERT
Serial No.:	12288895	Instrument:	2FA03408
Lot No.:	753517		

Résultats : activité LCR au LBU

- De mai 2017 à mars 2018 (10 mois)
- 380 LCR analysés (2016 : 350 LCR externés)
 - 166 provenant du SAU (43 %)
- 72 FilmArray[®] pratiqués (19 % des LCR)
 - 25 LCR du SAU (35%)
 - Soit 15 % des LCR du SAU (1 sur 6)
 - Biais de surreprésentation des autres services
 - Envoi ciblé sur horaires du LBU
 - PCR faites de jour par le personnel de Bactériologie

LCR des patients du SAU

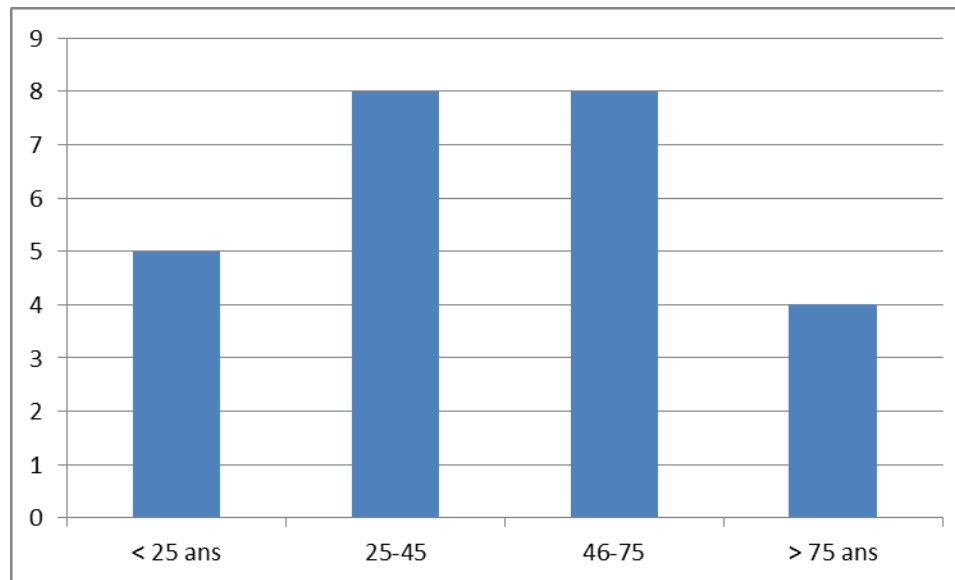
25 PCR FilmArray® ME pratiquées sur 166 LCR :

- Déclenchement de la PCR pour
 - 22 patients : cellularité ≥ 10 éléments/mm³
 - 3 patients : signes cliniques d'encéphalite (dont 1 splénectomisé)
- 11 résultats positifs (44%)
 - 2 *streptococcus pneumoniae*
 - 4 entérovirus
 - 4 Varicelle Zona Virus
 - 1 patient co-infecté herpes simplex virus + HHV6
- 14 résultats négatifs (56%)
 - Aucune culture secondaire positive
 - 1 « faux négatif » à VZV (< 10 copies/ml LCR)

PCR FilmArray®

Epidémiologie des 25 patients du SAU

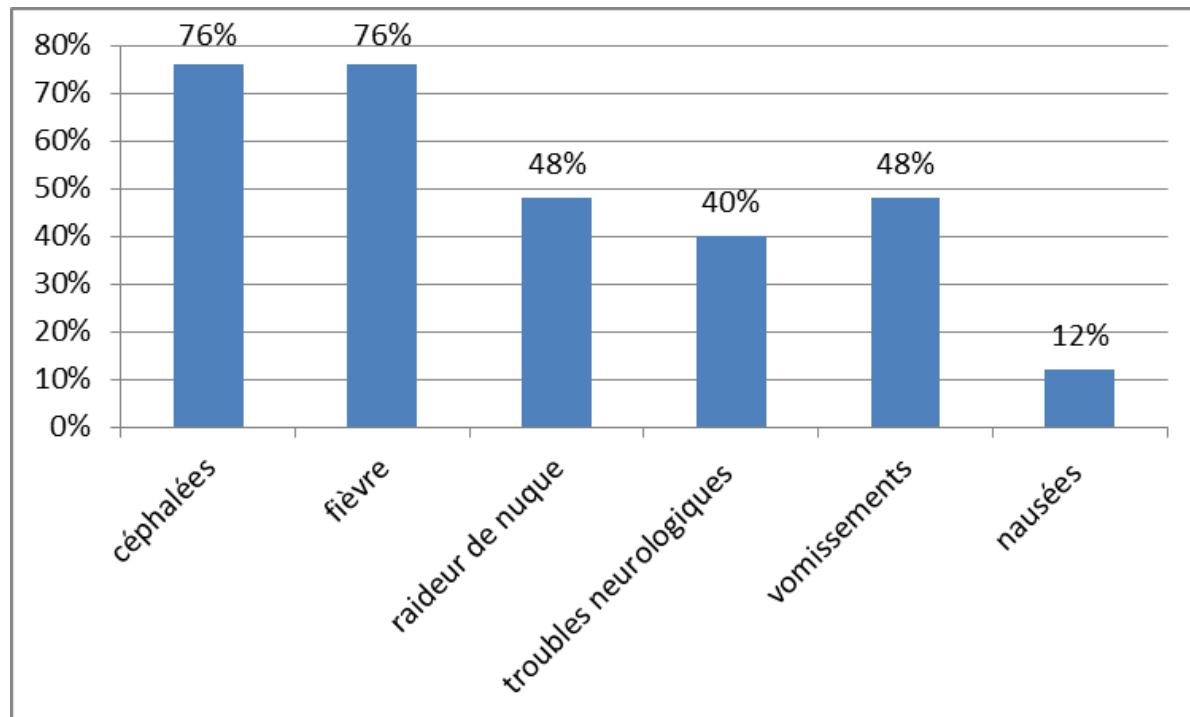
- 64% d'hommes – 36% de femmes
- Moyenne d'âge = médiane : 45 ans
- Extrêmes : 15 – 88 ans



PCR FilmArray[®]

Clinique des 25 patients du SAU

- Syndrome méningé fébrile : «*céphalées fébriles + vomissements + raideur de nuque*»
 - 6 patients /25 (24%)



PCR FilmArray®

Clinique des 25 patients du SAU

- Troubles neurologiques
 - 10 patients sur 25 (40%)
 - 2 infections à *Streptococcus pneumoniae*
 - 1 infection à VZV (troubles oculomoteurs)
 - 7 résultats négatifs
 - 1 toxoplasmose
 - 1 encéphalite à VIH
 - 1 positif à VZV sur échantillon virologie (PCR < 10 copies/ml)

PCR FilmArray® - Résultats positifs

Bactériologie

2 cas d'infections à *Streptococcus pneumoniae*

	Patient 1 : H 54 ans	Patient 2 : F 83 ans
Heure d'arrivée	4h22	17h36
Début des symptômes	Minuit	Environ 10 jours, dégradation brutale à 14h45
Température	39,2°	38,5°
TA (mm Hg)	144/79	136/97
FC (/min)	105	98
Score de Glasgow	12 (E4, V2, M6)	12 (E4, V2, M6)
Céphalées	oui	oui
Raideur de nuque	En fin de course	oui
Vomissements	oui	oui
Troubles neurologiques	Confus, agité	Confuse, mutisme
Signes ORL	otite	Otorragie purulente
Heure de réalisation de la PL	6h30	18h30

PCR FilmArray® - Résultats positifs

Bactériologie

2 cas d'infections à *Streptococcus pneumoniae*

- Biologie : sang

	Patient 1	Patient 2
GB (/mm ³)	18 790	25 640
CRP (mg/l)	26	191
PCT (µg/l)	0,06	9,76

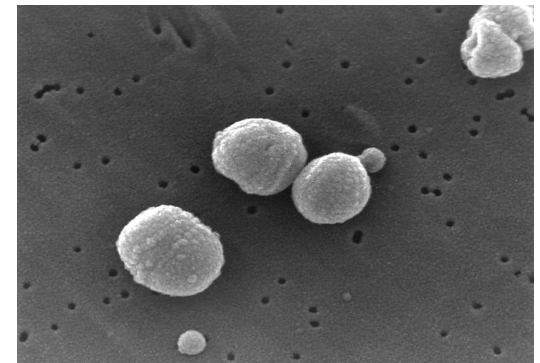
- Biologie : LCR

	Patient 1	Patient 2
Aspect	Trouble	Eau de riz
GB (/mm ³)	3 180	1 140
Protéïnorrhée (g/l)	4,32	14,0
Glycorachie (mmol/l)	1,6	< 0,3

PCR FilmArray® - Résultats positifs

Bactériologie - Bilan

- 2 cas positifs à *Streptococcus pneumoniae*
- Éléments d'orientation clinique
 - Début brutal
 - Signes ORL associés
- LCR trouble
 - Indication à une antibiothérapie immédiate
- Apport de la PCR
 - Rapidité de réponse
 - Confirmation diagnostique



PCR FilmArray[®] - Résultats positifs

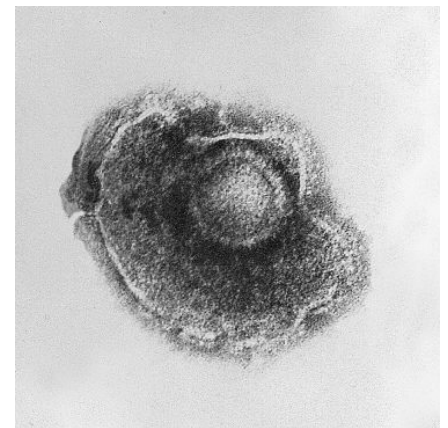
Virologie

- 9 patients / 25
 - 4 infections à VZV
 - 1 infection à HSV + HHV6
 - 4 Infections à entérovirus

PCR FilmArray® - Résultats positifs

Infections à VZV

- 3 hommes / 1 femme
- Age médian : 31 ans
- 2 patients présentaient un zona lors de l'examen initial, 1 l'a extériorisé secondairement
- Biologie : pas de syndrome inflammatoire
- LCR :
 - Hyperprotéinorachie
 - Glycorachie normale
 - Cellularité à prédominance lymphocytaire
- Apport PCR
 - Diagnostic immédiat
 - Monothérapie par aciclovir
 - Arrêt antibiothérapie (2)
 - Introduction aciclovir (2)



PCR FilmArray®

Un résultat « faux négatif »

- Femme 46 ans
- J20 d'une hospitalisation pour péritonite appendiculaire
- Céphalées inhabituelles depuis 1 semaine avec œdème du pavillon de l'oreille G
- Apparition d'une paralysie faciale périphérique G motivant la consultation avec hypoacousie G
- Pas de fièvre, vomissements, ni autre anomalie clinique
- TDMc N
- CRP neg / 6 500 GB
- LCR : Protéïnorrhachie 0,53 g/l, 160 éléments 90% L, FilmArray® négatif
- ADN VZV détecté sur 1 échantillon LCR (< 10 copies/ml), non retrouvé sur la recherche sanguine
- Diagnostic final : méningoencéphalite à VZV
- Impact PCR : pas d'antibiothérapie

PCR FilmArray®

1 infection à HSV2/HHV6

- Homme de 40 ans
- 3 antécédents de méningites herpétiques (syndrome de Mollaret)
- Céphalées brutales associées à des frissons, une photophonophobie et des nausées
- Tableau identique aux épisodes précédents
- LCR : prot. 1,78 g/l, Glu. 3,1 mmol/l, 60 éléments - 60% PNN
- CRP neg / 11 780 GB
- Impact PCR : pas d'antibiothérapie

NB : Confirmation des résultats sur autres PCR HSV2 (LCR) + HHV6 (Sang)

PCR FilmArray®

4 Infections à entérovirus

- 2 hommes / 2 femmes
- Age médian : 24 ans
- Examen clinique pauvre en dehors du syndrome méningé
- Biologie : syndrome inflammatoire modéré (CRP < 20)
- LCR
 - Glycorrhachie normale
 - Protéinorrhachie normale dans 3/4 des cas
 - Cellularité prédominant à PNN dans 3/4 des cas
- Apport PCR
 - Non prescription de l'antibiothérapie (arrêt pour 2 patients)
 - Non prescription de l'aciclovir (arrêt pour 1 patient)
 - Hospitalisation limitée au traitement symptomatique

Infection à entérovirus

Ex. d'apport sur la prise en charge clinique

- Homme 43 ans sans antécédent, consultation à 20h45
- Céphalées fébriles isolées évoluant depuis 48 heures associées à des vomissements
- Examen :
 - T° 40,2
 - Syndrome méningé
 - Pas de signes cutanés
 - Pas de signes de localisation neurologique

- Examens complémentaires

	Résultats
GB	10 000 /mm ³
CRP	Négative
PCT	Négative
Protéinorachie	1,5 g/l
Glycorachie	3 mmol/l
Éléments	52 /mm ³
Formule	74% PNN, 7% L, 19% cellules

- Patient mis initialement sous Aciclovir, amoxicilline et cefotaxime à doses méningées
- Arrêt des traitements à la réception de la PCR multiplex positive à Entérovirus
- Sortie du patient le matin

Exemple d'apport sur la prise en charge organisationnelle

- PL effectuée à 6h30
- Liquide trouble
- FilmArray[®] positif rendu à 8h00 (*Streptococcus pneumoniae*)

- Changement d'équipe paramédicale à 7h00
- Changement d'équipe médicale à 8h00
 - permet une fluidité de prise en charge
 - limite le nombre d'intervenants

Coûts-bénéfices

Indicateurs à définir

- Gain médico-économique
 - Test FilmArray[®] ME : 180 €
 - Journée d'hospitalisation
 - UHTCD : 1710 €
 - Médecine : 1265 €
 - Tests complémentaires réduits
- Gain dans la prise en charge des patients
 - Isolement et traitement
 - Durée d'hospitalisation
- Organisationnel

Conclusion

- Pour le laboratoire :
 - Technique rapide, fiable
 - Facilité d'utilisation et de formation des opérateurs
- Pour le SAU :
 - Apport diagnostic rapide
 - Utilisation à bon escient (43 % de résultats positifs)
 - Diminution de l'utilisation d'antibiotiques en cas de diagnostic virologique
 - Diminution des durées d'hospitalisation (infections à entérovirus)
- Mise en place prévue dans le service de Bactériologie pour assurer les analyses de jour

Remerciements : Dr V. Lalande (Bactériologie, Hôpital St-Antoine)