

Plateformes Multiplexes : infections neurologiques et respiratoires



Le point de vue de
l'infectiologue

JP STAHL



Le point de vue du
microbiologiste

E VARON

Liens d'intérêts

JP Stahl

- Aucun

E Varon

- Aucun

Les attentes du clinicien

- Réponse rapide si gravité clinique
- Réponse rapide si traitement spécifique : rôle dans le bon usage des antibiotiques
- Réponse rapide si comportement spécifique: isolement, résistance, action de santé publique (contagion)
- Meilleur diagnostic si
 - ✓ Infection multimicrobiennes
 - ✓ Antibiothérapie antérieure

Une exigence (*une seule !*)

- Pas d'ambiguïté du résultat

Raisonnement clinique en vraisemblances successives

Présentation clinique initiale : symptômes, gravité, épidémiologie



Hypothèses 1 2 3 4 5 6 7



Première ligne : biologie, imagerie afin de garder ouvertes ou fermées des pistes. Restent **1** **2** **3** ~~4~~ ~~5~~ ~~6~~ ~~7~~



Deuxième ligne : discriminer plus si besoin, avec examens plus sophistiqués (ex. Pet Scan). Restent **1** **2** ~~3~~ ~~4~~ ~~5~~ ~~6~~ ~~7~~



Troisième ligne : éventuel traitement d'épreuve

Les PCR multiplexes dans ce contexte

Les visions possibles

Vision old school

- La demande ***doit*** être orientée par la clinique ou l'épidémiologie.
- Toutes hypothèses étiologiques sont au même niveau de vraisemblance
- Dérapages à prévoir: finalement multiplexe = addition de plusieurs PCR simples qui conduit à ne pas réfléchir

Vision new school

- Un seul test, qui saute des étapes consommatrices de temps et éventuellement d'analyses
- Rapidité des résultats
- Non dépendant de la fragilité des pathogènes (conditions de transport)
- Fiable et reproductible
- Utilisable par des cliniciens non-spécialistes

Des progrès en outils BM diagnostiques

- [?]Détection en qq heures / 1 heure
- [?]Temps préparatoire des échantillons
- Elargissement des panels de micro-organismes
 - Virus / Bactéries / Levures
 - Co-infections

Analyse du flux de travail

Microbiologie – Hôpital Saint-Louis, Paris

Simplification

Standard vs FilmArray

	Etapes techniques	Etapes Validation
Virologie	11 → 4	5 → 2
Bactériologie	5 → 3	3 → 2

➤ nb de tubes LCR

➤ Volume LCR

➤ Manipulations

➤ Nb techniques → simplification accréditation

Pas de transfert inter-hospitalier – pas de délai supplémentaire

Comparison of the Biofire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP Fast Multiplex Assays for Detection of Respiratory Viruses

Elena B. Popowitch,^a Stacey S. O'Neill,^a Melissa B. Miller^{a,b}

University of North Carolina Health Care System, Chapel Hill, North Carolina, USA^a; University of North Carolina School of Medicine, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Chapel Hill, North Carolina, USA^b

TABLE 5 Workflow analysis of the four platforms

Parameter	Time ^a (h) or other value as indicated using:			
	FilmArray RP	eSensor RVP	xTAG	
			RVPv1	RVP fast
Off-board extraction ^b	No	Yes	Yes	Yes
No. of steps	1	3	5	2
Hands-on time	0.05	0.92	1.2	0.75
Instrument time	1.1	5.0	5.5	2.75
Time to assay completion	1.1	6.0	6.6	3.5
Total time to result	1.2	7.2	7.8	4.8
No. of samples processed in 8 h per instrument	7	21	21	21

Fiabilité du résultat?

- Echantillon / cibles
 - LCS → plutôt OK
 - Prélèvements respiratoires → plutôt compliqué
 - Prélèvement rhino-pharyngé
 - Expectoration?
 - LBA

Diagnostic biologique des infections neuro-méningées (1)

- Recherches ciblées – Détection simple
 - Epidémiologie / saison
 - Facteurs de l'hôte : âge, statut immunitaire
 - Présentation clinique
 - Cytologie et la chimie du LCS
 - Imagerie

SENSIBLES⁺⁺

Diagnostic biologique des infections neuro-méningées (2)

- MAIS
 - Etiologies infectieuses nombreuses
 - Pas de corrélation microbio-clinique
 - Cytologie trompeuse des méningites virales à leur début...
 - Méningites à Enterovirus sans véritable saisonnalité
- Et
 - Urgence de la prise en charge des méningites bactériennes
 - Eviter les traitements antibiotiques inutiles

Plaident pour une approche syndromique

Une box à tout faire



FilmArray is Comprehensive

FilmArray detects 14 pathogens including bacteria, viruses and fungi—something no other diagnostic on the market can do.

ME Panel Menu

Bacteria

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

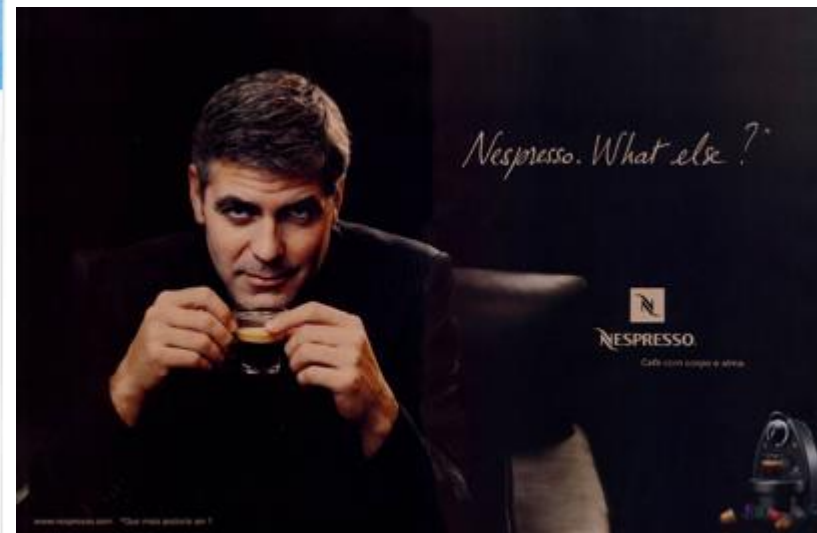
Yeast

Cryptococcus neoformans/gattii

Viruses

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

See how you can get faster results at BioFireDX.com.



Limites des multiplexes : Tests neurologiques (1)

- Ne dispense pas de la nécessité d'une bonne qualité pré-analytique, voire l'amplifie
- Rapidité **SI** technicien disponible 24/24, 7/7
- Meilleur diagnostic uniquement si interprétation rigoureuse : co-infections? réactivation?

Exemple:

Homme, 37 ans, encéphalite incontestable, pas de signes autres que neuro, LCS avec PCR VZV et CMV positives.

- 1) Laquelle est la bonne?
- 2) Quel traitement ?

Limites des multiplexes : Tests neurologiques (2)

- « Gaspillage » de tests non nécessaire dans le kit
- Temporalité des diagnostics :
 - exemple méningocoque (résultat immédiat) vs HSV (possible délai jusqu'à 4 jours)
- Pertinence de certaines recherches : entérovirus dans le LCS vs selles ou pharynx
- Non exhaustivité de l'exploration: étiologies 2017 des encéphalites en France

Enceif 2016/17– Top 10

Causes infectieuses identifiées (Nb, %)	Enceif (N =217)		
Herpes Simplex virus	46 (21%)		
Varicella Zoster virus	27 (12%)		
Tick-borne encephalitis	12 (6%)	Pas dans la multiplexe	sérum
<i>Listeria monocytogenes</i>	10 (3%)		Ex direct
Epstein Barr virus	7 (4%)	Pas dans la multiplexe	
Influenza virus	6 (3%)	Pas dans la multiplexe	Nez ou pharynx
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4 (2%)	Pas dans la multiplexe	
West Nile virus	3 (2%)	Pas dans la multiplexe	sérum
Enterovirus	3 (1%)	Pas tous dans la multiplexe	selles
Inconnu	83 (38%)	Sans doute pas dans la multiplexe	

Enceif 2016/17– suite

Causes infectieuses identifiées (Nb, %)	Enceif (N =217)		
Virus JC	2 (1%)	Pas dans la multiplexe	
<i>Borrelia burgdorferi</i>	2 (1%)	Pas dans la multiplexe	
HHV-6	2 (1%)	Ne distingue pas de l'intégration chromosomique	
Japanese encephalitis virus	2 (1%)	Pas dans la multiplexe	serum
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1 (1%)	Détection avec <i>C. gatti</i>	
<i>Legionella pneumophila</i>	1 (1%)	Pas dans la multiplexe	Ag U
Zika Virus	1 (1%)	Pas dans la multiplexe	serum
<i>M. pneumoniae</i>	1 (1%)	Pas dans la multiplexe	serum
<i>R. conorii</i>	1 (1%)	Pas dans la multiplexe	serum
<i>Legionella</i>	1 (1%)	Pas dans la multiplexe	urine
Rougeole	1 (1%)	Pas dans la multiplexe	
Primo VIH	1 (1%)	Pas dans la multiplexe	serum

Analyse critique

Hypothèse préliminaire : toutes les infections neuros se ressemblent : Vraiment?

- Clinique/épidémiologie :
 - ✓ Sepsis vs neuro « pur »
 - ✓ Purpuras vs rien ou vésicules (VZV)
 - ✓ Immunodéprimé vs immunocompétent (CMV)
- Biologique:
 - ✓ PL purulente ou claire
 - ✓ Polynucléaires ou Lymphocytes
 - ✓ Cellulorachie élevée

Analyse critique

- Et si la clinique n'oriente pas :
 - ✓ Purpura absent n'exclut pas méningo
 - ✓ Vésicules VZV absentes dans 50% des cas
 - ✓ Pas de sepsis au début (bactérien vs viral)
- Biologie pas toujours nette:
 - ✓ Trop précoce
 - ✓ Antibiothérapie préalable
 - ✓ Cellulorachie parfois élevée si virose

Limites des multiplexes : Tests neurologiques (3)

- Question du coût:
 - ✓ des tests
 - ✓ du temps technicien
 - ✓ des tests additionnels qui ne sont pas éliminés

Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens

Amy L. Leber,^a Kathy Everhart,^a Joan-Miquel Balada-Llasat,^b Jillian Cullison,^b Judy Daly,^c Sarah Holt,^c Paul Lephart,^d Hossein Salimnia,^d Paul C. Schreckenberger,^e Sharon DesJarlais,^e Sharon L. Reed,^f Kimberle C. Chapin,^g Lindsay LeBlanc,^g J. Kristie Johnson,^h Nicole L. Soliven,^h Karen C. Carroll,ⁱ Jo-Anne Miller,^j Jennifer Dien Bard,^k Javier Mestas,^k Matthew Bankowski,^{l,m} Tori Enomoto,^j Andrew C. Hemmert,ⁿ Kevin M. Bourzacⁿ

Analyte	Sensitivity/PPA ^b		
	TP/(TP + FN) ^c	%	95% CI
Bacteria			
<i>E. coli</i> K1	2/2	100	34.2–100
 <i>H. influenzae</i>	1/1	100	
 <i>L. monocytogenes</i>	0/0		
 <i>N. meningitidis</i>	0/0		
 <i>S. agalactiae</i> 	0/1	0.0	
<i>S. pneumoniae</i>	4/4	100	51.0–100
Viruses			
CMV	3/3	100	43.9–100
EV 	44/46	95.7	85.5–98.8
HSV-1	2/2	100	34.2–100
HSV-2	10/10	100	72.2–100
HHV-6 	18/21	85.7	65.4–95.0
HPeV	9/9	100	70.1–100
VZV	4/4	100	51.0–100
Yeast			
 <i>C. neoformans/C. gattii</i>	1/1	100	

5 cibles non
évaluables
sur 14

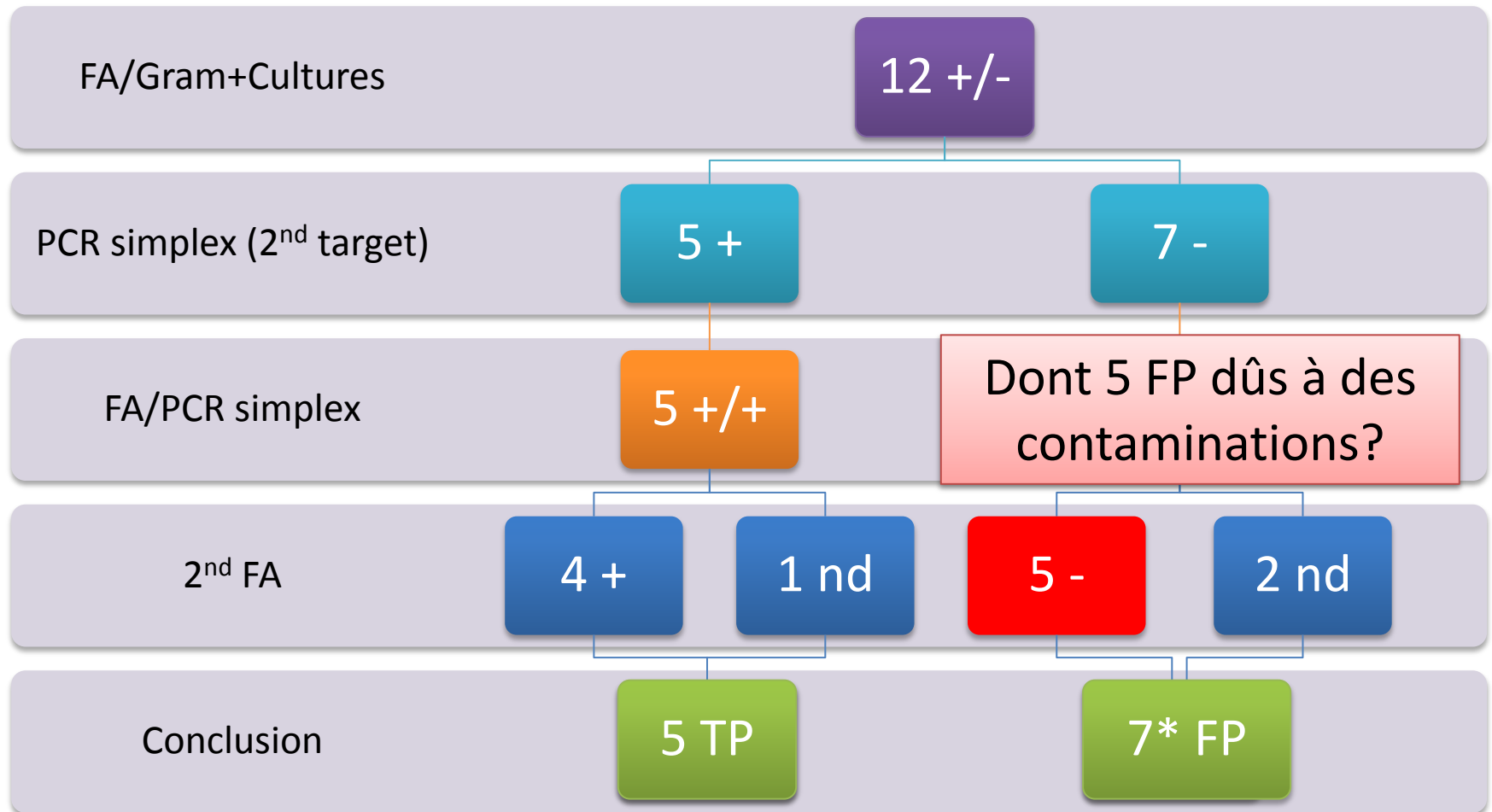
6 Faux Neg

PA 84.4% NA > 99.9%

SNC - FilmArray (FA) vs standard

FilmArray ME result disposition based on comparator testing	No. or type of result ^a		
	Total	Discrepant investigation outcome	
		FA confirmed	FA unconfirmed
FN		TN	FN
<i>S. agalactiae</i>	1		1
EV	2		2
HHV-6	3	1	2
Total	6	1	5
FP		TP	FP
<i>E. coli</i> K1	1		1
<i>H. influenzae</i>	1	1	
<i>S. agalactiae</i>	1		1
<i>S. pneumoniae</i>	12	5	7
CMV	3	1	2
EV	7	5	2
HSV-1	2		2
HSV-2	2	1	1
HHV-6	4	1	3
HPeV	3	3	
VZV	3	2	1
<i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i>	4	2	2
Total	43	21	22

Investigation des FP pneumocoques



Multiplexes pour les infections respiratoires

Enjeu majeur de santé publique

- Prévalence, gravité
- Maîtrise du risque infectieux
- Exposition aux antibiotiques et émergence de résistances
- Dépenses de santé

Limites des multiplexes :

Tests respiratoires (1)

Les principaux diagnostics différentiels d'une pneumonie, avant de prescrire un test multiplex:

- ✓ Embolie pulmonaire
- ✓ Pleurésie
- ✓ Poussée de BPCO
- ✓ Bronchite
- ✓ Pyélonéphrite
- ✓ Infarctus du myocarde

= examen clinique précis et poussé + imagerie
obligatoires

Multiplex: une offre large

LRTI Panel Menu

Quantitative Bacteria:

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex

Enterobacter aerogenes/cloacae complex

Escherichia coli

Haemophilus influenzae

Klebsiella oxytoca

Klebsiella pneumoniae group

Moraxella catarrhalis

Proteus spp.

Pseudomonas aeruginosa

Serratia marcescens

Staphylococcus aureus

Streptococcus agalactiae

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pyogenes

Fungi:

Cryptococcus neoformans/gattii

Pneumocystis jirovecii

Viruses:

Adenovirus

Coronavirus

Human Metapneumovirus

Human Rhinovirus/Enterovirus

Influenza A

Influenza B

MERS Coronavirus

Parainfluenza Virus

Respiratory Syncytial Virus

Qualitative Bacteria:

Chlamydia pneumoniae

Cryptococcus pneumophila

Mycoplasma pneumoniae

Antibiotic Resistance Markers:

*bla*_{CTX-M}

*bla*_{IMP}

*bla*_{KPC}

*bla*_{NDM}

*bla*_{OXA-48-like}

*bla*_{VIM}

mecA/mecC and MREJ

Unyvero



HPN HOSPITALIZED PNEUMONIA APPLICATION



GROUP	PATHOGEN	GENE	RESISTANCE AGAINST
Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>ermB</i>	Macrolide/Lincosamide
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>mecA</i>	Oxacillin
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>mecC</i> (LGA251)	Oxacillin
	<i>Escherichia coli</i>	<i>tem</i>	Penicillin
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	<i>shv</i>	Penicillin
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>ctx-M</i>	3rd generation cephalosporins
	<i>Proteus</i> spp.	<i>kpc</i>	Carbapenem
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>imp</i>	Carbapenem
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>ndm</i>	Carbapenem
	<i>Klebsiella varicola</i>	<i>oxa-23</i>	Carbapenem
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>oxa-24/40</i>	Carbapenem
	<i>Morganella morganii</i>	<i>oxa-48</i>	Carbapenem
Non-fermenting bacteria	<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>oxa-58</i>	Carbapenem
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>vim</i>	Carbapenem
	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	<i>sul1</i>	Sulfonamide
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>gyrA83</i>	Fluoroquinolone
	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>gyrA87</i>	Fluoroquinolone
Others / Fungi	<i>Pneumocystis jirovecii</i>		
	<i>Haemophilus influenzae</i>		
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		
	<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>		

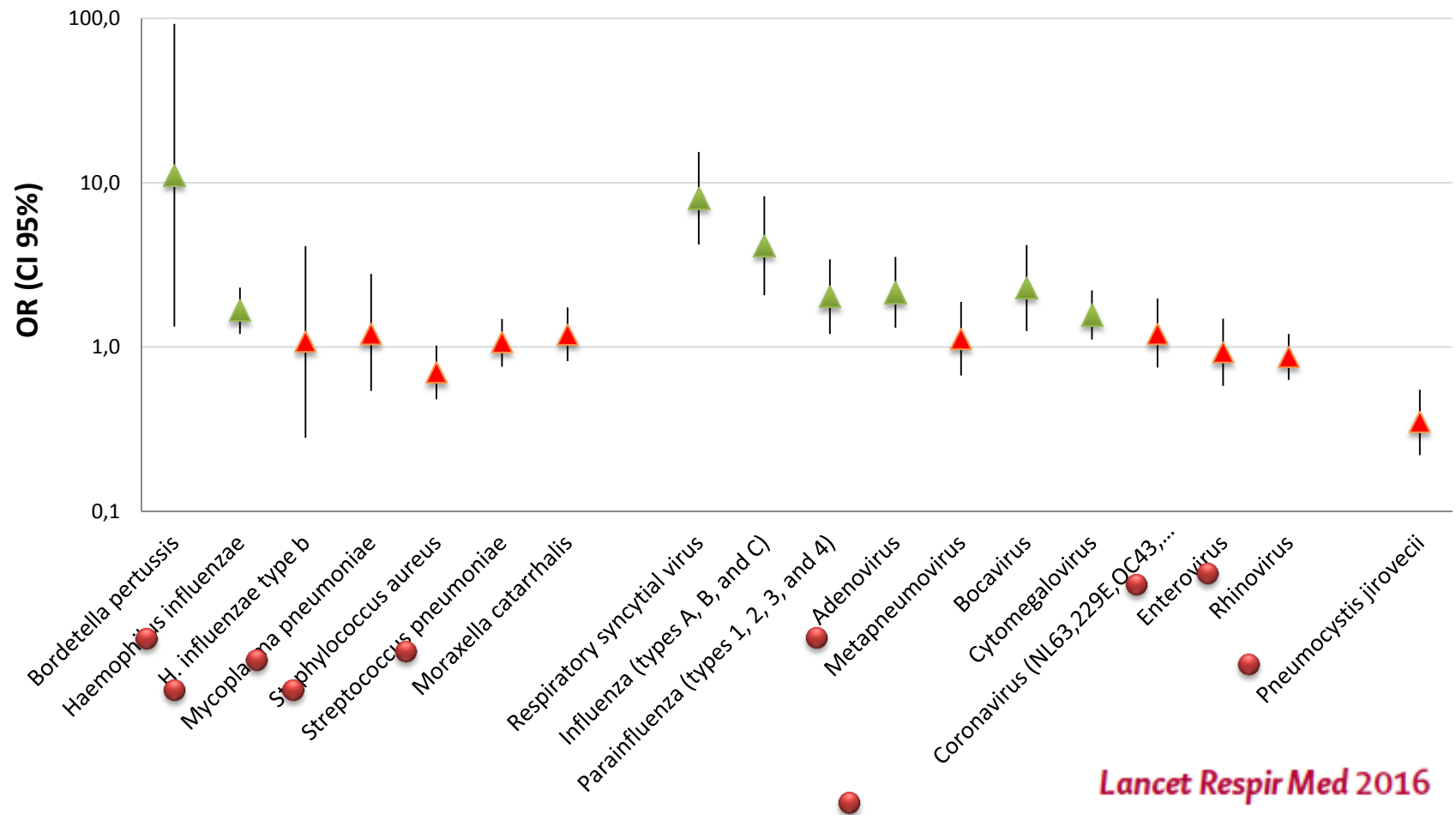


- Transfert in sample tube for lysis:
30 minutes
- Sample tube + Master mix tube in cartridge for run:
4-5 hours

Aetiology of childhood pneumonia in a well vaccinated South African birth cohort: a nested case-control study of the Drakenstein Child Health Study

Heather J Zar, Whitney Barnett, Attie Stadler, Sugnet Gardner-Lubbe, Landon Myer, Mark P Nicol

Prévalence des micro-organismes isolés du rhino-pharynx (Cas-témoins)



Aetiology of childhood pneumonia in a well vaccinated South African birth cohort: a nested case-control study of the Drakenstein Child Health Study

Heather J Zar, Whitney Barnett, Attie Stadler, Sugnet Gardner-Lubbe, Landon Myer, Mark P Nicol

Prélèvement rhino-pharyngé

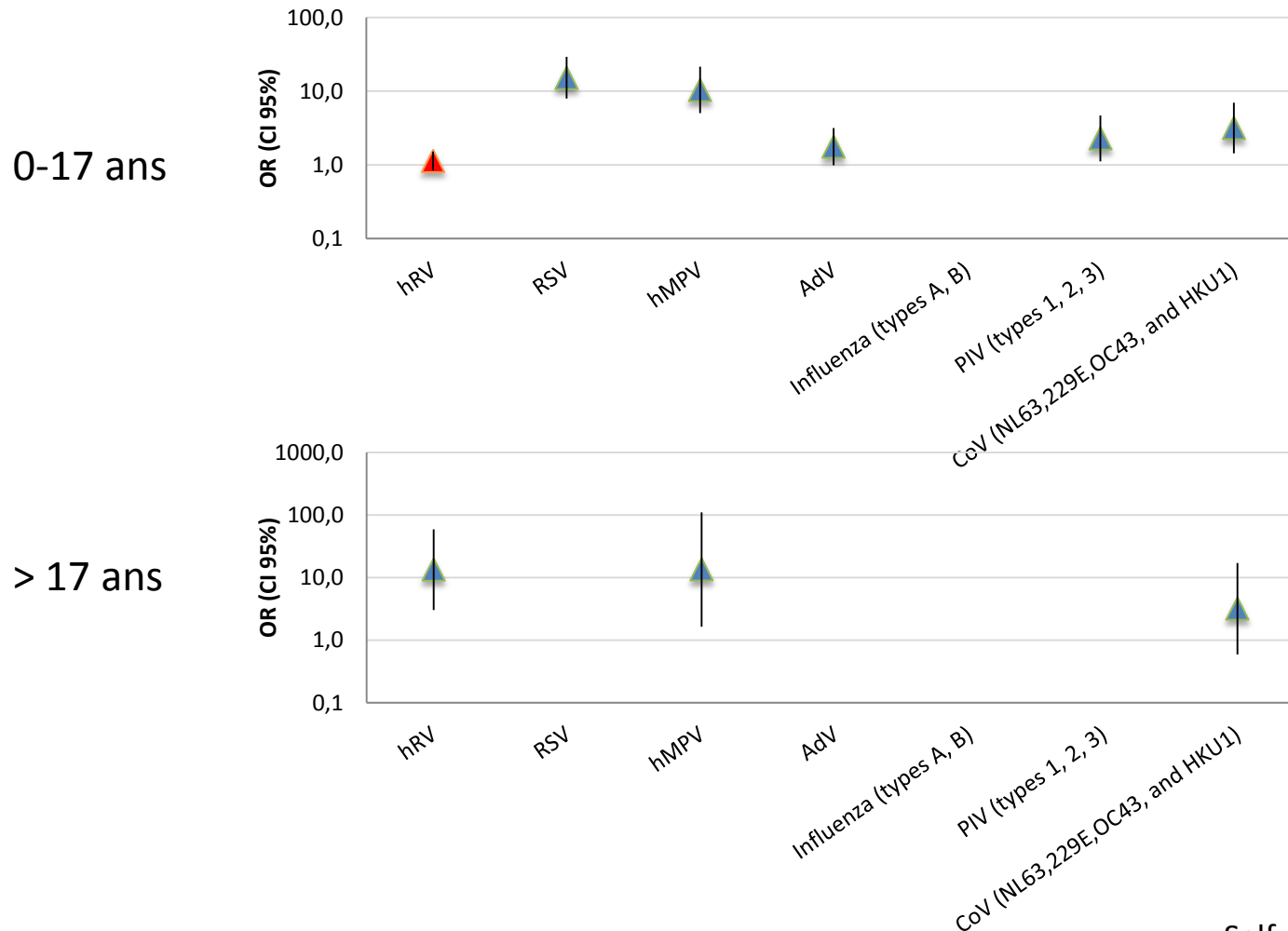
≠

Expectoration induite?

	Only nasopharyngeal swabs	Nasopharyngeal swabs and induced sputum both positive	Only induced sputum	Proportion of cases detected by induced sputum only
Bacteria				
<i>Bordetella pertussis</i>	0	4	12	75%
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	1	3	15	79%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	3	4	8	53%
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	49	30	29%
<i>H influenzae</i>	10	129	10	7%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	12	140	11	7%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	15	178	9	4%
Viruses				
Respiratory syncytial virus	7	53	12	17%
Influenza (types A, B, and C)	17	15	8	20%
Parainfluenza (types 1, 2, 3, and 4)	17	18	17	33%
Adenovirus	10	41	24	32%
Metapneumovirus	13	14	7	21%
Bocavirus	7	28	12	26%
Cytomegalovirus	14	121	18	12%
Coronavirus (NL63, 229E, OC43, and HKU1)	13	20	8	20%
Enterovirus	15	19	15	31%
Rhinovirus	30	51	33	29%
Fungi				
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	16	25	21	34%

Respiratory Viral Detection in Children and Adults: Comparing Asymptomatic Controls and Patients With Community-Acquired Pneumonia

Wesley H. Self,¹ Derek J. Williams,² Yuwei Zhu,³ Krow Ampofo,⁷ Andrew T. Pavia,⁸ James D. Chappell,⁴ Weston C. Hymas,⁹ Chris Stockmann,¹⁰ Anna M. Bramley,¹¹ Eileen Schneider,¹¹ Dean Erdman,¹¹ Lyn Finelli,¹¹ Seema Jain,¹¹ Kathryn M. Edwards,⁵ and Carlos G. Grijalva⁶



Limites des multiplexes dans les infections respiratoires (1)

- Distinguer l'infection de la colonisation
 - Quantification
 - Marqueurs de virulence
- Infection/Réactivation
- Micro-organisme viable ou non
- Marqueurs de R aux antibiotiques

Limites des multiplexes dans les infections respiratoires (2)

Interprétation en fonction

- De l'échantillon étudié
 - Pas de *Legionella* dans le rhino-pharynx
- Du microbiote respiratoire
 - Bactéries : *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*...
 - Virus...
 - Levures...

Le microbiote respiratoire

source: AL. Michon, H. Marchandin

Tableau I – Phyla, familles, genres ou espèces bactériennes les plus fréquemment décrits dans les voies aériennes supérieures et inférieures.

Phyla	Voies aériennes supérieures		Voies aériennes inférieures
	Fosses nasales	Cavité orale	
Bacteroidetes	Minortaire [10]	<i>Bacteroidetes</i> [10,18] <i>Prevotellaceae</i> [4] <i>Prevotella</i> [17,18] <i>Capnocytophaga</i> [18]	<i>Bacteroidetes</i> [6] <i>Prevotellaceae</i> [4] <i>Prevotella</i> [5, 13, 17] <i>Porphyromonas</i> [5]
Firmicutes	<i>Firmicutes</i> [10, 18] <i>Staphylococcaceae</i> [4] <i>S. aureus</i> [10] <i>Lachnospiraceae</i> [10]	<i>Firmicutes</i> [10, 18] <i>Streptococcaceae</i> [4, 10] <i>Streptococcus</i> [15, 17] <i>Vallionellaceae</i> [4] <i>Vallionella</i> [15, 17] <i>Acidaminococcaceae</i> [10] <i>Lachnospiraceae</i> [10]	<i>Firmicutes</i> [6] <i>Streptococcaceae</i> [4] <i>Streptococcus</i> [5, 13, 17] <i>Vallionellaceae</i> [4] <i>Vallionella</i> [5, 13, 17]
Proteobacteria	Minortaire [10]	<i>Proteobacteria</i> [18] <i>Neisseriaceae</i> [10] <i>Neisseria</i> [15, 17] <i>Pasteurellaceae</i> [10, 17] <i>Campylobacteraceae</i> [10] <i>Xanthomonadaceae</i> [10]	<i>Proteobacteria</i> [6] <i>Neisseria</i> [13] <i>Pseudomonas</i> [5] <i>Haemophilus</i> [13, 17] <i>Enterobacteriaceae</i> [17]
Actinobacteria	<i>Actinobacteria</i> [10, 18] <i>Propionibacteriaceae</i> [4, 10] <i>Corynebacteriaceae</i> [10]	<i>Rothia</i> [15, 18] <i>Corynebacterium</i> [15]	Minortaire [13]
Fusobacteria	Minortaire [13]	<i>Fusobacteria</i> [18] Minortaire [13]	Minortaire [13] <i>Fusobacterium</i> [15]

Les phyla sont indiqués en gras et les familles sont soulignées.

Conséquence diagnostique

- Trouver **un ADN bactérien** n'est pas un exploit
- Trouver l'ADN d'une bactérie réputée pathogène n'est pas synonyme de responsabilité: porteurs
- Intérêt pour interrompre ou ne pas prescrire les antibiotiques **seulement si** certitude du diagnostic
- Quid des identifications multiples : pneumocoque + hemophilus + staphylocoque chez un patient ventilé.
- Impératif d'interpréter, ce qui est déjà le cas, mais n'est pas résolu par ces techniques

Avantages

- Rapidité de résultat
- Intérêt potentiel pour un bon usage des antibiotiques. Mais uniquement à l'hôpital (pour l'instant), alors que plus de 80% de la prescription se fait en ville.
- Couplé avec les gènes de résistance
- Quantification (inoculum) à venir?

Challenges

- Evaluation de ces nouveaux outils est complexe
 - Standards ? plus ou moins performants virus/bactéries
 - Nature des prélèvements
 - LCS
 - Prélèvements respiratoires non invasifs
 - Rhino-pharyngé
- Distinguer infection virale et bactérienne ++
 - ↗ détection des virus
 - Prévalence des co-infections ?
- Stratégie diagnostique à repenser
 - Tests à positionner en 1ère ligne ++
 - Prise en charge rapide
 - Adaptée sur mesure
 - Epargne des antibiotiques
 - Mesures d'isolement – Contrôle des épidémies
 - (Re)définir les tests de 2^{ème} ligne

Aujourd'hui

- L'utilisation des plateformes multiplexes
 - Ne dispense pas de l'étude de l'échantillon pour l'évaluation de sa qualité
 - LCS
 - Expectoration, LBA
 - Ne dispense pas des techniques conventionnelles de bactériologie et myco/parasitologie
- Requiert une expertise pour
 - la réalisation (contaminations!)
 - l'interprétation
- A un coût global important

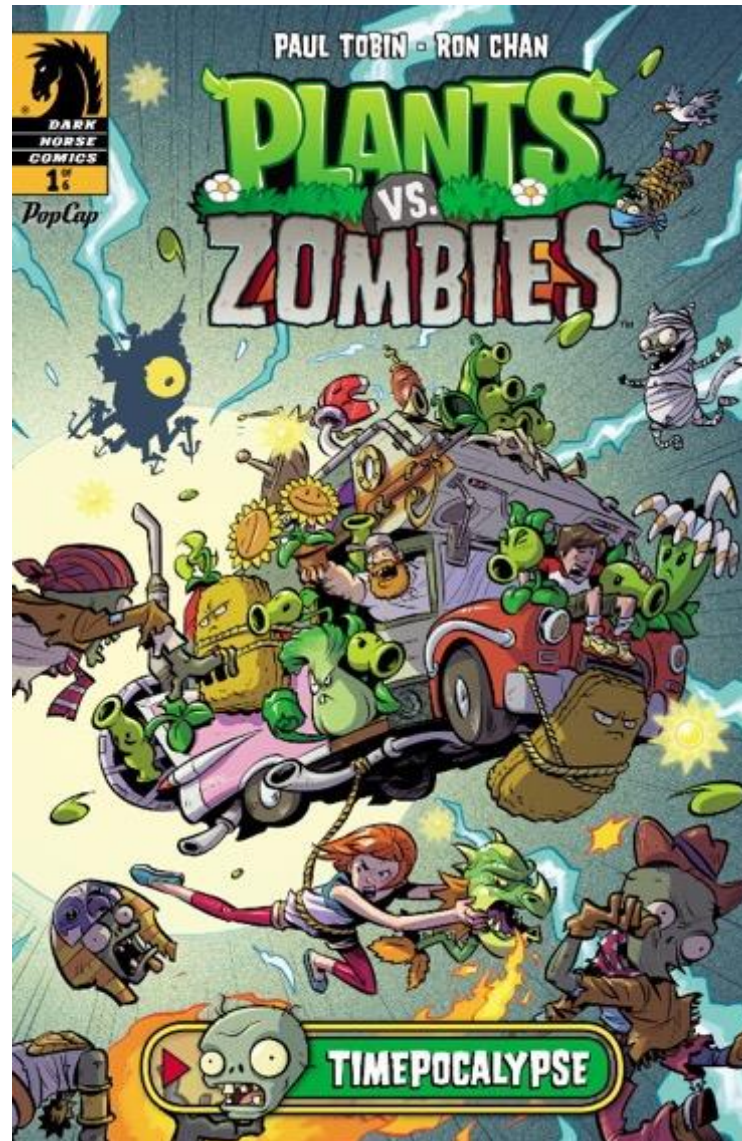
Un moyen terme?

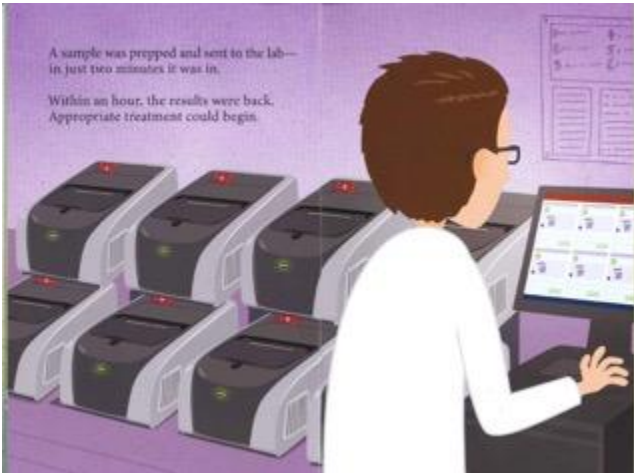


Utiliser les multiplexes suppose un changement des comportements

- Faire évoluer l'analyse clinique vers la question: quel organe et quel test à prévoir?
- Eliminer les autres critères : cellularité, CRP, PCT, etc....
- Si objectif bon usage, doit être disponible en ville, avec le prérequis de la disponibilité du laboratoire
- Il faut une interprétation. Par qui? Une garde biologique spécialisée? Une formation des cliniciens? Si on attend, la rapidité n'a plus de sens.
- Sinon, on en restera à l'antagonisme suivant:

Jeux vidéo vs analyse humaine





Plateformes multiplexes : un des outils du labo

Miniaturisation, microfluidique

- Multiplex → multiples simplex ou multiples chambres de réaction pour ↗ sensibilité
- Ajuster les panels
- Trouver de nouvelles cibles

Conclusions du clinicien

- Pourquoi pas, mais ce n'est que du « tout en un » **et pas complet**
- Le coût (global) est un point crucial
- Est-ce l'avenir?

Plex, mono ou multi vs WGS ?