

The logo for Université de Bretagne Occidentale (UBO) consists of the letters 'UBO' in a bold, stylized, black font.

Université de Bretagne Occidentale



FACULTÉ  
DE MÉDECINE &  
SCIENCES DE LA SANTÉ

Instituts  
thématiques



**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



# Nouvelles méthodes diagnostiques (PCR multiplex) dans les infections respiratoires

GERICCO, 23 Mars 2018

Clémence Beauruelle  
AHU, Unité de Bactériologie  
INSERM UMR1078, Axe Microbiota

# Les infections respiratoires

## Hautes:

otites, sinusites, Rhinopharyngites, Angines

## Basses:

- ▶ Bronchite aigue
- ▶ PAC
- ▶ PAVM
- ▶ Exacerbation de pathologie chronique pulmonaire



- Poumon sain/ pathologique
- Immunocompétent / immunodéprimé
- Enfant/ adulte/ sujet âgé:
  - Haut risque: < 5 ans, > 65 ans, grossesse, ID
- Nombreux virus et bactéries
- Documentation microbiologique : 50% des PAC

## Enjeu majeur de santé publique

- ▶ Prévalence, gravité, dépense de santé
- ▶ Maitrise du risque infectieux
- ▶ Exposition aux ATB, émergence de résistance

Clin Infect Dis 2008;47(Suppl 3):S150-6.

# Recommandation

- ▶ prise en charge des infections respiratoires basses
  - ▶ Antibiothérapie probabiliste Probabilités étiologiques (connaissance de l'épidémiologie des pneumonies; facteurs de risque propres au patient)
  - ▶ Place des investigations: critères de gravité, comorbidité, patient hospitalisé  
SFP (2010) /SPILF (2006) /ESR/ECCMID (2011)/ IDSA (2007)

	En ville	Hospitalisation conventionnelle	SI / réanimation
Hémocultures	-	+	+
ECBC	- sauf échec de ttt, OH (IDSA)	+	+(ou Aspiration bronchique, LBA)
Antigénurie	- sauf échec de ttt, OH (IDSA)	si sévère ± enfants (- IDSA, SFP)	+(± enfants (- IDSA, SFP))
PCR	-	±	±

# Recommandation: place de la PCR

Si résultats suffisamment rapide pour avoir un impact thérapeutique

## ▶ Chez l'adulte ESR/ ECCMID 2011

- ▶ Q-PCR *S. pneumoniae* si décapité
- ▶ Grippe et VRS en période épidémique
- ▶ Pathogènes atypiques

## ▶ Chez l'enfant >3 mois (SFP, 2014)

- ▶ PCR virales
  - En hospitalisation en période épidémique
  - Si les autres tests sont négatifs
  - Si des conséquences immédiates peuvent être tirées du résultat pour l'enfant et son entourage
- ▶ Mycoplasma/Chlamydochila
  - + sérologie car portage fréquent

*Are amplification tests useful for the diagnosis of LRTP*

**Recommendation:** Where available, application of quantitative molecular tests for the detection of *Streptococcus pneumoniae*, both in sputum and in blood, may be valuable in CAP patients in whom antibiotic therapy has been initiated and may be a useful tool for severity assessment. Application of molecular tests for the detection of influenza and RSV should be considered during the winter season and for the detection of atypical pathogens, provided the tests are validated and the results can be obtained sufficiently rapidly to be therapeutically relevant [A3].

En dehors des études épidémiologiques, le diagnostic d'une infection virale n'a d'intérêt que si des conséquences cliniques peuvent être tirées du résultat. L'identification rapide d'un virus peut modifier la prise en charge thérapeutique [5,9]. La performance des tests d'immunofluorescence (IF), des tests de diagnostic rapide (TDR) [10-12] ou des techniques de biologie moléculaire varie en fonction de l'épidémiologie du moment, de la précocité et de la qualité du prélèvement [5,12]. Les techniques de PCR ont pour avantage d'être adaptables à un grand nombre de virus, d'être très sensibles et spécifiques [13].

# Quels sont les besoins?

---

## Stratégies thérapeutiques pour cibler précocement un pathogène

(± Gènes de résistances)

Moindre pression de sélection

Moins EI

Meilleur pronostic

Moindres couts

## Objectifs

Test rapide (< 2h)

Facile

Nombreuses cibles

Analyse de plusieurs prélèvement simultanément

Faible cout

Distinction Colonisation vs Infection

---

Zumla lancet 2014 Nov;14(11):1123-1135

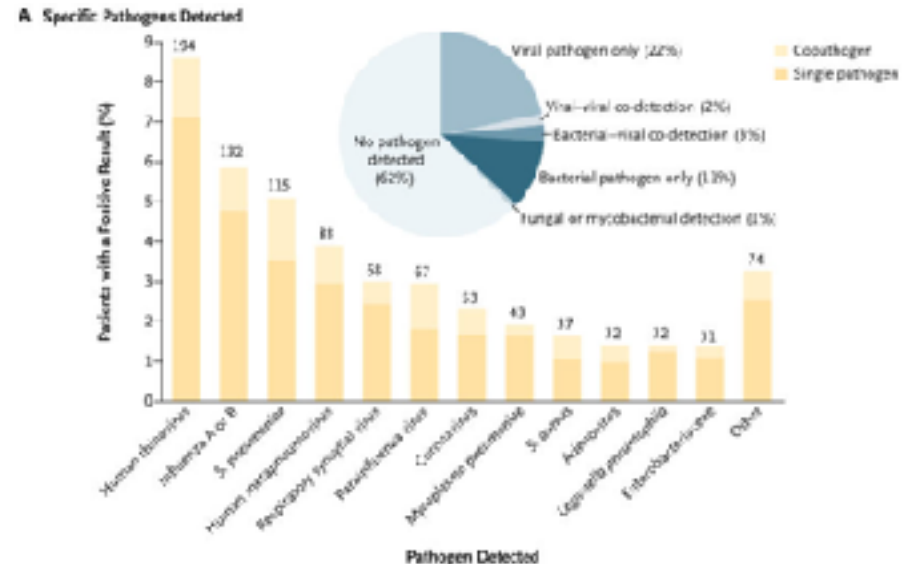
# Quels sont les pathogènes à cibler?

## ▶ Etude EPIC – Adultes

- ▶ PAC nécessitant une hospitalisation (21% SI)
- ▶ Confirmation RP
- ▶ Données microbio:
  - ▶ Culture: Hémocultures, liquide pleural, prélèvements respiratoires (crachat qualité ++, Aspi endotrachéales, LBA),
  - ▶ **PCR *Legionella* sur crachat**
  - ▶ **PCR sur liquide pleurale** : *Enterobacteriaceae*, *H. influenzae*, *pseudomonas*, *S. aureus*, *S. anginosus*, *S. mitis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*
  - ▶ **Antigénurie *S. pneumoniae* et *L. pneumophila***
  - ▶ **PCR sur écouvillon naso / oro- pharyngés** : *C. pneumoniae*; *M. pneumoniae*, *adenoV*, *coronaV 229E*, *HKU1*, *NL63*, *OC43*; *HMPV*; *rhinoV*; *influenzaV A et B* ; *PIV 1, 2, 3*; *VRS*
  - ▶ **Serologies** : *adenoV*, *HMPV*, *influenzaV A and B*, *parainfluenzaV*, and *RSV*
  - ▶ + tests de routines: mycologie, mycobactéries

2259 (97%) Had radiographic evidence of pneumonia, completed testing for both bacteria and viruses, and were included in population considered for etiologic assessment

853 (38%) pathogène détecté  
 -530 (23%) ≥ 1 virus  
 -247 (11%) bactérie  
 -59 (3%): virus + bactéries  
 -17 (1%) champ/ mycobact



## ▶ Rhinovirus > influenza > pneumo

Jain. *N Engl J Med.* 2015 July 30; 373(5): 415–427.

# Quels sont les pathogènes à cibler?

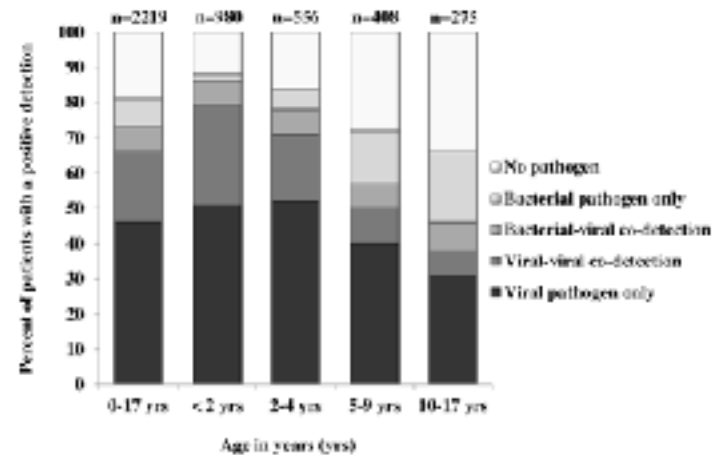
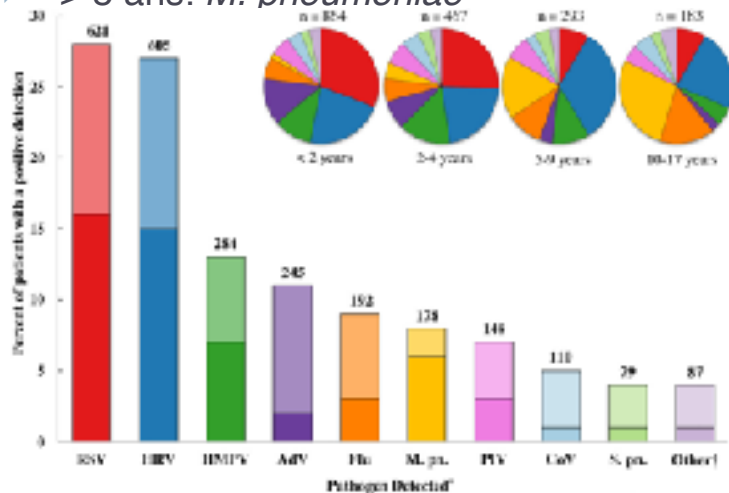
## ▶ Etude EPIC – Enfant

- ▶ PAC nécessitant une hospitalisation (21% SI)
- ▶ Confirmation RP
- ▶ Données microbio:
  - ▶ Idem + PCR *S. pneumoniae* sur sang total et LP
    - - ECBC et Antigénurie

2012 (85%) Children with radiographic pneumonia were enrolled during the two-year incidence period (July 2010-June 2012)

1802 (81%) pathogène détecté  
 - 1472 (66%) ≥ 1 virus  
 - 175 (8%) bactérie  
 - 155 (7%): virus + bactéries

- ▶ <5 ans : VRS> adenoV> metapneumoV
- ▶ > 5 ans: *M. pneumoniae*



Jain. N Engl J Med. 2015 February 26; 372(9): 835–845

# Quels sont les outils?

- ▶ Culture
- ▶ Développement de tests diagnostiques rapides:
  - ▶ Détection des antigènes (*S. pneumoniae*, *L. pneumophila*, VRS, grippe)
  - ▶ Techniques moléculaires: PCR simplex et multiplex

	Culture	Ag	IF	PCR	Sérologie
<i>S. pneumoniae</i>	X	X			
<i>H.influenzae</i>	X				
<i>Moraxella catarrhalis</i>	X				
<i>Legionella pneumophila</i>	X	X		X	X
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>				X	X
<i>Chlamydia pneumoniae</i>				x	X
Grippe		X	X	X	
VRS		X	X	X	



# Les différentes approches PCR

PCR simplex	PCR multiplex
<ul style="list-style-type: none"><li>-Une cible</li><li>-Sensible</li><li>-Présomption clinique forte</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Nombreuses cibles (2 → 30)</li><li>-Non orienté</li><li>- coût</li></ul>
PCR manuelle	PCR automatisée
<ul style="list-style-type: none"><li>-Extraction externalisée (± automatisée)</li><li>-Nécessité de personnels et laboratoires spécialisés</li><li>-Accessibilité: généralement 5j/7 aux heures ouvrables</li><li>-Grandes séries</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>totallement automatisée, extraction intégrée</li><li>-De plus en plus multiplexé</li><li>-Rapidité</li><li>-Personnel polyvalent</li><li>-Accessibilité étendue</li><li>-Coup par coup</li></ul>

# Approche syndromique

- ▶ Agents pathogènes les plus fréquemment impliqué dans un « syndrome »
- ▶ Détection et indentification simultanée de nombreux pathogènes (virus, bactéries, parasites...)
- ▶ A partir d'un seul prélèvement
- ▶ Délais de rendu de résultats très court pour les dernières générations (<4h)
- ▶ Spécificité élevée

**Table 1. US Food and Drug Administration–Approved Syndromic Panels for Multiple Pathogen Detection**

Characteristic	Test System					
	BD MAX	FilmArray	eSensor	Prodesse	Vengene	Luminex
Method	Real time PCR	Nested PCR with melt curve analysis	PCR with electrochemical detection	Real time PCR	PCR with low density nucleotide array	PCR with liquid phase bead array
Degree of multiplexing	4 targets	14–22 targets	13 targets	3–4 targets	1–16 targets	9–20 targets
Panels	GI	Respiratory, GI, CNS	Respiratory	Respiratory, GI	Respiratory, GI	Respiratory, GI, CNS
Testing location	Clinical laboratory	Near patient facility or clinical laboratory	Near patient facility or clinical laboratory	Clinical laboratory	Near patient facility or clinical laboratory	Clinical laboratory
Complexity	Moderate	Moderate	Moderate	High	Moderate	High
automation	Full	Full	Full	Partial	Full	Partial
throughput	Low-medium	Low-medium	Low-medium	Medium	Low	Medium-high
Time to results	~3 h	~1 h	~1 h	3–4 h	~2 h	~5–8 h

Abbreviations: CNS, central nervous system; GI, gastrointestinal; PCR, polymerase chain reaction.

D'après Hanson KE. Clin Infect Dis. 2016 Nov 15;63(10):1361-1367

**Table 2. Comparisons of US Food and Drug Administration–Approved Respiratory Panels**

Pathogens	Seegene	GeneMark		Luminex xTAG		
	FilmArray	eSensor	Varigene	RVP	RVP Fast	NxTAG
<b>Viral</b>						
Adenovirus	•	•	•	•	•	•
Coronavirus HKU1		•	•			•
Coronavirus NL 63	•	•	•			•
Coronavirus 229E	•	•	•			•
Coronavirus OC43	•	•	•			•
Human bocavirus	•		•			•
Human metapneumovirus		•	•	•	•	•
Influenza A	•	•	•	•	•	•
Subtype H1	•	•	•	•	•	•
Subtype H3	•	•	•	•	•	•
Subtype 2009 H1N1	•	•	•			
Influenza B	•	•	•	•	•	•
Parainfluenza 1	•	•	•	•	•	•
Parainfluenza 2	•	•	•	•	•	•
Parainfluenza 3	•	•	•	•	•	•
Parainfluenza 4	•	•	•	•		•
Respiratory syncytial virus		•	•		•	•
Respiratory syncytial virus A	•		•	•	•	•
Respiratory syncytial virus B	•		•	•	•	•
Rhinovirus/enterovirus	•	•	•	•	•	•
<b>Bacteria</b>						
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	•	•	•			•
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	•	•	•			•
<i>Bordetella pertussis</i>	•	•	•	•		
<i>Bordetella parapertussis</i> / <i>Bordetella bronchiseptica</i>				•		
<i>Bordetella holmesii</i>				•		

+ *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *L. pneumophila*, Enterovirus

+ MersCoV  
*B. parapertussis*

*L. pneumophila*

# Instruments de PCR syndromique

FilmArray

PCR en microfluidique

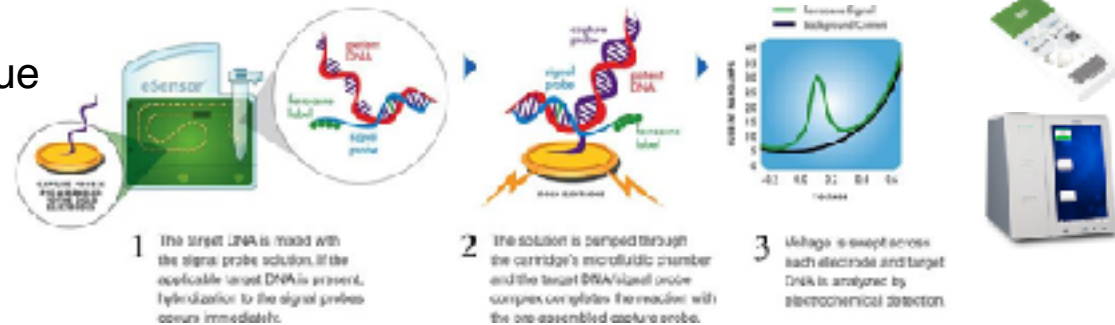
Courbes de fusion



GeneMark,  
ePlex

PCR en microfluidique

détection électrochimique



Verigene

Puce à ADN



# Instruments de PCR syndromique

## FilmArray

PCR en microfluidique

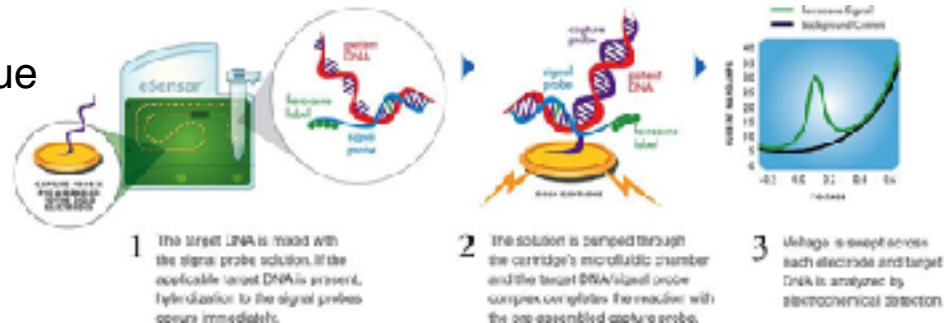
Courbes de fusion



## GeneMark, ePlex

PCR en microfluidique

détection électrochimique



## Verigene

Puce à ADN



- ▶ Système unitaire
- ▶ Cout du test ~ 120 €
- ▶ Temps de manip: 2'
- ▶ Résultats en 1h

# Trousses Syndromiques

## Luminex

Qualitatif  
21 cibles  
Résultats en 4h

Hands-on Time: 20-25 min

Time to Results: ~ 4 hrs



## Seegene, Allplex

Qualitatif  
4 panels → 26  
pathogènes  
Résultats en 4.5h



## RespiFinder

Qualitatif  
21 cibles  
Temps de manip  
Résultats en 6h



# Trousses Syndromiques

## Luminex

Qualitatif  
21 cibles  
Résultats en 4h

Hands-on Time: 20-25 min

Time to Results: ~ 4 hrs



## Seegene, Allplex

Qualitatif  
4 panels → 26  
pathogènes  
Résultats en 4.5h



## RespiFinder

Qualitatif  
21 cibles  
Temps de manip  
Résultats en 6h



Extraction, amplification et révélation séparée. Temps de manip > Ct

Séries

# Etudes

PCR multiplex	Méthode conventionnelle	Situation clinique	Références
Multiplex maison: <i>M. pneumoniae</i> , , <i>C. pneumoniae</i> <i>L. pneumophila</i> et <i>sp, Coronavirus OC43 et 229E, Influenza A/B, VRS, PIV 1-4, RhinoV, HMPV, adenoV,</i>	Crachat: culture bactérienne Sécrétion nasopharyngées: cultures virales, immunofluorescence Serologie : phase aiguë et convalescence	Adultes, PAC Communautaire / hospitalisation	Templeton. Clin Inf Dis 2005; 41:345–51
Multiplex maison : 26 pathogènes + quantification bactérienne	Crachat (96%), aspi trachéales (4%): culture bactérienne	Adultes PAC Urgences, 18.6% réa	Gadsby. Clin Inf Dis. 2016;62(7): 817–23
Respifinder (19 cibles)	Ecouvillon naso pharyngée (Antigénuries, Hémocultures crachats , sérologies non systématiques)	Adultes Urgences	Das D. Clin Microbiol Infect. 2015 Jun;21(6):608.e1-8.
FilmArray (18 cibles)	- Aspi nasopharyngée (38%) - LBA (62%) ≥VIRUS/ clinique: influenza A/B, adenoV, VRS, PIV 1-3, Verification / PCR	Adultes immunodéprimés (Onco et hemato)	Hammond. J Clin Microbiol. 2012 Oct;50(10):3216-21
FilmArray	VIRUS Ecouvillon /aspiration naso -pharyngée Immunofluorescence	Enfant ≤ 21 ans urgences	Xu, Am J Clin Pathol 2013;139:118-123
Filmarray	Ecouvillon naso-pharyngée PCR grippe, VRS + non systématique (PIV 1-3), HMPV	Enfants 3 mois -21 ans hospitalisés	Roger, Arch Pathol Lab Med—Vol 139, May 2015
Seegene : panels viraux + sepsis sur prélèvement respiratoire et sang	ECBC, Antigénuries, Hémocultures Sérologie <i>M. pneumoniae</i> Patients intubés: Aspiration trachéobronchique Patient non intubé: écouv naso-pharyngée	Adultes PAC – Réanimation	Siow WT Respiration 2016; 92:286-294
FilmArray	grippe, VRS: test rapide, PCR et/ou culture IF parainfluenzaV, adenoV [Mycoplasme (sérologie, PCR), <i>B. pertussis</i> (culture, PCR) : exclu de l'étude > 48 h]	Enfants 3 mois -18 ans hospitalisés	Subramony. J Pediatr. 2016 Jun; 173:196-201
FilmArray	Tests rapides grippe et VRS ± PCR ± (IFD) Culture virale PCR luminex (12 virus) < 8% des patients	Adultes urgences et hospit.	Rappo U. J Clin Microbiol 2016; 54(8):2096-2103
FilmArray	PCR influenza A/B, VRS, PIV 1-3, HMPV, adenovirus	Adultes urgences ou SI	Brendish. Lancet Respir Med. 2017 May;5(5):401-411
Unyvero	ECBC, LBA, Aspiration trachéobronchique: culture bacterienne	Adultes SI. PAVM	Jamal W. J Clin Microbiol. 2014. Jul; 52(7):2487-92.



# Diagnostic étiologique plus fréquent

▶ **Adulte: Urgences / Ambulatoire** <sup>1</sup> Templeton. Clin Inf Dis 2005; 41:345–51

▶ PAC (RP)

▶ <sup>1</sup> Méthodes conventionnelles: culture bactérienne (ECBC), cultures virales, IF, Serologie vs PCR masion *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Legionella*; influenzaV A et B; PIV 1-4; VRS; RhinoV; HMPV; AdenoV serogroupe E; CoronaV OC43 et 299E

Pathogen(s) detected	No. of patients with pathogen(s) detected	
	Conv	PCR
Total (n = 106)		
Specific pathogen		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	22	...
<i>Haemophilus influenzae</i>	6	...
<i>Legionella</i> species	2	6
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	5	10
influenza A virus	8	9
Rhinoviruses	2	18
Coronaviruses	0	14
Single pathogen	49	52
Mixed pathogens <sup>a</sup>	3	28
No pathogen	53	25

## Détection des pathogènes

- ▶ 49,5% → 76 %, > chez les personnes âgés / PAC sévère <sup>1</sup>
- ▶ .

# Diagnostic étiologique plus fréquent

- ▶ **Adulte: Urgences / Ambulatoire**
- ▶ PAC (RP)

<sup>1</sup> Templeton. Clin Inf Dis 2005; 41:345–51

<sup>2</sup> Gadsby. Clin Inf Dis. 2016;62(7):817–23

Pathogen(s) detected	No. of patients with pathogen(s) detected	
	Conv	PCR
Total (n = 105)		
Specific pathogen		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	22	...
<i>Haemophilus influenzae</i>	6	...
Legionella species	2	6
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	5	10
Influenza A virus	8	9
Rhinoviruses	2	18
Coronaviruses	0	14
Single pathogen	49	52
Mixed pathogens <sup>a</sup>	3	78
No pathogen	53	25

**Table 2. Pathogen Detection in Patients With Community-Acquired Pneumonia Using Molecular Methods (n = 303)**

Pathogen	N (%)
<b>Bacteria</b>	
Any bacteria	262 (87.1)
With $\geq 10^6$ CFU/mL, subff where quantified	231 (77.6)
<b>Virus</b>	
Any virus	98 (32.3)
Rhinovirus	41 (12.7)
Influenza	23 (7.1)
A	16 (5.0)
B	7 (2.2)
Parainfluenza virus	11 (3.4)
Any pathogen <sup>a</sup>	280 (92.4)
With $\geq 10^6$ CFU/mL, subff for bacteria where quantified	263 (87.1)

- ▶ <sup>1</sup> Méthodes conventionnelles: culture bactérienne (ECBC), cultures virales, IF, Serologie vs PCR maison *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Legionella*; influenzaV A et B; parainfluenzaV 1-4; VRS; RhinoV; MetapneumoV; AdenoV serogroupe E; CoronaV OC43 et 299E
- ▶ <sup>2</sup> Culture bactérienne vs multiplex maison (26 pathogènes) dont QPCR bactérienne (seuil :  $10^5$  UFC/ ml)

## Détection des pathogènes

- ▶ 49,5% → 76 %, > chez les personnes âgés / PAC sévère <sup>1</sup>
- ▶ 39% vs 87% <sup>2</sup>

# Diagnostic étiologique plus fréquent

- ▶ **Adulte: Urgences / Ambulatoire**
- ▶ PAC (RP)

<sup>1</sup> Templeton. Clin Inf Dis 2005; 41:345–51

<sup>2</sup> Gadsby. Clin Inf Dis. 2016;62(7):817–23

Pathogen(s) detected	No. of patients with pathogen(s) detected	
	Conv	PCR
Total (n = 106)		
Specific pathogen		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	22	...
<i>Haemophilus influenzae</i>	6	...
<i>Legionella</i> species	2	6
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	5	10
Influenza A virus	8	9
Rhinoviruses	2	18
Coronaviruses	0	14
Single pathogen	49	52
Mixed pathogens <sup>a</sup>	3	28
No pathogen	53	25

**Table 2. Pathogen Detection in Patients With Community-Acquired Pneumonia Using Molecular Methods (n = 303)**

Pathogen	N (%)
<b>Bacteria</b>	
Any bacteria	262 (87.1)
With $\geq 10^5$ CFU/mL, subff where quantified	231 (77.6)
<b>Virus</b>	
Any virus	98 (32.3)
Rhinovirus	41 (12.7)
Influenza	23 (7.1)
A	16 (6.0)
B	7 (2.2)
Parainfluenza virus	11 (3.4)
Any pathogen <sup>a</sup>	280 (86.7)
With $\geq 10^5$ CFU/mL, subff for bacteria where quantified	263 (87.1)

<sup>3</sup> Das D. Clin Microbiol Infect. 2015 Jun;21(6):608.e1-8

- ▶ <sup>1</sup> Méthodes conventionnelles: culture bactérienne (ECBC), cultures virales, IF, Serologie vs PCR maison *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Legionella*; influenza V A et B; parainfluenza V 1-4; VRS; RhinoV; MetapneumoV; AdenoV serogroupe E; CoronaV OC43 et 229E
- ▶ <sup>2</sup> Culture bactérienne vs multiplex maison (26 pathogènes) dont QPCR bactérienne (seuil :  $10^5$  UFC/ ml)
- ▶ <sup>3</sup> Méthode conventionnels: ECBC, Antigénuries, Hémocultures vs RespiFinder

Type	Patients with positive PCR (n = 76) n (%)
<b>Single agent</b>	
Influenza A/B	27 (35)
Rhinovirus	20 (26)
Respiratory syncytial virus A/B	7 (9)
Coronavirus 229E/NL63/OC43	7 (9)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	6 (8)
Parainfluenza virus 3/4	4 (5)
Human metapneumovirus (hMPV)	2 (3)
Adenovirus	1 (1)
<b>Multiple agents</b>	
Co229E— <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1 (1)
Coronavirus OC43—hMPV	1 (1)
Rhinovirus— <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1 (1)

## Détection des pathogènes

- ▶ 49,5% → 76 %, > chez les personnes âgés / PAC sévère <sup>1</sup>
- ▶ 39% vs 87% <sup>2</sup>
- ▶ 16 % vs 31% <sup>3</sup>

# Diagnostic étiologique plus fréquent

## ▶ Adultes - Réanimation

- ▶ 100 patients, Singapour
- ▶ Tests conventionnels: ECBC, Antigénuries, Hémocultures
- ▶ PCR multiplex:
  - ▶ Seegene Respi panels viraux
  - ▶ Seegene sepsis:
    - prélèvement respiratoire et sang

## The Use of Polymerase Chain Reaction Amplification for the Detection of Viruses and Bacteria in Severe Community-Acquired Pneumonia

Wen Ting Siow<sup>1,2</sup>, Evelyn Siew-Chuan Koay<sup>1,3,4</sup>, Chun Kiat Lee<sup>1,5</sup>, Hong Kai Lee<sup>1,6</sup>,  
 Veneta Ong<sup>2,6</sup>, Wang Jee Ngerng<sup>2,6</sup>, Hul Fang Lim<sup>2,6</sup>, Adeline Tan<sup>6</sup>,  
 Julian Wei-Tze Tang<sup>1,7</sup>, Jason Phua<sup>4,8</sup>



	Blood samples, n			Endotracheal aspirates or sputum, n		
	only culture positive	only PCR positive	both culture and PCR positive	only culture positive	only PCR positive	both culture and PCR positive
<b>Bacteria in the PCR test menu</b>						
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	0	2	2	13	7
<i>Moraxella pneumoniae</i>	0	0	2	4	2	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0	1	3	2	1
<i>Escherichia coli</i>	3	0	0	1	3	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	2	2	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	1	1	2	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	0	0	3	0
<i>Streptococcus maltophilia</i>	0	1	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecium/faecalis</i>	0	0	0	0	1	0
<b>Bacteria not in the PCR test menu</b>						
<i>Burkholderia mallei</i>	1	-	-	2	-	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	-	-	1	-	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0	-	-	1	-	-
<i>Citrobacter koseri</i>	0	-	-	1	-	-

Data are presented as number of patients with the specific bacteria detected. Some patients had more than one bacterial pathogen detected. PCR = Polymerase chain reaction.

Détection des pathogènes:  
42% vs 69%

Siow WT Respiration 2016; 92:286-294

# Diagnostic étiologique plus fréquent

## ▶ Adulte – Immunodéprimé

### ▶ 87 patients

- ▶ Symptomatiques (infection respi haute ou basse)
- ▶ et surveillance

TABLE 1 Baseline characteristics of 87 patients from whom respiratory samples were collected

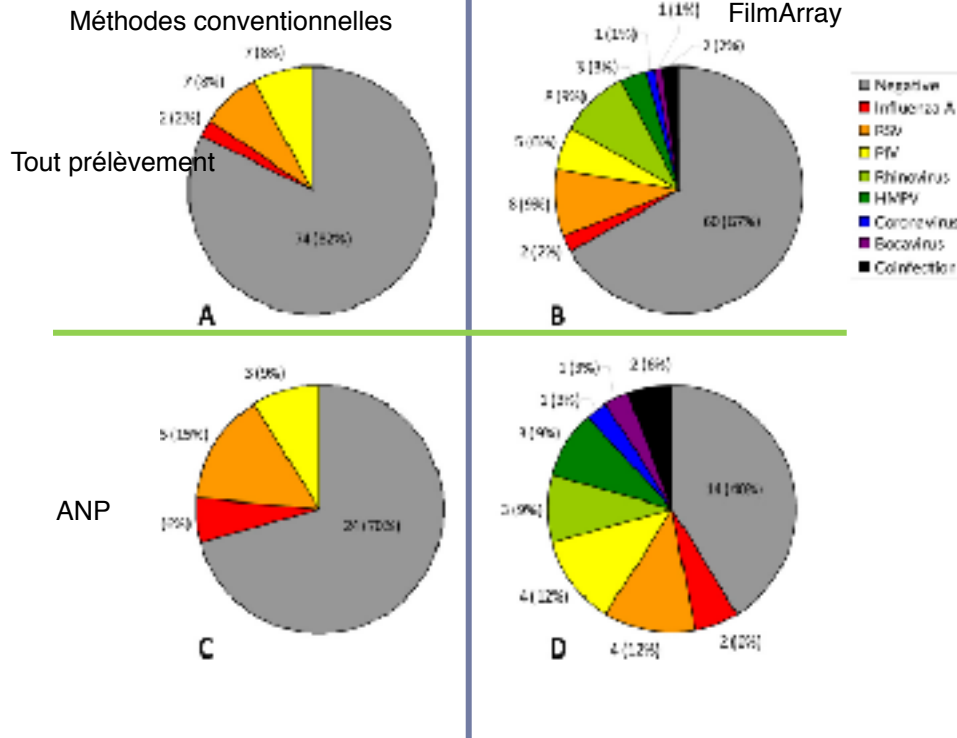
Characteristic	Value for patients
Median age, yrs (range)	55 (19, 80)
No. (%) male	53 (61)
No. (%) with underlying condition	
SOT <sup>a</sup>	30 (34)
HSCCT	42 (48)
Hematologic malignancy <sup>b</sup>	56 (64)
No. (%) with type of hematologic malignancy <sup>b</sup>	
Acute leukemia or myelodysplastic syndrome	24 (43)
Chronic leukemia	10 (18)
Lymphoma	18 (32)
Multiple myeloma	4 (7)

### ▶ 90 prélèvements (56 LBA et 34 Aspi NP)

### ▶ FilmArray

### ▶ Méthodes conventionnelles: ≥ 1 virus respi /clinique : influenzaV A et B, adenoV, VRS, parainfluenzaV 1, 2, 3 ± LBA: culture adenoV et PCR multiplex influenzaV A et B et RSV

### ▶ Verif par PCR temps reel des résultats



Détection des pathogènes: 16/90 vs 30/90

# Diagnostic étiologique plus fréquent

- ▶ **Enfants hospitalisés**
- ▶ Infection respiratoire haute ou basse non compliquée, co-infections exclues
- ▶ Méthodes conventionnelles:
  - ▶ PCR influenzae A et B, VRS
  - ▶ ± Vparainfluenzae (11%); ± metapneumoV (1%)<sup>1</sup>  
    adenoV<sup>2</sup>
- ▶ FilmArray

Taux de documentation :

13.4 vs 51.6%<sup>1</sup>

14% vs 42%<sup>2</sup>

## Impact of a Rapid Respiratory Panel Test on Patient Outcomes

Source: R. Roger, MD; Paolo Marzocchi, MD; Robert C. Jenks, PhD; David Lieberman, MD; Paul J. Anderson, MD; L. Renee Hirsch, MD; Marie A. O'Brien, PhD; Patricia Christakis, MD, MPH; M. J. McManus, J. D'Elia, James L. East, PhD

Variable	Pre-RRP (n = 365)	Post-RRP (n = 771)
Positive result, No. (%)	216 (59.8)	597 (77.9)
<b>Organism</b>	<b>No. (% of Positive)</b>	<b>No. (% of Positive)</b>
Respiratory syncytial virus	213 (98.6)	289 (48.4)
Influenza A	0	82 (13.7)
Influenza B	0	10 (1.6)
Parainfluenza 1–3	3 (1.4)	21 (3.5)
Parainfluenza 4	Not performed	1 (0.002)
Human metapneumovirus	0	57 (9.6)
Adenovirus	Not performed	4 (0.7)
Rhinovirus/enterovirus	Not performed	126 (21.1)
Coronavirus NL63	Not performed	7 (1.2)

<sup>1</sup> Roger, Arch Pathol Lab Med—Vol 139, May 2015

<sup>2</sup> Subramony. J-Pediatr. 2016 Jun;173:196-201

# ... et plus rapide

- ▶ 6.5h vs > 18h

Roger, Arch Pathol Lab Med—Vol 139, May 2015

**Table 4. Outcomes Before and After Rapid Respiratory Panel (RRP) Implementation Regardless of Whether the Test Result Was Positive or Negative**

Variable	Pre-RRP (n = 365)	Post-RRP (n = 771)	P Value
Time to test result, mean (SD), min	1119 (492)	383 (293)	<.001

- ▶ 1.6h vs 7h

**Comparison of TAT for Respiratory Viral Testing Between FilmArray and DFA**

Xu, Am J Clin Pathol 2013;139:118-123

Method	Collection Time	Total Volume	TAT, h		% of Samples Completed in	
			Mean	Median	< 2 h	< 3 h
FilmArray	12/14/2011 - 4/19/2012	2,537	1.5	1.4	82	95
DFA	12/14/2010 - 4/19/2011	1,399	7	6.5	0	2

- ▶ DFA, direct fluorescence assay; TAT, turnaround time.

Rappo U. J Clin Microbiol 2016; 54(8):2096-2103

# ... Conséquences: exposition aux ATB

Roger, Arch Pathol Lab Med—Vol 139, May 2015

## ► chez l'enfant

**Table 4. Outcomes Before and After Rapid Respiratory Panel (RRP) Implementation Regardless of Whether the Test Result Was Positive or Negative**

Variable	Pre-RRP (n = 365)	Post-RRP (n = 771)	P Value
Time to test result, mean (SD), min	1119 (492)	383 (293)	<.001
PCR results received in ED before admission, No. (%)	49 (13.4)	398 (51.6)	<.001
Antibiotic prescribed, No. (%)	268 (73.4)	555 (72.0)	.51
Antibiotic use, mean (SD), c	3.2 (1.6)	2.8 (1.6)	.003

Subramony. J Pediatr. 2016 Jun;173:196-201

Healthcare Resource	Non-MPCR Testing	MPCR Testing	p-value
	June 2010-May 2012	October 2012-May 2014	
N= 2349	N= 2430		
Antibiotic days, median (IQR)	5 (2-9)	4 (1-8)	<0.01

## ► Chez l'adulte

Gadsby. Clin Inf Dis. 2016;62(7):817-23

Potential Modification	Antibiotic Agent	N (%)
De-escalation		247 (77.2)
Remove 1 agent		113
	CLR	103
	AMC	7
Remove 2 agents	Other <sup>a</sup>	3
		12
Reduce spectrum of agent	CLR + AMX	5
	CLR + DOX	5
	AMC to DOX	3
	AMC to AMX	2
Reduce number and spectrum	Other <sup>b</sup>	2
		113
	AMC + CLR to DOX	61
	AMC + CLR to AMX	22
	AMX + CLR to AMC	12
	AMX + CLR to DOX	5
Escalation	CRO + CLR to DOX	4
	AMC + CLR to LEV	2
	Other <sup>c</sup>	4
Escalation		19 (5.9)

Brendish. Lancet Respir Med. 2017 May;5(5):401-411.

	POCT (n=260)	Control (n=354)	Risk difference (95% CI)	Unadjusted odds ratio (95% CI)	Adjusted odds ratio (95% CI)	Numbers needed to treat (95% CI)	p-value
<b>All antibiotics</b>							
Antibiotic (net)	301 (34%)	298 (85%)	0.5% (-4.9 to 6.4)	1.04 (0.70 to 1.54)	0.99 (0.57 to 1.70)	-	0.96*
Single dose only	31 (30) (30%)	10 (29) (3%)	6.9% (2.9 to 11.0)	3.16 (1.59 to 6.65)	-	15 (9 to 55)*	0.0010
Doses for >48h	57 (50) (37%)	76 (29) (21%)	7.8% (7.5 to 13.1)	7.05 (1.48 to 3.38)	-	13 (8 to 41)*	0.0047
Duration (days)	7.2 (5.1)	7.7 (4.9)	-0.4 (-1.2 to 0.405)	0.92 (0.85 to 1.05)†	0.91	-	0.12*

Diminution de la durée de l'antibiothérapie  
 Nombre de dose unique >  
 de-escalation nombre d'ATB et/ ou spectre



# ... Conséquences: gestion du risque viral

## ► Chez l'enfant

Roger, Arch Pathol Lab Med—Vol 139, May 2015

**Table 4. Outcomes Before and After Rapid Respiratory Panel (RRP) Implementation Regardless of Whether the Test Result Was Positive or Negative**

Variable	Pre-RRP (n = 365)	Post-RRP (n = 771)	P Value
Time to test result, mean (SD), min	1119 (492)	383 (292)	<.001
PCR results received in ED before admission, No. (%)	49 (13.4)	398 (51.6)	<.001
Antibiotic prescribed, No. (%)	268 (73.4)	555 (72.0)	.61
Antibiotic use, mean (SD), d	3.2 (1.6)	2.8 (1.6)	.003
Inpatient LOS, mean (SD), d	3.4 (1.7)	3.2 (1.6)	.16
ED LOS, mean (SD), min	256 (97)	282 (115)	.002
Time in isolation, mean (SD), h	23 (41)	20 (38)	.47

Abbreviations: ED, emergency department; LOS, length of stay; PCR, polymerase chain reaction.

Subramony. J Pediatr. 2016 Jun;173:196-201

Healthcare Resource	Non-MPCR Testing	MPCR Testing	p-value
	June 2010-May 2012	October 2012-May 2014	
	N 2349	N 2430	
Antibiotic days, median (IQR)	3 (2-9)	4 (1-8)	<0.01
Antibiotic days per 100 patient days, overall mean	86	75	0.4
Chest radiograph performance, n (%)	1820 (78)	1426 (59)	<0.01
Isolation precaution duration in hours, median (IQR)	0 (0-36)	30.2 (0-70)	<0.01
Isolation precaution duration in days per 100 patient days, overall mean	15	34	<0.01

Xu, Am J Clin Pathol 2013;139:118-123

Grippe +: traitement rapide et approprié (45% des cas résultats avant la sortie des urgences)

Détection des autres virus: diag différentiel. Isolement des patients

Isolement ciblé précoce, Maitrise d'une épidémie...

Traitement antiviral administré « à bon escient » dans les meilleurs délais

Temps d'isolement: ↓

# ... Conséquences: gestion du risque virale

## Chez l'adulte

Rappo U. *J Clin Microbiol* 2016; 54(8):2096-2103

Patients positive for influenza virus (n = 212)

Outcome	Unadjusted coefficient (95% CI)	P value	Adjusted coefficient (95% CI)	P value
Length of stay	-0.12 (-0.62, 0.37)	0.63	-0.37 (-0.73, -0.018)	0.010
Duration of antimicrobial use <sup>b</sup>	0.61 (-1.28, 0.061)	0.024	0.68 (-1.29, 0.060)	0.052
No. of chest radiographs <sup>c</sup>	-0.43 (-0.80, -0.067)	0.020	-0.42 (-0.72, -0.13)	0.005
Time to anti-influenza treatment <sup>d</sup>	-0.18 (-0.69, -0.53)	0.48	-0.20 (-0.65, 0.25)	0.37

Isolement ciblé précoce

isolement plus rapide des patients si Grippe +  
levée plus rapide de l'isolement si Grippe -

Traitement antiviral administré « à bon escient »  
dans les meilleurs délais

Brendish. *Lancet Respir Med.* 2017 May;5(5):401-411.

	POCT (n=360)	Control (n=354)	Difference (95% CI)	Odds ratio (95% CI)	Number needed to test (95% CI)	p value
<b>Neuraminidase inhibitor use</b>						
Neuraminidase inhibitor used (total)	66 (18%)	51 (14%)	3.9% (-1.5 to 9.4)	1.33 (0.89 to 1.99)	-	0.16
Used in influenza-positive patients	54/66 (82%)	24/51 (47%)	34.7% (17.5 to 52.0)	5.06 (2.20 to 11.65)	3 (1.9 to 5.5)	0.0001
Used in influenza-negative patients	12/66 (18%)	27/51 (53%)	-	-	-	-
influenza-positive patients treated with neuraminidase inhibitor*	52/57 (91%)	24/37 (65%)	26.4% (9.6 to 43.2)	5.6 (1.80 to 17.60)	4 (2.3 to 10.7)	0.0026
Duration of neuraminidase inhibitor use in influenza-negative patients (doses)†	2.0 (2.6)	6.1 (4.1)	-4.1 (-6.3 to -1.9)	-	-	0.0006
Time to first dose of neuraminidase inhibitor (h)*	8.8 (15.3)	21.0 (28.7)	-12.2 (-24.9 to 0.5)	-	-	0.0597
<b>Isolation facility use‡</b>						
All patients isolated	63/191 (33%)	49/154 (25%)	7.7% (-1.3 to 16.8)	1.45 (0.94 to 2.27)	-	0.12
Isolated with confirmed respiratory virus infection§	32/191 (17%)	17/154 (9%)	8.0% (1.3 to 14.7)	2.16 (1.12 to 3.92)	13 (6.8 to 73.2)	0.0217
influenza-positive patients isolated*	20/27 (74%)	13/23 (57%)	17.6% (-8.8 to 43.9)	2.20 (0.67 to 7.24)	-	0.14
Time to isolation (days)¶	0.5 (0.5)	1.0 (0.4)	-0.5 (-0.9 to -0.2)	-	-	0.0071
Time to de-isolation (days)¶¶	1.0 (0.0)	3.1 (2.2)	-2.1 (-3.6 to -0.7)	-	-	0.0057

# ... Conséquences : parcours de soins

Roger, Arch Pathol Lab Med—Vol 139, May 2011

## ► Chez l'enfant

Variable	Pre-RRP (n = 365)	Post-RRP (n = 771)	P Value
Time to test result, mean (SD), min	1119 (492)	383 (293)	<.001
PCR results received in ED before admission, No. (%)	49 (13.4)	398 (51.6)	<.001
Antibiotic prescribed, No. (%)	268 (73.4)	555 (72.0)	.61
Antibiotic use, mean (SD), d	3.2 (1.6)	2.8 (1.6)	.003
Inpatient LOS, mean (SD), d	3.4 (1.7)	3.2 (1.6)	.116
ED LOS, mean (SD), min	256 (97)	262 (115)	.002

Subramony. J Pediatr. 2016 Jun;173:196-201

Healthcare Resource	Non-MPCR Testing	MPCR Testing	p-value
	June 2010-May 2012	October 2012-May 2014	
	N 2349	N 2490	
Antibiotic days, median (IQR)	5 (1-9)	4 (1-8)	<0.01
Antibiotic days per 100 patient days, overall mean	86	75	0.4
Chest radiograph performance, n (%)	1820 (78)	1426 (59)	<0.01

## ► Chez l'adulte

Brendish. Lancet Respir Med. 2017 May;5(5):401-411

	POCT (n=360)	Control (n=354)	Difference (95% CI)	Odds ratio (95% CI)	p value
Admitted	332 (92%)	327 (92%)	0.2% (-1.1 to 0.8)	0.98 (0.56 to 1.70)	0.91
Length of hospital stay (days)*	5.7 (6-8)	5.8 (7-7)	-1.1 (-2.7 to -0.3)	-	0.0443
Prolonged inpatient stay†	81/327 (25%)	86/311 (28%)	-2.9% (-9.7 to 3.9)	0.86 (0.61 to 1.23)	0.42

Data are n (%) or mean (SD). POCT=point-of-care testing. \*Adjusted for in-hospital mortality. †Defined as ≥7 days (adjusted for in-hospital mortality).

Rappo U. J Clin Microbiol 2016; 54(8):2096-2103

Patients positive for influenza virus (n = 212)

Outcome	Unadjusted coefficient (95% CI)	P value	Adjusted coefficient (95% CI)	P value
Length of stay	0.12 (-0.62, 0.37)	0.63	0.37 (-0.75, 0.018)	0.030
Duration of antimicrobial use*	-0.61 (-1.28, 0.061)	0.074	-0.68 (-1.29, -0.060)	0.032
No. of chest radiographs*	0.43 (-0.80, 0.062)	0.030	0.43 (-0.73, 0.13)	0.005

Temps passé aux urgences: ↓  
 Durée d'hospitalisation: ↓  
 Non admission > si grippe +  
 Investigation : ↓

# ... Conséquences

---

## Impact diagnostique et thérapeutique

- ▶ Réduction du nombre de tests au laboratoire
- ▶ Réduction du nombre d'examens supplémentaires (RP...)
- ▶ Réduction de l'utilisation des ATB
- ▶ Augmentation de l'utilisation des ATV
- ▶ Isolement ciblé précoce
- ▶ Réduction de la durée de séjour

Roger, Arch Pathol Lab Med—Vol 139, May 2015  
Xu, Am J Clin Pathol 2013;139:118-123  
Noyola DE *Pediatr Infect Dis J* **2000**; **19(4):303-7**  
Sharma V Arch Pediatr Adolesc Med **2002**; **156:41-3**  
Esposito S *Arch Dis Childhood* **2003**; **88:525-6**  
Bonner AB *Pediatrics* **2003**; **112:363-7**  
Poehling KA *Arch Pediatr Adolesc Med* **2006**; **160:713-8**

# Autres contextes: PAVM

## ▶ Réanimation

### ▶ Curtis- Unyvero

- ▶ Combinaison de 3 instruments
  - 2 minutes de manipulation
  - Temps de rendu des résultats : 5h
- ▶ Cassettes unitaires
- ▶ Révélation par puce à ADN
- ▶ **panel pneumopathies nosocomiales**
- ▶ Qualitatif



GROUP	PATHOGEN	
Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter freundii</i>	
	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	
	<i>Proteus</i> spp.	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
	<i>Klebsiella variicola</i>	
	<i>Senftenella marcescens</i>	
	<i>Morganella morganii</i>	
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	
	Non-fermenting bacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<i>Acetobacter baumannii</i> complex
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		
<i>Legionella pneumophila</i>		
Others/ Fungi	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	

GENE	RESISTANCE AGAINST
<i>ermB</i>	Macrolide/Linkosamide
<i>mecA</i>	Oxacillin
<i>merC</i> (RA25')	Oxacillin
<i>fen</i>	Penicillin
<i>shv</i>	Penicillin
<i>ctx-M</i>	3rd generation cephalosporins
<i>kpc</i>	Carbapenem
<i>imp</i>	Carbapenem
<i>ndm</i>	Carbapenem
<i>oxa-23</i>	Carbapenem
<i>oxa-24/40</i>	Carbapenem
<i>oxa-48</i>	Carbapenem
<i>oxa-58</i>	Carbapenem
<i>vat</i>	Carbapenem
<i>sufI</i>	Sulfonamide
<i>gyrB3</i>	Fluoroquinolone
<i>gyrB7</i>	Fluoroquinolone

# Autres contextes: PAVM

- ▶ 49 patients, PNP nosocomiale
- ▶ Culture vs multiplex
  - ▶ Aspiration (30), LBA (7), Crachat (12)
- ▶ 3 groupes de PNP nosocomiales
  - ▶ 1: « moyenne à modérée » sans facteurs de risques et sévère précoce
  - ▶ 2: « moyenne à modérée » avec facteurs de risques
  - ▶ 3: sévère tardive

TABLE 2 Distribution of microorganisms according to severity of pneumonia

Microorganism (no. of isolates)	No. of patients <sup>a</sup> infected according to indicated detection type						P value <sup>b</sup>
	Group 1 (n = 8)		Group 2 (n = 24)		Group 3 (n = 15)		
	PCR	Culture	PCR	Culture	PCR	Culture	
<i>Acinetobacter baumannii</i> (13)	1	0	8	2	8	1	0.007
<i>Haemophilus influenzae</i> (1)	0	0	1	0	1	0	0.24
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (10)	0	0	8	1	4	0	0.0013
<i>Klebsiella oxytoca</i> (2)	0	0	2	0	0	0	0.24
<i>Legionella pneumophila</i> (1)	0	0	1	0	0	0	0.24
<i>Moraxella acrochaeta</i> (1)	0	0	0	0	1	0	0.5
<i>Pseudomonas</i> sp. (1)	0	0	0	0	1	0	0.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (12)	1	0	4	1	5	1	0.015
<i>Stenotrophomonas</i> (3)	0	0	1	0	2	0	0.12
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	0	0	1	0	1	0	0.24
MRSA <sup>c</sup> (3)	0	0	1	0	2	0	0.17
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (12)	2	0	5	0	6	1	0.0027
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (12)	0	2	2	0	2	0	0.015

TABLE 3 Treatment changed based on Uryvero results

Treatment or result	Cases (no. [%])	Comment <sup>a</sup>
Treatment changed	33 (67.3)	Within 6 h of specimen collection
Missing	16 (32.7)	No pathogen detected plus invalid readings (errors)
Total	49 (100.0)	
Improved		
Yes	30 (61.2)	Clinical parameters and CXR
No	8 (16.3)	CXR and clinical parameters unchanged
Died	3 (6.1)	Diad of non-recovery: 1 CML; 1 SMTB; 1 severe MI

<sup>a</sup> CXR, chest X-ray; CML, chronic myeloid leukemia; MTB, multidrug resistant tuberculosis; MI, myocardial infarction.

Jamal W. J Clin Microbiol. 2014 Jul;52(7):2487-92

# Autres contextes: mucoviscidose?

## ▶ Bactéries

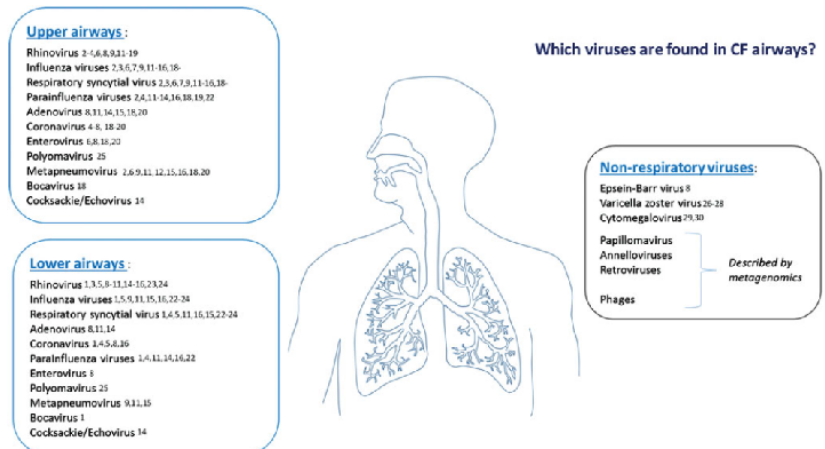
- ▶ *H. influenzae*,
- ▶ *S. aureus*,
- ▶ *P. aeruginosa*
- ▶ *BGNF*
- ▶ *MNT*
- ▶ Intérêt de la PCR pyo: détection + précoce

## ▶ Infections virales:

- ▶ alteration de la fonction respiratoire, progression de la maladie, diminution du VEMS, antibiothérapie prolongée
- ▶ La plupart des hospitalisations sont concomitantes ou précédées d'une infection virale
- ▶ Même virus chez les patients CF et non CF (Rhinovirus, VRS, Influenza)

Panel virus respiratoire?  
Panel nosocomial Curtis- Unyvero?  
Lien virus-bactéries?

Billard Crit Rev Microbiol. 2017 Nov;43(6):690-708  
Etherington. J Cyst Fibros. 2014 Jan;13(1):49-55  
Kieninger. Chest. 2013 Mar;143(3):782-790  
Hery-Arnaud Clin Microbiol Infect. 2017 Mar;23(3):203-207



# Intérêt des PCR multiplex pour le diagnostic des pneumopathies

## ▶ Innovation technologique

- ▶ Simples, rapides, nombreuses cibles, performant, réalisable dans l'environnement proche du patient:
  - ▶ Diagnostic d'urgence
  - ▶ Automatisé: biologie moléculaire accessible à un plus grand nombre de labo. Permanence des soins
- ▶ Impact sur les thérapeutiques anti- infectieuses et sur les examens para cliniques:
  - ▶ Adaptation rapide du traitement (ATBth raccourcie/ Antiviraux adaptés,
- ▶ Impact sur les isolements et sur la durée d'hospitalisation
  - ▶ Isolement adéquate, réduction des examens paracliniques
- ▶ A adapter au contexte clinique: suspicion d'infection virale, PAC, PAVM...
- ▶ Dialogue clinico-biologique
- ▶ Connaissances épidémiologiques (co-infections, microbiote)

