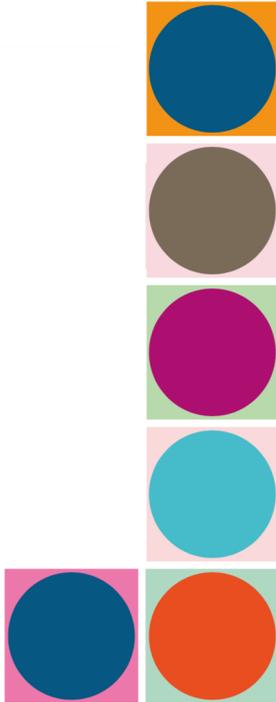


Diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori* : nouveautés au CNR

6 mai 2021

Lucie BENEJAT-BRUHL – Ingénieur Hospitalier
CNR des Campylobacters & Helicobacters, Bordeaux



Diagnostic de *H. pylori* au CNR



- Biopsies gastriques
 - culture
 - PCR en temps réel maison



- Selles
 - recherche par antigènes
 - PCR Amplidiag® *H. pylori*+ClariR, Mobidiag



- Air expiré
 - test respiratoire à l'urée marquée au C13



- Sérum
 - sérologie Liaison® *H. pylori* IgG, Diasorin



Diagnostic de *H. pylori* au CNR



- Biopsies gastriques
 - culture
 - PCR en temps réel maison



- Selles
 - recherche par antigènes
 - (PCR Amplidiag® *H. pylori*+ClariR, Mobidiag)



- ~~■ Air expiré~~
 - ~~• test respiratoire à l'urée marquée au C13~~



- Sérum
 - sérologie Liaison® *H. pylori* IgG, Diasorin

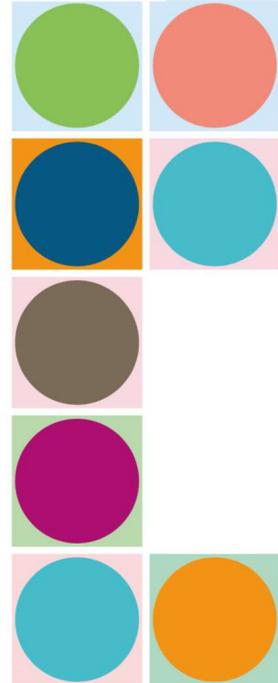
Nouveautés



Partie 1

PCR en temps réel

Biopsie gastrique



- PCR en temps réel maison
- Trousses de PCR en temps réel commerciales
- Contrôle Qualité Externe

Détection moléculaire de *H. pylori*

- Extraction d'ADN

- MagNA Pure 96, Roche Diagnostics



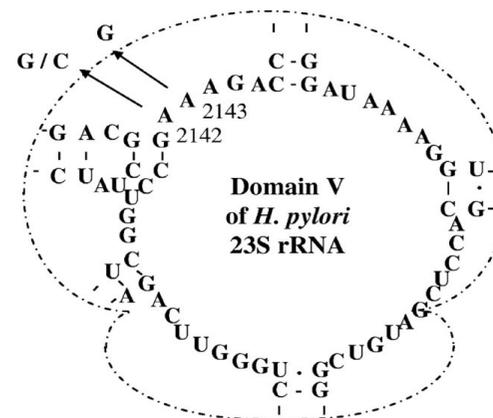
- Détection spécifique de *H. pylori*

- gène cible ADNr 23S

- Détermination de la résistance à la clarithromycine

- 3 mutations connues comme associées à cette résistance

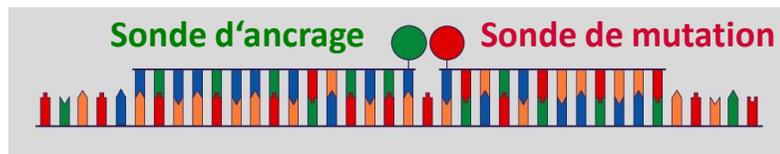
- A2142G
- A2143G
- A2142C



PCR maison du CNR

- PCR maison* en format FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

Hybridation parfaite

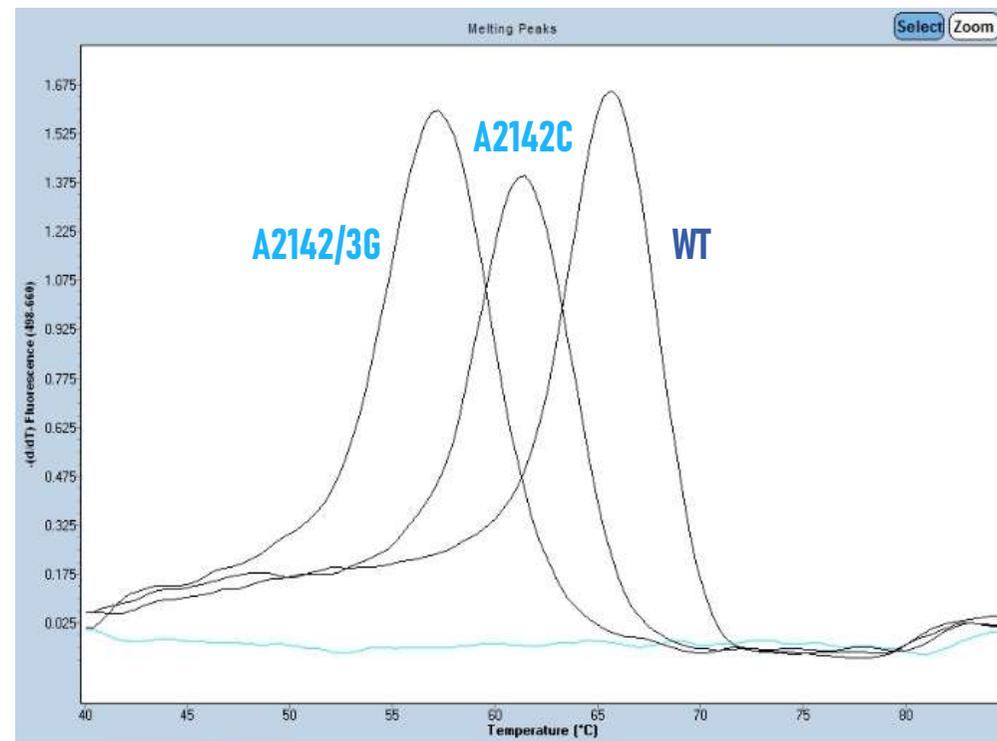


↳ Tm élevé

Mismatch



↳ décroissance du Tm



*Oleastro *et al.*, J Clin Microbiol 2003

Mise en place de barrettes prêtes à l'emploi

- Adaptation de notre PCR maison en vue de l'accréditation
 - arrêt des PCR en capillaires avec utilisation séparément des amorces, sondes et réactifs



Mise en place de barrettes prêtes à l'emploi

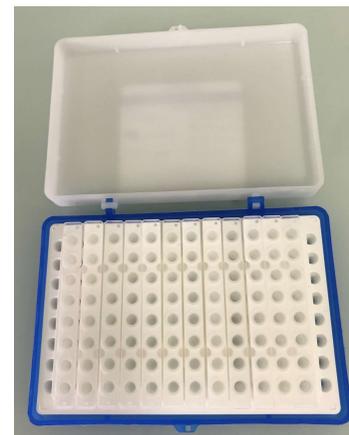
- Adaptation de notre PCR maison en vue de l'accréditation

- arrêt des PCR en capillaires avec utilisation séparément des amorces, sondes et réactifs



- synthèse par Eurogentec de barrettes 8 puits prêtes à l'emploi

LightCycler® 480 System



 Eurogentec

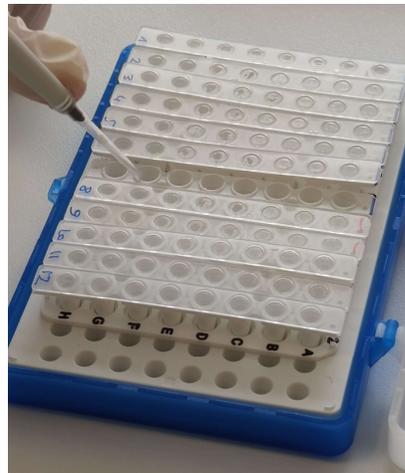


Barrettes prêtes à l'emploi (1)

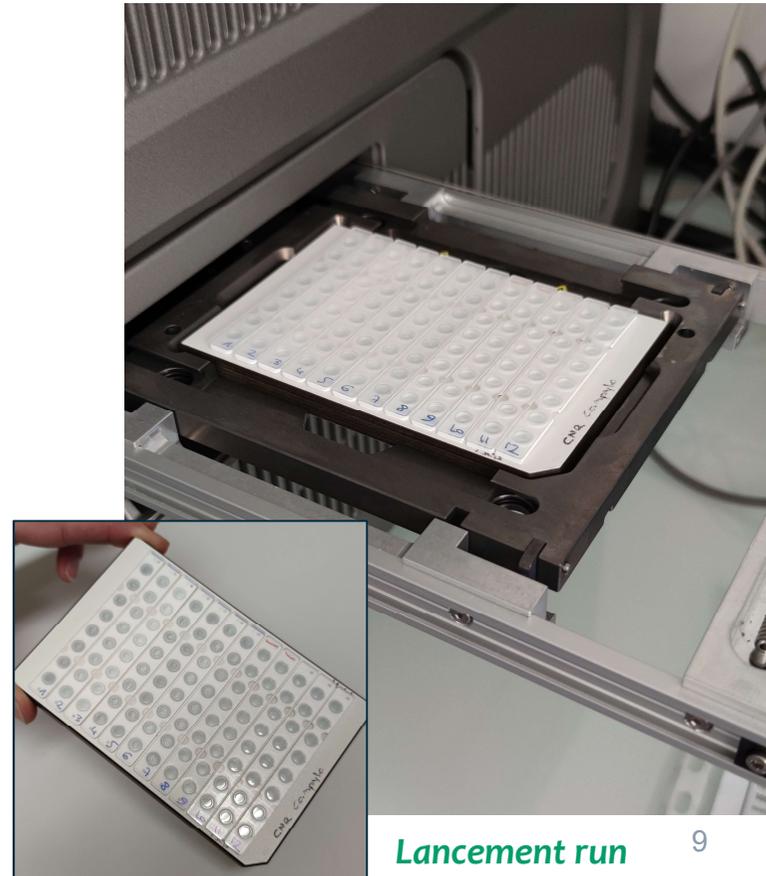
- Gain de temps
 - pas de préparation de mélange réactionnel
 - ajout de l'ADN seulement (petit volume 1µl)



Ouverture



Dépôt

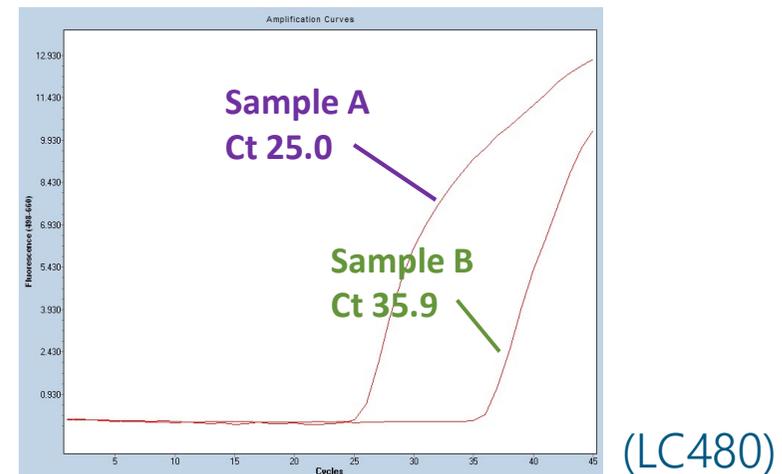
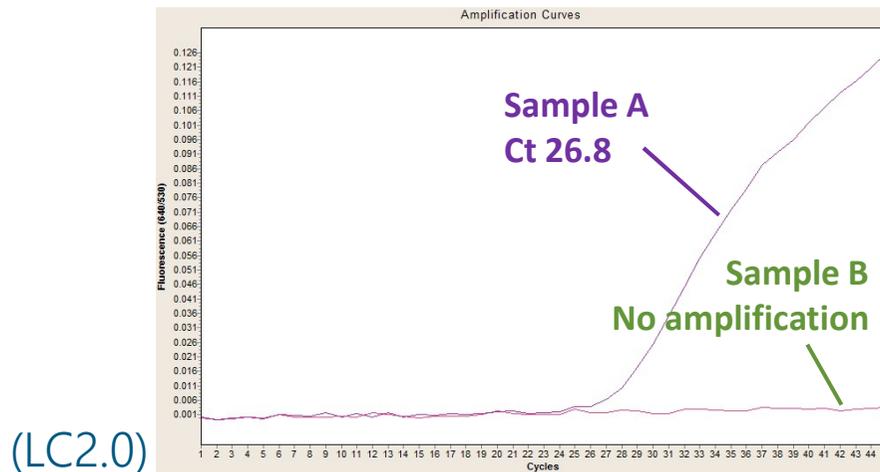


Lancement run

Barrettes prêtes à l'emploi (2)

- Gain en sensibilité

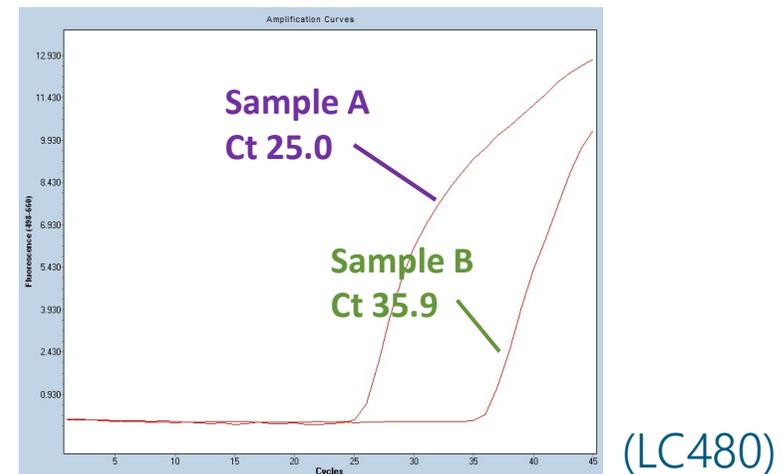
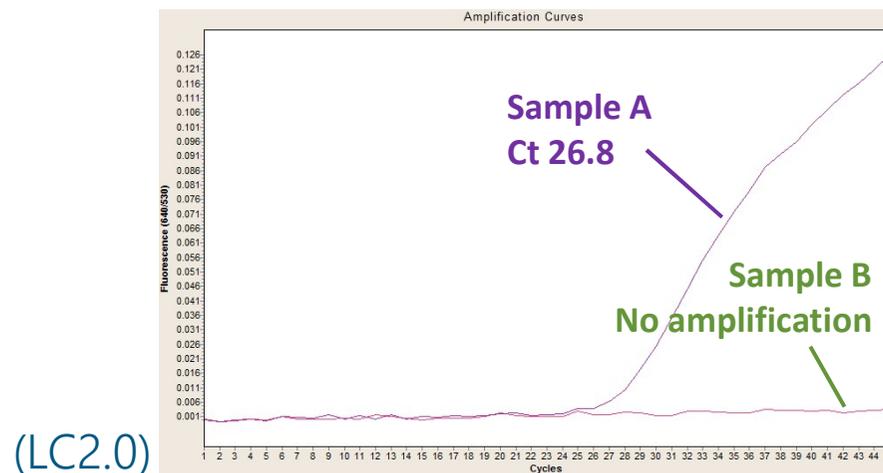
- Sur 50 échantillons : gain de 1,6 Ct en moyenne en comparaison de la PCR originelle (capillaires) avec changement de fluorophore 'Red640' en 'ATT0647N'



Barrettes prêtes à l'emploi (2)

■ Gain en sensibilité

- Sur 50 échantillons : gain de 1,6 Ct en moyenne en comparaison de la PCR originelle (capillaires) avec changement de fluorophore 'Red640' en 'ATT0647N'

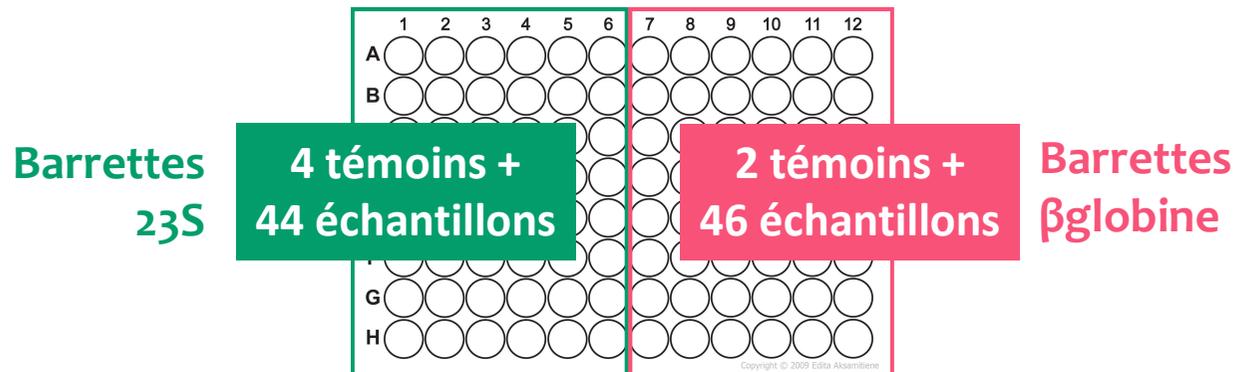


■ Stabilité des réactifs

- se conservent à -20°C durant 1 an
- stables à 4°C durant 24h, et à température ambiante durant 4h
- stables après un cycle de décongélation/recongélation

Barrettes prêtes à l'emploi (3)

- Contrôle d'extraction : barrettes prêtes à l'emploi pour amplification du gène de ménage eucaryote β globine
 - amplification dans le même run



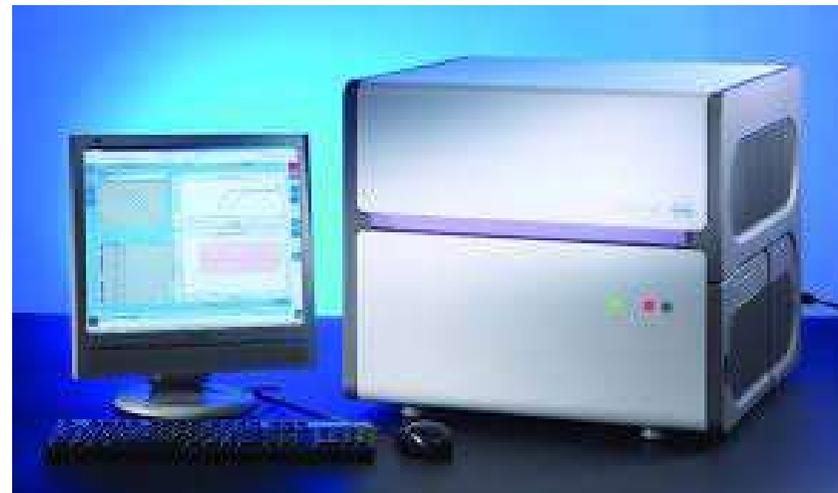
- En cas de PCR *H. pylori* négative
 - contrôle l'absence d'inhibiteurs
 - contrôle la qualité de l'extraction de l'ADN
- > sous réserve si Ct β globine > 27

Barrettes prêtes à l'emploi (4)

- **Coût bas**
 - **2,20€ à 3€ la double PCR 23S & Bglobine (12€ à 8,50€ la barrette)**
(prix négocié pour le CNRCH en tenant compte de notre activité annuelle)
- **Accessibles à tout laboratoire, mais barrettes uniquement utilisables sur instruments Roche** (format FRET : spécialité de Roche)



LightCycler® 96 Instrument



LightCycler® 480 System

Trousses de biologie moléculaire

■ Commercialisées en France

1



RIDA®GENE
Helicobacter pylori

2

MOBIDIAG



Amplidiag®
H. pylori+ClariR

3

Seegene



Allplex™
H. pylori & ClariR Assay

- PCR en temps réel après extraction d'ADN sur biopsies gastriques (et/ou selles pour Amplidiag)
 - détection de *Helicobacter pylori*
 - détermination de la résistance aux macrolides

Comparatif des trousse

	PCR maison*	PCR Ridagene	PCR Amplidiag	PCR Allplex
Instruments	<p><u>LC480 (Roche)</u> LC 2.0 (Roche)</p> 	<p><u>LC480 (Roche)</u> Mx3005P (Agilent Tech.) ABI 7500 (Applied BioS.) M2000rt (Abbott) <u>CFX96 (BioRad)</u> SmartCycler (Cepheid) Rotor-Gene Q (QIAGEN)</p> 	<p><u>CFX96 (BioRad)</u> RotorGene6000 (Qiagen) MX300 (Stratagene)</p> <p><i>Calibration + Logiciel Mobidiag pour l'interprétation</i></p> 	<p><u>CFX96 (BioRad)</u></p> <p><i>Logiciel Seegene pour l'interprétation</i></p> 

*Oleastro et al., J Clin Microbiol 2003

Comparatif des troussees

	PCR maison*	PCR Ridagene	PCR Amplidiag	PCR Allplex
Instruments	<p><u>LC480 (Roche)</u> LC 2.0 (Roche)</p> 	<p><u>LC480 (Roche)</u> Mx3005P (Agilent Tech.) ABI 7500 (Applied BioS.) M2000rt (Abbott) <u>CFX96 (BioRad)</u> SmartCycler (Cepheid) Rotor-Gene Q (QIAGEN)</p> 	<p><u>CFX96 (BioRad)</u> RotorGene6000 (Qiagen) MX300 (Stratagene)</p> <p><i>Calibration + Logiciel Mobidiag pour l'interprétation</i></p> 	<p><u>CFX96 (BioRad)</u></p> <p><i>Logiciel Seegene pour l'interprétation</i></p> 
Détection des mutations	<ol style="list-style-type: none"> 1.Allèle sauvage 2.Mutations A2142/3G 3.Mutation A2142C 4.Contrôle d'extraction 	<ol style="list-style-type: none"> 1.Mutations (A2142/3G et A2142C) 2.Contrôle interne 	<ol style="list-style-type: none"> 1.Allèle sauvage 2.Mutations (A2142-3G et A2142C) 3.Contrôle interne 	<ol style="list-style-type: none"> 1.Mutation A2142G 2.Mutation A2143G 3.Mutation A2142C 4.Contrôle interne

*Oleastro et al., J Clin Microbiol 2003

Comparatif des trousse

	PCR maison*	PCR Ridagene	PCR Amplidiag	PCR Allplex
Instruments	<p><u>LC480 (Roche)</u> LC 2.0 (Roche)</p> 	<p><u>LC480 (Roche)</u> Mx3005P (Agilent Tech.) ABI 7500 (Applied BioS.) M2000rt (Abbott) <u>CFX96 (BioRad)</u> SmartCycler (Cepheid) Rotor-Gene Q (QIAGEN)</p> 	<p><u>CFX96 (BioRad)</u> RotorGene6000 (Qiagen) MX300 (Stratagene)</p> <p><i>Calibration + Logiciel Mobidiag pour l'interprétation</i></p> 	<p><u>CFX96 (BioRad)</u></p> <p><i>Logiciel Seegene pour l'interprétation</i></p> 
Détection des mutations	<p>1.Allèle sauvage 2.Mutations A2142/3G 3.Mutation A2142C 4.Contrôle d'extraction</p>	<p>1.Mutations (A2142/3G et A2142C) 2.Contrôle interne</p>	<p>1.Allèle sauvage 2.Mutations (A2142-3G et A2142C) 3.Contrôle interne</p>	<p>1.Mutation A2142G 2.Mutation A2143G 3.Mutation A2142C 4.Contrôle interne</p>
Coût	3€ / test	10€** / test	18€** / test	inconnu

**peut être divisé par 2 si volume diminué par 2

*Oleastro et al., J Clin Microbiol 2003

Evaluation des 3 troussees au CNR



- **Matériel testé : biopsies gastriques**
 - 200 reçues en 2014 (Ridagene et Amplidiag)
 - 180 reçues en 2018 (Allplex)
- **Comparaison des 3 troussees par rapport aux techniques d'analyse du CNR (Culture + PCR maison)**

Evaluation des 3 trousseaux au CNR

- **Matériel testé : biopsies gastriques**
 - 200 reçues en 2014 (Ridagene et Amplidiag)
 - 180 reçues en 2018 (Allplex)
- **Comparaison des 3 trousseaux par rapport aux techniques d'analyse du CNR (Culture + PCR maison)**
- **Performances**

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Ridagene ¹	98,7	100	100	99,2
Amplidiag ¹	100	99,2	98,6	100
Allplex ²	100	97,6	98,0	100

¹Bénéjat *et al.*, Helicobacter 2018

²Jehanne *et al.*, Helicobacter 2020

Evaluation des 3 troussees au CNR

- Matériel testé : biopsies gastriques
 - 200 reçues en 2014 (Ridagene et Amplidiag)
 - 180 reçues en 2018 (Allplex)
- Comparaison des 3 troussees par rapport aux techniques d'analyse du CNR (Culture + PCR maison)
- Performances

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Ridagene ¹	98,7	100	100	99,2
Amplidiag ¹	100	99,2	98,6	100
Allplex ²	100	97,6	98,0	100

Excellentes Sensibilités et Valeurs Prédicatives Négatives

¹Bénéjat *et al.*, Helicobacter 2018

²Jehanne *et al.*, Helicobacter 2020

Evaluation des 3 trousseaux au CNR

- Matériel testé : biopsies gastriques
 - 200 reçues en 2014 (Ridagene et Amplidiag)
 - 180 reçues en 2018 (Allplex)
- Comparaison des 3 trousseaux par rapport aux techniques d'analyse du CNR (Culture + PCR maison)

■ Performances

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Ridagene ¹	98,7	100	100	99,2
Amplidiag ¹	100	99,2	98,6	100
Allplex ²	100	97,6	98,0	100

Excellentes Sensibilités et Valeurs Prédicatives Négatives

Spécificités et Valeurs prédictives Positives supérieures à 97%

¹Bénéjat *et al.*, Helicobacter 2018

²Jehanne *et al.*, Helicobacter 2020

Evaluation des 3 troussees au CNR



- Matériel testé : biopsies gastriques
 - 200 reçues en 2014 (Ridagene et Amplidiag)
 - 180 reçues en 2018 (Allplex)
- Comparaison des 3 troussees par rapport aux techniques d'analyse du CNR (Culture + PCR maison)

■ Performances

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Ridagene ¹	98,7	100	100	99,2
Amplidiag ¹	100	99,2	98,6	100
Allplex ²	100	97,6	98,0	100

Excellentes Sensibilités et Valeurs Prédictives Négatives

Spécificités et Valeurs prédictives Positives supérieures à 97%

Autre évaluation du kit Amplidiag sur biopsies gastriques effectuée par une équipe parisienne (Hays et al, Helicobacter 2019)

> Sensibilité 88,5% > Spécificité 100%

¹Bénéjat et al., Helicobacter 2018

²Jehanne et al., Helicobacter 2020

Contrôle Qualité Externe - PCR

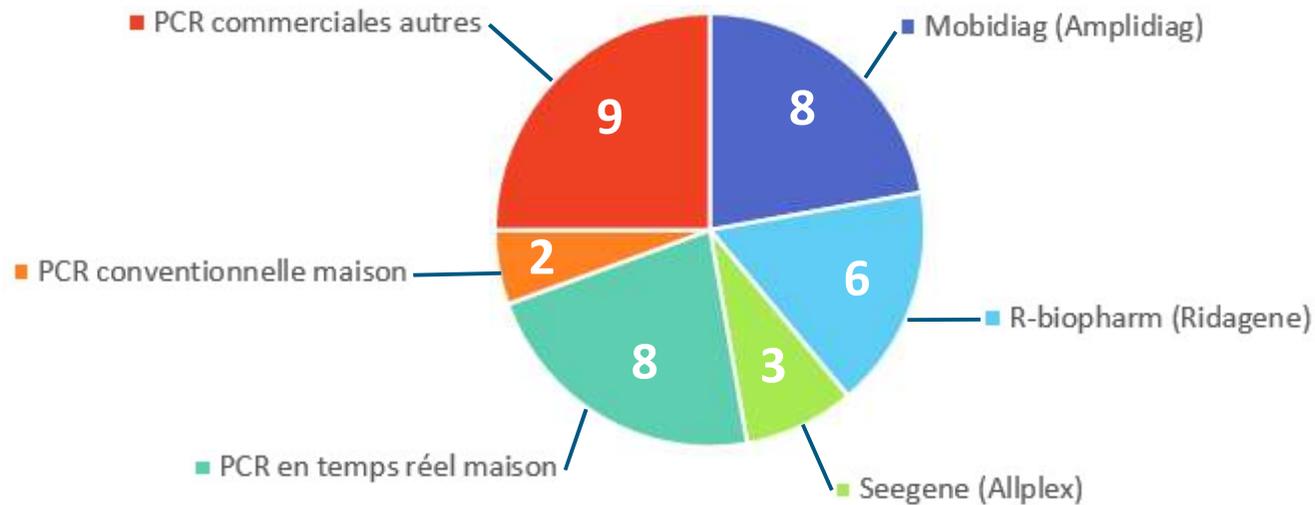


- QCMD *Helicobacter pylori* EQA
 - 10 extraits d'ADN issues de souches



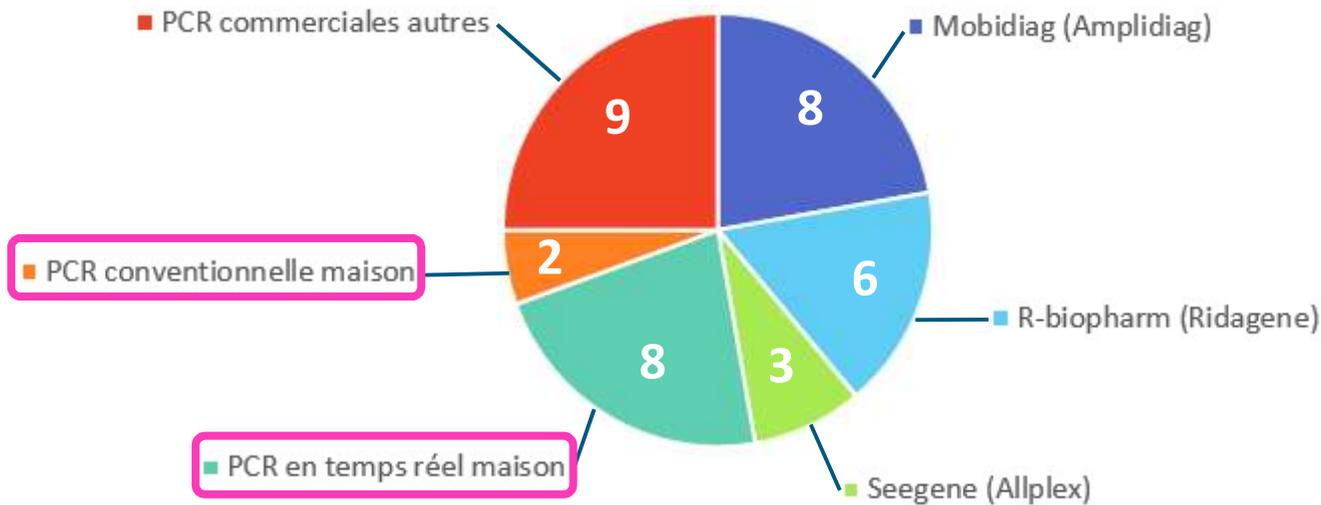
Contrôle Qualité Externe - PCR

- QCMD *Helicobacter pylori* EQA
 - 10 extraits d'ADN issues de souches
- QCMD 2020
 - 36 participants, 15 pays



Contrôle Qualité Externe - PCR

- QCMD *Helicobacter pylori* EQA
 - 10 extraits d'ADN issues de souches
- QCMD 2020
 - 36 participants, 15 pays



PCR maison

Contrôle Qualité Externe - PCR

- QCMD *Helicobacter pylori* EQA
 - 10 extraits d'ADN issues de souches
- QCMD 2020
 - 36 participants, 15 pays



PCR maison

Testés par le CNRCH

Contrôle Qualité Externe - PCR

- QCMD *Helicobacter pylori* EQA
 - 10 extraits d'ADN issues de souches
- QCMD 2020
 - 36 participants, 15 pays



PCR maison
Testés par le CNRCH

Contrôle Qualité Externe - PCR

■ Résultats QCMD 2020

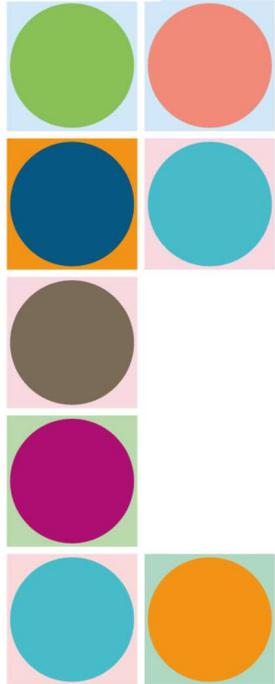
36 participants	CNRCH
95,3% correct	100% correct

Faux négatifs n=15/324+

- 6 > R-biopharm (Ridagene)
- 4 > PCR conventionnelle maison
- 3 > Mobidiag (Amplidiag)
- 2 > Commerciales autres

Faux positifs n=2/36neg

- 1 > PCR conventionnelle maison
- 1 > Commerciales autres



Partie 2

Recherche d'antigènes

Selles



- Trousses commerciales
- Contrôle Qualité Externe

Présentation de 4 trousse

- Commercialisées en France



BIONEXIA®
H. pylori Ag



RIDASCREEN®
Helicobacter



RIDA® QUICK
Helicobacter



H. pylori Ag
MonlabTest®

-> détection qualitative des antigènes spécifiques à *Helicobacter pylori* dans les selles

Présentation de 3 trousse

- Commercialisées en France

1 



BIONEXIA®
H. pylori Ag

2 



RIDASCREEN®
Helicobacter

3 



RIDA® QUICK
Helicobacter

4 



H. pylori Ag
MonlabTest®

-> détection qualitative des antigènes spécifiques à *Helicobacter pylori* dans les selles

Comparatif des 3 tests

	Ridascreen	Ridaquick	MonlabTest
Format	<p>Plaque ELISA</p>  <p>Ajout de réactifs</p> 	<p>Préparation du mélange réactionnel : selles + 2 réactifs</p>  <p>Cassette</p> 	<p>Tube de recueil pour dilution et dépôt</p>  <p>Cassette</p> 

Comparatif des 3 tests

	Ridascreen	Ridaquick	MonlabTest
Format	<p>Plaque ELISA</p>  <p>Ajout de réactifs</p> 	<p>Préparation du mélange réactionnel : selles + 2 réactifs</p>  <p>Cassette</p> 	<p>Tube de recueil pour dilution et dépôt</p>  <p>Cassette</p> 
Durée	2h (dont 1h30 d'incubation)	20 min (dont 5 min d'incubation et 15 min de migration)	10 min

Comparatif des 3 tests

	Ridascreen	Ridaquick	MonlabTest
Format	<p>Plaque ELISA</p>  <p>Ajout de réactifs</p> 	<p>Préparation du mélange réactionnel : selles + 2 réactifs</p>  <p>Cassette</p> 	<p>Tube de recueil pour dilution et dépôt</p>  <p>Cassette</p> 
Durée	2h (dont 1h30 d'incubation)	20 min (dont 5 min d'incubation et 15 min de migration)	10 min
Lecture	Lecteur de plaque	À l'œil nu	À l'œil nu

Comparatif des 3 tests

	Ridascreen	Ridaquick	MonlabTest
Format	<p>Plaque ELISA</p>  <p>Ajout de réactifs</p> 	<p>Préparation du mélange réactionnel : selles + 2 réactifs</p>  <p>Cassette</p> 	<p>Tube de recueil pour dilution et dépôt</p>  <p>Cassette</p> 
Durée	2h (dont 1h30 d'incubation)	20 min (dont 5 min d'incubation et 15 min de migration)	10 min
Lecture	Lecteur de plaque	À l'œil nu	À l'œil nu
Coût	2,5€ HT / test	7€ HT / test	Non connu

Evaluation des 3 troussees au CNR



- **Matériel testé**
 - **131 selles dont le statut *H. pylori* est connu à partir des biopsies gastriques**

- **Comparaison des 3 tests par rapport aux techniques d'analyse du CNR sur biopsies gastriques (culture + PCR maison)**

- **Détermination des performances**

Performance des 3 trousses

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Ridascreen	92,1	100	100	96,9
Ridaquick	89,5	100	100	95,9
MonlabTest	86,8	98,9	89,2	94,7

- Meilleure sensibilité pour le test ELISA Ridascreen

Performance des 3 trousseaux

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Ridascreen	92,1	100	100	96,9
Ridaquick	89,5	100	100	95,9
MonlabTest	86,8	98,9	89,2	94,7

- Meilleure sensibilité pour le test ELISA Ridascreen
- Bonne, voir excellente spécificité des 3 tests

Performance des 3 trousse

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Ridascreen	92,1	100	100	96,9
Ridaquick	89,5	100	100	95,9
MonlabTest	86,8	98,9	89,2	94,7

- Meilleure sensibilité pour le test ELISA Ridascreen
- Bonne, voir excellente spécificité des 3 tests
- VPP excellente sauf pour le test MonlabTest (<90%)
- VPN comprise entre 94 et 97% pour les 3 tests

Performance des 3 trousse



	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Ridascreen	92,1	100	100	96,9
Ridaquick	89,5	100	100	95,9
MonlabTest	86,8	98,9	89,2	94,7

- Meilleure sensibilité pour le test ELISA Ridascreen
 - Bonne, voir excellente spécificité des 3 tests
 - VPP excellente sauf pour le test MonlabTest (<90%)
 - VPN comprise entre 94 et 97% pour les 3 tests
 - Le test Ridascreen a les meilleures performances, suivi par le test Ridaquick
- **Le CNRCH utilise en routine le kit immunochromatographique Ridaquick de R-Biopharm**

Contrôle Qualité Externe - Ag



- LabQuality *Helicobacter pylori*, détection d'antigènes dans les selles
 - 4 CQE par an
 - 3 selles lyophilisées

LABQUALITY

Contrôle Qualité Externe - Ag

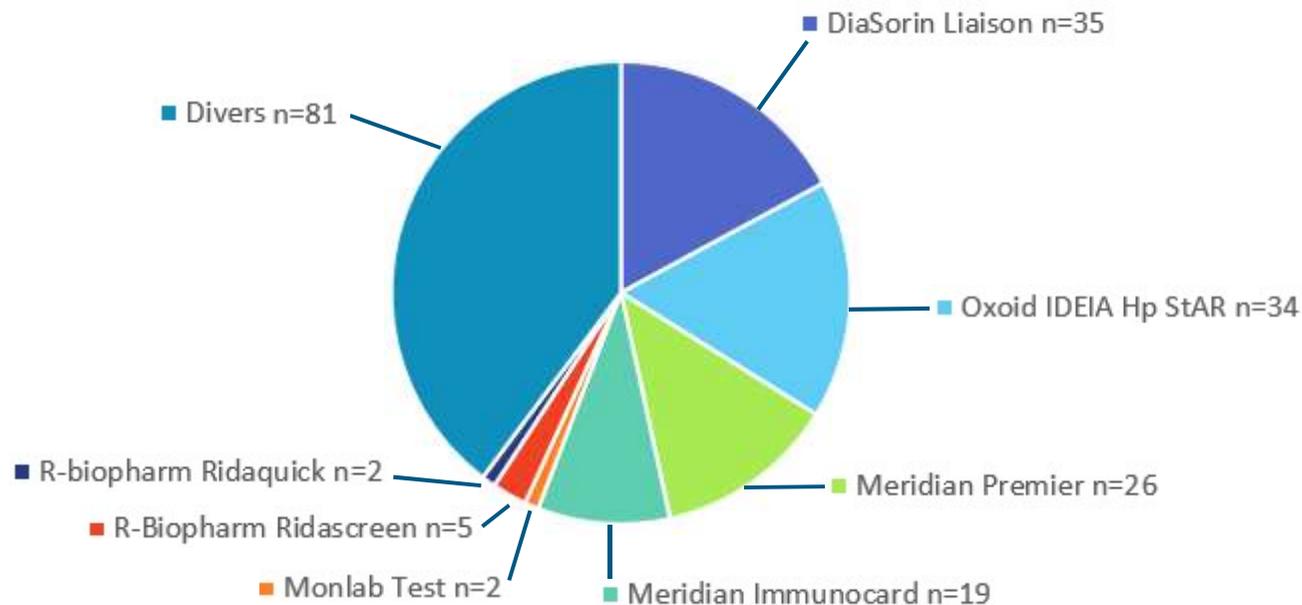
- LabQuality *Helicobacter pylori*, détection d'antigènes dans les selles

- 4 CQE par an
- 3 selles lyophilisées

LABQUALITY

- CQE 2021 trimestre 1

- 207 participants, 27 pays



Contrôle Qualité Externe - Ag

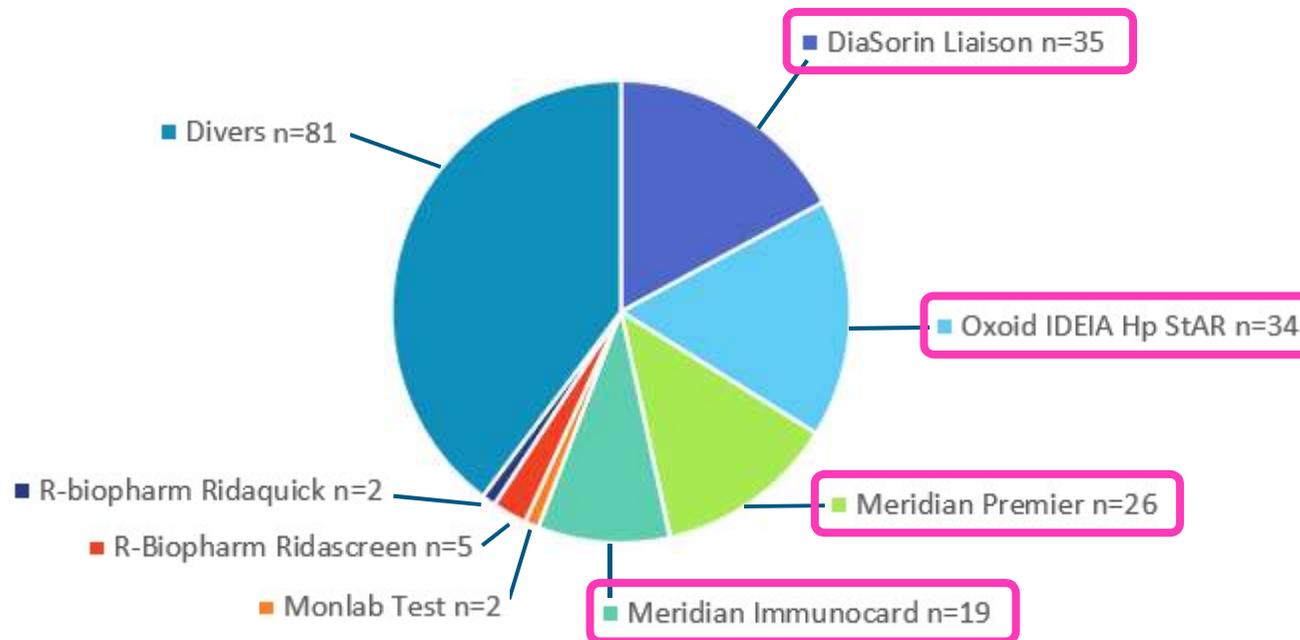
- LabQuality *Helicobacter pylori*, détection d'antigènes dans les selles

- 4 CQE par an
- 3 selles lyophilisées

LABQUALITY

- CQE 2021 trimestre 1

- 207 participants, 27 pays



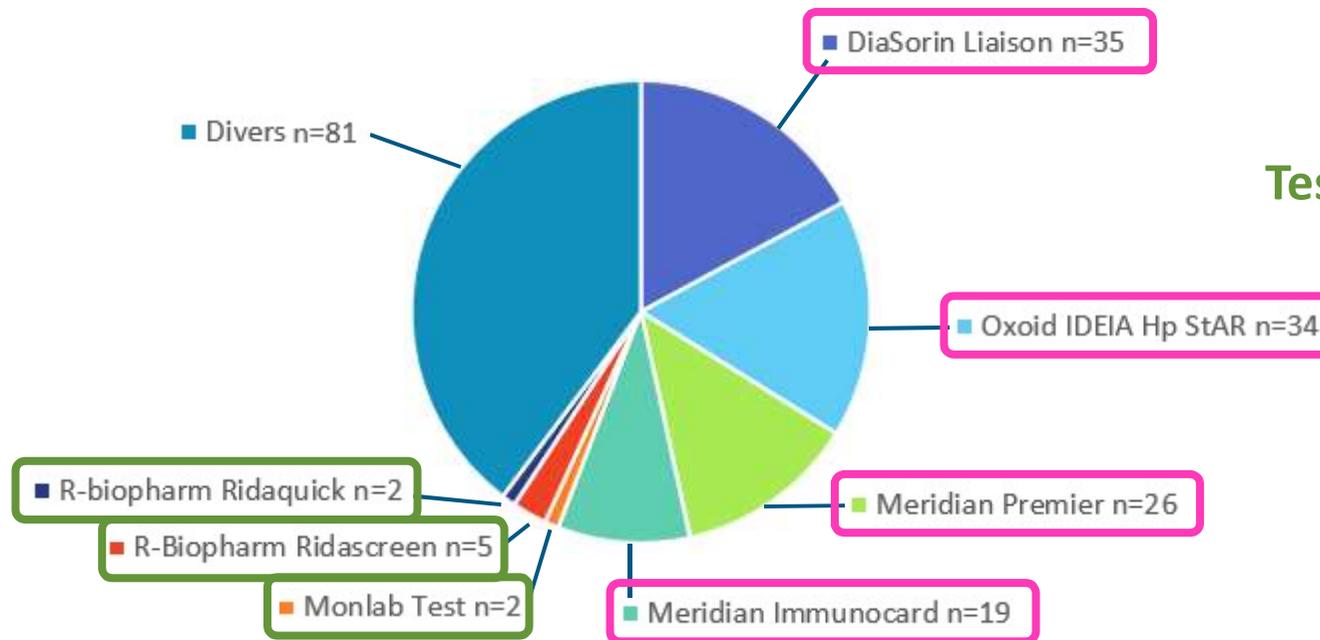
Les plus utilisés

Contrôle Qualité Externe - Ag

- LabQuality *Helicobacter pylori*, détection d'antigènes dans les selles
 - 4 CQE par an
 - 3 selles lyophilisées

LABQUALITY

- CQE 2021 trimestre 1
 - 207 participants, 27 pays



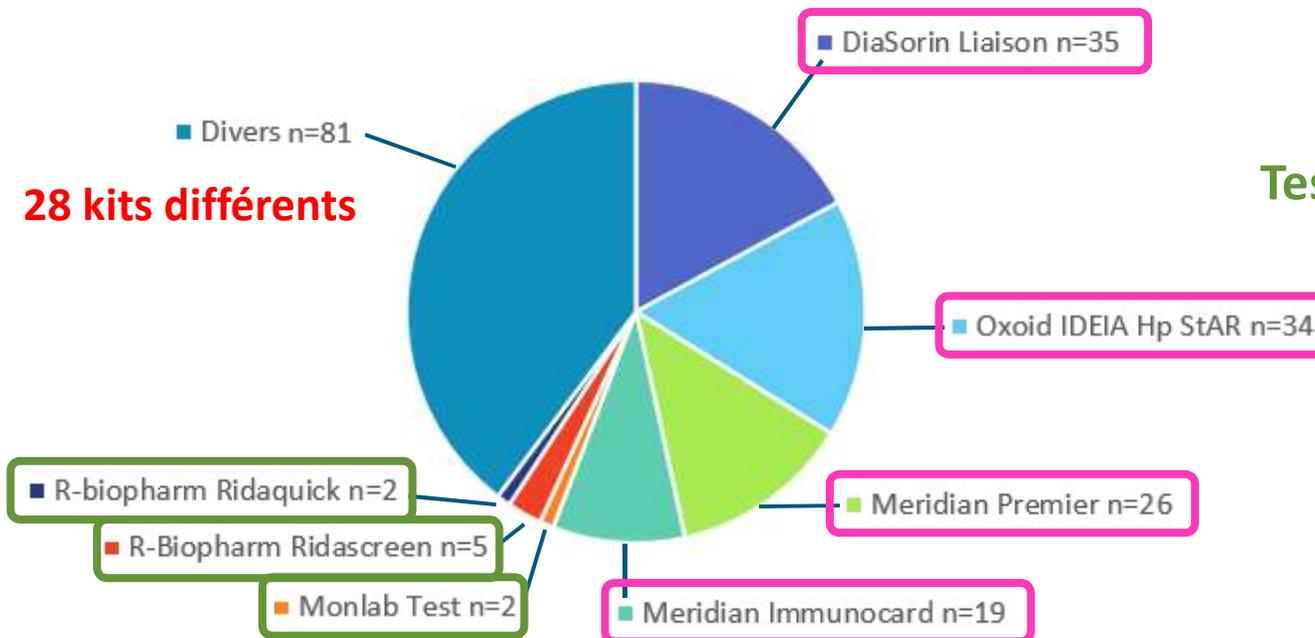
Les plus utilisés
Testés par le CNRCH

Contrôle Qualité Externe - Ag

- LabQuality *Helicobacter pylori*, détection d'antigènes dans les selles
 - 4 CQE par an
 - 3 selles lyophilisées

LABQUALITY

- CQE 2021 trimestre 1
 - 207 participants, 27 pays



Les plus utilisés
Testés par le CNRCH

Contrôle Qualité Externe - Ag

■ Résultats CQE 2021 trimestre 1

207 participants	CNRCH
97,6% correct	100% correct

Faux négatifs n=3/207+

- 1 > Divers**
- 1 > Meridian Premier**
- 1 > Oxoid IDEIA Hp StAR**

Faux positifs n=12/414neg

- 6 > Divers**
- 2 > Oxoid IDEIA Hp StAR**
- 2 > Meridian Premier**
- 1 > Meridian ImmunoCard**
- 1 > DiaSorin Liaison**

Conclusion (1)



- Barrettes Eurogentec prêtes à l'emploi
 - facilité d'utilisation
 - faible coût
 - accessible à tout le monde ! mais uniquement sur instruments ROCHE !

- Trousses commerciales de PCR en temps réel pour la détection de *H. pylori* dans les biopsies gastriques
 - facile à mettre en place dans un plateau de biologie moléculaire
 - excellentes performances
 - coût pouvant être élevé (>15€ le test pour Amplidiag)

- CQE disponible
 - QCMD *Helicobacter pylori*

Conclusion (2)

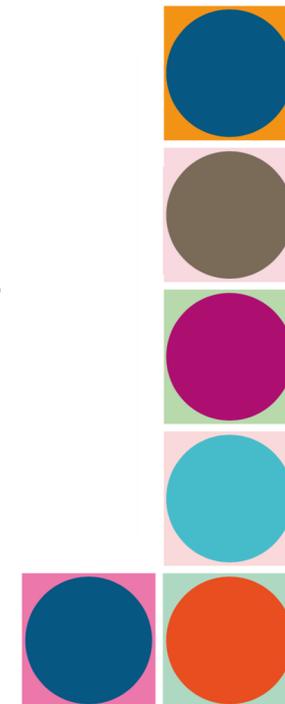


- Tests pour la détection de *H. pylori* dans les selles
 - non invasifs, rapides et très simples à utiliser pour les tests immunochromatographiques (ICT)
 - performances correctes (~90% de sensibilité)
 - pas d'information sur la résistance à la clarithromycine

- CQE disponible
 - LabQuality *Helicobacter pylori* : detection d'antigènes dans les selles

Perspectives

- Possibilité pour d'autres laboratoires de commander et utiliser les barrettes Eurogentec
- PCR dans les selles
 - Amplidiag de Mobidiag évalué dans les selles par le CHU de Poitiers (Pichon *et al.*, JCM 2020)
Se 96,3% Sp 98,7%
 - évaluation en cours au CNR
- Remboursement de la recherche *H. pylori* par PCR dans les biopsies ou par antigènes dans les selles
 - en pourparler mais pas à l'ordre du jour à court terme





Merci pour votre attention



université
de **BORDEAUX**

INSERM U1053 & CNRCH

