



J. POLLET<sup>1</sup>, P. DESI<sup>2</sup>, C. TAHIRI<sup>2</sup>, O. GALLON<sup>1</sup>, J.-W. DECOUSSER<sup>1,\*</sup>

## Biologie moléculaire d'urgence dans un hôpital de 300 lits

### RÉSUMÉ

La démocratisation des techniques moléculaires rapides par PCR temps réel constitue une formidable avancée pour un diagnostic efficace de certaines infections dans un délai compatible avec la prise en charge des patients. Les outils aujourd'hui disponibles sont suffisamment simples et fiables pour permettre à n'importe quel laboratoire de proposer ces analyses. Le CH de Dourdan (91), hôpital général de 300 lits, a mis en place en routine la détection des entérovirus, herpes simplex virus 1 et 2 et *Mycoplasma pneumoniae* par PCR temps réel. L'impact global de cette expérience, intégrant la nécessaire refonte du service de biologie et l'investissement financier réalisé, se révèle compatible avec les logiques de la maîtrise des coûts et de l'amélioration de la qualité de la prise en charge clinique.

### MOTS-CLÉS

PCR temps réel, méningite, Entérovirus, *Mycoplasma pneumoniae*, Herpes simplex virus

### Emergency molecular biology in a 300-beds hospital

#### SUMMARY

The development of molecular tools such as Real-Time PCR constitutes a real progress in term of the laboratory contribution to clinical diagnosis. Availability of "ready for use" assays now allows implementation of such technologies in any clinical laboratory. This article reports the experience of the "Centre Hospitalier de Dourdan", a general hospital of 300 beds, in incorporating routine molecular detection of Enterovirus, Herpes Simplex Virus 1&2 and *Mycoplasma pneumoniae*. The global impact, including intra-laboratory work organisation and financial investissement appears compatible with costs-control and enhancement of health care quality.

#### KEYWORDS

Real-Time PCR, meningitis, Enterovirus, *Mycoplasma pneumoniae*, Herpes simplex virus

### I - Introduction

La place des tests de diagnostic rapide dans la prise en charge de certaines pathologies infectieuses communautaires tend à se développer, notamment depuis l'expérience très positive du dépistage rapide du Streptocoque du groupe A, réalisé au cabinet médical, dans le diagnostic des angines. Cette montée en puissance est soutenue par la rationalisation de l'utilisation des antibiotiques et la lutte nécessaire contre l'émergence et la diffusion

des bactéries résistantes. Les infections respiratoires basses et les méningites sont des pathologies communautaires dont la prise en charge en milieu hospitalier pourrait également profiter de ces tests rapides reposant dans ce cas sur la détection de l'ADN/ARN des pathogènes par réaction de polymérisation en chaîne ou PCR. Nous présentons dans cet article l'expérience du CH de Dourdan, hôpital général de 300 lits, visant à la mise en place d'une technologie de PCR en temps réel et à l'évaluation de son impact clinique et économique.

<sup>1</sup> Pôle de Biologie et d'Hygiène Hospitalière – CH de Dourdan – 2, rue du Potelet – 91415 Dourdan

<sup>2</sup> Pôle Mère-Enfant – CH de Dourdan – 2, rue du Potelet – 91415 Dourdan

\*Pour correspondance

Tél. : 01 60 81 58 92 – Fax : 01 60 81 58 97 – E-Mail : jean-winoc.decousser@wanadoo.fr

## NOTE

Cet article constitue l'adaptation de l'atelier « Biologie moléculaire d'urgence dans un hôpital de 300 lits » donné dans le cadre du 35<sup>e</sup> colloque SNBH, St-Malo (26-29 septembre 2006).

## II - Matériel et méthode

### 1. Objectif du projet

Le diagnostic étiologique des infections respiratoires basses et des méningites / encéphalites aux urgences pédiatriques était le plus souvent fondé, en sus des critères cliniques et radiologiques, sur des paramètres biologiques indirects (dosages de la CRP, procalcitonine, du fibrinogène). Dans ce contexte les pédiatres souhaitaient pouvoir disposer de tests moléculaires permettant de détecter rapidement (< 24h) la présence de l'ADN d'entérovirus, d'Herpes simplex virus type 1 et 2 dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et de *Mycoplasma pneumoniae* dans l'arbre respiratoire.

### 2. Lieu de l'expérimentation

Le Centre Hospitalier de Dourdan est un hôpital général de 300 lits, disposant d'un service de pédiatrie reconnu au niveau départemental. Ce service dispose de 16 lits installés, totalisant 1250 admissions et 4500 journées d'hospitalisation annuelles (données 2005). Une garde de pédiatrie est assurée 24h/24, totalisant en 2005 près de 5 000 consultations spécifiques aux urgences de l'hôpital.

### 3. Le choix des paramètres

Les paramètres demandés en priorité par les cliniciens et qui ont fait l'objet d'un accord entre le service de biologie et les prescripteurs sont les suivants :

- détection du virus de l'herpes de type 1 et 2 (Herpes Simplex Virus 1 et 2 / HSV 1 et 2) dans le LCR, les vésicules, le pharynx...
- détection des entérovirus dans le LCR ;
- *Mycoplasma pneumoniae*.

Ces choix ont été motivés par : (i) le recrutement actuel du service de pédiatrie, (ii) la marge d'amélioration, en terme de service rendu, existant avec les techniques de diagnostic biologique en place (iii) la disponibilité des kits. L'argumentaire est développé ci-dessous :

#### 3.1 - Détection de virus de l'herpes de type 1 et 2 (Herpes Simplex Virus 1 et 2 / HSV 1 et 2) dans le LCR, les vésicules, le pharynx...

L'encéphalite herpétique, l'herpes néonatal et l'herpes génital de la parturiente constituent des urgences thérapeutiques. Les difficultés diagnostiques liées à des présentations atypiques, à des examens complémentaires non contributifs sont à l'origine de la mise en route légitime de traitements par aciclovir le temps d'obtenir l'infirmité du diagnostic. L'encéphalite herpétique est une maladie relativement rare en France (moins de 200 cas annuels) mais dont la mortalité à 6 mois est de 22 %, stable depuis 1992. Dans cette pathologie le délai de mise en route du traitement est étroitement lié à la mortalité : le risque de décès est multiplié par 4 si le traitement est retardé de 2 à 4 jours (1). Biologiquement, l'encéphalite herpétique peut se présenter en l'absence de toute réaction méningée (absence d'élément dans le LCR). Les signes cliniques

peuvent être modérés chez les immunodéprimés et lorsque le sous-type impliqué est le HSV-2.

#### 3.2 - Détection des entérovirus dans le LCR

Les entérovirus constituent la principale cause de méningites aseptiques non seulement chez l'enfant mais aussi chez l'adulte (un quart des cas) (2, 3). Ces méningites se développent sous deux formes : celle d'épidémies saisonnières estivo-automnales dont l'importance varie selon les années, mais également celle de cas sporadiques tout au long de l'année y compris en hiver (2, 3). Leur évolution naturelle est de très bon pronostic ; la prise en charge thérapeutique se limite à l'utilisation de paracétamol. Le diagnostic biologique en urgence consiste à mesurer les paramètres sanguins d'infections (numération de leucocytes et plus particulièrement des polynucléaires neutrophiles, dosage de la protéine C activée ou CRP et éventuellement de la procalcitonine) et réaliser à partir d'un échantillon de LCR la numération et le typage des éléments présents ainsi que le dosage de la glycorrachie et de la protéinorachie. Des algorithmes décisionnels (Spanos) permettent d'évaluer la probabilité d'une méningite bactérienne. Une étude récente réalisée chez 3295 patients de moins de 19 ans a permis de valider un certain nombre de paramètres biologiques permettant d'exclure avec une très forte probabilité une méningite bactérienne (4). Néanmoins dans certains cas ce diagnostic indirect ne suffit pas à différer un traitement antibiotique à large spectre dans l'attente de la négativité de la culture bactériologique après 48 heures d'incubation. En cas d'antibiothérapie préalable à la ponction de LCR, la possibilité de devoir faire face à une méningite décapitée aboutit souvent à des demandes pressantes de recherche d'antigènes solubles dans le LCR par des techniques coûteuses (immunochromatographie pour le pneumocoque : test Now Binax® validé dans cette indication) et/ou peu sensibles (agglutination de particules de latex). Parfois des demandes spécifiques de détection de l'ADN bactérien entraînent des surcoûts considérables avec des délais de rendus de résultats parfois long (PCR méningocoque ou *Listeria*). La prise en charge de ces méningites aseptiques posent 2 problèmes supplémentaires :

- la gestion humaine des parents traumatisés par le diagnostic posé de « méningite » et interloqués par l'absence de traitement antibiotique en raison d'une étiologie « probablement virale » ;
- le risque de transmission croisée lors de l'hospitalisation prolongée de patients infectés par un virus présent en grande quantité dans la gorge et les selles.

#### 3.3 - *Mycoplasma pneumoniae*

Cette bactérie est un pathogène endémique responsable de 15 à 20 % des pneumopathies communautaires. *M. pneumoniae* est à l'origine de bouffées épidémiques qui se développent tous les 3 à 5 ans auxquelles viennent s'ajouter des épidémies localisées dans des collectivités fermées (5). La population concernée est majoritairement constituée d'enfant de 5 à 15 ans. De nombreuses manifestations extra-pulmonaires ont été décrites : centrales (6 à 7 % : encéphalite, méningite), cutanées (25 % : érythème maculopapuleux), articu-

laire, cardiaque, hématologique... Par ailleurs les propriétés pro-inflammatoires de *M. pneumoniae* lui font prêter un rôle dans l'exacerbation de certaines pathologies respiratoires comme l'asthme (5).

#### 4. Les raisons du changement

Parmi ces 3 paramètres, il convient de distinguer ceux pour lesquelles la détection du génome constituait déjà le « gold standard » et ceux pour lesquelles la technique de référence utilisée n'était pas basée à ce jour sur la biologie moléculaire.

##### 4.1 - Entérovirus et HSV 1 et 2

En 2005, 110 analyses cyto-bactériologiques du LCR ont été réalisées chez des enfants. La recherche spécifique de l'ARN d'entérovirus ou de l'ADN de virus herpès était rarement demandée (environ 10 % des demandes). Ces recherches étaient en effet sous-traitées à des laboratoires spécialisés centralisés puis dans un second temps à un centre hospitalier voisin disposant de la technologie. Malgré cette réorientation, les délais de rendus de résultats n'étaient pas satisfaisants, dépassant systématiquement, par exemple pour l'entérovirus, les 48 heures nécessaires à l'obtention des cultures bactériologiques classiques. Ce délai excessif incompatible avec la prise en charge thérapeutique avait découragé les praticiens à demander la recherche d'entérovirus. En raison des conséquences thérapeutiques, la recherche des virus HSV1 et 2 par PCR était quant à elle demandée systématiquement en cas de suspicion d'infection herpétique.

##### 4.2 - *Mycoplasma pneumoniae*

La mise en évidence de la responsabilité de cette bactérie dans un tableau clinique était réalisée de manière indirecte par la détection et le dosage des anticorps totaux et des IgM spécifiques. Cette dernière recherche était réservée à l'enfant en raison de l'absence d'élévation des IgM chez l'adulte en présence d'une forme évolutive (5). Comme toutes sérologies, son interprétation nécessitait souvent l'analyse conjointe de sérums précoces et tardifs prélevés à 3 semaines d'intervalle ; elle se heurtait également aux problèmes traditionnels de l'activation polyclonale à l'origine de réaction non spécifique et de délai de réponse immunitaire (5). Par ailleurs, la technique utilisée n'était pas basée sur la méthode de référence, la fixation du complément, et ne permettait pas une automatisation de la recherche. La littérature souligne les grandes variations de résultats en fonctions des trousseuses utilisées (6).

Localement, les résultats ainsi obtenus étaient souvent décevants tant d'un point de vue du temps de réponse que des paramètres de sensibilité et de spécificité. En 2005, 125 sérologies spécifiques de *M. pneumoniae* ont été réalisées chez 117 enfants ; les praticiens disposaient donc rarement des données nécessaires au diagnostic d'infection respiratoire à *M. pneumoniae*.

### III - Résultats

#### 1. Choix de la technologie et organisation du service de biologie.

Le choix de la technologie a été réalisé sur les critères suivants :

- Utilisation de la technologie d'amplification génique, PCR, afin de disposer d'un large éventail de paramètres disponibles, associée à une confirmation spécifique de la cible amplifiée.
- Protocole ne nécessitant pas de compétences humaines particulières en biologie moléculaire, ni de locaux supplémentaires.
- Risque limité de contamination.

La technologie de la PCR en temps réel répond à toutes ces exigences avec un gain de temps considérable par rapport la PCR « standard » (étape de révélation automatisée).

##### 1.1 - Réactifs

Les réactifs devaient satisfaire aux exigences suivantes :

- Disponibilité de trousseuses prêtes à l'emploi, avec des tests en conditionnement unitaire, stable dans le temps et disposant d'un contrôle interne d'inhibition pour chaque réaction.
- Marquage CE indispensable à terme.

##### 1.2 - Appareil

L'offre actuelle en terme d'automate de PCR en temps réel est large. Néanmoins les exigences locales ont permis d'identifier rapidement, l'appareil correspondant à nos besoins. En effet, l'appareil devait être nécessairement multiparamétrique et utilisable au « coup par coup » (« random access »), avec un temps de réponse court.

Le choix s'est donc porté sur un appareil de PCR temps réel SMART CYCLER II® (Cepheid, Sunnyvale, Etats-Unis, *note 1*) accompagné des trousseuses dédiées fournies par le fabricant de l'appareil (*voir tableau I*),

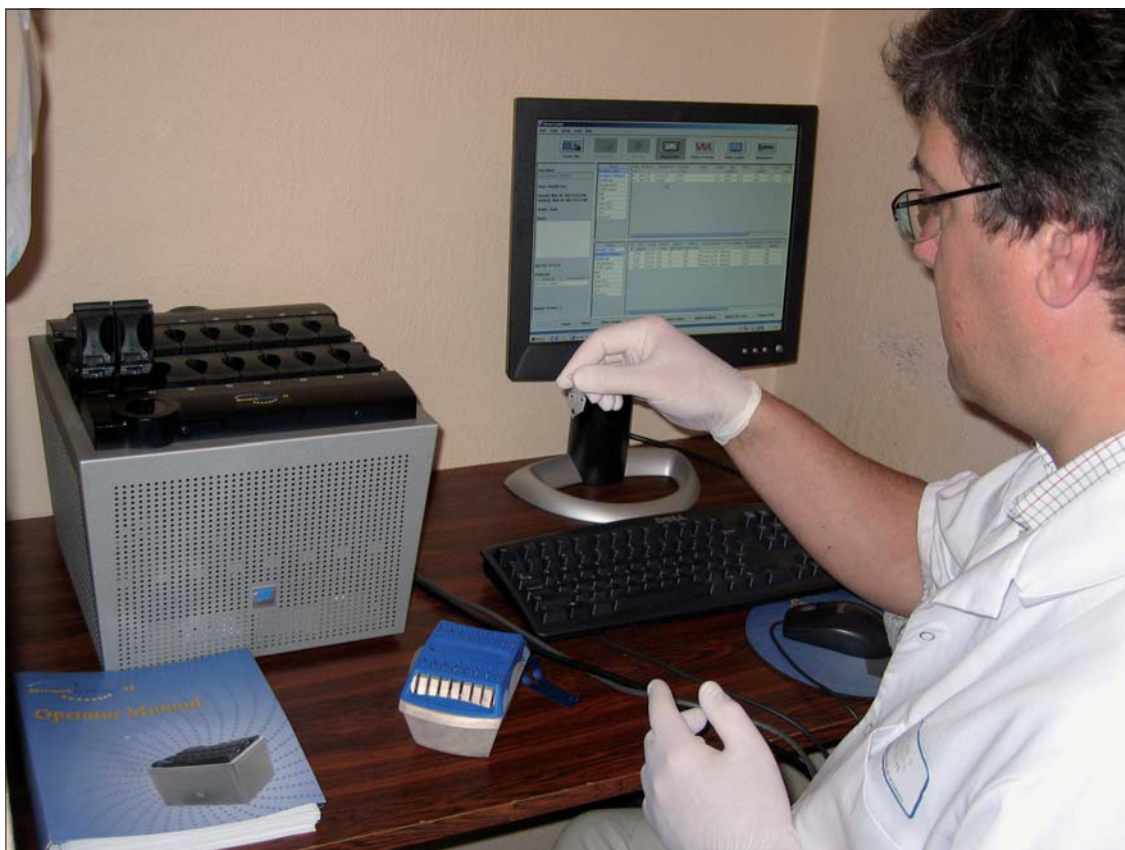
#### NOTE 1

Distribution en France :  
Instrumentation  
Laboratory France  
2, av. de Saint-Mandé - BP 35  
75560 Paris Cedex 12  
www.il-france.fr

**Tableau I**  
Les kits utilisés.

- **Enterovirus ASR Cepheid®**, précédé d'une étape de transcription inverse de l'ARN en ADN au moyen d'un kit SuperScript™ One-step RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis), son utilisation permet la détection dans le LCR des principaux entérovirus responsables de méningites à l'aide de 2 sondes spécifiques de leur région 5' non codante.
- **M. pneumoniae ASR Cepheid®**, permet la détection de *M. pneumoniae* à partir d'écouvillonnages oropharyngés à l'aide d'une sonde spécifique du gène d'adhésion P1.
- **HSV typing ASR Cepheid®**, permet la détection séparément de HSV-1 et HSV-2 à l'aide de 2 sondes spécifiques dirigées respectivement vers la glycoprotéine D et G à partir de LCR ou d'autres prélèvements (écouvillons) (7).

**Image 1**  
Système PCR  
temps réel



des kits d'extraction QIAamp ADN/ARN minikit (Qiagen, Amsterdam, Pays-Bas) et des milieux de transports (hors LCR) (*image 1*).

### 1.3 - Organisation du service de biologie

- Locaux : des pièces séparées ont été dédiées à l'extraction ADN/ARN et à la réalisation des réactions d'amplification/révélation.
  - Poste de travail et personnel : La réorganisation du laboratoire suite à la mise en place d'une chaîne pré-analytique a permis de consolider un des postes de travail dédiés à l'immunologie non urgente en incluant cette nouvelle technologie. La réalisation chaque matin des PCR est prioritaire sur cette « paillasse ». L'ajout ponctuel d'analyse dans la journée fait l'objet d'une discussion avec le clinicien en fonction du contexte clinico-biologique.
  - Formation interne : la mise en place des analyses a été réalisée par un des praticiens hospitaliers. Les techniciennes ont été ensuite formées en interne afin que le laboratoire puisse disposer d'une équipe suffisamment étoffée permettant la réalisation des analyses de biologie moléculaire en routine ; leur validation technique par une technicienne puis la validation biologique par un praticien.
- L'objectif était de ne pas réserver ce savoir-faire à quelques techniciennes spécialisées mais au contraire de démocratiser et de diffuser la réalisation pratique de ces analyses. Aucune difficulté n'a été rencontrée alors que la technologie n'existait pas dans le laboratoire. On notera toutefois que le personnel était déjà formé à la réalisation de charges virales par la technique de l'ADN branché (bDNA, sur système Versant - Bayer

Diagnostics, Etats-Unis) et à la détection des papillomavirus par hybridation moléculaire (Diagene, Reinach, Suisse). Les conditions de réalisation technique des analyses ont fait l'objet de protocoles écrits, précis et pratiques.

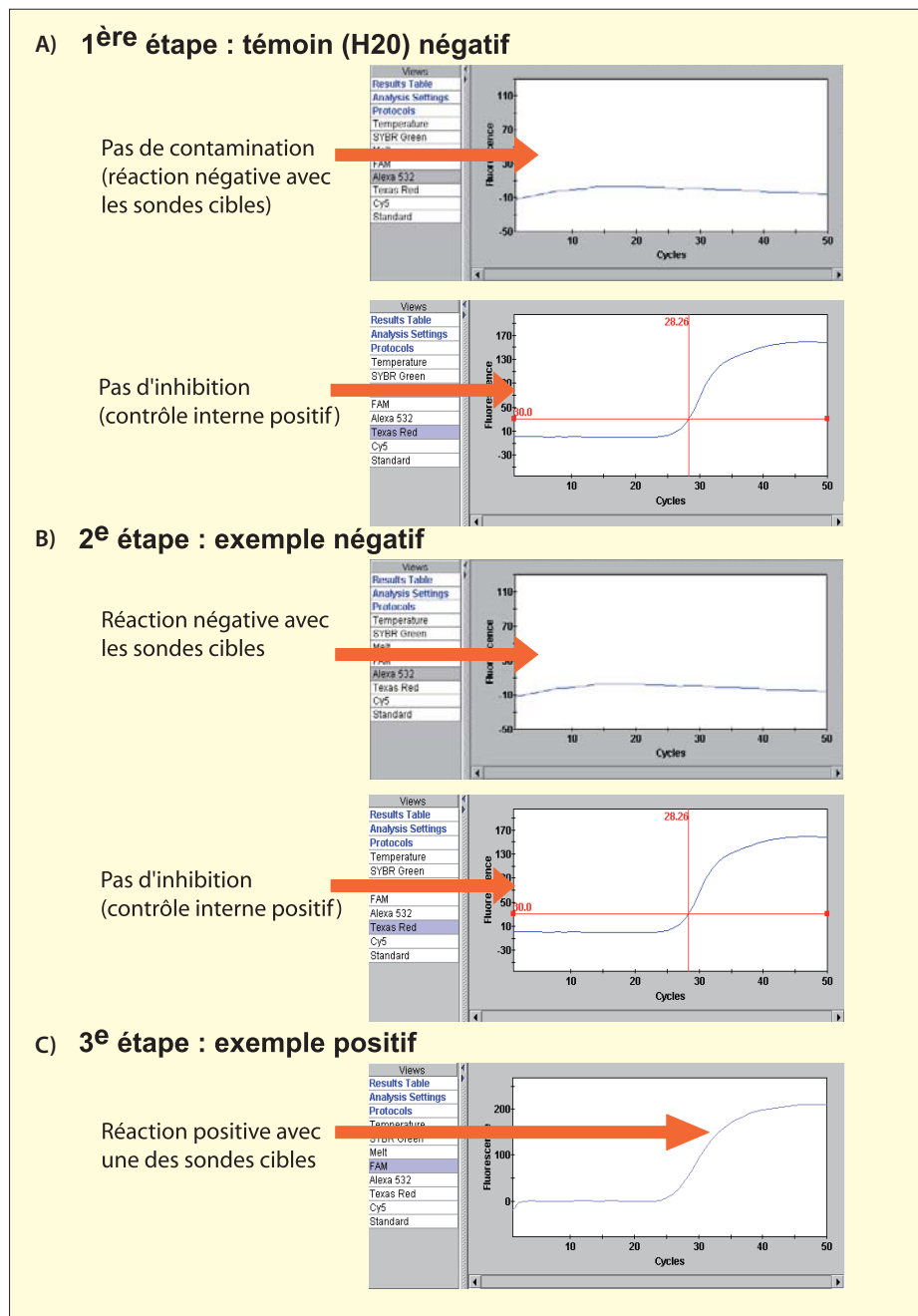
La réalisation systématique d'un contrôle négatif (fluide biologique remplacé par de l'eau distillée stérile) associé à un contrôle interne positif à chaque échantillon permet une validation simple et rapide de chaque résultat (*figure 1*). La mise en place à intervalle de temps régulier d'un contrôle d'extraction et d'un contrôle externe positif permet une validation globale de la technique. La durée globale de l'analyse est d'environ 2 heures, mobilisant le technicien pendant la phase d'extraction (30 minutes). Ceci permet un rendu de résultats dans les 24 heures suivant la demande, week-end et jours fériés exclus.

## 2. Les conséquences cliniques

Les conséquences cliniques de l'implantation de la PCR temps réel en routine dans le laboratoire sont importantes. La mise à disposition de ces tests a permis une meilleure prise en charge des enfants consultant les urgences pédiatriques pour les pathologies concernées :

- limitation de la prescription d'antibiotique
- Lors des nombreuses méningites à entérovirus et lors de pneumopathies non pneumococciques (antigène urinaire négatif) potentiellement dues à *M. pneumoniae*. Cette abstention de traitement antibiotique à large spectre (vancomycine associée au céfotaxime) ou de longue durée (14 jours de traitement par un macrolide en cas d'infections à mycoplasme) a un impact



**Figure 1**

Validation des résultats. **A)** 1<sup>ère</sup> étape : témoin (H2O) négatif, **B)** exemple d'un test négatif, **C)** exemple d'un test positif.

positif en terme de iatrogénicité médicamenteuse et de dommages écologiques collatéraux.

- Accélération de la sortie des enfants et de l'adhésion des parents aux décisions thérapeutiques :

La décision d'hospitalisation est quant à elle multifactorielle (importance de l'évolution dans le temps de la symptomatologie dans certaines situations cliniques, contexte familial...).

- Rationalisation des conduites diagnostiques :

Association de test phénotypique rapide (antigène pneumococcique urinaire) , permettant d'exclure certains pathogènes, et de recherches moléculaires ciblées, limitations des examens de seconde intention long et coûteux (PCR spécifique de la Borréliose de Lyme) sans effet délétère sur la qualité de la prise en charge du patient.

A titre d'exemple, l'Encadré I rapporte trois cas cliniques particulièrement révélateurs de l'intérêt individuel de la réalisation locale de ce type d'analyse.

### 3. Répercussions économiques

les répercussions économiques du projet ont été évaluées. L'analyse financière du projet doit inclure :

- le coût réactif et le temps technicien ;
  - l'absence de codifications de ces analyses à la nomenclature officielle des actes de biologie médicale ;
  - la réduction de la durée d'hospitalisation dans un contexte de facturation à l'activité croissante ;
  - la codification tarifaire spécifique de certaines pathologies.
- Alors qu'au niveau d'une population l'intérêt à la fois en terme de santé publique et d'économie semble

**Encadré 1: Cas cliniques****1a. Charlotte D., nouveau née âgée de 4 mois hospitalisée pour vomissements et fièvre:**

- Peu de signes généraux, CRP = 1 mg/L, transaminases normales.
- Ponction Lombaire de principe à cet âge: 83 éléments par mm<sup>3</sup> avec une majorité de lymphocytes, une biochimie normale (protéinorachie : 0,3 g/L).
- Le diagnostic d'une banale méningite virale est évoqué; devant la négativité de la PCR entérovirus obtenue dans les 12 heures, un nouvel examen clinique est réalisé et met en évidence des mouvements anormaux; un traitement par aciclovir est débuté et une PCR HSV 1 et 2 est demandée; l'enfant convulse.
- La PCR HSV revient positive à HSV-1; le traitement par aciclovir est maintenu pendant 21 jours. Le parenchyme cérébral est intact malgré cette présentation atypique d'une méningoencéphalite herpétique.

**1b. L'enfant Mattheo R. âgé de 2 ans est hospitalisé le 21/02/06 dans un tableau de pneumopathie atypique :**

- Une première sérologie *M. pneumoniae* est négative mais la PCR est positive le jour même. Le patient sort le 01/03 sous josamycine per os.
- Le contrôle de la sérologie réalisé en consultation le 06/03 montre une positivité des Ig totales anti-*M. pneumoniae* (1/5120<sup>e</sup>) et des IgM qui objectivent ce diagnostic précoce d'une infection à *M. pneumoniae* par la PCR.

**1c. Mme Nadège L. âgée de 21 ans consulte les urgences du CH de Dourdan le 24/08/06 pour syndrome méningé :**

- L'analyse de son LCR montre 12 éléments par mm<sup>3</sup> et une biochimie normale,
- Mise sous bi-antibiothérapie + aciclovir devant un tableau clinique peu rassurant,
- Le lendemain matin la PCR entérovirus revient positive, ce qui conduit à l'arrêt de tous les traitements et à la sortie de la patiente.

évidemment positif, l'analyse financière locale est moins pertinente (3, 7). Globalement, le bilan financier semble à ce jour transparent pour l'hôpital. Le « turn over » rapide des patients dans un contexte de rémunération « à la pathologie » (groupes homogènes de malades, ou GHM) est favorable à une diminution des durées de séjour, indépendamment de la libération de lits dans un contexte d'épidémie saisonnière toujours difficile à gérer. Dans l'absolu ce type de stratégie permettrait d'éviter des hospitalisations; ceci pose néanmoins le problème de l'impact de cette absence d'hospitalisation sur le financement de l'hôpital et de la prise en charge « en externe » par le patient de ces analyses non codifiées.

## IV - Discussion et perspectives

L'intérêt de ce travail repose sur la démonstration de la possibilité technique qu'ont tous les laboratoires de mettre en place des techniques de biologie moléculaires validées et sécurisées au même titre que les autres spécialités « traditionnelles ». La mise à disposition de technologie, réactifs, automate et logiciels d'interprétation permettent une démocratisation de la PCR dans des laboratoires ne relevant pas de la catégorie des laboratoires spécialisés dotés de personnels spécifiquement formés et utilisant des réactifs et des protocoles « maisons » adaptés de publications internationales (8). Le but de ce travail n'était pas d'évaluer les performances analytiques des réactifs utilisés; celles-ci ont fait l'objet de publications internationales et ne prêtent plus à discussion (9, 7, 10).

L'apport du service de biologie en terme de « services rendus » aux cliniciens et au patient semblent très positifs sur les paramètres étudiés. Des améliorations sont néanmoins souhaitables :

- Marquage CE et contrôle interne fournis dans chaque kit (en cours);
- Réalisation 24h/24, 7j/7 : ceci nécessitera l'automatisation de la phase d'extraction;
- Augmentation du nombre de paramètres disponibles afin de rentabiliser l'investissement et d'améliorer le diagnostic encore insuffisant de certaines pathologies (exemple : pneumopathies virales, pneumopathies atypiques à *Chlamydia pneumoniae*...) (11);
- Mise à disposition de kit de réactifs multiplexes incluant la détection de différents pathogènes par tableaux cliniques : « panel » méningite (entérovirus, méningocoque, pneumocoque), pneumonie (*C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, légionelles...) (12);
- Diminution du prix de revient;

Les objectifs à très court terme sont les suivants :

- Mise en place d'un système complètement automatisé : le Genexpert®. Cet appareil permet à partir du prélèvement d'avoir un résultat interprété avec uniquement 2 minutes de manipulation. Les paramètres disponibles en microbiologie sont à ce jour la détection du Streptocoque du groupe B chez la parturiente, la détection du portage du Staphylocoque doré résistant à la méthicilline (SARM) et la détection des entérovirus dans le LCR. Concernant le SARM, la mise en place de méthode rapide de dépistage maintenant parfaitement validées a permis dans certaines situations de faire diminuer l'incidence des infections hospitalières acquises à SARM (13, 14).

- Elargissement de la gamme des analyses proposées sur le Smart Cycler à la détection de *Bordetella pertussis* et *B. parapertussis*.
- Généralisation de l'utilisation de ces techniques à la pathologie adulte.

Si l'impact écologique et économique des techniques rapide de PCR semble clairement établi lors de la prise en charge des méningites à entérovirus, il est discuté pour les infections respiratoires (15, 16). Leur mise en place doit se faire avec l'adhésion des cliniciens et leur engagement à modifier leurs pratiques quotidiennes en fonction des résultats de ces nouvelles analyses. En cela, un délai de rendu des résultats inférieur à 24h semble capital et plaide pour la mise en place locale de ces techniques (17). A Dourdan, la réussite globale de l'introduction de ces techniques est au moins en partie due à la forte motivation des pédiatres. Néanmoins le problème du week-end et des jours fériés, période pendant laquelle les analyses de PCR ne sont pas réalisées, reste à résoudre. La mise en place de techniques encore moins coûteuses en temps de technicien est une étape indispensable à sa résolution. Nous pourrions ensuite passer à l'étape ultime : la réalisation en garde 24h/24, 7j/7 de ces analyses. Une autre question en suspens est l'intérêt pour certains paramètres d'augmenter de façon importante la sensibilité de détection des pathogènes. En effet, en plus de l'inconvénient qu'ont les techniques de PCR d'identifier du matériel génétique provenant de micro-organismes potentiellement non viables, la significativité de l'identification de quantité

très faible de pathogène opportuniste au sein d'un écosystème microbien reste à définir. Ceci est le cas pour le streptocoque du groupe B dont le dépistage implique, à la date de la dernière conférence de consensus, une évaluation semi-quantitative de la colonisation et ainsi du risque (18). La PCR en temps réel a une sensibilité et une spécificité en 1,5 heures comparable à celle de la culture en 48 heures (19). Cette discussion n'a pas lieu d'être dans le cadre de pathogène stricte ou de compartiment biologique indemne de toute flore. Le développement de PCR quantitative ou semi-quantitative permettrait d'appréhender cette problématique du portage asymptomatique dénué d'impact clinique (*M. pneumoniae*, Streptocoque B) (5).

## V - Conclusions

Cette expérience a été très positive pour l'ensemble des intervenants.

La disponibilité actuelle de trousse de PCR temps réel associées à un automate multiparamétrique simple d'utilisation permet l'implantation

de cette technologie dans n'importe quel laboratoire. La réorganisation du laboratoire a permis d'inclure la réalisation de ces recherches en routine et en urgence aux heures ouvrables du laboratoire, 5 jours sur 7. Les cliniciens, et plus particulièrement les pédiatres initialement très motivés, ont inclus ces tests moléculaires au sein des tests rapides déjà à leur disposition et ont adapté leurs attitudes thérapeutiques en fonction des résultats obtenus. La prise en charge de l'enfant est optimisée, en temps et en qualité. Le bilan économique est neutre dans le contexte financier actuel. L'élargissement de l'offre en terme de paramètres disponibles et la diminution des temps de rendu de résultats par l'automatisation de l'étape d'extraction permettront de développer cette activité dans un contexte d'amélioration de la qualité de la prise en charge du patient. La puissance et la simplicité des technologies disponibles ne doivent pas nous affranchir de la discussion et de la réflexion clinico-biologique sur l'utilisation et l'impact de cette démocratisation de la biologie moléculaire en biologie médicale.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) YAZDANPANA H., Données récentes sur la méningo-encéphalite herpétique. 48e journée de l'hôpital Claude Bernard, thème « les infections du système nerveux central », novembre 2005.
- (2) Centers for Disease Control and Prevention, Enterovirus surveillance – United States, 1970 – 2005. *MMWR*. 2006, 55, SS-8.
- (3) PEIGUE-LAFEUILLE H., ARCHIMBAUD C., MIRAND A., CHAMBON M., REGAGNON C., LAURICHESSE H., Du diagnostic moléculaire initial prospectif des méningites à entérovirus ... à la lutte contre l'antibiorésistance. *Med. Mal. Inf.*, 2006, 36, 124-131.
- (4) NIGROVIC LE, KUPPERMANN N., MACIAS CG, CANNIVINO CR, Moro-Sutherland DM, Schremmer RD, Schwab SH, Agrawal D, Mansour KM, Bennett JE, Katsogridakis YL, Mohseni MM, Bulloch B, Steele DW, Kaplan RL, Herman MI, Bandyopadhyay S., Dayan P, Truong UT, Wang VJ, Bonsu BK, Chapman JL, Kanegaye JT, Malley R; Pediatric Emergency Medicine Collaborative Research Committee of the American Academy of Pediatrics, Clinical prediction rule for identifying children with cerebrospinal fluid pleocytosis at very low risk of bacterial meningitis. *JAMA*. 2007, 297, 52-60.
- (5) WAITES KB, TALKINGTON DF, *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, 17, 697-728.
- (6) NIR-PAZ R., MICHAEL-GAYEGO A., RON M., BLOCK C., Evaluation of eight commercial tests for *Mycoplasma pneumoniae* antibodies in the absence of acute-infection. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2006, 12, 685-688.
- (7) RAND K., HOUCK H., LAWRENCE R., Real-time PCR detection of herpes Simplex Virus in cerebrospinal fluid and cost savings from earlier hospital discharge. *J. Mol. Diagn.*, 2005, 7, 511-516.
- (8) DORVAL I., GEFFROY F., Microbiologie, PCR en temps réel en routine : applications « maison » ou trousse ? *Spectra Biologie*, 2006, 25, 154, 39-43.
- (9) PODZORSKI RP, Evaluation of the Cepheid herpes simplex virus typing real-time PCT assay using dermal and genital specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2006, 56, 173-177.
- (10) KOST CB, ROGERS B., OBERSTE MS, ROBINSON C., EAVES BL, LEOS K., DANIELSON S., SATYA M., WEIR F., and NOLTE FS *et al.*, Multicenter beta trial of the GeneXpert enterovirus assay. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45, 1081-1086.
- (11) CHOI EH, LEE HJ, KIM SJ, EUN BW, KIM NH, LEE JA, LEE JH, SONG EK, KIM SH, PARK JY, SUNG JY, The association of newly identified respiratory viruses with lower respiratory tract infections in Korean Children, 2000-2005. *Clin. Inf. Dis.*, 2006, 43, 585-592.
- (12) STRALIN K., TORNQVIST E., KALTOFT MS, OLCEN P., HOLMBERG H., Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44, 643-645.
- (13) HARBARTH S., MASUET-AUMATELL C., SCHRENZEL J., FRANCOIS P., AKAKPO C., RENZI G., PUGIN J., RICOU B., PITTET D., Evaluation of rapid screening and-pre-emptive contact isolation for detecting and controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critical care: an interventional cohort study. *Crit. Care*, 2006, 10, R25.
- (14) TENOVER FC, Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. *Clin. Inf. Dis.*, 2007, 44, 418-423.
- (15) NOLTE FS, Case studies in cost effectiveness of molecular diagnostics for infectious diseases: pulmonary tuberculosis, enteroviral meningitis, and BK virus nephropathy. *Clin. Inf. Dis.*, 2006, 43, 1463-1467.
- (16) OOSTERHEERT JJ, VAN LOON AM, SCHUURMAN R., HOEPELMAN AI, HAK E., THIJSEN S., NOSSENT G., SCHNEIDER MM, HUSTINX WM, BONTEN MJ, Impact of rapid detection of viral and atypical bacterial pathogens by real-time polymerase chain reaction for patients with lower respiratory tract infection. *Clin. Inf. Dis.*, 2005, 41, 1438-1444.
- (17) MURDOCH DR, Impact of rapid microbiological testing on the management of lower respiratory tract infection. *Clin. Inf. Dis.*, 2005, 41, 1445-1447.
- (18) ANAES, Prévention anténatale du risqué infectieux bactérien neonatal précoce. 2001. Service recommandations et références professionnelles.
- (19) BERNADET M., BOURGEOIS-NICOLAOS N., GRESSIER F., FAVRE C., PANEL P., BUTEL MJ, DOUCET POPULAIRE F., Comparaison of real-time PCR assay and culture on Granada medium for detection of group B streptococci from rectovaginal swabs. 26e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, 2006, *Abstract* 157/390.