

Adaptation de la PCR *H. pylori* r-biopharm sur automate BD Max : retour d'expérience nantaise

Laboratoire de Bactériologie et Contrôles Microbiologiques

Dr Sophie Anne Gibaud, CHU Nantes

Recherche de *H. pylori* à partir de biopsies gastriques

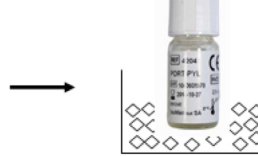
Laboratoire de Bactériologie et Contrôles Microbiologiques – CHU Nantes

2 biopsies antrales
+
2 biopsies fundiques

①



Biopsies gastriques

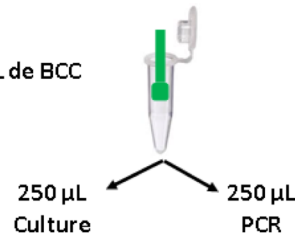


Portagerm Pylori

Maintenir le Portagerm à +4 °C jusqu'au broyage.

②

Biopsies + 500 µL de BCC



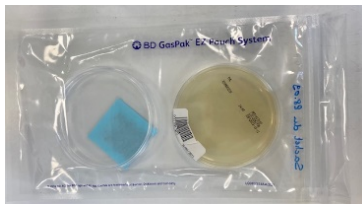
Transférer toutes les biopsies dans un microtube stérile contenant 500 µL de bouillon BBC, puis broyer les biopsies à l'aide d'un petit potter

Congélation IMMEDIATE de 250 µL du broyat à - 80 °C pour culture

PCR immédiate ou Congélation de 250 µL du broyat à - 20 °C si PCR différée

④

Mise en culture



250 µL (grosse goutte) au centre de la gélose (Pylori Agar BIOMERIEUX)
Incubation immédiate (10 j)
microaérobie (2 boîtes par sachet)
Lecture toutes les 48H

③

PCR sur BD MAX + kit RIDA®GENE *H. pylori*



Ajouter 500 µL de BCC et vortexer, centrifuger <1 mn à 2000 rpm, Prélever 200 µL du surnageant pour la PCR

- **Prise en charge des biopsies et PCR immédiate si réception avant 16H**
- **Délai de réponse de ≤ 24H**



kit RIDAGEN HP (R-Biopharm)

RIDAGEN HP



Le kit **RIDA®GENE H. pylori** contient :

- | | |
|---|----------------------|
| - Les tubes Reaction Mix (bouchon jaune) | à conserver à - 20°C |
| - Le tube Enzyme Mix (bouchon rouge) | à conserver à - 20°C |
| - Les tubes Contrôle Interne (bouchon marron) | à conserver à - 20°C |
| - Le tube Contrôle Pos | à conserver à - 20°C |
| - Le tube Contrôle Neg | à conserver à - 20°C |

Master Mix

Volumes 1 réaction

Volumes 20 réactions

Réaction Mix (tube bouchon **jaune**)
Enzyme Mix (tube bouchon **rouge**)
Contrôle Interne (tube bouchon **marron**)
Total

19,3 µL
0,7 µL
2,0 µL
22,0 µL/tube

386 µL
14 µL
40 µL

- Préparation de mix prêts à l'emploi, aliquotés et conservés à – 20°C, pour une utilisation quotidienne sur le **BDMAX** (Cf. validation stabilité des mix).

- Passage d'un contrôle pos et contrôle neg à chaque nouvelle préparation de mix et à chaque changement de lot du kit d'extraction BD

- 1 CQE / an (QCMD *Helicobacter pylori* - EQA Programme QAB164190)

ETUDE DE STABILITE DES MIX

- **Evaluation de la stabilité des mix**

Préparation de 10 microtubes contenant 22 µL de mix (tubes fournis dans le kit d'extraction DNA-1 de BD), conservés à – 20 °C et testés tous les 15 jours à l'aide du Témoin positif du kit.

Résultat de l'évaluation de la stabilité des mix HP du kit RIDAGEN HP

Evaluation de la stabilité des mix HP du kit RIDAGEN HP								
Préparation le 7/12/2022	date du test		résultat t HP	Ct HP	résultat Clari	Ct Clari	résultat CI	Ct CI
J0	07/12/2022	T pos	pos	26,5	pos	26,0	pos	23,6
J 8	15/12/2022	T pos	pos	28,0	pos	27,4	pos	25,0
J 16	23/12/2022	T pos	pos	26,5	pos	26	pos	24,3
J 27	03/01/2023	T pos	pos	27,4	pos	26,4	pos	24,7
J 42	18/01/2023	T pos	pos	27,1	pos	26,3	pos	24,4
J 49	25/01/2023	T pos	pos	28,4	pos	26,6	pos	24,9
J 55	31/01/2023	T pos	pos	28,1	pos	27,5	pos	24,7
J 68	13/02/2023	T pos	pos	27,3	pos	26,5	pos	24,6
J 85	01/03/2023	T pos	pos	26,3	pos	25,9	pos	24,1



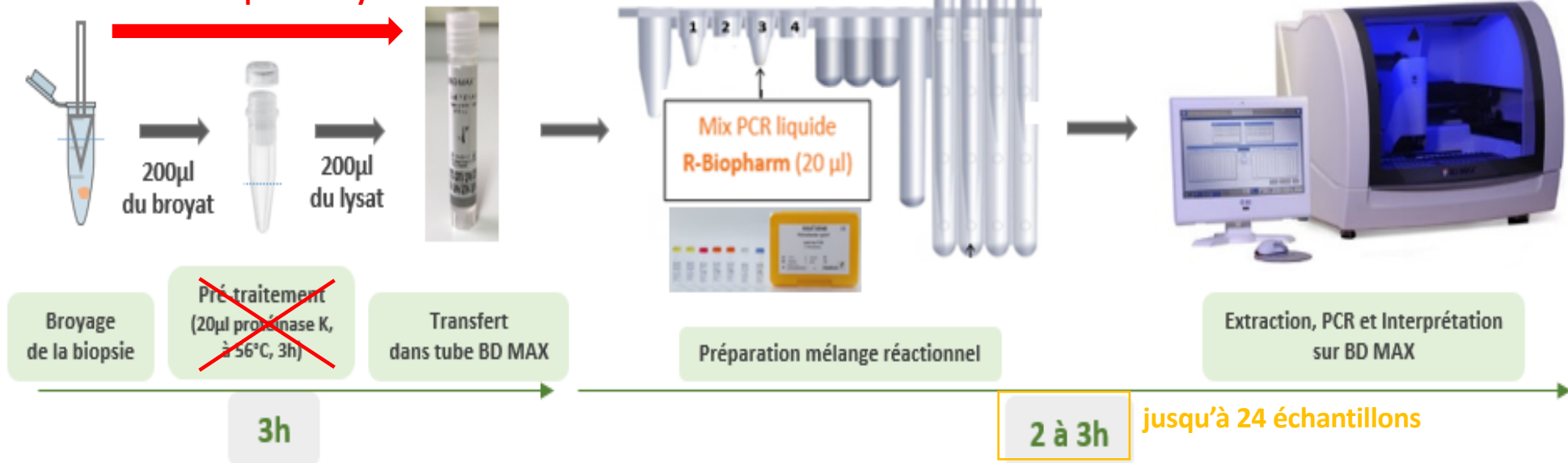
Les résultats sont excellents et comparables : bonne reproductibilité et stabilité dans le temps, même après presque 3 mois de congélation. Nous préparons à chaque fois 20 mix, qui sont largement utilisés dans les 3 mois, compte-tenu de notre activité.

PCR

- 500µl H₂O phy au broyat
- Vortexer et centrifugation 1 mn 2000 rpm
- Prélever 200µl du broyat dilué

Evaluation par le CNR du kit RIDAGEN HP sur le BD MAX

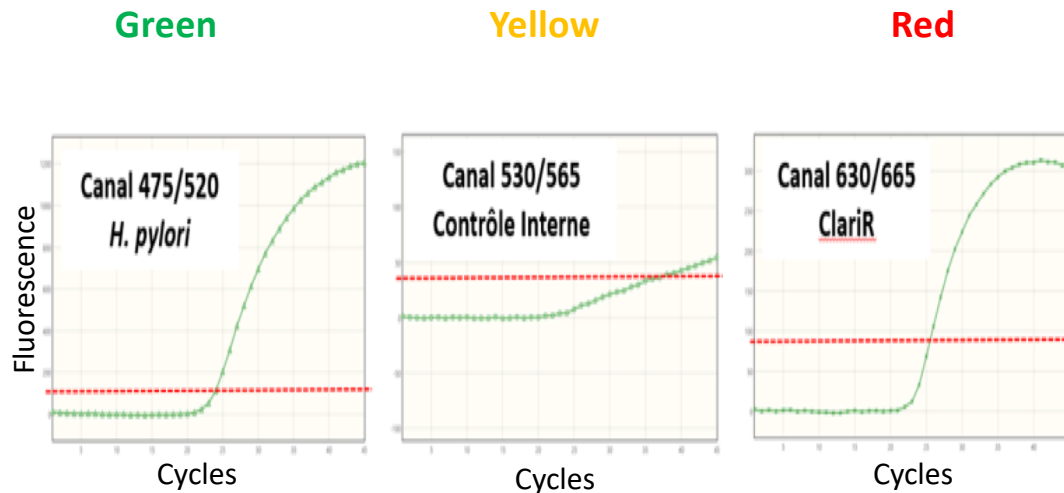
BD MAX Exk DNA-1
(Réf. 442818)



Bien broyer les biopsies et centrifuger brièvement pour pouvoir pipeter le bouillon sans aspirer les restes fibreux de biopsies.

- dénaturation à 98°C-60 s (1 cycle)
- amplification-détection :
98°C-15 s
68°C-32 s (45 cycles)

H. pylori positif clarithromycine résistant



Performances de détection* (%)

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

> Excellentes performances

*PCR du CNRCH comme référence.

Benejat L *et al.*, Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2022

Règles d'interprétation

	Hpylori					Clari R							
Hpylori - PCR	✓	✓	✗	✗	Hpylori - PCR	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✗
CI - PCR	✓	✗	✓	✗	CI - PCR	✓	✓	✗	✗	✓	✓	✗	✗
Results	➕ POS	➕ POS	➔ NEG	⚠ UNR	Clarith - PCR	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✓	✗
					Results	➕ POS	➔ NEG	➕ POS	➔ NEG	➔ NEG	➔ NEG	⚠ UNR	⚠ UNR

CULTURE

Selon les recommandations du CNRCH (nette amélioration)

- **Ensemencement**

Immédiatement ou après congélation à **- 80°C**.

Gélose pylori (BioMérieux)

Microaérobie en sachet, pas plus de 2 boîtes par sachet

- **Incubation et lecture**

A 37° pendant 10 jours, avec lecture et changement d'atmosphère tous les 48H

GRAM pour recherche de formes cocoïdes non cultivables avant repiquage (en pièce de monnaie) ou antibiogramme.

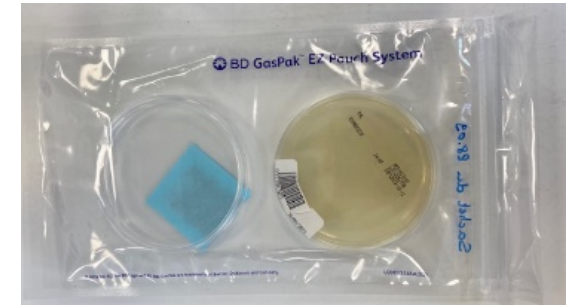
- **Identification**

Par Spectrométrie de Masse (Brücker) + /- test Urée

- **Antibiogramme**

Gélose Schaedler-vit K1 en microaérobie 2 boîtes par sachet

E-Tests : Clarithromycine, Lévofoxacine, Tétracycline, Rifampicine



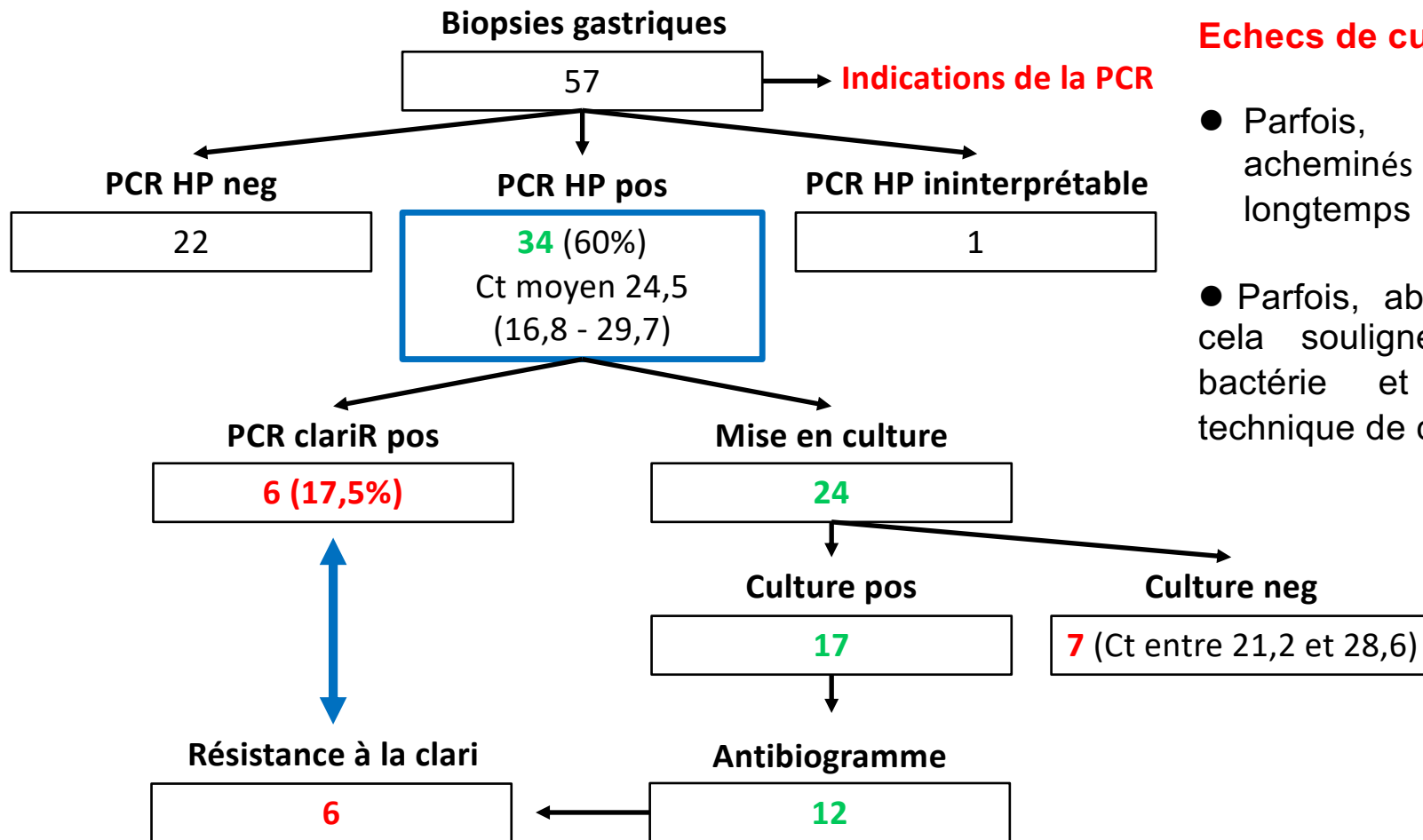
07/12/2022 (série)		T pos	pos	26,5	pos	26	pos	23,6
		T neg	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Nouveau kit DNA-1	04/01/2023	T pos	pos	25,9	pos	25,4	pos	23,4
03/03/2023 (série 2030)		T pos	pos	26,7	pos	26,1	neg	0,0
		T neg	!		!		!	0,0
Nouveau kit DNA-1	06/03/2023	T neg	!		!		!	0,0
07/03/2023 (série 2034)		T pos	pos	28,1	pos	27,0	pos	25,2
		T neg	neg	0,0	neg	0,0	pos	26,0
08/03/2023 (série 2036)		T pos	pos	27,9	pos	27,1	pos	25,3
		T neg	neg	0,0	neg	0,0	pos	25,2
24/03/20213 (série 2047)		T pos	pos	28,0	pos	27,5	pos	25,1
		T neg	neg	0,0	neg	0,0	pos	25,6
26/05/2023 (série 2100)		T pos	pos	27,7	pos	26,9	neg	0,0
		T neg	neg	0,0	neg	0,0	pos	28,1
29/06/2023 (séeie 2137)		T pos	pos	26,4	pos	25,5	neg	0,0
		T neg	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19/07/2023 (série 2155)		T pos	pos	27,9	pos	26,7	neg	0,0
		T neg	neg	0	neg	0	pos	27,8
Nouveau kit DNA-1	24/07/2023	T pos	pos	26,8	pos	26,4	pos	24,5
25/08/2023 (série 2198)		T pos	pos	28,0	pos	27,0	pos	25,0
		T neg	!		!		!	0,0

• **Contrôles des nouvelles préparations de mix**

Plusieurs préparations ont montré un résultat négatif pour le CI. Vigilance lors de la reconstitution du mélange.

BILAN D' ACTIVITE : 7 premiers mois d'activité en routine

31 janvier - 30 aout 2023



Echecs de cultures et subcultures

- Parfois, prélèvements non acheminés à +4°C, ou maintenus longtemps à T. ambiante.
- Parfois, absence de subcultures, cela souligne la fragilité de la bactérie et l'exigence de la technique de culture.

N° série - dates	N° DXLAB	Remarques	résultat HP	Ct HP	résultat Clari	Ct Clari	Résultat CI	Ct CI
2030 - 03/03/2023 2031 - 06/03/2023	230621208	1er passage 2nd passage	! pos	0,0 22,9	! neg	0,0 0,0	neg neg	0,0 0,0
2108 - 5/06/2023 2109 - 6/06/2023	231561753	1er passage 2nd passage	pos pos	22,9 23,6	! pos	 23,0	neg neg	0,0 0,0
2113 - 7/06/2023 2114 - 7/06/2023	231572599	1er passage 2nd passage	! pos	0,0 29,7	! neg	0,0 0,0	! pos	0,0 26,3
2130 - 21/06/2023 2131 - 21/06/2023	231711348	1er passage 2nd passage	! neg	0,0 0	! neg	0,0 0	! pos	0,0 25,1
2152 - 18/07/2023 2154 - 19/07/2023 2155 - 19/07/2023	231992050		! ! !	0,0 0,0 0,0	! ! !	0,0 0,0 0,0	! ! !	0,0 0,0 0,0
2362 - 24/07/2023 2164 - 25/07/2023	2332051258	1er passage 2nd passage	! neg	0,0 0,0	! neg	0,0 0,0	! pos	0,0 26,9
2169 - 28/07/2023 2170 - 28/07/2023	232071107	1er passage 2nd passage	! neg	0,0 0,0	! neg	0,0 0,0	! pos	0,0 27,2
2180 - 8/08/2023 2181 - 8/08/2023	232191400	1er passage 2nd passage	! neg	0,0 0,0	! neg	0,0 0,0	! pos	0,0 26,6
2183 - 9/08/2023 2184 - 9/08/2023	232211164	1er passage 2nd passage	! neg	0,0 0,0	! neg	0,0 0,0	! pos	0,0 24,1
2195 - 21/08/2023 2196 - 21/08/2023	232301411	1er passage 2nd passage	! neg	0,0 0,0	! neg	0,0 0,0	! pos	0,0 28,3

Echecs au 1^{er} passage (10/57)

Remarques importantes

- **Bien broyer les biopsies** et centrifuger brièvement pour pouvoir pipeter le bouillon sans aspirer les restes fibreux.
- **Les échecs au premier passage** peuvent être dû à la présence d'inhibiteurs (ADN génomique...). **En repassant le broyat dilué au 1/2, on lève l'inhibition dans 9 cas / 10** (Cf. tableau ci-dessus).

**Indications et Procédure mises en place depuis le 1 octobre 2023,
conformément aux recommandations (JO décembre 2022)**

► **Au diagnostic avec patient naïf de tout traitement d'éradication** ► **PCR en première intention**

Résultats PCR	Culture	Cotation
PCR neg	Non	N5237- B100
PCR pos WT	Non	N5237- B100
PCR pos + clari R	Oui	N5237- B100 (PCR) + N5238 - B60 (culture) +/- N5279- B70 (Antibiogramme)

► **Patient en échec de traitement d'éradication** ► **Culture en première intention**

Résultats PCR	Culture	Cotation
Non réalisée *	Oui	N5238 - B60 (culture) +/- N5279- B70 (si culture pos et antibiogramme)

* PCR en cas d'échec de la culture

BILAN ET CONCLUSION

Adaptation par le CNR
du kit RIDA® GENE H. pylori - R-biopharm
sur le BD MAX

Modifications apportées par le CHU de Nantes

- **Pré-traitement des biopsies avec lyse à la PK**
 - pas de tampon de lyse (ATL, Qiagen) car inhibition
- **Adaptations - problème d'amplification du contrôle interne**
 - volume doublé dans mélange réactionnel
 - diminution du seuil de détection
 - réduction du volume de prise d'essai (200 µl au lieu de 750 µl)
- **Durée globale de la technique**
 - 3 hrs de digestion + 2-3 hrs d'extraction/amplification sur BD MAX

- **Pré-traitement des biopsies**
 - Pas de lyse à la PK
 - Dilution du broyat contenant les 4 biopsies
- **Problème Contrôle Interne**
 - Essai en cours avec un volume doublé dans mix
- **Durée globale de la technique**
 - 2-3 hrs extraction/amplification sur BD MAX



Plus simple et plus rapide

*Lucie BENEJAT-BRUHL et al. Centre National de Reference des
Campylobacters & Helicobacters CHU de Bordeaux (P. Lehours)*

Remerciements

- Pr Philippe LEHOURS et CNR des Campylobacters et des Hélicobacters
- Pr Tamara MATYSIAK BUNKI et tous les gastroentérologues du CHU d Nantes, CH Saint Nazaire, CH Le Mans
- L'équipe du Diagnostic moléculaire du laboratoire de Bactériologie

