

LE LABORATOIRE DANS LA RÉPONSE

Progrès et insuffisances dans les
techniques et les stratégies
diagnostiques

Michel Blanchot
SPE 8 novembre 2016

Plus de 30 épidémies en 40 années

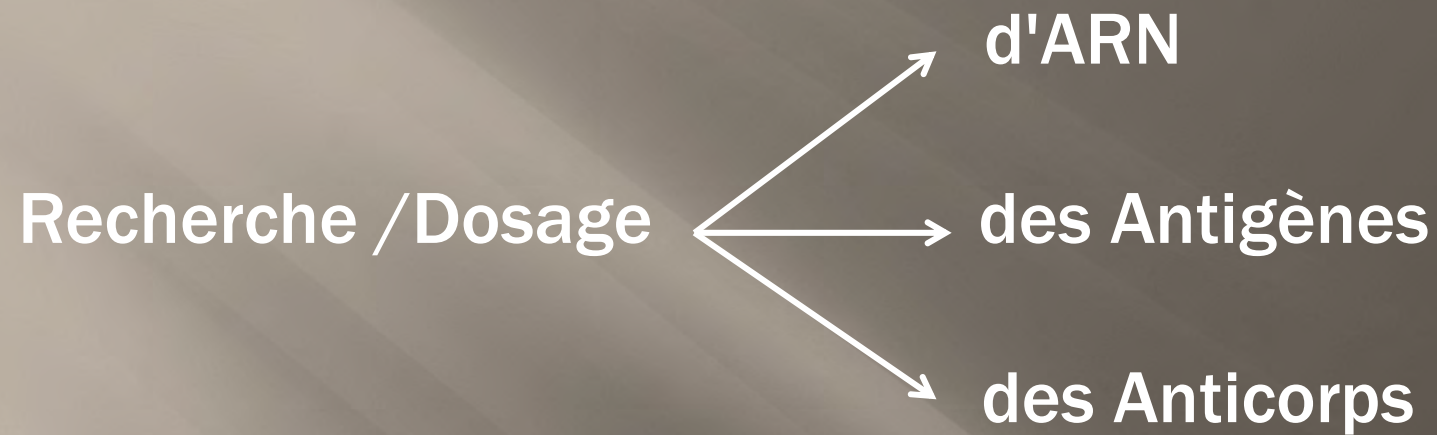
EVOLUTION DES TECHNIQUES

- ▣ **1976 YAMBUKU**
- ▣ **1989/1992 RESTON**
Asie/USA/Europe
- ▣ **1995 KIKWIT**
- ▣ **1996 GABON CIRMF**
- ▣ **2000 GULU CDC**
- ▣ **IFI IgG/IgM**
- ▣ **ELISA Ag/Ac**
- ▣ **Ag capture**
Situation épidémique
- ▣ **RT PCR / Electrophorèse (gène L)**
Qualitatif
Situation épidémique
- ▣ **Real – time RT PCR** Fluorescence
(Gènes NP)
 - Quantitatif
 - Laboratoire mobile (72 h)

Virus ARN mono caténaire

7 gènes – 9 protéines

GENE	ARN	PROTÉINES	ACIDES AMINÉS	POSITIONS
NP *	2970	Nucléoprotéine/Capside	739	Capside
VP 35	1375	Cofacteur Polymérase	340	Capside
VP 40	1504	Matrice	326	Enveloppe
GP *#	2405	Glycoprotéine	Soluble S * 364 Enveloppe 676 Soluble SS 298	Surface + Soluble * Mutations # Marburg
VP 30	1455	Nucléoprotéine mineure	288	Capside
VP 24	1633	Enveloppe	251	Enveloppe
L *	8397	ARN polymérase	2212	Capside

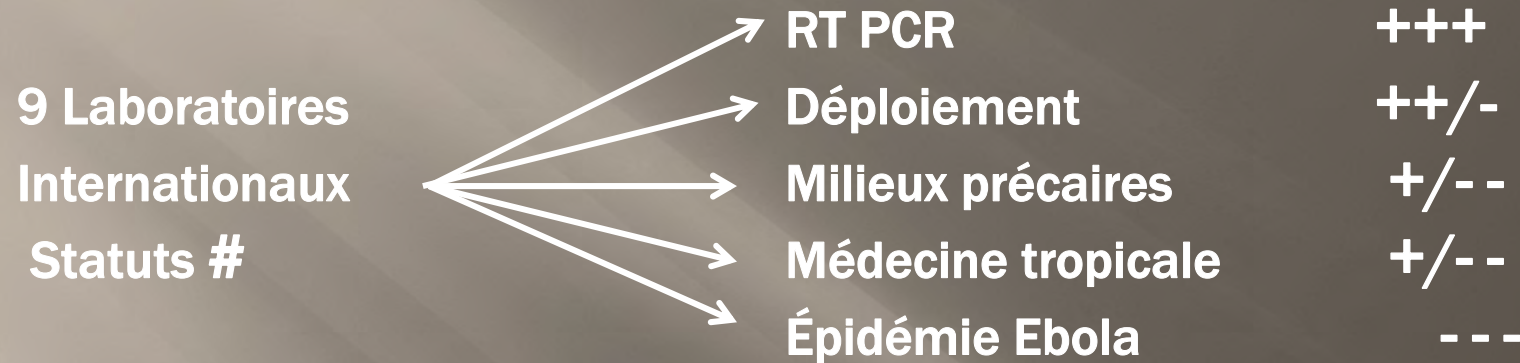


+ « *Diagnostic différentiel* » + « *Biologie Médicale* » + « *Suivis Cliniques/Thérapeutiques* »

« LES SAGES DU PASSÉ MONTRENT SEULEMENT LE CHEMIN »
Dhammapada

Maîtriser l'épidémie

Recherche d'ARN viral RT-PCR



Milieux biologiques

- Sang EDTA
- Urine
- Biopsie de peau
- Salive (écouvillon)
- Sang héparine
- Lait maternel
- Ponction cardiaque
- Écouvillon post-mortem
- 1er Test (C1)
- Test de suivi
- Test de guérison (G1)
- Test de confirmation (C2)
- Décès communautaire
- Test de guérison (G2)

URGENT

Fonctionnement

- Adossé à un CTE
Éloigné des villages et sécurisé sauf Conakry
- Bâtiment en dur (IPP,IPD,CRENS),
Tente (B Fast-B Life, CTS..),
Conteneur (K-Plan),
Structure précaire (EM Lab),
Camion (CRENS)







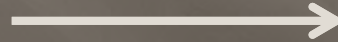
4

WHO « GOLDEN STANDARD »

« RAPID DIAGNOSTIC APPROVED FOR EMERGENCY DEPLOYMENT »
(Novembre 2014)

RealStar[®] Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 (Altona)

Techniques
Non Automatiques



Nombreux
Facteurs de Variabilité

« *En vérité, le chemin importe peu, la volonté d'arriver suffit à tout* »
Albert Camus

Les facteurs d'incertitudes

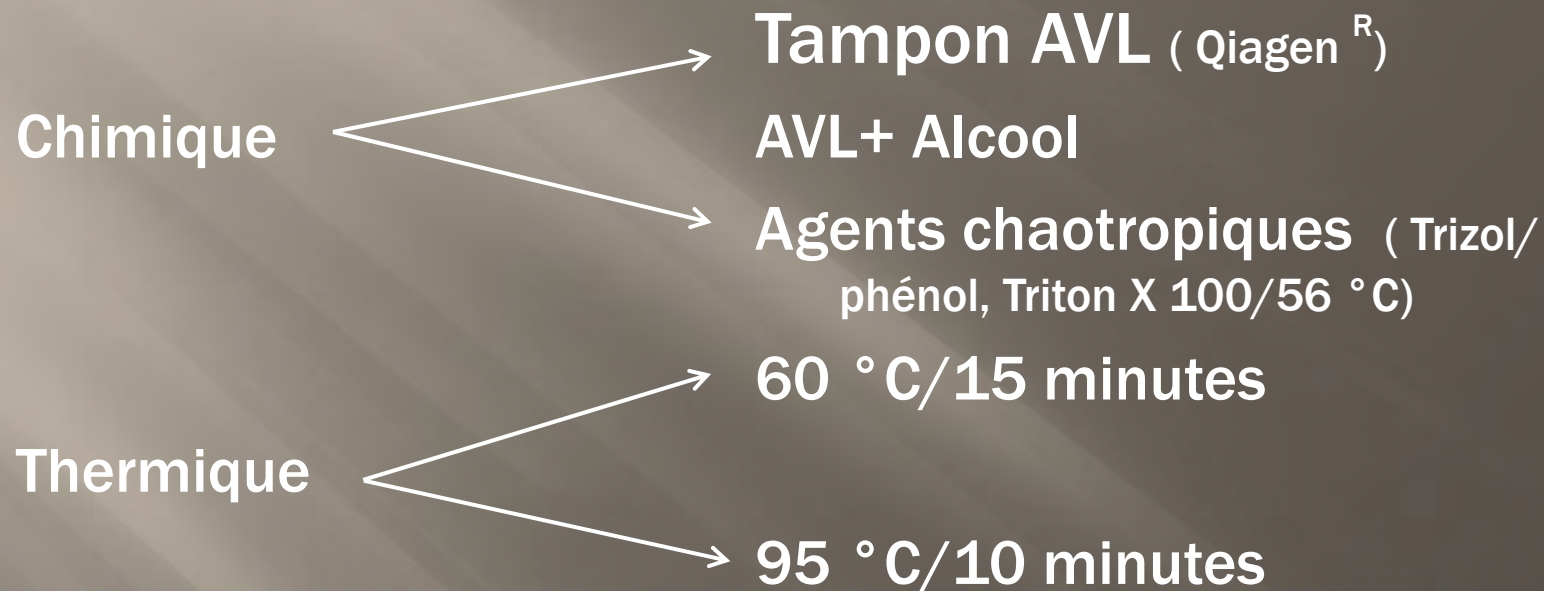
Inactivation/Dénaturation

Phase critique techniques manuelles(BSL 3)

- ▣ Risque infectieux (boîte à gants en dépression BSL 3)
- ▣ Risque de dénaturation de l'ARN (diminution de la sensibilité de la PCR)
- ▣ Prise en compte: concentration virale/dilution finale de l'ARN
- ▣ Compatibilité avec les autres examens (Recherche Ag/Ac, biochimie, bactériologie...)

**Objectif : obtention d'ARN viral non dénaturé
sans virions infectieux**

Inactivation/Dénaturation



- **ARN stable**

- **60 °C compatibles : électrolytes/urée/glucose**

- **Stabilité Ag/Ac, enzymes...**

Extraction

- ▣ Manuelle
- ▣ Automatique (Easy One, Qiacube...)
- ▣ Billes magnétiques (CDC, IPD)

Meilleure sensibilité de la RT PCR après extraction manuelle

Hybridation

Phase critique (BSL 2)

Mix /Hybridation

→ Gène ciblé : NP, VP35,VP40, L...

→ Séquence des amorces/probes

→ Amorces commerciales/"in House"

→ Nombre de cibles par tests

→ Mutation fractions génomique ciblée

→ Présence d'inhibiteurs

→ Compétition avec les contrôles

→ Risques de cross contaminations

Amplification/Détection

Thermocycleurs

- Système ouvert/fermé
- Nombre de tests simultanés
- Cycles variés
- Temps de réponse #
- Méthodes de détection : fluorescence /électrophorèse
- Résultats obtenus : CT ou positif/négatif

Smart cyclers : système ouvert et rapide

- Compatibilité avec le test utilisé
- Limite de détection (faible virémie/mutation)
- Limites de quantification/cut off

Contrôles

Contrôles internes

Contrôle Ebola positif

Contrôle positif d'extraction (fourni/
ajouté)

Contrôle négatif d'extraction

Contrôle d'inhibition/de compétition/de
spécificité (valeur des contrôles)

Contrôles externes

OMS – CDC

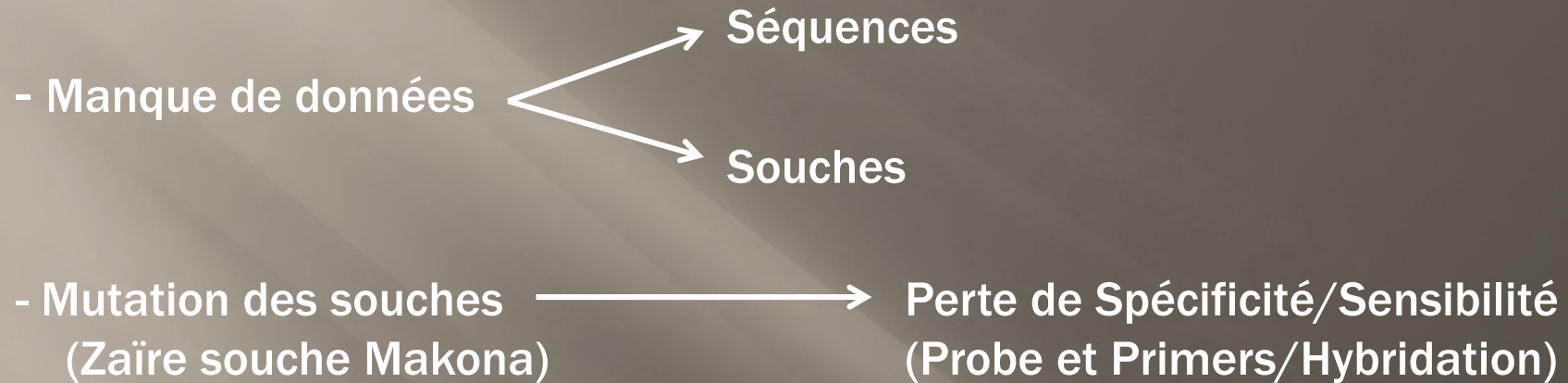
Altona Real Star
+ Smart Cycler

Faible sensibilité
FAUX NEG

Roche LightMix
+ Smart Cycler

Forte sensibilité
CT élevées

RealStar est devenu moins sensible



Compatibilité de la technique avec la plate-forme



CT N'EST PAS UN REFLET EXACT DE LA CHARGE VIRALE



PROBLÈME DE CONFIANCE

NÉGATIFS / FAUX NÉGATIFS

« La seule certitude, c'est que rien n'est certain »
Pline l'Ancien

Tests de confirmation

Test Négatif → faire une deuxième détermination

2^e Test

- Nouvelle PCR à 48/72 heures
- Autre PCR: Sonde #/« in House »,
Kit # Light Mix^R,
Plateforme # Light Cyclor^R, Rotorgen Q R,
BioFire^R....
- Dosage des Ag
- Dosage des IgG (Technique Winnipeg
Inactivation 60 °C/1 h)
- Dosage des IgM Capture +anti IgG Plus spécifique

Diagnostics différentiels

Point faible du dispositif

- Tdr paludisme +++
- IgM typhoïde +/-
- Lassa +/- -
- Dengue +/-
- Aucune capacité

Pas d'algorithme défini

Tests de suivi des patients

- Hématologie/Coagulation

Peu ou pas demandé

- Bactériologie

→ Un certain nombre de surinfections

→ Pas de demande

→ Nécessité d'une étuve réfrigérante

- Biochimie
(Réanimation)

→ Prélèvements contaminés dégradés (hémolyse, chaleur)

→ Utilisation d'automates : Piccolo^R, Istat^R, Epoc^R

→ Stérilisation des automates (eau de Javel, eau oxygénée, acide perchlorique)

Appuis à la recherche

Charges supplémentaires

- Essais thérapeutique: FAVIPRAVIR
- Suivi de la réponse immunitaire (interféron, immunoglobulines...)

L'examen de biologie médicale

Article L6 1211 – 1 code de la santé publique :
L'Examen de biologie médicale est « un acte
médical.....

.....se déroule en trois phases :

- la phase pré analytique,
- la phase analytique,
- la phase post analytique.

Les facteurs d'erreurs

La phase pré analytique

Prélèvements / Formation des préleveurs

➤ Origines

CTE, Équipes CRG (Enterrements sécurisés / communautaires),
Morgues, Équipes de suivi des contacts,
CT, CPT, CT Com....

➤ Nature

Sérum, plasmas, écouvillons...

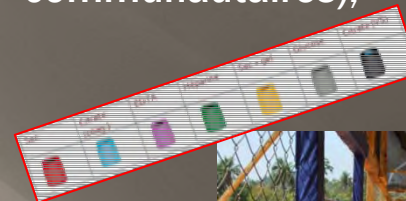
Préleveurs non formés/Prélèvements non conformes

➤ Identification /Documentation

Identification aléatoire (prélèvements multiples/même malade,
Homonymies, État civil/origine incertains ...

Documentation inadaptée /inutilisable (Formulation, langue...)

Techniques de désinfection (10' NaOCl)



Phase Post analytique

- Identification des Demandeurs / Destinataires
 - CTE/CTS/CDT – Médecins coordinateurs
 - Croix-Rouge – Points Focaux
 - Morgues – Responsable Mosquées
 - DPS/DSVCO/DCS – MCM --} Régulateur/Coordinateur OMS --} équipes d'interventions
- Hiérarchisation de la diffusion
- Définition des modalités et des supports
- Création d'un point focal laboratoire interlocuteur unique à la coordination
 - Coordinateur gestion de l'information
 - Coordonnateur National/Responsable Commission Surveillance
- Certificat de non contagion

Investigations de cas

Erreur de prélèvement :



Prélèvement sur héparine

10 patients objet d'un « suivi rapproché ».

- 2 vivants diagnostic négatif
- 3 vivantes diagnostics positifs
- 3 décédés,
- 4 disparus

« Patient de la Saint-Valentin »

Utilisation de kits et plateformes différents

1er PCR le 8 négative

PCR de contrôle le 11 positive

PCR de suivi le 14 négative

Investigations de cas

Famille KK derniers patients du CTE V3

Madame KK mari décédé d'Ebola remise en couple **avec Monsieur X** du village V1 **guéri d'Ebola** du 08/10/2014

- le 07/02/2015 se rend chez son compagnon
- le 10/02/2015 débuts de symptômes
- le 14/02/2015 se rends chez sa **filie** au village V2
- le 16/02/2015 consultations de la mère à l'hôpital V2
- le 19/02/2015 premier symptômes chez la fille
- le 23/02/2016 admissions au CTE de V3
- le 24/02/2016 **PCR négative pour la mère/2em PCR négative à 72 h**
PCR positive pour la fille
- le 24/02/2016 le **fils** venu du Libéria températures 40 °C
PCR négative/2em PCR négative 72 heures
PCR positive dans les urines de la mère
IgM typhoïde positive chez le fils

Nouvelles Techniques
Nouvelles Stratégies

Authorization of the emergency use
of in vitro diagnostics for detection of Ebola Zaire virus
under section 564(b)(1) of the Act, 21 U.S.C. § 360bbb-3(b)(1), unless the
authorization is terminated or revoked sooner.

- **RPA** (Recombinase Polymerase Amplification) Post- mortem
 - * Extraction/inactivation 95 °C/10'
 - * Purification /séparation de l'ARN sur billes magnétiques
 - * Amplification avec des amorces et des enzymes lyophilisées dans un tube réactionnel (6/10 minutes)
- **RT-PCR en temps réel automatique**
- **TDR** Tests de dépistages rapides

RT PCR automatique en temps réel

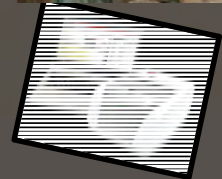
1° Manuel : zone contaminée BSL 3 (40 minutes)

- Inactivation (sang total...) tampon de lyse 20'
- Décontamination du récipient 20'



2° Automatique : zone à risque modéré BSL 2 (90 minutes)

- Extraction/Hybridation/Détection /Contrôles (sondes TaqMan...)/
Résultats automatiques



The FilmArray™ BioThreat-E test / Biofire^R ,,,,,,,,,,

Avantages

- Sécurité
 - Risque infectieux diminué
 - Cross contamination - - -
- Reproductibilité
Crédibilité
 - Opérateur +++
 - CT +++
- Simplicité
 - Fonctionnelle ++/-
 - Formation technique ++/-

Inconvénients

- Système fermé
- Risque infectieux/BSL 3
- Mobilité réduite (énergie)
- Sensibilité/Spécificité (mutations)

Objectifs ASSURED de l'OIMS
«Affordable, **Sensitive, Specific,**
User-friendly, Rapid, Equipment-free
and Deliverable »

TESTS DE DÉTECTION RAPIDE

- Recherche qualitative d'antigènes viraux
ex: EBOV, SUDV, BDBV du gène NP 40
- Immuno chromatographie par flot latérale LFI

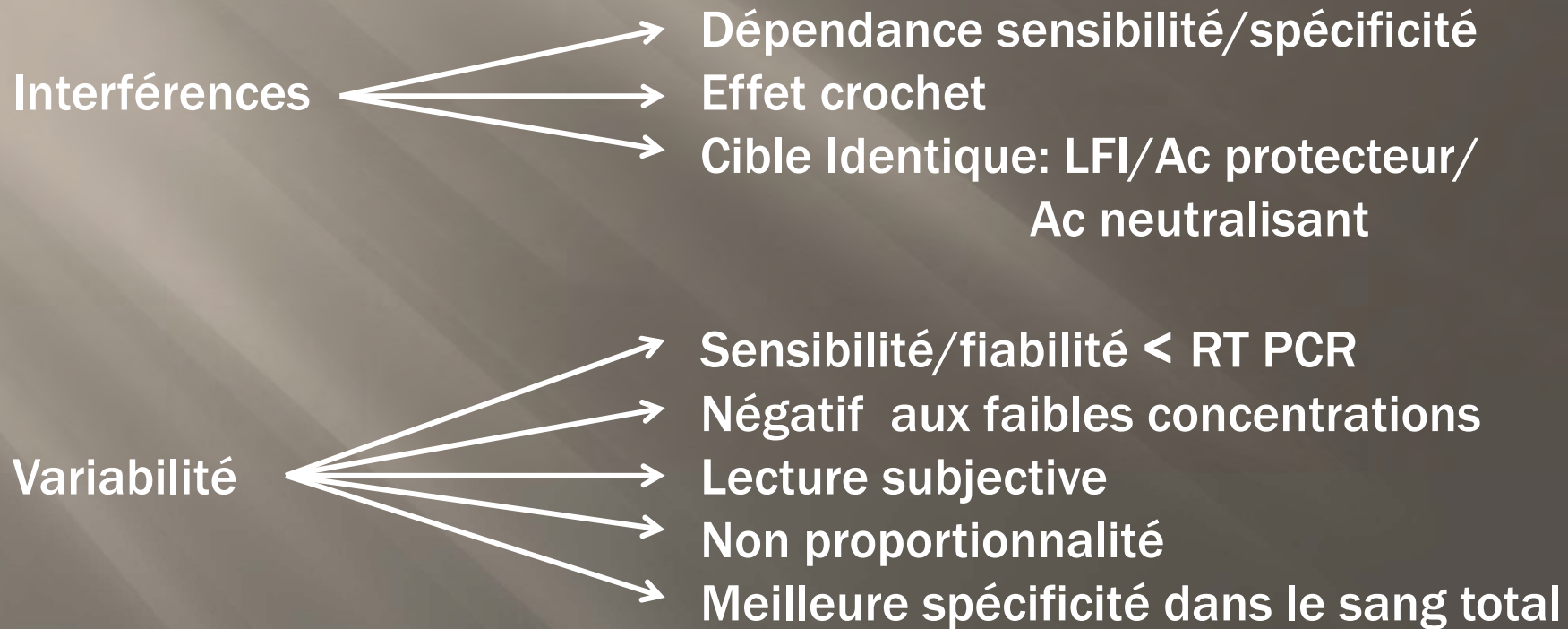
Avantages

- Affordable ++/-
- Rapid +++
- Equipment-free +/- (EPI)
- Deliverable +/-?

Inconvénients

Sensitive/ Specific

Antagonisme Sensibilité/Spécificité



User-friendly

Nombreux faux +

Nombreux faux -

- Confirmation obligatoire positifs et négatifs par RT-PCR
- Nécessité de compréhension des mécanismes (Formation obligatoire)
- Problème de confiance
- Impact socioculturel des résultats

Facilité d'emploi

Difficultés d'utilisation

Conditions d'utilisation des TDR

Recommandations du
« Implémentation Working Group Ebola » (WHO)

**- Utilisation possible
dans des situations spéciales**

- Suspicion d'épidémie zones reculées sans PCR
- Détection cas les plus sévères/
risque de transmission majeur
- Afflux massif de patients avec dépassement
des capacités de tri
- Zones de soins avec population à haut risque
- Suivi des chaînes de transmission

**- Pas d'utilisation
de TDR**

- si PCR disponible
- diagnostic non confirmé
- suivi de traitements
- diagnostic de routine
- recherche active de cas
- confirmer une guérison
- tester du sang avant transfusion
- un contrôle aux frontières

Résultats des TDR

Recommandations du
« Implémentation Working Group » Ebola (WHO)



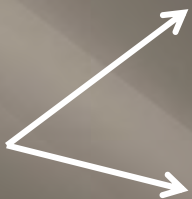


Base stratégique d'utilisation des TDR

Sensibilité par rapport RealStar^R Filovirus Screen RT-PCR



Stratégie d'utilisation

Choix des épidémiologistes VPP/VPN

- Faible prévalence (<15 %) 
 - TDR faible spécificité
faux + > vrai +
 - TDR forte spécificité
vrai + > faux -
- Incidence et prévalence en décroissance  tdr à spécificité élevée
(risque de faux -)
- Concentration virale élevée  tdr à sensibilité raisonnable

Modélisation / algorithmes des tdr

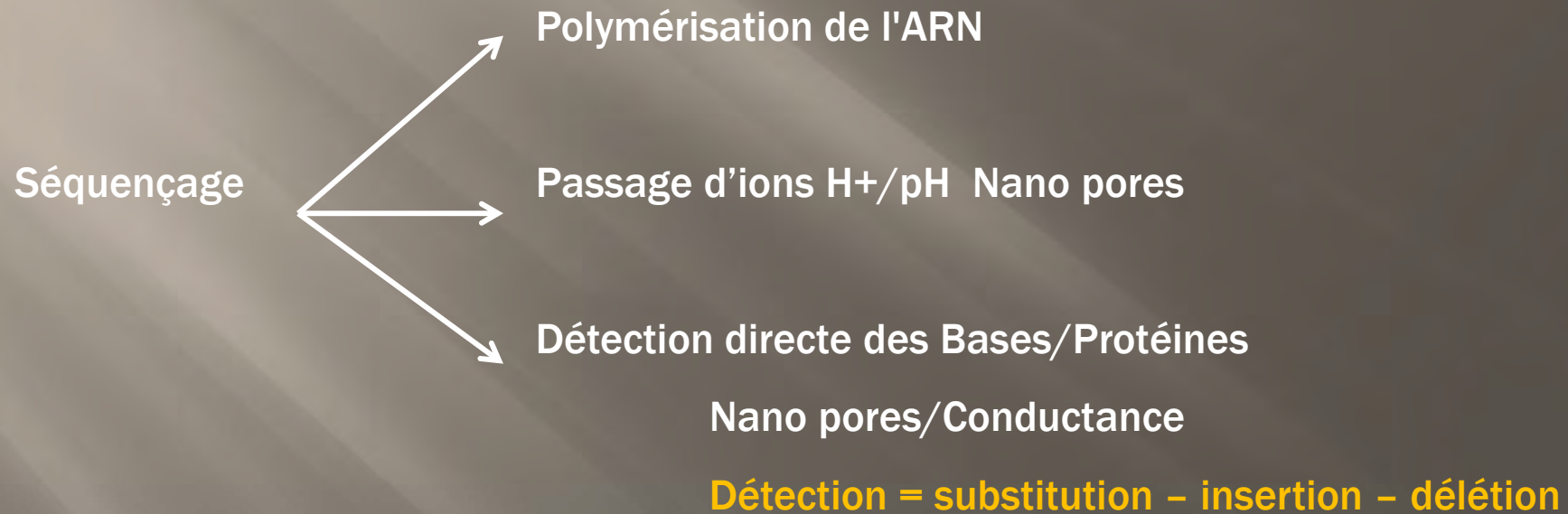
Utilisation de tdr → Augmentation de 15 % PCR

Utilisation de 2 TDR
spécifique+ sensible

Perte en spécificité
Gains modérés en sensibilité
N'augmente pas la performance
(sauf si concordance)
Discordance crée un groupe
« **indéterminé** » à haut risque
Algorithme et **VPP et VPN**
difficile à établir

**UN TDR NÉGATIF NE PEUT EXCLURE
UNE AFFECTION À EBOLA**

NOUVELLES PERSPECTIVES « SÉQUENÇAGE »



SÉQUENÇAGE CLASSIQUE

Février 2015

LIBERIA

Liberian Institute for Biomedical Research / (USAMRIID) Illumina Miseq

Transmission sexuelle

NEAR-REAL-TIME SEQUENCING

Fin épidémie 2015

SIERRA LEONE

Cambridge University

Ion Torrent Sequencer Life Technology^R

Identification rapide des foyers de contamination des patients

Séquençage portable en temps réel RNA/Protéines

MinIon (Oxford Nanopore technology[®])

Séquenceur portable

Nano pores protéiques / membrane polymère

Enzyme d'amarrage

Passage dans le nano pore

Différence de potentiel spécifique du nucléotide



Évaluations en RDC (Boende)

Essais en laboratoire mobile au Libéria (8 cas)

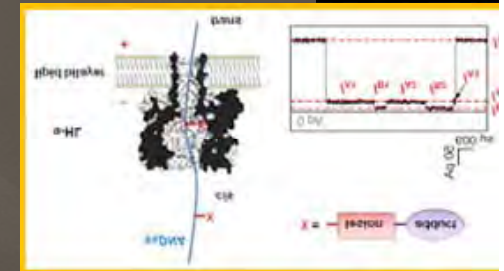
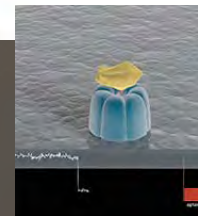
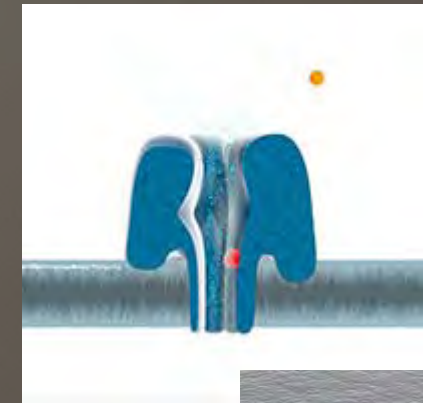
Nouvelle technologie (4^e génération)

Approche métagénomique

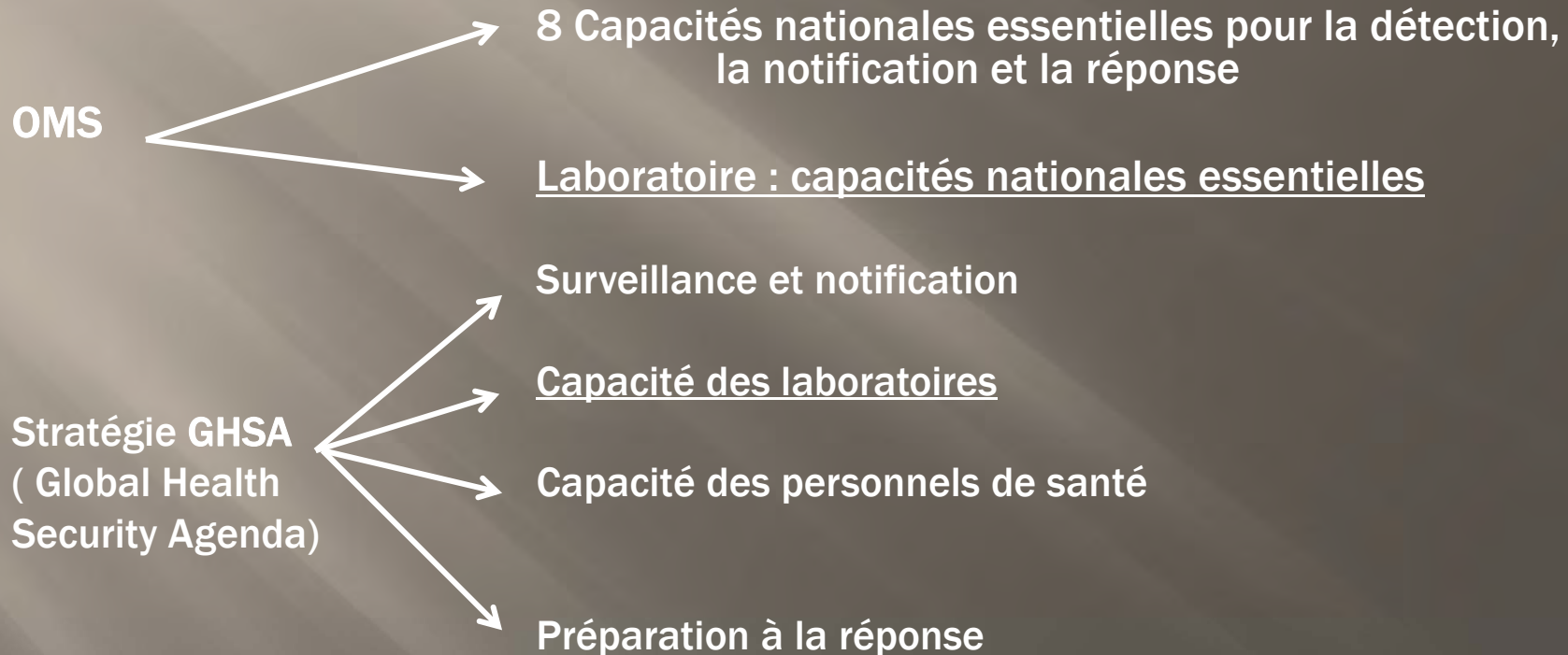
Séquençage à haut débit en milieu complexe

Pas d'amplification source d'erreur

Nouvelle philosophie : l'analyse vient au prélèvement



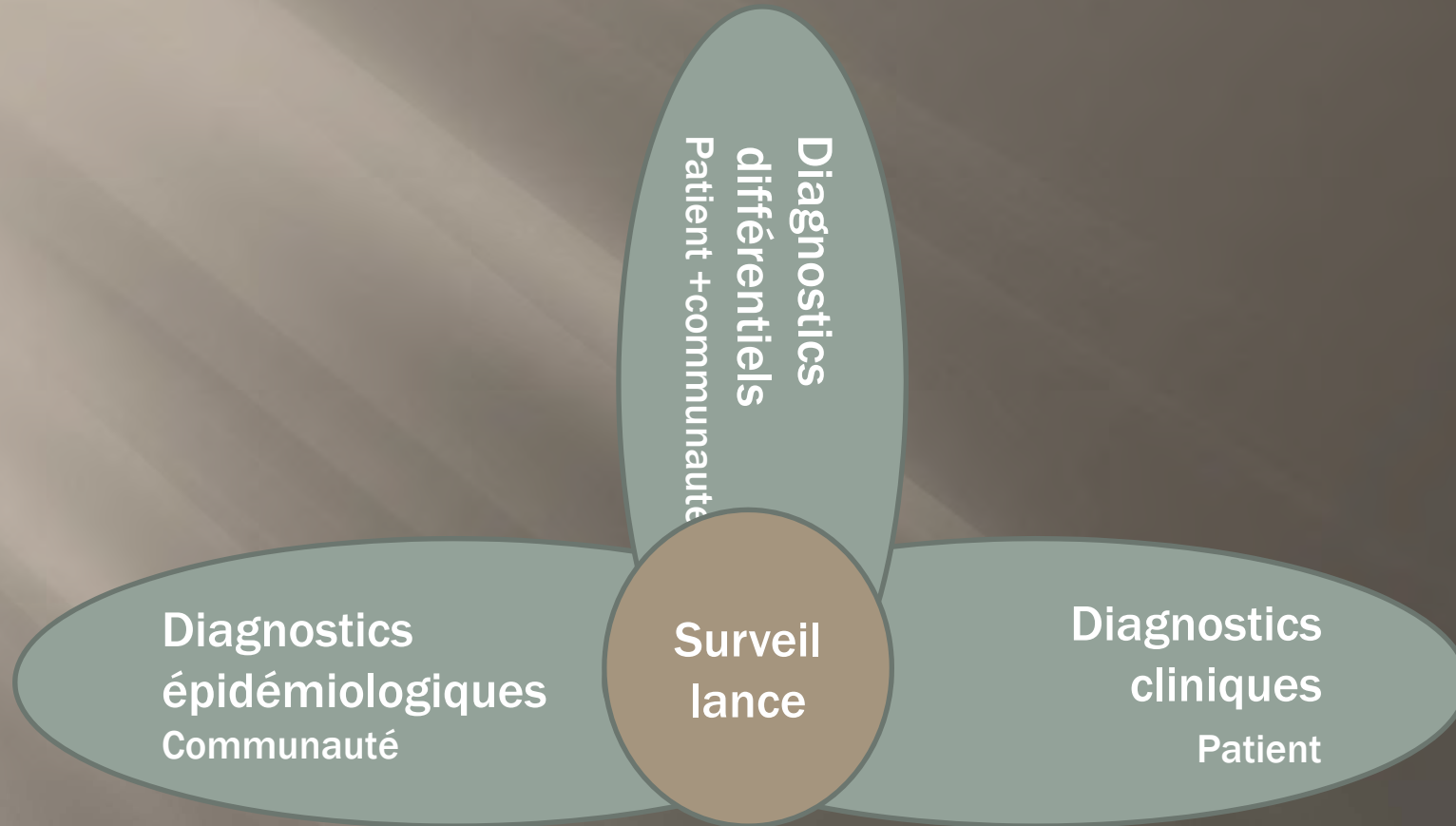
Règlement Sanitaire International (RSI 2005)



Épidémie Ebola 2015 -2016

« approche maladie et non pas approche transversale »

Rôle du laboratoire



Surveillance/veille épidémiologique de routine



**Merci
pour votre attention**