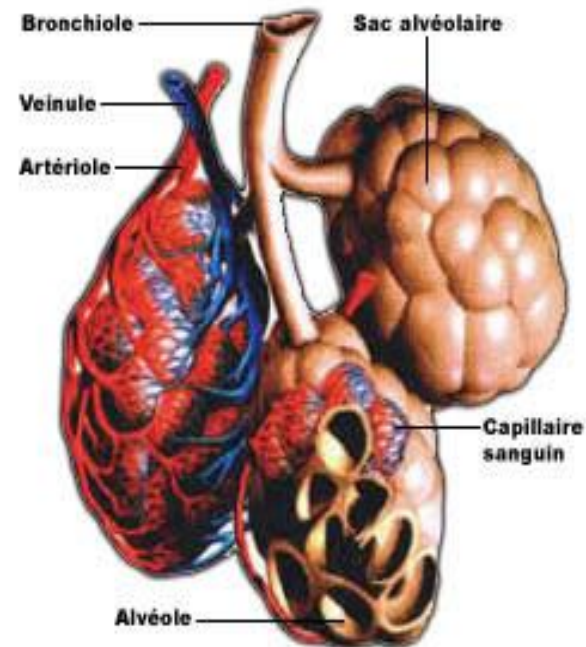


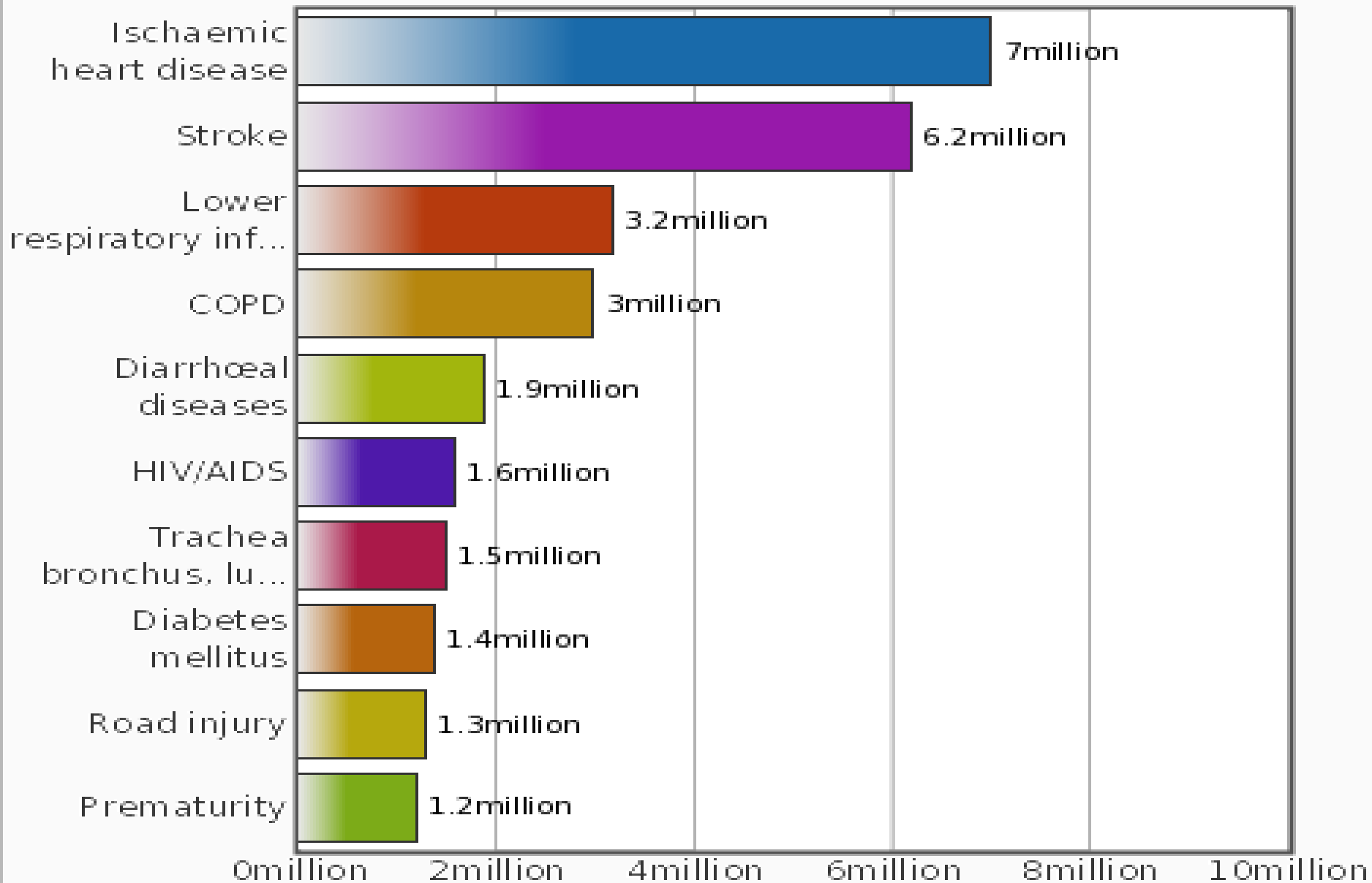
# Diagnostic microbiologique au cours des Bronchiolite et Pneumonie

Pr H. ZIANE

Service de microbiologie médicale, CHU Mustapha  
Samedi pédagogique, 14 avril 2018



## The 10 leading causes of death in the world 2011



# Infections respiratoires basses

Morbi-mortalité importante  
Problème de santé publique

Gravité des infections virales: épidémies/pandémie de grippe

Source de prescription des antibiotiques

Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques pneumocoque

Diversité étiologique: virus, bactéries (classiques, atypiques),...

Epidémiologie: partiellement établie

Vaccination

# À savoir      **Arbre respiratoire**

Flore commensale respiratoire « microbiote »

## **Infections respiratoires**

- Plusieurs Tableaux cliniques
- Agents étiologiques divers
- Diagnostic non systématique
- Indications
- Plusieurs techniques
- Interprétation difficile
- Association de plusieurs techniques

# Flore respiratoire et complexité des phénomènes

Tableau 1 Flores commensales prédominantes des voies aériennes supérieures

	Flore de la muqueuse buccale	Flore salivaire	Flore du pharynx	Flore des fosses nasales	Flore du conduit auditif
<i>Streptococcus salivarius</i>	+++	+++	++		
Autres streptococcus alpha hémolytiques	+++	++	++	+	
Bactéries anaérobies	++	+	++		
<i>Haemophilus</i>			+		
<i>Neisseria</i>			++	+	
<i>Moraxella</i>			++		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				+++	+++
Corynébactéries				++	+++
<i>Micrococcus</i>					++

A ces germes commensaux, s'ajoutent en petite quantité des bactéries en transit : entérobactéries, *Pseudomonas*  
**Certains sujets sont porteurs de germes potentiellement pathogènes comme *Staphylococcus aureus* au niveau des fosses nasales (un tiers des individus) et *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* au niveau du pharynx.**

# Flore respiratoire et complexité des phénomènes

- Voies respiratoires y compris le poumon non stériles  
(Protéobactéries, Firmicutes, Bacteroidetes)
- Flore dynamique: plusieurs facteurs  
(ethniques et environnementaux)
- Relation avec le microbiote intestinal
- Étude: implications thérapeutiques

**Au cours d'une bronchiolite**

**Au cours d'une pneumonie**

**Y a t'il indication du diagnostic microbiologique?**

# Au cours d'une bronchiolite

## Diagnostic microbiologique

### Non

- Non systématique
- Origine virale\*\*\*
- Peu d'implications thérapeutiques

### Oui

- Formes sévères
- Mise en route d'un traitement antiviral (anti grippe, anti VRS)
- Surinfections bactériennes
- Données épidémiologiques\*\*



# Au cours d'une pneumonie

## Diagnostic microbiologique

### Non

- Formes bénignes
- Sensibilité (+/-) des prélèvements non invasifs
- Difficulté de réalisation des prélèvements invasifs
- Différentes techniques: sensibilité et disponibilité
- 25-50% sans agents identifiables
- Urgence thérapeutique?

### Oui

- Formes sévères\*\*
- Place des bactéries\*
- Mise en route d'une antibiothérapie adaptée
- Surveillance de la résistance aux antibiotiques
- Données épidémiologiques\*\*

# Virus et Infections Respiratoires

Au moins 200 virus, classés dans six familles

- *Rhinovirus*
- *Enterovirus*

## ***Picornaviridae***

30 nm, non-enveloppé,  
RNA (+, SS, 7kb)

- *Influenza A, B, C*

## ***Orthomyxoviridae***

120 nm, enveloppé,  
RNA (-, 8SS, 14kb)

- *RSV A & B*
- *hMPV, Rougeole*
- *Parainfluenza (1 à 4)*

## ***Paramyxoviridae***

150-160 nm, enveloppé,  
RNA (-, SS, 15kb)

- *HCoV-229E*
- *HCoV-OC43*
- *HCoV-SARS*

## ***Coronaviridae***

100-120 nm, enveloppé,  
RNA (+, SS, 30kb)

- *Adenovirus*

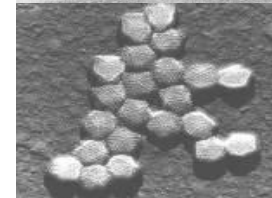
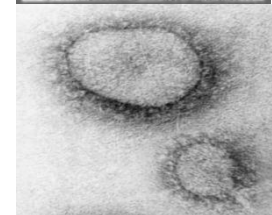
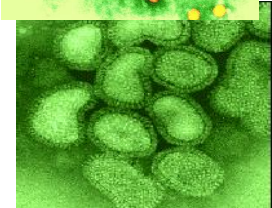
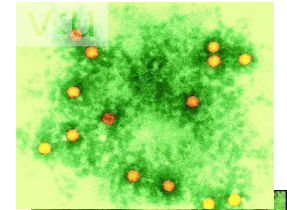
## ***Adenoviridae***

70-90 nm, non-enveloppé,  
DNA (DS, 36kb)

- *HSV1 et HSV2*
- *CMV*
- *EBV*

## ***Herpesviridae***

120-200 nm, enveloppé,  
DNA (DS, 124-235kb)



# Virus et Infections Respiratoires

## Virus respiratoires classiques

- Virus de la grippe A/B
- Virus parainfluenza 1,2,3
- Virus respiratoire syncytial
- Adénovirus (51)
- Rhinovirus (100)

## Virus respiratoires opportunistes terrain favorisant

- herpes simplex
- cytomegalovirus
- Adenovirus

## Post éruptifs

- virus de la varicelle
- virus de la rougeole

## Virus respiratoires émergents

Coronavirus : SARS, NL63, HKU1

Metapneumovirus humain (1, 2)

Bocavirus

Polyomavirus KI; WU

- Identifiables par les outils moléculaires
  - virus influenza C
  - Virus parainfluenza 4
  - Rhinovirus (100)
  - Coronavirus OC43, 229E,
  - Enterovirus (#10)

# Virus et variabilités génétiques

Variations génétiques= nouveaux variants (virus Influenza\*\*\*)

## **Le drift antigénique ou glissement antigénique ou encore dérive antigénique**

- Changement antigénique par mutations successives

## **Le shift antigénique ou cassure antigénique**

- Virus à génomes segmentés

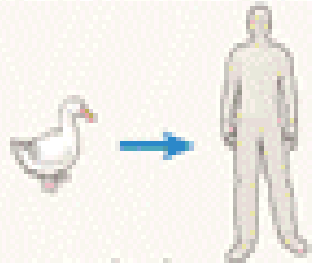
- Echange de segments génomiques ou réassortiments génomiques entre deux virus de la même espèce mais différents antigéniquement, co-infectant simultanément une même cellule (échanges au cours de l'infection du cochon par un virus grippal A humain et un virus grippal A aviaire).

## **La recombinaison génétique**

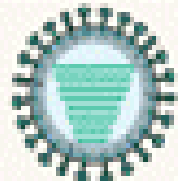
- Echange entre deux génomes ou segments génomiques viraux.

1918 "Spanish influenza" → 1957 "Asian influenza" → 1968 "Hong Kong influenza" → Next pandemic influenza

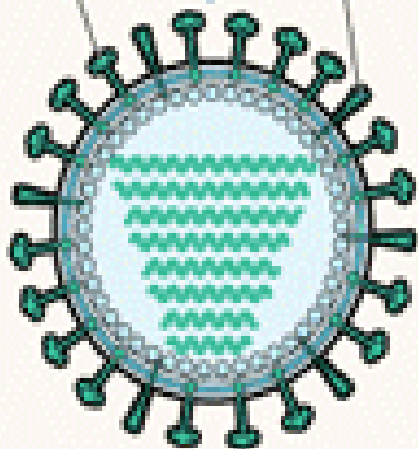
### H1N1 influenza virus



Bird-to-human transmission of H1N1 virus

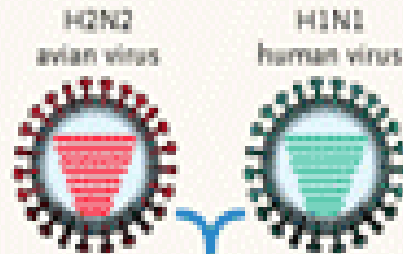


Hemagglutinin      Neuraminidase

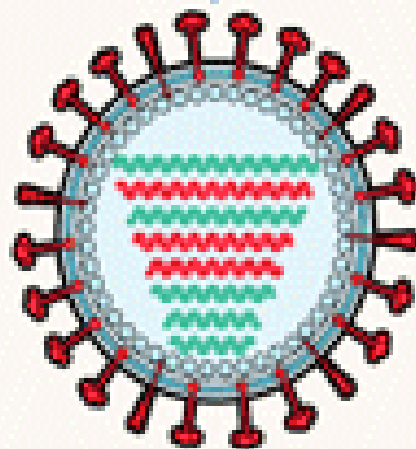


All 8 genetic segments thought to have originated from avian influenza virus

### H2N2 influenza virus



Reassortment

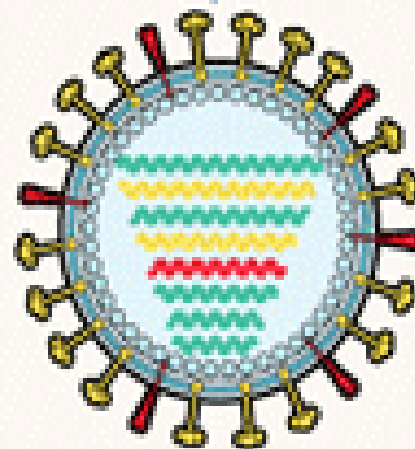


3 new genetic segments from avian influenza virus introduced (HA, NA, PB1); contained 5 RNA segments from 1918

### H3N2 influenza virus



Reassortment



2 new genetic segments from avian influenza virus introduced (HA, PB1); contained 5 RNA segments from 1918



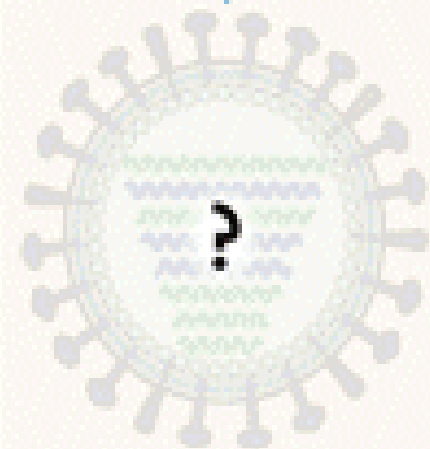
Avian virus

or



Avian virus

H3N2 human virus



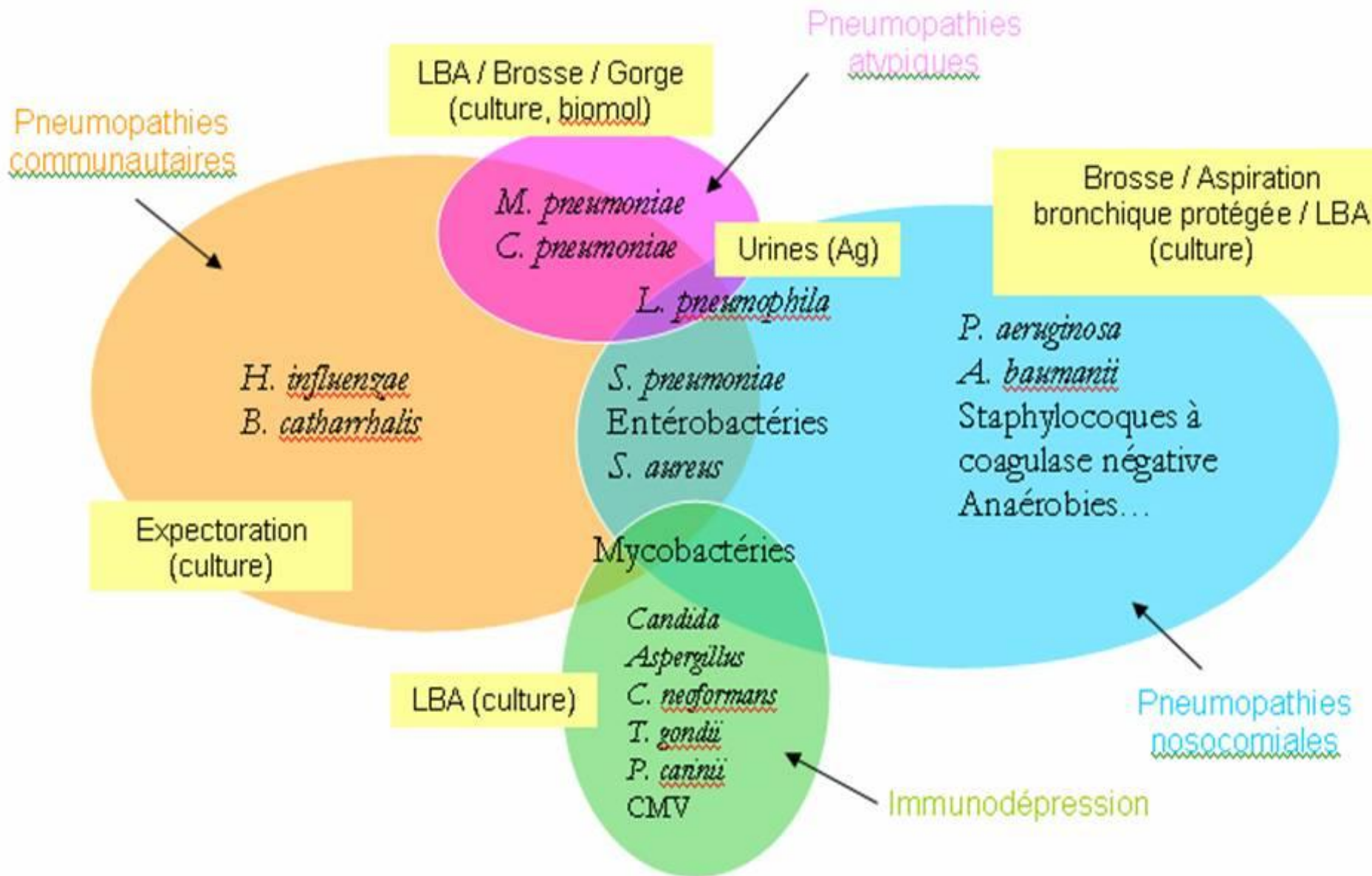
All 8 genes new or further derivative of 1918 virus

Syndromes	Causes virales	Caractéristique majeure
Rhinites  Pharyngites	<i>Coronavirus</i> <i>Metapneumovirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Virus para-influenza</i> <i>Metapneumovirus</i> <i>Virus influenza</i> <b>VRS</b> <b>EBV</b> <b>HSV</b> <i>Coxsackievirus A</i> <i>autres entérovirus</i> <i>Rhinovirus</i>	Rhume commun
Laryngite Bronchite <b>Bronchiolite</b>	<i>Virus para-influenza</i> <i>Virus influenza</i> <b>VRS</b> <b>Metapneumovirus</b> <i>Adénovirus</i> <i>virus de la Rougeole</i> <i>Rhinovirus</i> <i>Coronavirus</i>	<b>Bronchiolite du nourrisson</b>

## Syndromes cliniques respiratoires

Syndromes	Causes virales	Caractéristique majeure
<b>Pneumopathie</b>	<b>Virus influenza</b> <i>Adénovirus</i> <b>VRS</b> <i>Metapneumovirus</i> <b>Coronavirus</b> <i>Virus para-influenza</i> <i>Rhinovirus</i>	<b>Grippe</b>       <b>SRAS</b> (syndrome respiratoire aigu sévère)
<b>Pneumopathie dans contexte particulier</b>	<i>Virus de la:</i> <i>Rougeole</i> <i>Varicelle</i> <i>Cytomegalovirus</i> <i>Hantavirus</i>	

# Etiologies bactériennes des pneumopathies



# Quels examens microbiologiques?

**Pourquoi?**

**&**

**Comment?**



# Examens microbiologiques

## Pourquoi?

- Réévaluation de la place des pathogènes:  
actualiser les données épidémiologiques
- Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques : consensus thérapeutiques nationaux
- Etude de la résistance aux antiviraux (+/-)
- Détection de nouveaux variants (ex: prévention des épidémies/pandemie de grippe)
- Adaptation de la prise en charge thérapeutique:  
ATBs, ATVs, Vaccins\*

# Examens microbiologiques

## Comment ?

### Diagnostic direct

Mise en évidence de l'agent pathogène ou l'un de ses constituants:  
antigènes, génome

1. Méthodes classiques
2. Biologie moléculaire

Plusieurs prélèvements  
Plusieurs techniques

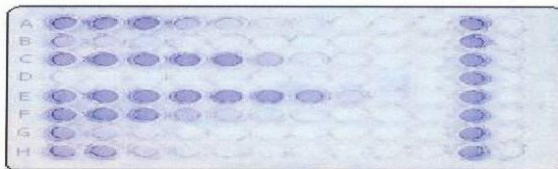
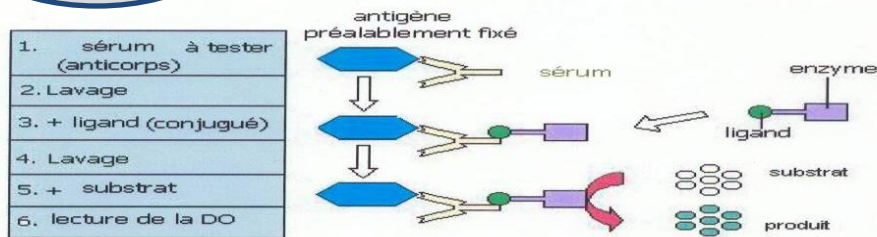
### Diagnostic indirect

Mise en évidence de la réponse à l'infection:  
recherche des anticorps

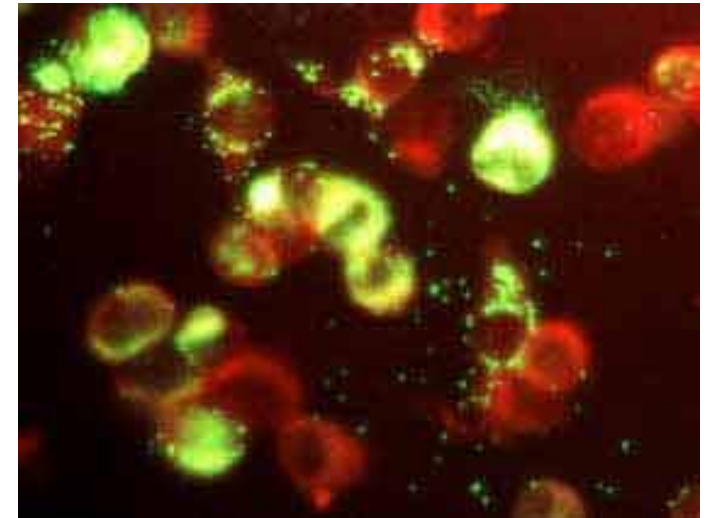
Sérologie

Deux sérums à 2-3  
Semaines d'intervalle

# Sérologie



TECHNIQUE ELISA



Sérologie (IFI)

- un diagnostic différé dans le temps: rétrospectif
- interprétation difficile
- statut immunitaire d'une population « épidémiologie »
- quantification des anticorps dans le sérum du patient
- efficacité d'un vaccin

Sérologie virale, sérologie bactérienne (*M.pneumoniae*, *C.pneumoniae*,..)

# Diagnostic direct

## Les prélèvements

### Recherche virale

- recueillis le plus tôt possible
- aspiration des mucosités du nasopharynx (une sonde)
- aspiration bronchique
- écouvillonnage pharyngé
- doivent être acheminés rapidement au laboratoire à basse température (milieux de transport)
- gardés éventuellement à -70°C.

### Recherche bactérienne

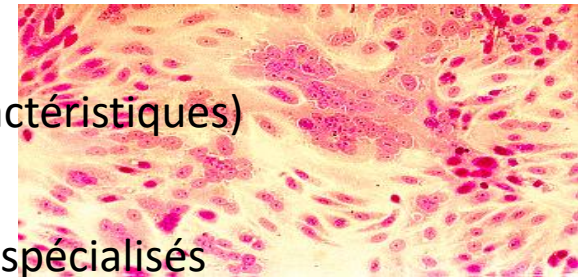
- recueillis le plus tôt possible, sans ATBs\*
- conditions de prélèvements (asepsie, modalités)
- prélèvements respiratoires:  
expectoration, LBA, AB, PDP, ...
- hémoculture \*\*
- autres: LP, sérum, urines (+/- enft),...
- doivent être acheminés rapidement au laboratoire
- modalités de conservation à respecter pour chaque prélèvement

# Diagnostic direct

## 1. Méthodes classiques

### 1. Isolement du virus sur cellules

- Nécessité de plusieurs cellules : spécificités virales (ECP caractéristiques)
- Virus non cultivables ou difficilement cultivables
- Méthode laborieuse et coûteuse, réservée aux laboratoires spécialisés
- Méthode de choix pour étude et caractérisation des virus

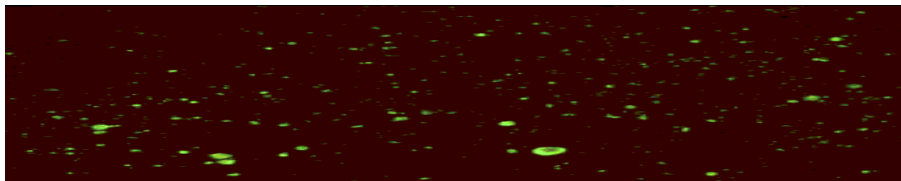


ECP VRS: forme des syncytia

### 2. La détection rapide des antigènes viraux ou bactériens par :

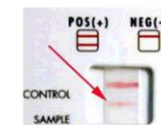
immunofluorescence\* ou immuno chromatographie

- Technique de choix sur le plan coût et rapidité du diagnostic.
- Sensibilité du test
- Qualité du prélèvement \*pour la validation



RECHERCHE D'ANTIGÈNES PAR TECHNIQUES IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES (SUITE)

o Recherche d'antigènes solubles pneumocoque



# Diagnostic direct

## 1. Méthodes classiques

### 3. Étude cyto bactériologique

- Nécessité de plusieurs prélèvements (valeur diagnostic variable)
- Bactéries non cultivables ou difficilement cultivables
- Examen direct, mise en culture, étude de la sensibilité aux antibiotiques
- Méthode de pratique courante
- Etude quantitative des prélèvements respiratoires
- Méthode de référence pour étude des bactéries, et leur sensibilité aux antibiotiques
- Délai de réponse  $\geq 72$ h

# Problématique

## Diagnostic bactériologique de la pneumonie

### - Valeur diagnostic

Selon méthode diagnostic mise en place: 15 – 66%

Selon type de prélèvement: 25 % LBA, 21% brosse protégée, ECBC 33%, , hémoculture 0,5 à 27 %

Fragilité et/ou exigence nutritive des agents pathogènes

- Difficultés des prélèvements invasifs

- Diversité étiologique, variété des techniques Dc, toutes non disponibles

- 25-50% sans agents identifiables

# Diagnostic direct

## 2. Biologie moléculaire

ADN (PCR) ou ARN (RT-PCR)

- Plusieurs techniques: classique, temps réel\*\*
- Sensibilité
- Rapidité de la réponse <24h voire 6h
- Multiplex\*\* (plusieurs virus, plusieurs bactéries,..)
- Bactéries non ou difficilement cultivables
- Difficulté d'interprétation; portage\*
- Coût



# Culture+CerTest+PCR

Non identifiée	Un pathogène	coïnfection
12	08	12
37.5%	25 %	37.5%
		62.5%

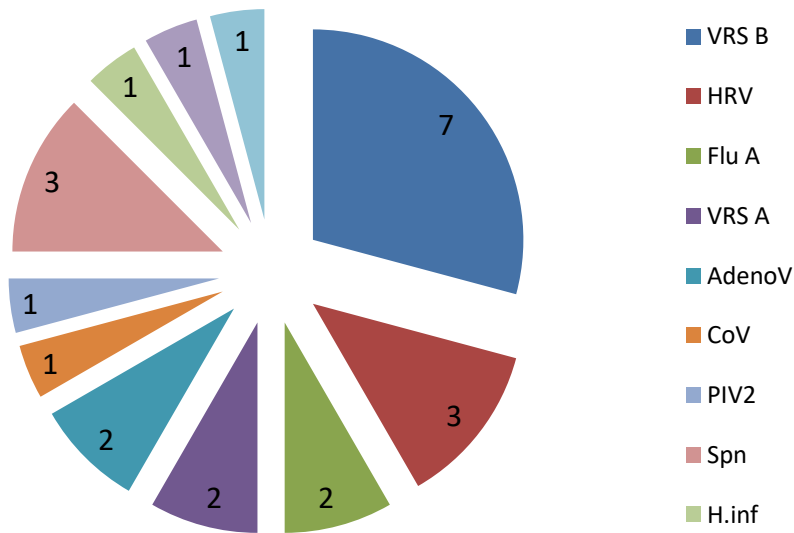


Fig 4: étiologie des pneumonies chez nourrisson

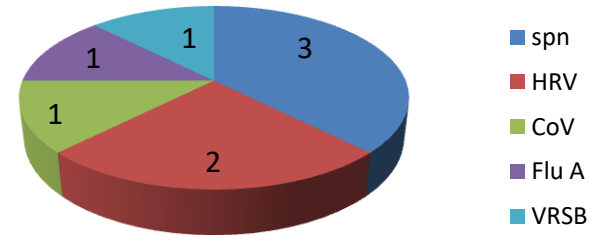


Fig 5: étiologie des pneumonies chez >2ans

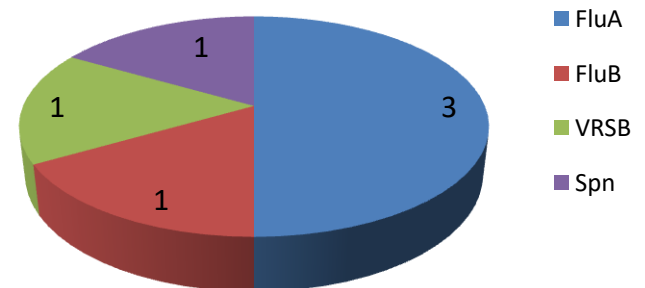


Fig 6: étiologie des pneumonies chez adulte


# Culture+CerTest+PCR

Taux de positivité PCR: 31.5 % (10/32)

PCR / culture négative: 33.3% (4/12)

Dc étiologique : 62.5% ( 50-75%)

Virale: 56.2% (22-30% ) >> bactérienne : 31.5%

- PCR bactérienne < PCR viral
- Période d'étude : février -avril 2011
- Sensibilité de la PCR : 29% virus sujets asymptomatiques, 40% enfants<14 ans
- Co-infection: 2.8%  26.5%

# Conclusion

## Dans la bronchiolite et la pneumonie Diagnostic microbiologique

1. Réévaluer la place des pathogènes
2. Suivre l'évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques
3. Adaptation thérapeutique
4. Détection de « nouveaux » pathogènes

Prélèvements précoces

Large panel de virus et bactéries à détecter

Bon choix des techniques

Association de plusieurs techniques

Collaboration clinico-microbiologique