



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

 www.em-consulte.com



Importance de la PCR dans la gestion d'une épidémie à *Mycoplasma pneumoniae* au centre hospitalier de Béthune (Pas-de-Calais)

Usefulness of PCR test for the management of a Mycoplasma pneumoniae outbreak in Bethune Hospital (Pas-de-Calais, France)

S. Dekeyser^{a,*}, C. Bonnel^b, A. Martinet^b, D. Descamps^a

^a Laboratoire, centre hospitalier de Béthune, rue Delbecque, 62408 Béthune, France

^b Service de pédiatrie, centre hospitalier de Béthune, rue Delbecque, 62408 Béthune, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 9 juillet 2010

Accepté le 29 juillet 2010

Disponible sur Internet le 6 septembre 2010

Mots clés :

Infection respiratoire

Mycoplasma pneumoniae

PCR

Sérodiagnostic

R É S U M É

Objet. – La biologie moléculaire (PCR) constitue une aide rapide et spécifique pour le diagnostic différentiel des infections respiratoires à mycoplasme, première cause de pneumonies communautaires chez l'enfant de plus de cinq ans.

Méthode. – Positivité de la PCR (Chlamylège[®], Argène) (aspiration nasopharyngée, prélèvements respiratoires, écouvillonnage nasopharyngé) et/ou du sérodiagnostic (Elisa).

Résultats. – Trente-neuf cas diagnostiqués : 31 entre septembre et décembre 2008 (30 enfants et un adulte) et huit depuis juin 2009 (trois adultes et cinq enfants). Les enfants (âge moyen : 3,6 ans) ont été hospitalisés dans 88,6 % des cas pendant 2,9 jours pour atteinte respiratoire haute ou basse, avec surtout échec de traitement aux β -lactamines (65,7 % des cas). Les quatre adultes (âge moyen : 29,5 ans) ont présenté une pneumopathie, avec hospitalisation pour trois d'entre eux dont un en réanimation. Vingt-huit PCR sur 32 se sont avérées positives (87 %) : sans sérologie associée (13), sérologies négatives (huit), IgG et IgM positives (cinq) et IgG seules (deux). Pour sept patients, seule la sérologie a été réalisée : IgM \pm IgG. Pour deux enfants, IgM positive isolément, avec une PCR probablement faussement négative (prélèvement paucicellulaire).

Conclusion. – La sensibilité de la sérologie dans le diagnostic des infections à mycoplasmes reste limitée : les IgM qui apparaissent généralement une semaine après le début des signes cliniques sont le plus souvent absentes chez l'adulte et élévation tardive des IgG. Le diagnostic précoce des pneumopathies de l'enfant par PCR a permis de caractériser rapidement ce phénomène épidémique et d'adapter les thérapeutiques.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

A B S T R A C T

Keywords:

Respiratory tract infections

Mycoplasma pneumoniae

PCR

Serological test

Subject. – Molecular amplification (PCR) provides adequate rapid and specific diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection (first agent responsible for community-wide bacterial pneumonia in children above 5 years of age).

Method. – Positive (Chlamylège[®], Argène) PCR in nasopharyngeal aspirate, respiratory samples and nasopharyngeal swab and/or positive serological test (ELISA).

Results. – Diagnosis of *M. pneumoniae* infection in 39 cases: 31 between September and December 2008 (30 children and one adult) and eight since June 2009 (three adults and five children). Children (mean age: 3.6 years) were hospitalized in 88.6% of cases, mean hospitalization duration was 2.9 days for respiratory tract infections, mainly due to lack of response to β -lactamines therapy (65.7%). Four adults (mean age: 29.5 years) presented a pneumonia, with hospitalization for three of them with one in intensive care unit. Twenty-eight PCR have proved positive (87%): without associated serology (13), eight negative serologies, IgG and IgM positive (five), and IgG alone (two). Seven patients had only serological test for diagnosis: IgM \pm IgG. For two children, IgM positive only in isolation, with a PCR probably false negative.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : sdekeyser@ch-bethune.fr (S. Dekeyser).

Conclusion. – The sensitivity of the serology in the diagnosis of mycoplasma infection is limited: IgM, which appear traditionally 1 week after clinical signs are mostly inexistent for adults and IgG rise at a later stage. Early diagnosis of child pneumoniae by PCR helped rapidly characterize this epidemic phenomenon and adapt the treatment.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Mycoplasma pneumoniae est une bactérie intracellulaire humaine à tropisme respiratoire, capable de pénétrer à l'intérieur des cellules de l'épithélium respiratoire grâce à l'adhésine P1 et de s'y multiplier lentement tout en limitant l'activité ciliaire [1]. Cette bactérie n'appartient pas à la flore commensale des voies respiratoires mais peut cependant y persister plusieurs semaines.

Les infections à *M. pneumoniae* représentent 15 à 20 % des pneumonies communautaires de l'adulte, en deuxième position après *Streptococcus pneumoniae*. Ce taux peut atteindre 40 % chez l'enfant et constitue la première cause des pneumopathies communautaires chez les plus de cinq ans [2]. Les manifestations cliniques observées sont très hétérogènes : asymptomatiques, infections hautes (otites, sinusites, rhinopharyngites) et basses (pneumopathies, trachéobronchites). Leur évolution reste favorable le plus souvent mais des cas de pneumopathies sévères ont été décrits avec détresse respiratoire potentielle et mise en jeu du pronostic vital [3]. Le rôle de ce pathogène est également établi dans l'exacerbation aiguë de crises d'asthme et dans l'entretien de l'asthme chronique. Des formes extrapulmonaires atypiques ont également été décrites : atteinte cutanée (éruption vésiculeuse et érythème polymorphe), neuroméningée (complications les plus graves : méningo-encéphalites, syndrome cérébelleux) et myopéricardite. Une co-infection virale est observée dans 15 à 20 % des cas : le virus respiratoire syncytial est le plus fréquemment retrouvé, mais aussi des *Rhinovirus*, *Enterovirus*, influenza, para-influenza et *Coronavirus* [3].

Cette infection est partiellement immunisante : l'immunité acquise ne dure que deux à dix ans avec une moyenne à quatre ans. Elle évolue sur un mode endémique en période estivo-hivernale avec des pics épidémiques tous les quatre à sept ans, souvent précédés d'une chute significative de la prévalence et du taux moyen d'IgG. Il est essentiel d'effectuer un diagnostic différentiel avec les viroses (largement majoritaire avant l'âge de trois ans) à l'aide d'outils diagnostics fiables et rapides associés à un faisceau d'arguments cliniques et radiologiques.

2. Méthode

Trente-neuf infections à mycoplasme ont été diagnostiquées entre septembre 2008 et août 2009 en présence d'une PCR et/ou d'un sérodiagnostic positifs associés à des arguments cliniques et/ou radiologiques évocateurs.

2.1. PCR (trousse Chlamylège[®], Argène)

2.1.1. Principe

Cette trousse permet le dépistage et l'identification simultanée par amplification génique de *M. pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Legionella sp.* sur aspirations nasopharyngées chez les enfants, prélèvements respiratoires ou écouvillonnage nasopharyngé chez les adultes.

2.1.2. Extraction, amplification et révélation

Un ADN purifié est obtenu par lyse de l'échantillon par une protéase et élution sur colonne. Un fragment de 299 paires de base est amplifié au niveau du gène codant pour l'adhésine P1 de *M. pneumoniae*. Pour chaque échantillon, amplification avec un pré-mix d'amplification et un pré-mix d'inhibition (recherche d'inhibiteurs en systématique) associé à un témoin négatif et un témoin positif plasmidiques en parallèle.

Après dénaturation chimique des produits amplifiés, la révélation est effectuée en microplaques avec une sonde générique biotinylée, un conjugué streptavidine/peroxydase couplé à un substrat TMB (tétraméthylbenzidine), lecture à 450 nm. Un témoin négatif de révélation permet de calculer la valeur seuil.

En présence d'un résultat positif, l'identification est réalisée dans un second temps avec des sondes spécifiques de *M. pneumoniae*.

2.2. Sérodiagnostic (trousse EIA Diasorin IgG et IgM)

Technique semi quantitative qui permet la recherche des IgG et des IgM du sérum par technique Elisa. Des antigènes natifs purifiés sont fixés sur les puits de la microplaque, la révélation des IgG et des IgM est effectuée par des anticorps de chèvre anti-IgG et IgM, conjugués à la peroxydase de Raifort. Pour la recherche des IgM, un adsorbant est ajouté pour éliminer les IgG et les facteurs rhumatoïdes présents. Cette analyse est externalisée dans un autre laboratoire.

3. Observations

De septembre 2008 à août 2009, 39 infections à *M. pneumoniae* ont été diagnostiquées en deux vagues : 30 enfants et un adulte de septembre à décembre 2008, trois adultes et un enfant de juin à août 2009. L'âge moyen des enfants est de 3,6 ans (trois mois à 14 ans) et 29,5 ans pour les adultes (16 à 37 ans). La cellule interrégionale d'épidémiologie (CIRE) du Nord-Pas-de-Calais a été alertée en octobre 2008 pour enquête épidémiologique (Fig. 1).

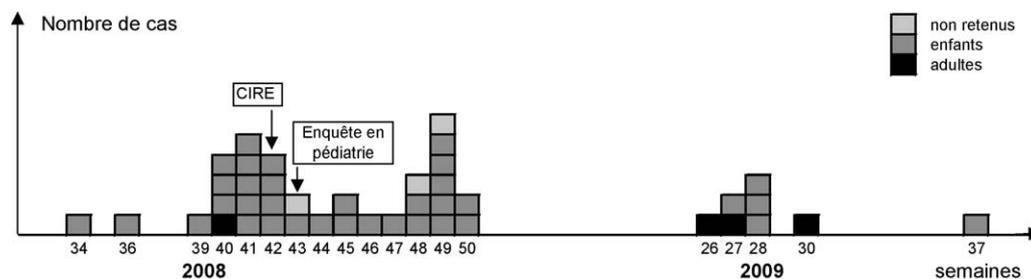


Fig. 1. Courbe épidémique.

3.1. Adultes

Parmi les adultes, trois sur quatre ont été hospitalisés (deux en pneumologie et un en réanimation). Tous ont présenté une pneumopathie, associée à une détresse respiratoire pour deux d'entre eux : un patient a dû être intubé, ventilé et transféré dans le service de réanimation. L'analyse des dossiers n'a pas révélé d'antécédents particuliers si ce n'est deux patients tabagiques.

3.2. Enfants

Les enfants ont été hospitalisés dans 88,6 % des cas (31 sur 35) pendant 2,9 jours en moyenne. Les motifs d'hospitalisation sont répertoriés dans le Tableau 1 et sur la Fig. 2 : gêne respiratoire, toux et hyperthermie étant les principaux motifs évoqués.

Après analyse des dossiers, il s'avère qu'une toux était présente dans 89,7 % des cas avec détresse respiratoire pour 45,7 % et oxygénothérapie nécessaire pour 22,8 % des enfants. Plusieurs formes mineures ont été observées se limitant à une atteinte ORL haute (rhinopharyngite, angine, otite). Des signes digestifs sont fréquemment présents : diarrhée, vomissements et douleurs abdominales (Tableau 2).

À noter également un échec de traitement aux β -lactamines dans 65,7 % des cas. La majorité des enfants présentant une infection à mycoplasme n'avaient pas d'antécédents particuliers (57 %) et 22 % souffraient d'un asthme chronique (Fig. 3).

Dans l'attente des résultats sérologiques et/ou de PCR, les diagnostics suivants ont été posés sur un faisceau d'arguments cliniques et radiologiques (Tableau 3).

4. Résultats biologiques

Sur les 39 infections diagnostiquées, une PCR était réalisée chez 32 patients et était positive chez 28 d'entre eux (soit une sensibilité de la PCR de 87 %). Chez les patients ayant une PCR positive, la sérologie était variable : positive en IgG et IgM ($n = 5$), positive en IgG seule ($n = 2$), négative ($n = 8$) et non réalisée ($n = 13$). Sept patients ont été diagnostiqués sur la sérologie uniquement (PCR non réalisée) (sérologie considérée positive en cas d'élévation des IgM plus ou moins des IgG. La sensibilité de la sérologie dans notre étude est de 58 % : 15 patients ont eu une sérologie positive en IgM (\pm IgG) sur 26 réalisées. Cinq enfants avaient une PCR négative et des IgM positives de façon isolée. Le diagnostic d'infection à mycoplasme n'a été retenu que pour deux de ces cinq enfants. Pour les trois autres, les données cliniques radiologiques et biologiques n'étaient pas concordantes, notamment la réalisation d'une seconde sérologie n'avait pas montré d'élévation secondaire des IgG : ils ont donc été exclus de l'étude et considérés comme des faux-positifs en sérologie. L'ensemble de ces résultats sont présentés dans le Tableau 4 et sur la Fig. 4.

5. Discussion

L'épidémie observée dans la région béthunoise s'est déroulée en deux vagues successives, une première à l'automne 2008 et une seconde au cours de l'été 2009. La moyenne d'âge des enfants

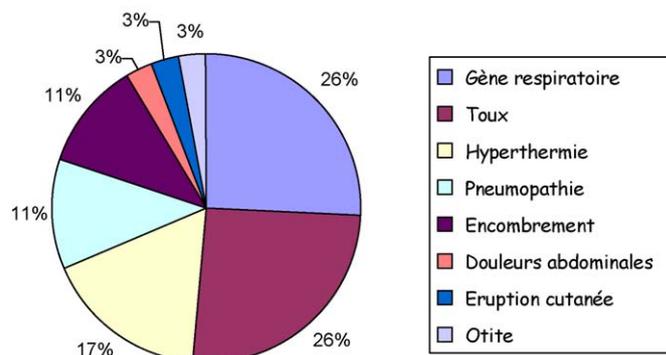


Fig. 2. Principaux motifs d'hospitalisation des enfants.

Tableau 2
Principaux signes cliniques observés.

Hyperthermie > 38,5 °C (%)	80
Toux (%)	89,7
Détresse respiratoire (%)	45,7
Oxygénothérapie (%)	22,8
Signes ORL	
Rhinopharyngite (%)	22,8
Otite (%)	11,4
Angine (%)	8,6
Signes digestifs	
Vomissements (%)	14,3
Diarrhées (%)	8,6
Douleurs abdominales (%)	14,3
Céphalées (%)	2,8
Éruption cutanée (%)	5,7

Antécédents

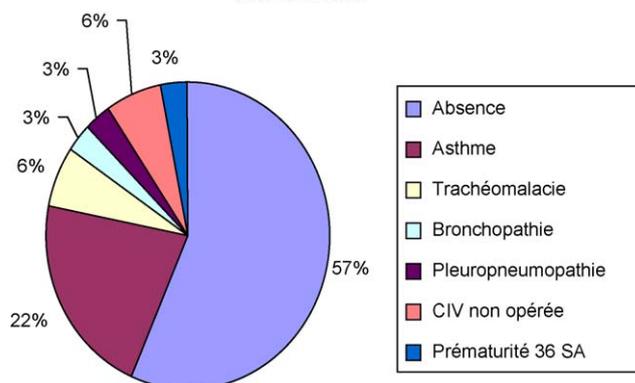


Fig. 3. Antécédents observés.

Tableau 1
Motifs d'hospitalisation chez les enfants.

Gêne respiratoire (%)	25,70
Toux (%)	25,70
Hyperthermie (%)	17,10
Pneumopathie (%)	11,40
Encombrement (%)	11,40
Douleurs abdominales (%)	2,90
Éruption cutanée (%)	2,90
Otite (%)	2,90

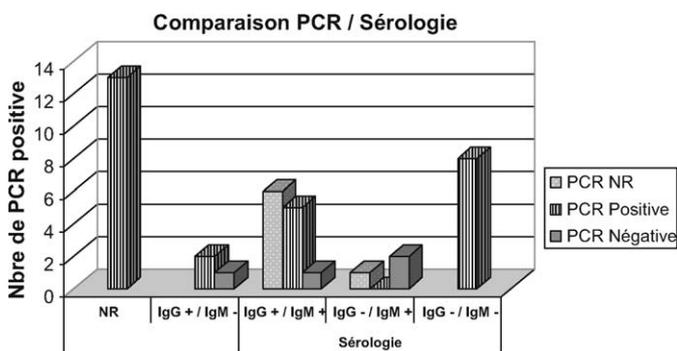
diagnostiqués au centre hospitalier de Béthune était légèrement inférieure à ce qui est habituellement observé au cours des infections respiratoires chez l'enfant de plus de cinq ans) : 28 enfants sur 35 avaient moins de cinq ans. Cependant, n'ont été recensés que les enfants et adultes hospitalisés ou vus en consultation dans

Tableau 3
Diagnosics retenus.

	n	%
Pneumopathie focalisée	10	28,6
Pneumopathie multifocale atypique	10	28,6
Bronchite	7	20
Rhinopharyngite	2	5,8
Exacerbation asthme	2	5,8
Bronchiolite à VRS négatif	1	2,8
Toux isolée	1	2,8
Otite	1	2,8
Éruption isolée	1	2,8

Tableau 4
Comparatif des résultats sérologiques et PCR.

	PCR		
	Non réalisée	Positive	Négative
<i>Sérologie</i>			
Non réalisée		13	
IgG+/IgM-		2	1
IgG+/IgM+	6	5	1
IgG-/IgM+	1	0	2+3 exclus
IgG-/IgM-		8	

**Fig. 4.** Comparaison des résultats obtenus en sérologie et par PCR.

notre établissement. Le nombre de cas a été probablement sous-estimé du fait des nombreuses atteintes cliniques paucisymptomatiques traitées en ambulatoire et non documentées le plus souvent, sachant que les techniques de biologie moléculaire sont plus difficilement accessibles en biologie de ville et non pris en charge par la sécurité sociale (analyse hors nomenclature). L'enquête épidémiologique menée par la CIRE a été peu contributive par absence d'exploration biologique et des techniques de PCR peu ou pas utilisées dans les hôpitaux environnants. Un message d'alerte a cependant été communiqué aux structures de soins.

Le diagnostic précoce de ces infections est tout de même important, car plusieurs études ont montré qu'une prise en charge thérapeutique tardive ou d'une durée insuffisante augmente le risque de séquelles respiratoires [4]. De plus les atteintes sévères, même si elles sont rares sont à prendre en compte : au cours de notre épidémie, un adulte a été hospitalisé en réanimation, intubé ventilé, et une oxygénothérapie a été nécessaire pour 22,6 % des enfants. Selon les recommandations Afssaps, un tableau clinique et radiologique évocateur d'une pneumopathie atypique ou l'absence d'amélioration clinique sous 48 à 72 heures de traitement par β -lactamines doit conduire à la mise en place d'un traitement

précoce par macrolide en monothérapie pour une durée d'au moins 14 jours [5,6].

Plusieurs études ont montré que le diagnostic biologique d'infections à *M. pneumoniae* est variable en fonction des techniques utilisées (PCR, sérologies) et de la population étudiée [3]. La plupart des techniques Elisa utilisent des Ag purifiés qui permettent le dépistage des IgG et des IgM ; cependant la sensibilité et la spécificité sont différentes selon les trousseuses utilisées [3]. De plus la cinétique des anticorps est différente en fonction de l'âge du sujet. Les IgM spécifiques apparaissent théoriquement de façon isolée une semaine après le début des signes cliniques et deux semaines avant l'apparition des IgG. Elles sont présentes surtout chez l'enfant et l'adolescent au cours d'une infection aiguë. Chez l'adulte, le profil observé est différent avec présence d'IgG et absence généralement d'IgM. Ce sont souvent des réinfections avec une élévation tardive du titre des IgG : la sérologie dans ce cas est donc peu contributive. Le dépistage par PCR est fiable et précoce de part sa sensibilité et sa spécificité (variable selon les trousseuses utilisées) et nécessite des échantillons facilement réalisables (aspiration nasopharyngée chez l'enfant, écouvillonnage de gorge ou prélèvement respiratoire chez l'adulte). Le facteur limitant est la quantité des cellules dans le prélèvement pouvant être à l'origine de faux négatifs et la présence d'inhibiteurs dans les prélèvements respiratoires. Ces techniques peuvent être réalisées précocement par rapport à l'apparition des signes cliniques, avec des résultats rendus rapidement (analyse effectuée une à deux fois par semaine). L'interprétation d'un résultat positif peut toutefois être délicate du fait de la colonisation possible du tractus respiratoire par *M. pneumoniae*. Parmi les résultats que nous avons observés, le diagnostic d'infections à mycoplasmes a pu être confirmé pour dix enfants grâce à la PCR alors que la sérologie était négative (diagnostic très précoce) ou avec des IgG seules (réinfection probable). Une PCR s'est avérée négative alors que la sérologie était positive en IgG et en IgM (il s'agit probablement d'un faux-négatif lié à un prélèvement paucicellulaire).

Pour cinq enfants ayant des IgM positives de façon isolée, il n'y a pas eu d'amplification par PCR. Après étude des dossiers cliniques, deux infections à mycoplasme ont été retenues (prélèvement paucicellulaire probable). Pour les trois autres enfants, le résultat de la sérologie correspondait probablement à un faux-positif (un contrôle sérologique ultérieur n'a pas permis de mettre en évidence l'apparition d'IgG). Le diagnostic d'infection à mycoplasme a été retenu pour tous les patients ayant une PCR positive. Ces résultats nous montrent l'intérêt et l'importance de combiner ces deux types de techniques.

Depuis cet épisode épidémique, nous avons fait évoluer notre technique de PCR en choisissant une trousse d'amplification en temps réel, plus sensible, qui nous a permis également d'améliorer la rapidité d'obtention du résultat ainsi que sa qualité, la bêtaglobine (standard interne) permettant d'apprécier la conformité du prélèvement.

6. Conclusion

Du fait de la variabilité des formes cliniques observées (asymptomatiques aux formes sévères avec détresse respiratoire et mise en jeu du pronostic vital chez l'adulte jeune), des complications et des séquelles observées lors de la mise en route tardive d'une antibiothérapie adaptée, la combinaison PCR-sérologie permet un diagnostic précoce et fiable. L'utilisation de la PCR a permis de mettre en évidence rapidement ce pic épidémique et à sensibiliser les cliniciens à ce type de pathologie respiratoire très probablement sous-estimée, les co-infections bactériennes et virales n'étant pas rares.

Conflit d'intérêt

Aucun.

Références

- [1] Bébear CM. Physiopathologie et diagnostic des infections à *Mycoplasma pneumoniae*. Rev Fr Allergol Immunol Clin 2007;47:438–41.
- [2] Gendrel D, Biscardi S, Marc E, Moulin F, Iniguez JL, Raymond J. *Mycoplasma pneumoniae*, pneumonies et asthme. Congrès les infections à bactéries atypiques 18–19 juin 2004, Paris.
- [3] Petitjean-Lecherbonnier J, Vabret A, Gouarin S, Dina J, Legrand L, Freymuth F. Infections à *Mycoplasma pneumoniae* : étude rétrospective en Basse Normandie de 1997 à 2005. Épidémiologie-place de la sérologie et de la PCR pour le diagnostic. Pathol Biol 2006;54:603–11.
- [4] Vaux S, Chubilleau C, Schapman L, Lévy-Bruhl D. Investigation d'une épidémie de pneumopathies à *Mycoplasma pneumoniae* en milieu scolaire, Loiret, printemps 2005. BEH 2006;n° 26.
- [5] Antibiothérapie par voie générale en pratique courante dans les infections respiratoires basses de l'adulte et de l'enfant. Recommandation Afssaps; 2005.
- [6] Antibiothérapie par voie générale dans les infections respiratoires basses de l'adulte (pneumonie aiguë communautaire, exacerbation de bronchopneumopathie chronique obstructive). Afssaps, mise au point; 2010.