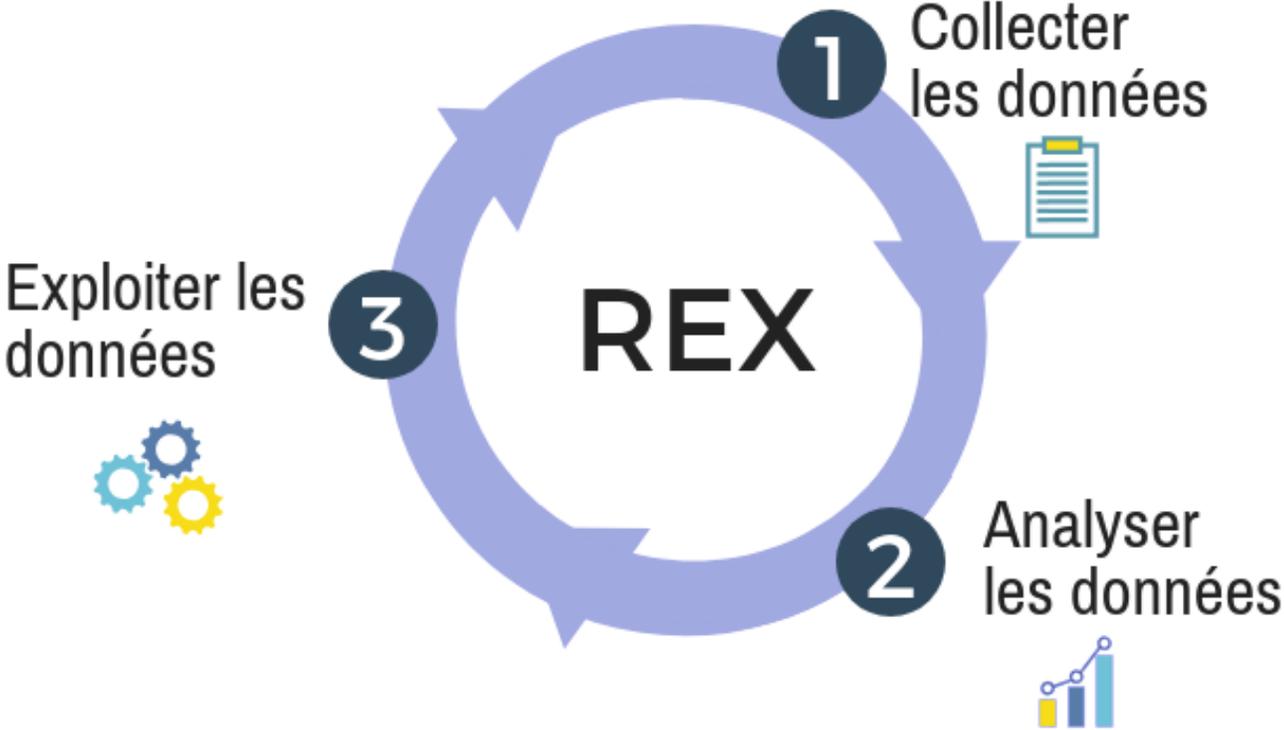


# De la multiplexe hypersensible à la recherche d'ARN16S dans les diagnostics d'infections ostéo-articulaires...

Retour  
d'expérience au laboratoire du CHT Gaston Bourret

# La PCR Multiplexe : un outil pratique mais délicat à interpréter !

## La Multiplexe : une révolution ?



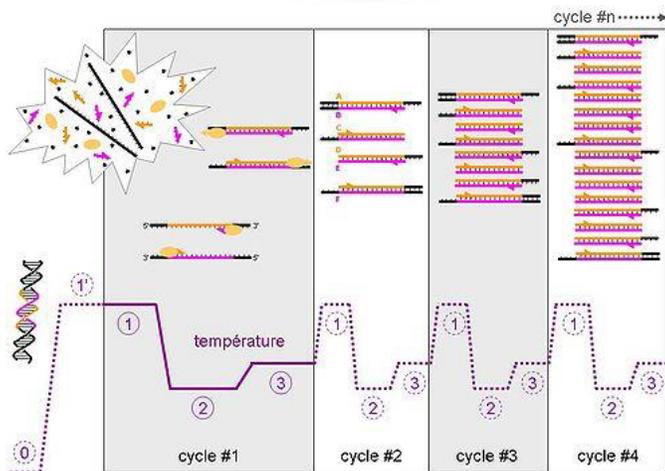
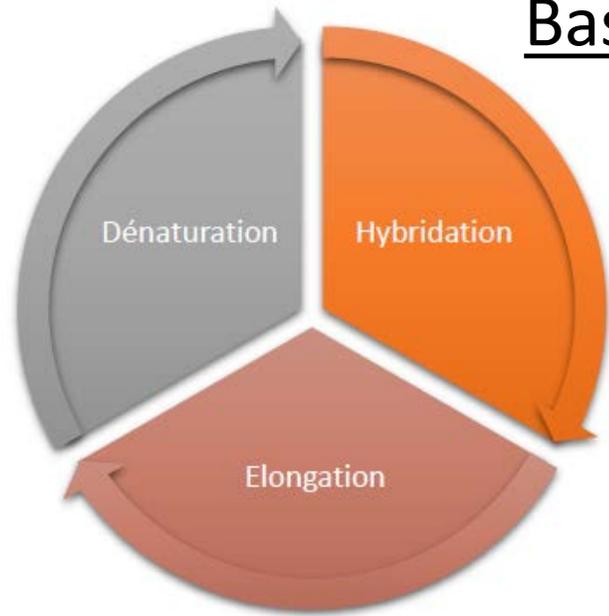
<p>Panel Respiratoire</p>  <p>20 cibles</p>	<p>Panel Identification Hémoculture</p>  <p>27 cibles</p>	<p>Panel Gastro-Intestinal</p>  <p>22 cibles</p>	<p>Panel Méningite Encéphalite</p>  <p>14 cibles</p>
--	--	---	---

**BioFire® Joint Infection (JI) Panel**

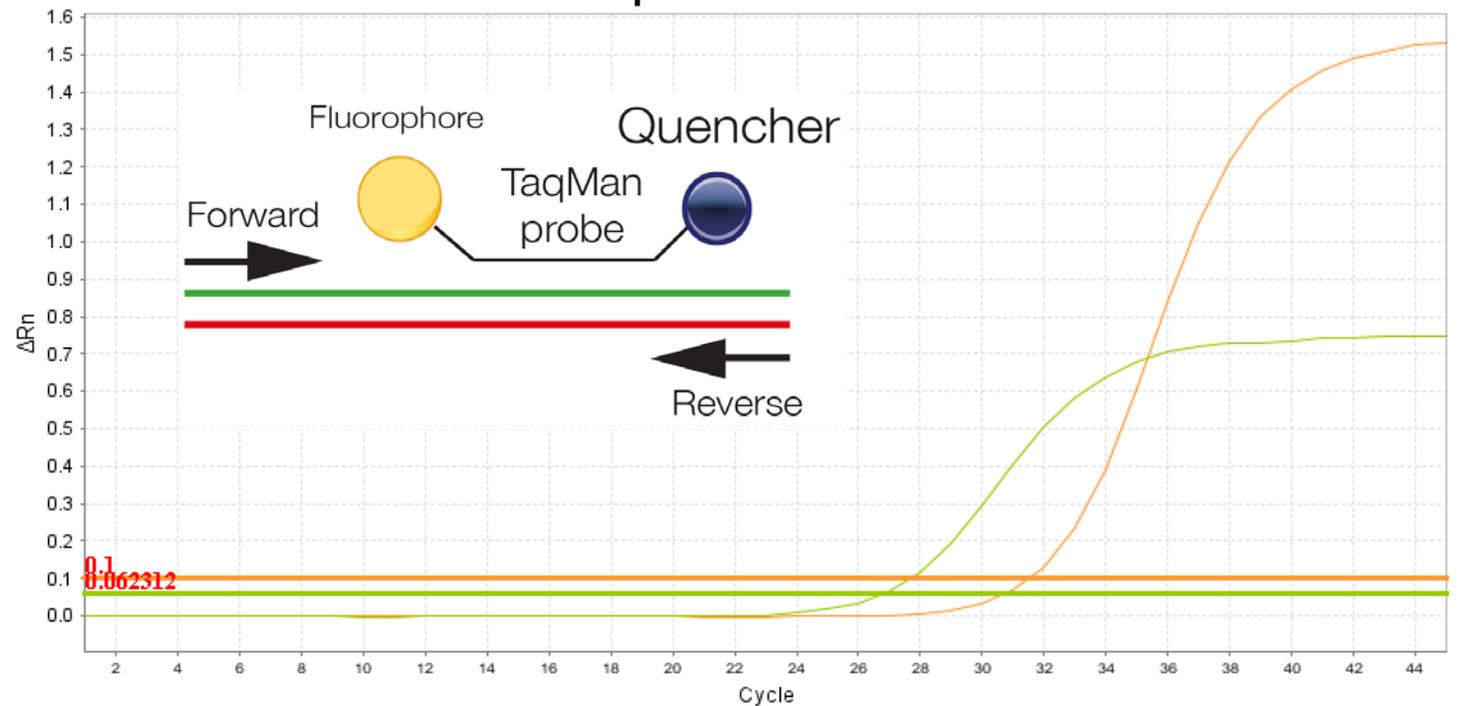
Plus de 6 ans d'expérience au laboratoire du CHT...

# La PCR en temps réel (ou Taqman PCR) : rappel de base

## Base



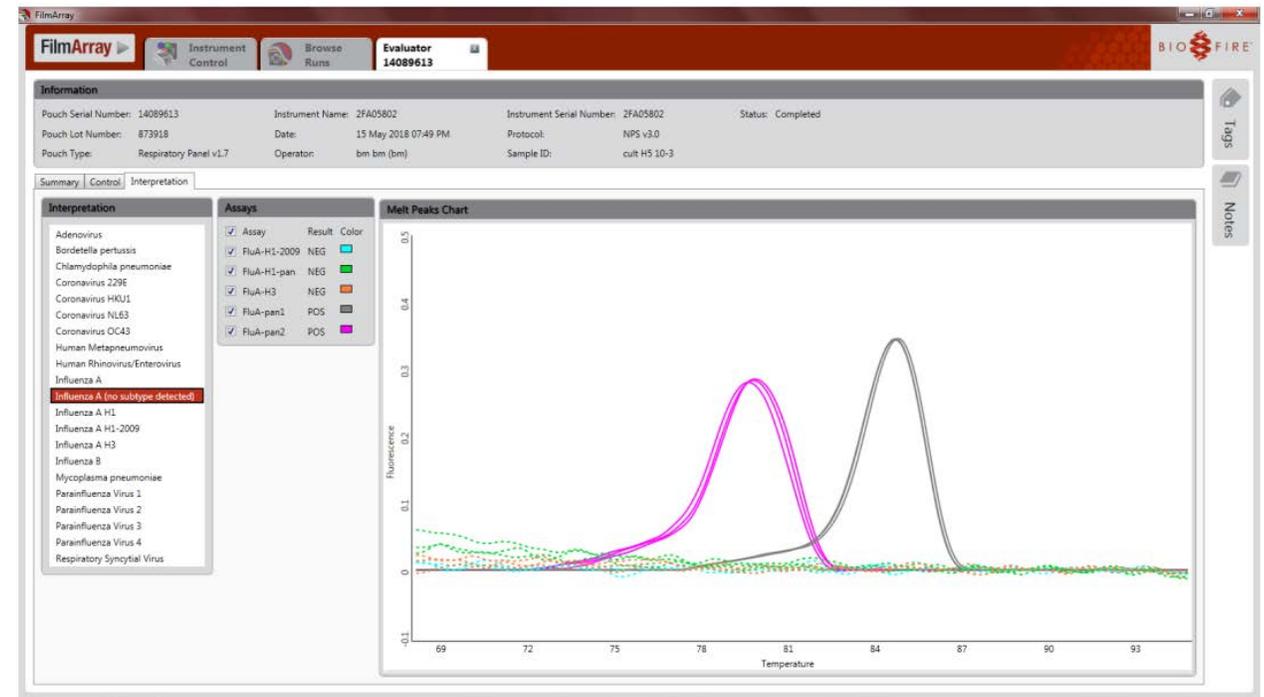
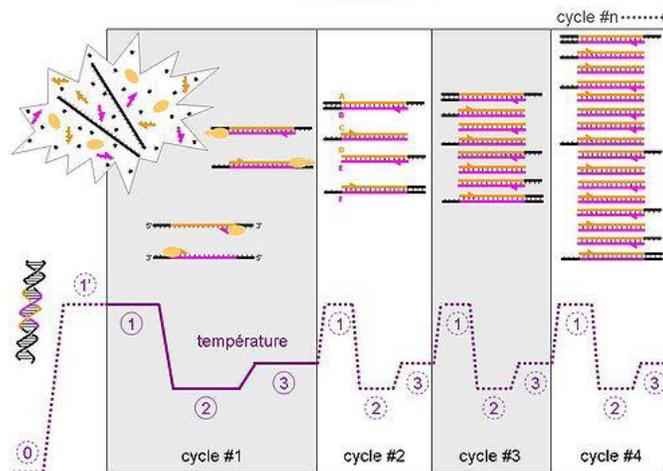
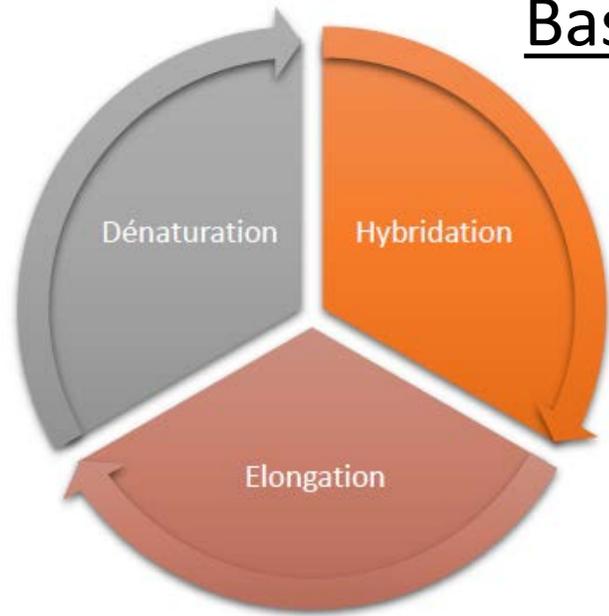
## Amplification Plot



1 cible avec 2 amorces + 1 sonde spécifique d'hybridation

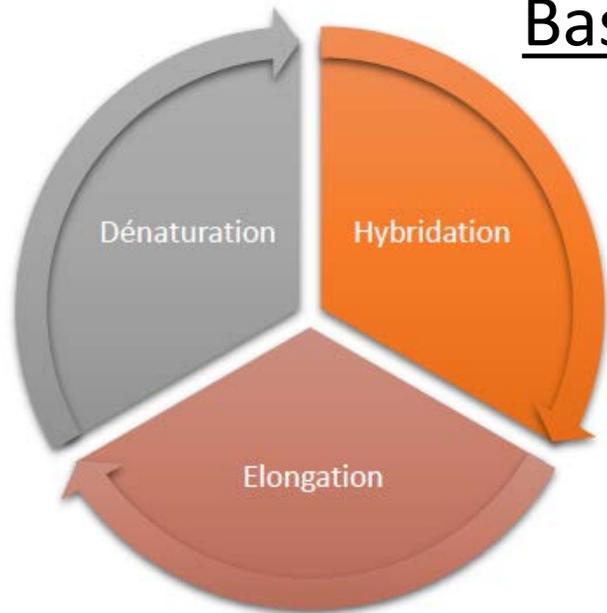
# La PCR multiplexe (ou PCR nichée) : rappel de base

Base

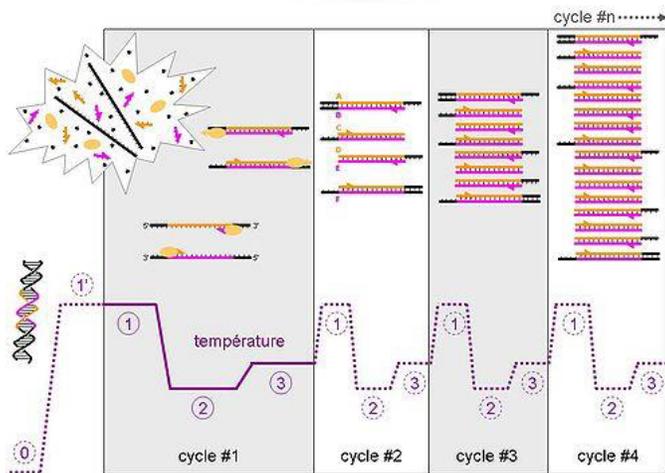
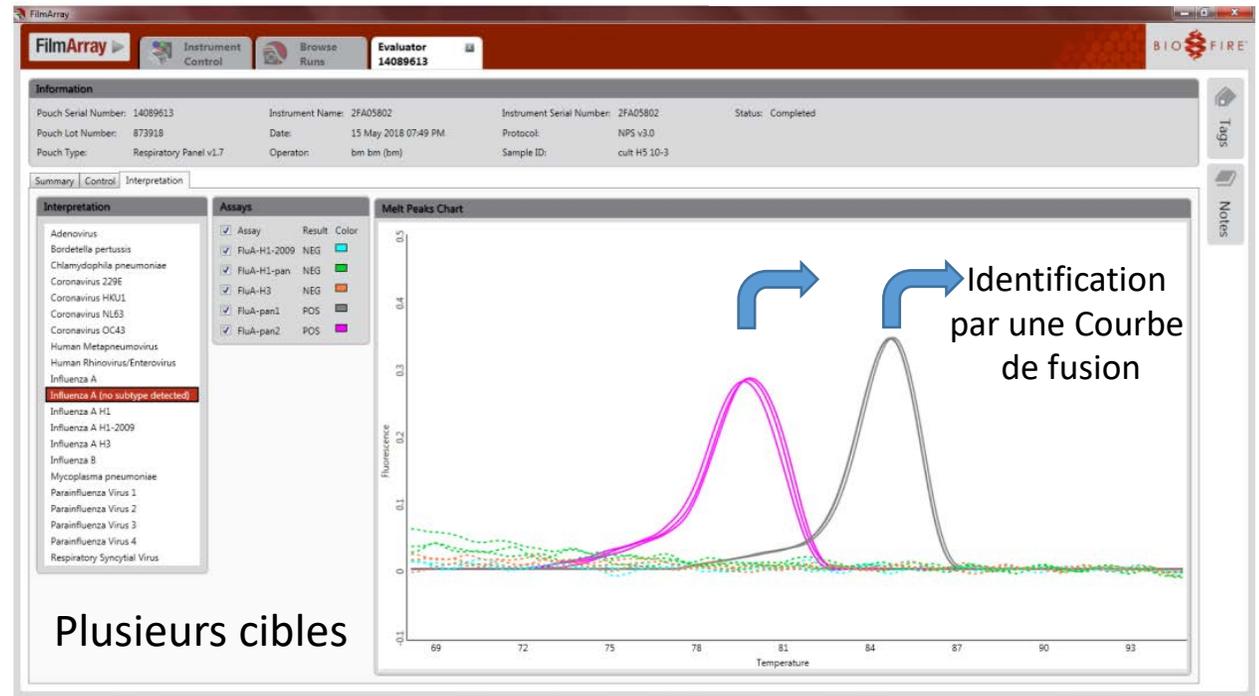
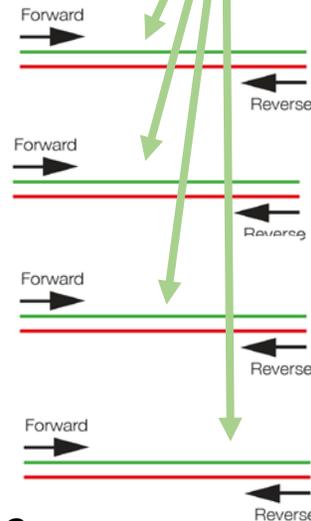
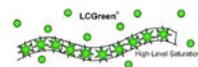


# La PCR multiplexe (ou PCR nichée) : rappel de base

Base



Intercalant  
Sybergreen  
non spécifique



# La PCR multiplexe panel Méningé



## Panel FilmArray ME

### • Bactéries

- *Escherichia coli* K1
- *Haemophilus influenzae*
- *Listeria monocytogenes*
- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus pneumoniae*

### • Levures :

- *Cryptococcus gattii/neoformans*

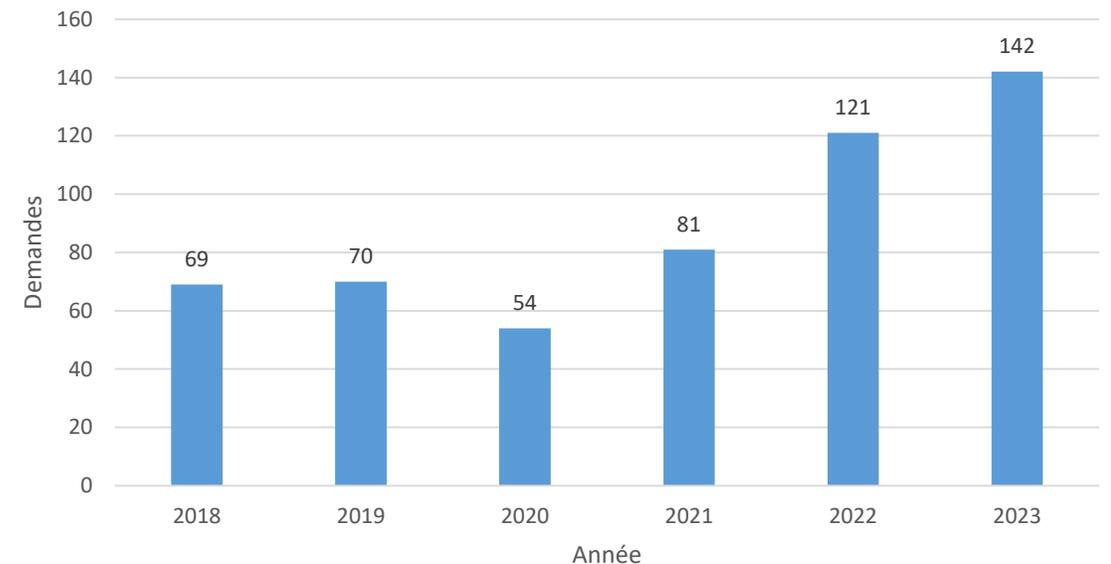
### • Virus

- CMV
- Entérovirus
- HSV-1
- HSV-2
- HHV-6
- Parechovirus
- VZV

Mise en place  
2017

Coût = 35 000 cfp

Nbres de demandes Multiplexe Méningée



# La PCR multiplexe panel Hémoculture



Panel  
Identification  
Hémoculture



27  
cibles

## Composition du Panel FilmArray Hémoculture :

### • Bactéries Gram - :

- *Haemophilus influenzae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Escherichia coli*
- *Enterobacter cloacae complex*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Proteus*
- *Serratia marcescens*

### • Bactéries Gram+ :

- *Listeria monocytogenes*
- *Enterococcus*
- *Staphylococcus sp*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus sp*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*

### • Levures :

- *Candida albicans*
- *Candida glabrata*
- *Candida krusei*
- *Candida parapsilosis*
- *Candida tropicalis*

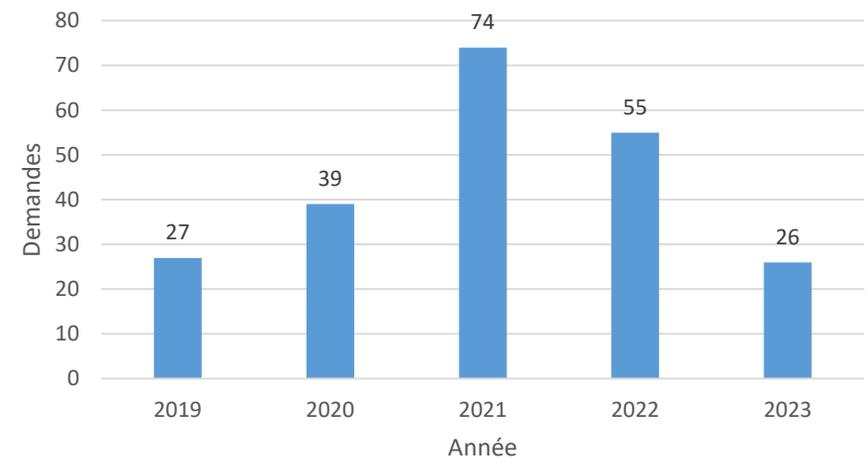
### • Gènes de résistance aux ATB :

- Mec A (résistance à la pénicilline SARM)
- Van A/B (ERV)
- *BlaKPC* : résistance aux carbapénèmes (EPC)

2018

Coût = 36 000 cfp

## Nbres de demandes Multiplexe Hémoculture



# La PCR multiplexe panel Gastro-intestinal



Panel  
Gastro-Intestinal

## Composition du Panel QIASTAT GI



22  
cibles

### • **Bactéries :**

- *Campylobacter jejuni, coli et upsaliensis*
- *Clostridium difficile* (ToxA/B)
- *Plesiomonas shigelloides*
- *Salmonella*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Vibrio parahaemolyticus et vulnificus*
- *Vibrio cholerae*
- *E. coli* diarrhéogène/*shigella*
  - Entéroaggrégative (EAEC)
  - Entéropathogène (EPEC)
  - Enterotoxinogène (ETEC)
  - *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC)
  - *E. coli* O157
  - *Shigella* / *E.coli* Entero-invasive (EIEC)

### • **Virus :**

- Adenovirus (F40/41)
- **Astrovirus**
- Norovirus (GI/GII)
- Rotavirus
- **Sapovirus** (I, II, IV et V)

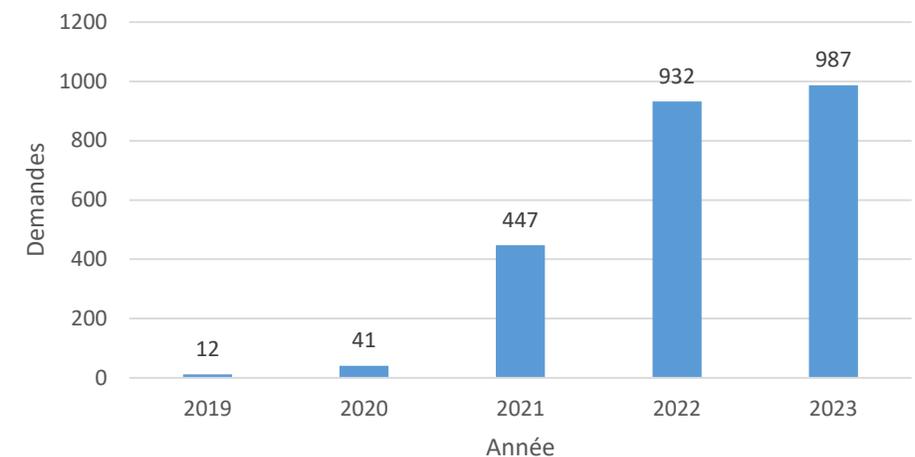
### • **Parasites :**

- *Cryptosporidium*
- *Cyclospora cayetanensis*
- *Entamoeba histolytica*
- *Giardia intestinalis*

2019

Coût = 18 000 cfp

Nbres de demandes Multiplexe Gastro-intestinale



# La PCR multiplexe panel Respiratoire



QIASTAT

Panel  
Respiratoire

## Composition du Panel FilmArray Respiratoire :



20  
cibles

### • Virus

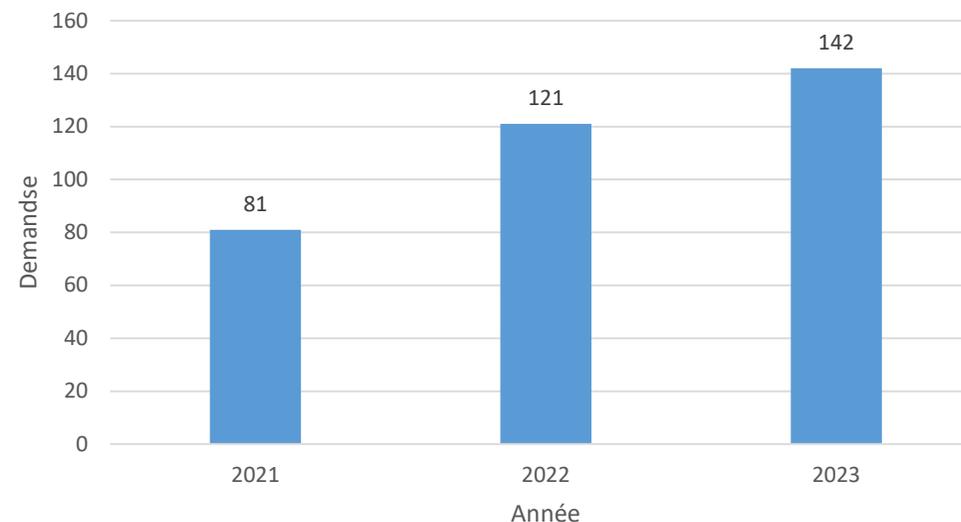
- Adenovirus
- Coronavirus
  - HKU1
  - NL63
  - 229E
  - OC43
- Metapneumovirus
- Rhinovirus
- Entérovirus
- Virus de la grippe A
  - A/H1
  - A/H1 2009
  - A/H3
- Virus de la grippe B
- Parainfluenza virus 1, 2, 3, 4
- VRS
- MERS-Cov

### • Bactéries

- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydomphila pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*

2020  
Coût = 38 000 cfp

Nbres de demandes Multiplexe respiratoire



# La PCR multiplexe panel Ostéo-articulaire



## BioFire® Joint Infection (JI) Panel

### Bactéries à Gram positif

<i>Anaerococcus prevotii/vaginalis</i>	<i>Fingoldia magna</i>	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Cutibacterium avidum/granulosum</i>	<i>Peptoniphilus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	

### Bactéries à Gram négatif

<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Kingella kingae</i>	<i>Proteus</i> spp.
<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Complexe <i>Enterobacter cloacae</i>	Groupe <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella</i> spp.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	

### Levures

<i>Candida</i>
<i>Candida albicans</i>

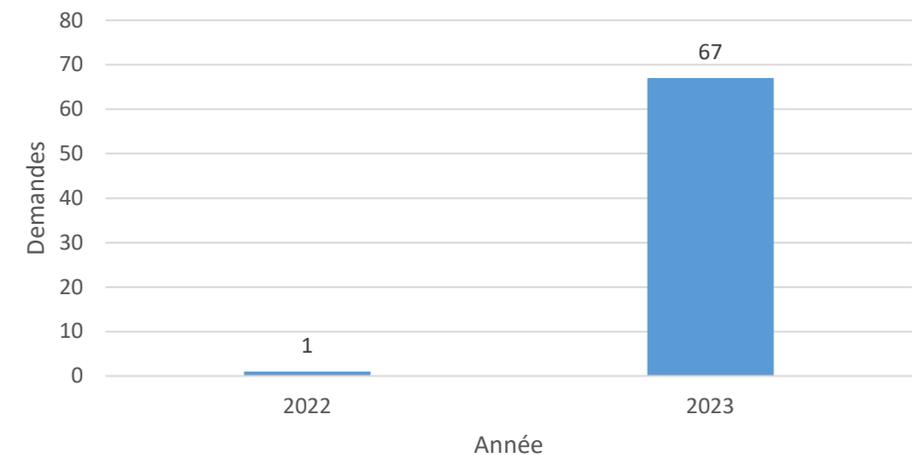
### Gènes de résistance aux antibiotiques

CTX-M	KPC	NDM	<i>vanA/B</i>
IMP	<i>mecA/C</i> et MREJ (MRSA)	OXA-48-like	VIM

2023

Coût = 45 000 cfp

Nbres de demandes Multiplexe IOA



# La PCR multiplexe : revue de prescription +++

**Panel FilmArray ME**

**Bactéries**

- *Escherichia coli* KI
- *Haemophilus influenzae*
- *Listeria monocytogenes*
- *Neisseria meningitidis*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus pneumoniae*

**Viruses**

- CMV
- Entérovirus
- HSV-1
- HSV-2
- HHV-6
- Paréchovirus
- VZV

**Levures**

- *Cryptococcus gattii/neoformans*

Echantillon LCR 200 ul  
Coût du test : 28 500F  
Non prescriptible sur DxCare

**Panel Respiratoire**

**Composition du Panel FilmArray Respiratoire :**

**Viruses**

- Adenovirus
- Coronavirus
- H1N1
- NL63
- ZIKV
- OC43
- Metapneumovirus
- Rhinovirus
- Entérovirus
- Virus de la grippe A
  - A/H1
  - A/H3 2009
  - A/H3
- Virus de la grippe B
- Parainfluenza virus 1, 2, 3, 4
- VRS
- MERS-Cov

**Bactéries**

- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Mycoplasma pneumoniae*

Prix 1test = 30 000F

**Patients hospitalisés :**

- Pneumopathies graves d'allure virale sans étiologie
- Le Weekend (grippe/coqueluche) service de réa noct.

**Surveillance en Santé publique (DASS) :**

- Epidémies de syndrome pseudo grippe
- Réalisation d'une PCR Grippe /MERS-Cov en urgence 24h/24 7j/7 (problème du P2-7)

**Panel Gastro-intestinal**

**Composition du Panel FilmArray GI**

**Bactéries :**

- *Campylobacter jejuni*, coli et *upsaliensis*
- *Clostridium difficile* (ToxA/B)
- *Plesiomonas shigelloides*
- *Salmonella*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Vibrio parahaemolyticus* et *vulnificus*
- *Vibrio cholerae*
- *E. coli* diarrhéogène/shigella
- Entéroaggrégative (EAEK)
- Entérotoxigène (EPEC)
- *E. coli* producteurs de shigatoxines (STEC)
- *E. coli* O157
- *Shigella / E. coli* Entero-invasif (EIEC)

**Viruses :**

- Adenovirus (F40/41)
- Astrovirus
- Norovirus (GI/GII)
- Rotavirus
- Sapovirus (I, II, IV et V)

**Parasites :**

- *Cryptosporidium*
- *Cyclospora cayentanensis*
- *Entamoeba histolytica*
- *Giardia intestinalis*

Prix : 29 125 F

Retour de voyage en zone d'épidémie de cholera

Surveillance d'épisodes épidémiques virales : complète le panel actuel, amélioration des performances diagnostiques

- > réseau GIV ? Si tests de 1<sup>er</sup> ligne négatifs.



**Panel Identification Hémostase**

**Composition du Panel FilmArray Hémostase :**

**Bactéries Gram - :**

- *Haemophilus influenzae*
- *Neisseria meningitidis*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Escherichia coli*
- *Enterobacter cloacae* complex
- *Klebsiella oxytoca*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Proteus*
- *Serratia marcescens*

**Bactéries Gram+ :**

- *Listeria monocytogenes*
- *Enterococcus*
- *Staphylococcus* sp
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*

**Levures :**

- *Candida albicans*
- *Candida glabrata*
- *Candida lussei*
- *Candida parapsilosis*
- *Candida tropicalis*

Prix du kit : 25 125 F

Indiqué pour Hémostases polymicrobiennes ? En 15 à 7

- Galie de 24h sur l'identification

Autres prélevements (CR, Bactéries de ponticelli ...) alternative à une PCR ADP 355 et technique non validée mais utilisable dans d'autres CH

**BioFire® Joint Infection (JI) Panel**

Bactéries à Gram positif			
<i>Anerococcus prevotivaginalis</i>	<i>Finexella magna</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Parvimonas micro</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Cultibacterium avidum/granulosum</i>	<i>Peptoniphilus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		
Bactéries à Gram négatif			
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Kingella kingae</i>	<i>Proteus</i> spp.	
<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Complexe <i>Enterobacter cloacae</i>	Groupe <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella</i> spp.	
<i>Escherichia coli</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		
Levures			
<i>Candida</i>			
<i>Candida albicans</i>			
Gènes de résistance aux antibiotiques			
CTX-M	KPC	NDM	vanA/B
IMP	meoA/C et MREJ (MRSA)	OXA-48-like	VIM

# La PCR multiplexe : avantages

## FILMARRAY® LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE RÉVOLUTIONNÉE

### Simple

- Pas besoin de locaux de biologie moléculaire
- Pas besoin de personnel habilité
- Pas de pipetage de précision
- Préparation simple de l'échantillon
- Aucun équipement / consommable supplémentaire

### Rapide

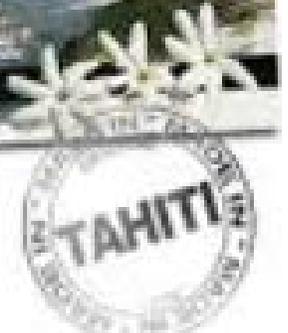
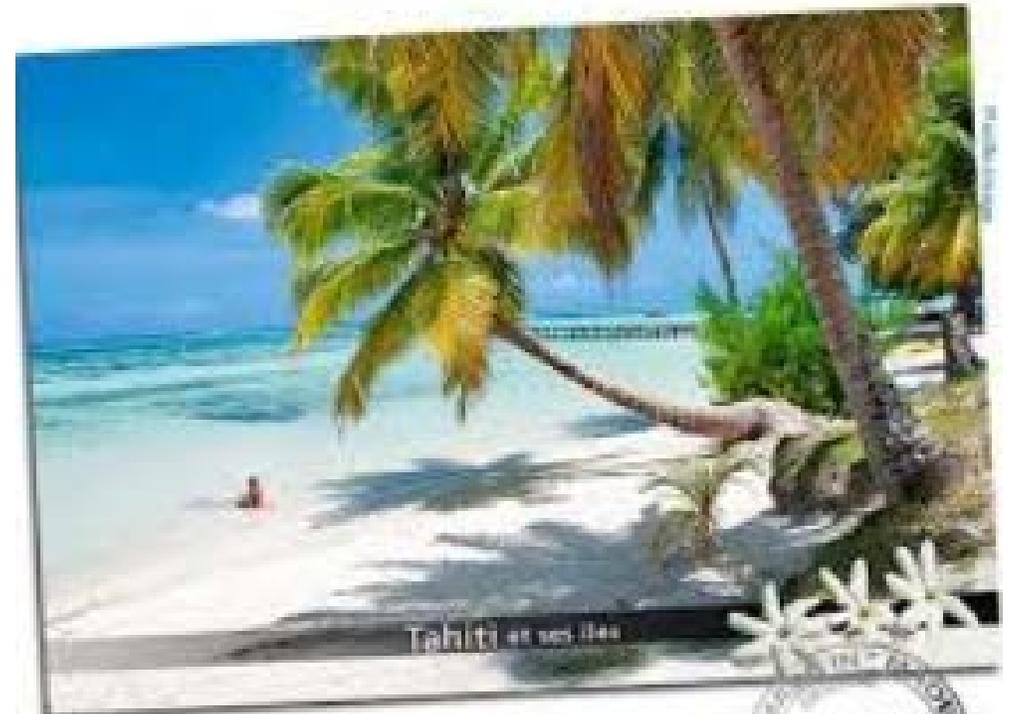
- Temps de manipulation: 2 min
- Résultats rendus en 1 heure

### Détection simultanée

- PCR multiplexe « nichée »
- 14-27 cibles
- Contrôles inclus

### Adaptabilité

Configuration évolutive  
Accessible 7/7 24/24  
Connexion LIS



# La PCR multiplexe : inconvénients

## FILMARRAY® LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE RÉVOLUTIONNÉE

### Simple

- Pas besoin de locaux de biologie moléculaire
- Pas besoin de personnel habilité
- Pas de pipetage de précision
- Préparation simple de l'échantillon
- Aucun équipement / consommable supplémentaire

### Rapide

- Temps de manipulation: 2 min
- Résultats rendus en 1 heure

### Détection simultanée

- PCR multiplexe « nichée »
- 14-27 cibles
- Contrôles inclus

### Adaptabilité

Configuration évolutive  
Accessible 7/7 24/24  
Connexion LIS



### Prix

- 30 000 cfp

### Dérives

- Hausse des prescriptions
- Approche syndromique

Ne remplace  
Pas la culture

- Antibiogramme
- Traitement empirique

**Difficultés d'interprétation**

# La PCR multiplexe : s'en méfier

## **Attention !**

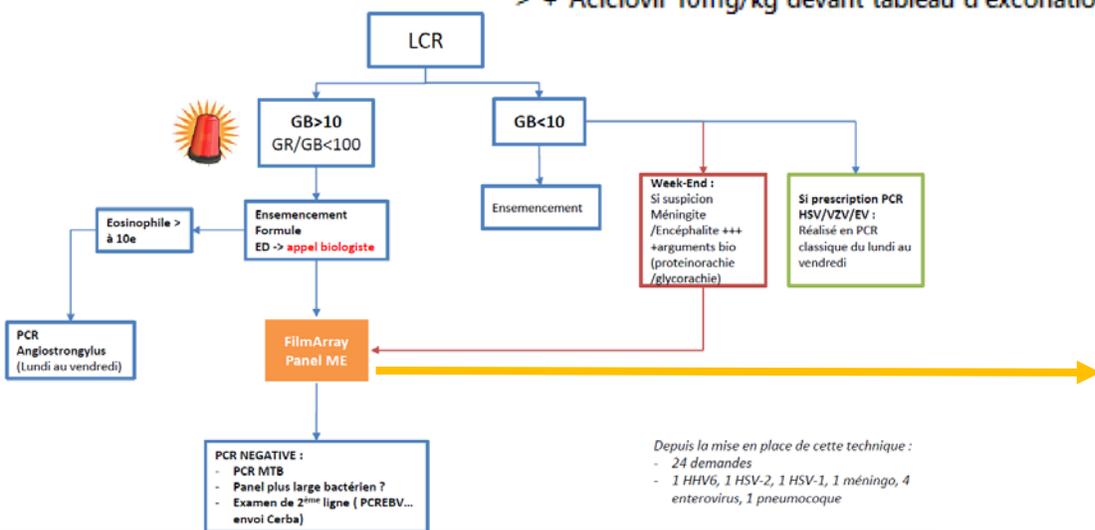
Une mauvaise interprétation peut  
conduire à des erreurs diagnostiques  
et à une mauvaise prise en charge du  
patient

# Quelques exemples

## Exemple N°1 : PCR méningée

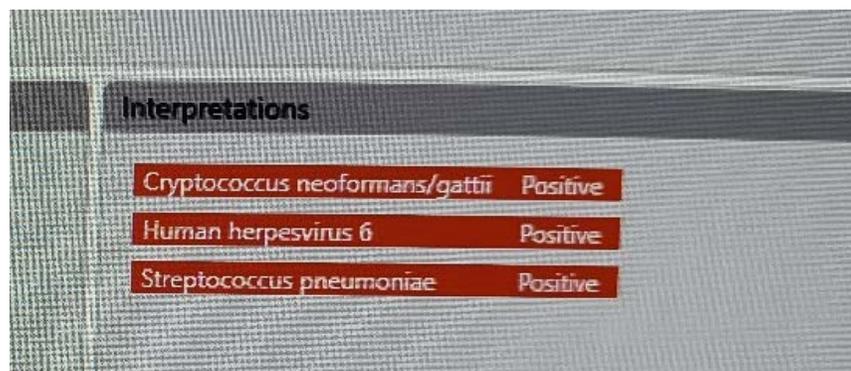
- Patiente enceinte de 29 ans se présente aux urgences le 01/05/2024 avec un tableau de céphalées, hyperthermie, trouble de la vigilance + raideur nuque
- Hospitalisée pour suspicion de méningite à pneumocoque sans porte d'entrée
- PL est faite aux urgences
  - Hypoglycorachie / hyperprotéinorachie/1700 GB/mm<sup>3</sup> dont 76% de PNN

> ATB débuté par Cefotaxime 50mg/kg + PSE 21g /24h  
 > + Aciclovir 10mg/kg devant tableau d'excoriation mais sans tableau d'encéphalite



Depuis la mise en place de cette technique :  
 - 24 demandes  
 - 1 HHV6, 1 HSV-2, 1 HSV-1, 1 méningo, 4 enterovirus, 1 pneumocoque

## Multiplexe méningée



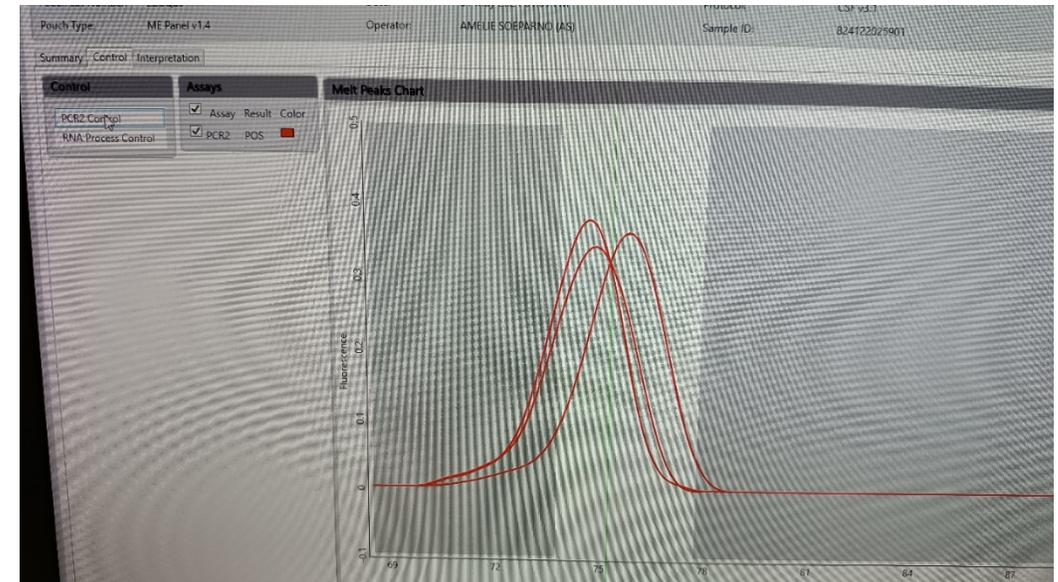
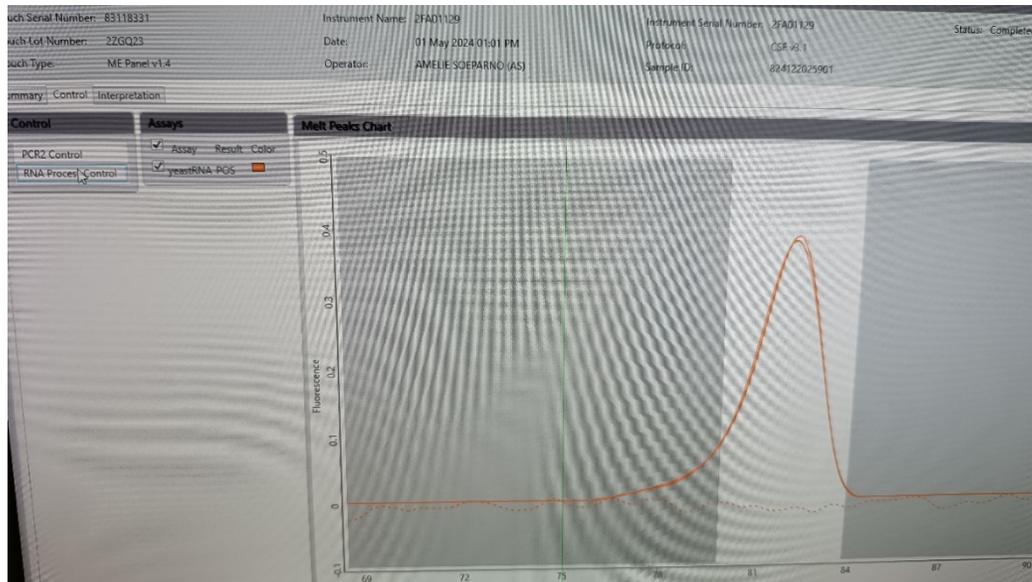
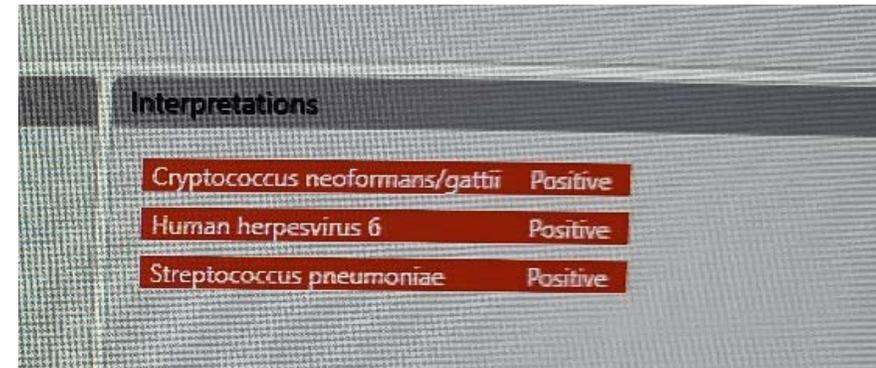
--- Prél. 824122025901 Du 01/05/2024 (Liq. Céphalo-Rachidien (Bact)) -

Liquide Céphalo-rachidien			
Aspect (LCR)	Tech.	TROU	
Ex. direct LCR			
Éléments nucléés (LCR)	Tech.	1710	/mm <sup>3</sup>
Hématies (LCR)	Tech.	350	/mm <sup>3</sup>
Formule LCR			
Formule non réalisable (LCR)	CR	NR	
Poly neutro (LCR)	Tech.	75	%
Poly eosino (LCR)	Tech.	0	%
Lymphocytes (LCR)	Tech.	25	%
Monocytes (LCR)	Tech.	0	%
Cellules autres (LCR)	CR	NR	%

# La PCR multiplexe panel méningé

## ☐ Exemple N°1 : PCR méningée

- Analyse des courbes



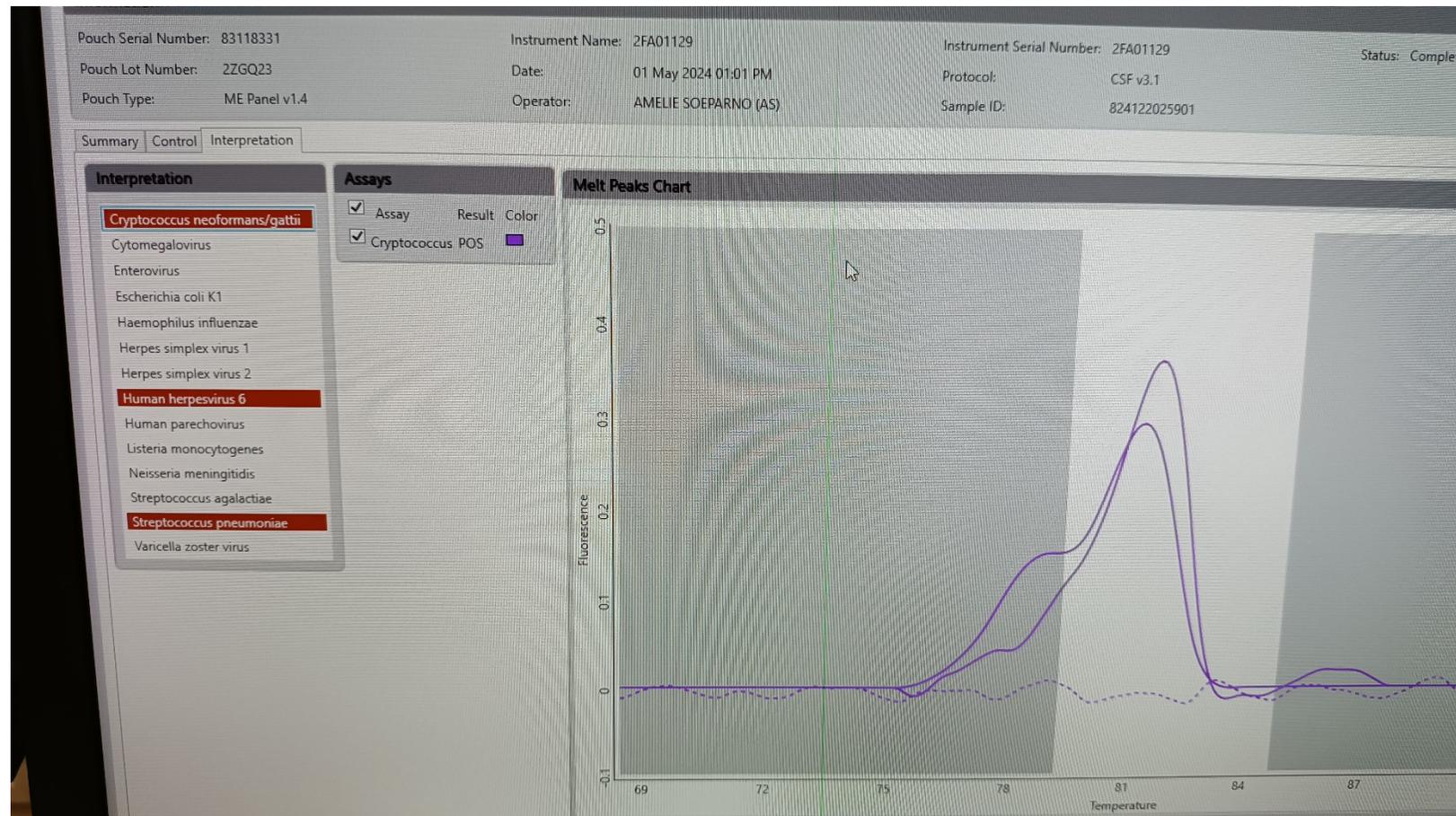
Contrôles internes = Valides

# La PCR multiplexe panel méningé

## ☐ Exemple N°1 : PCR méningée

- Analyse des courbes

**CIBLE 1 = Cryptocoque**

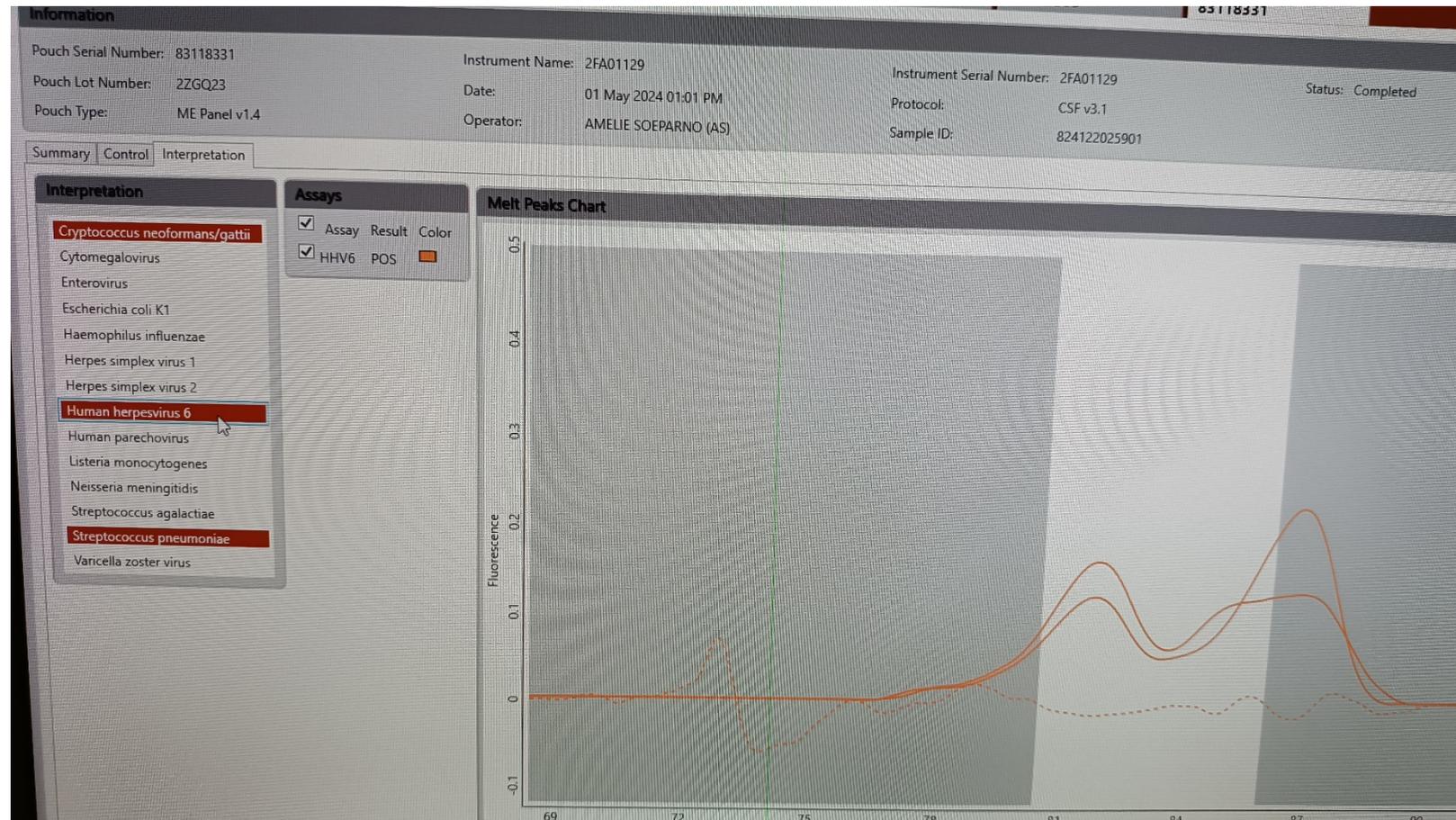


# La PCR multiplexe panel méningé

## ☐ Exemple N°1 : PCR méningée

- Analyse des courbes

**CIBLE 2 = HHV6**

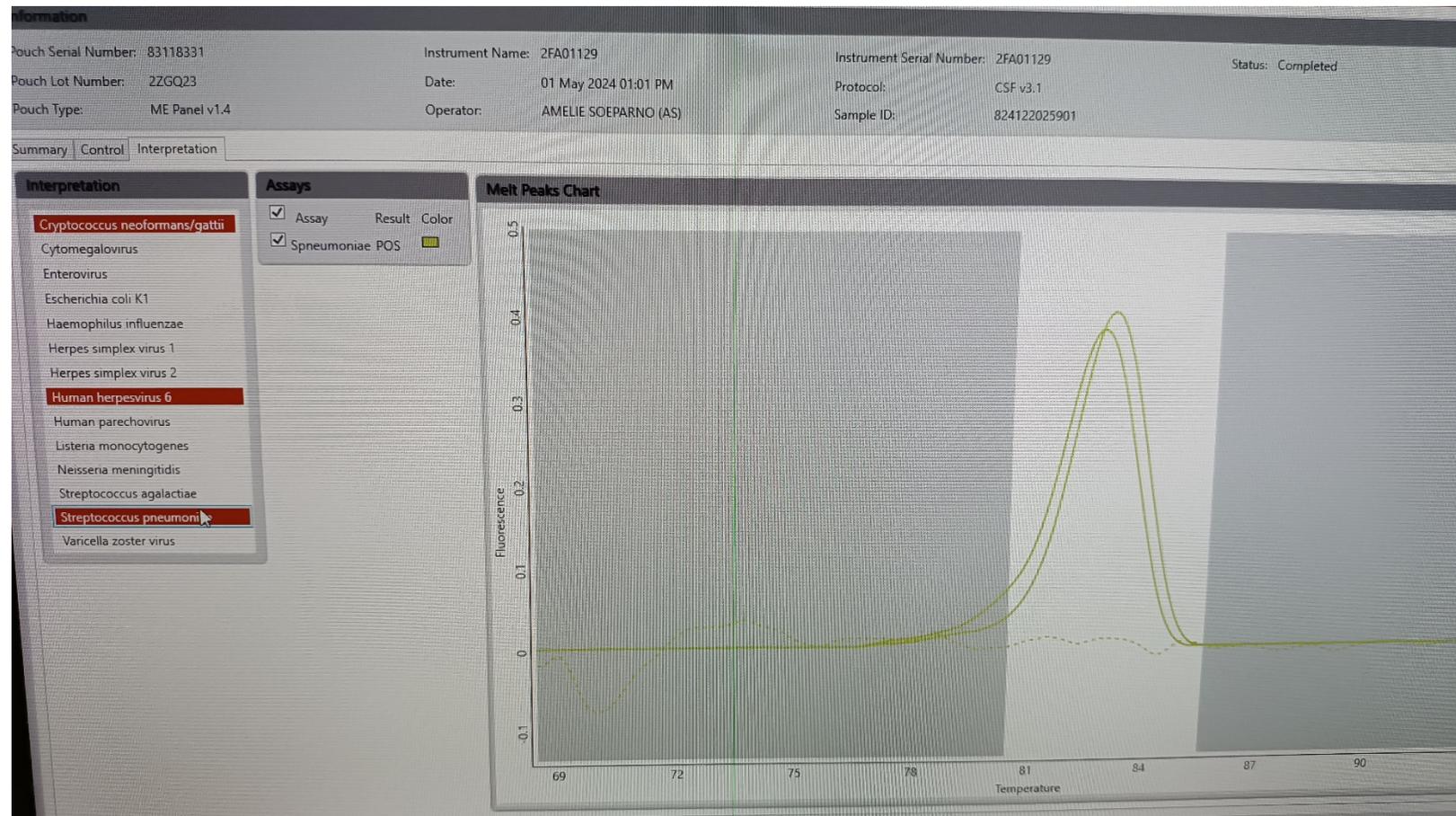


# La PCR multiplexe panel méningé

## □ Exemple N°1 : PCR méningée

- Analyse des courbes

**CIBLE 3 = Pneumocoque**



# La PCR multiplexe panel méningé

- ❑ Exemple N°1 : PCR méningée
  - Interprétation biologique

Méningite à PNO?

Quid des autres cibles?

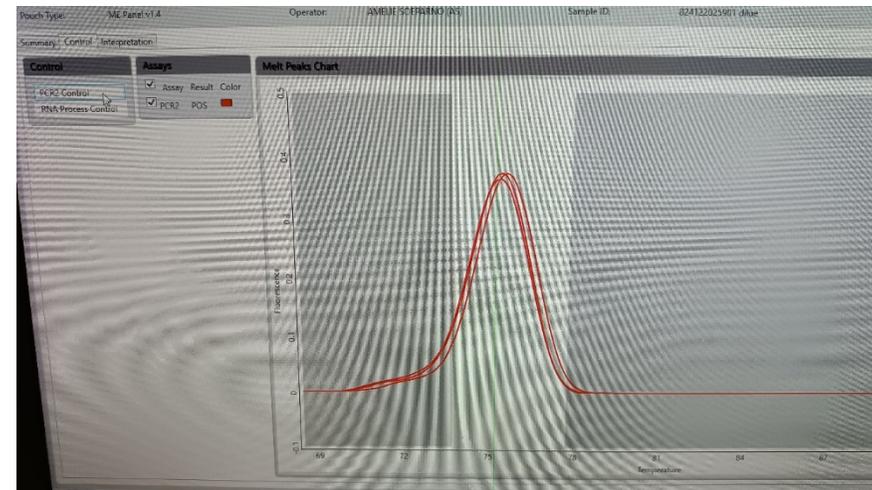
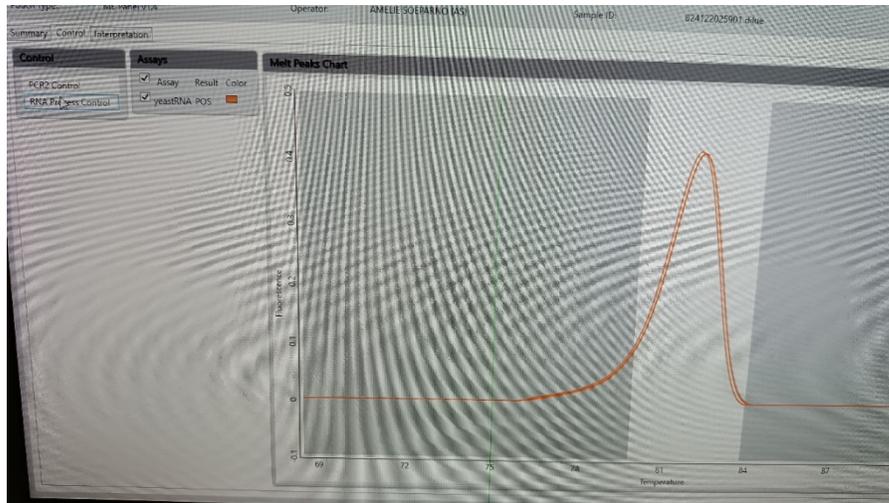
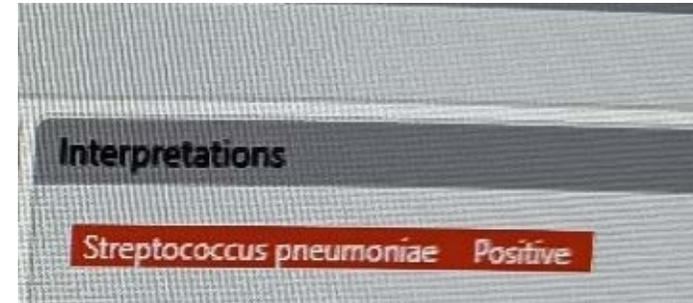


Contrôle du prélèvement  
dilution au 1/10



# La PCR multiplexe panel méningé

- Exemple N°1 : PCR méningée
  - Prélèvement dilué

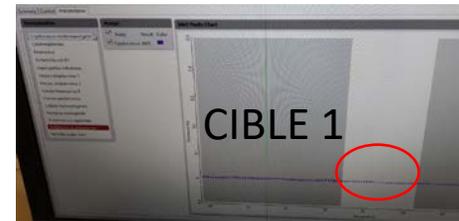


**Contrôles internes = Valides**

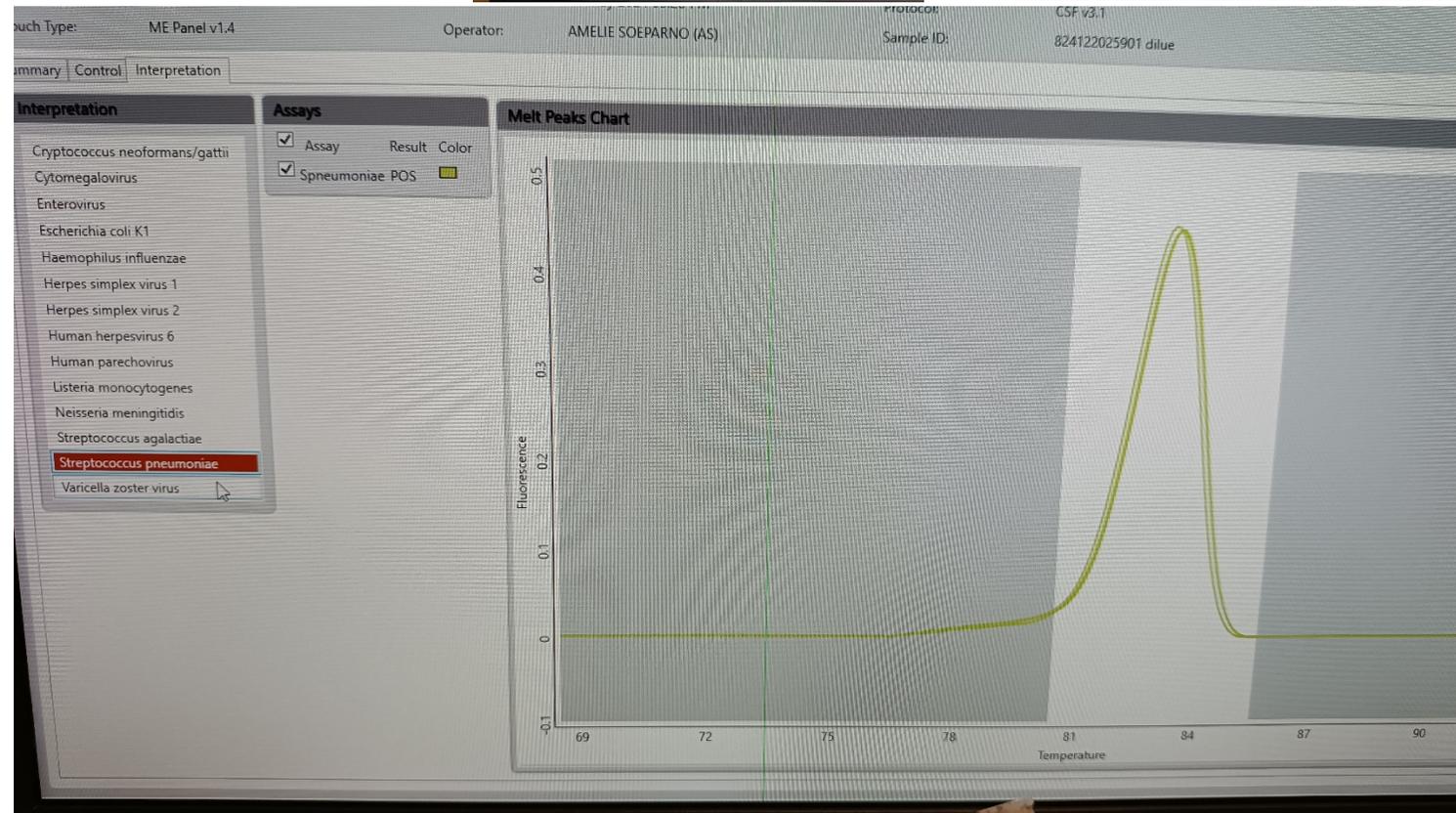
# La PCR multiplexe panel méningé

## ☐ Exemple N°1 : PCR méningée

- Prélèvement dilué



**CIBLE 3 = pneumocoque**



# La PCR multiplexe panel méningé

## ❑ Exemple N°1 : PCR méningée

- Conclusion

Défaut de spécificité



Se méfier des  
Co-infections



Contrôler les  
Courbes ++

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases  
<https://doi.org/10.1007/s10096-020-03859-y>

ORIGINAL ARTICLE



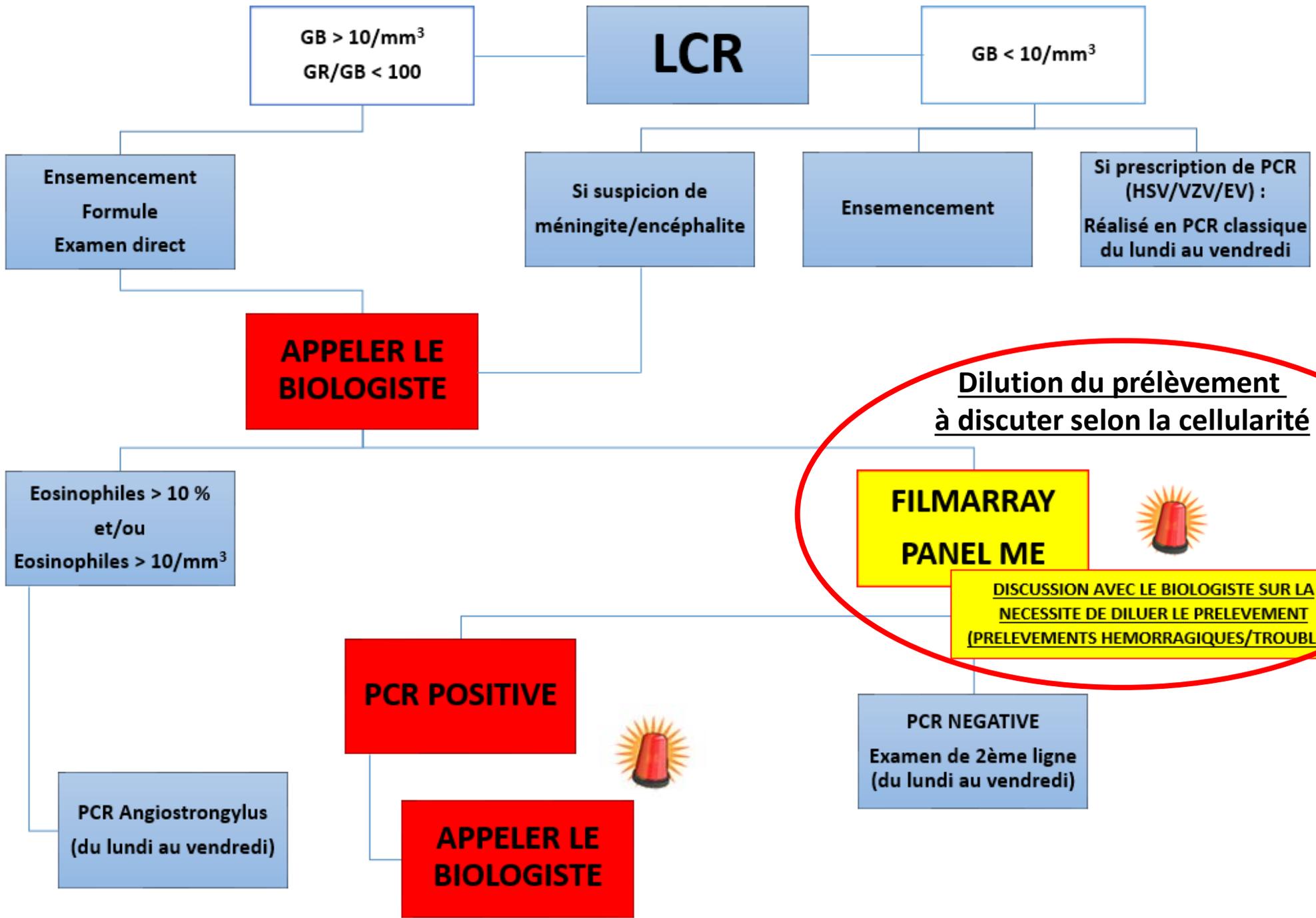
Point-of-care multiplexed diagnosis of meningitis using  
the FilmArray® ME panel technology

Jean-Jacques Vincent<sup>1</sup> · Christine Zandotti<sup>1</sup> · Sophie Baron<sup>1,2</sup> · Christian Kandil<sup>1</sup> · Pierre-Yves Levy<sup>1,3</sup> ·  
Michel Drancourt<sup>1,2</sup> · Didier Raoult<sup>1,2</sup> · Laetitia Ninove<sup>1,4</sup>

Received: 2 December 2019 / Accepted: 3 March 2020  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Protocole  
de dilution?





**APPELER LE BIOLOGISTE**

Dilution du prélèvement à discuter selon la cellularité

**FILMARRAY  
PANEL ME**



**DISCUSSION AVEC LE BIOLOGISTE SUR LA NECESSITE DE DILUER LE PRELEVEMENT (PRELEVEMENTS HEMORRAGIQUES/TROUBLES)**

**PCR POSITIVE**



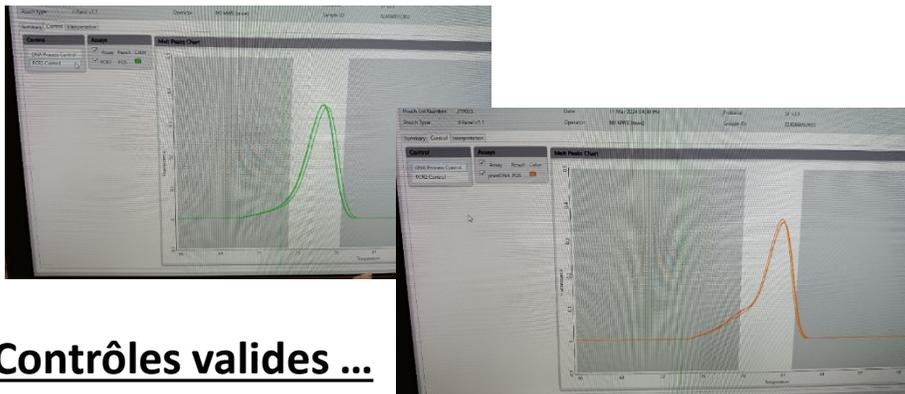
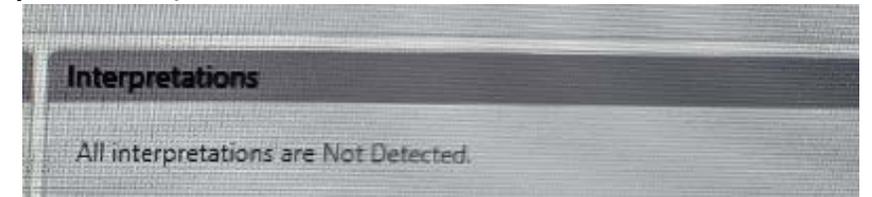
**APPELER LE BIOLOGISTE**

# La PCR multiplexe panel Ostéo-articulaire

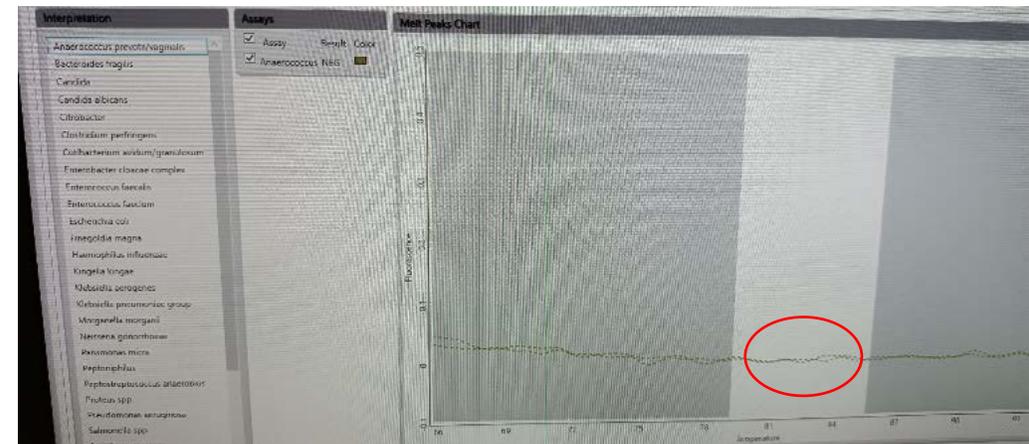
## ❑ Exemple N°2 : PCR ostéo-articulaire

- Arthrite septique du genou D du 20/02/2024 : culture positive à *Staph aureus*
- Reprise chirurgicale de mauvaise évolution (épanchement + désunion) avec biopsie intra articulaire le 01/03/2024
  - Multiplexe IOA lancée sur le prélèvement (hémorragique +++)

PCR rendue négative par l'automate



Contrôles valides ...

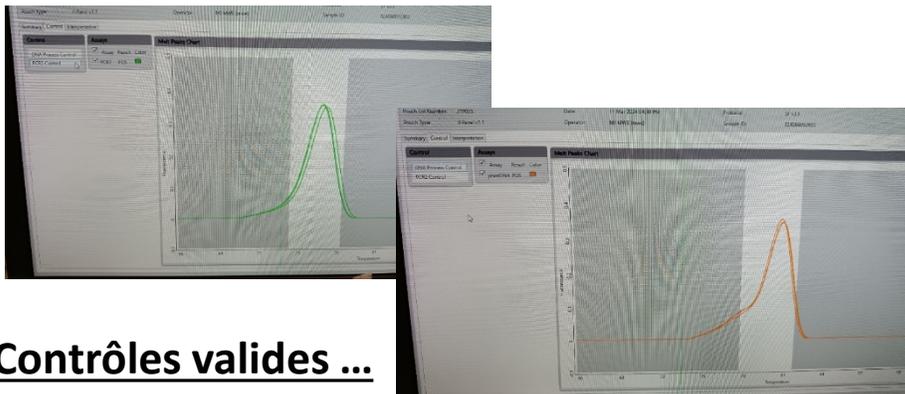
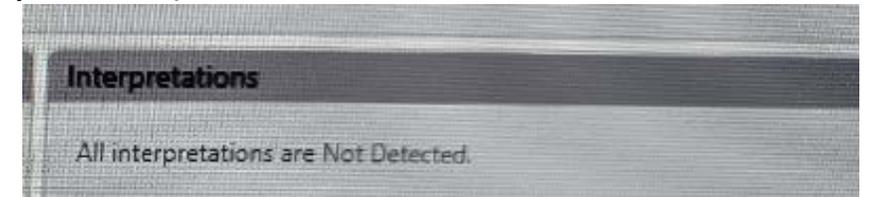


# La PCR multiplexe panel Ostéo-articulaire

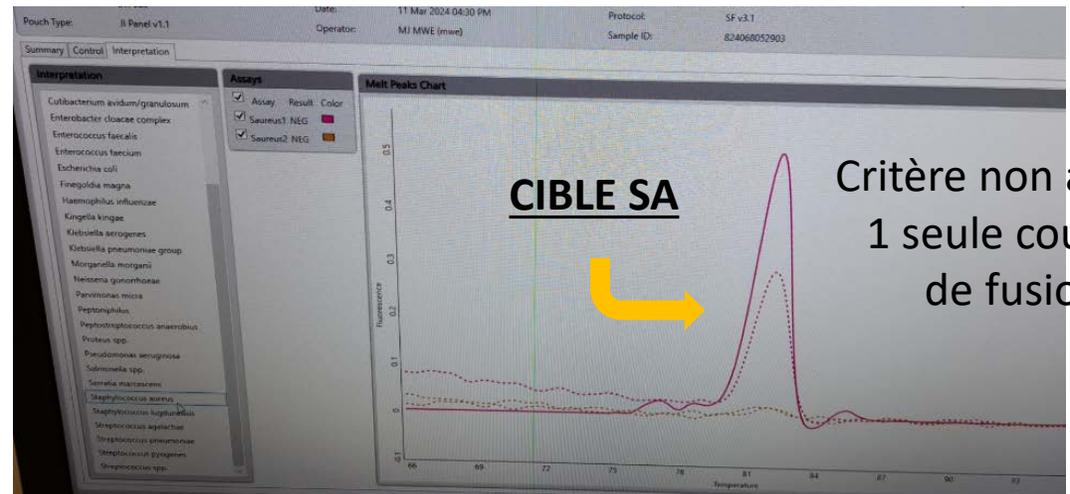
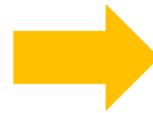
## ❑ Exemple N°2 : PCR ostéo-articulaire

- Arthrite septique du genou D du 20/02/2024 : culture positive à *Staph aureus*
- Reprise chirurgicale de mauvaise évolution (épanchement + désunion) avec biopsie intra articulaire le 01/03/2024
  - Multiplexe IOA lancée sur le prélèvement (hémorragique +++)

PCR rendue négative par l'automate



Contrôles valides ...



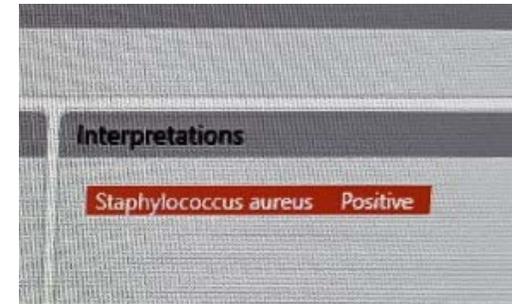
CIBLE SA

Critère non atteint  
1 seule courbe  
de fusion

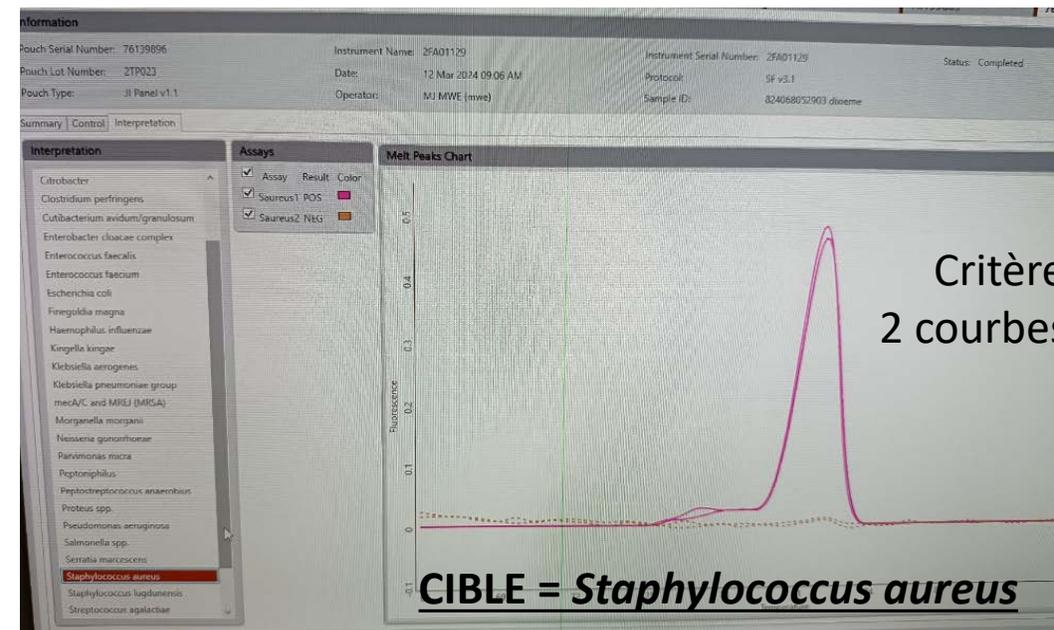
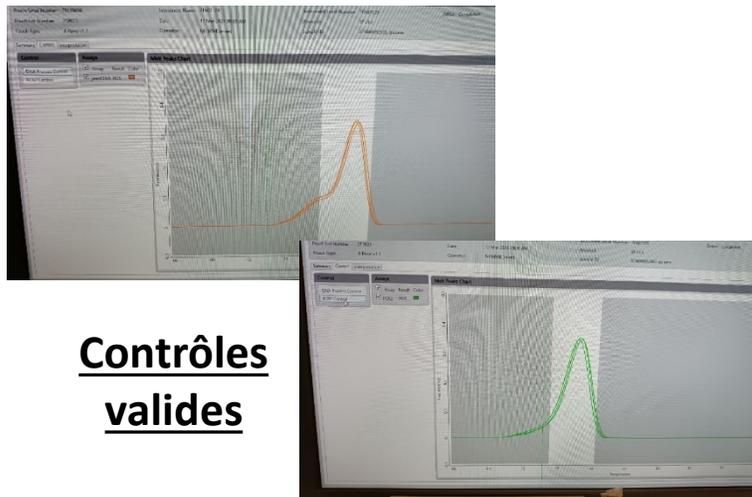
# La PCR multiplexe panel Ostéo-articulaire

## ❑ Exemple N°2 : PCR ostéo-articulaire

- Dilution du prélèvement au 10ème



**PCR positive à *Staphylococcus aureus***



# La PCR multiplexe panel Ostéo-articulaire

## ❑ Exemple N°2 : PCR ostéo-articulaire

- Conclusion

Défaut de sensibilité



Prélèvement  
à diluer (inhibiteur?)



Attention aux  
Courbes!!



# La PCR multiplexe panel Ostéo-articulaire

## ☐ Exemple N°3 : PCR ostéo-articulaire

- Ponction du genou D sur gonalgie post traumatique évoluant depuis 15j (Choc lors d'un match de foot)
- CRP = 137 mg/L ; Fièvre à 38,9°C
- Lavage du genou sans antibiothérapie débutée
- PCR IOA lancée : positive à *Staphylococcus aureus*
- Culture = Positive à *Streptococcus dysgalactiae*

Discordance Culture vs PCR

### Examen Cyto-Bactériologique d'un Liquide articulaire

Numéro du prélèvement : 824237026501  
Aspect : Purulent

### Examen direct d'un liquide articulaire

Numéro du prélèvement : 824237026501  
Eléments nucléés : 200000 /mm<sup>3</sup>  
Hématies : 5000 /mm<sup>3</sup>

### Formule Cytologique

Numéro du prélèvement : 824237026501  
Polynucléaires Neutrophiles: 77 %  
Polynucléaires éosinophiles : 0 %  
Lymphocytes : 12 %  
Cellules mononucléées : 11 %  
Autres cellules : 0 %

### Microcristaux et Ragocytes:

Absence de cristaux  
Flore à l'examen direct : Absence de flore bactérienne

### Résultat après incubation

Numéro du prélèvement : 824237026501  
Culture : Monomorphe

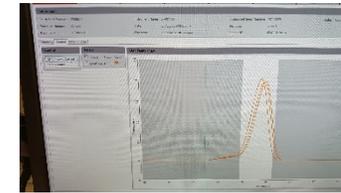
### Germe(s) :

Germe isolé tardivement uniquement à partir d'un bouillon d'enrichissement.  
- *Streptococcus dysgalactiae*  
Nombreux

# La PCR multiplexe panel méningé

## Exemple N°3 : PCR ostéo-articulaire

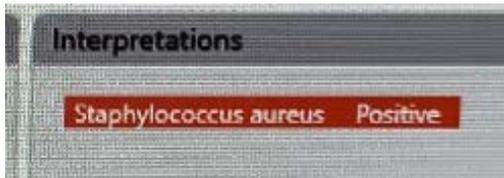
- Réalisation d'une multiplexe IOA



Pure

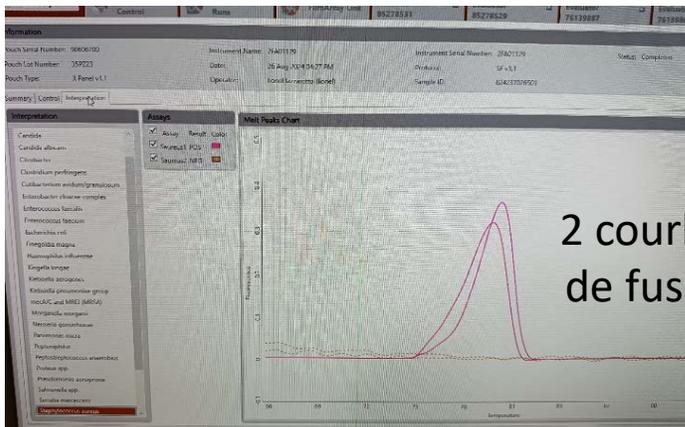
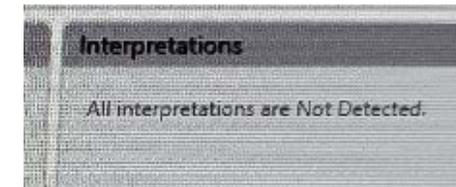
Contrôles  
valides

Diluée au 1/100

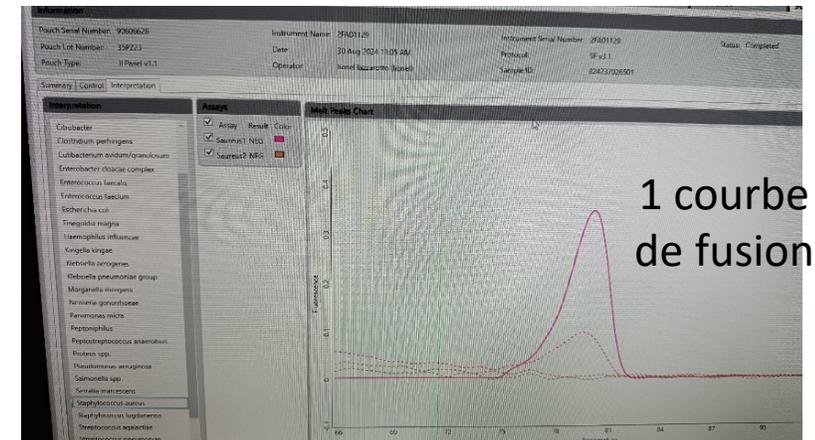


PCR rendue positive  
par l'automate

PCR rendue négative  
par l'automate



2 courbes  
de fusion



1 courbe  
de fusion

# La PCR multiplexe panel Ostéo-articulaire

## ☐ Exemple N°3 : PCR ostéo-articulaire

- Conclusion

Contamination?



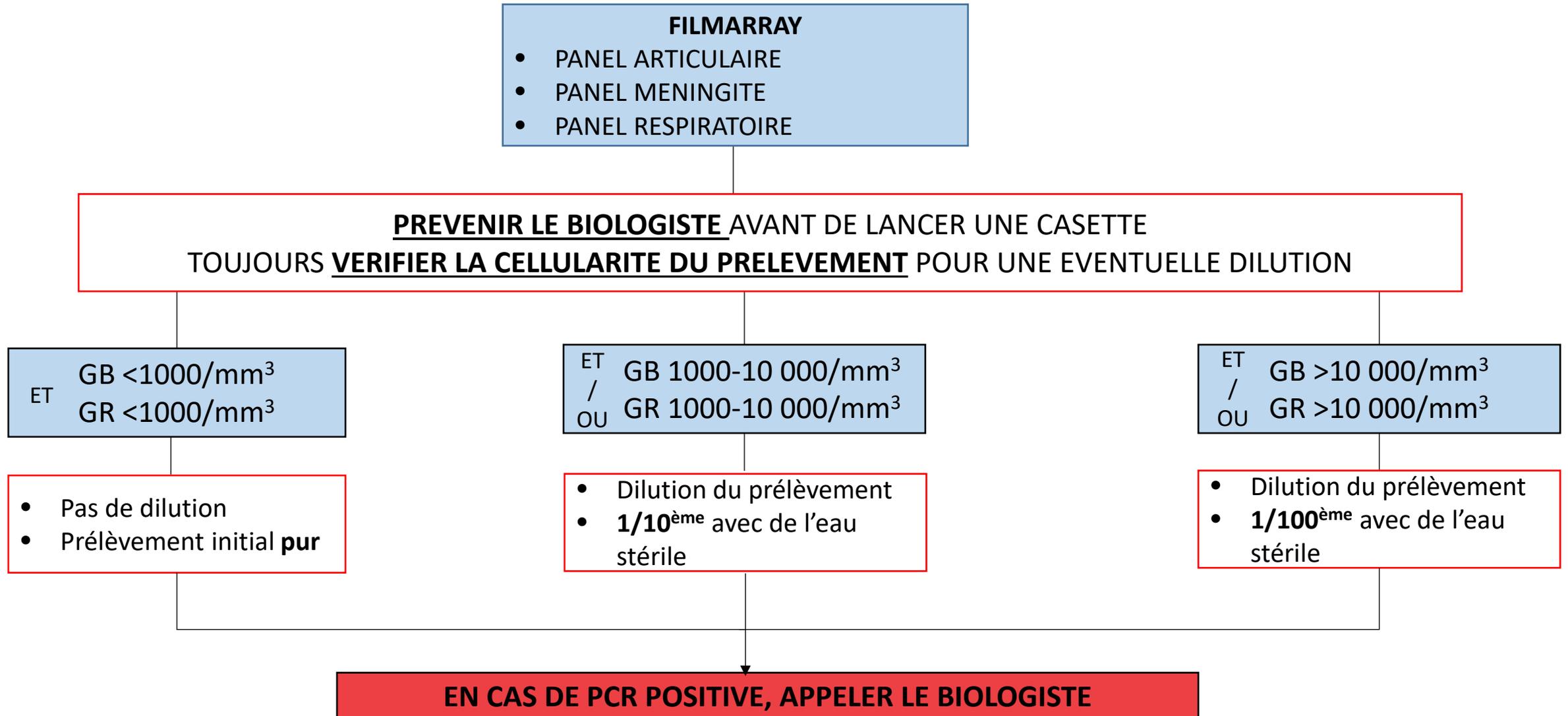
Prélèvement  
à diluer?



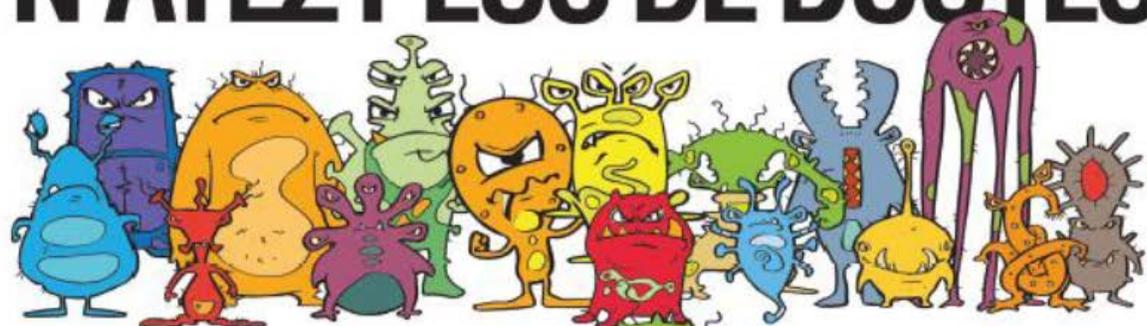
Application du  
protocole de dilution



# Procédure de dilution au laboratoire du CHT



**N'AYEZ PLUS DE DOUTES**



**MAIS DES CERTITUDES**



# La Multiplexe n'est pas une PCR pour les nuls

## Contamination

- **Attention aux faux positifs** fréquents avec la PCR nichée
- Propreté de la hotte / 1 seul prélèvement à la fois

## Algorithme

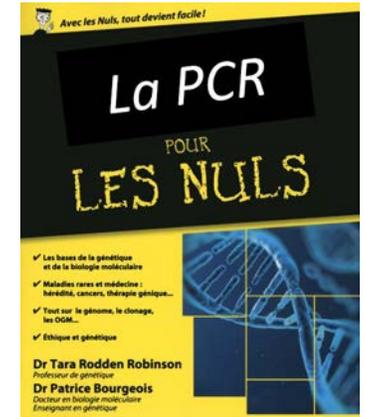
- 2/3 pour les contrôles ; (2/3) ou (1/2) pour les cibles pathogènes
- Erreur d'interprétation du logiciel
- **Lecture des courbes indispensables**

## Dilution

- Attention aux prélèvements hémorragiques et/ou troubles
- **Discuter d'une dilution préalable avec le biologiste**

## HHV6

- Détection du virus intégré sans aucune pathogénicité
- **Risque de fausse interprétation : résultat rendu sur avis biologiste**



# La PCR multiplexe : bilan

Multiplexe vs  
Culture

Interprétation des  
courbes et de la  
cellularité

Avis  
microbiologique

ESPRIT CRITIQUE SUR LE RENDU D'UN RESULTAT DE MULTIPLEXE

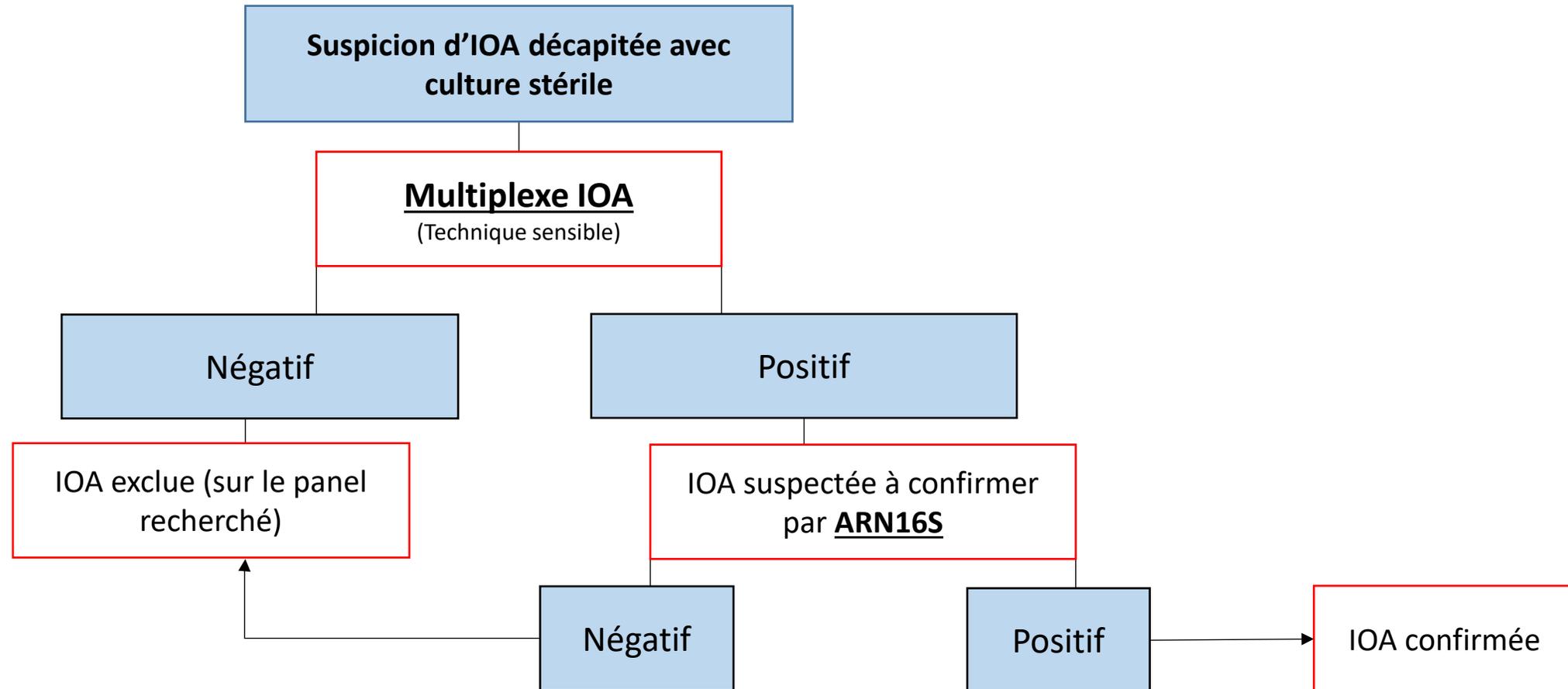
MISE EN PLACE D'UNE PROCEDURE DE DILUTION SELON CELLULARITE

→ Forte sensibilité qui peut nécessiter du recul et pourquoi pas un algorithme associant une technique hyper spécifique

→ ARN16S ?

# L'ARN16S au laboratoire du CHT : projet

- But = développement d'une technique très spécifique pour le diagnostic des infections ostéo-articulaires décapitées



# L'ARN16S au laboratoire du CHT : projet en cours

## □ Mise en place *en mai 2024* :

- 1<sup>ère</sup> étape : optimisation de la PCR ARN16S à partir des échantillons ostéo-articulaires positifs en culture +/- Multiplexe IOA
- Amplification de la quasi-totalité du gène (protocole V1-V9 ; kit SQK-16S114.24, ONT)
  - amorces V1-27F (5' AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3') barcodée
  - amorces V9-1492R (5' GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT 3') barcodée
- Les aliquots amplifiés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose

Espèce en culture	Espèce trouvé	Nombre de Reads	Si non quel niveau de classification ?	Nombre de Reads
Staphylococcus aureus	Staphylococcus roterodami	953	-	-
Haemophilus influenzae	Haemophilus influenzae	3 812	-	-
Escherichia coli	-	-	Enterobactéries (Famille)	3 922
Enterococcus faecalis	Enterococcus faecalis	966	-	-
Streptococcus pneumoniae	Streptococcus pneumoniae	5 547	-	-

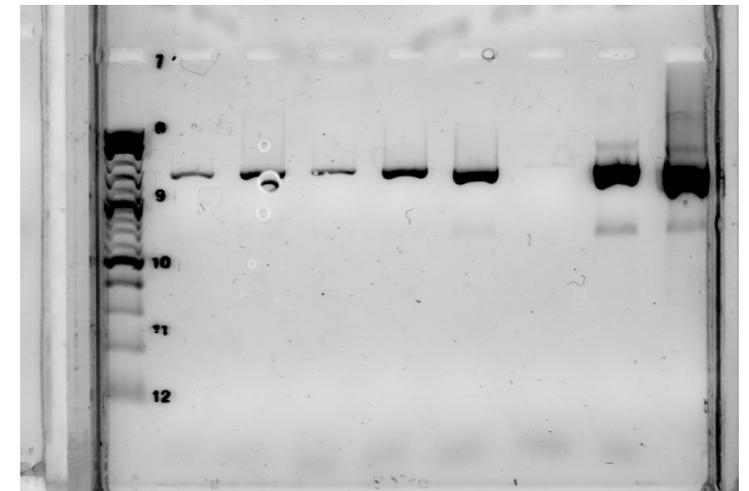


Figure 1. Electrophorèse sur gel d'agarose de l'amplification par PCR du gène ARNr 16S. Dans l'ordre de gauche à droite : 1. Marqueur de taille 2. Staphylococcus aureus 3. Haemophilus influenza 4. Escherichia coli 5. Enterococcus faecalis 6. Streptococcus pneumoniae 7. PCR de 25 cycles 8. PCR de 35 cycles 9. PCR de 45 cycles.

# L'ARN16S au laboratoire du CHT : projet

☐ A ce jour :

Défaut de sensibilité de la PCR  
nombre de cycles augmentés de  
25 (reco fournisseur ONT) à 45

Défaut de sensibilité de la PCR  
selon les espèces/genres

Défaut d'identification du logiciel EPI2ME  
selon les espèces/genre

**OPTIMISATION de  
la première étape  
de l'analyse  
+++**



**Merci pour votre attention**  
**La Orana**

