



**PCR *Helicobacter pylori* sur automates BD
MAX et InGenius à l'aide des réactifs
RIDA® GENE *Helicobacter pylori* :
automatisation et performances**

Lucie BENEJAT-BRUHL *et al.*

Centre National de Reference des Campylobacters & Helicobacters
CHU de Bordeaux (P. Lehours)

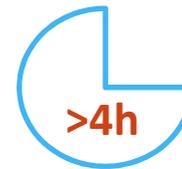


Détection moléculaire de *H. pylori* au CNRCH



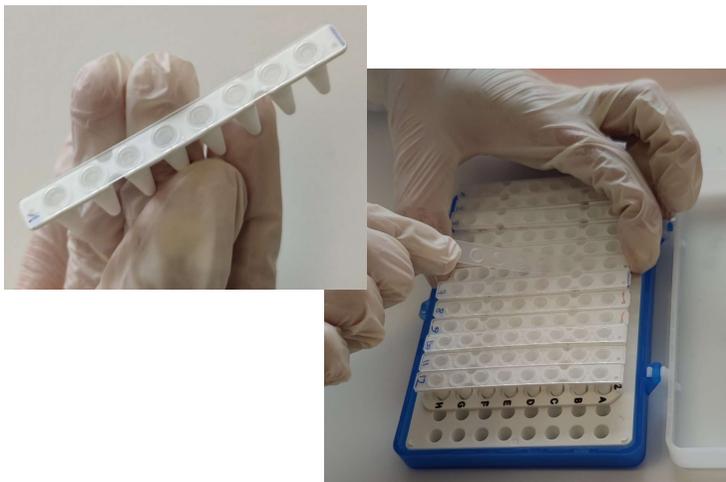
→ Extraction d'ADN sur biopsies gastriques broyées et digérées

- › MagNA Pure 96, Roche Diagnostics



→ PCR

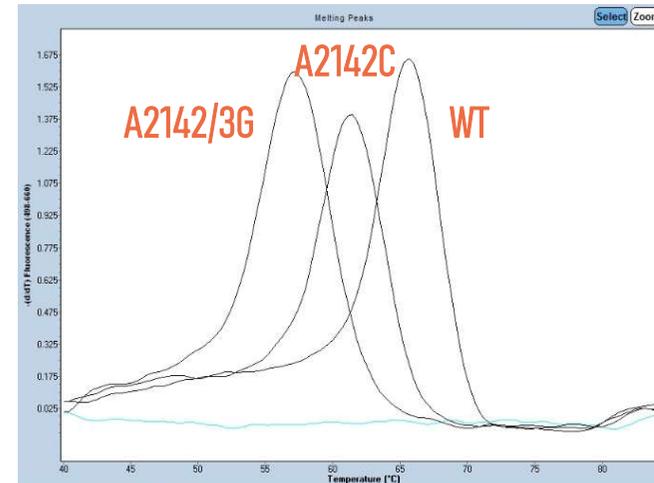
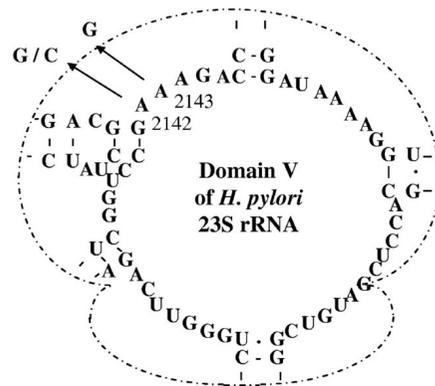
- › synthèse par Eurogentec de barrettes prêtes à l'emploi* (ajouter 1µl ADN)



*Bénéjat *et al.*, Helicobacter 2021

Détection moléculaire de *H. pylori* au CNRCH

- PCR maison* en format FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)
 - › détection de *H. pylori* : gène cible *ADNr 23S*
 - › détermination de la résistance à la clarithromycine : 3 mutations les plus connues comme étant associées à cette résistance



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

- PCR de contrôle d'extraction
 - › amplification du gène de ménage eucaryote *betaglobin*

Trousse commerciale r-biopharm



→ R-biopharm – gamme RIDAGENE : trousse de biologie moléculaire

RIDA[®]GENE *Helicobacter pylori*



› *Helicobacter*. 2018 Oct;23(5):e12512. doi: 10.1111/hel.12512. Epub 2018 Aug 28.

Real-time PCR for *Helicobacter pylori* diagnosis. The best tools available

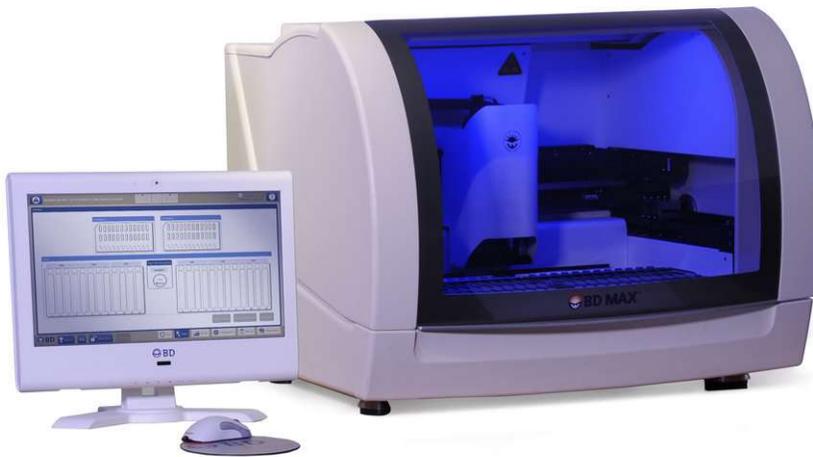
Lucie Bénéjat^{1 2}, Astrid Ducournau^{1 2}, Philippe Lehours^{1 2}, Francis Mégraud^{1 2}

Se 98,7% et Sp 100%

- **PCR en temps réel (format Taqman)**
 - › détection de *Helicobacter pylori*
 - › détermination de la résistance aux macrolides (sans connaître le génotype)

Systemes intégres : automates de biologie moléculaire

→ Système BD MAX
de Becton Dickinson



→ Système ELITE InGenius
de ELITechGroup



> Extraction, PCR et interprétation des résultats combinées

Tests des réactifs r-biopharm sur les 2 automates

Peut-on associer les réactifs r-biopharm avec l'automate BD MAX et/ou l'automate InGenius pour détecter *H. pylori* dans les biopsies gastriques ?

- › Faisabilité
- › Performances

Matériel disponible au CNR

→ Biopsies gastriques broyées

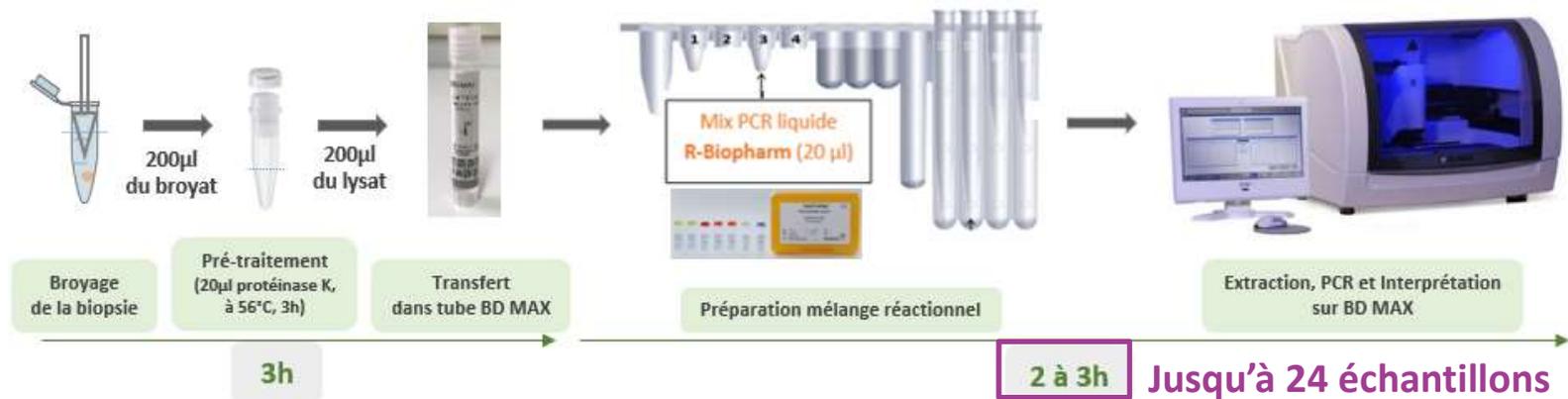
- › résultats de culture et PCR maison connus
- › BD MAX : évaluation en prospectif (2021)
 - 210 broyats issus de la routine
- › InGenius : évaluation en rétrospectif (2022)
 - 200 broyats issus du protocole PHARE* (2018) conservés à -80°C



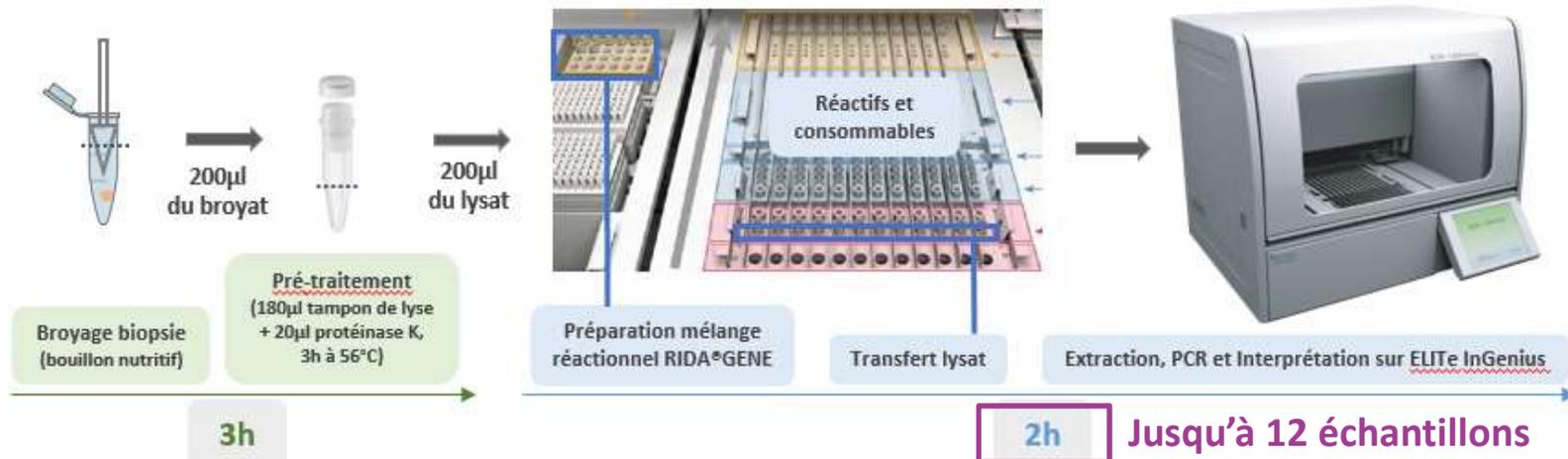
*Mégraud *et al.*, Helicobacter 2021

Déroulement d'une série

→ BD MAX



→ ELITE InGenius



Mises au point

→ Pré-traitement des biopsies

- › **BD MAX** : pas de tampon de lyse (ATL, Qiagen) car inhibition
- › **InGenius** : même pré-traitement qu'au CNR

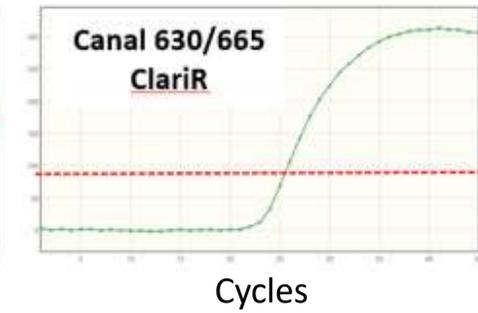
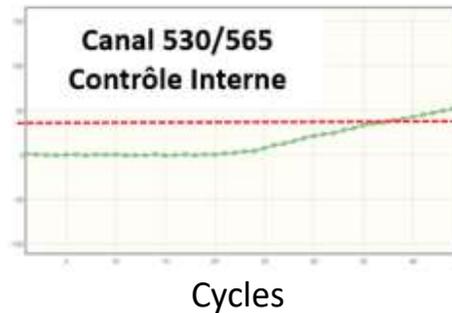
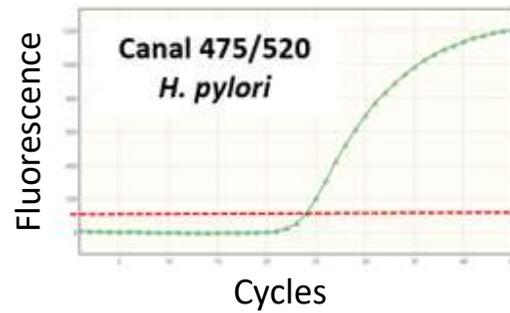
→ Adaptations

- › **BD MAX** : problème d'amplification du contrôle interne
 - volume doublé dans mélange réactionnel
 - diminution du seuil de détection
 - réduction du volume de prise d'essai (300 µl au lieu de 750 µl)
- › **InGenius** : aucune adaptation nécessaire

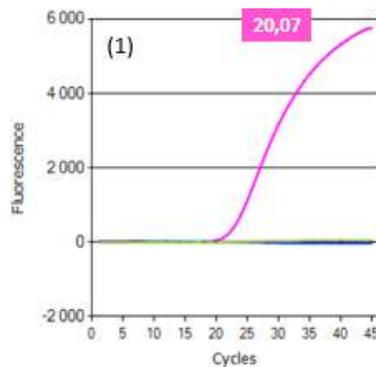
Adaptation réussie

→ BD MAX

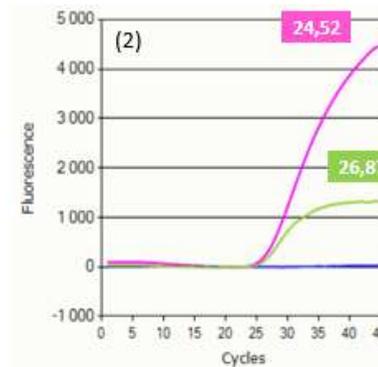
H. pylori positif
clarithromycine
résistant



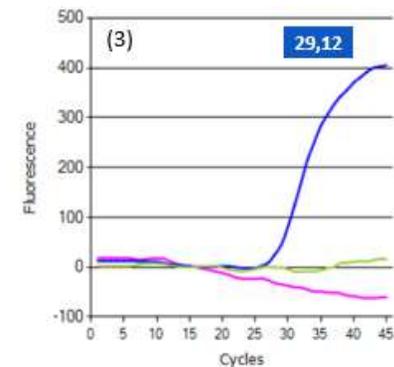
→ ELITe InGenius



H. pylori positif
clarithromycine
sensible



H. pylori positif
clarithromycine
résistant



H. pylori négatif

rose : *H. pylori* / bleu : contrôle Interne / vert : résistance à la clarithromycine

Résultats

→ BD MAX

PCR CNRCH	PCR BD MAX	Nb.
Négatif	Négatif	108
Négatif	WT	1
Négatif	Muté	1
WT	WT	65
A2142-3G	Muté	28
WT+A2142-3G	Muté	6
WT+A2142-3G	WT	1
TOTAL		210

→ ELITe InGenius

PCR CNRCH	PCR InGenius	Nb.
Négatif	Négatif	98
Négatif	WT	2
WT	WT	65
A2142-3G	Muté	30
WT+A2142-3G	Muté	5
TOTAL		200

Concordances statut *H. pylori*

Résultats

→ BD MAX

PCR CNRCH	PCR BD MAX	Nb.
Négatif	Négatif	108
Négatif	WT	1
Négatif	Muté	1
WT	WT	65
A2142-3G	Muté	28
WT+A2142-3G	Muté	6
WT+A2142-3G	WT	1
TOTAL		210

→ ELITe InGenius

PCR CNRCH	PCR InGenius	Nb.
Négatif	Négatif	98
Négatif	WT	2
WT	WT	65
A2142-3G	Muté	30
WT+A2142-3G	Muté	5
TOTAL		200

Concordances statut résistance clarithromycine

Résultats

→ BD MAX

PCR CNRCH	PCR BD MAX	Nb.
Négatif	Négatif	108
Négatif	WT	1
Négatif	Muté	1
WT	WT	65
A2142-3G	Muté	28
WT+A2142-3G	Muté	6
WT+A2142-3G	WT	1
TOTAL		210

Discordances

→ ELITE InGenius

PCR CNRCH	PCR InGenius	Nb.
Négatif	Négatif	98
Négatif	WT	2
WT	WT	65
A2142-3G	Muté	30
WT+A2142-3G	Muté	5
TOTAL		200

Pas d'antécédent d'infection à *H. pylori*

Antécédent d'infection à *H. pylori* avec arrêt précoce du traitement
> **considéré comme vrai positif**

H. pylori clari R retrouvé en culture

Performances

→ BD MAX

Performances de détection* (%)		
	de <i>H. pylori</i>	du génotype <i>ADNr 23S</i>
Sensibilité	100	97,1
Spécificité	99,1	100
VPN	100	98,5
VPP	99,0	100

→ ELITe InGenius

Performances de détection* (%)		
	de <i>H. pylori</i>	du génotype <i>ADNr 23S</i>
Sensibilité	100	100
Spécificité	98,0	100
VPN	100	100
VPP	98,0	100

> Excellentes performances sur les 2 automates

*PCR du CNRCH comme référence.

Tests sur selles

→ BD MAX

Test sur 6 selles positives
-pas de détection > inhibiteur de PCR

→ ELITE InGenius

Tests sur 30 selles négatives et 25 selles positives (dont 6 clari R)

Performances de détection* (%)		
	de <i>H. pylori</i>	du génotype <i>ADNr 23S</i>
Sensibilité	72	66,7
Spécificité	100	100
VPN	81,1	85,7
VPP	100	100

> Détection possible sur InGenius mais performances moyennes

Coût

→ PCR RIDAGENE sur BD MAX

- › Prix négocié à prix public : **20-35€** par analyse (20€ BD + 10€ r-biopharm)

→ PCR RIDAGENE sur InGenius

- › Prix CHU : **17€** par analyse (7€ Elitech + 10€ r-biopharm)

→ PCR CNRCH en barrettes Eurogentec

- › Prix négocié : **4,5€** par analyse (extraction comprise)

> Remboursement de la PCR à venir : B100 (27 euros) ?

Conclusion

→ Association entre systèmes automatisés BD MAX / InGenius et r-biopharm réussie

- › compatibilité des instruments et réactifs
- › optimisation des protocoles
- › excellentes performances

› Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2022 Apr 22.
doi: 10.1007/s10096-022-04444-1. Online ahead of print.

Automation of RIDA® GENE Helicobacter pylori PCR on the BD MAX™ System

Lucie Bénéjat^{1 2}, Alban Giese², Zoé Lescaudron²,
Julien Bonnac², Astrid Ducournau^{1 2}, Emilie Bessède^{1 2},
Philippe Lehours^{3 4 5}

→ Facilité d'utilisation et gain de temps

- › extraction et PCR combinées
- › logiciel d'interprétation simple
- › limitation des contaminations

→ Non conseillé sur selles

- › impossible sur BD MAX
- › performances moyennes sur InGenius

