

# Diagnostic rapide des maladies infectieuses par PCR multiplex syndromiques

**Journée de Biologie Praticienne - 7 décembre 2018**

**Pr. Alban LE MONNIER**

Service de Microbiologie Clinique  
Plateforme de dosages des anti-infectieux  
**Groupe Hospitalier Paris Saint-Joseph**

Département de Microbiologie  
EA4043, Unité Bactéries Pathogènes et Santé  
**Université Paris-Sud Paris Saclay**



Vendredi 7 & samedi 8  
Décembre 2018

Maison de la Chimie  
28 bis rue St-Dominique  
75007 PARIS



## Déclaration de liens d'intérêt

### Conférences : invitations en qualité de conférencier

→ Cepheid, bioMérieux, Astellas, MSD

**Conférences : invitations en qualité d'auditeur** (prise en charge de frais de voyage, d'hébergement ou d'inscription à des congrès ou autres manifestations)

→ Novartis, Pfizer, Astellas, MSD, Sanofi-Pasteur, bioMérieux, Cepheid

**Soutiens financiers à la Recherche** (investigateur principal d'une recherche ou d'une étude clinique) :

→ Sanofi-Pasteur, Astellas, MSD, Eumédica, I2A, Biorad, Alere, Curetis, bioMérieux, ThermoFisher



Move healthcare forward.



Diagnostics



Autocopy

JBP - 201

# Enjeu du diagnostic étiologique rapide des maladies infectieuses

## Bactéries ? Virus ? Parasites, Champignons ?

**Un retard au diagnostic** est générateur de :

- retard à l'instauration d'une prise en charge adaptée (thérapeutiques, organisation des soins, isolement septiques, filiarisation des patients, ...),
- taux de complications plus important,
- surconsommation d'antibiotiques et d'antiviraux (acyclovir) en attendant le retour des résultats,
- prescription d'examens complémentaires le plus souvent inutiles et coûteux,
- prolongation des durées de séjour motivée par l'errance diagnostique,
- angoisse pour les patients et leurs proches, les équipes médicales et soignantes.

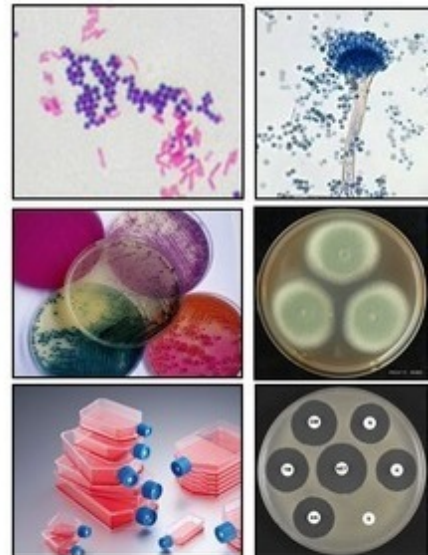
=> Besoin d'une réponse rapide de la microbiologie pour adapter précocement le traitement de 1ère ligne dans un contexte de bon usage des anti-infectieux

## Techniques classiques de microbiologie

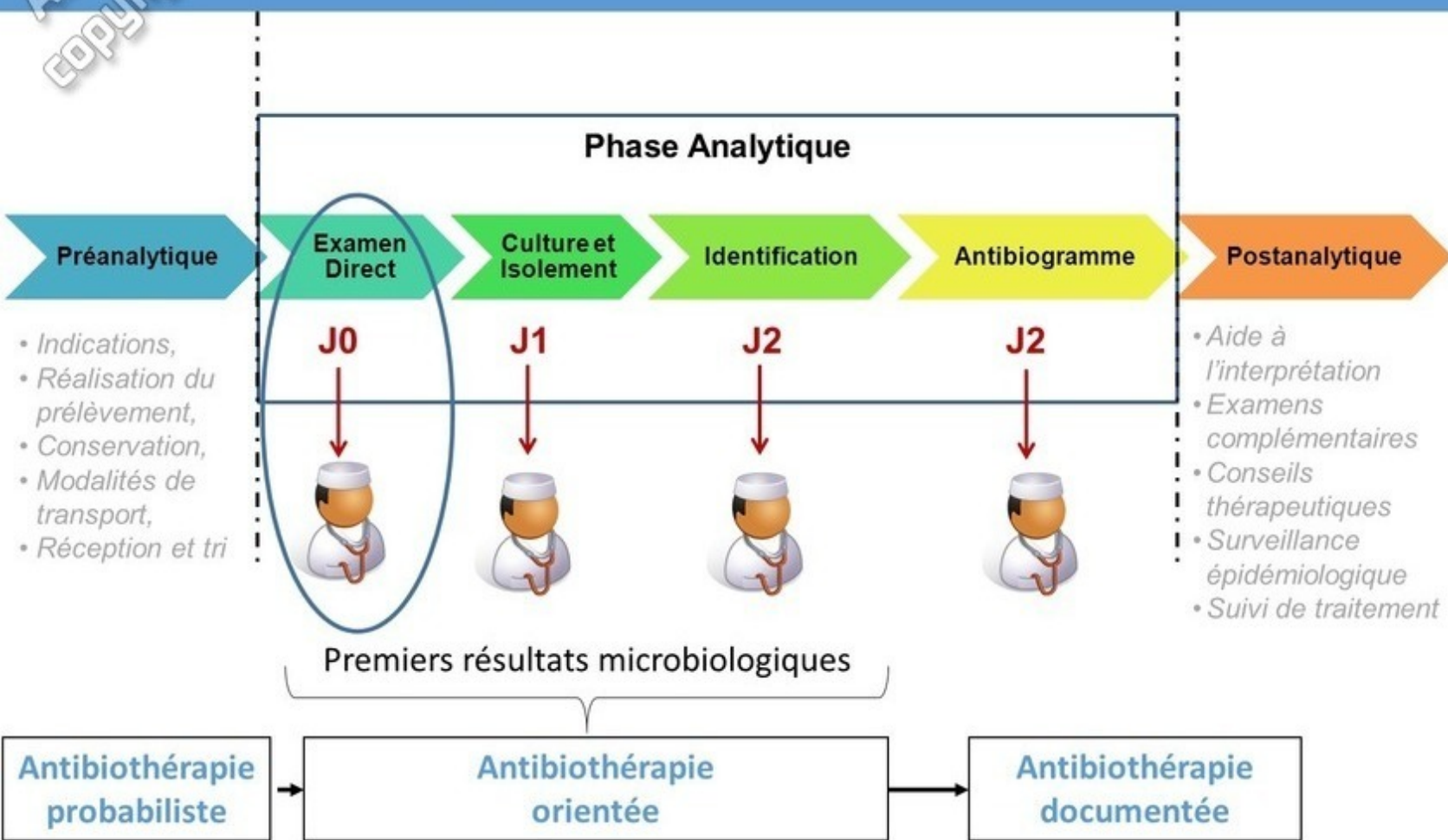
- Examen direct après coloration spécifique (Gram, Ziehl, ...),
- Détection d'antigène spécifique,
- Culture bactérienne et fongique,
- Antibiogramme sur colonies isolées,
- Culture cellulaire pour les virus,
- Sérodiagnostic, ...

## Problématiques

- Faible sensibilité de l'ED pour l'orientation précoce des traitements,
- Multiplicité des étiologies possibles pour un même syndrome infectieux (B, V, P-M)
- Mise en défaut des cultures (patient déjà sous traitement, agents infectieux difficilement ou non cultivables),
- Délai important pour l'obtention des résultats partiels puis complets incompatible avec une adaptation précoce des traitements ...

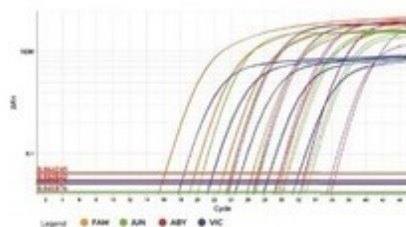


# Comment faire plus vite ?



# Evolutions technologiques récentes en microbiologie

- **Tests unitaires d'orientation diagnostique**
- **Ensemencements automatisés** enrichis par l'intelligence artificielle avec des algorithmes de tri par reconnaissance d'images
- **Identification rapide par MALDI-TOF-MS**
- **Biologie moléculaire** : avancées technologiques importantes
  - **PCR en temps réel** simplifiant la détection (sondes marquées)
  - **Plus rapide** : *run* de plus en plus rapides
  - **Quantification** (charges virales etc.)
  - **Plateforme tout-en-un** facile d'accès (« Nespresso »)
  - **Multiplexage** (plusieurs canaux de détection puis micro-array)



... et bientôt le WGS !!!

# PCR multiplexe pour une perspective d'approche diagnostique syndromique rapide

## Principe

Détection simultanée de plusieurs cibles au cours de la même analyse  
Sur un même échantillon biologique

## Avantages

Work-flow simplifié, économie de volume échantillon, réduction du temps d'analyse, ...

## Limites techniques

Nombre de cibles variable en fonction du mode de détection

- **Canaux de fluorophore** limitant les choix (ex : PF GeneXpert)

=> PCR simplexe ou « Basplexe »

- **Puces ADN (array)** pour la détection de multiples amplicons

=> PCR Multiplex



Permet l'approche diagnostique par syndrome



## Test conventionnel



## Analyse syndromique



# Quel équipement de biologie moléculaire ?

## Plateau technique de biologie moléculaire

## Plateforme intégrée, tout-en-un

Prélèvement respiratoire



20-30 mn

Extraction  
des acides nucléiques

1 h-2 h

PCR multiplex

50 mn-2 h 30

Interprétation  
des résultats

2 h 30-9 h



Système intégré

- Extraction
- PCR
- Interprétation

< 5 mn

1 h-2 h



Temps de manipulation technique



Durée de réalisation

## Une grande expertise

- Équipements spécialisés, performants et ouverts aux PCR « maison » et commerciales,
- Large diversité des analyses proposées,
- Un haut débit de réponse => adapté pour les grandes ou mini séries,
- Coûts minimisés.

## Contraintes ne permettant pas de répondre à tous les besoins

- Restreint à dans des centres spécialisés peu nombreux,
- Nécessite des locaux adaptés, des investissements importants et du personnel expert et formé,
- Accessibilité en journée mais fermé en période de garde et le WE,
- Délais de rendu variables mais peu compatibles avec l'urgence car difficilement mobilisable « à la demande » ...

## Critères de choix

### **Inventaire préalable des besoins dans une démarche concertée avec les prescripteurs**

=> besoins et attentes des cliniciens et positionnement souhaité

=> contraintes du laboratoire (organisation, volume d'analyse, redondance d'équipement, etc.)

# Quels besoins et quelles attentes respectives ?

## point de vue du clinicien

- Rapide
- Pan micro-organismes
- « A la demande »
- Accessible 24/7
- Gènes de résistance
- Pas de démultiplication des prélèvements (faible volume)

## point de vue du microbiologiste

- Pas de locaux dédiés
- Pas d'expertise technique
- Technicité simple et TAT courts
- Automatisation complète
- Modulaire
- Performances analytiques
- Test unique facile à accréditer
- Coût-efficace



## Critères de choix

### **Inventaire préalable des besoins dans une démarche concertée avec les prescripteurs**

=> besoins et attentes des cliniciens et positionnement souhaité

=> contraintes du laboratoire (organisation, volume d'analyse, redondance d'équipement, etc.)

- Compositions des panels
- Performances analytiques
- Caractéristiques de la plateforme ciblée
- Coffrets réactif et coût / au test

# Composition des panels

- **Panel marqués** CE-IVD et/ou FDA souvent captif d'une plateforme
- **Composition variable selon les fabricants**
  - Nombre et liste des agents infectieux
  - Diversité : bactéries, virus, parasite, champignons
  - Gènes codant certains facteurs de virulence et/ou de résistance aux antibiotiques
- **Discordance entre besoins du terrain et certains choix**
  - Choix des gènes cibles parfois influencé par la réglementation
  - Certains variants de souches ne correspondant pas à l'épidémiologie européenne
  - Absences notables ou présences embarrassantes de certains agents infectieux dont le pouvoir pathogène est difficile à interpréter
- **Stratégie différente selon les fabricants**
  - Réactivité différentes pour la mise à jour des panels
  - Entre une démarche d'exhaustivité et des panels flexibles ou adaptatifs (antécédents, renseignements cliniques fournis, premiers résultats microbiologiques, ...)

Author's  
copyright ©

# Menu

## Entrée

Dos de Cabillaud  
sur son lit de Risotto au Pesto

## Plat

Rond de Gîte  
farci au Foie Gras et Morilles

## Dessert

Pièce montée  
et ourmandises des mariés

## Vins

Johannisberg du Valais AOC | 2010 |  
Bourgogne Coteaux des Moines | 2009 |

# Les Trois Frères Provençaux,

Restaurateurs, Palais-Royal, au Perron, N°3

## DEJEUNERS ET DINERS.

Le menu de plus pour satisfaire		MOUTON		DESSERTS	
Le petit porc.	POTAGES	Pied d'agneau à la provençale.	77	Bœuf à l'indienne.	80
à la crème.	78	Chateaubriand sauté au jus de viande.	78	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	79	Un chateaubriand sauté à l'anglaise.	79	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	80	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	81	Chateaubriand sauté au jus de viande.	81	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	82	Chateaubriand sauté au jus de viande.	82	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	83	Chateaubriand sauté au jus de viande.	83	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	84	Chateaubriand sauté au jus de viande.	84	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	85	Chateaubriand sauté au jus de viande.	85	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	86	Chateaubriand sauté au jus de viande.	86	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	87	Chateaubriand sauté au jus de viande.	87	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	88	Chateaubriand sauté au jus de viande.	88	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	89	Chateaubriand sauté au jus de viande.	89	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	90	Chateaubriand sauté au jus de viande.	90	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	91	Chateaubriand sauté au jus de viande.	91	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	92	Chateaubriand sauté au jus de viande.	92	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	93	Chateaubriand sauté au jus de viande.	93	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	94	Chateaubriand sauté au jus de viande.	94	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	95	Chateaubriand sauté au jus de viande.	95	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	96	Chateaubriand sauté au jus de viande.	96	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	97	Chateaubriand sauté au jus de viande.	97	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	98	Chateaubriand sauté au jus de viande.	98	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	99	Chateaubriand sauté au jus de viande.	99	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80
à la tomate.	100	Chateaubriand sauté au jus de viande.	100	Chateaubriand sauté au jus de viande.	80

ou



# Performances analytiques et données médico-économiques

## Etudes sur les performances analytiques

- De plus en plus d'études dont des retours d'expériences,
- Vigilance sur liens d'intérêt avec les industriels,
- Besoin d'impliquer plus en amont les CNR pour évaluer ces panels,
- Conditions d'évaluation variables
  - modalités d'étude hétérogènes (pré-analytique, type d'échantillon, choix des patients)
  - mise en condition de vie réelle avec échantillon frais et non sur des banque de collections biologiques congelées
  - comparateur pas toujours existants (ex *E. coli* entero-pathogène sur panel GI)

## Etudes médico-économiques

- Moins nombreuses mais en cours ...
- Importance des conditions pré et post analytiques sur l'évaluation de l'impact clinique
- Importance de la sélection des patients inclus,
- Limite d'analyse : délais variables d'acheminement des échantillons au laboratoire, disponibilité des cliniciens 24/7 pour modifier précocement la prise en charge, organisation en place, ...

# Critères de choix de la plateforme

- Diversité des panels proposés,
- Encombrement,
- Automatisation complète ou partielle,
- Débit de tests : grand débit et/ou à la demande (pour quel usage ?)
- Modularité,
- Accessibilité et facilité de prise en main par personnel polyvalent non expert,
- Temps de préparation des échantillons biologiques (TAT),
- Temps d'analyse,
- Logiciel d'analyse et d'interprétation et ergonomie de l'interface,
- Connectabilité,
- Coût (achat ou mise à disposition) ...

# Caractéristiques des principales plateformes intégrées ou semi-intégrées et panels syndromiques disponibles en Europe

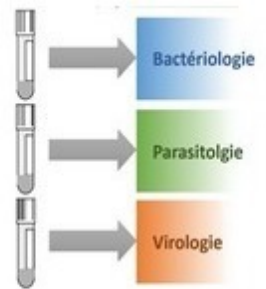
Société	GenMark Diagnostics		bioMérieux/ Biofire	Quiagen	Mobidiag	Becton Dickinson	Curetis	Luminex		Seegene/ Eurobio
Plateforme	ePlex®	eSensor XT-8®	FilmArray®	DiagCORE Analyzer STAT-Dx®	Novodiag®	BD MAX®	Unyvero®	Verigene Nanogrid Technology®	MAGPIX® ou Luminex 100/200®	Nimbus® CFX96®
Panels	Rv	Rv	Rv, ME, BF, GE	R, GE	GE	GE	R, BF, GE	P, B, GE	P, ME, B, GE	P, GE
Automatisation	Totale	Totale	Totale	Totale	Totale	Totale	Partielle <sup>a</sup>	Partielle <sup>a</sup>	Partielle <sup>a</sup>	Partielle <sup>a</sup>
Technicité	Simple	Simple	Simple	Simple	Simple	Simple	Complexe	Complexe	Complexe	Complexe
Débit de tests	3-24 (modulaire)	8-24 (modulaire)	1-12 (modulaire)	1-8 (modulaire)	1-16 (modulaire)	1-24 (modulaire)	1-32 (modulaire)	1-32 (modulaire)	≤ 50	≤ 76
Délai de réponse	~ 1,5 h	~ 1 h	~ 1 h	~ 1 h	~ 1,25 h	2-3 h	~ 4 h	2,5 h	~ 5 h	3-5 h

<sup>a</sup> Au moins deux équipements différents sont requis pour gérer les différentes phases analytiques (extraction, amplification et détection-lecture).

Abréviations des panels : R : infection respiratoire ; Rv : infection respiratoire (virus et bactéries atypiques) ; ME : méningo-encéphalite ; B : bactériémie ; BF : bactériémie/fongémie ; GE : gastro-entérite.

# Panel méningite/encéphalite

Biochimie



- 2 panels commercialisés (d'autres en développement)
- 14 et 18 cibles d'agents infectieux responsables de M/E communautaire (B, V, M)

## Avantages

- Volume échantillon faible : 200  $\mu$ l (épargne de LCR précieux pour lancer examens complémentaires)
- Réponse rapide particulièrement adaptée au diagnostic des M/E (*run* : 1h à 3h (hors temps d'extraction))
- Ne plus avoir à choisir entre acyclovir, amoxicilline ou C3G.
- Rajouter rapidement une ligne thérapeutique oubliée
- Stratégie microbiologique sur la base des premiers résultats cyto-chimiques +++

## Limites

- Interprétation de la détection d'un HHV6, des EBV souvent (trop) souvent positifs
- Certains manques dans la composition du panel : comme la Rougeole et le BK
- Sensibilité correcte mais avec des seuils pas compatibles pour le contrôle ou les suivi post traitement (cas de faux négatifs)
- Quelques cas de contamination par bactérie ORL (cas de faux positif)



**Respiratoire Haut** (virus et bactéries atypiques) : nombreux panels (panels les plus anciens)

- Adapté à l'urgence notamment dans le cas des infections respiratoires graves ou chez les sujets fragiles
- Effort pour proposer un panel flexible à adapter en fonction du contexte
- Epidémiologie saisonnière

**Respiratoire Bas** (bactéries : hCAP, PAVM) : 1 seul disponible + 1 autre (12/2018)

- Le nouveau panel présente l'avantage de classe de quantification facilitant l'interprétation en fonction de seuil
- Gènes de résistances plus ou moins nombreux et adaptés
- Peu de recul mais des études d'évaluation et médico-économiques sont en cours

## Limites

- Vigilance sur le type de prélèvement réalisé
- Problématique du *Pneumocystis* et d'autres manques
- Difficultés d'interprétation : signification clinique de la présence d'un virus dans les sécrétions respiratoires ? Quelle attitude devant un virus pour lequel il n'existe pas de traitement ?
- Etudes médico-économiques encore insuffisantes

# Panel gastro-entériques



- Nombreux panels de composition variable (n=7)
- Possibilité de choix parmi des panels flexibles (B-V-PM) efforts pour proposer des panels différenciés
- Quelques manques notables dans certains panels

## Intérêts

- Alternative intéressante à la coproculture standard et aux multiples recherches particulières selon le contexte (*C. difficile*, *Vibrio*, *Yersinia*, *E. coli* O157 ...)
- Réponse très rapide sans réel intérêt car pas de réelle urgence pour ce type d'examen
- Optimisation des flux au laboratoire (processus simplifié)

## Limites

- Pas de gènes de résistances aux ATB (nécessité de se concentrer sur les positifs pour isoler les souches)
- Problème d'interprétation sur les coinfections, les colonisations, les différents pathovars de *E. coli* (fréquemment retrouvés)
- Peu d'études médico-économiques bien conduites à ce jour

# Panel bactériémie/fongémie



- Peu de panels (n=3), d'autres en développement
  - Sur flacons d'hémoculture positif
  - Nombreuses cibles : bactéries et levures et gènes de résistance aux ATB (plus ou moins nombreux)
  - Réponse plus ou moins rapide en fonction des systèmes (1h à qqes heures)
- => **Nouvelle stratégie** intéressante basée sur les résultats du Gram permettant de choisir le panel le plus approprié et de conserver un pan-Gram négatif, pan-Gram positif, pan-levures

## Limites et vigilances

- Beaucoup d'alternatives ont été développées pour la gestion des hémocultures (PCR ciblée, FISH, ou MALDI-TOF-MS) => positionnement compliqué du fait du coût
- Peu adapté en systématique sur toutes les hémocultures au risque de saturer la plateforme et perdre en réactivité
- Indications sur quelques cas particuliers : levures, polymicrobien, etc.
- Interprétation des résultats sur les gènes de résistances aux ATB détectés
- Attention à certains manques dans les identifications de famille ou de genre (cf. notice !)

- **Infections sexuellement transmissibles** (2 types de panels, B, V et P)  
=> plus une stratégie de grande mini ou grande série avec une contrainte organisationnelle avec les CeGGID
- **Infections ostéoarticulaires et des tissus mous** (1 panel et 1 en développement)  
bactéries + gènes codant la résistance  
beaucoup d'évaluation en cours pour des patients d'orthopédie septique
- **Santé de la femme** : composition très variable proche ou associée aux IST
- **Fièvre de l'immunodéprimé**

## Pipeline et besoins en attente

- **Infections urinaires**
- **Fièvre au retour de voyage**
- **Infections intra-abdominales, ...**



- Respect de l'environnement (usage unique, choix des matériaux, ...),
- Délai de péremption des kits,
- Température de conservation,
- Contenu des coffrets en nombre de tests,
- Coût test unitaire ...

## Financement : rappel du contexte actuel ...

- Innovations technologiques majeures dans l'objectif d'aller toujours plus vite,
- Restriction budgétaire dans un contexte de T2A,
- Laboratoires = centre de coût, ventilation des bénéfices médico-économiques sur les pôles cliniques



## Achat *versus* mise à disposition

### Arguments médicaux

- Besoin du soutien inconditionnel de la collectivité médicale
- Réponse rapide (en théorie 24/7),
- Adaptation rapide des stratégies thérapeutiques,
- Baisse de la mortalité, des complications et de la iatrogénie (EI et IAS),
- Diminution de l'errance diagnostique (anxiété des équipes et des familles)

### Arguments économiques

- Baisse des DMS, des frais d'hospitalisation et libération de lits,
- Baisse des consommations ATB, antiviraux et antifongique (stratégie bon usage des AI),
- Baisse de la prescription des examens complémentaires inutiles (biologie et radiologie),
- Balance des coûts (coûts de l'externalisation versus mise en place d'une plate-forme de biologie moléculaire, ...),
- Financement par les enveloppes MERRI avec les RIHN,
- Valorisation des séjours avec l'optimisation du codage PMSI en lien avec son DIM.

## Positionnement hospitalier

- Indications : travail commun à faire avec les prescripteurs,
- Encadrement strict pour rationaliser l'usage et éviter un recours abusif à ces tests

=> Mise en place de stratégies de juste prescription (retour expérience)

- Pas accessibles sur le logiciel de prescription connectée ni sur les bons de demande d'examen y compris celui d'urgence
- Séniorisation des prescriptions et validation préalable par un sénior de microbiologie sur la base d'une discussion clinico-biologique
- Validation préalable de l'indication par le microbiologiste
- Indicateurs de suivi des prescriptions

Réinternalisation d'examens sous-traités (formation, organisation, gestion, ...)

## Réorganisation des laboratoires

- Favorise le regroupement des laboratoires
- 24h/7j => habilitation de l'ensemble du personnel de jour et de nuit,
- Systématique en première ligne (pour certains panels) => volume et contrainte
- Interactions à mettre en place et responsabilité de la validation biologique entre les différences services (bactériologie, virologie, Parasitologie-mycologie)
- POC et biologie délocalisée ?(vigilance : besoin de plus de recul)

# Limites qu'il faut connaître

## Rapide oui mais ?

« *Rapid is good but accurate is everything* »

=> En amont : quelle logistique d'acheminement des prélèvements (multisite, coursier) ?

=> En aval : quelle disponibilité 24/7 des cliniciens pour adapter les TTT ?

## Etudes médico-économiques souvent isolées, monocentriques, voire rétrospectives ...

=> à interpréter avec prudence

**Performances analytiques** variables selon les panels mais aussi les conditions d'utilisation (échantillon frais, congelé ...) pas assez sensible pour le suivi de patients (FP et FN)

=> à consolider

**Cas de contamination** (ex: germes ORL et panel M/E)

=> cela reste de la biologie moléculaire

**Interprétation difficile de situations nouvelles** cas HHV6 et panel M/E, co-infection digestive à plusieurs AI, colonisation vs infection, absence de quantification ou question clinique clairement posée

=> besoin de plus de recul

**Pas de détection des émergences** de nouveaux clones ou gènes de résistances aux ATB

=> Besoin de réactivité des fabricants

**Coûts au test encore très(trop) importants**

=> Marché de plus en plus concurrentiel qui devrait permettre de réduire les coûts à terme

# Quelques problèmes et points de vigilance

## Message important aux cliniciens :

- **Ne pas se désinvestir du raisonnement clinique** et du diagnostic différentiel
- **Pas de panel exhaustif** (manque certains agents infectieux et gène de résistance)
- Outils de diagnostic rapide **pas adapté pour le suivi** de l'efficacité des traitements
- **La culture reste le gold standard** pour l'isolement des souches bactériennes (réalisation de l'antibiogramme, surveillance épidémiologique et de l'émergence de nouveaux clones pathogènes ou résistants, ...)

## Situations particulières renforçant le rôle du microbiologiste

- Confronter à des étiologies habituellement non demandées ou non évoquées
- Agents infectieux sans traitement à ce jour : quelle prise en charge ?
- Cas des **colonisations** asymptomatiques mise en évidence
- Cas de **co-infections** difficilement interprétable ...
- **Dérives** : **rapide tendance à « exiger »** l'approche syndromique en première intention alors qu'elle n'est pas toujours justifiée médicalement

- **Evolutions technologiques rapides** accessibles à tous les laboratoires et susceptibles de modifier nos organisations et nos modes d'exercices,
- **Approche syndromique rapide répondant à une demande forte** des équipes médicales et avec un important service rendu aux patients ;
- **Tests onéreux sur un marché devenu fortement concurrentiel** : importance des critères de choix en fonction de ses besoins et des organisations déjà en place
- **Panels perfectibles** avec des limites qu'il convient de connaître
- **Le microbiologiste** = doit jouer un rôle central dans le positionnement de ces tests, leur juste prescription et les conseils pour l'interprétation des résultats

⇒ **une opportunité pour**

- Renforcer les relations clinico-biologiques localement
- Décentraliser la biologie spécialisée actuellement concentrée sur certains sites





Author's  
copyright ©



Merci pour votre attention 2018 - A LE MONNIER