

**L'APPROCHE SYNDROMIQUE DANS
LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE
DES PATHOLOGIES INFECTIEUSES**

POUR OU CONTRE?

PR F. DJENNANE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE MERE ENFANT

CHU BÉNI MESSOUS-ALGER OUEST

EVOLUTION DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE...

- Depuis 20 dernières années, l'introduction de la biologie moléculaire et l'automatisation ont radicalement changé les pratiques des labo de microbiologie.
- L'amélioration de la communication entre microbiologiste et clinicien et les évolutions technologiques (standardisation, développement de test diagnostic rapide, BM...) ont conduit à une réorganisation de la stratégie diagnostic des laboratoires de microbiologie médicale.
- Aujourd'hui, la révolution a eu lieu, la biologie moléculaire est au centre de cette stratégie devenant le nouveau **gold standard** pour le diagnostic de plusieurs maladies infectieuses.

EVOLUTION DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE...

- Une des limites majeures du diagnostic moléculaire microbiologique était le fait que chaque pathogène potentiel était ciblé de manière individuelle,
- Mais...l'avènement des techniques PCR multiplex a permis de détecter en une seule fois dans un même échantillon biologique un grand nombre de pathogènes possibles, *via* leur signature génétique.
- Désormais face à un syndrome clinique le microbiologiste dispose de kits moléculaires permettant d'identifier un panel d'agents pathogènes potentiellement responsables de ce syndrome.



Respiratory



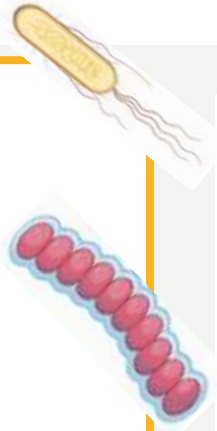
Meningitis/ encephalitis

Type d'échantillon : liquide cephalo-rachidien (LCR) non centrifuge 200 µl

14 cibles

Bacteries

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



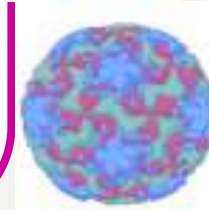
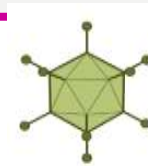
Champignons

Cryptococcus neoformans/gattii



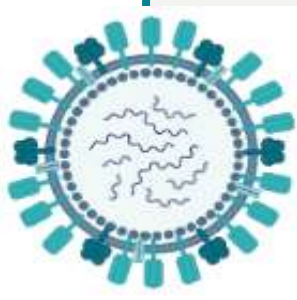
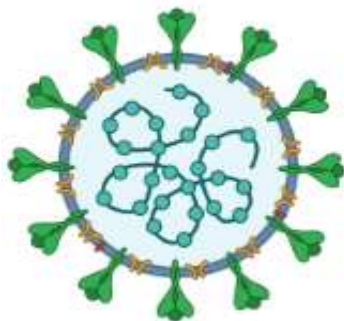
Virus

- Cytomegalovirus (CMV)
- Enterovirus (EV)
- Herpes simplex virus 1 (HSV-1)
- Herpes simplex virus 2 (HSV-2)
- Human herpesvirus 6 (HHV-6)
- Human parechovirus (HPeV)
- Varicella zoster virus (VZV)



Virus

- Adénovirus
- Coronavirus HKU1
- Coronavirus NL63
- Coronavirus 229E
- Coronavirus OC43
- **SARS-CoV 2**
- **MERS-Coronavirus**
- Métapneumovirus humain
- Rhinovirus/Entérovirus humain
- Virus de la grippe A
- Virus de la grippe A/H1
- Virus de la grippe A/H1-2009
- Virus de la grippe A/H3
- Virus de la grippe B
- Parainfluenza 1
- Parainfluenza 2
- Parainfluenza 3
- Parainfluenza 4
- Virus respiratoire syncytial



Panel Respiratoire 2.1 plus

Type d'échantillon : écouvillon nasopharyngé 300 µl

23cibles



Bacteries

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



Deux cibles SARS-COV-2 :

- **Gène Spike Protein (S)**
- **Gène Membrane Protein (M)**



Pneumonia Panel

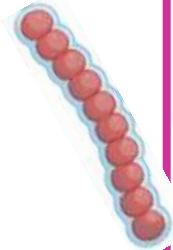
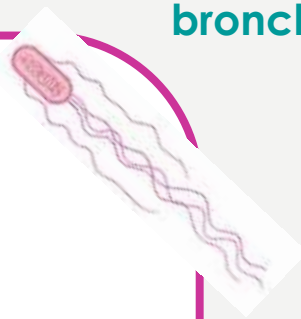
Type d'échantillon : crachat, aspiration endotracheale et lavage broncho-alveolaire (+mini LBA)

43
cibles

Bactéries

Bactéries semi-quantitatives

- *Acinetobacter baumannii*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli*
- *Haemophilus influenza*
- *Klebsiella aerogenes*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Proteus spp.*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumonia*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus agalactiae*



Gènes de résistance aux antibiotiques

- *mecA/C* et MREJ

Carbapénémase

- KPC
- NDM
- Oxa-48-like
- VIM , IMP

BLSE (CTX-M)

Bactéries atypiques

- *Legionella pneumophila*
- *Mycoplasma pneumonia*
- *Chlamydia pneumoniae*



Virus

- Virus de la grippe A
- Virus de la grippe B
- Virus RS
- Entérovirus/rhinovirus humains
- Métapneumovirus humain
- Virus parainfluenza
- Adénovirus
- Coronavirus
- MERS-CoV



Gastro-intestinal Panel

Type d'échantillon : Selles en milieu de transport Cary Blair 200 µl

22 cibles

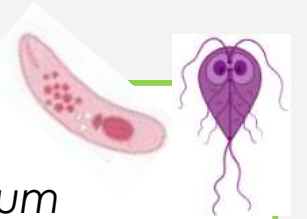
Bacteries

- Campylobacter (jejuni, coli et upsaliensis)
- Clostridium difficile (toxine A/B)
- Plesiomonas shigelloides
- Salmonella
- Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus et cholerae)
- Vibrio cholerae
- Yersinia enterocolitica
- E. coli/Shigella diarrhéique
- E. coli (EAEC) entéroagréatif
- E. coli (EPEC) entéropathogène
- E. coli (ETEC) It/st entérotoxinogène
- E. coli productrice de Shiga-toxine (STEC) stx1/stx2
- E. coli O157
- Shigella/E. coli entéroinvasif (EIEC)



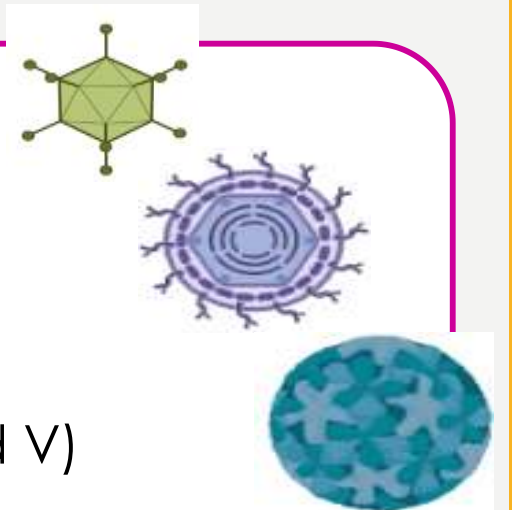
Parasites

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



Virus

- Adenovirus F 40/41
- Astrovirus
- Norovirus GI/GII
- Rotavirus A
- Sapovirus (I, II, IV, and V)



Blood Culture Identification (BCID2) Panel

Type d'échantillon : milieu d'hémoculture positive (200 µl)

43 Cibles

Bactéries Gram-

Complexe Acinetobacter
calcoaceticus-baumannii

Bacteroides fragilis

Enterobacterales

- Complexe Enterobacter cloacae
- Escherichia coli
- Klebsiella aerogenes
- Klebsiella oxytoca
- Groupe Klebsiella pneumoniae
- Proteus
- Salmonella
- Serratia marcescens
- Haemophilus influenzae
- Neisseria meningitidis
- Pseudomonas aeruginosa
- Stenotrophomonas maltophilia

Bactéries Gram+

Enterococcus faecalis

Enterococcus faecium

Listeria monocytogenes

Staphylococcus

- Staphylococcus aureus
- Staphylococcus epidermidis
- Staphylococcus lugdunensis

Streptococcus

- Streptococcus agalactiae
- Streptococcus pneumoniae
- Streptococcus pyogenes

Gènes de résistance aux antibiotiques

- **Résistance à la méticilline:** mecA/C, MREJ
- **Resistance à Vancomycine :** Gène vanA/B
- **Resistance à Colistin** *mcr-1*
- **BLSE:** CTX-M
- **Carbapénèmase:** Gène KPC, IMP, OXA-48-like, NDM, VIM.

Levures

- Candida albicans
- Candida glabrata
- Candida auris
- Candida krusei
- Candida parapsilosis
- Candida tropicalis
- Cryptococcus neoformans/gattii

COMING SOON...



BioFire® Bone and Joint Infection Panel*

1 Test. 39 Targets. ~1 Hour.

*Investigational use only. Not for use in diagnostic procedures.

GRAM-POSITIVE BACTERIA

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

GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Bacteroides fragilis
Citrobacter
Enterobacter cloacae complex
Escherichia coli
Haemophilus influenzae
Kingella kingae
Klebsiella aerogenes
Klebsiella pneumoniae group
Morganella morganii
Neisseria gonorrhoeae
Proteus spp.
Pseudomonas aeruginosa
Salmonella spp.
Serratia marcescens

YEAST

Candida spp.
Candida albicans

ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES

Carbapenemases

IMP
KPC
NDM
OXA-48-like
VIM

ESBL

CTX-M

Methicillin Resistance

mecA/C and MREJ

Vancomycin Resistance

vanA/B





**RETOUR
D'EXPÉRIENCE...
UTILISATION PCR
BIOFIRE***

**LABORATOIRE MERE ENFANT
UNITE DE MICROBIOLOGIE
CHU BENI MESSOUS**

JUIN 2021



- Adoption de la stratégie diagnostic par approche syndromique moléculaire



Panels BioFire*



- **Respiratoire haut + bas**
- **Menigo-encéphalite**
- **Gastrointestinal**

Techniques
conventionnelles



- Conservées dans la majorité des situations



178
PCR multiplex
réalisées

71

• **IRH**



22

• **IRB**



60

• **ME**



25

• **GI**



- Optimiser le **délat de réponse** et le taux de **positivité** dans le diagnostic microbiologique des pathologies infectieuses (Performances !!!).
- Enrichir les **données de l'épidémiologie microbiennes** (Bactéries, virus, parasites, champignons) des pathologies infectieuses.
- Evaluer **expertise du microbiologiste** dans l'utilisation de l'approche syndromique.



Impact dans la prise en charge du patient



OBJECTIFS



Délai de réponse :

ECB : **J1**: ED/Mise en culture

J2: Lecture de la culture et isolement

J3: isolement et ATBgr

J4: Lecture ATBgr

PCR Multiplex BioFire* : (-1h à 1h15)

J1: Résultat +/- marqueurs de Résistance



**TAUX POSITIVITÉ
GLOBAL ET DÉLAI
DE RÉPONSE**

Résultats PCR syndromique Vs Résultats techniques usuelles



- **ME** : Sur 60 PCR seules **40** ont bénéficié des deux techniques
(PCR vs ECB LCR)

		PCR ME	
		Positif	Négatif
ECB LCR	Positif	04/40 (100% concordance)	7/40**
	Négatif	06/40*	23/40

*Optimisation de la positivité de **15%** : récupération de 06 cas + en PCR

**Etiologies hors panels : Méningite nosocomiale dont
(*A.baumannii*, *Achromobacter*, *2S.aureus* et *03E.coli*)



**TAUX POSITIVITÉ
OPTIMISATION ...**

Résultats PCR syndromique Vs Résultats techniques usuelles



- **GI** : Sur 25 PCR seules 17 ont bénéficié des deux techniques (**PCR vs Coproculture**)

		PCR GI	
		Positif	Négatif
Coproculture	Positif	01/17 (Incomplet)	00/17
	Négatif	14*/17	02/17

*Optimisation de la positivité de **82%** : récupération de 14 cas + en PCR

**TAUX POSITIVITÉ
OPTIMISATION ...**



Résultats PCR syndromique Vs Résultats techniques usuelles



- IRB : Sur 22 PCR seules **14** ont bénéficié des deux techniques PCR vs ECB

		PCR ME	
		Positif	Négatif
ECB Expectoration PDP LBA	Positif	05/14 (100% Concordance)*	01/14
	Négatif (AGP)	06/14	03/14

**TAUX POSITIVITÉ
OPTIMISATION ...**



Optimisation de la positivité de **43% : récupération de 06 cas + en PCR

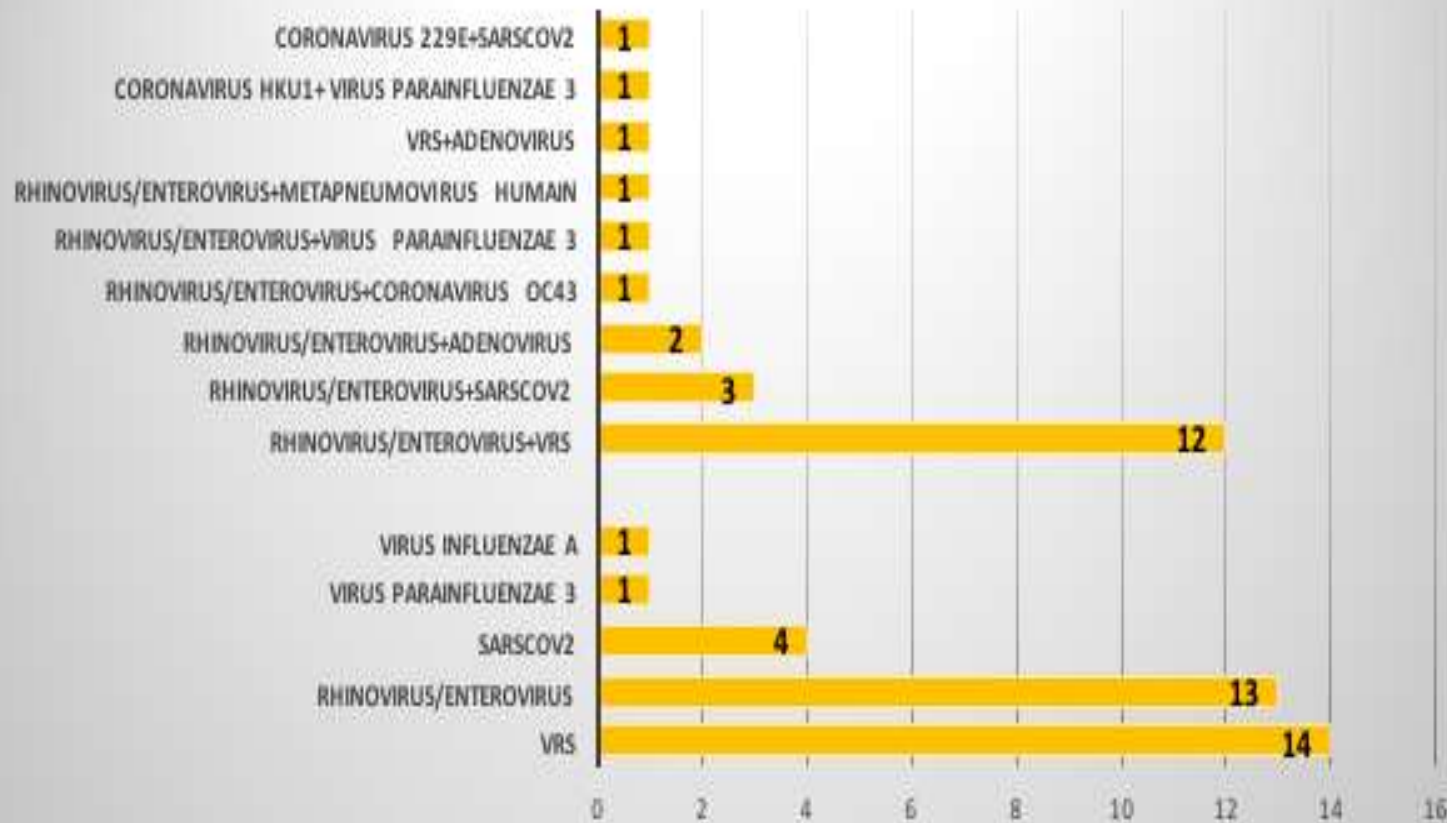
*Résultats incomplets 03cas/05 et 02cas/05 identiques mais la PCR ajoutait les marqueurs de résistance.

- IRH pas de parallèle Epidémie Covid19, Pvmt NP non adapté à la culture bactérienne





IRH : 56 PCR +



Principalement virale ...



EPIDÉMIOLOGIE MICROBIENNE DES PATHOLOGIES INFECTIEUSES



IRB

01 Etiologie	Adenovirus	1
	S.aureus (Mec A/C)	1
	A.baumannii	1
	Rhinovirus/Enterovirus	1

- Aucune PCR + ne ressemble à l'autre : 18+ avec des agents étiologiques différents associés ou pas!!
- Etiologies bactériennes en priorité, les virus peu représentés
- Les résultats avec 1 ou 2 agents étiologiques : intérêt certain dans la prise en charge thérapeutique des pneumopathies
- Association de plus de 2 agents étiologiques : caractère nosocomial important avec des marqueurs de résistance: Mise en place d'une politique maîtrise des IN en réanimation.

04 Etiologies	Serratia marcescens + Adenovirus + Coronavirus + Rhinovirus/Enterovirus	1
05 Etiologies	A.baumannii + P.aeruginosa + K. oxytoca (CTX M/ NDM) + V. Influenzae + V. parainfluenzae	1
	Acinetobacter baumannii + Klebsiella pneumoniae + Enterobacter cloacae + Influenza virus A + Rhinovirus/Enterovirus	1
	Moraxella catarrhalis + Haemophilus influenzae + Klebsiella oxytoca + Pseudomonas aeruginosa + Rhinovirus/Enterovirus	1

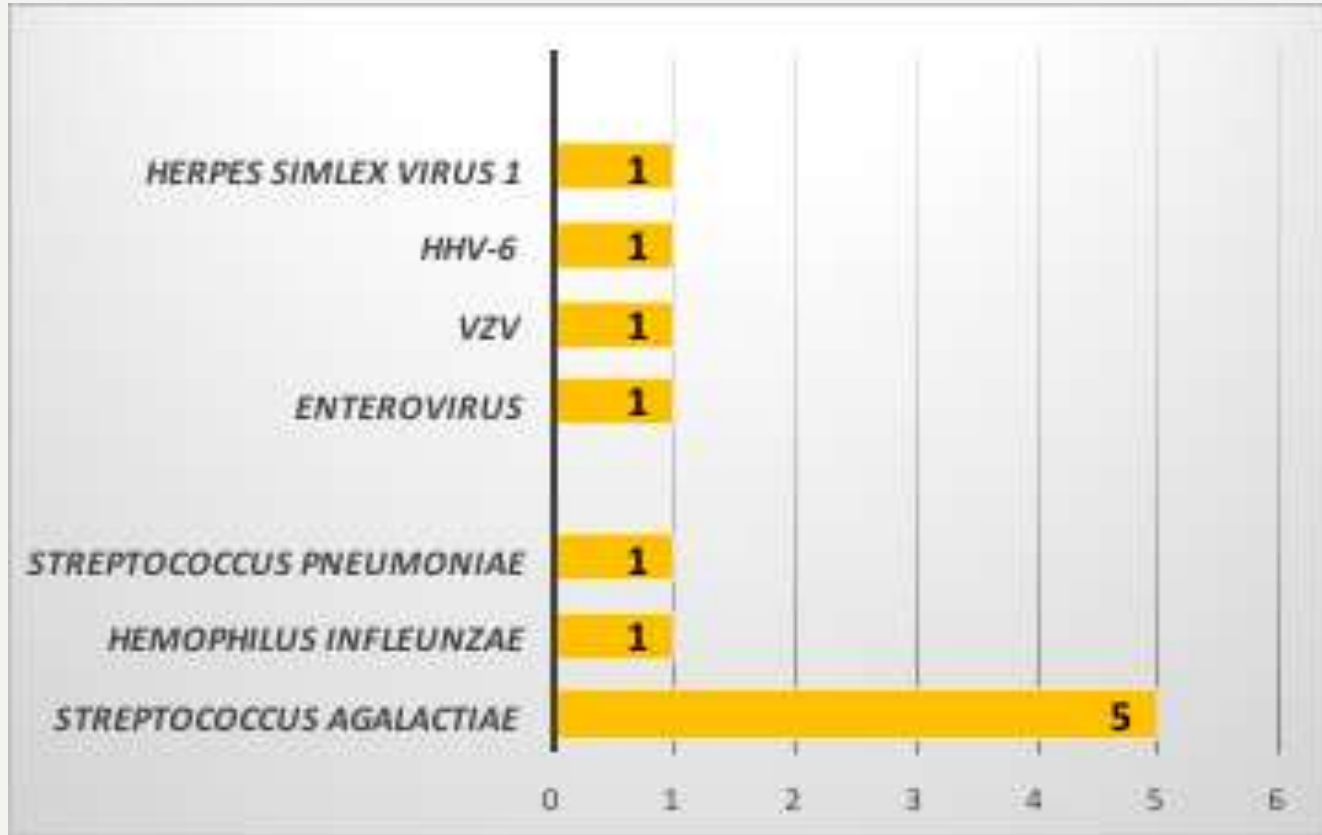


EPIDÉMIOLOGIE MICROBIENNE DES PATHOLOGIES INFECTIEUSES





ME : N=11 PCR+



Thérapeutique ciblée, réduit délai hospitalisation....



EPIDÉMIOLOGIE MICROBIENNE DES PATHOLOGIES INFECTIEUSES





GI : N= 18 PCR positives

01 Etiologie	Rotavirus	2
	Norovirus	1
	EPEC	1
	Clostridium difficile Tox A/B	1

- Aucune étiologie parasitaire!!!
- Le Rotavirus et Campylobacter sont les 02 principales étiologies isolées associées ou pas (copro standards ne le permet pas)
- C.difficile : colite pseudomembraneuse...

03 Etiologies	Campylobacter + Norovirus	1
	Rotavirus + Norovirus	2
	Campylobacter + Rotavirus + EPEC	1
	Campylobacter + Rotavirus + EAEC	1
	Campylobacter + Rotavirus + Norovirus	1
Plus de 03 Etiologies	Rotavirus + EPEC + EAEC	1
	Campylobacter + Clostridium difficile toxinA/B + Salmonella + Shig-like toxin + E. coli	1



EPIDÉMIOLOGIE MICROBIENNE DES PATHOLOGIES INFECTIEUSES





- La tâche du microbiologiste est difficile et représente un vrai défi pour anticiper les techniques à mettre en œuvre pour rechercher les microorganismes potentiellement présents dans le pvmt pathologique.
- L'interprétation des résultats des PCR multiplex exige du microbiologiste d'avoir regard aiguisé, ajouter à cela une excellente collaboration avec les cliniciens pour une confrontation des données bactério-clinique de qualité surtout quand il s'agit :
 - Résultat positif à plusieurs étiologies.... (IRB qualité du pvmts..)
 - Résultat discordant avec le résultat conventionnel (faux négatifs à discuter, reconsidérer l'historique du patient...)
 - Marqueurs de résistance et évolution clinique des patients déjà sous antibiothérapie.



EXPERTISE DU MICROBIOLOGISTE

FilmArray		Meningitis / Encephalitis (ME) Panel - IVD		BIOFIRE	
				www.BioFireDx.com	
Run Summary					
Sample ID: 14067-0295		Run Date: 21 Jun 2015 1:47 PM			
Detected: Human herpesvirus 6		Controls: Passed			
WARNING: The FilmArray ME Panel does not distinguish between latent and active CMV and HHV-6 infections. Detection of these viruses may indicate primary infection, secondary reactivation, or the presence of latent virus. Results should always be interpreted in conjunction with other clinical, laboratory, and epidemiological information.					
Result Summary					
Bacteria					
Not Detected	Escherichia coli K1				
Not Detected	Haemophilus influenzae				
Not Detected	Listeria monocytogenes				
Not Detected	Neisseria meningitidis				
Not Detected	Streptococcus agalactiae				
Not Detected	Streptococcus pneumoniae				
Viruses					
Not Detected	Cytomegalovirus				
Not Detected	Enterovirus				
Not Detected	Herpes simplex virus 1				
Not Detected	Herpes simplex virus 2				
✓ Detected	Human herpesvirus 6				
Not Detected	Human parechovirus				
Not Detected	Varicella zoster virus				
Yeast					
Not Detected	Cryptococcus neoformans/gattii				
Run Details					
Pouch: ME Panel v1.4		Protocol: CSF v2.0		Operator: Jane Doe (JaneDoe)	
Run Status: Completed		Serial No.: 02550174		Instrument: ITI FA "FA1183"	
Lot No.: 200415					

EN CONSÉQUENCES...

- Réorganisation du workflow du laboratoire améliorant le délai et la qualité du résultat plus précise et exhaustive au vu de l'implication des pathogènes viraux et bactériens.

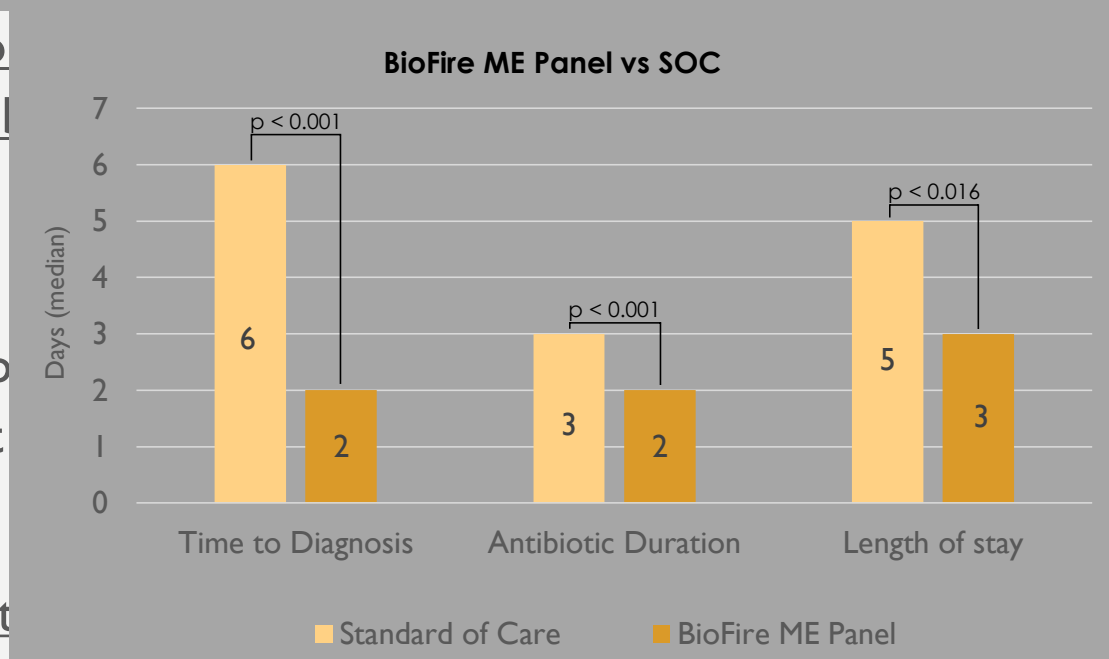
O'Brien MP, Francis JR, Marr IM, Baird RW (2018) Impact of Cerebrospinal Fluid Multiplex Assay on Diagnosis and Outcomes of Central Nervous System Infections in Children: A Before and After Cohort Study. The Pediatric infectious disease journal 37:868–871

- Renforcer la collaboration prise en charge globale hospitalisation.

- Intervenir dans la prise en charge entrainant isolement

- Participer à la réduction de l'usage adapté et ciblé particulièrement dans IR basses.

- Connaissance de l'écologie microbienne des pathologies infectieuses : enrichir les données épidémiologiques: protocoles thérapeutiques, consensus, recommandations, AMS locaux voir nationaux.



attitude et de sérénité dans la prise en charge de réduire la durée de leur

la détection rapide des BMR afin d'éviter leur propagation.

ins respiratoires hautes et leur usage adapté et ciblé particulièrement dans IR basses. Et lever les freins à la désescalades ATB

POUR OU CONTRE?

- **OUI** : Rapide, Performant et Efficient
- Mais encore: outil diagnostique précieux qui contribue à
 - Améliorer la prise en charge des syndromes infectieux chez les patients
 - Réduire la consommation et l'usage inadapté des ATB
 - Epidémiologie locale
 - Avoir un impact médico-économique favorable



MERCI