

Développement et évaluation de tests antigéniques rapides pour le diagnostic d'infections méningococciques et pneumococciques

Cyrille Hedi Haddar

▶ **To cite this version:**

Cyrille Hedi Haddar. Développement et évaluation de tests antigéniques rapides pour le diagnostic d'infections méningococciques et pneumococciques. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSES065 . tel-02896584

HAL Id: tel-02896584
https://theses.hal.science/tel-02896584

Submitted on 10 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre NNT : 2019LYSES065

THESE de DOCTORAT DE l'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de

Université Jean Monnet - Saint-Etienne

Ecole Doctorale N°488
Sciences, Ingénierie, Santé

Spécialité de doctorat : Biologie Cellulaire et Moléculaire
Discipline : Biologie, médecine et Santé

Soutenue publiquement le 19/12/2019, par :

Cyrille Hedi HADDAR

Développement et évaluation de tests antigéniques rapides pour le diagnostic d'infections méningococciques et pneumococciques

Membres du jury :

Mme Elisabeth BOTELHO-NEVERS	PU-PH	Université de Saint-Etienne	Présidente
Mme Marie KEMPF	PU-PH	Université d'Angers	Rapporteure
M. Christophe BURUCOA	PU-PH	Université de Poitiers	Rapporteur
M. Bernard LA SCOLA	PU-PH	Université d'Aix-Marseille	Examinateur
M. Paul VERHOEVEN	MCU-PH	Université de Saint-Etienne	Examinateur
M. Yves GERMANI	DR	BioSpeedia - Institut Pasteur - Paris	Co-directeur de thèse
M. Bruno POZZETTO	PU-PH	Université de Saint-Etienne	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été soutenu financièrement par un contrat doctoral CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche) n°1283/2014. Ce dispositif est piloté par l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT).

J'adresse tout d'abord mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Mme la Pr. Marie Kempf et à M. le Pr. Christophe Burucoa qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi qu'à Mme la Pr. Elisabeth Botelho-Nevers, à M. le Pr. Bernard La Scola et au Dr Paul Verhoeven pour leur présence comme examinatrice ou examinateur de ce travail.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Pr Bruno Pozzetto pour m'avoir accueilli depuis maintenant plus de 8 ans dans ton laboratoire. Merci de m'avoir proposé cette opportunité, pour ton aide et ton avis toujours très pertinent.

Merci à mon co-directeur de thèse et responsable scientifique en entreprise, M. le Dr Yves Germani et à la présidente de BioSpeedia, Mme le Dr Evelyne Begaud. Merci de m'avoir donné ma chance et l'opportunité de découvrir l'Institut Pasteur, environnement scientifique d'exception. Merci pour votre confiance et soutien au quotidien. BioSpeedia est une belle aventure et je suis honoré d'en faire partie.

Un merci tout particulier à M. le Dr Paul Verhoeven. Tu as été le premier à me faire confiance, tu m'as donné le goût de faire de la recherche. J'ai passé des années extrêmement enrichissantes à tes côtés et je te dois beaucoup. Merci d'avoir cru en moi. Je te souhaite le meilleur pour la suite, professionnellement comme personnellement.

Merci aux médecins du laboratoire des Agents Infectieux et d'Hygiène et tout particulièrement à Anne Carricajo pour ton implication dans les projets que nous avions en commun malgré ton temps toujours très chargé ; Florence Grattard pour tes nombreuses idées souvent pertinentes ; Sylvie Pillet pour ton amitié et tes conseils toujours bienveillants (et bravo pour ton traité !), Thomas Bourlet pour ta sympathie et ton accueil prolongé au GIMAP, Manon Lleres-Beaudoin pour m'avoir laissé cohabiter dans ton bureau ponctuellement, Caroline Mahinc pour notre soutien mutuel tout au long des années.

Comment faire des remerciements sans mentionner le personnel du laboratoire des Agents Infectieux et d'Hygiène. Merci énormément les filles (et les rares mecs !) pour votre bienveillance et votre aide de chaque instant. Mentionner tout le monde serait compliqué mais je tiens quand même à remercier quelques personnes en particulier : Camille « Camomille », merci pour ton amitié sincère ; Cécile « La Mère », mon homologue de « ronchitude » ; Isa et Martine, mes compagnes de biologie moléculaire ; Véronique et Dominique, les pro de l'antibio ; Corinne, tes casseroles de milieux et ta métrologie adorée. Merci à toutes les autres techniciennes de bactério. Merci également aux techniciennes de virologie (Audrey, Nath, Sandra, Véro, Jacqueline …) pour votre bonne humeur et votre gentillesse ! Merci également aux techniciennes du labo de parasitologie, toujours bienveillantes. Enfin, merci aux secrétaires : Marie-Claude, Marie-Noëlle, Nadia et Sandrine, toujours prêtes à m'aider.

Merci au personnel du GIMAP, aux collègues, internes et étudiants : Joss, continue à nous surprendre avec ton NGS ; Johan, merci pour ton travail acharné sur le PneumoResp, je te souhaite le meilleur ; merci à Fedy pour ta bonne humeur. Merci à toi, Julie « Dr Gagnaire » pour nos moments de franche rigolade et de craquage en secteur post-ampli. Tu vois, on y est arrivé finalement ! Merci à Pierre « Dr Sapin », pour ton amitié sincère !

Merci aux personnes travaillant à l'Institut Pasteur avec lesquelles j'ai travaillé, en particulier Aude, merci pour ta gentillesse et ton aide. Merci à Mohamed-Kheir Taha pour l'accès à son laboratoire et à nos travaux en commun. Merci aussi à la Pasteur Running Team toujours prête à courir par tous les temps : Piernicola, David, Anthony, Phillipe, Claudia, Sandra et bien d'autres.

Merci à mes anciens collègues de BioSpeedia, Pierre et Guylène. Merci Pierre pour ta sympathie malgré notre courte interaction ! Merci Guylène pour m'avoir beaucoup appris (et un peu cassé les pieds, soyons honnête !) sur la qualité. Nos conversations sur absolument tout me manquent ! Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à mes amis, pour votre présence au fil des années. Amélie, un énormissime merci pour tout. Travailler avec toi fut un véritable plaisir, merci pour tout ce que tu m'as appris (comme la technique légendaire du pipetage inverse) ! Je suis content d'avoir croisé ta route et je te souhaite le meilleur pour la suite ! Merci à Laurinette et Yacine, ex-collègues de choc ! Je suis content de voir que cela marche pour vous. Merci à Guillaume, exilé aux Etats-Unis,

recevoir de tes nouvelles me fait toujours autant plaisir, reviens-nous vite ! Merci à Karima la nouvelle canadienne ! Merci à toi Julien, pour les raclettes et tes célèbres salades Caesar, de pures merveilles ! Merci à mes copains d'enfance, Céline et Guillaume ! Céline, Boubou Musclor, merci pour les covoiturages ! Guillaume « Morray », tu verras, je suis sûr que tu finiras par t'habituer à Paris (mais pars vite quand même !).

Merci à toute ma famille. Merci à Juju d'être là. Merci à mon frère Sam, de croire en moi et de veiller sur moi, j'espère que ton avenir sera radieux. Merci à mes parents pour m'avoir fait confiance pour mes choix professionnels, même si cela vous faisait un peu peur. Avec mon frère, nous avons de la chance de vous avoir et nous le savons. Merci pour tout.

Et enfin, merci à tous ceux que j'oublie et qui ont contribué de près ou de loin à ce travail, j'espère que vous pourrez me le pardonner.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS **2**

SOMMAIRE **5**

RESUME **8**

ABSTRACT **9**

ABREVIATIONS **10**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX **12**

INTRODUCTION **14**

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **18**

Chapitre 1 : Les tests de diagnostic rapide 19

1. Définition d'un test de diagnostic rapide 21
2. Les caractéristiques d'un test idéal : les critères ASSURED 21
3. Les différents tests de diagnostic rapide 23
   - 3.1 Les tests rapides basés sur les acides nucléiques 23
   - 3.2 Les tests rapides basés sur les réactions physiques 25
   - 3.3 Les tests rapides basés sur les réactions immunologiques 26
4. Les tests rapides immunochromatographiques à flux latéral (LFIA) 30
   - 4.1 Principe des tests LFIA 31
   - 4.2 Les membranes 34
   - 4.3 Les anticorps 40
   - 4.4 Les nanoparticules 46
5. Réglementation des tests immunochromatographiques 49
   - 5.1 Réglementation américaine 50
   - 5.2 Réglementation européenne 50
6. Le marché des tests rapides de type LFIA 52

Chapitre 2 : Infections à méningocoques 54

1. Rappel sur le germe et ses facteurs de virulence 54
   - 1.1 Phylogénie 54
   - 1.2 Structure du génome 54
   - 1.3 Description de la bactérie 55
   - 1.4 Principaux facteurs de virulence 56
   - 1.5 Classification / Sérogroupes 56
   - 1.6 Epidémiologie 57
2. Pouvoir pathogène 59
   - 2.1 Transmission et portage 59
   - 2.2 Infections 59
   - 2.3 Antibiothérapie 60
   - 2.4 Vaccination 60
3. Eléments diagnostiques 62
   - 3.1 Examen clinique 62

3.2 Examen microbiologique 63
4. Tests rapides pour la détection du méningocoque 63
4.1 Typage moléculaire par d'amplification des acides nucléiques 63
4.2 Typage antigénique 64
Chapitre 3 : Infections à pneumocoques 66
1. Rappel sur le germe et ses facteurs de virulence 66
1.1 Phylogénie 66
1.2 Description de la bactérie 66
1.3 Principaux facteurs de virulence 67
1.4 Classification / Sérogroupes / Sérotypes 70
1.5 Epidémiologie 71
1.6 Antibiothérapie 72
1.7 Vaccination antipneumococcique 72
2. Pouvoir pathogène 74
2.1 Pathologies non invasives 74
2.2 Pathologies invasives 74
2.3 Transmission et portage 75
3. Eléments diagnostiques 76
3.1 Examen clinique 76
3.2 Examen microbiologique 76
4. Tests rapides pour la détection du pneumocoque 78
4.1 Tests moléculaires 78
4.2 Tests antigéniques 78
OBJECTIFS 81
MATERIELS ET METHODES 83
MeningoSpeed 84
1. Utilisation du test MeningoSpeed 84
1.1 Protocole 84
1.2 Interprétation des résultats 84
PneumoSpeed 86
1. Utilisation du test PneumoSpeed 86
1.1 Protocole 86
1.2 Interprétation des résultats 87
PneumoResp 87
1. Utilisation du test PneumoSpeed 87
1.1 Protocole 87
1.2 Interprétation des résultats au niveau de la cassette 89
1.3 Interprétation des résultats vis-à-vis du patient 89
2. Evaluation de la spécificité du test PneumoResp 90
3. Corrélation entre la culture semi-quantitative et les charges bactériennes obtenues par technique d'amplification PCR 90
3.1 Culture quantitative 90
3.2 Calcul de la limite de détection des tests PCR 90
4. Marquage CE du test Pneumoresp 92

RESULTATS 93

MeningoSpeed : Test de diagnostic rapide de la méningite à méningocoques dans le LCR 94

ARTICLE 1 : Validation of a new Rapid Detection Test for the detection of Neisseria meningitidis A/C/W/X/Y antigens in cerebrospinal fluid..... 95

PneumoSpeed : Test de diagnostic rapide du pneumocoque dans l'urine et le LCS 118

PneumoResp : un test de diagnostic rapide du pneumocoque dans les expectorations 120

Description et création du test PneumoResp..... 120

Evaluation de la spécificité du test PneumoResp..... 120

Détermination de la relation entre culture bactérienne et PCR quantitative..... 120

Evaluation clinique 123

ARTICLE 2 : Strategy using a new antigenic test for rapid diagnosis of Streptococcus pneumoniae infection in respiratory samples from children consulting at hospital. 123

DISCUSSION.....151

TDR MeningoSpeed 152

TDR PneumoSpeed 153

TDR PneumoResp..... 154

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 158

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....161

ANNEXES 172

Annexe 1 : Brevet FR 1905115 déposé le 16 mai 2019..... 173

Annexe 2 : Article « Tests de diagnostic rapide des shigelloses » 177

Annexe 3 : Synthèse des travaux personnels..... 186

RESUME

Les tests de diagnostic rapide (TDR) sont aujourd'hui des outils indispensables pour une réponse urgente en pathologie infectieuse. De nombreux tests sont disponibles pour rechercher différents agents pathogènes (VIH, streptocoque du groupe A, plasmodium …) dans des prélèvements biologiques variés (urine, liquide cérébrospinal ou LCS, sang …). L'avantage de ce mode de diagnostic est leur rapidité, leur simplicité de mise en œuvre, y compris par des non-spécialistes ou à l'extérieur d'une structure de laboratoire, et leur coût raisonnable. Dans ce travail de thèse CIFRE, nous présentons trois TDR que nous avons contribué à développer et à évaluer, basés sur l'immunochromatographie à flux latéral (LFIA).

Le premier TDR cible *Neisseria meningitidis* dans le LCS, bactérie responsable de redoutables épidémies de méningites dans les pays à ressources limitées. Ce TDR est le seul test commercial de type LFIA qui permette de détecter 5 des 6 principaux sérogroupes impliqués dans la maladie (A/C/W/X/Y). Une étude publiée sous l'égide du CNR des méningocoques à l'Institut Pasteur de Paris montre les excellentes performances de ce test sur près de 560 échantillons de LCS provenant de 6 pays.

Le deuxième TDR cible *Streptococcus pneumoniae* dans l'urine et le LCS, également dans le cadre du diagnostic des méningites bactériennes. Ce test, couplé au précédent, fait l'objet d'une étude multicentrique en Afrique de l'ouest sous couvert de l'OMS.

Le troisième TDR est un avatar du précédent dédié aux sécrétions respiratoires. Dénommé PneumoResp, il introduit le concept de TDR semi-quantitatif en proposant d'effectuer le test sur sécrétions non diluées et, en cas de résultat positif, sur sécrétions diluées au 1 :100ème. Nous proposons un algorithme (qui fait l'objet d'un brevet en cours d'expertise) qui vise à différencier le portage de l'infection invasive à *S. pneumoniae* chez l'enfant. Par rapport aux techniques conventionnelles (culture semi-quantitative et qPCR), nous montrons sur quelque 200 échantillons respiratoires une excellente sensibilité et une très bonne valeur prédictive négative de ce test pour exclure ou suspecter une infection active à *S. pneumoniae* chez l'enfant dès le premier jour.

ABSTRACT

Nowadays, Rapid Diagnostic Tests (RDTs) are essential tools for an urgent response in infectious diseases. Many tests are available to search for different pathogens (HIV, group A streptococcus, plasmodium ...) in various biological samples (urine, cerebrospinal fluid or CSF, blood ...). The main advantages of this mode of diagnosis are speed, simplicity of implementation, including by non-specialists or outside a laboratory structure, and reasonable cost. In this “CIFRE” (industrial) thesis, we present three RDTs based on lateral flow immunochromatography (LFIA) that we contributed to develop and evaluate.

The first TDR targets Neisseria meningitidis, a bacterium responsible for severe outbreaks of meningitis in resource-limited countries, in CSF samples. This RDT is the only LFIA-type commercial test that can detect 5 of the 6 major serogroups involved in the disease (A/C/W/X/Y). A study published under the authority of the meningococci reference centre at the Institut Pasteur of Paris showed the excellent performances of this test on nearly 560 CSF samples collected from 6 countries including 5 in Africa.

The second TDR targets Streptococcus pneumoniae in urine and CSF; it is also intended to the diagnosis of bacterial meningitis. This test, coupled with the previous one, is the object of a multicentric study presently conducted in West Africa under cover of WHO.

The third TDR is an avatar of the previous one but was dedicated to respiratory secretions. Called PneumoResp, it introduces the concept of semi-quantitative RDT. It proposes to perform the test on undiluted secretions and, in the case of positive result, on 1:100-diluted secretions. We present an algorithm (which is the object of a patent pending appraisal) that aims to differentiate S. pneumoniae carriage from invasive infection by this germ in children. Compared to conventional techniques (semi-quantitative culture and qPCR assays), the test performed on 196 respiratory specimens showed an excellent sensitivity and a very good negative predictive value, allowing to exclude or suspect an active S. pneumoniae infection as soon as the first day.

ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
ATCC	*American Type Culture Collection*
AuNPs	Nanoparticules d'or
CDR	*Complementarity Determining Regions*
CPS	Capsule polysaccharidique
C_t	*threshold cycle*
CWPS	*Cell Wall PolySaccharide*
DIV	Diagnostic *in vitro*
DMDIV	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*
DM	Dispositifs Médicaux
ELISA	*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
FDA	*Food and Drug Administration*
HDA	*Helicase-Dependent* A*mplification*
Ig	Immunoglobulines
kDa	KiloDalton
LAMP	*Loop-mediated Isothermal Amplification*
LCS	Liquide Cérébrospinal
LFIA	*Lateral Flow ImmunoAssay*
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
LSPR	*Localized surface plasmon resonance*
mAb	Anticorps monoclonal
MALDI-TOF	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight*
McF	*McFarland*
MDA	*Multiple Displacement Amplification*
MLST	*Multilocus Sequence Typing*
NAAT	Nucleic Acid Amplification Test
NAFLIA	*Nucleic Acid Lateral Flow ImmunoAssay*
NALF	*Nucleic Acid Lateral Flow*
NASBA	*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMV	*Outer membranes vesicles*
pAb	Anticorps polyclonal
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
POC	*Point-Of-Care*
qPCR	*Quantitative Real-Time PCR*
RCA	*Rolling Circle Amplification*
RPA	*Recombinase Polymerase Amplification*
SDA	S*trand Displacement Amplification*
Se	Sensibilité
SELEX	*Systematic evolution of ligands by exponentiel enrichment*
SERS	*Surface enhanced Raman scattering*
SMART	*Simple Method for Amplifying RNA Targets*

Sp Spécificité
SPR *Surface Plasmon Resonance*
TDR Test de Détection Rapide
TMA *Transcription Mediated Amplification*
TROD Test Rapide à Orientation Diagnostic
UFC Unités Formant Colonies
V_HH *Variable Heavy of Heavy chain antibody*
VPN Valeur prédictive négative
VPP Valeur prédictive positive

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Tableaux 13
Figure 1. Principales causes de décès dans le monde en 2004. 19
Figure 2. Les critères ASSURED 22
Figure 3. Exemples de tests moléculaires rapides basés sur le principe de la PCR. 24
Figure 4. Exemple de test d'agglutination au latex pour la détection de *Neisseria meningitidis*. 28
Figure 5. Différentes techniques pour la fabrication de dispositifs de détection antigénique à support papier. 29
Figure 6. Représentation des différents éléments constituant un test rapide de type LFIA. 31
Figure 7. Les deux formats de tests rapides immunochromatographiques à flux latéral. 33
Figure 8. Exemples d'automates permettant le dépôt de réactifs sur membrane. 37
Figure 9. Différence entre un flux laminaire et un flux turbulent. 39
Figure 10. Représentation d'une immunoglobuline (de type G) et de ses différents domaines. 40
Figure 11. Production des anticorps monoclonaux. 42
Figure 12. Représentation d'un anticorps classique de type IgG et d'un anticorps de lama. 43
Figure 13. Méthode de sélection des V_HH à partir d'un camélidé via la technique du phage display. 44
Figure 14. Représentation schématique du couplage d'une nanoparticule d'or avec un anticorps via la stratégie EDC/NHS. 49
Figure 15. Constituants du dossier technique de marquage CE pour un dispositif DIV. 51
Figure 16. Nouvelle classification des dispositifs médicaux in vitro selon le règlement européen 2017/746. 52
Figure 17. Evolution du marché des tests rapides de type LFIA de 2016 à 2023. 53
Figure 18. Représentation circulaire du génome de *N. meningitidis* Z2471. 55
Figure 19. Distribution géographique des sérogroupes de *N. meningitidis* responsables de maladies à méningocoques invasives en 2007. 57
Figure 20. Proportion de cas d'infections invasives à méningocoque par sérogroupe, France entière, 2000-2017. 58
Figure 21. La ceinture de la méningite en Afrique (meningitis belt). 59
Figure 22. Symptômes possibles dans le cas d'une méningite suivant l'âge du patient. 62
Figure 23. Observation microscopique de *Streptococcus pneumoniae* dans le liquide cérébro-spinal. 67
Figure 24. Principaux facteurs de virulence du pneumocoque. 67
Figure 25. Composition du CPWS de *S. pneumoniae*. 69
Figure 26. Système d'échiquier pour l'identification du type capsulaire des pneumocoques. 71
Figure 27. Progression d'une infection pneumococcique de la mise en contact à l'infection. 74
Figure 28. Représentation des différents résultats positifs pour MeningoSpeed. 85

Figure 29. Représentation des différents résultats négatifs pour MeningoSpeed. 85
Figure 30. Les différents résultats possibles du test PneumoSpeed. 87
Figure 31. Protocole du test PneumoResp. 89
Figure 32. Différents prototypes testés pour le TDR MeningoSpeed. 94
Figure 33. Données permettant le calcul de la limite de détection et de la sensibilité analytique des tests PCR *ply* et *lyt*A. 121
Figure 34. Calcul de l'efficacité des tests PCR *ply* et l*yt*A. 122
Figure 35. Corrélation entre la valeur de C_t des tests PCR et la quantité de bactéries obtenues en culture (exprimée en UFC/ml) pour la souche *S. pneumoniae* ATCC 49619. 122
Figure 36. Proposition de stratégie de diagnostic des infections respiratoires à *S. pneumoniae* utilisant le TDR PneumoResp. 157

Tableaux

Tableau 1. Relation entre taille des pores des membranes, vitesse de migration et sensibilité dans un test LFIA. 36
Tableau 2. Les différentes classes d'immunoglobulines. 41
Tableau 3. Comparaison des avantages et inconvénients des différents types d'anticorps. 46
Tableau 4. Description des vaccins méningococciques proposés en France en 2019. 61
Tableau 5. Description des vaccins pneumococciques passés et actuels. 73
Tableau 6. Amorces utilisées pour la recherche des gènes *ply* et *lytA*. 91
Tableau 7. Expériences réalisées pour le marquage CE du PneumoResp. 92
Tableau 8. Résultats de l'évaluation clinique du test PneumoSpeed sur des échantillons de liquide cérébrospinal. 118
Tableau 9. Résultats de l'évaluation clinique du test PneumoSpeed sur 18 échantillons de LCS testés au CNR des méningocoques et *Haemophilus influenzae*. 119

INTRODUCTION

Les maladies infectieuses font plus de 15 millions de victimes par an (Lozano et al. 2012), essentiellement dans les pays en voie de développement. Comparées à d'autres pathologies, les maladies infectieuses peuvent être transmises de manière exponentielle parmi les populations en un laps de temps relativement court, menaçant ainsi la santé publique en général et potentiellement l'économie. Elles ont une capacité naturelle à évoluer et à s'adapter aux réponses que l'homme met en place pour se prémunir (exemple : les antibiotiques pour lutter contre les bactéries). Régulièrement, de nouvelles « menaces » émergent (SRAS, Zika, EBOLA …) et mettent à contribution les capacités de réponse de l'être humain. Dans le monde d'aujourd'hui toujours plus connecté géographiquement (augmentation du trafic aérien, mondialisation, migration…), les maladies se transmettent avec une célérité accrue, ce qui nécessite leur identification précoce, si possible avant l'apparition d'épidémies.

Pour de nombreuses maladies infectieuses, un diagnostic rapide et précis constitue une stratégie de santé publique essentielle en permettant un traitement précoce, adapté, efficace et dirigé. Un diagnostic et un traitement précoces permettent aussi aux maladies qui n'ont pas de vaccins efficaces, comme l'infection VIH, la tuberculose ou le paludisme, de limiter leur extension si elles sont détectées rapidement. Beaucoup de symptômes sont communs à de multiples maladies telles que la toux, la fièvre ou les courbatures. Un clinicien expérimenté peut diagnostiquer l'infection en se basant sur les signes physiques, les symptômes et les antécédents du patient mais souvent il doit s'appuyer sur des tests de laboratoire pour confirmer ce diagnostic. Pour le patient lui-même, connaître le type d'infection dont il est atteint dès que possible lui permet de mieux gérer sa maladie et notamment d'éviter de la transmettre.

De nombreuses méthodes de diagnostic microbiologique ont été développées comme la culture bactérienne ou encore la biologie moléculaire. Cependant, pour beaucoup d'entre elles, il est nécessaire de disposer d'une infrastructure développée de type laboratoire avec du personnel qualifié et des équipements coûteux. Ainsi pour supporter les efforts de contrôle au niveau mondial, en particulier dans les pays aux ressources limitées, où les installations de laboratoire ont une portée restreinte, un diagnostic simple, rapide et utilisable au plus près du patient, est essentiel. Les tests POC (Point-Of-Care) ont été développés dans cette optique et sont devenus des outils importants dans la détection des maladies infectieuses. Dans la

lutte contre le VIH, en particulier, ces tests POC ont été grandement bénéfiques. Ils ont amélioré l'espérance de vie de nombreux sujets séropositifs et ont permis de limiter la transmission. Cependant, de nombreuses autres maladies qui pèsent lourdement dans des pays aux ressources limitées attendent toujours des tests rapides de qualité pour répondre aux besoins de ces systèmes de santé.

Bien que le principal avantage des tests de diagnostic rapide (TDR) soit leur impact potentiel sur la santé publique, beaucoup de stratégies développées pour les marchés des pays à faible revenu sont également très rentables dans les pays à revenu élevé. Du fait de leur simplicité et de leur rapidité d'exécution, les TDR nécessitent beaucoup moins de main-d'œuvre. De plus, chaque échantillon fait l'objet d'un seul test, ce qui réduit les risques de confusion ou de contamination des échantillons.

Un format de TDR qui s'est particulièrement développé est le test immunochromatographique à flux latéral (LFIA). En effet, il est relativement facile à produire et à mettre en œuvre. Habituellement il ne requiert pas de matériel supplémentaire, ne nécessite pas de formation particulièrement poussée et donne une réponse visuelle en un temps court. Tous ces atouts font de lui un excellent candidat pour diagnostiquer les maladies infectieuses au plus près du patient.

Cette thèse a été financée grâce au dispositif CIFRE (**C**onvention **I**ndustrielle de **F**ormation par la **Re**cherche) n°1283/2014. Le dispositif CIFRE permet une collaboration entre un laboratoire académique et une entreprise privée. BioSpeedia, jeune entreprise du secteur de la santé basée à Paris, est une start-up issue de l'Institut Pasteur de Paris. Elle a pour mission de développer et commercialiser des TDR pour les maladies infectieuses. Ses premiers tests sont axés sur la méningite bactérienne. Le laboratoire GIMAP (Groupe sur l'Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes) EA3064 basé à la Faculté de Médecine de Saint-Etienne apporte pour sa part son expertise sur les infections causées par les micro-organismes et participe au développement et à la validation clinique des prototypes réalisés.

Compte tenu des considérations précédentes, l'objectif principal de ce travail de thèse a été d'évaluer les différents TDR élaborés par BioSpeedia pour détecter les pathogènes ciblés, avec notamment la proposition d'un nouvel outil diagnostique pour rechercher le pneumocoque dans les sécrétions respiratoires.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous développons des rappels bibliographiques orientés sur trois axes. Le premier axe s'articule sur les TDR et en particulier sur les tests immunochromatographiques à flux latéral. Le deuxième axe propose des rappels sur la bactérie *Neisseria meningitidis* et le troisième axe d'autres rappels sur la bactérie *Streptococcus pneumoniae*, deux bactéries responsables d'infections graves et pour lesquelles nous présentons l'évaluation de TDR innovants.

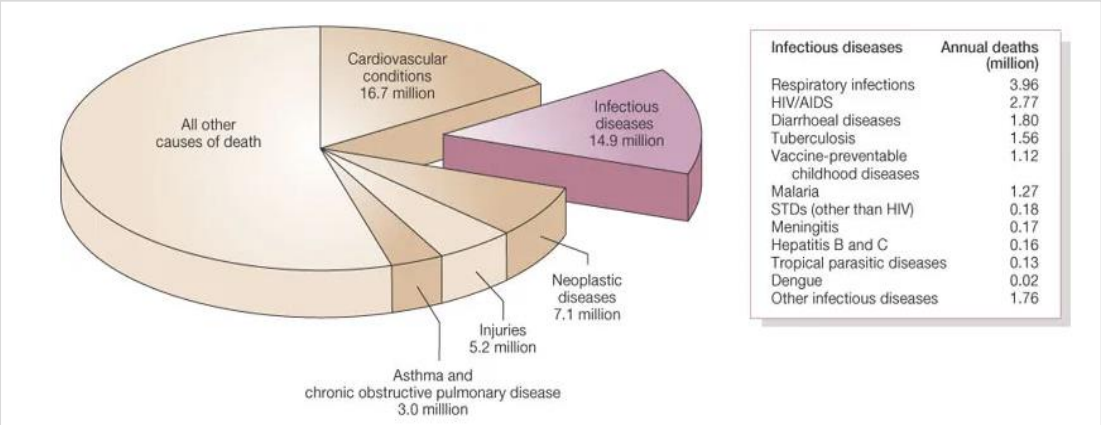
La partie consacrée aux travaux personnels comporte un premier volet centré sur la validation du TDR que nous avons construit, MeningoSpeed, permettant la détection de *Neisseria meningitidis* dans le liquide cérébrospinal (LCS). La deuxième partie des travaux personnels rapporte la validation de PneumoSpeed, TDR permettant la détection de *Streptococcus pneumoniae* dans les urines et le LCS. La troisième partie des travaux personnels traite de la mise en place d'une étude destinée à valider une nouvelle trousse créée pendant ce travail, PneumoResp, permettant la détection de *Streptococcus pneumoniae* dans les sécrétions respiratoires et ayant pour objectif de différencier la colonisation de l'infection véritable par cette bactérie.

Ces résultats sont complétés par une discussion générale et des perspectives en termes de développement de nouvelles applications et améliorations des tests rapides évalués dans ce travail.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les tests de diagnostic rapide

De nombreuses maladies infectieuses plus ou moins émergentes telles que les hépatites virales, la dengue, le choléra, les syndromes respiratoires aigus sévères à nouveaux coronavirus, la grippe aviaire, le paludisme ou encore la fièvre hémorragique à virus Ébola constituent une grave menace pour l'humanité et sont responsables de nombreux décès dans le monde (Morens et al. 2004). D'après un rapport de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), en 2004 les décès dus aux maladies infectieuses représentaient environ 15 millions dans le monde (**Figure 1**).



Infectious diseases	Annual deaths (million)
Respiratory infections	3.96
HIV/AIDS	2.77
Diarrhoeal diseases	1.80
Tuberculosis	1.56
Vaccine-preventable childhood diseases	1.12
Malaria	1.27
STDs (other than HIV)	0.18
Meningitis	0.17
Hepatitis B and C	0.16
Tropical parasitic diseases	0.13
Dengue	0.02
Other infectious diseases	1.76

Figure 1. Principales causes de décès dans le monde en 2004. Données OMS. D'après Morens et al. 2004.

Bien que ces maladies soient généralement localisées dans une région donnée, elles peuvent se propager plus ou moins facilement en raison de l'augmentation des voyages (Findlater & Bogoch 2018) ou encore en raison des migrations ou du réchauffement climatique. Il est donc important de mettre au point des tests de diagnostic permettant de les détecter afin de freiner leur propagation et de faciliter leur traitement.

Les outils idéaux de diagnostic des maladies infectieuses doivent être sensibles, spécifiques, rapides, adaptés, robustes, économiques et conviviaux. Au cours des cinquante dernières années, de nombreuses améliorations ont été apportées au diagnostic des pathologies infectieuses. Les techniques conventionnelles de diagnostic direct comprennent la culture, la microscopie, la reconnaissance immune d'antigènes d'agents pathogènes, ainsi que des stratégies d'amplification en chaîne des acides nucléiques de type PCR. Ces procédés

ont largement contribué au diagnostic des maladies infectieuses et ont grandement favorisé leur prévention et leur traitement.

Pendant des décennies, les stratégies basées sur la culture et la microscopie ont été les plus couramment utilisées pour la détection des microorganismes procaryotes. Ces méthodes classiques de diagnostic bactérien permettent d'isoler un certain nombre de bactéries pathogènes et de déterminer leur sensibilité aux antibiotiques. En revanche, le temps nécessaire à la croissance bactérienne ne permet pas une détection précoce et rapide des pathologies associées. Les tests primaires nécessitent 24 à 48 h en moyenne et jusqu'à une dizaine de jours pour les pathogènes les plus exigeants.

La stratégie basée sur l'immunologie a été largement utilisée pour la détection rapide des agents bactériens grâce à la reconnaissance des antigènes de l'agent infectieux par des anticorps spécifiques. Différentes méthodes basées sur ce concept ont été développées : les tests ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), les dosages immunologiques par fluorescence, les dosages immuno-magnétiques ou encore les dosages radio-immunologiques.

Ces dernières années, les méthodes d'amplification des acides nucléiques (NAAT pour Nucleic Acid Amplification Tests) ont fait l'objet d'un essor considérable pour rechercher l'ADN ou l'ARN de pathogènes. Ces techniques de biologie moléculaire sont actuellement considérées comme les méthodes les plus sensibles pour détecter un germe. Parmi ces techniques, les tests PCR sont la méthode la plus couramment utilisée. Il existe plusieurs types de tests PCR, et notamment ceux « en temps réel » ou qPCR, permettant de mesurer la charge bactérienne ou virale d'un échantillon, élément très utilisé pour le diagnostic d'une infection. Les tests moléculaires peuvent rendre un résultat dans la journée, voire en moins d'une heure, suivant la technique utilisée, ce qui est beaucoup plus rapide que la culture bactérienne. Ses principaux inconvénients sont un coût encore un peu élevé et la nécessité de disposer d'un environnement technique assez sophistiqué. En raison de sa rapidité, de sa spécificité et de sa sensibilité, la PCR en temps réel reste le test moléculaire le plus utilisé. Mais de nouvelles méthodes émergent (voir chapitre « Les tests rapides basés sur les acides nucléiques »).

Dans les pays en voie de développement, ces techniques ont d'autres limites liées à la faiblesse des ressources allouées à la santé et au manque de personnel qualifié. Par conséquent, des alternatives diagnostiques restent nécessaires en termes de simplicité de mise en œuvre, de rapidité des résultats et de coût raisonnable.

1. Définition d'un test de diagnostic rapide

Les premières définitions évoquées sont « un test médical réalisé sur ou à proximité du site de soins du patient » ou encore « tout test effectué au moment où le résultat du test permet de prendre une décision clinique et de prendre une mesure permettant d'améliorer les résultats en matière de santé » (Drain et al. 2014).

La définition proposée par Schito et al. 2012 est la suivante : « test de diagnostic effectué près du patient ou de l'établissement de traitement, ayant un délai d'exécution rapide et pouvant entraîner un changement dans la gestion du patient ».

Globalement un test rapide se doit d'être faisable dans un temps court, n'importe où et permettre d'orienter la décision médicale. Beaucoup de termes existent pour désigner un TDR : Test Rapide à Orientation Diagnostique (TROD), test « Point-Of-Care » (POC) (on parle alors de « Point-Of-Care Testing » ou POCT).

2. Les caractéristiques d'un test idéal : les critères ASSURED

ASSURED est l'acronyme de : « Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid, Equipment-free, Delivered ». Cette stratégie a été élaborée par l'OMS, à l'occasion d'un rapport sur le diagnostic des infections sexuellement transmissibles, afin que les pays émergents puissent avoir accès à des tests de diagnostic fiables et à des coûts raisonnables (Kettler et al. 2004). Les points définis par cette stratégie visent à préconiser les caractéristiques idéales d'un TDR (**Figure 2)**.

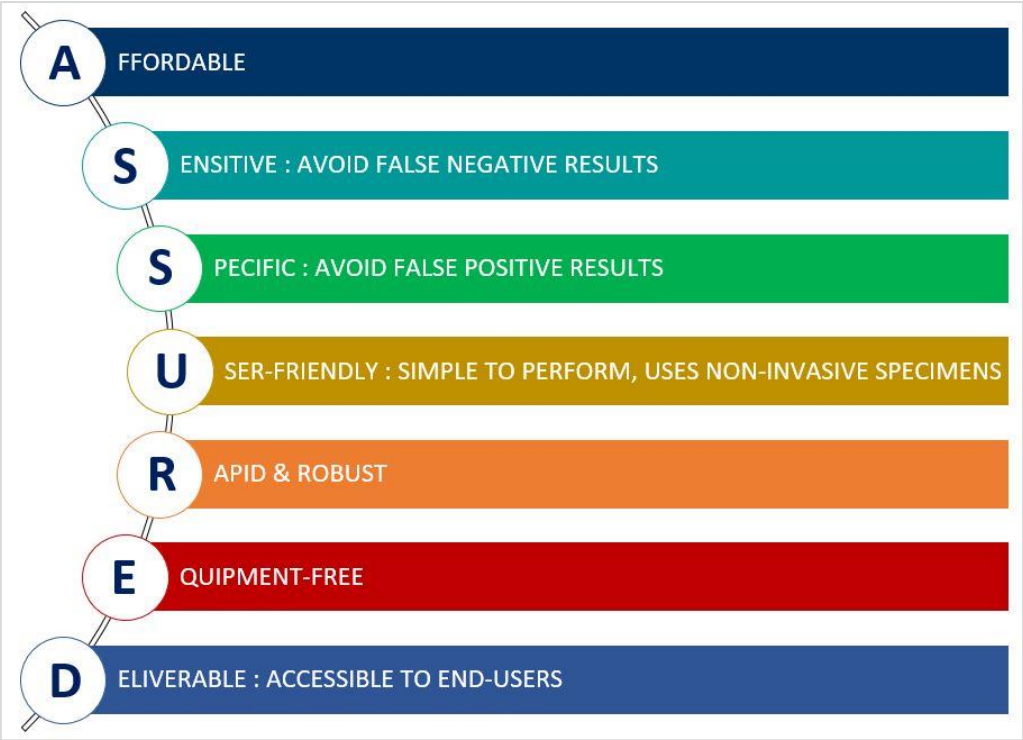


Figure 2. Les critères ASSURED tels que décrits par l'OMS (Ketler et al. 2004).

Ces critères sont les suivants : le test doit être **A**ccessible afin que le maximum de personnes y ait accès ; **S**ensible pour avoir le moins de résultats faussement négatifs ; **S**pécifique pour avoir le moins de résultats faussement positifs ; facile à **U**tiliser, c'est-à-dire sans exiger de compétences techniques très précises ; **R**apide pour prendre des décisions sans délai, et robuste, notamment en évitant de recourir à une chaîne de froid ; sans **E**quipement supplémentaire pour limiter les coûts et les installations complexes (électricité notamment), et à **D**isposition de ceux qui en ont besoin, que cela soit au sein d'un POC, dans une pharmacie ou dans un dispensaire.

Récemment, au vu des nouvelles technologies émergentes récentes, une équipe londonienne (Land et al. 2019) a proposé le sigle REASSURED. Les 2 lettres rajoutées au début correspondent à « **R**eal-time connectivity » : connectivité en temps réel et « **E**ase of specimen collection » : facilité de prélèvement des échantillons. On a ici l'idée de pouvoir lire et transmettre le résultat d'un test avec un appareil dédié ou avec un portable. Interpréter le résultat à l'aide d'un « lecteur » permet souvent une sensibilité accrue (non limitée par la vision humaine), évite des erreurs de transcription et harmonise l'interprétation. La rapidité de transmission permet aussi de pouvoir prendre des décisions de santé publique plus rapidement (par exemple pour alerter de façon précoce les autorités de santé en cas

d'épidémie dans une zone reculée, ou encore pour faire de l'épidémiologie à grande échelle). La deuxième idée est de pouvoir utiliser des échantillons non invasifs (salive, urine…) comme matrice des tests afin de simplifier également cette étape.

3. Les différents tests de diagnostic rapide

Il existe différentes catégories de tests rapides basés (i) sur la détection des acides nucléiques, (ii) sur des propriétés physiques, ou encore (iii) sur des propriétés immunologiques.

3.1 Les tests rapides basés sur les acides nucléiques

Traditionnellement, les NAATs passent par une étape d'extraction de l'ADN suivie par l'amplification de celui-ci, ce qui nécessite un personnel qualifié. Jusqu'à encore récemment, l'extraction était un point clé qui prenait du temps et devait être réalisée séparément. Des améliorations ont été faites pour réduire le temps d'extraction et la coupler de façon automatique à la réaction d'amplification, simplifiant le test et raccourcissant son délai de réalisation.

3.1.1 Les tests d'amplification des acides nucléiques basés sur la méthode PCR

Un raccourcissement de la durée des cycles de PCR permet à la plateforme qPCR MIC de BioMolecularSystems d'obtenir un résultat en 25 minutes. Encore plus rapide, des plateformes de type GeneXpert® (Cepheid) sont des outils de (q)PCR avec une extraction intégrée permettant de délivrer un résultat en moins de deux heures. Un homologue de cette technique est le système Cobas® Liat® de Roche fournissant un résultat en 15 minutes. On peut aussi citer les automates BD MAX™ de Becton Dickinson et FilmArray® de BioMérieux qui permettent une approche syndromique avec des trousses ayant des « panels » pouvant détecter plusieurs pathogènes en moins de 2h avec un minimum de temps de manipulation (**Figure 3**).

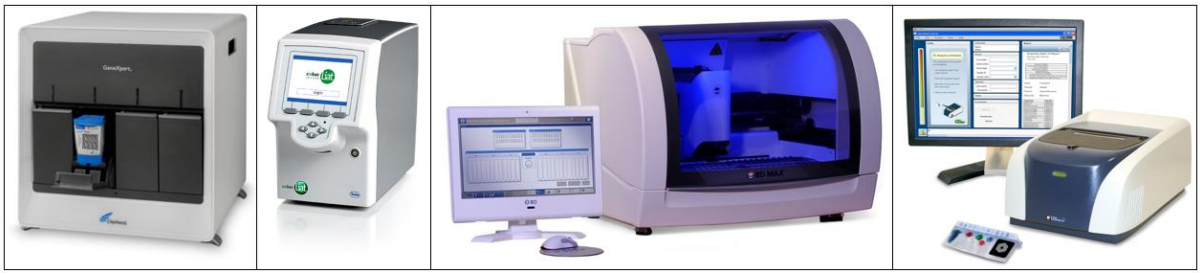


Figure 3. Exemples de tests moléculaires rapides basés sur le principe de la PCR. De gauche à droite : système GeneXpert® (Cepheid), système Cobas® Liat® (Roche), système BD MAX™ (BD) et système FilmArray® (BioMérieux).

3.1.2 Les tests d'amplification d'acides nucléiques isothermes

Depuis les années 1990, de nombreuses techniques d'amplification isotherme ont été développées. Certaines de ces méthodes ont la particularité de ne pas nécessiter d'équipements coûteux de type thermocycleur, ce qui les rend particulièrement utiles dans les pays à ressources limitées. Nous pouvons citer l'amplification basée sur la séquence d'acide nucléique (NASBA, également connue sous le nom d'amplification par transcription, TMA), l'amplification par signal de la technologie de l'acide ribonucléique (ARN) (SMART), l'amplification hélicase-dépendante (HDA), l'amplification de la recombinase polymérase (RPA), l'amplification par cercle roulant (RCA), l'amplification à déplacement multiple (MDA), l'amplification isotherme de l'ADN induite par boucle (LAMP) et l'amplification à déplacement de brin (SDA). Quelques-unes de ces techniques sont détaillées ci-après. Pour une revue plus détaillée le lecteur peut se référer au travail de Maffert et al. (2017).

La LAMP (en anglais, Loop mediated isothermal amplification of DNA) ou amplification isotherme de l'ADN induite par boucle est une méthode de biologie moléculaire. Il s'agit d'une technique d'amplification de l'ADN (ou ARN) avec la particularité de pouvoir l'effectuer à température constante et basse. Cela est possible grâce à l'enzyme polymérase *Bst* issue de *Bacillus strerothermophilus* et à 4 amorces différentes pouvant reconnaitre 6 régions distinctes sur le gène cible (Notomi 2000). La révélation est faite de différentes manières telles que la visualisation à l'œil nu via des méthodes colorimétriques, la fluorescence, la détection en temps réel, une électrophorèse ou encore via un test immunochromatographique à flux laminaire. Dans ce dernier cas, le passage par LAMP avant la phase d'immunochromatographie permet d'être plus sensible tout en étant plus rapide qu'une PCR

classique. La détection passe souvent par une liaison avec la biotine et la technique peut aussi détecter plusieurs cibles en une seule réaction. Il peut s'agir d'une technique multiplex (Chen et al. 2016). Les principales limitations sont la difficulté de bien sélectionner les amorces et le risque de contamination.

La technique NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) nécessite une étape initiale de dénaturation pour supprimer les structures secondaires de l'ARN. Il s'agit d'une méthode basée sur la transcription utilisant une combinaison de trois enzymes : l'*Avian myeloblastosisvirus* reverse transcriptase, la RNase H et l'ARN polymérase T7. On observe une alternance de la transcription inverse et de la transcription sous-séquentielle de l'ADN pour amplifier les cibles d'ARN. Elle est optimale à 41°C et dure environ 30 minutes.

La technique RPA (recombinase polymerase amplification) est une technique d'amplification isotherme à basse température (37-39°C) basée sur l'utilisation de complexes formés par des amorces oligonucléotidiques et d'enzymes appelées recombinases permettant de faciliter l'hybridation des amorces (Piepenburg et al. 2006).

La technique HDA (helicase-dependant amplification) ou amplification hélicase-dépendante est basée sur l'utilisation d'une enzyme ayant une activité hélicase pour dénaturer l'ADN (Vincent et al. 2004). La réaction d'amplification peut alors entièrement se dérouler à 37°C. Il s'agit de son principal avantage avec sa vitesse (entre 30 et 60 minutes). Cependant, le risque de contamination reste élevé à cause du manque de spécificité des enzymes pour appareiller les amorces sur les régions homologues de l'ADN combiné à la basse température de réaction (37°C). La technologie HDA est sous le joug d'un brevet (EP1539979 B) protégeant la technique jusqu'en 2023.

3.2 Les tests rapides basés sur les réactions physiques

Ces tests s'appuient sur les propriétés physiques du vivant, comme la réfraction de la lumière, la conductivité des électrons ou encore la capillarité. Deux grands représentants de ces tests sont les tests utilisant la technologie plasmonique et la microfluidique.

3.2.1 Technologies plasmoniques

Les technologies plasmoniques étudient la propagation de plasmons de surface le long d'une interface métal-diélectrique (or, argent et aluminium). La détection se fait par une modification de la lumière détectée. Parmi les différentes plates-formes de détection optique, les propriétés uniques de résonance plasmonique de surface (SPR) des nanomatériaux plasmoniques en font un procédé très prometteur pour la détection chimique et biologique et le diagnostic clinique. Deux classes importantes de capteurs plasmoniques ont été proposées :

- La résonance plasmonique de surface localisée (LSPR) repose sur la haute sensibilité des variations de l'indice de réfraction des nanomatériaux plasmoniques (Halas et al. 2011)**.** La capture des échantillons biologiques est contrôlée via la modification de l'indice de réfraction, ce qui entraîne une modification de la lumière réfléchie.
- La spectroscopie Raman exaltée (SERS) implique une amplification importante de la diffusion Raman à partir d'analytes adsorbés sur ou à proximité d'une surface métallique nanostructurée (Nie & Emory 1997).

3.2.2 Microfluidique

Grâce à la technologie microfluidique, les échantillons et les réactifs peuvent être transportés, mélangés et mis en réaction dans des micro-chambres spécifiques de manière contrôlée avec précision. La microfluidique sur papier est considérée comme une technologie peu coûteuse et conviviale pour la détection des agents pathogènes. En outre, la capacité de lecture par colorimétrie est également utile dans de nombreux cas dans les pays à ressources limitées. Cheng et al. (2010) ont réalisé un dispositif d'analyse à base de papier microfluidique pour la détection d'anticorps dirigés contre un antigène d'enveloppe du VIH-1, la glycoprotéine gp41. Avec ces tests, la manipulation est simple, le résultat relativement rapide (moins d'une heure) et un petit volume d'échantillon (1 à 10 µl) est requis.

3.3 Les tests rapides basés sur les réactions immunologiques

Les réactions immunologiques sont connues depuis longtemps. Le premier test utilisant ce procédé est le dosage radio-immunologique, développé dans les années 1950 par Rosalyn

Yalow et Salomon Berson (Berson et Yalow, 2006). Ce dernier exploitait la liaison protéine-anticorps. Depuis, de nombreux tests découlent de ce procédé.

3.3.1 ELISA

La technique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) est connue depuis de nombreuses années et a beaucoup été développée. Elle permet de rechercher ou doser dans un échantillon la présence d'anticorps, d'antigènes ou de protéines. La révélation est faite grâce à une réaction colorée produite par une enzyme liée à un anticorps agissant sur un substrat. Des kits prêts à l'emploi sont disponibles et peuvent rendre un résultat en moins d'une heure. Cependant, un personnel qualifié est nécessaire pour bien réaliser le test.

3.3.2 Immunofluorescence

L'immunofluorescence directe se réalise par un anticorps couplé à un fluorochrome dirigé contre l'antigène. Un dispositif à fluorescence (par exemple un microscope à épifluorescence) permet d'exciter ce fluorochrome et de révéler le complexe si celui-ci est présent. L'immunofluorescence indirecte, quant à elle, se base sur l'utilisation de 2 anticorps ; le premier (dit anticorps « primaire ») est dirigé contre l'antigène recherché, le second (dit anticorps « secondaire ») marqué par un fluorophore est dirigé contre l'anticorps primaire. La révélation se fait de manière similaire. La méthode indirecte permet d'augmenter la spécificité du marquage ainsi que son intensité.

3.3.3 Agglutination au Latex

Créés en 1956 par Plotz et Singer, les tests d'agglutination au latex consistent à recouvrir des microbilles de latex d'anticorps spécifiques de l'agent pathogène. Le test nécessite de mélanger l'échantillon (LCS, sérum ou urine) du patient avec les particules de latex marquées. La présence d'une agglutination confirme que le prélèvement renferme l'antigène du pathogène (**Figure 4**). La principale limite de ces tests est la nécessité de devoir conserver les réactifs à +4°C, ce qui peut être un obstacle dans les pays à ressources limitées en zone tropicale.

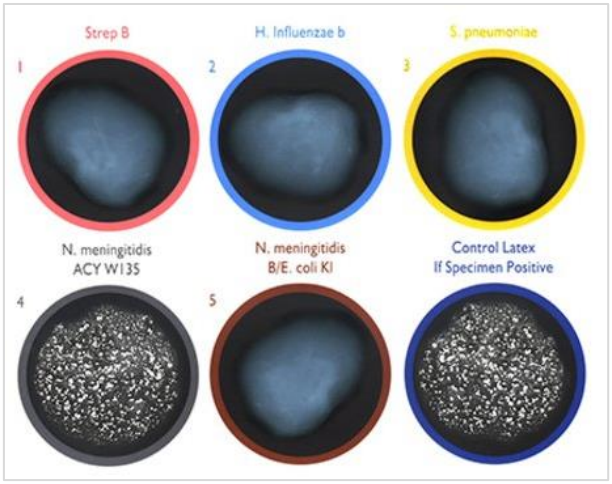


Figure 4. Exemple de test d'agglutination au latex pour la détection de *Neisseria meningitidis*. Le puits 4 (en bas à gauche) montre une réaction positive. Wellcogen™ *Neisseria meningitidis* - ThermoSientific™.

3.3.4 Dispositifs à base de papier

Les approches basées sur un dispositif à base de papier gagnent en intensité ces dernières années. En effet, le coût du papier et la facilité de développement des tests sur ce support rendent cette technologie attractive. Les tests immunochromatographiques à flux latéral (LFIA pour *Lateral Flow Immunochromatographic Assay*) sont les représentants les plus connus de cette catégorie. Ils seront développés plus en détails dans la suite de ce travail. Il faut noter que, depuis peu, des formes plus complexes de dispositifs à support papier sont créées à partir de techniques diverses (Maffert et al. 2017) comme la photolithographie, l'impression à partir de cire ou le découpage laser, comme l'illustre la **Figure 5**.

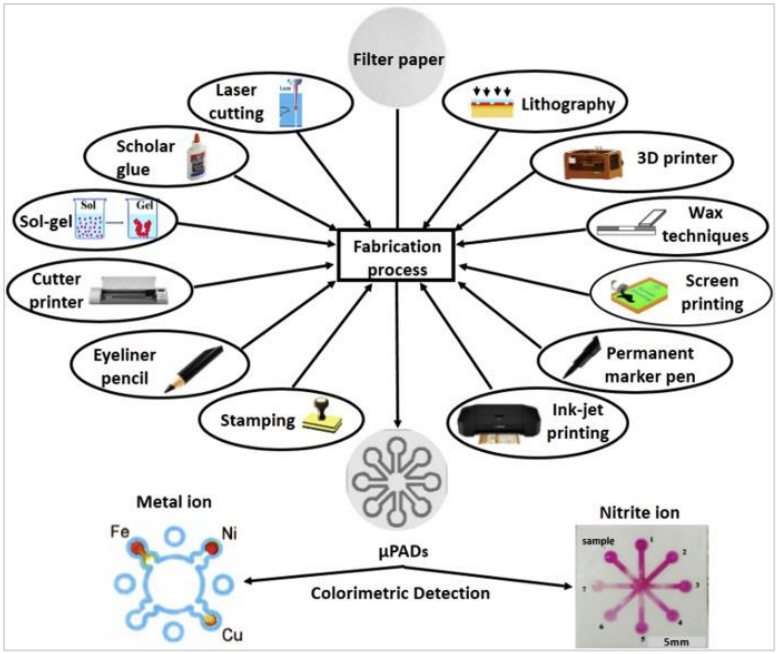


Figure 5. Différentes techniques pour la fabrication de dispositifs de détection antigénique à support papier. D'après Sriram et al. 2017.

Dans des applications notamment de détection de pathogènes dans la nourriture ou dans l'environnement, les techniques dites NALFIA et NALF émergent. Elles combinent un test rapide à flux latéral avec une PCR utilisant des amorces marquées. Cela permet de se passer de thermocycleurs coûteux de PCR en temps réel ou encore d'éviter de faire des électrophorèses pour révéler le résultat. Dans la pratique, après réalisation de la PCR, on dépose une goutte des produits de PCR sur une bandelette réactive à flux latéral. Dans la technique NALFIA (*Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay*), la ligne test est composée d'un anticorps et d'un amplicon marqué. Dans ce cas, une séquence d'ADN amplifiée spécifique à un organisme cible peut être détectée en utilisant des amorces avec deux étiquettes différentes (par exemple, la biotine et l'isothiocyanate de fluorescéine). L'analyte transporté par des nanoparticules d'or marquées à l'avidine est reconnu en se liant à un anticorps spécifique de l'étiquette (anticorps anti-fluorescéine) préalablement pulvérisé sur la ligne test. Il existe aussi le format NALF pour *Nucleic Acid Lateral Flow*. C'est le même principe mais sans réaction antigène-anticorps sur la ligne test. Le signal provient d'une hybridation spécifique des acides nucléiques des produits de PCR avec des sondes complémentaires (de type biotine/streptavidine) immobilisées sur la ligne test.

4. Les tests rapides immunochromatographiques à flux latéral (LFIA)

Les tests rapides immunochromatographiques à flux latéral sont maintenant utilisés dans de nombreux domaines comme la santé (détection de bactéries, de virus, de champignons, de biomarqueurs cancéreux, de drogues …), la sécurité alimentaire (allergènes, pathogènes, substances chimiques …), contrôle de l'environnement (pathogènes, pureté de l'eau …). Nous nous focaliserons sur le domaine des maladies infectieuses.

Les tests LFIA sont destinés à être réalisés rapidement (jusqu'à 60 minutes), à proximité du patient/du prélèvement. Ces tests peuvent être utilisés par un personnel non qualifié, voire non-professionnel de santé. Le premier test sur bandelettes a été créé par Leuvering et al. en 1980, et était un test de grossesse détectant l'hormone chorionique gonadotrope humaine.

A l'avantage des LFIA, ils sont simples d'utilisation, souvent en une seule étape. Cela permet aux personnes non-spécialistes de pouvoir les réaliser. Ils ne nécessitent pas d'infrastructures particulières et peuvent être souvent faits au lit du patient. Ils sont robustes, avec des dates de péremption variant entre 1 à 2 ans à température ambiante. Les réactifs ne nécessitent pas forcement de chaine du froid, ce qui est appréciable dans les pays tropicaux à ressources limitées. Les déchets produits sont minimes. Ils sont aussi accessibles car moins chers que les autres techniques. Enfin, ils accélèrent la prise en charge du patient permettant un traitement adapté plus précoce.

Au passif des tests LFIA, ils sont beaucoup moins sensibles que les tests moléculaires. Souvent, ils restent uniquement qualitatifs ou au mieux semi-quantitatifs. On observe parfois des problèmes de migration, liés à la matrice d'échantillon (échantillons visqueux ou purulents) ou à un défaut ponctuel de fabrication. Ils sont très sensibles à l'humidité. Enfin, quand la lecture est visuelle, il peut y avoir des erreurs dans l'interprétation des résultats.

Nous allons voir dans un premier temps le principe de ces tests. Puis nous nous attacherons à décrire leur composition. Un rappel sur les anticorps, composant essentiel, sera ensuite proposé puis nous terminerons cette partie par des considérations sur les mécanismes d'attaches entre les anticorps et les particules utilisées pour fabriquer le test.

4.1 Principe des tests LFIA

Le principe de base est simple : un échantillon liquide (ou son extrait) contenant l'analyte d'intérêt se déplace par capillarité à travers différentes zones de bandes polymères sur lesquelles des molécules pouvant interagir avec l'analyte sont attachées. Une bandelette réactive à écoulement latéral typique est constituée de membranes superposées (appelées par la suite « tampons ») qui sont montées sur une carte support pour une meilleure stabilité et une meilleure manipulation. La **Figure 6** montre les différents composants de ces tests.

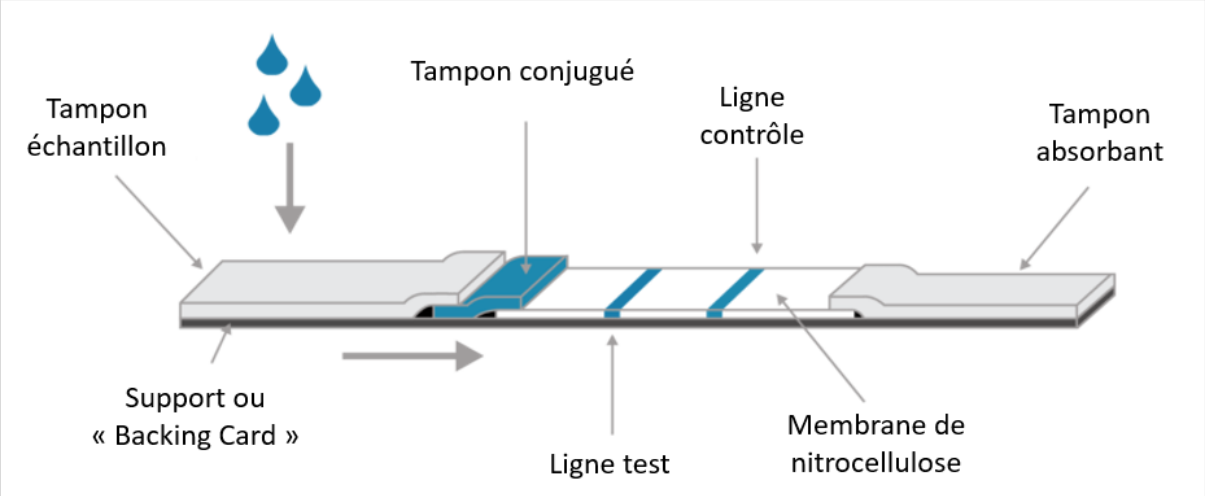


Figure 6. Représentation des différents éléments constituant un test rapide de type LFIA.

Repris et adapté de https://www.dcndx.com/lateral-flow-rapid-diagnostic-test/

L'échantillon est appliqué sur un tampon d'échantillon absorbant qui est imprégné de sels tampons et d'agents tensioactifs qui rendent l'échantillon approprié pour une interaction avec le système de détection. Le tampon d'échantillon permet de s'assurer que l'analyse présente dans l'échantillon est capable de se lier aux conjugués. L'échantillon traité migre à travers le tampon conjugué, qui contient des anticorps spécifiques à l'analyte cible conjugués à des particules colorées ou fluorescentes - le plus souvent des colloïdes d'or. L'échantillon et l'anticorps conjugué lié à l'analyte cible migrent le long de la bande dans la zone de détection. Il s'agit d'une membrane poreuse, généralement composée de nitrocellulose, avec des composants biologiques spécifiques (principalement des anticorps ou des antigènes) immobilisés sur des lignes. Leur rôle est de réagir avec l'analyte lié à l'anticorps conjugué. La reconnaissance de l'échantillon analysé donne une réponse appropriée sur la ligne de test, tandis qu'une réponse sur la ligne de contrôle indique le bon écoulement de liquide à travers la bandelette. La lecture, représentée par les lignes apparaissant avec des intensités

différentes, peut être évaluée à l'œil nu ou à l'aide d'un lecteur dédié. Afin de tester plusieurs analytes simultanément dans les mêmes conditions, des lignes de test supplémentaires d'anticorps spécifiques à différents analytes peuvent être immobilisées. Le liquide traverse le dispositif en raison de la force capillaire du matériau en bande et, pour maintenir ce mouvement, un tampon absorbant est fixé à l'extrémité de la bande. Le rôle du tampon absorbant est d'évacuer les excès de réactifs et d'empêcher le reflux du liquide.

4.1.1 Les différents formats de LFIA

Deux formats de LFIA peuvent être construits (**Figure 7**) : le format direct (ou sandwich) et le format indirect (ou compétitif).

Le format direct (ou sandwich). Il est généralement utilisé pour détecter des analytes plus volumineux ayant au moins deux sites de liaison. Habituellement, un anticorps dirigé contre un site de liaison est conjugué à la nanoparticule et un anticorps dirigé contre un autre site de liaison est utilisé pour la ligne test. Si la particule d'intérêt est présente dans l'échantillon, celle-ci se lie à la fois au conjugué anticorps-nanoparticule et à l'anticorps sur la ligne test, produisant un signal positif. Le format en sandwich donne une intensité de signal sur la ligne test directement proportionnelle à la quantité d'analyte présente dans l'échantillon. Indépendamment de la quantité d'analyte dans l'échantillon, un anticorps anti-espèce situé sur la ligne de contrôle se lie à la nanoparticule, produisant ainsi un signal de ligne de contrôle puissant démontrant que le test fonctionne correctement et que l'échantillon a bien été introduit.

Le format indirect. Le format compétitif est utilisé pour détecter les cibles lorsque des paires d'anticorps ne sont pas disponibles ou si la cible est trop petite tels que des stéroïdes et des médicaments. Dans ce format, la ligne test contient la molécule recherchée, généralement un complexe protéine-analyte, et le tampon conjugué contient le conjugué de détection anticorps-nanoparticule. Si la molécule cible est présente, elle se lie au conjugué de détection, ce qui l'empêche ensuite de se lier au niveau de la ligne test. Il n'y a pas de signal sur la ligne test. Si la molécule cible n'est pas présente, les conjugués présents sur le tampon conjugué se lient à l'analyte sur la ligne test, produisant un signal. Dans le format compétitif, l'intensité du signal est inversement proportionnelle à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon. Comme dans le format sandwich, la ligne de contrôle lie le conjugué

nanoparticule avec ou sans la molécule cible, ce qui garantit que le test fonctionne correctement.

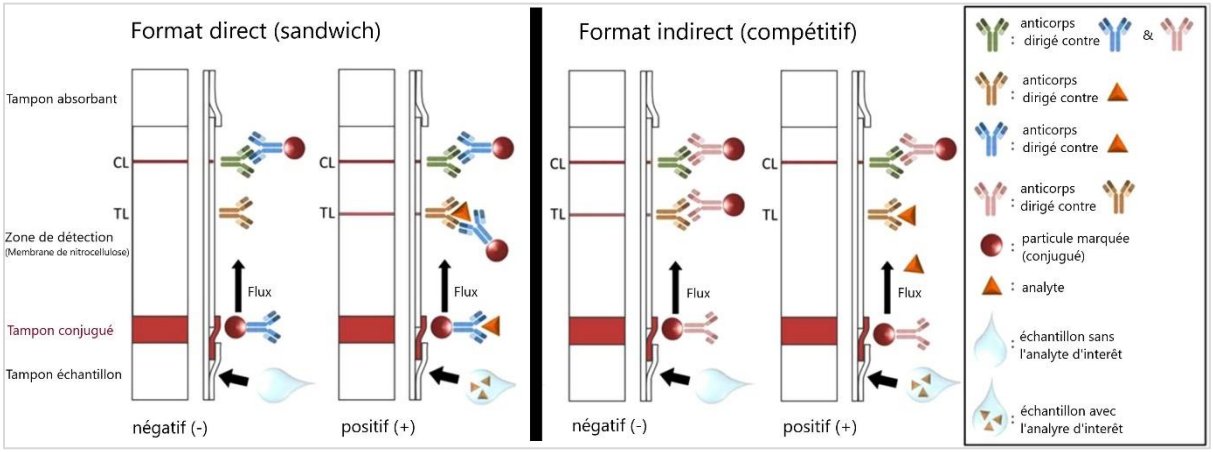


Figure 7. Les deux formats de tests rapides immunochromatographiques à flux latéral.

Repris et adapté de Quesada-González & Merkoçi (2015).

4.1.2 Lecture des résultats

De nombreux moyens de lire les résultats existent. On distingue des lectures colorimétriques, fluorescentes, électrochimiques ou encore hybrides (Banerjee & Jaiswal 2018).

Dans le cas des nanoparticules d'or ou d'autres conjugués produisant des couleurs, une analyse qualitative ou semi-quantitative peut être effectuée par inspection visuelle des couleurs sur les lignes test et de contrôle. Le principal avantage de ce système est une lecture rapide avec une réponse de type oui/non. Des lecteurs analytiques peuvent être utilisés pour quantifier la réponse. L'image visuelle du test LFIA peut être numérisée et analysée à l'aide d'instruments et de logiciels commerciaux.

Les colorants fluorescents ou les particules paramagnétiques ne peuvent pas être détectés directement à l'œil nu et nécessitent des lecteurs dédiés pour l'analyse qualitative ou quantitative. De plus, les méthodes de détection automatisées offrent des avantages par rapport à la lecture à l'œil nu en termes de consommation de temps, d'interprétation des résultats et d'ajustement des variables. Les lecteurs de téléphones portables sont devenus un instrument populaire pour développer des lecteurs applicables dans les pays en développement (Vashist et al. 2015).

4.2 Les membranes

Les membranes (aussi appelées « PAD » en anglais) constituent les éléments principaux des tests LFIA. Les différents PAD sont faits avec des matériaux poreux souvent non tissés, par exemple la fibre de verre ou encore la cellulose. Il y a des paramètres importants à prendre en compte pour la sélection des membranes comme la taille des pores (pour une membrane en nitrocellulose par exemple). Les pores étant répartis de manière inégale (en raison du processus de fabrication), un paramètre appelé le temps d'écoulement capillaire est essentiel pour une bonne sélection du matériau. Le temps d'écoulement capillaire est le temps nécessaire pour que le liquide se déplace complètement et remplisse complètement la membrane. D'autres paramètres importants à prendre en compte sont, entre autres, la facilité de liaison des protéines et la capacité d'immobilisation des protéines.

4.2.1 Le tampon échantillon

Également appelé « sample pad », le tampon échantillon est la porte d'entrée de l'échantillon dans le test. Le but du tampon échantillon est de moduler toute la variabilité chimique (notamment le pH) entre l'échantillon et le système de détection, de répartir uniformément l'échantillon et de le diriger vers le tampon conjugué. En effet, dans certaines matrices d'échantillons comme la salive ou encore l'urine, la composition peut varier et interférer avec le système de détection. Pour cela, il est généralement imprégné de sels tampons, de protéines, de tensioactifs et d'autres liquides pour contrôler le débit de l'échantillon et le rendre apte à l'interaction avec le système de détection. Si l'analyte d'intérêt est présent dans l'échantillon, il doit être capable de se lier aux réactifs de capture et à la membrane. De plus, les pores du tampon d'échantillon peuvent agir en tant que filtre afin d'éliminer les matériaux redondants, par exemple les cellules sanguines réduites. Le tampon échantillon retient les particules indésirables tout en permettant au fluide contenant l'analyte de s'écouler à travers la bandelette.

Les principales caractéristiques à prendre en compte sont au nombre de deux :

- l'épaisseur/le poids : une membrane plus épaisse a un volume de rétention plus grand et permet donc un volume d'échantillon plus grand.

- le matériau : fibre de cellulose ou de verre ; la fibre de cellulose est plus efficace sur des grands volumes d'échantillon, a une résistance plus faible et est utilisée pour les prétraitements avec tampons et réactifs de blocage ; la fibre de verre a globalement les caractéristiques inverses.

4.2.2 Le tampon conjugué

A partir du tampon échantillon, le liquide échantillon est ensuite transféré sur le tampon conjugué, également appelé « conjugate pad ». Le rôle principal de ce dernier est de fixer les particules (nanoparticules d'or liés à des anticorps par exemple) du détecteur et de les maintenir fonctionnellement stables jusqu'à ce qu'elles soient remises en suspension par l'échantillon. Les matériaux utilisés sont la fibre de verre ou encore à la fibre de cellulose.

Les caractéristiques principales à considérer sont l'épaisseur et la densité. Ces 2 facteurs contribuent au volume dit « de rétention », essentiel pour l'absorption et la libération du conjugué. Lorsque le liquide se déplace à travers la membrane, les particules du détecteur doivent être libérées rapidement, et tout doit être mis en œuvre pour que la répartition des particules du détecteur dans le tampon conjugué soit uniforme. Cela est rendu possible par la composition du tampon conjugué contenant des glucides (tels que le saccharose) qui sert de conservateur et d'agent de resolubilisation. Lorsque les particules conjuguées sont séchées en présence de sucre, les molécules de sucre forment une couche autour d'elles stabilisant leur structure biologique. Lorsque l'échantillon pénètre dans le tampon conjugué, les molécules de sucre se dissolvent rapidement, entraînant les particules dans le flux de fluide.

4.2.3 La membrane de nitrocellulose

La membrane de nitrocellulose est l'une des parties les plus critiques d'un test LFIA. En effet, c'est à sa surface que se forment les complexes immunologiques et que le signal est détecté. Cette membrane est le matériau qui détermine le débit de migration de la cassette et donc le temps requis pour avoir un résultat. En effet, au moment du choix de la membrane de nitrocellulose, la caractéristique principale à prendre en compte est l'écoulement capillaire (« *wicking time* » en anglais). Il s'agit du temps nécessaire pour un liquide de migrer et remplir totalement une bande de membrane. Ce temps détermine le bon fonctionnement d'une bandelette et la sensibilité du système de détection. Il est inversement proportionnel au débit capillaire, défini comme la distance parcourue par unité de temps. Le débit décroît de façon

exponentielle à mesure que le front de migration remonte sur la membrane, rendant sa mesure difficile car il change constamment. Ce débit capillaire est lié à la taille des pores de la membrane. A mesure que ceux-ci augmentent, le débit de la membrane augmente. Suivant les types de membranes, le fabricant donnera le temps d'écoulement capillaire. Plus l'écoulement capillaire sera lent, plus le test sera sensible mais plus le test prendra du temps (**Tableau 1**).

Tableau 1. Relation entre taille des pores des membranes, vitesse de migration et sensibilité dans un test LFIA.

Taille des pores de la membrane	Vitesse de migration (écoulement capillaire)	Sensibilité du test à flux latéral
Grands	Rapide	Basse
Intermédiaires	Intermédiaire	Intermédiaire
Petits	Lent	Haute

Un autre facteur important est l'épaisseur de la membrane. Cette épaisseur, déterminée par le volume des pores, agit sur le volume de liquide nécessaire pour saturer la membrane. Elle peut affecter la distribution des réactifs de capture sur la membrane, ou encore, quand la membrane est compressée (par exemple dans des tests de type cassette avec un boitier en plastique), la variation peut entrainer un écrasement de la membrane et des tampons.

La nitrocellulose étant hydrophobe, elle a une capacité d'adsorption élevée pour les protéines. Les membranes faites pour les tests LFIA adsorbent généralement plus de 100 mg d'IgG/cm^2. Aux concentrations de réactifs de capture normalement appliquées, la capacité de liaison est 5 à 10 fois plus importante que nécessaire. Cette capacité d'adsorption diminue avec le poids moléculaire de la protéine. Un signal faible, souvent interprété comme une liaison protéique faible, est généralement dû à une interaction chimique qui interfère avec l'adsorption de la nitrocellulose ou qui favorise la désorption. Pour corriger cela, les anticorps et autres protéines doivent être appliqués sur la membrane dans des tampons sans sels, tensioactifs ou sucres. Des agents de blocage peuvent être utilisés pour améliorer les caractéristiques d'écoulement de la membrane, comme des surfactants, pour les rendre

humides et uniformiser la membrane. En effet, les échantillons testés (urines, sang, salive …) sont en général bien différents de l'eau que les fabricants utilisent pour leurs contrôles qualité. Ces échantillons s'écoulent bien souvent à des vitesses plus faibles. De plus, l'application des réactifs de capture (le plus souvent des anticorps formant les lignes test et contrôle) sur la membrane, crée des zones avec un environnement chimique différent à cause des sels, tampons ou autres additifs utilisés pour la conception de ces réactifs de capture. L'échantillon ne peut plus traverser avec la même efficacité toute la membrane. Le fait de « bloquer » la membrane permet d'améliorer l'écoulement à travers celle-ci.

L'application des réactifs de captures (anticorps) sur la membrane se fait le plus souvent avec un automate de distribution par dépôt ou pulvérisation assistée (**Figure 8**). Cet appareil permet de répandre les réactifs avec ou sans contact (en les transformant en de minuscules gouttelettes) afin de les répartir uniformément en une bande sur la membrane. La méthode manuelle est possible mais est beaucoup moins précise et donne des résultats souvent non reproductibles d'une bandelette à une autre. Les paramètres importants à prendre en compte sont la concentration de réactifs, la vitesse de distribution et le taux de distribution.

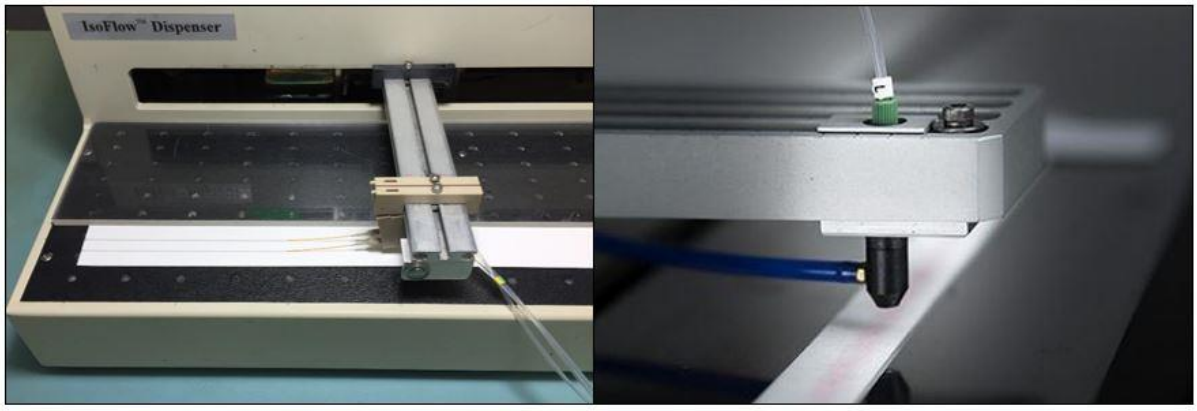


Figure 8. Exemples d'automates permettant le dépôt de réactifs sur membrane. A gauche, l'automate IsoFlow™ Dispenser (Imagene Technology) place les réactifs par dépôt direct. A droite, l'automate µAirJet™ (BioDot) les place par pulvérisation. *Source : https://nanocomposix.com/pages/nitrocellulose-membrane-selection-and-striping-for-lateral-flow-assays#target et https://www.biodot.com/lateral-flow/*

4.2.4 Le tampon absorbant

La fonction du tampon absorbant, également appelé « wicking pad », est de faire passer l'échantillon à travers la membrane et de collecter le liquide traité. Le volume de capture de toute membrane est donné et le fait d'avoir un tampon absorbant à l'extrémité de la bandelette réactive peut augmenter le volume de l'échantillon pouvant être acheminé sur la membrane car elle agit comme une éponge pour le volume supplémentaire. Ainsi ce matériau permet d'utiliser des volumes d'échantillons plus importants. La sélection correcte du tampon absorbant minimisera le reflux de tout excès de réactif et fournira une lecture agréable du test. La présence du tampon absorbant peut réduire les résultats non spécifiques et les problèmes de sensibilité. En effet, le volume supplémentaire qui traverse la ligne de test élimine les complexes non spécifiques (qui sont faiblement liés à la ligne de test) et permet une augmentation de la concentration totale d'échantillon qui passe sur les bandes du test. Ainsi cela accroît la sensibilité du test.

Les tampons absorbants les plus populaires sont constitués en cellulose. Les caractéristiques à prendre en compte pour le choix du tampon absorbant sont les mêmes que pour le tampon échantillon : épaisseur, poids, résistance, matériau. En général, ils sont en fibres de cellulose, matériau qui a une grande capacité de rétention.

4.2.5 Le support et la cassette

Les deux derniers éléments servent à soutenir les autres composants. Le support appelé aussi « backing card » est une partie plus rigide qui permet de soutenir les autres membranes, et de les rassembler. Généralement fait en vinyle, il possède un côté adhésif permettant aux autres parties de venir se fixer dessus pour solidifier l'ensemble. La cassette, quant à elle, est composée de plastique et permet de maintenir et protéger les composants en place. Elle permet une saisie « sécurisé » du dispositif, évitant ainsi la contamination des membranes. La cassette permet aussi de contrôler le débit en appliquant une pression en des points appropriés sur la bande afin de garantir que tout le fluide passe à travers la bande avec le même débit.

4.2.6 L'assemblage : une histoire d'optimisation

Beaucoup de paramètres rentrent en compte pour faire un bon test LFIA. La qualité, et le choix des membranes et des réactifs de marquage sont primordiaux, ainsi que la taille de

chaque composant et des différents traitements chimiques subis. La position des éléments (autant des membranes que des lignes tests et contrôles) peut faire varier les résultats. Tous ces paramètres rentrent en compte dans l'optimisation finale du test. Mais des aspects plus physiques rentrent aussi en considération comme la capillarité, le phénomène d'interaction qui se produit aux interfaces entre un liquide et une surface dans notre cas. L'écoulement du liquide peut être caractérisé par le nombre *Re*, appelé nombre de Reynolds (Reynolds 1983). Il représente le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité. Il est défini par :

$Re = \frac{\rho V L}{\mu}$, où ρ est la masse volumique du fluide, *V* la vitesse du fluide, *L* la taille du système et μ la viscosité du fluide.

Les tests à flux latéral ont normalement un nombre de Reynolds bas (inférieur à 1), ce qui signifie que le flux progresse de manière continue, relativement stable et donc de façon laminaire (**Figure 9**).

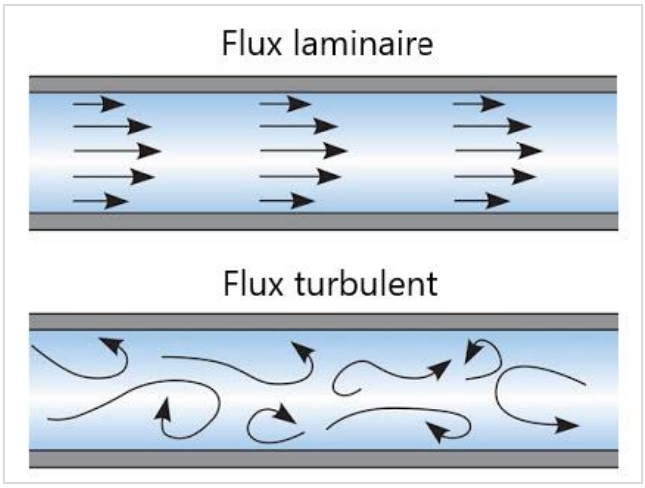


Figure 9. Différence entre un flux laminaire et un flux turbulent. Le flux laminaire a un nombre de Reynolds bas, et le flux turbulent un nombre élevé. *Source : https://www.theengineeringconcepts.com/laminar-flow-vs-turbulent-flow/*

Pour finir, un test peut paraître idéal au moment de la preuve de concept mais ne pas donner les mêmes résultats dans le temps. Il faut alors revoir l'optimisation, parfois de chaque paramètre un par un, pour satisfaire le besoin initial.

4.3 Les anticorps

Composants essentiels dans les tests rapides immunochromatographiques à flux latéral, les anticorps permettent la détection des antigènes potentiellement présents dans l'échantillon. Les anticorps sont des glycoprotéines sécrétées par des cellules dérivées des lymphocytes B, les plasmocytes. Ils sont aussi connus sous le nom d'immunoglobulines (Ig). Leur rôle est clé dans le système immunitaire puisqu'ils permettent notamment la neutralisation de certains agents pathogènes.

4.3.1 Structure

Les anticorps sont composés de quatre polypeptides. Deux copies identiques de chaînes lourdes (~ 55 kDa) et deux copies identiques de chaînes légères (~ 25 kDa) reliées entre elles par des ponts disulfures et des liaisons non-covalentes. Il existe 2 types de chaînes légères (κ et λ) et 5 types de chaînes lourdes (α, δ, ε, γ, et μ) qui définissent l'isotype de l'Ig. Les chaines sont composées de « domaines immunoglobulines ». En général, 4 domaines immunoglobines forment une chaîne lourde et 2 domaines immunoglobulines forment une chaine légère. La représentation finale de ces arrangements est le plus souvent une structure en forme de Y d'environ 150 kDa (**Figure 10**).

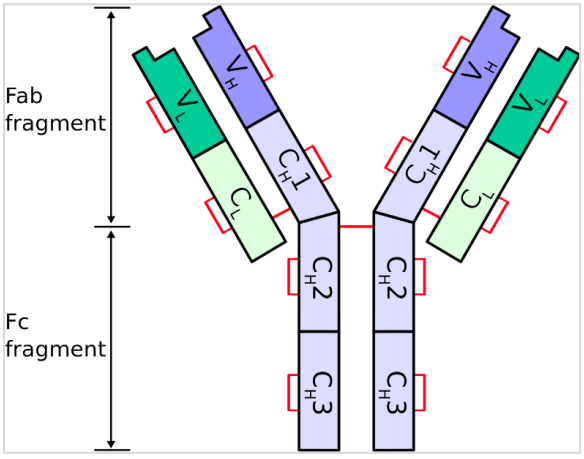


Figure 10. Représentation d'une immunoglobuline (de type G) et de ses différents domaines. (Source : Wikipédia). *Les chaînes lourdes sont en violet et les chaînes légères en vert. Les domaines constants sont CH1, CH2 CH3, CL. Les domaines variables sont VL et VH. Les éléments représentés en rouge sont les ponts disulfures.*

La chaîne légère est composée d'un domaine constant et d'un domaine variable. La chaîne lourde est composée, quant à elle, de trois (ou 4 suivant l'isotype) domaines constants et d'un domaine variable. Les domaines variables sont composés de 3 régions appelées CDR (*Complementarity Determining Regions*). Les CDR de la chaîne lourde et de la chaine légère forment à leur extrémité, le paratope, site de fixation de l'épitope antigénique (zone de l'antigène qui se fixe à l'anticorps).

L'immunoglobuline est composée de plusieurs fragments :

- le fragment Fab (*Fragment antigen binding*), composé de la chaîne légère et de la partie supérieure de la chaîne lourde ; c'est le site de reconnaissance de l'antigène.
- le fragment Fc (fragment cristallisable) a quant à lui des fonctions effectrices ; il permet à l'immunoglobuline d'être reconnue par les acteurs de l'immunité et à activer le complément. Le fragment Fc est composé des fragments constants des chaines lourdes (cf. **Figure 10**) ;
- le fragment Fv est constitué uniquement des régions variables de l'anticorps ; cette partie a la même affinité pour l'antigène que l'anticorps complet, puisqu'il est le support des CDR ;
- le fragment F(ab')2 est composé de l'association des fragments Fab et d'une petite portion des parties constantes des chaînes lourdes.

Chez les mammifères, on trouve 5 classes d'Ig : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Les IgG et IgA sont sous-divisées en sous-classes, se référant à leur isotype, à cause de polymorphismes dans les régions conservées de la chaîne lourde (**Tableau 2**).

Tableau 2. Les différentes classes d'immunoglobulines.

	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
Forme					
Chaîne lourde	α	δ	ε	γ	μ
Sous-classe	IgA1 et IgA2	-	-	IgG1 à IgG4	-
Poids moléculaires (KDa)	160 à 500	185	190	150	950
Localisation	Muqueuses Sécrétions	Lymphocytes B	Basophiles Mastocytes	Lymphocytes B Sang	Lymphocytes B Sang
Proportion dans le sérum	15 à 20 %	< 1 %	< 1 %	70 à 75 %	10 %
Rôles	Agglutination Neutralisation bactéries et virus	Activation des lymphocytes B	Allergies Neutralisation de parasites	Neutralisation toxines, bactéries et virus Fixe le complément	Agglutination Fixe le complément

4.3.2 Les différents types d'anticorps

4.3.2.1 Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (mAbs) sont des anticorps produits par un seul clone de lymphocytes B. Dans les années 1970, Köhler et Milstein ont conçu une technique (**Figure 11**) destinée à générer des anticorps monoclonaux d'une spécificité souhaitée (Köhler 1975). Cette découverte leur a valu le prix Nobel de médecine en 1984. La technique consiste à fusionner des cellules B spléniques et des cellules de myélome pour créer une cellule appelée hybridome, possédant à la fois la capacité de produire l'anticorps spécifique issue de la cellule B splénique et la capacité d'être « immortelle » du fait de son origine cancéreuse. Cette technique a révolutionné la médecine et bon nombre d'applications actuelles en résultent. Cette production est en général réalisée chez la souris.

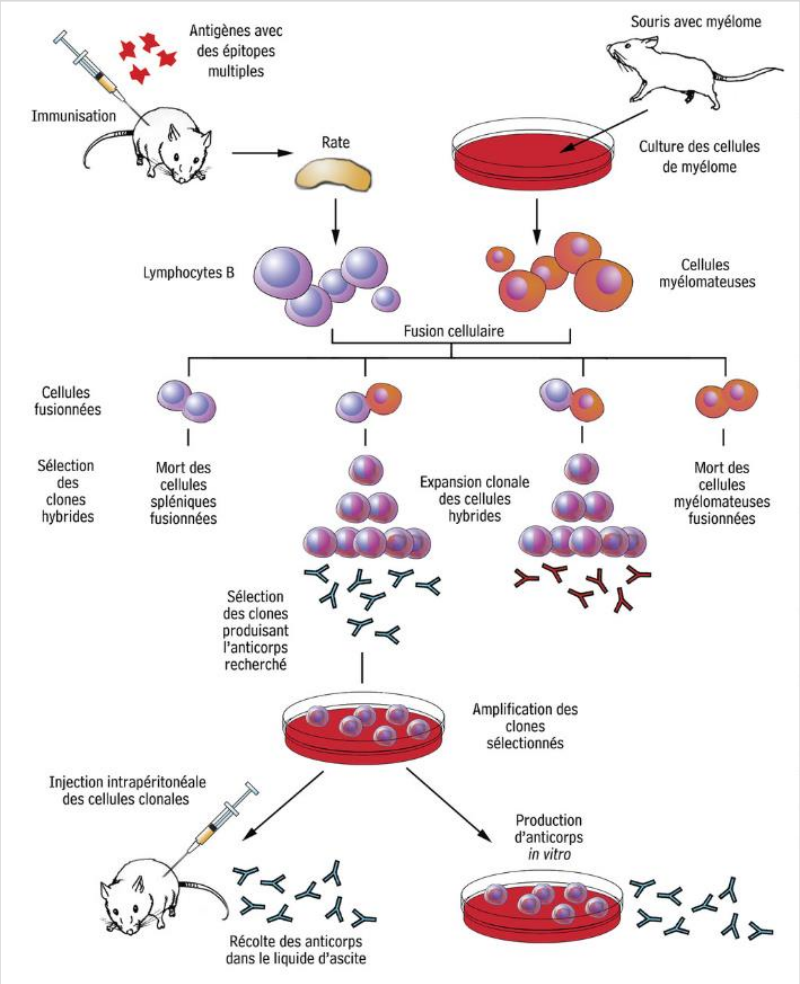


Figure 11. Production des anticorps monoclonaux. *Crédit : Roselyne L'Italien, Immunohématologie, page 53, année 2008, Editeur : CCDMD (Centre collégial de développement de matériel didactique – www.ccdmd.qc.ca).*

La particularité des mAbs est de cibler un seul épitope. Les anticorps monoclonaux sont utilisés dans les activités diagnostiques mais aussi en thérapeutique. En effet, ces dernières années, les anticorps monoclonaux thérapeutiques se sont considérablement développés avec l'avènement des anticorps humanisés (Morrisson et al.1984 ; Jones et al. 1986).

4.3.2.2 Anticorps polyclonaux

Un anticorps polyclonal (pAb) est un anticorps pouvant réagir avec plusieurs épitopes différents à partir du même antigène. Cela permet d'augmenter la capacité de détection de l'anticorps pour l'antigène. Un avantage non négligeable des pAbs est leur tolérance à des changements mineurs de la structure de l'antigène. Pour obtenir des anticorps polyclonaux, on immunise un animal avec l'antigène d'intérêt. Le sérum immun est ensuite purifié. Un choix important est celui de l'espèce produisant les pAbs car celle-ci déterminera la quantité et la qualité d'anticorps récupérée à la fin du processus. Les espèces les plus utilisées sont le lapin, la souris, le rat, le mouton, la chèvre. Les facteurs déterminant le choix de l'animal sont la quantité d'anticorps souhaitée (plus l'animal est gros, plus il génère des pAbs) et la quantité d'antigène disponible (plus l'animal est gros, plus il faut d'antigènes pour avoir une réponse immune).

4.3.2.3 Anticorps V_HH

Aussi appelés « nanobodies », ce sont des anticorps à domaine unique présents chez certaines espèces de camélidés (lamas, alpagas, chameaux, dromadaires). Ces fragments d'environ 15 kDa sont isolés à partir des domaines variables des chaînes lourdes de certains animaux comme le lama ou le chameau (**Figure 12**).

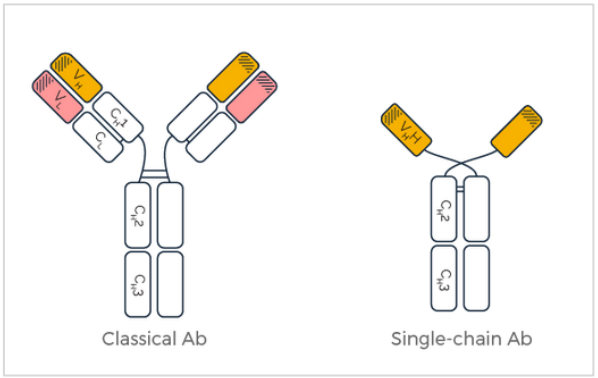


Figure 12. Représentation d'un anticorps classique de type IgG et d'un anticorps de lama.

CH1, CH2, CH3, CL correspondent aux domaines constants. VH, VL et V_HH correspondent aux domaines variables. Source : http://antibodymanufacturing.eurogentec.com/vhh-antibody-fragments-heavy-chain-antibodies/

Les avantages de ces anticorps sont les suivants : stabilité aux pH extrêmes, grande solubilité, stabilité thermique, petite taille qui leur permet d'atteindre des épitopes « cachés » non accessibles aux anticorps classiques. Dans des applications thérapeutiques, le V_HH (Variable Heavy of Heavy chain antibody) a des propriétés de pénétration tissulaire élevée et est rapidement éliminé de la circulation. Certains V_HH peuvent même franchir la barrière hémato-encéphalique.

Pour obtenir des V_HH, on immunise des animaux, on récupère et isole les cellules d'intérêt, on clone ensuite via la biologie moléculaire les V_HH dans des plasmides, puis on utilise une technique appelée la phage display (**Figure 13**) pour faire le criblage des anticorps d'intérêt.

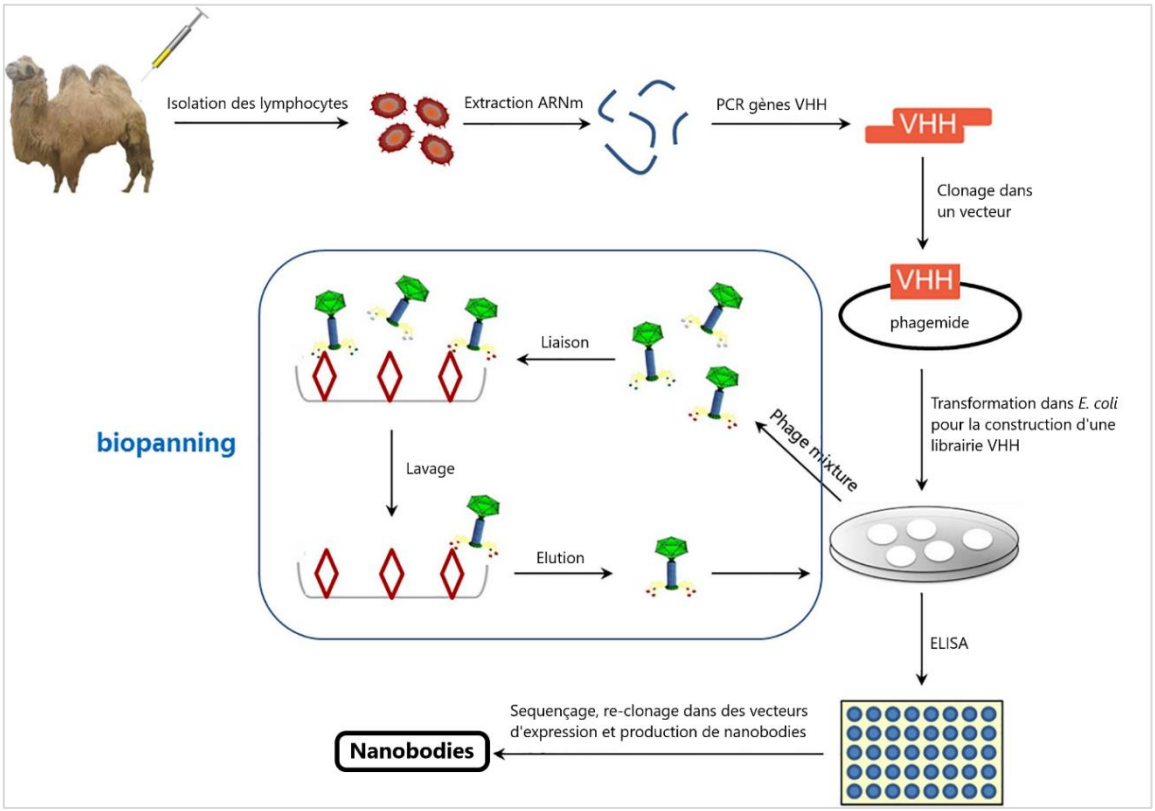


Figure 13. Méthode de sélection des V_HH à partir d'un camélidé via la technique du phage display. *Adapté et traduit de Liu et al. 2018.*

4.3.2.4 Aptamères

Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques simple brin. Découverts en 1990 (Tuerk 1990), les aptamères sont synthétisés *in vitro* via une méthode appelée SELEX (*systematic evolution of ligands by exponentiel enrichment*) et sont de plus en plus utilisés pour remplacer les anticorps. Le coût des aptamères est très inférieur à celui des anticorps. Leur conjugaison à des nanoparticules comme l'or est très efficace. Les aptamères sont également utilisés en tant que molécules de capture et de détection dans les LFIA, notamment pour la détection de l'allergène β-conglutine (Jauset-Rubio et al. 2016) ou encore de l'hormone 17β-estradiol (Alsager et al. 2017). Le nombre de tests LFIA à base d'aptamères publiés reste cependant très limité et il n'existe à ce jour aucun test rapide à flux latéral de ce type qui soit commercialement disponible, ce qui peut être dû à la nouveauté de cette application et au petit nombre d'aptamères sur le marché. Par rapport aux anticorps, les aptamères sont tout aussi spécifiques, peuvent être modifiés aisément et ne demandent pas de conditions de stockage particulières.

4.3.3 Sélection des anticorps pour les tests rapides

Les avantages et inconvénients sont listés dans le **Tableau 3**. La nature spécifique des anticorps a des conséquences sur la préparation du conjugué et son immobilisation sur la membrane. Actuellement, les anticorps monoclonaux ont tendance à être préférés. Du fait de leur nouveauté, il faudra quelques années avant de voir des tests LFIA adaptés à partir de V_HH ou d'aptamères de façon commerciale. Concernant les anticorps polyclonaux, les principaux inconvénients sont (i) de ne pas savoir si l'anticorps purifié la première fois sera le même lors des autres productions ; (ii) que l'exigence de volume n'est pas prévisible ; (iii) que la validation d'un lot d'anticorps polyclonal alternatif est coûteuse et peut impliquer de réoptimiser d'autres éléments du test à flux latéral pour les faire correspondre au nouveau lot. De plus, il peut être nécessaire de devoir évaluer plusieurs lots pour obtenir le résultat le plus proche.

Tableau 3. Comparaison des avantages et inconvénients des différents types d'anticorps.

	Monoclonal	Polyclonal	V_HH	Aptamère
Avantages	Reproductibilité lot-à-lot Approvisionnement illimité Moins de bruit de fond que les polyclonaux	Moins cher à produire Haute affinité Peut reconnaitre de multiples épitopes Plus grande tolérance aux variations d'antigène	Reproductibilité lot-à-lot Approvisionnement illimité Stabilité Spécificité Bas poids moléculaire (15 kDa)	Reproductibilité lot-à-lot Stabilité thermique Bas poids moléculaire (13-26 kDa) Synthèse chimique à faible coût
Inconvénients	Peut-être trop spécifique (par exemple entre 2 espèces très similaires) Quantité d'anticorps Délai d'obtention (nouveau développement) Coût plus élevé	Variabilité lot-à-lot Quantité importante d'anticorps non-spécifiques qui peuvent interférer avec un bruit de fond Epitopes multiples = importance de surveiller les réactions croisées Peut requérir une purification plus intense	Coût de développement Production plus compliquée avec de grands espaces pour élever les animaux Gestion des déchets plus compliquée avec notamment les phages	Sans modification chimique, ils sont très sensibles aux nucléases Nombre d'aptamères disponibles encore limités Technologie assez récente (qui est protégée par un brevet)

4.4 Les nanoparticules

De nombreuses nanoparticules peuvent être utilisées pour la construction de tests LFIA : colloïdes (or, carbone, argent), particules de latex, billes magnétiques, nanoparticules fluorescentes, quantum dots, liposomes chargés de colorants (Huang 2016). Chaque composé offre des avantages et des inconvénients mais les nanoparticules d'or (AuNPs) sont encore

très largement préférées. La plupart du temps, dans les tests immunochromatographiques, une liaison va être réalisée entre des anticorps et des AuNPs. L'or est un matériau inerte, facile à visualiser et à conjuguer. Les AuNPs sont accessibles, leurs propriétés sont connues depuis longtemps et elles sont assez simples à créer puisque qu'elles peuvent être facilement réalisées en laboratoire. Elles ont aussi l'avantage d'être non toxiques, et compatibles avec un grand nombre d'application (on les retrouve par exemple en microscopie électronique).

4.4.1 Synthèse des AuNPs

Il existe 2 voies majeures de synthèse des nanoparticules d'or : la voie chimique et la voie physique.

Concernant les méthodes chimiques, beaucoup existent et se basent sur la réduction de la molécule d'or (Au). Il existe une synthèse via la réduction d'acide chloroaurique ($HAuCl_4$) en présence de citrate de sodium dans l'eau, appelée méthode de Turkevich (1951) et Frens (qui l'a amélioré en 1970) (Turkevich et al. 1951 ; Frens 1973). Le citrate de sodium va jouer le rôle de stabilisateur et d'agent réducteur. En variant la quantité de citrate, on fait varier la taille des nanoparticules obtenues, en général de l'ordre de 10 à 20 nm. En 1994, Brust et al. ont développé une méthode permettant d'obtenir des nanoparticules stables de 1 à 5 nm de diamètre. $HAuCl_4$ va réagir avec le tétrahydruroborate de sodium ($NaBH_4$) qui va le réduire. On ajoute ensuite des radicaux thiols afin de stabiliser l'ensemble. En effet, le complexe Au-S possède une grande force de liaison.

Il existe aussi des méthodes de synthèse physiques ; cependant, elles mènent à des nanoparticules moins stables et donc moins intéressantes pour notre application. Ces méthodes consistent à fragmenter l'or massif via une ablation laser ou encore une irradiation ionique.

4.4.2 Liaisons des anticorps aux AuNPs

Ils existent plusieurs types d'interactions entre les nanoparticules d'or et les anticorps.

4.4.2.1 Interactions physiques

Ces interactions physiques existent via 3 phénomènes (a) l'attraction ionique entre l'or chargé négativement et les anticorps chargés positivement ; (b) l'attraction hydrophobe entre les parties hydrophobes de l'anticorps et la surface de la nanoparticule d'or ; (c) les liaisons datives entre les électrons des particules d'or et les composants sulfurés de l'anticorps

(comme les groupements amine présents sur les acides aminés des anticorps). Les anticorps sont adsorbés de façon spontanée et non spécifique sur les particules d'or stabilisées au citrate. Cette bioconjugaison utilise les modes d'interactions hydrophobes ou ioniques. L'interaction hydrophobe se fait grâce à l'attraction entre les parties hydrophobes de l'anticorps et la surface métallique qui entraine la formation d'une liaison non-covalente. Les groupes chargés positivement sont abondants dans les anticorps (comme les acides aminés chargés positivement et l'extrémité N-terminale). Les interactions ioniques se forment entre ces groupes et la surface des particules chargés négativement. Les modes de liaisons non covalentes ont plusieurs faiblesses incluant la nécessité d'avoir une forte concentration d'anticorps au départ et l'orientation aléatoire de l'anticorps à la surface de la nanoparticule ; à cause de l'attraction électrostatique, la réponse biologique est difficile à contrôler. Une faible interaction hydrophobe entre l'or et l'anticorps a été montrée, en plus de la présence d'une liaison or-sulfhydryle/or-amine entre les nanoparticules d'or et des résidus de cystéine/lysine présents sur l'anticorps.

Ce type de la liaison dépend énormément des changements de pH. Ce dernier détermine la charge et la stabilité du conjugué. De plus, le pH influence la surface couverte et la biofonctionnalité des protéines après le processus de conjugaison.

4.4.2.2 Interactions chimiques

Les problèmes rencontrés ci-dessus par les méthodes de couplage électrostatique telles que l'instabilité du conjugué et l'inactivation des IgG peuvent être résolus en utilisant des méthodes de conjugaison covalente.

Les interactions chimiques entre les anticorps et la surface des nanoparticules sont, elles, réalisées par (i) la chemisorption effectuée via les dérivés thiols ; (ii) l'utilisation d'agents de liaison bifonctionnels (chimie EDC/NHS) ; (iii) l'utilisation de molécules adaptatrices (comme le complexe streptavidine/biotine).

Il y a formation d'une liaison covalente entre la nanoparticule d'or et les groupes sulfhydryle libres de l'anticorps. On peut aussi utiliser des médiateurs de liaisons ou des molécules bifonctionnelles pour lier de façon covalente l'Ac à la nanoparticule d'or. En effet, les groupes fonctionnels présents à la surface des nanoparticules peuvent être convertis en d'autres groupes fonctionnels par des molécules bifonctionnelles. Les groupes carboxyliques

habituellement trouvés peuvent être mis à réagir avec des amines primaires au moyen d'une réaction de condensation pour donner des liaisons amides. Pour cette raison, un carbodiimide soluble dans l'eau (par exemple l'EDC) est habituellement utilisé (**Figure 14**). Après avoir formé un composé intermédiaire avec le fragment carboxylique, le groupe activé est réactif vis-à-vis des amines primaires. Dans le cas d'amines primaires présentes à la surface des particules, des composés ester actifs (N-hydroxysuccinimide; NHS) peuvent être utilisés pour former de manière égale des liaisons amides.

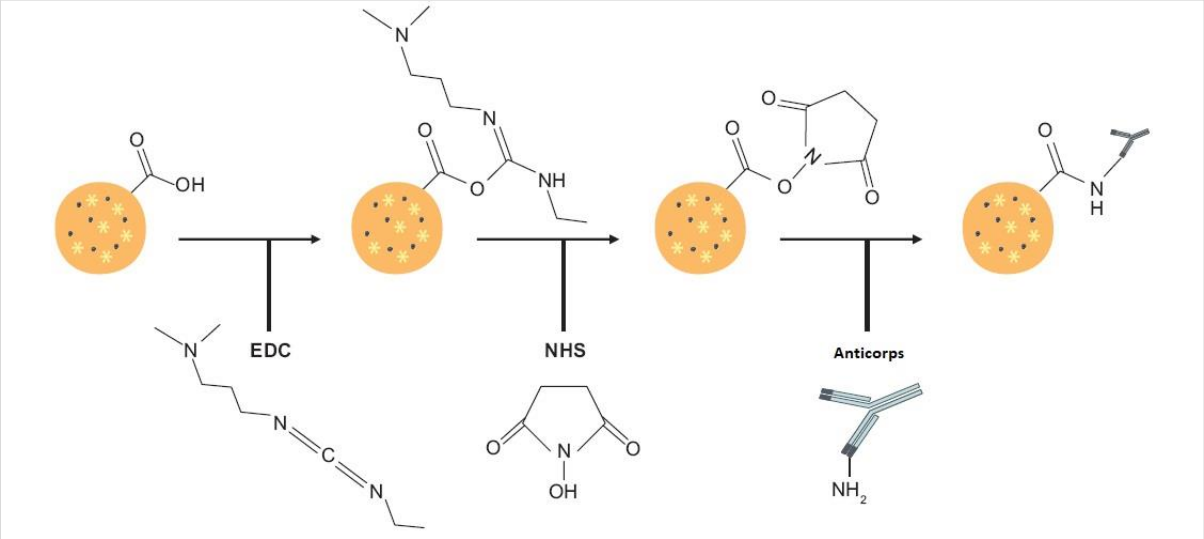


Figure 14. Représentation schématique du couplage d'une nanoparticule d'or avec un anticorps via la stratégie EDC/NHS. *Abréviations : EDC → 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide ; NHS → N-hydroxysuccinimide.*
(Repris et modifié de Moura et al. 2014).

5. Réglementation des tests immunochromatographiques

Dans la plupart des pays, avant la mise sur le marché, un test doit être conforme à la réglementation en vigueur du pays de commercialisation. Dans la pratique, il s'agit d'un certain nombre d'expériences à réaliser autant d'un point de vue analytique que clinique. On distingue deux grandes réglementations : la réglementation américaine et la réglementation européenne. Cette dernière sera plus amplement détaillée.

5.1 Réglementation américaine

Dans la réglementation américaine, les tests immunochromatographiques sont régulés par la Food and Drug Administration (FDA). Il en existe 3 classes (I, II et III) qui sont hiérarchisées en fonction du risque pour le patient. Plus la classe est élevée, plus le fabricant doit remplir d'exigences. En général, il doit appliquer les exigences de la réglementation partie 820 du CFR 21 (système qualité) et du dossier 510k (dossier technique). Parfois, l'approbation de mise sur le marché ou PMA (*Pre-Market Approuval*) est nécessaire si le matériel est de classe III, la plus exigeante. Dans la réglementation américaine, le fabricant doit prouver que son produit est équivalent à un autre dispositif officiellement commercialisé aux USA. Le fabricant doit aussi être présent « physiquement » sur le territoire américain pour y vendre son/ses produit(s) ou passer par un intermédiaire le cas échéant.

5.2 Réglementation européenne

Avant d'être commercialisé sur le marché européen, un produit doit être conforme aux exigences générales en matière de sécurité et de performances qui lui sont applicables. La réglementation applicable en Europe et en France pour les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* (DMDIV) est la directive 98/79/CE (Nom complet : directive 98/79/CE du Parlement Européen et du Conseil du 27 Octobre 1998 relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro). On distingue plusieurs classes de dispositifs pour les DMDIV :

- les dispositifs de l'annexe II et les autotests ; leurs dossiers sont contrôlés par des organismes notifiés avant leurs mise sur le marché :
    - annexe IIA → dispositifs de détermination de certains groupes sanguins, tests de dépistage de maladies infectieuses qui sont à risque élevé pour le patient comme HIV (1 et 2), les virus des hépatites (B, C, D) et HTLV (I et II) ;
    - annexe IIB → dispositifs servant au diagnostic de maladies héréditaires ou encore à la détermination de groupes tissulaires (quelques exemples : mesure du glucose sanguin, évaluation du risque de la trisomie 21, tests concernant le cytomégalovirus, les chlamydia, la rubéole et la toxoplasmose) ;
- Les dispositifs hors annexe II qui sont dits à « auto-certification » pour la mise sur le marché.

L'application de ces directives se traduit par l'apposition du marquage CE. Ce marquage est fait par auto-déclaration pour les dispositifs hors annexe II, ce qui signifie que l'industriel n'a pas à justifier les performances de son dispositif au moment du marquage mais au moment d'un contrôle des autorités de Santé du pays où il commercialise ses produits. Le contenu du dossier technique à fournir est détaillé dans la **Figure 15**.

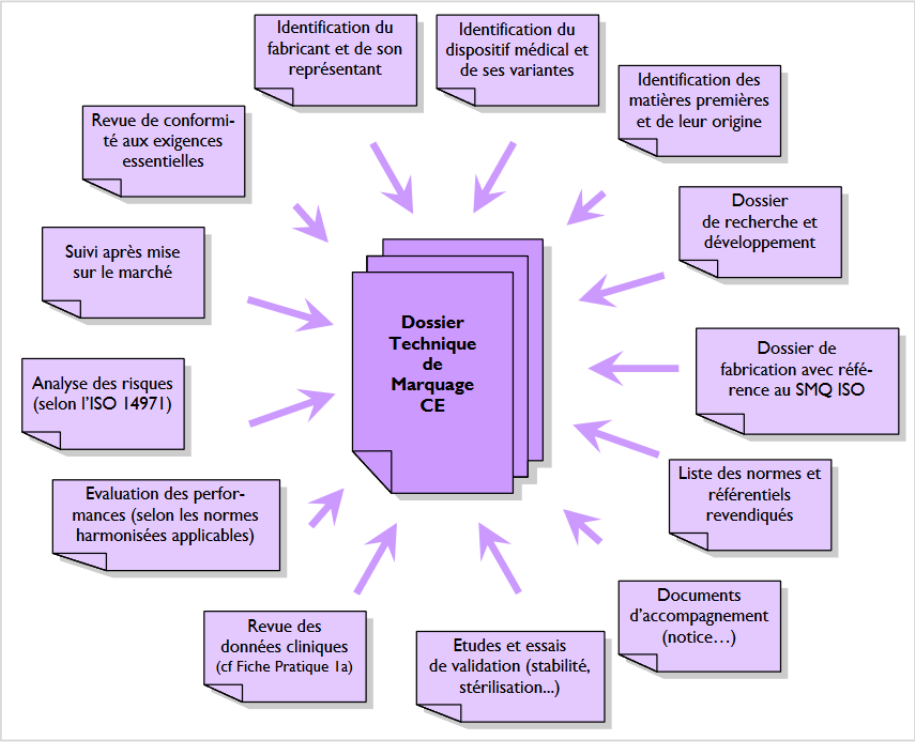
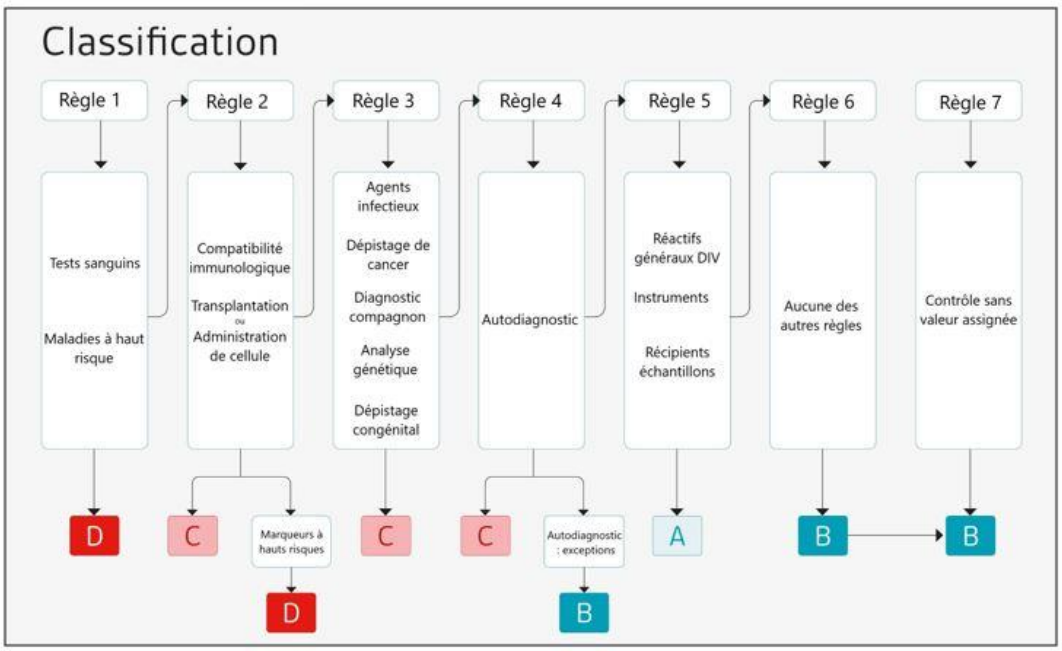


Figure 15. Constituants du dossier technique de marquage CE pour un dispositif DIV. CE : Conformité Européenne, SMQ : Système de management de la qualité, ISO : International Organization for Standardization. *Source : http://www.twoksa.com/documents/fiches-pratiques/*

Plusieurs scandales ont éclaté ces dernières années, surtout pour les DM (Dispositifs Médicaux) comme par exemple la célèbre affaire des prothèses mammaires PIP. Afin de lutter contre cela, l'UE a établi un nouveau règlement (**Figure 16**). Entré en vigueur en Avril 2017, le règlement UE 2017/746 sera appliqué pour les DIV en 2022 (les DM seront séparés et auront leur règlement à part 2017/745). Les plus gros changements seront la modification de la classe de risque des DIV et le processus de mise sur le marché (comme une étape d'évaluation clinique plus stricte, la vérification du dossier technique par un organisme notifié à la place d'une auto-certification, un identifiant produit unique présent dans une base de données

européennes communes et publiques …). De plus, avec ce nouveau règlement, les fabricants auront l'obligation d'être certifiés ISO 13485 au niveau de leur système qualité. Cette norme précise les exigences des systèmes de management de la qualité au sein de l'industrie des dispositifs médicaux.



Classification	Profil de risque
A	Risque individuel faible et risque pour la santé publique faible
B	Risque individuel modéré et/ou risque pour la santé publique faible
C	Risque individuel élevé et/ou risque pour la santé publique modéré
D	Risque individuel élevé et risque pour la santé publique élevé

Figure 16. Nouvelle classification des dispositifs médicaux in vitro selon le règlement européen 2017/746. *Repris et traduit de https://www.bsigroup.com/en-GB/medical-devices/our-services/IVDR-Revision/*

6. Le marché des tests rapides de type LFIA

Le marché mondial des tests rapides à flux latéral est important et continue de croître chaque année. Il présente un taux de croissance estimé à 7%. De nombreuses entreprises se sont lancées dans ce segment et pour de nombreuses applications : cliniques, environnementales, vétérinaires … En 2005, 39 entreprises détenaient 80% de ce marché (O'Farell 2013). Le marché du diagnostic clinique est considéré comme le plus lucratif car il y a une forte demande mondiale de tests rapides décentralisés des laboratoires.

La **Figure 17** illustre la marge de progression du segment des tests rapides de type MFIA au cours des années à venir.

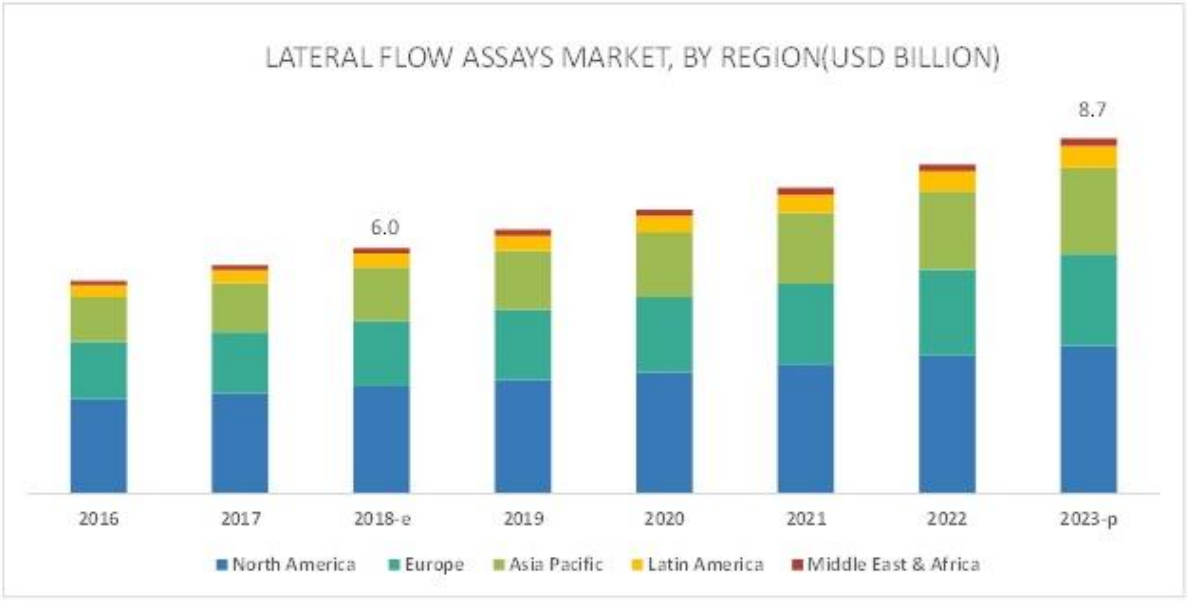


Figure 17. Evolution du marché des tests rapides de type LFIA de 2016 à 2023. *Source : https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/lateral-flow-assay-market-167205133.html*

Chapitre 2 : Infections à méningocoques

La première description clinique d'une infection à méningocoques fut décrite en 1805, lors d'une épidémie à Genève, par Gaspard Vieusseux (Vieusseux 1805). L'agent causant cette maladie, *Neisseria meningitidis*, fut isolé et décrit en 1887 par un médecin autrichien du nom de Weichselbaum (Weichselbaum 1887).

1. Rappel sur le germe et ses facteurs de virulence

1.1 Phylogénie

N. meningitidis fait partie du règne des bactéries et de l'embranchement des *Proteobacteria*, qui sont toutes des bactéries à Gram négatif. Parmi les 5 classes de cet embranchement, *N. meningitidis* fait partie des *Betaproteobacteria* (β-*proteobacteria*) et de l'ordre de *Neisseriales*. Au sein de la famille des *Neisseriaceae*, les genres les plus connus sont *Neisseria* et *Kingella*. Le genre qui nous intéresse, *Neisseria*, est composé de plusieurs espèces, pathogènes ou non. Différentes méthodes existent pour les caractériser, tels que des tests à base de sucres. Le nom *Neisseria* vient d'Alfred Neisser qui a découvert le gonocoque en 1879. Seules 2 espèces sont des pathogènes stricts chez l'être humain : *Neisseria gonorrhoeae* (le gonocoque) et *Neisseria meningitidis* (le méningocoque).

1.2 Structure du génome

N. gonorrhoeae et *N. meningitidis* partagent plus de 80% de leur génome (Tinsley et al. 1996). Celui de *N. meningitidis* a une taille comprise entre 2 et 2,2 mégapaires de bases et contient environ 2000 gènes (Schoen et al. 2008) (**Figure 18**). Environ 70% du génome code des fonctions métaboliques essentielles. Il existe des mécanismes de transfert horizontaux d'ADN, expliquant la grande diversité des souches. La caractéristique principale de l'évolution du méningocoque est la plasticité de son génome (Rouphael & Stephens 2012).

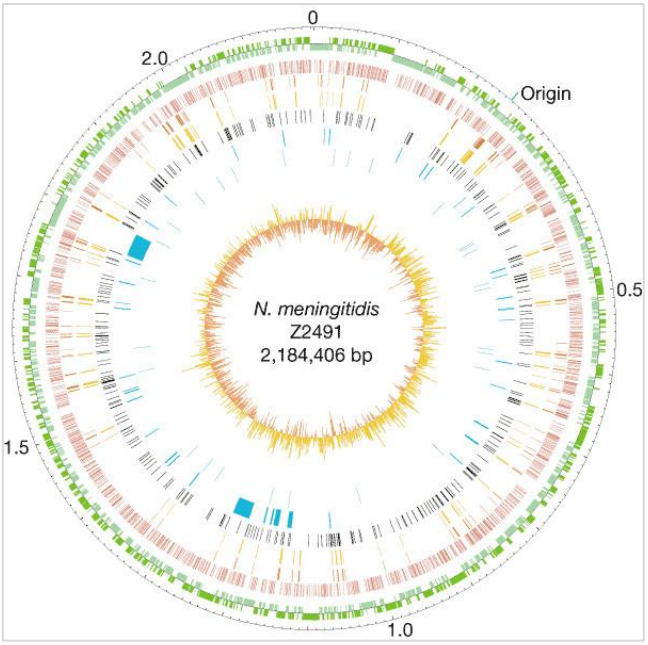


Figure 18. Représentation circulaire du génome de *N. meningitidis* Z2471.

(Repris et traduit de Parkhill et al. 2000)**.**

Les cercles concentriques montrent, de l'extérieur vers l'intérieur, l'échelle en mégabase, avec l'origine de la réplication indiquée ; les séquences de codage prédites dans le sens des aiguilles d'une montre (vert foncé) et dans le sens contraire (vert clair) ; les séquences d'absorption neissérienne (rouge) ; les répétitions dRS3 (orange foncé) ; et les éléments de répétitions de séquence RS (orange clair) ; les répétitions dispersées (noir); les insertions de séquences IS et les éléments phagiques (marqueur étroits et barres larges respectivement; turquoise), et les répétitions en tandem (bleu foncé). L'histogramme interne montre le tracé de (G-C) / (G+C) avec des valeurs supérieures à zéro en jaune et inférieures à zéro en orange. Figure générée grâce au logiciel LASERGENE (DNAStar).

1.3 Description de la bactérie

N. meningitidis est une bactérie à Gram négatif, présente sous forme de diplocoques à face aplatie ou encore en grains de café. Cette bactérie pousse sur des géloses enrichies (géloses au sang cuit ou chocolat) avec une atmosphère d'aérobiose stricte. Elle a besoin d'être incubée à 37°C en atmosphère humide sous 5% de CO_2. On utilise parfois des milieux sélectifs supplémentés en antibactériens (vancomycine, colimycine) et amphotéricine B pour sélectionner uniquement les espèces pathogènes de *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Les souches de *N. meningitidis* ont les caractéristiques biochimiques suivantes : positivité pour

l'oxydase, la catalase et la gamma-glutamyl aminopeptidase (cette dernière enzyme permet la différenciation entre le gonocoque et le méningocoque).

1.4 Principaux facteurs de virulence

N. meningitidis est une bactérie à multiplication extracellulaire. De nombreux facteurs de virulence participent à sa pathogénicité en assurant l'adhésion aux cellules-hôtes. Une sélection des principaux facteurs de virulence sont présentés ici.

Les pili. Ce sont des structures filamenteuses protéiques à la surface de la bactérie ; les pili facilitent l'adhésion de celle-ci à la cellule hôte. Le méningocoque possède des pili de type IV qui sont principalement composés de la piline. Les pili aident aussi la bactérie à traverser le mucus présent dans le nasopharynx et aident les bactéries à se déplacer à la surface des cellules hôtes (Merz & So 2000).

Le lipopolysaccharide. Le lipopolysaccharide (LPS), encore appelé lipooligosaccharide (LOS), est une endotoxine à la surface de la membrane externe de *N. meningitidis*. Ce LPS est composé d'un lipide A et d'un core oligosaccharidique pouvant être sialylé. *N. meningitidis* possède plusieurs types de structures de LPS différents. Son rôle est important dans le choc septique et il joue un rôle dans l'adhérence de la bactérie.

Le système de captation du fer. *N. meningitidis* a besoin de fer pour se développer. Le système de captation du fer permet à la bactérie de se procurer du fer à partir de protéines comme la lactoferrine, la transferrine, l'hémoglobine et de complexes haptoglobine-hémoglobine.

La capsule. *N. meningitidis* peut avoir une capsule ou non. Cependant, les souches responsables d'infection sont presque toujours capsulées. La capsule est un élément essentiel pour la survie de la bactérie dans l'organisme de l'hôte, notamment en inhibant la phagocytose et en favorisant la résistance aux anticorps par échappement à la réaction médiée par le complément (Rouphael & Stephen 2012). La capsule est aussi souvent utilisée comme cible des vaccins. Sa composition biochimique définit les différents sérogroupes.

1.5 Classification / Sérogroupes

Ces sérogroupes sont différenciés en fonction de la structure de la capsule et de critères immunologiques. Actuellement, 12 types différents de capsules sont connus (A, B, C,

29E, H, I, K, L, W135, X, Y, Z,) mais seuls 6 sont responsables de la plupart des infections invasives : les types A, B, C, W, X et Y. Les sérogroupes A et X ont des structures assez semblables, qui se différencient par un ajout de mannosamine pour le A, et des répétitions d'unités de N-Acétyl Glucosamine-1-Phosphate pour le X. Les capsules des sérogroupes B et C sont structurées autour d'homopolymères de résidus d'acides sialiques. Enfin, les sérogroupes W et Y ont des capsules composées d'hétéropolymères d'acides sialiques avec des résidus galactose (W) et glucose (Y).

Pour caractériser le sérogroupe, on utilisait par le passé un typage phénotypique avec des anticorps dirigés contre des protéines telles que PorA, PorB ou contre le LOS. Mais ces méthodes avaient d'importantes limites et ont été abandonnées. Aujourd'hui, on utilise le plus souvent le génotypage des souches par la technique de référence dite « *Multi Locus Sequence Typing* » (MLST) qui permet de comparer la séquence de 7 gènes de ménage (Maiden 1998). Grâce aux comparaisons entre les séquences, on arrive à dégager des profils bien distincts et à regrouper les souches en complexes clonaux.

1.6 Epidémiologie

On estime le nombre de cas de méningites à 2,82 millions par an avec plus de 300 000 décès (dont un tiers d'enfants de 1 mois à 5 ans), d'après les chiffres 2019 de ONG PATH (https://www.path.org/articles/toward-world-without-meningitis/). Comme ce germe est facilement transmis, des épidémies flambent assez régulièrement. La répartition des sérogroupes circulants est variable selon les régions du monde, comme l'illustre la **Figure 19**.

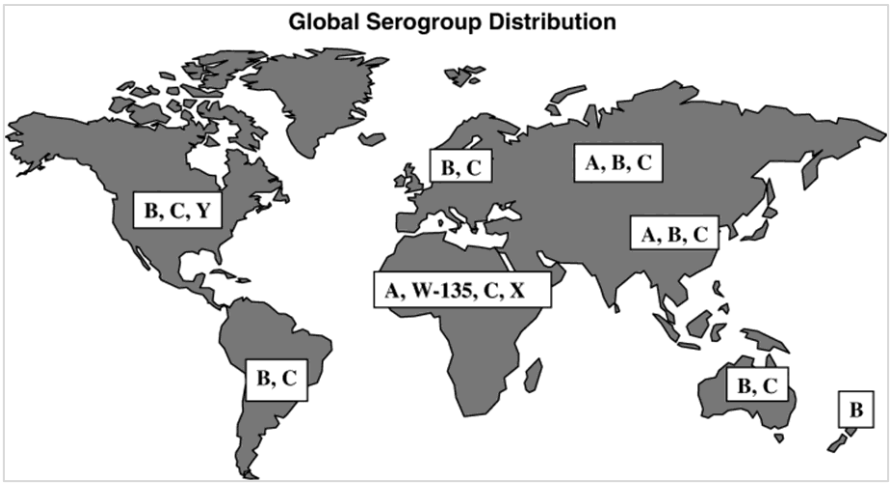


Figure 19. Distribution géographique des sérogroupes de *N. meningitidis* responsables de maladies à méningocoques invasives en 2007. D'après Stephens (2007).

Dans les pays industrialisés comme l'Amérique, l'Europe ou encore l'Australie, les sérogroupes B et C sont les plus représentés. On peut voir sur la **Figure 20,** la répartition des sérogroupes en France. Des épidémies de petite taille voir de taille modeste ont lieu assez fréquemment, comme par exemple celle de sérogroupe B en 2016 à Dijon (Thabuis et al. 2018). En 2017, 537 cas ont été rapportés (Santé Publique France/ Centre National de Référence des méningocoques et *Haemophilus influenzae* – Rapport : Les infections invasives à méningocoque en France en 2017) avec un taux de décès de 12% et un taux de séquelles précoces de 7%. Le taux d'incidence de la maladie était de 0,91 / 100 000 habitants. Les personnes les plus touchées sont les jeunes enfants (0-4 ans) et les jeunes adultes (15-24 ans).

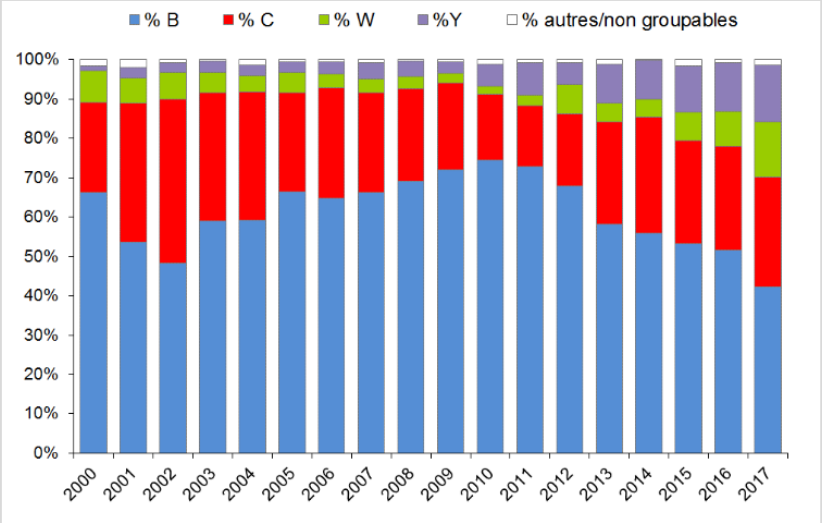


Figure 20. Proportion de cas d'infections invasives à méningocoque par sérogroupe, France entière, 2000-2017. Figure extraite du rapport : Les infections invasives à méningocoque en France en 2017 (Santé Publique France/ Centre National de Référence des méningocoques et d'*Haemophilus influenzae*).

Le méningocoque est aussi présent au Moyen-Orient, notamment lors du pèlerinage annuel à la Mecque (Hadj). Des épidémies ont eu lieu en 1987, 2000 and 2001 (Yezli et al. 2018). En Asie, le sérogroupe A est historiquement responsable de grandes épidémies en Chine (Zhang et al. 2008), en Inde ou encore en Russie. On observe actuellement un remplacement de ce sérogroupe par les sérogroupes B et C.

En Afrique, de grandes épidémies sont récurrentes. Historiquement, ce sont plutôt les sérogroupes A, W et X qui ont été impliqués. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a mis en place, dans les pays d'Afrique, un programme de vaccination de masse contre le méningocoque A en 2010 (programme MenAfriVac). Le sérogroupe A a régressé au bénéfice

des autres sérogroupes comme les sérogroupes W ou C ; ce dernier a causé des épidémies au Nigéria et au Niger (Funk et al. 2014, Nnadi et al. 2017). La partie du monde ayant les taux d'incidence les plus élevés est une région de l'Afrique sub-saharienne appelée la ceinture de la méningite (**Figure 21)**.



Figure 21. La ceinture de la méningite en Afrique (meningitis belt). *Source : Control of epidemic meningococcal disease, WHO practical guidelines, World Health Organization, 1998, 2nd edition, WHO/EMC/BAC/98.3.*

2. Pouvoir pathogène

2.1 Transmission et portage

Le méningocoque est une bactérie à réservoir humain exclusif. La contamination entre porteurs se fait par contact direct via la voie aérienne. La transmission se fait via les petites gouttelettes émises lors de la respiration des sujets infectés ou encore via la salive. Une fois le germe transmis, il y a soit un portage nasopharyngé asymptomatique (fréquent), soit un départ d'infection invasive à méningocoque. La période d'incubation de cette infection est en moyenne de 4 jours, mais elle peut varier de 2 à 10 jours (https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/meningococcal-meningitis). Le portage concerne environ 5 à 25% de la population générale (Cartwright et al. 1987).

2.2 Infections

Pour des raisons encore incomprises, à partir du portage, *N. meningitidis* peut causer des infections en prenant à défaut le système immunitaire. On parle d'infection invasive à méningocoques. Le pathogène circule alors dans le sang, causant une septicémie, et peut franchir la barrière hémato-méningée pour causer une méningite. Les méningocoques sont

une cause fréquente de méningites bactériennes, de l'ordre de 30% des cas chez les individus âgés entre 15 et 60 ans (Johri et al. 2005). Depuis ces dernières années, une émergence des urétrites à *Neisseria meningitidis* est observée notamment chez les hommes ayant des relations sexuelles avec des hommes (HSH). La plasticité génomique du méningocoque, facilitant l'émergence de variants, serait en cause (Taha et al. 2016).

Il existe des facteurs favorisant l'infection. Au niveau de l'hôte, un des facteurs favorisant l'infection est l'âge. En effet, le risque de maladie invasive est plus élevé chez l'enfant et décroit avec les années. Tous les êtres humains sont réceptifs, mais le risque de maladie est plus élevé chez les personnes splénectomisées ou atteintes d'un déficit d'une protéine du complément. Les personnes immunodéprimées sont également très vulnérables. Au niveau de l'environnement, en Afrique sub-saharienne, la sécheresse et les vents de sable peuvent favoriser la dissémination de l'infection. En effet, ces conditions rudes vont « dégrader » la barrière muqueuse de l'hôte et faciliter l'entrée de la bactérie. Au contraire, à la saison des pluies, on observe un arrêt des épidémies.

2.3 Antibiothérapie

Il existe un arsenal thérapeutique pour lutter contre la bactérie. Les antibiotiques utilisés peuvent être l'amoxicilline, la rifampicine, la ciprofloxacine et des céphalosporines de 3ème génération (cefotaxime, ceftriaxone). En Afrique, en cas d'infrastructure et de ressources sanitaires limitées, on peut utiliser la ceftriaxone.

2.4 Vaccination

Différents vaccins ont été développés pour lutter contre ce germe. Ils sont souvent dirigés contre la capsule, élément constitutif de *N. meningitidis*. Cependant, les vaccins contre le sérogroupe B ont toujours été un défi car la capsule de ce sérogroupe est faiblement immunogène. Par conséquent, des alternatives ont été recherchées comme des vaccins ciblant les OMV (*outer membranes vesicles)*. L'antigène dominant dans les OMV est la porine membranaire externe PorA, qui varie antigéniquement. Ainsi, l'inconvénient majeur des vaccins OMV est qu'ils sont en grande partie spécifiques des variants de PorA et offrent une protection croisée limitée. Pour élargir la couverture, des OMV ont été préparés à partir de deux ou trois souches de *N. meningitidis*, chacune conçue pour exprimer plusieurs variants de PorA. Le début de l'ère génomique a vu l'avènement de la vaccinologie inversée qui identifie

les candidats-vaccins du sérogroupe B à partir de séquences du génome entier. Cette approche a permis d'identifier différents facteurs dont la protéine de liaison au facteur H (fHbp), qui ont été inclus dans le vaccin Bexsero.

En France, la vaccination contre le méningocoque de sérogroupe C est obligatoire chez les nourrissons depuis le 1er janvier 2018. La vaccination contre le sérogroupe C est recommandée jusqu'à l'âge de 24 ans. La vaccination contre les autres valences (A/B/W/Y) n'est recommandée que dans des situations particulières : immunodépression, voyage dans les pays situés dans la ceinture de la méningite, personnel de laboratoire pouvant être en contact avec le germe, situation d'épidémie (**Tableau 4**) … D'autres vaccins, non proposés en France ont été développés. Pour une revue plus détaillée, le lecteur intéressé peut consulter le travail récent de Dretler et al. (2018).

Tableau 4. Description des vaccins méningococciques proposés en France en 2019.

Nom commercial	Fabricant	Sérogroupes	Type de vaccins	Utilisation
Bexsero®	GSK	B	Protéique monovalent	Utilisation restreinte à partir de 2 mois
Menjugate 10® **NeisVac®**	GSK Pfizer	C	Monovalent conjugué	Nourrissons à partir de 2 mois
Menveo®	GSK	A C W Y	Tétravalent conjugué	À partir de 2 ans
Nimenrix®	Pfizer	A C W Y	Tétravalent conjugué	À partir de 6 semaines

3. Eléments diagnostiques

3.1 Examen clinique

Les symptômes observés les plus fréquents sont la raideur de la nuque, des céphalées, une forte fièvre, des vomissements, un état de confusion et une photosensibilité (**Figure 22**).

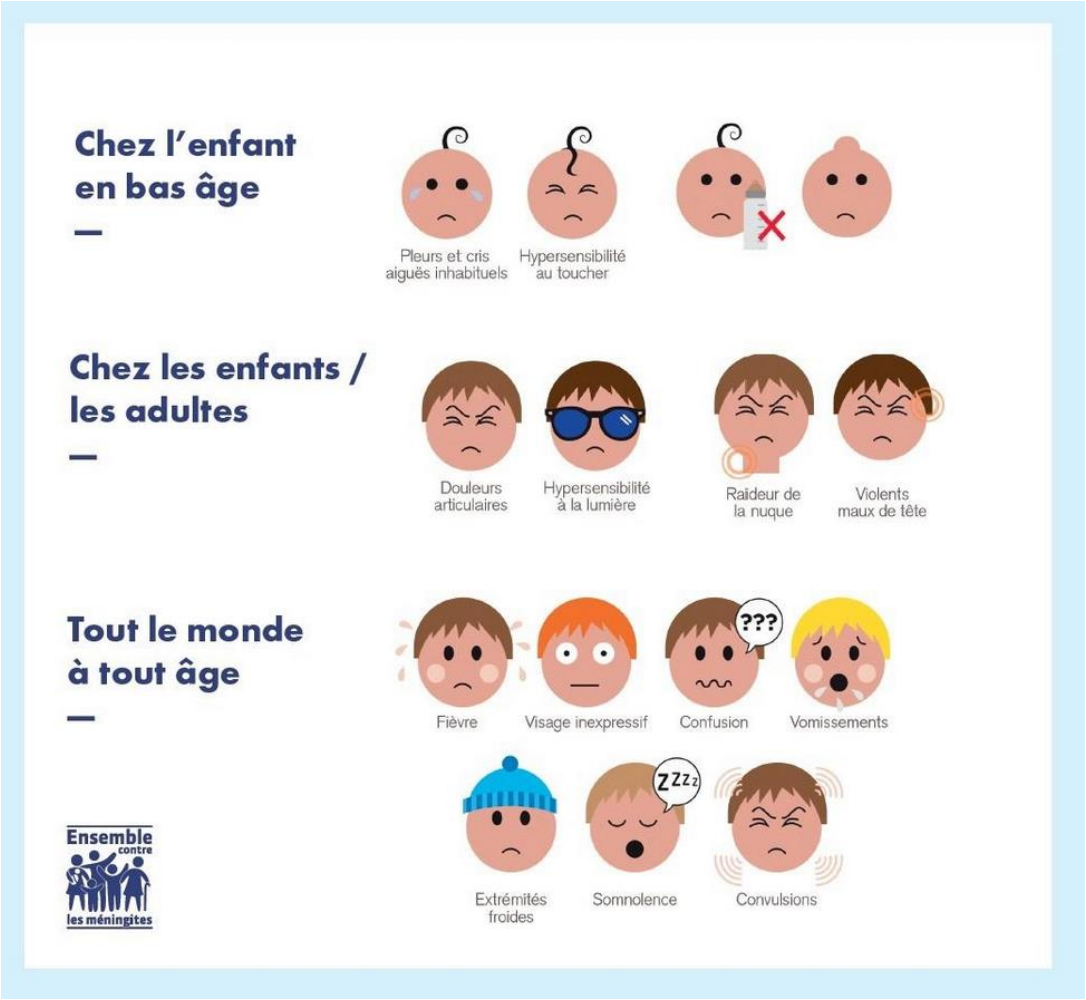


Figure 22. Symptômes possibles dans le cas d'une méningite suivant l'âge du patient.

Source : Collectif « Ensemble contre les méningites ».

Même lorsque le diagnostic de la maladie est posé rapidement et qu'un traitement est initié, dans les 24 à 48 heures, 5 à 10% des malades décèdent. A terme, la méningite peut entrainer comme conséquences des troubles neurologiques, des pertes d'audition ou encore des troubles de l'apprentissage chez 10 à 20% des survivants (https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/meningococcal-meningitis). La forme plus rare de septicémie à méningocoque est souvent mortelle et se caractérise par des éruptions hémorragiques, souvent liées à un *purpura fulminans*, et par un choc infectieux.

Des présentations atypiques peuvent être observées comme des arthrites septiques, des péricardites septiques, des épiglottites, des pneumopathies invasives, des pleuropneumopathies, ou encore des atteintes abdominales (https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/instruction_dgs_sp_2018_163.pdf).

3.2 Examen microbiologique

Au laboratoire, c'est le plus souvent le LCS qui est analysé. Une ponction lombaire est réalisée chez le patient et est envoyée au laboratoire pour analyse. Le sang, via les hémocultures, doit aussi être analysé. La première technique utilisée est la coloration de Gram qui oriente la recherche de pathogène. Dans tous les cas, une culture bactérienne doit être réalisée sur des milieux adaptés à la pousse du méningocoque, enrichis en fer et en glucose à 37°C sous 5% de CO_2. La culture doit être initiée le plus rapidement possible après le recueil du prélèvement et les grands écarts de température doivent être évités. L'identification se fait ensuite soit sur la base des critères biochimiques (oxydase et catalase positives, capacité de métaboliser le glucose et le maltose, alpha-glutamyl transférase positive), soit à l'aide d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight). Cette méthode permet de séparer les différentes protéines d'un analyte ionisé et de mesurer leur « temps de vol » à travers un tube à vide, ce temps de vol dépendant de leur masse et de leur charge. Les résultats des différents temps de vols génèrent un spectre qui est spécifique d'un germe donné. Ce spectre est comparé aux profils conservés dans une base de données, permettant ainsi l'identification du germe. Cette technique permet de définir l'espèce de la bactérie mais pas son sérogroupe. Pour le sérogroupage, il faut utiliser un test d'agglutination ou un typage par PCR utilisant des amorces de groupe.

4. Tests rapides pour la détection du méningocoque

Des tests rapides ont été développés pour faire face à l'urgence que représente le diagnostic de *N. meningitidis*. Plus rapides que la culture qui se manifeste en 24 à 48 h, ils permettent en outre de donner le groupe auquel appartient la souche incriminée.

4.1 Typage moléculaire par d'amplification des acides nucléiques

Pour *N. meningitidis*, un gène couramment ciblé est *ctrA*, impliqué dans le transport de la capsule et conservé entre les différents sérogroupes. Pour la détection des différents sérogroupes, le Centre National de Référence des méningocoques et d'*Haemophilus*

influenzae (Institut Pasteur, Paris) préconise les recherches des gènes *csaB*, *csb*, *csc*, *csw*, *csy* et *csxA* pour typer les sérogroupes Nm A, B, C, W, Y et X respectivement (Deghmane et al. 2019).

En matière de PCR multiplex, le test BioFire® FilmArray® (BioMérieux) comporte la recherche de *N. meningitidis* dans ses panels « Meningitis/Encephalitis (ME) Panel » pour une utilisation sur LCS et « Blood Culture Identification (BCID) Panel » pour une utilisation à partir d'hémocultures. Il existe aussi la plateforme ePlex® (GenMark DX) et son panel « ePlexBCID-GN Panel » permettant de rechercher la bactérie dans le sang.

4.2 Typage antigénique

4.2.1 Tests d'agglutination au latex

Ces tests sont très utilisés en laboratoire car rapides et faciles à exécuter. Il est important de noter qu'aucun test de ce type ne détecte *N. meningitidis* de sérogroupe X. Les principaux tests sont détaillés ci-après.

Le test Pastorex (Bio-Rad) est souvent utilisé. Il permet de détecter dans le LCS, les sérogroupes A, C, Y/W, et le complexe *N. meningitidis* sérogroupe B/*Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et les streptocoques du groupe B. A cause de la similarité au niveau de leur domaine antigénique, il ne permet pas de distinguer le sérogroupe Y du sérogroupe W, ni le sérogroupe B de *E. coli* K1. Quelques limitations existent : le fabricant recommande de chauffer et centrifuger les échantillons de LCS avant utilisation, ce qui constitue un frein dans les pays à faible ressources. De plus, une fois entamés, les tests doivent être utilisés dans le mois. Les performances obtenues en laboratoire et sur le terrain présentent une sensibilité comprise entre 69 et 87% et une spécificité comprise entre 81 et 93% (Rose et al. 2009).

Le Wellcogen (Remel) permet de détecter Nm A/C/Y/W, et NmB/E.coli K1 dans le LCS, le sérum, les urines et le sang. D'après les données du fabricant, la sensibilité est de 71% pour le panel ACYW et de 65% pour NmB/*E. coli* K1 et sa spécificité est supérieure à 98% pour les deux complexes. Le panel NmB/*E. coli* K1 est également utilisable sur colonie bactérienne.

Le BD Directigen Meningitis Combo Test (BD) agglutine NmC/NmW, NmA/NmY et NmB/Ecoli K1 dans les urines, le LCS et le sérum. Peu d'études ont évalué ce réactif. D'après

le fabricant et des études anciennes (Hoban et al. 1985 ; Cuevas et al. 1989), la sensibilité varie de 30% à 100% selon l'échantillon et sa spécificité est comprise entre 97,2% et 100%.

4.2.2 Tests Rapide d'Orientation Diagnostic (TROD)

Les premiers tests immunochromatographiques à flux latéral ont été développés par les équipes de l'Institut Pasteur et le CERMES (Chanteau et al. 2006) pour une détection dans le LCS. Cette première version comportait 2 bandelettes pouvant reconnaître les sérogroupes A/W135 d'une part et C/Y d'autre part. Les performances de ces bandelettes dans le LCS variaient selon le sérogroupe (Chanteau et al. 2006) et étaient excellentes en laboratoire : pour le sérogroupe A, la sensibilité et la spécificité étaient de 97,1% et 93,8%, respectivement. Pour le sérogroupe W, la sensibilité était de 99,4% et la spécificité de 100%. Pour le sérogroupe C, la sensibilité était de 99,6% et la spécificité non calculée. Pour le sérogroupe Y, la sensibilité et la spécificité étaient de 100%. Des études sur le terrain ont montré que la sensibilité globale était d'environ 90% et la spécificité globale d'environ 65% (Rose et al. 2009), appelant à faire des améliorations. Après remplacement de l'anticorps dirigé contre NmA, une nouvelle évaluation (Collard et al. 2014) a confirmé de meilleurs résultats en laboratoire (sensibilité : 91,5%, spécificité : 84,4%) et sur le terrain (sensibilité : 87,6%, spécificité : 85,7%). Dans la continuité de ces travaux, l'Institut Pasteur a développé une nouvelle bandelette pouvant détecter le méningocoque de sérogroupe X avec une sensibilité de 94% et une spécificité de 100% (Agnememel et al.2015).

Par la suite, BioSpeedia a obtenu une licence permettant d'utiliser les anticorps développés et utilisés par l'Institut Pasteur pour créer ses propres bandelettes. BioSpeedia a ensuite amélioré les tests par différents procédés : réduction de la largeur des membranes permettant de réduire le volume de LCS à utiliser ; amélioration de la liaison anticorps-or aboutissant à une meilleure conservation et à une plus grande résistance thermique des tests. A ce jour, ce TROD, dénommé MeningoSpeed, est le seul test immunochromatographique à flux latéral disponible commercialement pour la détection des méningocoques de sérogroupes A/C/W/Y/X. L'évaluation des performances de ce nouveau test fait partie des résultats présentés dans le premier article de ce travail.

Chapitre 3 : Infections à pneumocoques

Le pneumocoque a été isolé pour la première fois en 1881, simultanément par le français Louis Pasteur et le médecin militaire américain George Sternberg. Il a été appelé *Diplococcus pneumonia* à partir de 1920 en raison de son apparence dans les colorations de Gram. En 1974, il a été renommé *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) en raison de sa grande parenté avec les streptocoques.

1. Rappel sur le germe et ses facteurs de virulence

1.1 Phylogénie

S. pneumoniae appartient au règne des bactéries, à la division des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales*. Sa famille est celle des *Streptococcaceae* qui se divisent en plusieurs genres dont *Streptococcus* auquel il appartient. Le genre *Streptococcus* comprend 44 espèces et sous-espèces, regroupés en 3 ensembles : streptocoques pyogènes, streptocoques oraux et streptocoques du groupe D. *S. pneumoniae* appartient à l'ensemble des streptocoques oraux. Ces streptocoques oraux sont eux-mêmes divisés en 5 sous-ensembles (Or1, Or3, Or4, Or5 et Or6) et *S. pneumoniae* forme à lui seul l'unique espèce du sous-ensemble Or3.

S. pneumoniae est très proche des espèces *Streptococcus mitis* et *Streptococcus oralis*, notamment au niveau génomique. En 2004, une nouvelle espèce dénommée *Streptococcus pseudopneumoniae* a été décrite. Comme son nom l'indique, cette espèce est extrêmement proche de *S. pneumoniae*, partageant jusqu'à 99,7 % d'homologie au niveau de ses séquences nucléotidiques 16S (Arbique et al. 2004).

1.2 Description de la bactérie

S. pneumoniae est une bactérie qui se présente sous forme de cocci à Gram positif de 0,5 à 1 µm de diamètre, groupés en diplocoques ovoïdes, dits en « flamme de bougie », et souvent capsulés (**Figure 23**).

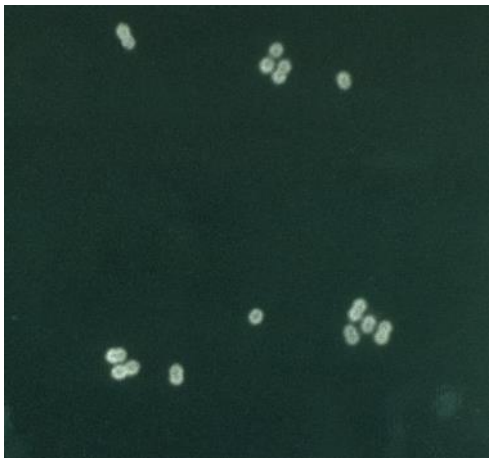


Figure 23. Observation microscopique de *Streptococcus pneumoniae* dans le liquide cérébro-spinal. Technique de coloration utilisant des anticorps fluorescents. *Source : Public Health Image Library/CDC/Dr. M. S. Mitchell.*

1.3 Principaux facteurs de virulence

Les facteurs de virulence du pneumocoque sont multiples (**Figure 24**). Nous détaillerons ci-après seulement une sélection d'entre eux.

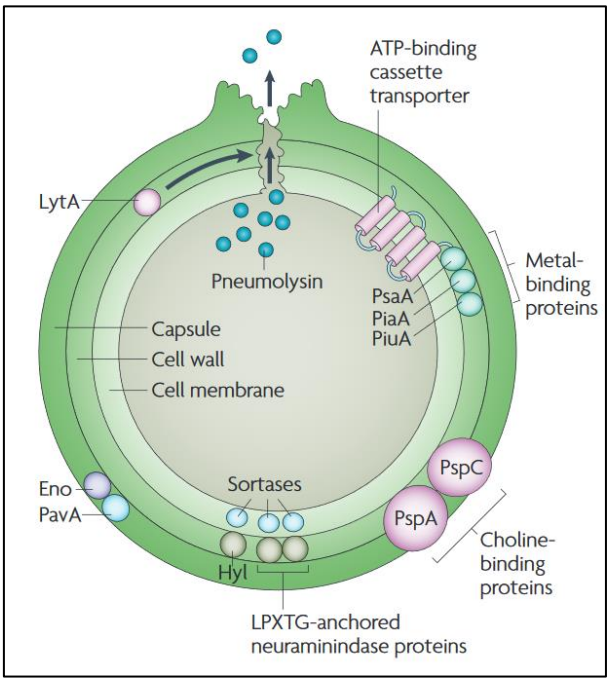


Figure 24. Principaux facteurs de virulence du pneumocoque. D'après Kadioglu et al. (2008). *PspA et PspC : Pneumococcal surface proteins A and C; Hyl : hyaluronate lyase; PavA : pneumococcal adhesion and virulence A; Eno : enolase; LytA : autolysin A; PsaA : pneumococcal surface antigen A; PiaA : pneumococcal iron acquisition A et PiuA : pneumococcal iron uptake A.*

1.3.1 Capsule polysaccharidique

La capsule polysaccharidique (CPS) forme la couche la plus externe de la bactérie et mesure approximativement 200 à 400 nanomètres d'épaisseur. Il existe plus de 90 polysaccharides sérologiquement distincts (Henrichsen 1995). Les types de CPS les plus simples sont des polymères linéaires avec des unités répétées comprenant deux monosaccharides ou plus. Les types structurels plus complexes sont des polysaccharides ramifiés avec des squelettes répétitifs composés d'un à six monosaccharides comportant des chaînes latérales supplémentaires.

La présence de la capsule a longtemps été la condition *sine qua non* de la virulence des souches des pneumocoques (Austrian 1981) mais quelques souches dites « non typables », c'est-à-dire ne possédant pas de capsule, ont été notamment associées à des épidémies de conjonctivites (Martin et al. 2003). La virulence de *S. pneumoniae* est liée à l'épaisseur de la capsule et au sérotype (MacLeod & Kraus 1950). Son rôle dans la virulence provient de son activité antiphagocytaire. L'anticorps dirigé contre les composants de la paroi cellulaire du pneumocoque s'attache à la surface de l'organisme et se lie à son tour au complément. La présence de la capsule empêche le composant du complément iC3b et le fragment Fc des immunoglobulines situées à la surface des cellules bactériennes d'interagir avec leurs récepteurs situés à la surface des cellules phagocytaires, de sorte que les organismes restent extracellulaires (Kadioglu et al. 2008). Des données plus récentes suggèrent que la capsule peut également réduire la quantité totale de complément déposée sur la surface bactérienne (Abeyta et al. 2003). La capsule est également cruciale pour la colonisation et empêche l'élimination mécanique par le mucus. Il a aussi été rapporté que la capsule procure un degré de résistance à l'autolyse spontanée ou induite par un antibiotique, contribuant ainsi à la tolérance aux antibiotiques dans les isolats cliniques. Fait intéressant, cette capacité varie également de manière significative entre les sérotypes capsulaires (Fernebro et al. 2004).

De plus, on a observé que le pneumocoque peut modifier son sérotype capsulaire par transfert de gène horizontal et échapper ainsi aux vaccins dirigés contre des sérotypes spécifiques (Coffey et al. 1998).

1.3.2 Paroi cellulaire polysaccharidique (CWPS)

La paroi est constituée de peptidoglycane et d'acides téichoïques majoritairement représentés par le polysaccharide C commun à toutes les souches de *S. pneumoniae*. Ce composant induit l'inflammation, probablement via l'activation du complément et l'induction de cytokines. Le composant principal de la paroi cellulaire est un acide téichoïque complexe qui contient une protéine appelée phosphorylcholine. Cette protéine permet d'avoir un site d'attachement pour l'activation des cellules endothéliales durant la maladie invasive.

La structure de CWPS a déjà été étudiée et peut varier légèrement suivant la souche. Elle consiste en une répétition de pentasaccharides avec une seule phosphocholine attachée à la position 6 du résidu galactose (Karlsson et al. 1999).

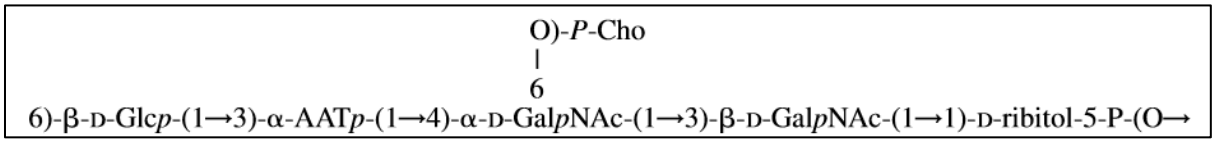


Figure 25. Composition du CPWS de *S. pneumoniae*. (Karlsson et al. 1999) *AAT : 2-acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxy-d-galactose ; Cho : Choline.*

1.3.3 Pneumolysine

La pneumolysine (ply) appartient à la famille des toxines formant des pores. C'est une toxine intracytoplasmique de 53 kDa, exprimée en phase de croissance tardive. Elle est relarguée uniquement en cas de lyse de la paroi cellulaire de la bactérie. Initialement, la toxine se lie au cholestérol membranaire ; il se forme alors de grands pores (jusqu'à 30 nm de diamètre) en oligomérisant jusqu'à 50 monomères de toxine. Ply induit également d'autres effets à des concentrations sublytiques, y compris l'activation de la voie classique du complément, malgré l'absence d'anticorps spécifiques. Il a été montré que l'absence de ply réduit la virulence de la bactérie dans les infections (Berry et al. 1989).

La toxine ne semble jouer aucun rôle dans l'inflammation associée à la méningite (Friedland et al. 1995) mais joue un rôle dans la surdité associée à la méningite (Wellmer et al. 2002), ainsi que dans la bactériémie (Benton et al. 1995) et la pneumonie (Berry et al. 1989). De plus, ply a une implication clé dans les lésions cérébrales induites lors de la méningite à pneumocoque. Le niveau de toxine libérée dans le LCS pendant le traitement antibiotique dépend du type d'antibiotique utilisé. Une étude chez le lapin a montré que, pendant le

traitement, le niveau de toxine libérée dans le LCS est plus important si la ceftriaxone est utilisée pour traiter l'infection par rapport à un antibiotique non bactériolytique, telle que la rifampine (Spreer et al. 2003). Cela souligne l'importance de la lyse bactérienne dans la libération de ply et a des conséquences importantes pour le traitement de la méningite à pneumocoque.

1.3.4 Autolysine

Appartenant à la famille des choline-binding protéines, l'autolysine (lytA) est une amidase qui clive le pont N-acetylmuramoyl-L-alanine du peptidoglycane pneumococcique (Howard & Gooder 1974). Bien qu'elle lyse la paroi cellulaire quand la croissance cesse (par exemple à cause de la pénicilline), elle participe aussi à la croissance de la paroi cellulaire. Elle est essentielle pour la libération de la pneumolysine. De plus, lytA s'est révélée être déclenchée par le lysozyme humain, un facteur de défense libéré lors de l'infection et de l'inflammation (Bruyn et al. 1992), induisant une lyse du pneumocoque et amplifiant ainsi l'inflammation.

1.3.5 Protéines de surface du pneumocoque (PspA et PspC)

Il s'agit de protéines de surface immunogènes appartenant au groupe des choline-binding protéines. Leurs fonctions exactes ne sont pas encore totalement élucidées mais elles sont essentielles dans la virulence du germe. Elles participent à l'échappement de la bactérie au système immunitaire de l'hôte. PspA interfère avec la fixation du composant C3 du complément sur la surface de la bactérie. Cette protéine qui se lie à la lactoferrine protège aussi la bactérie de l'activité bactéricide de l'apolactoferrine (Kadioglu et al. 2008). PspC, quant à elle, fixe le facteur régulateur H du complément et réduit donc l'activation de celui-ci (Kadioglu et al. 2008).

1.4 Classification / Sérogroupes / Sérotypes

Il existe 2 classifications pour distinguer les différents sérogroupes de *S. pneumoniae* : d'une part, la classification danoise de Kauffmann-Lund, et d'autre part une classification américaine très peu utilisée. Dans la classification danoise, les sérogroupes sont ordonnés de 1 à 48. A l'intérieur de chaque sérogroupe, il y a des sérotypes identifiés par des lettres. Un sérotype est identifié par le numéro de son sérogroupe et par une lettre (s'il existe plusieurs

sérotypes à l'intérieur du sérogroupe). Plus de 97 sérotypes ont été observés, différenciés par la structure de leur capsule.

Afin de réaliser le sérotypage, plusieurs méthodes existent. La technique la plus répandue est l'agglutination sur lame à l'aide de particules de latex sensibilisées. Avec l'aide de sérums spécifiques développés par le Statens Serum Institute de Copenhague et d'un échiquier (**Figure 26**), le sérogroupe de la bactérie peut être déterminé ; sinon le résultat est rendu non typable.

Pool	P	Q	R	S	T	Non-vaccine types/groups
A	**1***	18(A,B,**C***,F)	**4***	**5***	**2**	
B	19(**F***, **A***,B, C)	6(**A***, **B***, C)	**3***	**8**		
C	7(**F***, A, B, C)				**20**	24(F, A, B), 31, 40
D			9(A, L, **N**, **V***)		11(F, **A**, B, C, D)	16(F, A), 36, 37
E			12(**F**, A, B)	10(F, **A**, B, C)	33(**F**, A, B, C, D)	21, 39
F				17(**F**, A)	22(**F**, A)	27, 32(F, A), 41(F, A)
G						29, 34, 35(F, A, B, C), 42, 47(F, A)
H	14*	23(**F***, A, B)		15(F, A, **B**, C)		13, 28(F, A)
I						25(F, A), 38, 43, 44, 45, 46, 48

Figure 26. Système d'échiquier pour l'identification du type capsulaire des pneumocoques.

D'après Jauneikaite et al. (2015)

Une autre technique de typage est la réaction de Quellung, considérée comme la méthode de référence pour le sérotypage. On observe au microscope le gonflement de la capsule de la bactérie quand elle est mise en contact avec le sérum qui lui est spécifique. Cette technique est utilisée en cas d'échec de la méthode d'agglutination.

D'autres méthodes de typage existent (Jauneikaite et al. 2015) mais ne seront pas détaillées ici. On peut citer les tests PCR qui peuvent être utilisés en cas de difficulté de culture de la bactérie. Cependant, la multitude de sérotypes à tester la rend complexe à mettre en œuvre. Le séquençage de la souche constitue également une alternative possible.

1.5 Epidémiologie

S. pneumoniae est commensal des voies aériennes supérieures de l'homme. Le réservoir est principalement le rhinopharynx des porteurs asymptomatiques. En 2006, l'OMS estimait que les maladies pneumococciques tuaient au moins 1,5 million de personnes par an et, à partir de 2009, un million de décès d'enfants de moins de 5 ans chaque année (Geno et al. 2015). Les infections à pneumocoques sont plus fréquentes dans les pays en développement que dans les pays industrialisés.

Le portage est diminué par certains traitements antibiotiques et par les vaccins contre *S. pneumoniae*. Avec l'arrivée des vaccins et les mécanismes biologiques naturels, de nombreuses résistances aux antibiotiques sont apparues au fil des années comme la résistance à la pénicilline. Ainsi, on observe des pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) depuis les années 1960. Il a également été isolé des souches multi-résistantes aux antibiotiques en Afrique du Sud en 1977, qui résistent à la clindamycine, au chloramphénicol, à la tétracycline, à l'érythromycine et aux bêta-lactamines (Watson et al. 1993). Depuis la généralisation de la vaccination dans le monde, des « remplacements sérotypiques » ont eu lieu. Les sérotypes vaccinaux ont progressivement disparu, avec l'émergence de nouveaux sérotypes non couverts par les vaccins (Hays et al. 2017).

1.6 Antibiothérapie

Les pneumocoques sont naturellement sensibles à différents antibiotiques, notamment aux bêtalactamines. L'utilisation des antibiotiques pour traiter une infection à pneumocoques dépend du site infecté. Le premier choix est souvent l'amoxicilline. Si la souche présente une sensibilité diminuée à cette molécule, l'utilisation de céphalosporine de 3ème génération est recommandée (ceftriaxone, céfotaxime, ceftaroline). On peut également utiliser des fluoroquinolones ou la vancomycine en milieu hospitalier.

1.7 Vaccination antipneumococcique

Des vaccins (**Tableau 5**) ont été développés depuis les années 1983 contre *S. pneumoniae*. Tous les sérogroupes ne sont pas inclus dans les vaccins, mais uniquement les souches circulantes qui présentent un intérêt clinique.

Un premier vaccin a été élaboré en 1983. Il s'agit du Pneumovax® PPV23, ciblant 23 sérotypes. Ce vaccin a permis une réduction des infections invasives chez l'adulte. Malheureusement, il avait une mauvaise immunogénicité chez les enfants, en particulier chez les moins de deux ans et chez les patients immunodéprimés. Son action diminuait avec le temps et avec l'âge du patient, ce qui a été imputé à l'utilisation d'anticorps non adaptés. Les vaccins suivants ont corrigé ces problèmes en liant les protéines CPS du pneumocoque à des protéines porteuses qui augmentent l'immunogénicité.

Le PCV7 (Prevnar®) créé dans les années 2000, cible 7 sérotypes. Ce vaccin a été développé à partir des CPS de chaque sérotype conjugué à une protéine porteuse qui est la

toxine diphtérique CRM197. Ce vaccin a montré une protection accrue chez les enfants. Il n'est plus utilisé de nos jours.

Un vaccin similaire a été lancé en 2010, le PCV13 (Prevnar®), ciblant 13 sérotypes et comportant la même technologie que le vaccin précédent. Il a montré de bons résultats pour la protection des pneumonies et de l'otite chez les jeunes enfants. Il semble aussi protéger les personnes les plus âgées contre les pneumonies communautaires. Il remplace désormais le PCV7 dans les recommandations vaccinales.

Le PCV10 (Synflorix®), né en 2011, possède les mêmes sérotypes que le PVC7 plus 3 sérotypes additionnels. Les protéines porteuses sont une protéine-D d'*Haemophilus influenzae* et deux anatoxines (tétanique et diphtérique). Il présente des performances similaires au PCV13. Cependant, il n'est actuellement pas recommandé par la HAS (Haute Autorité de Santé) dans la stratégie de prévention des infections à pneumocoque dans le contexte spécifique français. Son autorisation de mise sur le marché européenne le décrit comme agissant contre les maladies invasives, les pneumonies et les otites moyennes aiguës causées par *S. pneumoniae* chez les nourrissons et les enfants âgés de 6 semaines à 5 ans.

Tableau 5. Description des vaccins pneumococciques passés et actuels.

(adapté de Wantuch & Avci 2018).

Vaccins	Année d'introduction	Type Protéine de liaison	Sérotypes ciblés
PSV23 (VPP23)	1983	VPP	1,2,3,4,5,6B,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,14,15B, 7F,18C,19A,19F,20,22F,23F et 33F
PCV7 (VPC7)	2000	VPC	4,6B,9V,14,18C,19F et 23F
PCV10	2011	VPC	1,4,5,6B,7F,9V,14,18C,19F et 23F
PCV13 (VPC13)	2010	VPC	1,3,4,5,6A,6B,7F,9V,14,18C,19A,19F et 23F

VPP : Vaccins antipneumococciques polysaccharidiques ; VPC : Vaccins antipneumococciques conjugués

2. Pouvoir pathogène

La bactérie pénètre par le nez et peut ensuite se propager dans l'organisme. Soit la bactérie restera au stade de colonisation, soit elle devient invasive et crée des infections **Figure 27**.

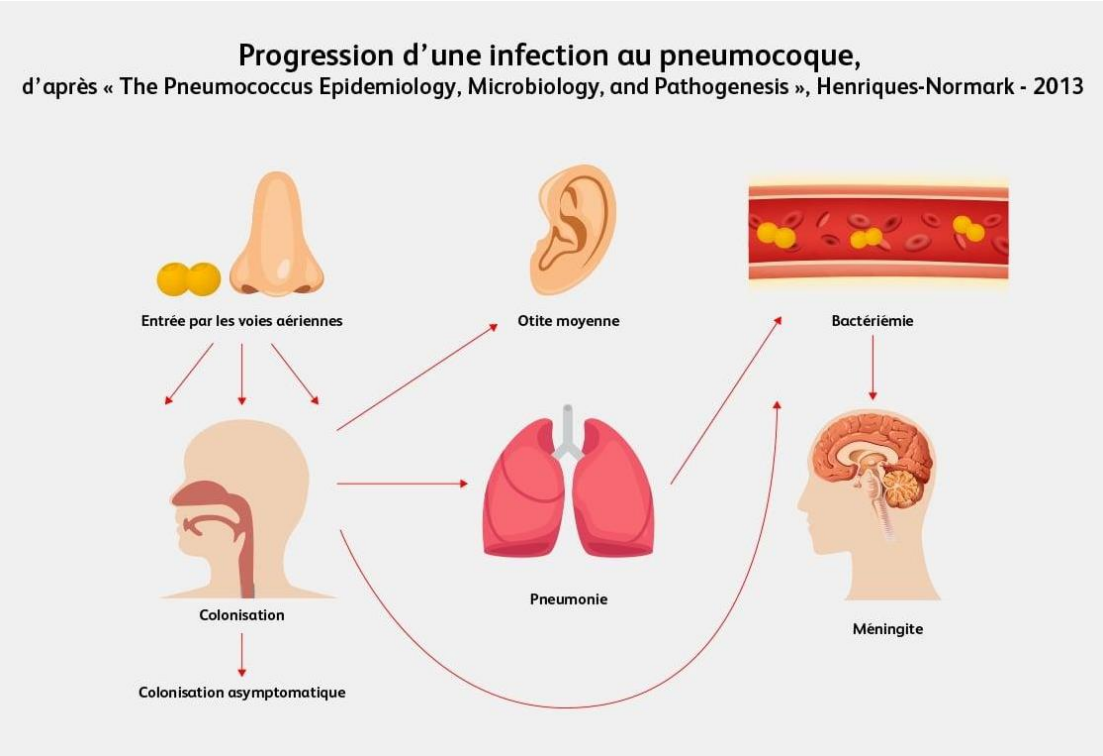


Figure 27. Progression d'une infection pneumococcique de la mise en contact à l'infection.
Source : https://www.pfizerpro.fr/parlons-vaccins/maladies-infectieuses/infections-invasives-a-pneumocoques

2.1 Pathologies non invasives

S. pneumoniae peut être responsable d'otites moyennes aiguës (OMA). Ces otites sont la première cause d'infection bactérienne en pédiatrie car deux tiers des enfants de moins de 2 ans vont en développer une (Bingen 2002). Les autres manifestations cliniques non invasives sont des sinusites et des conjonctivites.

2.2 Pathologies invasives

2.2.1 Pneumopathies à S. pneumoniae

Le pneumocoque est responsable de 25% des pneumopathies aiguës communautaires chez l'enfant et de 30 à 50% de celles-ci chez les adultes. Après la contamination par gouttelettes, le pneumocoque colonise le tractus respiratoire de l'hôte. Au moment de

l'infection, qui suppose une diminution des défenses immunitaires de l'hôte, deux phases vont être nécessaire pour la bactérie : tout d'abord, l'adhésion grâce à divers facteurs de virulence de la bactérie, ce qui suppose une capacité de celle-ci à résister à la phagocytose par les macrophages alvéolaires, notamment du fait de la présence de la capsule ; puis l'invasion de la bactérie qui correspond à la multiplication de *S. pneumoniae* dans les espaces alvéolaires induisant la sécrétion d'un exsudat œdémateux.

2.2.2 Méningites à S. pneumoniae

La méningite à pneumocoque est la plus fréquente des méningites bactériennes en France. Elle commence par des céphalées associées à des nausées et des vomissements. La fièvre augmente brutalement. Elle se caractérise aussi par des signes neurologiques, des convulsions et des troubles de la conscience. La bactérie passe les barrières méningées et se multiplie dans les méninges via une réaction inflammatoire dépendante des polynucléaires. Des cytokines sont produites en réponse à la présence de bactéries. La méningite à pneumocoque est associée à une mortalité élevée (8 à 10% chez l'enfant et 30% chez l'adulte) et à des séquelles importantes (20 à 30% des cas), notamment aux niveaux auditif et neurologique.

2.2.3 Bactériémies à S. pneumoniae

A partir d'un foyer précédemment infecté (pulmonaire ou méningé), la bactérie va passer dans le sang. Un purpura fulminans peut être observé, notamment chez les splénectomisés et les immunodéprimés.

2.3 Transmission et portage

La niche de *S. pneumoniae* est le nasopharynx. La transmission est interhumaine via les aérosols de sécrétions nasopharyngées. Les facteurs de risques sont les suivants : présence de virus comme la grippe ou le virus respiratoire syncytial par exemple (Kim et al. 1996), patients séropositifs pour HIV (Feikin et al. 2010), tabagisme et alcoolisme (Grau et al. 2014). Une étude (Backhaus et al. 2016) a montré que d'autres facteurs de risques étaient l'âge (moins de 2 ans ou plus de 65 ans), le diabète, les troubles spléniques ou encore l'immunodépression. L'incidence des infections varie aussi avec la saisonnalité. Les infections sont plus fréquentes en hiver et au printemps (Gray et al. 1982). Les pneumococcies sont des infections communautaires et on peut observer des épidémies (Zivich et al. 2018). Le portage

est augmenté dans les lieux avec une forte promiscuité entre les individus, comme par exemple les crèches. En revanche, la méningite à pneumocoque survient presque toujours sous forme de cas isolés.

Compte tenu de tous ces facteurs de risque, le taux de portage exact est difficile à estimer. De plus, il est variable selon l'âge. Il est beaucoup plus élevé chez les enfants que chez les adolescents ou les adultes. En effet, il varie de 27 à 65% chez les jeunes enfants alors qu'il est de moins de 10% chez les adultes (Weiser et al. 2018).

3. Eléments diagnostiques

3.1 Examen clinique

Pneumopathies à pneumocoques. Le diagnostic de pneumonie doit être envisagé chez les sujets présentant une fièvre, une fréquence respiratoire élevée (pour l'âge), un effort respiratoire accru (tirage thoracique, torchère nasale), une saturation en oxygène ≤ 95% et des signes auscultatoires. Une confirmation radiologique est indispensable.

Pour la méningite à pneumocoques, on observe différents symptômes : (i) fièvre et céphalées qui commencent souvent brutalement, intenses, pouvant être augmentées par la lumière, le bruit ; (ii) raideur méningée, notamment la nuque, mais elle peut être absente chez les sujets âgés et (iii) troubles de la conscience, vomissements classiquement en jet. Des signes d'aggravation peuvent être observés comme un coma fébrile, un état de choc, un purpura extensif. Une ponction lombaire est indispensable pour confirmer le diagnostic.

La bactériémie à pneumocoque peut être transitoire, intermittente ou continue. Une bactériémie transitoire peut survenir spontanément. Une bactériémie intermittente peut survenir lorsque des bactéries d'un site infecté sont libérées sporadiquement dans le sang par une infection diffuse (par exemple, une péritonite ou un abcès extravasculaire). Une bactériémie continue se produit généralement lorsque les organismes ont un accès direct au sang, comme lors d'une endocardite infectieuse ou à partir de cathéters intraveineux.

3.2 Examen microbiologique

Le pneumocoque est un germe fragile qui nécessite un transport rapide et adapté (notamment au niveau de la température) des prélèvements au laboratoire. La nature des prélèvements peut être multiples : LCS ou liquides de ponction pour la recherche de

méningites, sécrétions respiratoires profondes pour la recherche de pneumopathies ou encore hémoculture pour la recherche d'une bactériémie.

Un examen direct par la coloration de Gram est en général réalisé à la recherche de diplocoques à Gram positif. Une culture est ensuite réalisée. Les streptocoques sont anaérobie facultatif, catalase et oxydase négatifs. Les conditions optimales de pousse sont un ensemencement sur milieu enrichi, un pH de 7,8, une température de 37°C et une atmosphère sous 5 à 10% de CO_2. Les colonies sur gélose sont alpha-hémolytiques à bord régulier et de surface bombée. Les souches sont le plus souvent identifiées par spectrométrie de masse de type Maldi-TOF. Cependant, quelques espèces de streptococcus étant fortement apparentées, il est parfois difficile de différencier *S. pneumoniae* d'un autre type de streptocoque comme *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* ou encore *S. oralis*. Quelques études ont montré que l'analyse fine des spectres permet d'établir des pics spécifiques aux espèces (Werno et al. 2012, Ikryannikova et al. 2013). Mais d'autres tests complémentaires plus simple à réaliser existent comme le test de sensibilité à l'optochine ou encore le test de lyse.

3.2.1 Test de sensibilité à l'optochine

Par rapport aux autres souches de streptocoques, *S. pneumoniae* est habituellement sensible à l'optochine. Pour être considéré comme sensible, le cercle d'inhibition doit être supérieur à 14 mm. Les souches alpha-hémolytiques présentant des zones d'inhibition intermédiaires, entre 9 et 13 mm, doivent subir d'autres tests. Cependant, ces dernières années, des souches résistantes à l'optochine ont été décrites ; elles représentent environ 5% des souches (Kellogg et al. 2001). Il est intéressant de noter qu'une bactérie extrêmement proche, *S. pseudopneumoniae*, est sensible à l'optochine en atmosphère aérobie mais résistante sous une atmosphère enrichie en CO_2 (Arbique et al. 2014).

3.2.2 Test de solubilité dans la bile (test de lyse)

Ce test est basé sur l'utilisation d'un sel biliaire, le désoxycholate de sodium. Ce sel lyse *S. pneumoniae* et non les autres streptocoques, permettant de différencier cette espèce des autres streptocoques tels que *S. mitis* ou *S. oralis*. Le test consiste à faire une suspension dense de la bactérie à analyser, puis à rajouter du désoxycholate de sodium ou de l'eau (comme témoin négatif). Si le sel biliaire lyse la bactérie, il s'agit très vraisemblablement d'un pneumocoque, même si quelques exceptions ont été décrites (Kellogg et al. 2001).

4. Tests rapides pour la détection du pneumocoque

4.1 Tests moléculaires

4.1.1 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

De nombreuses méthodes concernant différents gènes pour la détection moléculaires de *S. pneumoniae* ont été développées. On trouve ainsi la détection du gène de la pneumolysine *ply* (McAvin et al., 2001), du gène de l'autolysine *lytA* (Corless et al., 2001), du gène codant la protéine de surface A *psaA* (Morrison et al., 2000), du gène codant la superoxide dismutase *sodA* (Kawamura et al., 1999), ou encore du gène codant la penicillin binding protein *pbp* (O'Neill et al., 1999).

De plus, des tests PCR multiplex se développent, permettant de rechercher simultanément plusieurs bactéries/virus/champignons. Commun avec le méningocoque, on peut citer le test BioFire® FilmArray® (BioMérieux) avec les panels Blood Culture Identification (BCID) ; Meningitis/Encephalitis (ME) et Pneumonia (PN). La plateforme ePlex® (GenMark DX) avec les panels Respiratory Pathogen (RP) et Blood Culture Identification (BCID) permet également la recherche de ce pathogène.

4.2 Tests antigéniques

Le but des tests antigéniques est de rechercher la présence d'antigènes solubles du pneumocoque et/ou de détecter le sérogroupe impliqué. Il existe un grand nombre de tests qui sont souvent similaires (même procédé de détection et même cible antigénique). Nous présentons ici les principaux tests disponibles sur le marché, à savoir les tests d'agglutination au latex et les tests rapides d'immunochromatographie. Il faut noter que d'autres méthodes de détection antigéniques existent telles que les tests de type dot-blot, les tests à base de microbilles, les puces à ADN ou encore le test de Quellung.

4.2.1 Tests d'agglutination au latex

Il existe, comme pour le méningocoque, des tests d'agglutination au latex pour identifier le pneumocoque à partir des souches isolées en culture. Ces tests peuvent être fabriqués par le laboratoire en interne ou achetés commercialement. Dans le cas de la production en interne, des antisérums commerciaux sont liés de manière passive aux particules de latex dans des conditions strictes d'asepsie. Cependant, comme leur viabilité à

long terme est inconnue, ceux-ci doivent être testés régulièrement (Satzke et al. 2013), ce qui est compliqué dans un environnement qualité de type Cofrac.

Sur le plan commercial, de très nombreux tests existent et ne seront pas détaillés ici. Nous pouvons citer les tests Wellcogen® (ThermoFisher), Dryspot™ Pneumo (Oxoid), Pastorex® (Bio-Rad), ImmuLex™ *S. pneumoniae* Omni (SSI DIagnostica), Pneumoslide™ *S. pneumoniae* Latex Test Kit (BD), etc. Ces tests sont simples à réaliser et requièrent peu de formation et d'équipement. En revanche, le principal inconvénient est qu'il faut un inoculum riche, ce qui est parfois difficile à obtenir si la souche a du mal à pousser.

4.2.2 Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD)

De très nombreux tests existent sur ce segment de marché : BinaxNow® *Streptococcus pneumoniae* (Alère), SOFIA® *Streptococcus pneumoniae* FIA (Quidel), ImmuView® *S. pneumoniae* (SSI Diagnostica), Tru Strep Pneumoniae (Meridian), Uni-Gold *S. pneumoniae* (Trinity Biotech), BIOSYNEX® *S. pneumoniae* (BioSynex), etc.

Le test le plus utilisé dans les laboratoires est sans doute le test BinaxNow® *Streptococcus pneumoniae* (Alère). Ce test peut s'utiliser à partir de LCS ou d'urine et recherche le polysaccharide C pneumococcique. Les limites sont une sensibilité moins bonne chez les enfants (Dowell et al. 2001 ; Dominguez et al. 2003), due au portage élevé dans cette population. De plus quelques réactions croisées avec certaines espèces orales alpha hémolytiques comme *S. mitis* ou encore *S. oralis* ont été observées (Murdoch & Reller, 2003). Les performances de ce test varient selon les études, avec une sensibilité comprise entre 65 et 85% et une spécificité comprise entre 90 et 100% (Gutiérrez et al. 2003, Smith et al. 2003, Rosón et al. 2004).

Le test SOFIA® *Streptococcus pneumoniae* FIA (Quidel) utilise l'immunofluorescence pour la lecture et est recommandé pour des prélèvements d'urine. Une application pour le LCS a été récemment proposée. Un lecteur (disponible en 2 modèles) est nécessaire pour lire le résultat (invisible à l'œil nu) ce qui permet d'automatiser la lecture et réduire l'erreur due au facteur humain. Ce test détecte également l'antigène CPWS de la bactérie. A partir des urines, pour détecter une pneumopathie, des études ont obtenu une sensibilité et une spécificité de 78,6% et 74,2%, respectivement (Burgos et al. 2018) ou encore de 77.4% et 86.7% (Vicente et al. 2017). Selon le fabricant, le test aurait une sensibilité de 100% sur le LCS

mais l'analyse est biaisée du fait de l'absence de LCS négatifs (on ne peut pas calculer la spécificité) pour le lecteur 1. Pour le lecteur 2, la sensibilité et la spécificité sont de 100% à partir de 100 LCS (50 négatifs et 50 positifs).

Le test ImmunView (SSI Diagnostica) se présente sous forme de bandelette (sans cassette protectrice). La détection de la bactérie se fait sur l'urine et le LCS, et le test est validé pour les patients de plus de 8 ans. Selon le fabricant, pour l'urine, la sensibilité est de 93% et la spécificité de 98%. Sur le LCS, la sensibilité est de 100% et la spécificité de 98%. Dans la bibliographie, comparé au test BinaxNow, ce test présentait des performances similaires pour la détection de l'antigène dans les urines (sensibilité d'environ 60% et spécificité de 97% ; Athlin et al. 2017).

Un test nommé ODK0501 RAPIRUN® a été développé et testé par une firme japonaise pour détecter *S. pneumoniae* dans les prélèvements respiratoires chez les adultes et dans les hémocultures (Fukushima et al. 2016). La cible de ce test est le polysaccharide C. Plusieurs publications en sont issues. L'étude d'Ehara et al. (2008) a montré que, chez les adultes, ce test permet une meilleure détection clinique de *S. pneumoniae* dans les sécrétions que dans les urines. L'étude de 2015 de Fukushima et al. a permis de montrer que ce test était plus efficace que le test BinaxNow pour la détection du germe dans les sécrétions respiratoires mais les auteurs de l'étude n'ont pas regardé si les patients développaient une pneumopathie à *S. pneumoniae*. Une autre étude (Ikegame et al. 2017) s'est intéressée au diagnostic des pneumopathies à pneumocoques en comparaison avec une trousse destinée à la détection de la bactérie dans les urines (où l'antigène recherché était l'antigène de capsule). Le test croisait avec des espèces telles que *S. intermedius* ou *Micromonas micros* (maintenant dénommée *Parvomonas micra*). Au moment de la rédaction de ce travail, ce test n'est apparemment pas commercialisé.

Les tests développés par BioSpeedia pour rechercher le pneumocoque s'appellent PneumoSpeed et PneumoResp. PneumoSpeed est conçu pour une utilisation dans l'urine et le LCS. L'évaluation dans l'urine montre une sensibilité de 93% et une spécificité de 96%. L'évaluation sur des LCS est présentée dans ce travail. PneumoResp, dont le développement est issu de ce travail, est conçu pour les expectorations. Ses performances seront détaillées dans la publication numéro 2 de la partie « résultats ».

OBJECTIFS

L'ensemble des données exposées précédemment souligne l'importance du diagnostic rapide pour la détection des maladies infectieuses. Les bactéries développées précédemment, S. *pneumoniae* et *N. meningitidis*, sont des micro-organismes impliqués dans des maladies pouvant être gravissimes comme les méningites ou encore les pneumonies. BioSpeedia, à travers des recherches antérieures et ce travail, a développé des outils TDR permettant de détecter ces deux bactéries.

Les objectifs de notre travail de thèse peuvent être résumés comme suit :

- validation du TDR MeningoSpeed détectant *Neisseria meningitidis* dans le LCS ;
- validation du TDR PneumoSpeed détectant *Streptococcus pneumoniae* dans le LCS ;
- création et validation d'un prototype de TDR, PneumoResp, détectant *Streptococcus pneumoniae* dans les prélèvements respiratoires.

Le premier objectif a été atteint après avoir testé des supports différents ayant chacun leurs avantages et leurs inconvénients. Un modèle a été retenu, ses performances ont été vérifiées et il a été testé sur le terrain pour une validation clinique (**article 1**).

Le second objectif, plus facile à remplir, a été de valider le test PneumoSpeed. Ce TDR avait déjà été validé sur l'urine mais jamais sur des échantillons cliniques de LCS.

Enfin, le troisième objectif a été initié quelques mois après le début de cette thèse. Suite à des discussions avec des cliniciens pédiatres qui déploraient les difficultés de cultiver le pneumocoque, il nous a été demandé d'adapter un TDR pour la détection du pneumocoque dans les sécrétions respiratoires (**article 2**). Un **brevet** concernant cette stratégie diagnostique a été déposé et est en cours d'expertise (**annexe 1**).

Nous allons voir brièvement quelques éléments de matériels et méthodes utilisés pour ce travail (les informations de constructions des bandelettes ne seront pas dévoilées pour cause de confidentialité), puis nous exposerons les résultats obtenus, notamment sous forme de deux articles en cours de publication (un en voie d'acceptation et un soumis). Nous discuterons brièvement ces résultats avant de terminer par des conclusions et des perspectives.

MATERIELS ET METHODES

MeningoSpeed

1. Utilisation du test MeningoSpeed

1.1 Protocole

Le protocole décrit est validé sur des échantillons de LCS. Les étapes de l'utilisation du MeningoSpeed sont les suivantes :

1. Lire attentivement la notice. Vérifiez la date d'expiration du test ; n'utilisez aucun test ayant passé la date d'expiration sur l'étiquette. S'assurer que chaque pochette est hermétiquement fermée avant utilisation. Ramener les tests et échantillons à température ambiante avant leur utilisation. Ouvrir la poche peu avant l'utilisation (environ 5 minutes).
2. Sortir les cassettes de la poche en la déchirant au niveau de l'encoche et les placer sur une surface plane et horizontale.
3. Homogénéiser l'échantillon. Tenir la pipette jetable fournie verticalement, prendre une fraction de l'échantillon et distribuer une goutte dans le puits d'échantillon "S" de la cassette. Démarrez immédiatement la minuterie. Un liquide rougeâtre apparaîtra et se déplacera le long de la membrane.
4. Lire le résultat à dix (10) minutes. Certains résultats positifs peuvent apparaître plus tôt et être lus (la ligne test peut apparaitre dès une minute). Les résultats ne sont valides qu'après l'apparition de la ligne contrôle et jamais au-delà de dix (10) minutes.
5. Eliminer les composants du test et les échantillons conformément au protocole interne d'élimination des déchets biologiques.

1.2 Interprétation des résultats

Test(s) positif(s) : Des bandes rose-violacées distinctes apparaissent dans les zones contrôle ("CL") et test ("A, W, Y, C ou X") suivant le sérogroupe de *Neisseria meningitidis* identifié. L'intensité de couleur de la ligne peut varier en fonction du niveau d'infection. En cas de méningite à *N. meningitidis* Y, les lignes tests Y et W peuvent apparaitre en raison d'une communauté antigénique. L'observation de ces deux lignes de couleur rose-violacée signe la présence de *N. meningitidis* Y. En cas de méningite à *N. meningitidis* W, seule la ligne test W apparait (**Figure 28**).

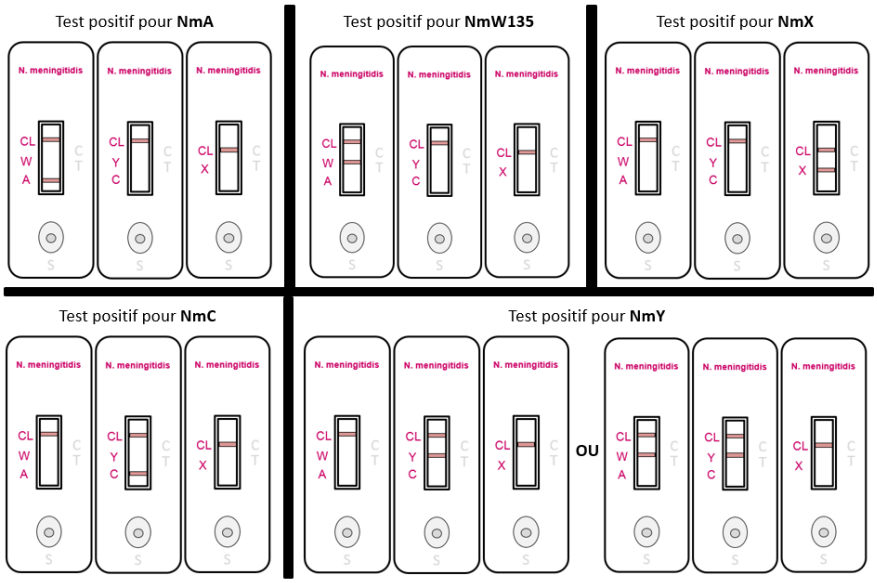


Figure 28. Représentation des différents résultats positifs pour MeningoSpeed.

Test(s) négatif(s) : Une seule ligne rose-violacée apparaît dans la zone CL sur les trois cassettes. Aucune ligne apparente n'apparait dans les zones test ("A, W, Y, C ou X") (**Figure 29**).

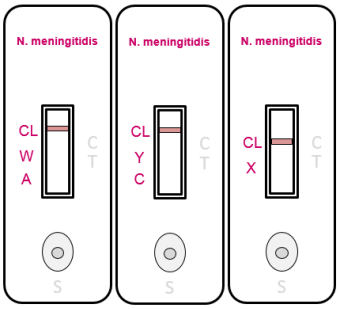


Figure 29. Représentation des différents résultats négatifs pour MeningoSpeed.

Test(s) invalide(s) : Aucune ligne visible n'apparaît dans la zone CL, indépendamment des résultats éventuels des zones test ("A, W, Y, C ou X"). Il est conseillé de refaire le test.

PneumoSpeed

1. Utilisation du test PneumoSpeed

1.1 Protocole

Le protocole décrit est validé sur des échantillons de LCS et d'urine. Les étapes de l'utilisation de PneumoSpeed sont les suivantes :

1. Lire toute la notice, vérifier l'intégralité de la trousse à utiliser, ramener la trousse et les échantillons à température ambiante avant la réalisation du test, s'ils sont conservés au froid.
2. Ouvrir la pochette individuelle et déposer la cassette sur une surface plane et horizontale. Le puits échantillon S doit se situer en bas de la cassette, vers le manipulateur. La ligne test pour le diagnostic de *S. pneumoniae* est identifiée en bas à droite des pistes de réaction par la lettre T. La ligne contrôle est identifiée par la lettre C en haut à droite des pistes réactionnelles. Le puits « S », en bas de la cassette, est l'endroit où l'échantillon doit être déposé.
3. Homogénéiser le prélèvement.
4. A l'aide de la pipette jetable fournie avec le kit, déposer une goutte (environ 30 µL) du prélèvement de LCS ou d'urine dans le puits échantillon « S » de la cassette. Eviter la formation de bulles d'air lors du dépôt.
5. Ajouter immédiatement 3 gouttes de diluant dans le même puits « S ».
6. Déclencher le chronomètre. Quand le test débute, un front coloré rougeâtre se déplace du bas vers le haut, le long de la membrane.
7. Lire le résultat à quinze (15) minutes. Ne lire aucun résultat après ce délai. Des résultats fortement positifs peuvent être observés plus tôt.
8. Eliminer les composants du test et les échantillons conformément au protocole interne d'élimination des déchets biologiques.

1.2 Interprétation des résultats

Trois résultats sont possibles. Ils sont décrits ci-dessous (**Figure 30**).

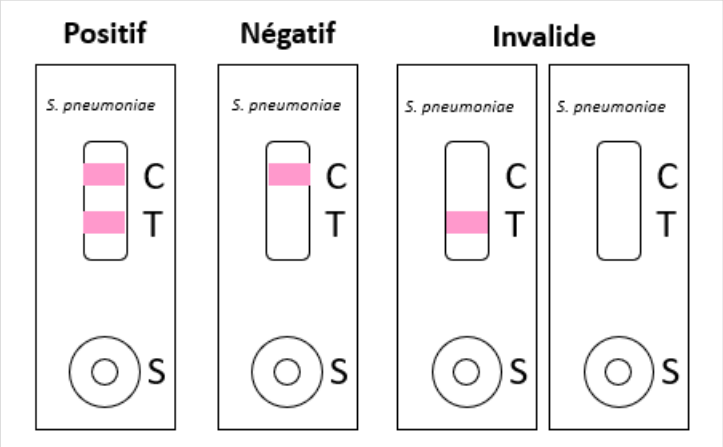


Figure 30. Les différents résultats possibles du test PneumoSpeed.

Un test est positif si on observe la présence de deux bandes distinctes : une ligne contrôle apparait au niveau de la zone C et une ligne pourpre même de faible intensité apparait au niveau de la zone T. **Un test est négatif** si seule une ligne pourpre apparait au niveau de la zone contrôle C. Aucune ligne n'apparait au niveau de la zone T. **Un test est invalide** si aucune ligne pourpre visible n'apparait au niveau de la zone contrôle C quel que soit le résultat de la zone T. Il est conseillé de refaire le test.

PneumoResp

1. Utilisation du test PneumoSpeed

1.1 Protocole

1. Lire l'intégralité de la notice, vérifier que tous les éléments de la trousse sont présents, ramener la trousse à température ambiante avant la réalisation du test, ainsi que les échantillons s'ils sont conservés au froid.
2. Le prélèvement d'expectoration est fluidifié par addition d'un réactif comme Digest-EUR® (Eurobio) ou Sputasol (ThermoFisher) (1 volume d'échantillon pour 1 volume de diluant). Cette étape est commune à toutes les techniques d'analyse portant sur ce type de prélèvement en laboratoire selon le référentiel REMIC 2018.

3. 500 microlitres d'expectoration fluidifiée sont prélevés précisément à la pipette de laboratoire et placés dans le tube 1 ; agiter au vortex 10 secondes.
4. A l'aide d'une pipette de la trousse, déposer successivement, dans le puits « sample » S, une goutte du prélèvement traité dans le tube 1 puis trois gouttes de tampon de migration (diluant pousseur/Diluent Buffer) du test PneumoResp. Déclencher le chronomètre. Un front coloré rougeâtre se déplace du bas vers le haut, le long de la membrane. La lecture se fait à l'œil nu. Les résultats ne sont valides qu'après l'apparition de la ligne contrôle. La lecture définitive du test se fait à la 15ème minute, mais des résultats positifs peuvent apparaitre avant. Ne lire aucun test après ce délai. Si le test est négatif, l'examen est terminé ; il ne s'agit probablement pas d'une infection invasive à *S. pneumoniae*.
5. Si ce premier test est positif, le prélèvement traité dans le tube 1 est alors traité dans le tube 2. Pour cela, mettre précisément 990 microlites de « Solution de traitement 2 » dans le tube 2 et y ajouter 10 microlitres de l'échantillon traité restant dans le tube 1. Agiter le mélange au vortex 10 secondes.
6. L'étape 3 est alors répétée, à partir du contenu du tube 2. Si le test est de nouveau positif, il s'agit probablement d'une infection active à *S. pneumoniae*. Si le test est négatif, le portage sera interprété selon les données cliniques, radiologiques, biologiques, thérapeutiques et épidémiologiques.
7. Eliminer les composants du test et les échantillons selon la procédure locale réservée aux déchets potentiellement infectieux.

Le protocole schématique du test PneumoResp peut être résumé dans la **Figure 31**.

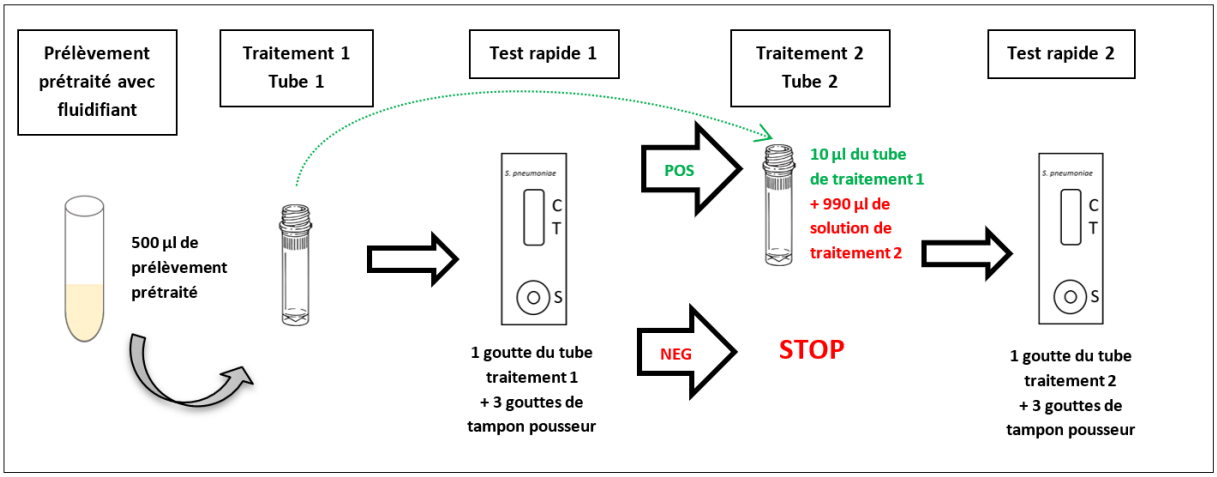


Figure 31. Protocole du test PneumoResp.

1.2 Interprétation des résultats au niveau de la cassette

Le test est positif si on observe la présence de deux bandes distinctes : une ligne contrôle apparait au niveau de la zone C et une ligne rougeâtre, même de faible intensité, au niveau de la zone T. **Le test est négatif** si seule une ligne rougeâtre apparait au niveau de la zone contrôle C. Aucune ligne n'apparait au niveau de la zone T. **Le test est invalide** si aucune ligne rougeâtre visible n'apparait au niveau de la zone contrôle C, quel que soit le résultat de la zone T.

1.3 Interprétation des résultats vis-à-vis du patient

Si le résultat est négatif après le traitement 1, il n'y a pas nécessité de faire le traitement 2. Le patient n'est probablement pas porteur d'une infection invasive à *S. pneumoniae*. **Si le résultat est positif après le traitement 1 et négatif après le traitement 2,** le patient est porteur de *S. pneumoniae* au niveau de l'arbre respiratoire supérieur. Ce portage sera interprété selon les données cliniques, radiologiques, biologiques, thérapeutiques et épidémiologiques. **Si le résultat est positif après les traitements 1 et 2, l**e patient est porteur d'une forte charge bactérienne et est suspect d'infection invasive à *S. pneumoniae*. Ce résultat sera interprété selon les données cliniques, radiologiques, biologiques (culture semi-quantitative notamment), thérapeutiques et épidémiologiques.

2. Evaluation de la spécificité du test PneumoResp

Pour évaluer la spécificité de PneumoResp, nous avons testé des souches bactériennes. Les souches, conservées en tubes gélosés ou en tubes-billes, ont été ensemencées sur gélose au sang ou milieu de culture adéquat, puis une solution McF 0,5 a été réalisée en diluant les colonies dans de l'eau saline (Versylene® Fresenius NaCl 0,9%). L'échantillon a ensuite été testé en plaçant une goutte de la solution McF 0,5 + 3 gouttes de diluant sur une cassette de la trousse PneumoResp. La spécificité du test PneumoResp a été évaluée sur 52 espèces bactériennes. Trente appartenaient au groupe mitis *: S. mitis, S. oralis, S. gordonii, S. sanguinis, S. parasanguinis, S. peroris, S. pneumoniae* et *S. pseudopneumoniae*, 22 espèces appartenaient à d'autres espèces bactériennes : *Alloscardovia omnicolens, Enteroccocus avium, E. faecalis, E. faecium, Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae, Klebsiella pneumoniae, Parvimonas micra* et *Staphylococcus aureus* ou au groupe streptocoques non-mitis : *S. agalactiae, S. anginosus, S. constellatus, S. pyogenes, S. salivarius* et *S. vestibularis*.

3. Corrélation entre la culture semi-quantitative et les charges bactériennes obtenues par technique d'amplification PCR

Les résultats de la culture bactérienne semi-quantitative et des tests PCR effectués sur deux gènes de virulence du pneumocoque ont été confrontés afin de déterminer une correspondance entre les cycles de PCR et les résultats de quantification de la culture.

3.1 Culture quantitative

Une souche de *S. pneumoniae* ATCC 49619 a été cultivée sur gélose au sang. Après pousse, elle a été diluée dans de l'eau saline (Versylene® Fresenius NaCl 0,9%) afin de faire un bouillon de 0,5 McF. Ce bouillon a ensuite été ensemencé aux dilutions 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} et 10^{-7} sur gélose au chocolat (gélose PolyViteX, BioMérieux) avec un ensemenceur automatique capable de réaliser des dilutions (easySpiral® Dilute, Interscience). Les résultats ont été lus à l'aide d'un lecteur (Scan 1200, Interscience) à 24h pour déterminer la concentration de l'inoculum de départ. La solution a été ensemencée 3 fois indépendamment.

3.2 Calcul de la limite de détection des tests PCR

Le bouillon a été calibré avec de l'eau PPI à la même valeur de 0,5 McF, à partir de la même culture de bactérie (*S. pneumoniae* ATCC 49619) que ci-dessus. Il a été réparti en 5

tubes de 200 µl. Chaque tube a été dilué au centième (dilution à 10^{-2}) afin de ne pas contaminer l'extracteur. Avant l'extraction, 20 µl de protéinase k (Eurobio) ont été ajoutés dans chaque tube pour prétraiter les échantillons pendant 10 minutes à 50°C. Les échantillons ont ensuite été extraits grâce à l'automate EasyMag (BioMérieux) en utilisant le programme « specific B » avec une élution de 50 µl. Deux réactions PCR ont ensuite été réalisées pour détecter les gènes *ply* et *lytA*. Les amorces et sondes qui ont été utilisés sont mentionnées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Amorces utilisées pour la recherche des gènes *ply* et *lytA*.

Nom	Type	Séquences (5'- 3')	Longueur (pb*)	Tm (°C) (% de CG)	Référence publication
ply					
SPply F	Sens	TGCAGAGCGTCCTTTGGTCTAT	22	66 (48)	Corless et al. 2001
SPply R	Antisens	CTCTTACTCGTGGTTTCCAACTTGA	25	72 (44)	Corless et al. 2001
SPply TP	Sonde	TTCGAGTGTTGCTTATGGGCGCCA	24	74 (54)	Gracie et al. 2014
lytA					
LytA F	Sens	CGCAATCTAGCAGATGAAGCAG	22	49.7 (50)	Adapté de McAvin et al. 2001
LytA R	Antisens	AAGGGTCAACGTGGTCTGAGT	21	51.6 (54.5)	Adapté de Boving et al. 2009
LytA Pr	Sonde	TTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGG	25	52.6 (48)	McAvin et al. 2001

*pb : paires de bases

Pour l'amplification du gène *ply*, le test PCR a été réalisé sous un volume de 20 µl contenant 12,5 µl de mastermix (1X QuantiTect multiplex PCR kit, Qiagen), 16 pmol de chaque amorce, 6 pmol de sonde et 5 µl d'ADN. La réaction de PCR a consisté en une dénaturation initiale (10 min à 95°C) suivie de 45 cycles de dénaturation (15 sec à 95°C) et d'une hybridation/extension (60 sec à 60°C) sur un thermocycleur Smart (Cepheid).

Pour l'amplification du gène *lytA*, le test PCR a été réalisé sous un volume de 20 µl contenant 12,5µl de mastermix (2X FAST qPCR Mastermix, Eurogentec), 20 pmol de chaque amorce, 6 pmol de sonde et 5 µl d'ADN. La réaction de PCR a consisté en une dénaturation initiale (10 min à 95°C) suivie de 45 cycles de dénaturation (15 sec à 95°C) et d'une hybridation/extension (40 sec à 59°C) sur un thermocycleur ABI7500 Fast (Applied Biosystems).

4. Marquage CE du test Pneumoresp

Pour le marquage CE du test PneumoResp, plusieurs expériences ont été réalisées et sont toujours en cours. Le **Tableau 7** résume les tests effectués ou à faire.

Tableau 7. Expériences réalisées pour le marquage CE du PneumoResp.

Expérience	Objectif
Répétabilité	Vérifier que le test est répétable en testant plusieurs fois le même échantillon dans les mêmes conditions
Reproductibilité inter-jours	Vérifier que le test donne les mêmes résultats quel que soit le jour
Reproductibilité inter-lots	Vérifier que le test donne les mêmes résultats quel que soit le lot
Reproductibilité inter-personnes	Vérifier que le test donne les mêmes résultats quel que soit le manipulateur
Reproductibilité inter-lieux	Vérifier que le test donne les mêmes résultats quel que soit le lieu
Robustesse de la solution 2	Vérifier la robustesse de la dilution de la solution 2
Robustesse de l'évaluation du test après ouverture et variations de température	Vérifier que le test est robuste s'il est ouvert à des températures autres que celles préconisées
Robustesse de la stabilité de l'échantillon	Vérifier que le test fonctionne avec un échantillon ayant subi des variations de traitement (comme des écarts de température ou des cycles de congélation)
Robustesse du temps de lecture	Vérifier que des variations mineures de temps de lecture n'influent pas sur le résultat par rapport aux temps indiqués dans la notice
Robustesse du volume de l'échantillon	Vérifier que des variations mineures de volume de l'échantillon n'influent pas sur le résultat par rapport au volume indiqué dans la notice
Robustesse du volume du tampon pousseur	Vérifier que des variations mineures de volume du tampon n'influent pas sur le résultat par rapport au volume indiqué dans la notice
Interférences	Vérifier que les substances pouvant être présentes dans la matrice (par exemple du sang) n'influent pas sur les résultats du test

Les tests restant à effectuer incluent les tests de stabilité afin de confirmer la date d'expiration de la trousse. Pour cela, une stabilité accélérée sera effectuée en mettant le produit dans une enceinte climatique à température plus élevée pendant un temps relativement court (par exemple 1 mois à 45°C). Une stabilité en temps réel sera aussi initiée. Des tests de variations de la température seront également effectués afin de mimer le transport des trousses sous différentes atmosphères et anticiper les chocs de température.

RESULTATS

MeningoSpeed : Test de diagnostic rapide de la méningite à méningocoques dans le LCR

Nous avons repris les anciens travaux des équipes de l'Institut Pasteur de Paris (Chanteau et al. 2006 ; Agnememel et al. 2015) afin de développer nos bandelettes. Nous avons utilisé les mêmes anticorps monoclonaux NmA, NmC, NmY, NmW que ces équipes (anticorps déposés à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes). Pour NmX, nous avons produit cet anticorps polyclonal selon une méthode proche de celle utilisée précédemment.

Par rapport à la version précédente développée par l'Institut Pasteur, nous avons amélioré la sensibilité, le cut-off et la stabilité du test (conservation jusqu'à 2 ans à 30°C) par une amélioration de la conjugaison à l'or. Nous avons également réduit le volume nécessaire à la réalisation du test puisque 30 µl suffisent pour faire le TDR pour une cassette. Plusieurs versions du TDR ont été testées et un prototype final a été approuvé pour devenir le produit commercialisable (**Figure 32**). Pour des raisons de propriété industrielle et de confidentialité, il ne sera dévoilé ici ni les méthodes de conception ni les composants de la bandelette.



Figure 32. Différents prototypes testés pour le TDR MeningoSpeed.
La version commerciale est présentée à droite.

La version actuelle du test permet de détecter les sérogroupes principaux d'infection par *N. meningitidis* : NmA, NmC, NmW, NmX et NmY. Une cassette détecte les sérogroupes A et W, une autre détecte les sérogroupes C et Y et enfin une dernière cassette détecte le sérogroupe X. L'autre sérogroupe important en termes de santé publique, le sérogroupe B, n'est pour le moment pas inclus dans le panel de détection.

L'étape majeure faisant suite à la phase de mise au point était la validation du prototype choisi pour entrer en phase de commercialisation. Cette validation a pu avoir lieu grâce à l'interaction de BioSpeedia avec l'unité « Infections Bactériennes Invasives » de l'Institut Pasteur que dirige le Pr. Mohamed K. Taha et qui est aussi Centre national de référence des Méningocoques et *Haemophilus influenzae* et centre collaborateur de l'OMS pour les méningites bactériennes.

Nous décrivons dans ce **premier article** l'évaluation des performances du prototype choisi. Celui-ci a été envoyé et testé dans 7 centres différents (5 centres en Afrique : Côte d'Ivoire, Maroc, Niger, République Centrafricaine, Togo et 2 en France : CNR des méningocoques et CHU de Saint-Etienne). Au total, MeningoSpeed a été évalué sur 560 échantillons de LCS. Nous avons pu montrer, par rapport à un test PCR multiplex « maison » développé par l'Institut Pasteur utilisé comme « gold standard », que MeningoSpeed avait une sensibilité de 92,7% (IC 95% 0,89-0,95), une spécificité de 93.8% (IC 95% 0,90-0,96), une valeur prédictive positive de 95.6% (IC 95% 0,93-0,97) et une valeur prédictive négative de 89.83% (IC 95% 0,85-0,93) avec une concordance globale de 93.2%.

Ce TDR permet également de typer les sérogroupes A/C/W/X/Y. Sur les 319 échantillons positifs par PCR, les résultats étaient concordants avec le TDR pour 299 d'entre eux. La sensibilité était de 93.0%, 74.4%, 98.1%, 100% et 83.3% pour les sérogroupes A, C, W, X et Y, respectivement. La spécificité et la valeur prédictive négative étaient excellentes pour les 5 sérogroupes. En conclusion, le test MeningoSpeed a montré de très bonnes performances pour la détection rapides des antigènes de *N. meningitidis* dans le LCR.

L'article complet en version originale figure ci-après tel qu'il a été soumis à la revue *Journal of Clinical Microbiology*. Les trois rapporteurs ont émis des avis plutôt très positifs et l'article est en révision favorable.

ARTICLE 1 : Validation of a new Rapid Detection Test for the detection of Neisseria meningitidis A/C/W/X/Y antigens in cerebrospinal fluid.

Validation of a new Rapid Detection Test for the detection of *Neisseria meningitidis* A/C/W/X/Y antigens in cerebrospinal fluid

Cyrille H. Haddar[1,2], Aude Terrade[3], Paul Verhoeven[1,4], Berthe-Marie Njanpop-Lafourcade[5], Mireille Dosso[6], Fati Sidikou[7], Ali Elhaj Mahamamne[7], Jean-Pierre Lombart[8], Aziza Razki[9], Eva Hong[3], Alain Agnememel[3], Evelyne Begaud[2], Yves Germani[2], Bruno Pozzetto[1,4,#] and Muhamed-Kheir Taha[3]

[1] GIMAP EA 3064 (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes), University of Lyon, 42023 Saint-Etienne, France

[2] BioSpeedia, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

[3] Institut Pasteur, Invasive Bacterial Infections Unit and National Reference Centre for Meningococci and *Haemophilus influenzae*, 28 rue du Dr. Roux 75724 Paris, France

[4] Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 02, France

[5] Agence de Médecine Préventive, Paris, France

[6] Bacteriology and Virology Department, Institut Pasteur, Abidjan, Côte d'Ivoire

[7] Centre de Recherche Medicale et Sanitaire (CERMES), BP 10887, Niamey, Niger

[8] Institut Pasteur de Bangui, BP 923, Bangui, Central African Republic

[9] Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Morocco

Key words: *Neisseria meningitidis*, cerebrospinal fluid, rapid diagnostic test, validation

Running title: New A/C/W/X/Y RDT for *N. meningitidis* infection in CSF

[#] **Corresponding author:**

Pr. Bruno Pozzetto, MD, PhD

Laboratory of Bacteriology-Virology-Hygiene, University hospital of Saint-Etienne

42055 Saint Etienne Cedex 02, France

Tel: +33 4 77 82 84 34

Fax: +33 4 77 82 84 60

E-mail: bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr

ABSTRACT (245 words)

Meningococcal meningitis remains a life-threatening disease worldwide, with high prevalence in the sub-Saharan meningitis belt. A rapid diagnosis is crucial for implementing adapted antimicrobial treatment. We describe the performances of a new immunochromatographic test (MeningoSpeed, Biospeedia, France) for detecting and grouping *Neisseria meningitidis*. Cerebrospinal fluids (CSF) were collected from 5 African countries and France. For the rapid diagnostic test (RDT), the CSF sample was deposited on each of the 3 cassettes for a total volume of 90 µl. The results of the RDT were compared to those of a reference multiplex PCR assay detecting the major serogroups of *N. meningitidis* on 560 CSF specimens. Five specimens were found uninterpretable by RDT (0.9%). The results of interpretable specimens were as follows: 305 positive and 212 negative samples by both techniques, 14 positive by PCR only and 24 positive by RDT only (sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of 92.7%, 93.8%, 95.6% and 89.8%, respectively, with an accuracy of 93.2% and a kappa test of 0.89, $P < 0.05$). From 319 samples positive by PCR for serogroups A, C, W, X or Y, the grouping results were concordant for 299 specimens (sensitivity of 93.0%, 74.4%, 98.1%, 100% and 83.3% for serogroups A, C, W, X and Y, respectively). The MeningoSpeed RDT exhibited excellent performances for the rapid detection of *N. meningitidis* antigens. It can be stored at room temperature, requires minimal amount of CSF, is performed in 15 minutes or less and is easy-to-use at bedside.

INTRODUCTION

Neisseria meningitidis (Nm) is a Gram-negative bacterium that infects humans only; it is one of the major agents of septic meningitis, with the potential to cause either outbreaks or sporadic cases worldwide. The “meningitis belt” of sub-Saharan Africa, involving 26 countries from Senegal in the West to Ethiopia in the East, exhibits the highest rates of the disease (1). However, sporadic and epidemic cases also occur everywhere in the world (2). Meningitis due to *N. meningitidis* is known to exhibit a severe prognosis including frequent sequels and life-threatening issue (3). There are 12 known serogroups of *N. meningitidis*, differentiated by the composition of the structure of their polysaccharide capsule, but only six of them (A, B, C, W, X and Y) are commonly involved in human neurological infections. Five of these serogroups (A, B, C, W, and Y) are targets in currently licensed meningococcal vaccines (4).

Despite vaccination programs in some African countries, outbreaks due to *N. meningitidis* are still observed in Africa. Since the introduction of the MenAfriVac immunization program using a vaccine directed against *N. meningitidis* serogroup A, major epidemics involving this serogroup have nearly disappeared in Africa (5). However, other serogroups are emerging in the meningitis belt and outbreaks involving C, W or X serogroups (depending on the country) are now reported (2,6). Ongoing surveillance for early detection of *N. meningitidis* epidemics is important, as illustrated by a recent study from the World Health Organization (WHO) Collaborating Centers for Reference Meningitis that showed that new strains of *N. meningitidis* can cause epidemic at any time and everywhere (7).

WHO guidelines recommend the use of point-of-care tests, also named Rapid Diagnostic Tests (RDT), for the early etiological diagnosis of meningitis, notably in resource-

limited countries (8). RDT have been defined as tests able to give a result in the same visit as diagnosis (9) or that can be used in health-care settings with limited infrastructure and non-trained personnel (10). Current RDT aimed to detect *N. meningitidis* in resource-limited countries are mainly gram staining, latex agglutination kits (11-13), immunochromatographic dipstick diagnostic test (14-18), and nucleic acid amplification tests (NAAT), notably those based on loop-mediated isothermal amplification methods due to high sensitivity, a rapid availability of results, and minimal specialized equipment and laboratory expertise (19-21).

Dipsticks using immunochromatography have been recently developed at the Institut Pasteur de Paris (IPP), France to detect meningococci of serogroups A, C W/Y and X (14,16,18) that were subsequently transferred to Biospeedia which developed an improved prototype for industrial use. This report describes an innovative, rapid and easy-to-use immunochromatographic RDT called MeningoSpeed (BioSpeedia, Paris, France). This test uses monoclonal antibodies directed against capsular polysaccharides belonging to A, C, W, X and Y antigens of *N. meningitidis*. This study was aimed at evaluating this new test on many cerebrospinal fluid (CSF) specimens originating in large part from countries of the meningitis belt.

MATERIAL AND METHODS

Population

The studied population included patients consulting for clinical symptoms suspect of meningitis. The study was performed on 560 CSF specimens collected between 2006 and 2017 from 7 different centers located in 5 African countries and France: 70 samples from the Centre de Recherche Médicale et Sanitaire, Niamey, Niger, 77 from the Pasteur Institute of Abidjan,

Côte d'Ivoire, 29 from the Pasteur Institute of Bangui, République Centre-Africaine, 6 from the Pasteur Institute of Casablanca, Morocco, 90 from the Agence de Médecine Préventive-Togo of Dapaong, Togo, 72 from the University-Hospital of Saint-Etienne, France and 216 from the IPP, France.

Study design

The diagnosis strategy to perform the initial etiological diagnosis of meningitis in each country, combining RDT screening, bacterial culture and NAAT, was left to the initiative of each center and is not described herein. The CSF samples that were evaluated in this study were remaining clinical specimens that were kept frozen at -80°C. The MeningoSpeed cassettes were distributed by the IPP to the other centers, in line with the mission of these centers for the surveillance of meningococcal diseases in the corresponding countries under approvals from the internal board of the PPI. The samples were anonymized before testing. In this study, the performances of the MeningoSpeed RDT were evaluated retrospectively by comparison to the results of an in-house multiplex PCR assay described below, also performed in each center, used as reference standard.

Microbiological cultures

Bacterial cultures were performed for some specimens (at least 266) by plating a 10-µl volume of CSF on appropriate media; the plates were incubated at 37°C under 5% CO_2.

MeningoSpeed Rapid Diagnostic Test

The MeningoSpeed RDT (Biospeedia, Paris, France) is a lateral flow immunochromatographic test composed of 3 cassettes. The first one detects A and W

serogroups, the second one detects Y and C serogroups, and the third one detects X serogroup. Each cassette comprises a control line for verifying that the sample was deposited correctly. One drop (approximately 30 µl) of CSF specimen was deposited in the sample well of each cassette with the help of a disposable pipette present in the kit. The result was read as soon as the bands appear for a maximum time of 15 minutes. In the absence of positivity of the control line, the test is declared uninterpretable.

PCR assays

An in-house real-time PCR multiplex assay developed by the IPP (referenced as "IPP rtPCR assay" further in the text) was used in each center for the detection of *N. meningitidis* DNA targeting the meningococcal-specific gene *crgA* coding for a LysR-like transcriptional regulator, and six serogroup-specific (A, B, C, W, X, Y) Nm capsular genes. A Qiagen column-based method was used for the optimal extraction of DNA from CSF. Internal quality controls were included to monitor extraction of DNA and PCR inhibition, as previously described (22).

Additional PCR assays were performed for the detection of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* DNA targeting *hpd* and *lytA* genes, respectively, according to formerly described techniques (23).

Statistical analysis

Descriptive variables, sensitivity, specificity and predictive values were reported with their 95% confidence interval (CI). These data, together with the Cohen's kappa concordance coefficient, were calculated by using GraphPad Prism 5 software (California, USA). *P* values under 5% were considered to be statistically significant.

RESULTS

Results combining culture and PCR techniques

Five hundred and sixty CSF samples were included into the study. By combining conventional culture (performed on at least 288 samples) and IPP rtPCR assay (performed on all the samples), the following results were observed: 334 samples were positive for *N. meningitidis* (including 44 serogroup A, 10 serogroup B, 47 serogroup C, 161 serogroup W, 60 serogroup X and 12 serogroup Y), 83 samples were positive for *Streptococcus pneumoniae*, 16 samples were positive for *Haemophilus. influenzae*, 5 samples were positive for *Streptococcus suis* and 122 samples were negative.

Performances of the MeningoSpeed RDT by comparison to IPP rtPCR assay

Five of the 560 specimens were found to be uninterpretable by RDT (0.9%). **Table 1** depicts the comparative results between the MeningoSpeed RDT and the IPP rtPCR assay taken as reference standard (22) on the 555 interpretable CSF specimens by comparison to. The accuracy between the two tests was 93.2 % (Cohen's kappa test of 0.89, $P < 0.05$). The respective sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of RDT were of 0.927 (95% CI 0.892-.952), 0.938 (95% CI 0.896-0.964), 0.956 (95% CI 0.926-0.974) and 0.898 (95% CI 0.851-0.932) by comparison to PCR. The variations of NPV and PPV for the diagnosis of *N. meningitidis* (serogroups A/C/W/Y/X) according to prevalence 0-100% are shown in **Figure 1**.

Analysis of discrepant results

174 **Table 2** gives the details of the 43 specimens that gave discrepant results by PCR and
175 RDT (5 uninterpretable by RDT, 24 positive by PCR and negative by RDT, and 14 exhibiting the
176 opposite pattern). Concerning false-positive results, they were observed in negative
177 specimens as well as in specimens positive for another bacterium; in 8 of these 14 samples,
178 the cross-reactivity was observed with the W valence. Concerning false-negative results, it is
179 worthwhile to note that the MeningoSpeed RDT does not include antigens targeting the B
180 serogroup, which explains why the 10 samples found positive for this serogroup –all coming
181 from CSF sampled in France- were all missed by the RDT.
182
183 **Correlation between MeningoSpeed RDT and IPP rtPCR assay at the serogroup level**
184 After exclusion of the 10 samples found positive for serogroup B that was absent from
185 the RDT, 319 CSF samples remained positive by PCR. From these 319 samples, 299 gave
186 concordant results at the serogroup level by both techniques with the following distribution:
187 40 NmA, 35 NmC, 156 NmW, 58 NmX and 10 NmY. For 6 samples, the RDT detected *N.*
188 *meningitidis* infection but with a wrong serogroup: 3 samples were identified as NmA by RDT
189 but were typed NmC by PCR, and 3 other samples identified as NmX by RDT were typed NmA,
190 NmC and NmY, respectively, by PCR. The 14 remaining samples positive by PCR were found
191 negative by RDT. **Table 3** illustrates the performances of the RDT for each serogroup:
192 sensitivity was excellent for serogroups A, W and X, correct for serogroup Y and weak for
193 serogroup C. The specificity and NPV were excellent for all the 5 serogroups (**Table 3**).
194
195 **DISCUSSION**
196

197 The identification and serogrouping of *N. meningitidis* infection are important for
198 disease control and vaccination strategies (24, 25). The availability of RDTs is important for the
199 early diagnosis of meningitis due to this bacterium, notably in case of outbreaks that
200 frequently occur in the meningitis belt of sub-Saharan Africa (26). The MeningoSpeed RDT
201 evaluated in this study answers to most of the diagnostic criteria required by WHO for limited-
202 resource areas: it is easy to store (room temperature with stability of two years between +4°C
203 and 30°C), perform and read, without needing sophisticated equipment nor electricity; small
204 amounts of CSF are required (less than 100 µl for the 3 cassettes); the result is available within
205 15 minutes; 5 of the 6 most commonly identified serogroups can be detected, which permits
206 simultaneous identification and serogrouping with a good confidence; finally, the overall
207 performances of the test are very satisfactory by comparison to a sensitive PCR assay taken as
208 reference standard when tested on a large panel of CSF belonging to various serogroups
209 (**Tables 1 and 3**). However, the risk of missing a positive sample (as illustrated by the overall
210 NPV of 89.8% with regard to PCR assay) confirms that a negative result with this technique
211 does not avoid further testing and the start of an empiric antimicrobial treatment if the clinical
212 and biological context is evocative of purulent meningitis.

213 At the serogroup level, the analytical performances of the MeningoSpeed RDT were in
214 good concordance with those of other rapid antigenic tests, as illustrated in **Table 4** for
215 sensitivity and specificity. Even if the comparison of results is not totally pertinent given the
216 size and origin of the panels that were evaluated in these different studies, it is worthwhile to
217 note that the performances of the MeningoSpeed RDT were at least equivalent to and often
218 higher than those of former tests. The only exception concerned serogroup C for which a few
219 samples were missed; the same moderate sensitivity for this serogroup was noticed in the
220 study of Uadiale et al. conducted in Nigeria (13). These observations stressed once more that

a negative result for *N. meningitidis* antigens in a CSF sample from a patient suspect of purulent meningitis does not discard the diagnosis of meningococcal infection and must be confirmed by additional microbiological investigations. In the future, an improvement in the quality of the antibodies used in the MeningoSpeed test may contribute to reduce the number of cross-reactivities and of false-negative results.

We are aware that the present study shows some limitations. First, its retrospective design is not compatible with a correct evaluation of the feasibility of the RDT in field condition. However, the technology of the MeningoSpeed RDT is very close to that already evaluated in points-of-care by other studies; the study of Collard et al. (17) performed in Niger on a large panel of samples is illustrative of the good concordance between results obtained with a dipstick system in the field and in a reference laboratory (see **Table 4**). A prospective in-field study is currently conducted in Niger and Burkina Faso for validating the MeningoSpeed assay. Second, despite the very low proportion of uninterpretable results (0.9%), it is important to consider that all of them were found positive for *N. meningitidis* DNA by the IPP rtPCR assay (**Table 2**), which means that such samples need imperatively to be tested by an alternative technique. Third, the absence of B serogroup in the MeningoSpeed panel led to miss 10 samples found positive for this serogroup by the IPP rtPCR assay. Although NmB serogroup is less frequently involved than others in meningitis outbreaks occurring in Africa (all the B strains of this study were detected in CSF sampled in France), it was shown to be responsible for 29% of all the outbreaks observed in other continents (24). In order to fill the gap we have the objective to add this valence to a future version of the MeningoSpeed RDT. Forth, a few methodological aspects were neglected, including an inter-site quality control in order to assess that the results of the different tests were reproducible from a site to another, or a blind reading of each RDT by two independent observers in order to minimize

the misinterpretations due to eye-reading. These limitations are linked to the difficulty of organizing a ground trial in 7 different centers including 5 of them in African countries. It is obvious that these limitations may have conducted to under-estimate the performances of the tested RDT. Finally, the eye-reading of the result of the present RDT may introduce subjectivity in the interpretation of the test, notably when non-trained personnel is in charge of it; for the detection of other agents, and notably viruses, automatic readers are available, which improves substantially the traceability and the performances of such “digital immunoassays” (27). It could be interesting to propose this improvement for a future version of the test.

Despite these limitations, the test evaluated in this study brings together most of the qualities of a point-of-care RDT. In most cases, its performances can guarantee an accurate detection of *N. meningitidis* antigens and a correct serogrouping of the agent. The test is now in evaluation in large-scale studies performed in the African meningitis belt.

ACKNOWLEDGMENTS

BioSpeedia delivered the MeningoSpeed RDT kits for free. This company had no role in study design, data collection, interpretation of results, or the decision to submit the work for publication.

CHH is a PhD student of the University of Saint-Etienne whose thesis was cofounded by the CIFRE French Ministry of Higher Education and Research (CIFRE fellowship no 1283/2014) and BioSpeedia.

These results were presented in part at the 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases that occurred in Madrid last April 2018 (poster 0849).

CONFLICT OF INTEREST

EB and YG are working at BioSpeedia, a spin-off of the Paris Pasteur Institute. The other authors have no conflict of interest to declare in relation with the matter of this study.

AUTHORS'CONTRIBUTION

CHH did some experiments, analyzed the results and contributed to the writing of the paper. AT, PV, BMNL, MD, FS, AEM, JPL, AR, EH and AA provided the results of the different centers involved in the trial and approved the final manuscript. EB and YG elaborated the MeningoSpeed RDT and approved the final manuscript. BP contributed to the analysis of results and wrote the manuscript. MKT conceived the design of the study, contributed to the analysis of results and contributed to the writing of the manuscript. All the authors agreed with the revised manuscript.

285 **REFERENCES**

286

287 1. Harrison LH, Pelton SI, Wilder-Smith A, Holst J, Safadi MA, VazquezJA, Taha MK,
288 LaForce FM, von Gottberg A, Borrow R, Plotkin SA. 2011. The Global Meningococcal
289 Initiative: recommendations for reducing the global burden of meningococcal
290 disease. Vaccine 29:3363–3371.
291 2. Acevedo R, Bai X, Borrow R, Caugant DA, Carlos J, Ceyhan M, Christensen H, Climent
292 Y, de Wals P, Dinleyici EC, Echaniz-Aviles G, Hakawi A, Kamiya H, Karachaliou A,
293 Lucidarme J, Meiring S, Mironov K, Sáfadi MAP, Shao Z, Smith V Steffen R, Stenmark
294 B, Taha MK, Trotter C, Vázquez JA, Zhu B. 2019. The Global Meningococcal Initiative
295 meeting on prevention of meningococcal disease worldwide: epidemiology,
296 surveillance, hypervirulent strains, antibiotic resistance and high-risk populations.
297 Expert Rev Vaccines 18:15-30.
298 3. Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. 2001. Meningococcal
299 disease. N Engl J Med 344:1378-1388.
300 4. McCarthy PC, Sharyan A, Sheikhi Moghaddam L. 2018. Meningococcal vaccines:
301 current status and emerging strategies. Vaccines 6.pii:E12.
302 5. Daugla DM, Gami JP, Gamougam K, Naibei N, Mbainadji L, Narbé M, Toralta J,
303 Kodbesse B, Ngadoua C, Coldiron ME, Fermon F, Page AL, Djingarey MH, Hugonnet S,
304 Harrison OB, Rebbetts LS, Tekletsion Y, Watkins ER, Hill D, Caugant DA,
305 Chandramohan D, Hassan-King M, Manigart O, Nascimento M, Woukeu A, Trotter C,
306 Stuart JM, Maiden M, Greenwood BM. 2014. Effect of a serogroup A meningococcal
307 conjugate vaccine (PsA-TT) on serogroup A meningococcal meningitis and carriage in
308 Chad: a community study [corrected]. Lancet 383:40-47.

309 6. Soumahoro MK, Kouamé-Elogne C, Anné JC, Noufé S, N'Guessan KC, Kacou-N'Douba
310 A, Hanslik T, Dosso M. 2018. Emergence of *Neisseria meningitidis* W135 in Côte
311 d'Ivoire: laboratory based-surveillance. Epidemiol Health 40:e2018058.
312 7. Topaz N, Caugant DA, Taha MK, Brynildsrud OB, Debech N, Hong E, Deghmane AE,
313 Ouédraogo R, Ousmane S, Gamougame K, Njanpop-Lafourcade BM, Diarra S, Fox LM,
314 Wang X. 2019. Phylogenetic relationships and regional spread of meningococcal
315 strains in the meningitis belt, 2011-2016. EBioMedicine 41:488-496.
316 8. World Health Organization. 2014. Revised guidance on meningitis outbreak response
317 in sub-Saharan Africa. Wkly Epidemiol Rec 89:577-588.
318 9. Pai NP, Vadnais C, Denkinger C, Engel N, Pai M. 2012. Point-of-care testing for
319 infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income
320 countries. PLoS Med 9:e1001306.
321 10. Yansouni CP, Bottieau E, Lutumba P, Winkler AS, Lynen L, Büscher P, Jacobs J, Gillet P,
322 Lejon V, Alirol E, Polman K, Utzinger J, Miles MA, Peeling RW, Muyembe JJ, Chappuis
323 F, Boelaert M. 2013. Rapid diagnostic tests for neurological infections in central
324 Africa. Lancet Infect Dis 13:546-558.
325 11. Borel T, Rose AM, Guillerm M, Sidikou F, Gerstl S, Djibo A, Nathan N, Chanteau S,
326 Guerin PJ. 2006. High sensitivity and specificity of the Pastorex latex agglutination
327 test for *Neisseria meningitidis* serogroup A during a clinical trial in Niger. Trans R Soc
328 Trop Med Hyg 100:964-969.
329 12. Rose AM, Gerstl S, Mahamane AE, Sidikou F, Djibo S, Bonte L, Caugant DA, Guerin PJ,
330 Chanteau S. 2009. Field evaluation of two rapid diagnostic tests for *Neisseria*
331 *meningitidis* serogroup A during the 2006 outbreak in Niger. PLoS One 2009 4:e7326.

13. Uadiale K, Bestman A, Kamau C, Caugant DA, Greig J. 2016. Evaluation of Pastorex meningitis kit performance for the rapid identification of *Neisseria meningitidis* serogroup C in Nigeria. Trans R Soc Trop Med Hyg 110:381-385.
14. Chanteau S, Dartevelle S, Mahamane AE, Djibo S, Boisier P, Nato F. 2006. New rapid diagnostic tests for *Neisseria meningitidis* serogroups A, W135, C, and Y. PLoS Med 3:e337.
15. Rose AM, Mueller JE, Gerstl S, Njanpop-Lafourcade BM, Page AL, Nicolas P, Traoré RO, Caugant DA, Guerin PJ. 2010. Meningitis dipstick rapid test: evaluating diagnostic performance during an urban *Neisseria meningitidis* serogroup A outbreak, Burkina Faso, 2007. PLoS One. 5:e11086.
16. Terrade A, Collard JM, Nato F, Taha MK. 2013. Laboratory evaluation of a rapid diagnostic test for *Neisseria meningitidis* serogroup A.Trans R Soc Trop Med Hyg 107:460-461.
17. Collard JM, Wang X, Mahamane AE, Idi I, Issaka B, Ousseni M, Mayer LW, Nato F, Moulia-Pelat JP. 2014. A five-year field assessment of rapid diagnostic tests for meningococcal meningitis in Niger by using the combination of conventional and real-time PCR assays as a gold standard. Trans R Soc Trop Med Hyg 108:6-12.
18. Agnememel A, Traincard F, Dartevelle S, Mulard L, Mahamane AE, Oukem-Boyer OOM, Denizon M, Kacou-N Douba A, Dosso M, Gake B, Lombart JP, Taha MK. Development and evaluation of a dipstick diagnostic kit for *Neisseria meningitidis* serogroup X. J Clin Microbiol 53:449-454.
19. McKenna JP, Fairley DJ, Shields MD, Cosby SL, Wyatt DE, McCaughey C, Coyle PV. 2011. Development and clinical validation of a loop-mediated isothermal

355 amplification method for the rapid detection of *Neisseria meningitidis*. Diagn
356 Microbiol Infect Dis 69:137-144.
357 20. Lee D, Kim EJ, Kilgore PE, Kim SA, Takahashi H, Ohnishi M, Anh DD, Dong BQ, Kim JS,
358 Tomono J, Miyamoto S, Notomi T, Kim DW, Seki M. 2015. Clinical evaluation of a
359 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Neisseria*
360 *meningitidis* in cerebrospinal fluid. PLoS One 10:e0122922.
361 21. Seki M, Kilgore PE, Kim EJ, Ohnishi M, Hayakawa S, Kim DW. 2018. Loop-Mediated
362 Isothermal Amplification methods for diagnosis of bacterial meningitis. Front Pediatr
363 6:57.
364 22. Deghmane AE, Hong E, Taha MK. 2019. Diagnosis of meningococcal infection using
365 internally controlled multiplex real-time PCR. Methods Mol Biol 1969:17-31.
366 23. World Health Organization. 2011. PCR for detection and characterization of bacterial
367 meningitidis pathogens: *Neisseria meningitidis, Haemophilus influenza, and*
368 *Streptococcus pneumoniae.* p 105-156. *In* WHO (ed), Laboratory methods for the
369 diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae,*
370 *and Haemophilus influenza*, 2nd ed, WHO/IVB.11.09, Geneva.
371 https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/full-manual.pdf . Accessed 9 October
372 2019.
373 24. van Kessel F, van den Ende C, Oordt-Speets AM, Kyaw MH. 2019. Outbreaks of
374 meningococcal meningitis in non-African countries over the last 50 years: a
375 systematic review. J Glob Health 9:010411.
376 25. Bai X, Borrow R, Bukovski S, Caugant DA, Culic D, Delic S, Dinleyici EC, Eloshvili M,
377 Erdősi T, Galajeva J, Křížová P, Lucidarme J, Mironov K, Nurmatov Z, Pana M, Rahimov
378 E, Savrasova L, Skoczyńska A, Smith V, Taha MK, Titov L, Vázquez J, Yeraliyeva L. 2019.

379 Prevention and control of meningococcal disease: updates from the Global
380 Meningococcal Initiative in Eastern Europe. J Infect pii:S0163-4453(19)30332-9.
381 [Epub ahead of print].
382 26. Patel JC, Soeters HM, Diallo AO, Bicaba BW, Kadadé G, Dembélé AY, Acyl MA,
383 Nikiema C, Lingani C, Hatcher C, Acosta AM, Thomas JD, Diomande F, Martin S, Clark
384 TA, Mihigo R, Hajjeh RA, Zilber CH, Aké F, Mbaeyi SA, Wang X, Moisi JC, Ronveaux O,
385 Mwenda JM, Novak RT; MenAfriNet Consortium. 2019. MenAfriNet: a network
386 supporting case-based meningitis surveillance and vaccine evaluation in the
387 meningitis belt of Africa. J Infect Dis 220:S148-S154.
388 27. Merckx J, Wali R, Schiller I, Caya C, Gore GC, Chartrand C, Dendukuri N, Papenburg J.
389 2017. Diagnostic accuracy of novel and traditional rapid tests for influenza infection
390 compared with reverse transcriptase polymerase chain reaction: a systematic review
391 and meta-analysis. Ann Intern Med 167:394.
392

TABLES

Table 1. Comparison of the results obtained by the rapid diagnostic test (RDT) and the IPP rtPCR assay taken as reference standard on 555 cerebrospinal fluids for the diagnosis of Neisseria meningitidis infection.

		PCR		Total
		+	-	
RDT	+	305	14	319
	-	24	212	236
Total		329	226	555

Table 2. Analysis of discrepant results between the PCR assays taken as reference standard and the MeningoSpeed rapid diagnostic test (RDT).

RDT	no.	Results of PCR assays targeting Nm, Sp or Hi								
		NmA	NmB	NmC	NmW	NmX	NmY	Sp	Hi	Neg
Uninterpretable	**5**	**1**	**0**	**0**	**2**	**2**	**0**	**0**	**0**	**0**
False negative	**24**	**2**	**10***	**8**	**3**	**0**	**1**	**0**	**0**	**0**
False positive	**14**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**2**	**3**	**9**

Nm: *Neisseria meningitidis*; Sp: *Streptococcus pneumoniae*; Hi: *Haemophilus influenzae*.
Neg: negative result by the PCR tests targeting independently Nm, Sp and Hi.
* It was predicted that these samples would be negative since the RDT assay lacks the NmB antigen**.**

406 **Table 3.** Performances of the MeningoSpeed RDT by comparison to the IPP rtPCR assay used
407 as reference standard for the serogroup determination of the 319 specimens found positive
408 for Neisseria meningitis by PCR (after exclusion of the 10 samples serogrouped as NmB as this
409 antigen was absent from the RDT).

410

	Serogroup determined by PCR				
	A	**C**	**W**	**X**	**Y**
no. CSF + by PCR	43	47	159	58	12
Sensitivity (CI 95%)	0.930 (0.799-0.981)	0.744 (0.594-0.856)	0.981 (0.942-0.945)	1 (0.923-1)	0.883 (0.509-0.970)
Specificity (CI 95%)	0.990 (0.976-0.996)	1 (0.990-1)	0.980 (0.960-0.990)	0.986 (0.976-0.994)	1 (0.991-1)
PPV (CI 95%)	0.889 (0.751-0.958)	1 (0.877-1)	0.951 (0.903-0.978)	0.892 (0.784-0.952)	1 (0.655-1)
NPV (CI 95%)	0.994 (0.982-0.998)	0.977 (0.959-0.988)	0.992 (0.976-0.998)	1 (0.990-1)	0.996 (0.985-0.999)
Cohen's kappa coefficient (CI 95%)	0.901 (0.834-0.969)	0.842 (0.755-0.930)	0.952 (0.924-0.980)	0.936 (0.889-0.983)	0.907 (0.780-1)

411

412 PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

413

414 **Table 4.** Respective sensitivity and specificity of RDT by comparison to PCR as referenced in different studies of the literature.

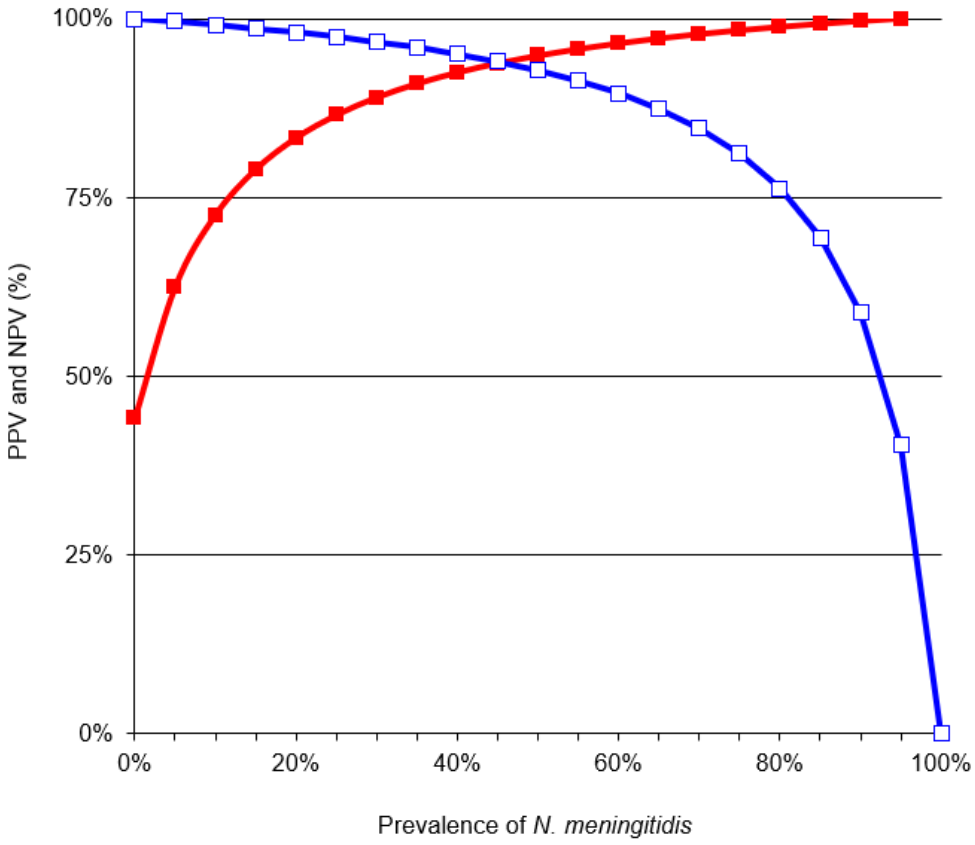
Reference Year	Type of RDT	No. CSF	Origin of CSF	Serogroup	Sensitivity % (CI 95%)	Specificity % (CI 95%)
(11) 2006	LA	484	Niger 2003	A	88 (85-91)	93 (90-95)
(12) 2009	LA Dipstick	126	Niger 2006	A	69 (57-79) 89 (80-95)	81 (68-91) 62 (48-75)
(15) 2010	Dipstick	265	Burkina Faso 2007	A	70.0 (55.4-82.1)	97.0 (93.4-98.7)
(16) 2013	Dipstick	401	France, Burkina Faso, Niger	A	88 (81-92)	99 (98-100)
(17) 2014	Dipstick	1113* 1162**	Niger 2008-2012	A/W	87.6 (85.7-89.3) 92.5 (89.8-92.9)	85.7 (83.1-87.2) 84.6 (82.0-86.9)
(18) 2015	Dipstick	369	Cameroon, Côte d'Ivoire, Niger, France	X	94 (86-98)	100 (99-100)
(13) 2016	LA	63	Nigeria 2013-2015	C	80.0 (65.4-90.4)	94.4 (72.7-99.9)
This study 2019	Dipstick	560	Niger, Côte d'Ivoire, République Centre-Africaine, Togo, France	A C W X Y	93.0 (79.9-98.1) 74.4 (59.4-85.6) 98.1 (94.2-99.5) 100 (92.3-100) 83.3 (50.9-97.0)	99.0 (97.6-99.6) 100 (99.0-100) 98.0 (96.0-99.0) 98.6 (97.6-99.4) 100 (99.1-100)

415 RDT: rapid diagnostic test; CSF: cerebrospinal fluid; LA: latex agglutination.
416 * tested in point-of-care; ** tested in reference laboratory.

417 **FIGURE LEGEND**

418

419 **Figure 1.** Positive (red line with filled squares) and negative predictive values (blue line with
420 open squares) of the MeningoSpeed rapid diagnostic test for the detection of *N. meningitidis*
421 in cerebrospinal fluid according to prevalence varying from 0 to 100%.



422

423

PneumoSpeed : Test de diagnostic rapide du pneumocoque dans l'urine et le LCS

Le TDR PneumoSpeed avait été testé cliniquement pour la matrice urine (données internes de BioSpeedia) par comparaison à la technique PCR et à un autre TDR. Les performances avaient été les suivantes : sensibilité de 93%, spécificité de 96%, valeur prédictive positive de 92% et valeur prédictive négative de 97%.

Pour évaluer les performances cliniques du test PneumoSpeed sur LCS, nous avons collectés 32 échantillons de LCS au CHU de Saint-Etienne et au centre d'Infectiologie Charles Mérieux d'Antananarivo à Madagascar. Ils ont été testés positifs grâce à plusieurs techniques incluant l'examen direct et la culture bactérienne, considérée comme la technique de référence actuelle pour la détection de *S. pneumoniae* dans le LCS ; dans certains cas, des techniques supplémentaires comme la détection d'antigènes solubles par tests BinaxNow ou Pastorex et la biologie moléculaire (PCR) ont également été utilisées. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 8** :

Tableau 8. Résultats de l'évaluation clinique du test PneumoSpeed sur des échantillons de liquide cérébrospinal.

		Culture bactérienne (n=32)		**Examen direct (n=32)**		**TDR commercial (n=13)**		**PCR (n=13)**	
		Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
PneumoSpeed	Positif	13	2	15	0	11	0	11	0
	Négatif	0	17	0	17	0	2	2	0
	Total	13	19	15	17	11	2	13	0

Par rapport à la culture bactérienne, la sensibilité était de 100%, la spécificité de 89%, la valeur prédictive positive de 86% et la valeur prédictive négative de 100%. Si on exclut les deux échantillons positifs par PneumoSpeed et négatifs en culture (qui correspondent à des faux négatifs de la culture car confirmés positifs par les 3 autres techniques (examen direct, PCR et autre TDR commercial), les performances sont toutes de 100% et la concordance est totale (100%).

Le test PneumoSpeed a aussi une corrélation de 100% par rapport à l'examen direct et aux TDR concurrents. Par rapport à la PCR, 2 LCS sont positifs en PCR mais négatifs en TDR. Ce sont 2 faux négatifs du PneumoSpeed qui avaient également été manqués par les 3 autres techniques (examen direct, culture et TDR concurrents). La sensibilité dans ce cas est de 85% (IC95% : 57,8%-95,7%) et la valeur prédictive positive de 100% (IC95% : 74,1%-100%) ; la spécificité et la valeur prédictive négative ne peuvent pas être calculées, aucun échantillon n'ayant été trouvé négatif.

Dans une autre validation indépendante faite par le Centre National de Références des Méningocoques et *Haemophilus influenzae* de l'Institut Pasteur de Paris, 27 échantillons supplémentaires de LCS ont été testés versus la PCR comme méthode de référence. Parmi ces 27 échantillons, 18 correspondaient à une méningite à *S. pneumoniae*, 6 correspondaient à une méningite bactérienne due à un autre germe (*N. meningitidis* A, B, C, W et X, ou *H. influenzae*) et 3 étaient négatifs. Les résultats sont consignés dans le **Tableau 9**. Ils indiquent une sensibilité de 94.44% (IC 95% : 72.71% -99.86%), une spécificité de 100% (IC95% : 69.15% à 100%), une valeur prédictive positive de 100% (IC95% : 81,6%-100%), et une valeur prédictive négative de 90% (IC95% : 59,6%-98,2%).

Tableau 9. Résultats de l'évaluation clinique du test PneumoSpeed sur 18 échantillons de LCS testés au CNR des méningocoques et *Haemophilus influenzae*.

		PCR S. *pneumoniae*		
		Positif	**Négatif**	Total
PneumoSpeed	**Positif**	17	0	17
	Négatif	1	9	10
	Total	18	9	27

PneumoResp : un test de diagnostic rapide du pneumocoque dans les expectorations

Description et création du test PneumoResp

Suite à de nombreuses discussions avec le laboratoire des Agents Infectieux et d'Hygiène du CHU de Saint-Etienne, l'idée du PneumoResp a germé. Il s'agissait de développer un dispositif destiné à détecter rapidement (à J0 de l'épisode infectieux) *S. pneumoniae* dans des prélèvements respiratoires facilement disponibles (crachats induits ou sécrétions rhino-pharyngées), tout en excluant si possible un portage. Nous avons utilisé le test PneumoSpeed destiné à détecter les antigènes solubles du germe dans les urines et le LCS, et nous l'avons adapté aux prélèvements respiratoires supérieurs. Suite à différents traitements, nous avons réussi à préparer l'échantillon afin qu'il soit compatible avec le système de détection du test. Pour différencier une colonisation d'une infection, nous avons proposé, à la manière de ce qui se fait pour les cultures bactériologiques semi-quantitatives, de diluer l'échantillon au centième.

Evaluation de la spécificité du test PneumoResp

Afin d'évaluer la spécificité du test –a priori beaucoup plus problématique que dans l'urine ou le LCS du fait de l'abondance des streptocoques dans la cavité orale et les voies aériennes supérieures) -, différentes espèces bactériennes et notamment celles qui sont commensales de la sphère oropharyngée ont été testées pour rechercher de potentielles réactions croisées. Sur toutes les souches testées, seule une des 3 souches de *Parvimonas micra* et les 3 souches de *S. pseudopneumoniae* ont été à l'origine de réactions croisées avec le test PneumoResp. Cette réactivité croisée avec *P. micra* avait déjà été signalée avec le TDR BinaxNOW (Ploton et al. 2018).

Détermination de la relation entre culture bactérienne et PCR quantitative

Les résultats de la quantification sur gélose de la souche *S. pneumoniae* ATCC 49619 ont donné 5,34 x 10^7 UFC/ml pour l'inoculum de départ. Les charges bactériennes des

différentes dilutions de raison 10 ont ensuite été déterminées à partir de cette valeur de départ.

Au niveau des deux tests PCR ciblant chacun un gène de virulence, nous avons cherché à corréler la valeur de C_t (*cycle threshold*) aux résultats de culture quantitative à partir de la valeur mentionnée au paragraphe précédent (**Figure 33**). Ces données nous permettent également de calculer la limite de détection de nos tests PCR.

ply	UFC/mL	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	Répétition 4	Répétition 5	Nombre de détection	Moyenne des valeurs de Ct
pur	5,34E+07	-	-	-	-	-	-	-
10-1	5,34E+06	-	-	-	-	-	-	-
10-2	5,34E+05	25,58	25,17	25,31	25,08	25,41	5/5	25,31
10-3	5,34E+04	29,09	29	28,9	28,78	28,95	5/5	28,944
10-4	5,34E+03	32,24	32,66	33,49	33,02	33,1	5/5	32,902
10-5	5,34E+02	36,61	36,06	36,56	35,47	35,78	5/5	36,096
10-6	5,34E+01	X	38,16	X	X	X	1/5	38,16
10-7	5,34E+00	X	X	X	X	X	0/5	-
10-8	5,34E-01	X	X	X	X	X	0/5	-

lytA	UFC/mL	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	Répétition 4	Répétition 5	Nombre de détection	Moyenne des valeurs de Ct
pur	5,34E+07	-	-	-	-	-	-	-
10-1	5,34E+06	-	-	-	-	-	-	-
10-2	5,34E+05	27,13	26,41	26,65	26,64	26,64	5/5	26,694
10-3	5,34E+04	30,48	30,6	31,02	30,64	30,42	5/5	30,632
10-4	5,34E+03	34,71	34,81	35,45	35,58	35,43	5/5	35,196
10-5	5,34E+02	X	38,37	44,42	39,85	40,64	4/5	40,82
10-6	5,34E+01	39,91	X	X	X	X	1/5	39,91
10-7	5,34E+00	X	X	X	X	X	0/5	-
10-8	5,34E-01	X	X	X	X	X	0/5	-

Figure 33. Données permettant le calcul de la limite de détection et de la sensibilité analytique des tests PCR *ply* et *lyt*A.

Cinq répétitions ont été réalisées. Le symbole « - » désigne une valeur non mesurée et le symbole « X » désigne une valeur non détectée.

La limite de détection des 2 tests PCR a pu être déterminée : elle était d'environ 10^3 UFC/ml pour le gène *ply* et d'environ 10^4 UFC/ml pour le gène *lytA*. L'efficacité a aussi été calculée en utilisant la formule : *E=((10^(-1/pente)-1)*100)* (**Figure 34**) ; elle a été de 101,5% et 87,5% pour les PCR *ply* et *lytA* respectivement.

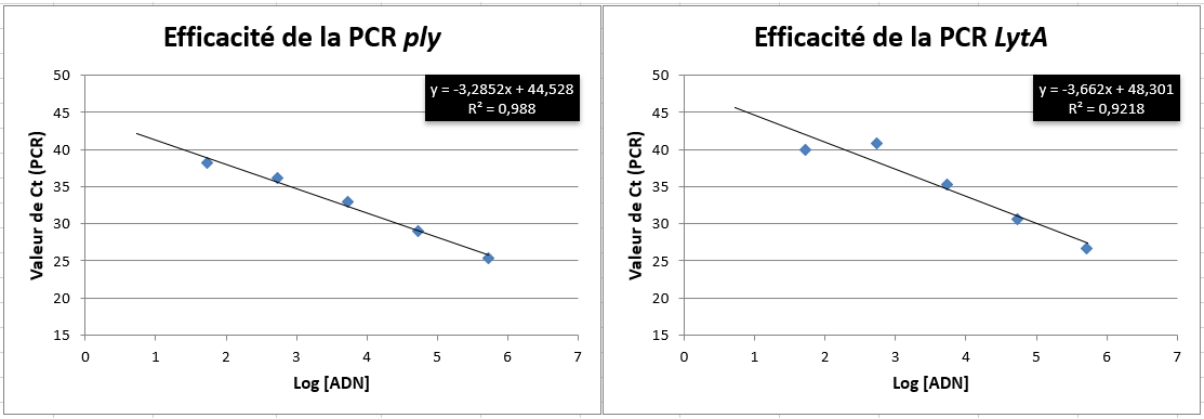


Figure 34. Calcul de l'efficacité des tests PCR *ply* et l*ytA*.

La corrélation entre les résultats de la culture bactérienne (exprimée en UFC/ml) et des tests PCR (exprimées en Ct) est illustrée sur la **Figure 35**. Elle permet de calculer une charge bactérienne à partir du résultat des tests de qPCR.

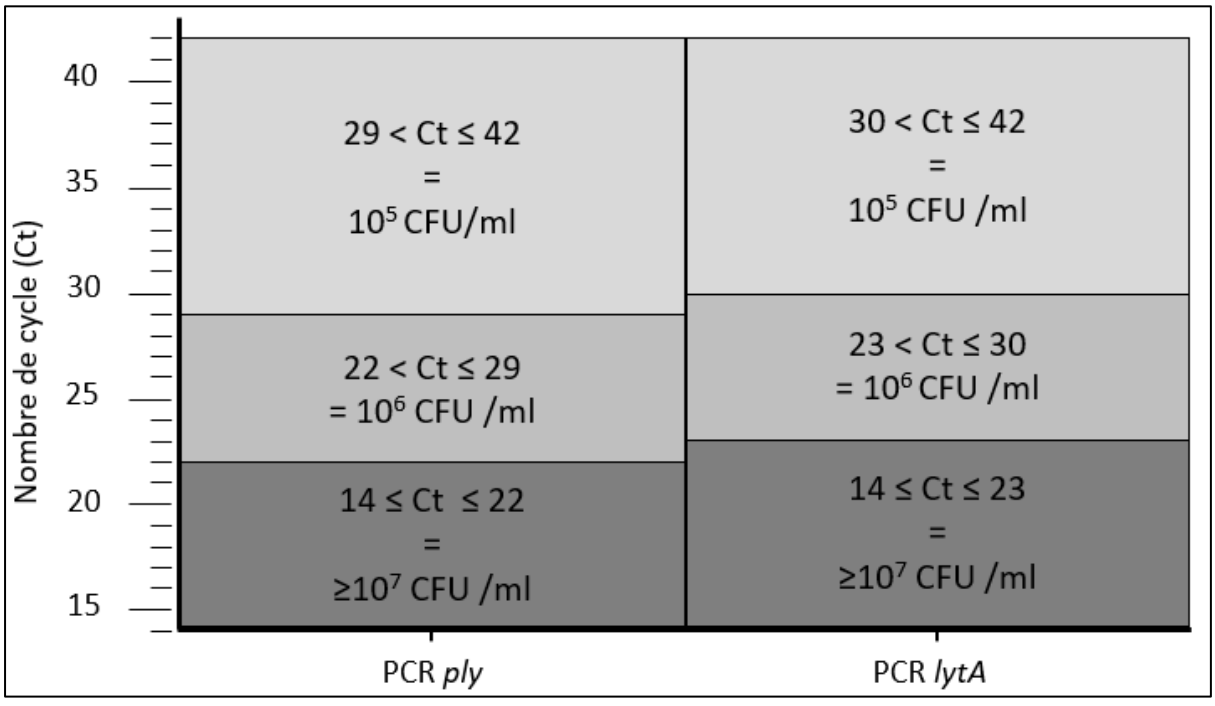


Figure 35. Corrélation entre la valeur de C_t des tests PCR et la quantité de bactéries obtenues en culture (exprimée en UFC/ml) pour la souche *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Evaluation clinique

Suite à tous ces travaux préliminaires, nous avons conduit une étude rétrospective pilote pour comparer le test PneumoResp à la culture semi-quantitative conventionnelle et aux deux tests de qPCR mentionnés ci-dessus. Cette étude a été conduite sur 196 sécrétions respiratoires provenant d'enfants ayant consulté au CHU de Saint-Etienne pour suspicion d'infection respiratoire.

L'article complet en version originale figure ci-après tel qu'il a été soumis à la revue *BMC Microbiology*.

La stratégie diagnostique développée dans le cadre de ce test fait l'objet d'un dépôt de brevet qui est en cours d'expertise (**annexe 1**).

ARTICLE 2 : Strategy using a new antigenic test for rapid diagnosis of Streptococcus pneumoniae infection in respiratory samples from children consulting at hospital.

Research article

Strategy using a new antigenic test for rapid diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infection in respiratory samples from children consulting at hospital

Cyrille H. Haddar[1,2], Johan Joly[3], Anne Carricajo[1,3], Paul O. Verhoeven[1,3], Florence Grattard[1,3], Olivier Mory[4], Evelyne Begaud[2], Yves Germani[2], Aymeric Cantais4 and Bruno Pozzetto1,3*

[1] GIMAP EA 3064 (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes), University of Lyon, 42023 Saint-Etienne, France

[2] BioSpeedia, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

[3] Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 02, France

[4] Pediatric Emergency Department, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 02, France

*** Corresponding author:**

Pr. Bruno Pozzetto, MD, PhD

Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University hospital of Saint-Etienne

42055 Saint Etienne Cedex 02, France

Tel: +33 4 77 82 84 34

Fax: +33 4 77 82 84 60

E-mail: bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr

ABSTRACT (237 words)

Background. Despite vaccination programs, *Streptococcus pneumoniae* remains among the main microorganisms involved in bacterial pneumonia, notably in terms of severity. The prognosis of pneumococcal infections is conditioned in part by the precocity of the diagnosis. The aim of this study was to evaluate the impact of a Rapid Diagnostic Test (RDT) targeting cell wall polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* and performed directly in respiratory samples, on the strategy of diagnosis of respiratory pneumococcal infections in children.

Results. Upper-respiratory tract samples from 196 children consulting at hospital for respiratory infection were tested for detecting *S. pneumoniae* using a newly-designed RDT (PneumoResp, Biospeedia), a semi-quantitative culture and two PCR assays. If positive on fluidized undiluted specimen, the RDT was repeated on 1:100-diluted sample. The RDT was found highly specific when tested on non-*S. pneumoniae* strains. By comparison to culture and PCR assays, the RDT on undiluted secretions exhibited a sensitivity (Se) and negative predictive value (NPV) of more than 98%. By comparison to criteria of *S. pneumoniae* pneumonia combining typical symptoms, X-ray image, and culture ≥ 10^7 CFU/ml, the Se and NPV of RDT on diluted specimens were 100% in both cases.

Conclusions. In case of negative result, the excellent NPV of RDT on undiluted secretions allows excluding *S. pneumoniae* pneumonia. In case of positive result, the excellent sensitivity of RDT on diluted secretions for the diagnosis of *S. pneumoniae* pneumonia allows proposing a suitable antimicrobial treatment at day 0.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, respiratory infection, rapid diagnostic test, PCR assay, pneumonia, child.

48 **BACKGROUND**

49

50 Pneumonia is a major health problem worldwide. It is one of the leading causes of
51 death and morbidity in children, especially in those under 5 years of age [1,2]. Despite
52 vaccination programs, *Streptococcus pneumoniae* remains among the main microorganisms
53 involved in bacterial pneumonia, notably in terms of severity [3]. The correct management of
54 these infections is helped by a rapid identification of the organism in clinical samples. The
55 microbiological diagnosis of *S. pneumoniae* infection is usually based on the semi-quantitative
56 culture of the bacterium from samples of the respiratory tract (usually sputum or rhino-
57 pharyngeal secretions) [4,5]. However, several factors may contribute to make the
58 microbiological confirmation difficult: (i) the differentiation between strains of *S. pneumoniae*
59 and of alpha haemolytic streptococci (formerly called viridans) that are part of the commensal
60 oral flora may be difficult [6,7]; (ii) the correct identification of *S. pneumoniae* compared to
61 other *Streptococcus* species of the mitis group relies usually on the combination of several
62 phenotypic techniques including colony morphology, optochine susceptibility, bile salt lysis
63 and mass spectrometry [6,8,9]; (iii) the culture can be falsely negative when the patient has
64 received early antimicrobial treatment. Therefore, the time to get the result of conventional
65 culture, that is usually 18 hours, can be delayed, leading to probabilistic antibiotic treatments
66 that impair antibiotic stewardship [10].
67 In recent years, the search for *S. pneumoniae* urinary antigens has found its place in
68 the bacteriological diagnosis of pneumococcal infections. These tests have a good negative
69 predictive value (NPV) for *S. pneumoniae* pneumonia, but they lack specificity. They are not
70 interesting in paediatrics because of prolonged excretion in case of invasive infections and
71 frequent asymptomatic carriage in this population [11,12]. Because of these difficulties, it

seems necessary to propose new diagnostic approaches for facilitating and shortening the management of pneumococcal infections. The objective of this study was to evaluate the impact of a Rapid Diagnostic Test (RDT) targeting cell wall polysaccharide and performed directly in respiratory samples, on the strategy of diagnosis of respiratory infections potentially caused by this bacterium in children.

RESULTS

Specificity of the PneumoResp RDT

The specificity of the test was evaluated on 52 bacterial strains belonging to 24 different species, including 30 strains of streptococci of the mitis group (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. peroris, S. pneumoniae* and S*. pseudopneumoniae*) and 22 strains of bacteria belonging to other genera (*Alloscardovia omnicolens*, *Enterococcus avium*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Parvimonas micra* and *Staphylococcus aureus*) or to non-mitis streptococci (*S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. pyogenes*, *S. salivarius* and *S. vestibularis*) in order to verify the absence of reactivity with the antigens used in the test with regard to the bacteria potentially present in the oral or respiratory flora. No cross-reactions were observed for strains belonging to the tested species, except for one of the 3 strains of *Parvimonas micra* and for the 3 strains of *S. pseudopneumoniae*. The PneumoResp RDT was positive for the 4 tested strains of *S. pneumoniae* (3 clinical strains and the ATCC reference strain 49619) that were used as positive controls.

Correlation between qPCR assays and semi-quantitative culture

Using dilutions of the ATCC strain 49619 of *S. pneumoniae*, a correlation was established between bacterial loads obtained by culture (expressed in CFU/ml) and PCR assays (expressed in Ct); the results are shown in **Figure 1**. The sensitivity of the two PCR assays was shown to be 10^3 CFU/ml for the *ply* gene and 10^4 CFU/ml for the *lytA* gene.

Overall microbiological results from clinical specimens

The demographic and clinical characteristics of included patients are listed in **Table 1**. **Table 2** summarizes the results obtained for the 196 collected respiratory specimens using semi-quantitative culture, qPCR and RDT. All the 70 strains of *S. pneumoniae* that were recovered from culture were susceptible to optochin and positive with the bile salt lysis test.

Performances of the RDT by comparison to culture, PCR assays and clinical data

The performances of the PneumoResp RDT were evaluated on the 196 respiratory specimens corresponding to the patients listed in **Table 1**. The RDT was first tested on undiluted fluidized samples; in case of positive result, the test was repeated after a 1:100 dilution. **Table 3** shows the performances of the RDT by comparison to the semi-quantitative culture and to the two PCR assays with high bacterial load (Ct corresponding to10^7 CFU/ml or more); it was also tested with regard to the criteria of *S. pneumoniae* pneumonia that were listed above.

The sensitivity and negative predictive value (NPV) of the RDT on undiluted specimens were shown to be both of 100% by comparison to all the tested conditions depicted in **Table 3**, except for the *ply* PCR assay, which were both of 98.4. This means that no sample exhibiting a high bacterial load was missed by the RDT and that a negative RDT result was highly

predictive of a weak or negative pneumococcal load. Another illustration of the correlation between bacterial loads evaluated by the two PCR assays and the results of RDT is shown on **Figure 2.**

With regard to the criteria of *S. pneumoniae* pneumonia, the results of **Table 3** show that, if the RDT was negative on an undiluted specimen, pneumococcal pneumonia could be ruled out at day 0; in addition, all the 23 presumed pneumococcal pneumonia were tested positive by using the RDT on diluted specimen at day 0 (**Figure 3**).

DISCUSSION

The newly-designed PneumoResp RDT presented in this study was shown able to detect rapidly *S. pneumoniae* antigens with excellent clinical sensitivity and specificity in non-invasive respiratory specimens from children suspected of respiratory infection. Moreover, the test was used to give an early measure of the *S. pneumoniae* load in these samples in order to anticipate the treatment of the most serious infections while sparing anti-pneumococcal therapy in case of negative result.

Although the rapid detection of *S. pneumoniae* antigens is currently performed in many body fluids, including urine, cerebrospinal fluid and pleural fluid [3,7,11,12], the specimens from the respiratory tract have been excluded from this clinical practice. A few years ago, a sputum antigen kit was developed in Japan and tested in adult patients for the rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia with an excellent sensitivity, exceeding largely that of the urinary tests [18-20]. However, this diagnosis strategy has remained confidential and was never tested in children known to exhibit a high level of pneumococcal asymptomatic carriage [3,7,21].

The main strengths of this study can be summarized as follows. First, the present RDT is highly specific for *S. pneumoniae*, notably with regard of the other members of the mitis group. The only cross-reactive results in this group were obtained with ***S. pseudopneumoniae***, a species considered to be a respiratory pathogen and having a similar susceptibility profile to antibiotics than *S. pneumoniae* [13,22-24]. Cross-reaction was also observed with *Parvimonas micra*, which was recently reported for another RDT directed against *S. pneumoniae* [25]; this agent is an anaerobic gram-positive bacterium of the oral microbiota that could be responsible for opportunistic infections of the respiratory area. Second, the sensitivity and NPV of the PneumoResp RDT were excellent with regard to semi-quantitative culture and PCR assays targeting virulence pneumococcal genes, which allowed ruling out all the negative results for *S. pneumoniae* at day 0 without risk of missing highly positive samples. Finally, the RDT used on 1:100 diluted samples was able to identify at day 0 all the presumptive cases of pneumococcal pneumonia identified in this study.

This exploratory work has some limitations. First, *S. pneumoniae* is the only microorganism that has been analysed. Although this germ is frequently involved in bacterial pneumonia, other respiratory bacteria such as *Haemophilus influenzae* or *Moraxella catarrhalis*, but also “atypical bacteria” (especially *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*) and viruses need to be taken into consideration, notably in children [3,26-30]. Although not reported in this study, these agents were sought for in all the cases of ascertained pneumonia. Second, it is a retrospective study that was merely dedicated to explore the performances of the test; consequently, the diagnosis strategy that emerged with this two-step RDT would need to be validated prospectively. Third, we assessed that a high pneumococcal load in upper respiratory secretions ($\geq 10^7$ CFU/ml or equivalent by PCR) was predictive of an invasive pneumococcal infection; even if this threshold has been

recommended in upper respiratory secretions by European guidelines [4,5], other guidelines discouraged their use [3]. However, the good correlation between quantitative results obtained by culture and PCR (see **Figure 1**) indicates that these measures may have a clinical pertinence.

The PneumoResp kit, by allowing a two-step analysis, first on undiluted secretions and, if positive, on 1:100-diluted secretions, can be used as a semi-quantification tool. In the conditions of the second step, the sensitivity of the RDT was close to the threshold of 10^7 CFU/ml considered significant for recognizing the involvement of this bacterium in the aetiology of a pulmonary parenchymal infection [4,5]. In accordance with the overall results of the study, an algorithm depicted in **Figure 4** summarizes the benefit of the PneumoResp RDT for managing active pneumococcal infections in children. When the RDT is negative on undiluted secretion, the probability of active pneumococcal infection is very low and other aetiology must be looked for. When the RDT is positive on diluted secretion, this probability is high and an anti-pneumococcal treatment must be discussed. In intermediate situations (positive RDT on undiluted secretion and negative on diluted one), the semi-quantitative culture remains essential for deciding between carriage and active infection, as well as the implementation of other tests such as molecular multiplex approaches seeking at the same time the respiratory viruses (the first cause of pneumonia in children) and intracellular atypical bacteria which are difficult to grow and need a different antimicrobial treatment [26-, 30].

CONCLUSIONS

This pilot study is indicative of the value of the new PneumoResp RDT in children for the early management of active respiratory pneumococcal infection whose incidence is declining with vaccination but whose clinical severity remains high [3,26,27]. The strategy described above would help to save useless anti-pneumococcal treatment while identifying rapidly highly active infections. A prospective study on a large cohort of children would be useful to ascertain the present algorithm. Other future research would consists in developing a point-of-care format of this test that would be usable at bedside of emergency units, and in validating this strategy in adult patients whose prevalence of pneumococcal carriage is much more lower than in children.

METHODS

Population, study design and ethical considerations

The population consisted of 196 children consulting for symptoms compatible with acute respiratory infection at the University Hospital of Saint-Etienne, France, between October 2017 and July 2018. The study was performed on 196 respiratory samples (sputum or nasopharyngeal secretions) sent to the Microbiology Department of this hospital. Since it was a pilot study for method validation without impact on the management of patients, no patient consent was needed according to the French regulation on non-interventional studies (Code de la santé publique - Article L1121-1). Clinical data were analysed retrospectively and anonymously from the files (Emergency Resume Summary and Hospital Report) consulted by the paediatricians who managed the children. The present study obtained a favourable advice from the Ethic Committee of the University-Hospital of Saint-Etienne (ref. IRBN872019/CHUSTE). The diagnosis of pneumonia was defined on the coexistence of

215 evocative clinical criteria and an abnormal parenchymal image on chest X-ray [3]; *S.*
216 *pneumoniae* was estimated responsible for pneumonia if the bacterial load was greater than
217 or equal to 107 CFU/ml for *S. pneumoniae* by semi-quantitative culture of respiratory
218 specimens (sputum or nasopharyngeal secretions), irrespectively of the presence of other
219 pathogen(s) [4,5].
220
221 **Microbiological methods**
222 The samples were treated with an equivalent volume of a sterile solution of
223 dithiothreitol (Digest-EUR®, Eurobio) for the realization of semi-quantitative culture. The
224 undiluted pretreated sample and a 1:100 dilution were plated on blood agar (COS,
225 BioMérieux) including an optochin disc (OPTO-F, BioMérieux), Columbia CNA agar (BBL™
226 Columbia agar, Beckton-Dickinson) and were incubated at 37°C under 5% CO_2 atmosphere
227 [13]. The identification of presumptive colonies was based on phenotypic characters (i.e. flat
228 surface, alpha-haemolysis and optochin susceptibility), then confirmed by Matrix Assisted
229 Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) (Microflex LT, Bruker Daltonics). A
230 lysis test using bile salts (BBL Desoxycholate Reagent Droppers, Beckton-Dickinson) was also
231 used for validating the correct identification of each isolated strain.
232
233 **RDT procedure**
234 The newly-designed PneumoResp kit (BioSpeedia) was used. First, 250 µl of sample
235 specimen fluidized by an equal volume of Digest-EUR® was added to tube 1 of the kit and
236 vortex-agitated. One drop of this solution was deposited on the RDT plate, and 3 drops of
237 diluent were immediately added. If no band appeared in the test line and the control band
238 was present within 15 minutes, the RDT was considered negative and the analysis was

stopped. If no band appeared in both marks within 15 minutes, the RDT was considered invalid. If two bands appeared, the test was considered positive; 10 µl of the sample present in tube 1 and 990 µl of the solution of tube 3 were transferred to tube 2 and vortex-agitated; then, a second RDT was performed on this 1:100 dilution using the same protocol and the same interpretations for the reading. The specificity of the RDT was also tested on 52 bacterial strains (inoculum adjusted to 0.5 McFarland) including 30 streptococci belonging to the mitis group.

Real-time PCR assays

Two hundred microliters of samples were pretreated with 20 µl of proteinase K (Eurobio) and incubated for 10 min at 50°C. The samples were then extracted using the EasyMag machine (BioMérieux). Two PCR techniques were used to detect *S. pneumoniae* DNA, one targeting the *ply* gene and the other the *lytA* gene. The primers and probes (Eurogentec) were those used in previous works with minor changes [14-17] (**Table 4**).

For amplification of the *ply* gene, the PCR assay was performed under a volume of 20 µl containing 12.5 µl mastermix (1X QuantiTect multiplex PCR kit, Qiagen), 16 pmol each of forward and reverse primers, 6 pmol of probe and 5 µl of DNA template. Thermal cycling reactions consisted of an initial denaturation (10 min at 95°C) followed by 45 cycles of denaturation (15 sec at 95°C) and annealing/extension (60 sec at 60°C) on the Smartcycler instrument (Cepheid).

For amplification of *lytA* gene, the PCR assay was performed under a volume of 20 µl containing 12.5 µl of mastermix (2X FAST qPCR Mastermix, Eurogentec), 20 pmol each of forward and reverse primers, 6 pmol of probe and 5 µl of DNA template. Thermal cycling reactions consisted of an initial denaturation (10 min at 95°C) followed by 45 cycles of

denaturation (15 sec at 95°C) and annealing/extension (40 sec at 59°C) on the ABI7500 Fast instrument (Applied Biosystems).

Correlation between bacterial loads obtained by PCR assays and quantitative culture

Using 10-fold serial dilutions of an ATCC reference strain of *S. pneumoniae* (strain 49619), a correlation was established between the cycle threshold (Ct) of both PCR assays (which is inversely proportional to the DNA bacterial load) and quantitative culture expressed in CFU/ml using a colony counter (Scan 1200, Interscience).

Statistical analysis

Descriptive variables, sensitivity, specificity and predictive values were reported with their 95% confidence interval (CI) using GraphPad Prism 5 software.

ABBREVIATIONS

ATCC: American Type Culture Collection

CFU: Colony Forming Unit

Ct: Cycle threshold

NPV: Negative Predictive Value

PPV: Positive Predictive Value

qPCR: quantitative PCR

RDT: Rapid Diagnostic Test

DECLARATIONS

Ethics approval and consent to participate

Since it was a pilot study for method validation without impact on the management of patients, no patient consent was needed according to the French regulation on non-interventional studies (Code de la santé publique - Article L1121-1). Clinical data were analysed retrospectively and anonymously from the files (Emergency Resume Summary and Hospital Report) consulted by the paediatricians who managed the children. The present study obtained a favourable advice from the Ethic Committee of the University-Hospital of Saint-Etienne (ref. IRBN872019/CHUSTE).

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

CHH is a PhD student of the University of Saint-Etienne whose thesis was cofounded by the CIFRE French Ministry of Higher Education and Research (CIFRE fellowship No 1283/2014) and BioSpeedia. EB and YG are working at BioSpeedia. The other authors have no conflict of interest to declare in relation with the matter of this study.

Funding

The PneumoResp kits were a gift of the company BioSpeedia. The funders had no role on the design of the study but the conceivers of the test were associated to the retrospective analysis of the results.

Authors' contributions

CHH performed most of the microbiological experiments of the study, was associated to the design of the study, elaborated the illustrations and contributed to the analysis of data. JJ collected the clinical data and contributed to their analysis. AnneC, POV and FG supervised the microbiological part of the study, including cultures and molecular tests. AnneC participated to the design of the study and to the analysis of the results. OM and AymericC supervised the clinical part of the study and authorised the access to the patients' files. AymericC participated to the analysis of the clinical results. EB and YG conceived and developed the RDT; they were also involved in the analysis of results. BP conceived the design of the study, contributed to the analysis of results and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read, amended and approved the manuscript.

Acknowledgements

The investigators thank the technical staff of the Laboratory of Infectious Agents and Hygiene of the University Hospital of Saint-Etienne involved in the sampling collection and culture. Alexis Labbe, Elsa Modrzewski and Marua Sellamna are acknowledged for skilful technical assistance.

334 **REFERENCES**

335

336 1. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in
337 children. *Lancet.* 2005;365:1147–52.
338 2. Global Burden of Disease Child and Adolescent Health Collaboration, Kassebaum N, Kyu
339 HH et al. Child and adolescent health from 1990 to 2015: findings from the global burden
340 of diseases, injuries, and risk factors 2015 Study. *JAMA Pediatr*. 2017;1716:573–92. doi:
341 10.1001/jamapediatrics.2017.0250.
342 3. Harris M, Clark J, Coote N, et al. British Thoracic Society guidelines for the management
343 of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax.* 2011;66(S2):1–23.
344 4. Freymuth F, Leven M, Wallet F. Lower respiratory tract infections. In: Cornaglia G, Courcol
345 R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Vila J, SFM, ESCMID editors. European
346 manual of clinical microbiology. 1st ed. France: Epernay. 2012. p.153–61.
347 5. Botterel F, Cattoen C, Pozzetto B. Infections broncho-pulmonaires. REMIC Société
348 Française de Microbiologie Ed. 2018. p. 199–212.
349 6. Mundy LS, Janoff E, Schwebke KE, Shanholtzer C, Willard KE. Ambiguity in the
350 identification of *Streptococcus pneumoniae*. Optochin, bile solubility, quellung, and the
351 AccuProbe DNA probe tests. *Am J Clin Pathol.* 1998;109:55–61.
352 7. Murdoch DR, O'Brien KL, Driscoll AJ et al. Laboratory methods for determining
353 pneumonia etiology in children. *Clin Infect Dis.* 2012;54:146–52.
354 8. Marín M, Cercenado E, Sánchez-Carrillo C et al. Accurate differentiation of *Streptococcus*
355 *pneumoniae* from other species within the *Streptococcus mitis* group by peak analysis
356 using MALDI-TOF MS. *Front Microbiol.* 2017;doi: 10.3389/fmicb.2017.00698.

9. Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from non pneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2863–7.
10. Srinivasan A. Antibiotic stewardship: why we must, how we can. *Cleve Clin J Med.* 2017;84:673-9.
11. Hamer DH, Egas J, Estrella B, MacLeod WB, Griffiths JK, Sempértegui F. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1025–8.
12. Viasus D, Calatayud L, McBrown MV, Ardanuy C, Carratalà J. Urinary antigen testing in community-acquired pneumonia in adults: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019;17:107–15.
13. Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P et al. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4686–96.
14. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1553–8.
15. Gracie K, Correa E, Mabbott S et al. Simultaneous detection and quantification of three bacterial meningitis pathogens by SERS. *Chem Sci.* 2014;5:1030–40.
16. McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM et al. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3446–51.

17. Boving MK, Pedersen LN, Moller JK. Eight-plex PCR and liquid-array detection of bacterial and viral pathogens in cerebrospinal fluid from patients with suspected meningitis. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47:908–13.
18. Ehara N, Fukushima K, Kakeya H et al. A novel method for rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum and its application in adult respiratory tract infections. *J Med Microbiol.* 2008;57:820-6.
19. Izumikawa K, Akamatsu S, Kageyama A et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum samples from patients with lower respiratory tract infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16:672-8.
20. Ikegame S, Nakano T, Otsuka J et al. The evaluation of the sputum antigen kit in the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Intern Med.* 2017;56:1141-6.
21. Abdullahi O, Nyiro J, Lewa P, Slack M, Scott JAG. The descriptive epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* nasopharyngeal carriage in children and adults in Kilifi District, Kenya. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:59–64.
22. Laurens C, Michon AL, Marchandin H, Bayette J, Didelot MN, Jean-Pierre H. Clinical and antimicrobial susceptibility data of 140 *Streptococcus pseudopneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:4504–7.
23. Mohammadi JS, Dhanashree B. *Streptococcus pseudopneumoniae*: an emerging respiratory tract pathogen. *Indian J Med Res.* 2012;136:877–80.
24. Wen SCH, Anderson T, Murdoch D. *Streptococcus pseudopneumoniae*. *Clin Microbiol Newsletter.* 2014;36:65–71.

403 25. Ploton MC, Caseris M, Jost C et al. Likely false-positive pneumococcal antigen yest
404 BinaxNOW due to *Parvimonas micra*: a four-case series. *Chest.* 2018; doi:
405 10.1016/j.chest.2017.12.026.
406 26. Bénet T, Sánchez Picot V, Messaoudi M et al. Microorganisms associated with pneumonia
407 in children <5 years of age in developing and emerging countries: the GABRIEL pneumonia
408 multicenter, prospective, case-control study. *Clin Infect Dis.* 2017;65:604–12.
409 27. Leung AKC, Wong AHC, Hon KL. Community-acquired pneumonia in children. *Recent Pat*
410 *Inflamm Allergy Drug Discov*. 2018;12:136–44.
411 28. Cilla G, O Nate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in
412 community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: high rate of viral
413 coinfection. *J Med Virol.* 2008;80:1843–9.
414 29. Esposito S, Daleno C, Prunotto G et al. Impact of viral infections in children with
415 community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza*
416 *Other Respir Viruses.* 2013;7:18–26.
417 30. Cantais A, Mory O, Pillet S et al. Epidemiology and microbiological investigations of
418 community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a
419 university hospital. *J Clin Virol.* 2014;60:402–7.
420

421 **TABLES**

422

423 **Table 1.** Demographic and clinical characteristics of the studied cohort.

Characteristics	Numeric data
Demographic characteristics	
- No. of subjects	196
- mean age in years (range)	1.99 (0-15)
- median age in years	0.83
- interquartile in years	0.18-2.88
- sex ratio M/F	1.23
Main symptom for consulting (%)	
- dyspnea	92 (46.9)
- cough	39 (19.9)
- hyperthermia	77 (39.3)
- other*	36 (18.4)
Antibiotic treatment before inclusion (%)	23 (11.7)
Chest radiography (%)	124 (63.3)
- pulmonary condensation	32 (16.3)
- interstitial syndrome	54 (27.5)
Hospital unit at inclusion (%)	
- emergency unit	187 (95.4)
- intensive care unit	9 (4.6)
Hospitalized patients (%)	154 (78.6)
Average length of hospital stay in days	7.8
Biological inflammatory syndrome (%)	63 (31.2)
Pneumonia (%)	113 (57.6)
S. pneumoniae pneumonia (%)	23 (11.7)

424

425 * mainly abdominal pain and diarrhea

426

427 **Table 2**. Microbiological results concerning the search for *S. pneumoniae* on the 196 samples
428 of the study.

Microbiological tests	Number of positive (%)
Semi-quantitative culture	70 (35.7)
- $< 10^7$ CFU/ml	20 (10.2)
- $\geq 10^7$ CFU/ml	50 (25.5)
Positive PCR tests (*ply* and/or *lytA)*	169 (86.2)
- *ply* gene	167 (85.2)
· Ct < 22*	63 (32.1)
· Ct ≥ 22	104 (53.1)
- *lytA* gene	123 (62.7)
· Ct < 23*	32 (16.3)
· Ct ≥ 23	91 (46.4)
Positive PneumoResp RDT	
- undiluted sample	133 (67.8)
- 1:100 diluted sample	76 (38.7)

429 Ct: cycle threshold.

430 * These thresholds were shown to correspond to approximately
431 10^7 CFU/ml by qPCR for the considered PCR assay (see **Figure 1**).

432

433 **Table 3.** RDT performances compared to various parameters on 196 and 133 undiluted and
434 1:100-diluted specimens, respectively.

435

RDT results	*S. pneumoniae* positive culture					
	Positive	Negative	Sensitivity % (IC 95%)	Specificity % (IC 95%)	PPV % (IC 95%)	NPV % (IC 95%)
RDT undiluted			100 (94.8-100)	50.4 (41.4-58.6)	52.6 (48.3-56.9)	100 (94.3-100)
Positive	70	63				
Negative	0	63				
RDT diluted			91.4 (82.5-96)	80.9 (69.6-88.7)	84.2 (76.1-89.9)	89.5 (79.8-94.9)
Positive	64	12				
Negative	6	51				
	S. pneumoniae culture ≥10^7 CFU/ml					
	Positive	Negative	Sensitivity % (IC 95%)	Specificity % (IC 95%)	PPV % (IC 95%)	NPV % (IC 95%)
RDT undiluted			100 (92.9-100)	43.1 (35.4-51.2)	37.6 (34.3-41)	100 (94.3-100)
Positive	50	83				
Negative	0	63				
RDT diluted			94.6 (92.9-100)	68.7 (58.1-77.4)	65.8 (58.3-72.6)	100 (93.7-100)
Positive	50	26				
Negative	0	57				
	Quantitative PCR for *ply* gene Ct < 22					
	Positive	Negative	Sensitivity % (IC 95%)	Specificity % (IC 95%)	PPV % (IC 95%)	NPV % (IC 95%)
RDT undiluted			98.4 (91.5-99.7)	46.6 (38.3-55.1)	46.6 (42.7-50.7)	98.4 (89.8-99.8)
Positive	62	71				
Negative	1	62				
RDT diluted			91.9 (82.5-96.5)	73.2 (61.9-82.1)	75 (67-81.6)	91.2 (82-96)
Positive	57	19				
Negative	5	52				
	Quantitative PCR for *lytA* gene Ct < 23					
	Positive	Negative	Sensitivity % (IC 95%)	Specificity % (IC 95%)	PPV % (IC 95%)	NPV % (IC 95%)
RDT undiluted			100 (87.5-100)	37.3 (30.3-44.8)	20.3 (18.5-22.3)	100 (94.3-100)
Positive	27	106				
Negative	0	63				
RDT diluted			96.3 (81.7-99.3)	52.8 (43.4-62.1)	34.2 (29.6-39.2)	98.3 (89-99.7)
Positive	26	50				
Negative	1	56				
	S. pneumoniae pneumonia					
	Positive	Negative	Sensitivity % (IC 95%)	Specificity % (IC 95%)	PPV % (IC 95%)	NPV % (IC 95%)
RDT undiluted			100 (85.7-100)	36.4 (29.6-43.8)	17.3 (15.7-19)	100 (94.3-100)
Positive	23	110				
Negative	0	63				
RDT diluted			100 (85.7-100)	51.8 (42.6-60.9)	30.3 (26.3-34.5)	100 (93.7-100)
Positive	23	53				
Negative	0	57				

436 PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

437

438 **Table 4**. Sequences of primers and probes used in this study for detection of *S. pneumoniae*

439 *ply* and *lytA* genes.

440

Primer name	Type	Sequences (5' to 3')	Length (bp)	Tm (°C) (GC%)	Reference
ply					
SPply F	Forward	TGCAGAGCGTCCTTTGGTCTAT	22	66 (48)	[14]
SPply R	Reverse	CTCTTACTCGTGGTTTCCAACTTGA	25	72 (44)	[14]
SPply TP	Probe	TTCGAGTGTTGCTTATGGGCGCCA	24	74 (54)	[15]
lytA					
LytA F	Forward	CGCAATCTAGCAGATGAAGCAG	22	50 (50)	Adapted from [16]
LytA R	Reverse	AAGGGTCAACGTGGTCTGAGT	21	52 (55)	Adapted from [17]
LytA Pr	Probe	TTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGG	25	53 (48)	[16]

441

442 **FIGURES' LEGENDS**

443

444 **Figure 1**. **Correlation between qPCR assays and quantitative cultures.** The number of cycle
445 threshold (Ct) of two quantitative PCR assays targeting virulence genes of *S. pneumoniae* was
446 correlated to the number of CFU/ml of *S. pneumoniae* by conventional culture.

447

448 **Figure 2. Correlation between qPCR assays and RDT**. The approached quantification using
449 ply (a) or lytA (b) quantitative PCR assays, as evaluated by cycle threshold (Ct), was correlated
450 to the results obtained with the PneumoResp Rapid Diagnostic Test (RDT) on undiluted and
451 diluted respiratory specimens found either negative or positive. The green bar corresponds
452 to the median and the blue bars to the 95% confidence interval. CFU: colony forming unit.

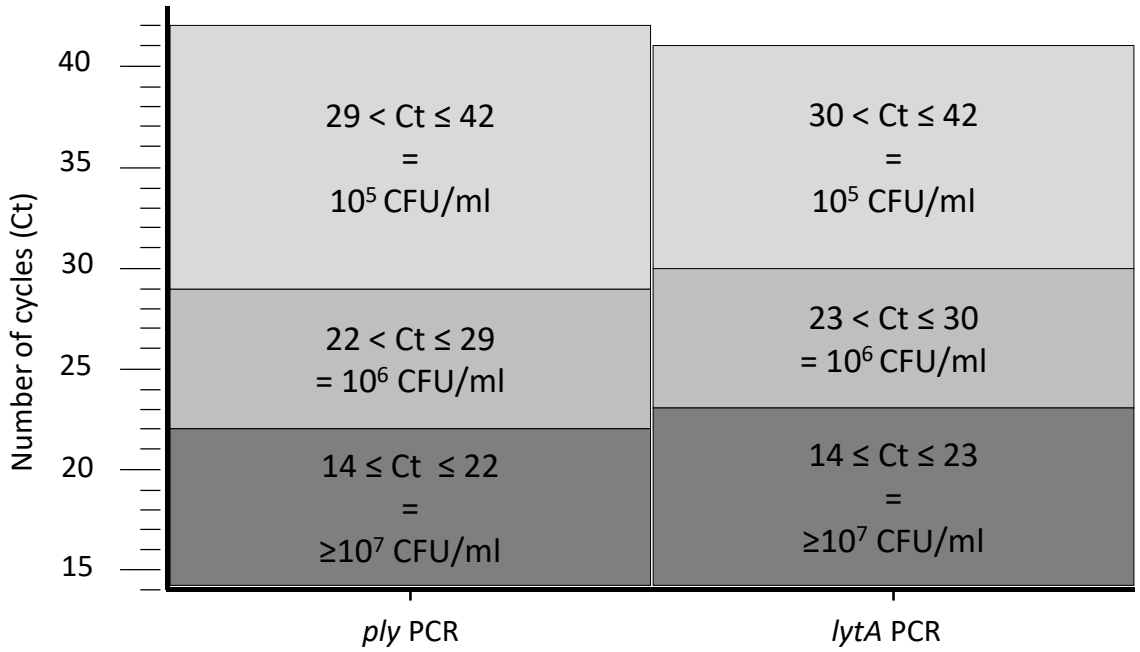
453

454 **Figure 3. Use of RDT for assisting the prediction of pneumococcal pneumonia at day 0 in**
455 **children.** RDT: rapid diagnostic test.

456

457 **Figure 4. Algorithm based on RDT for assisting the diagnosis of pneumococcal infection at**
458 **day 0.** This algorithm is proposed for children consulting at hospital for respiratory infection.
459 RDT: rapid diagnostic test.

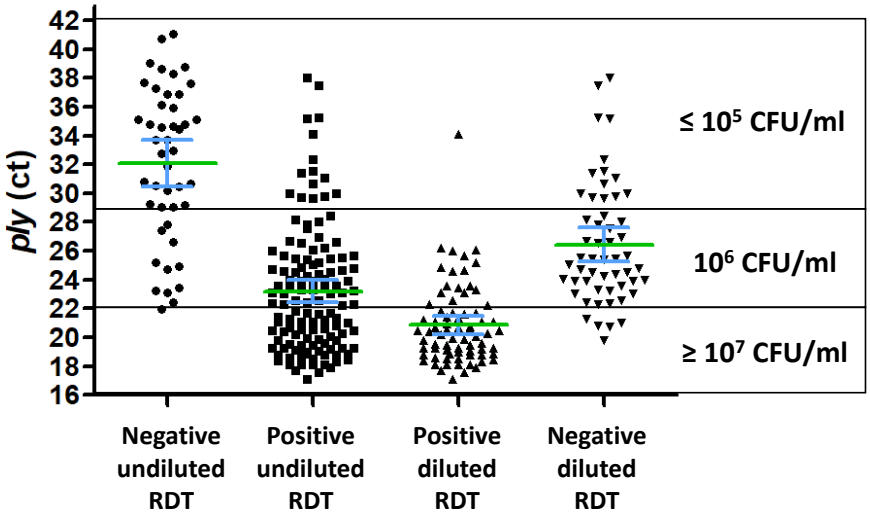
460 **Figure 1**. **Correlation between qPCR assays and quantitative cultures.** The number of cycle
461 threshold (Ct) of two quantitative PCR assays targeting virulence genes of *S. pneumoniae* was
462 correlated to the number of CFU/ml of *S. pneumoniae* by conventional culture.



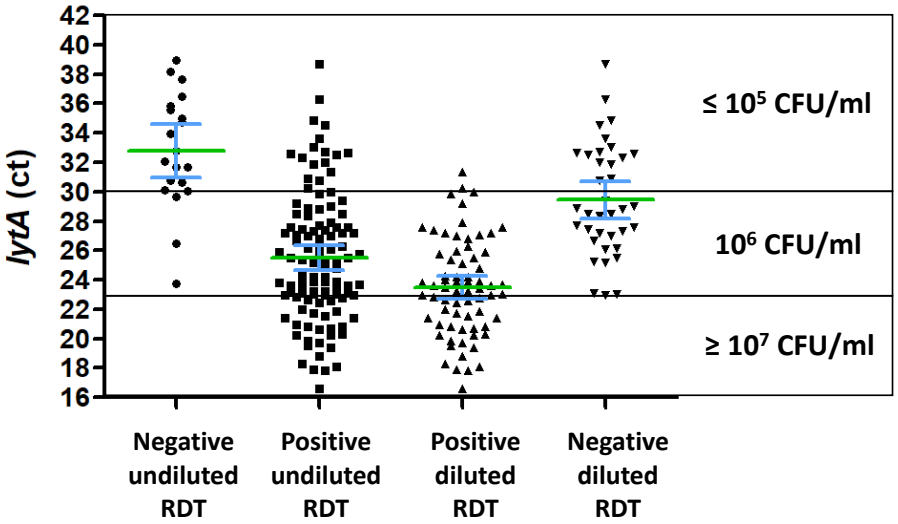
463

Figure 2. Correlation between qPCR assays and RDT. The approached quantification using ply (a) or lytA (b) quantitative PCR assays, as evaluated by cycle threshold (Ct), was correlated to the results obtained with the PneumoResp Rapid Diagnostic Test (RDT) on undiluted and diluted respiratory specimens found either negative or positive. The green bar corresponds to the median and the blue bars to the 95% confidence interval. CFU: colony forming unit.

a

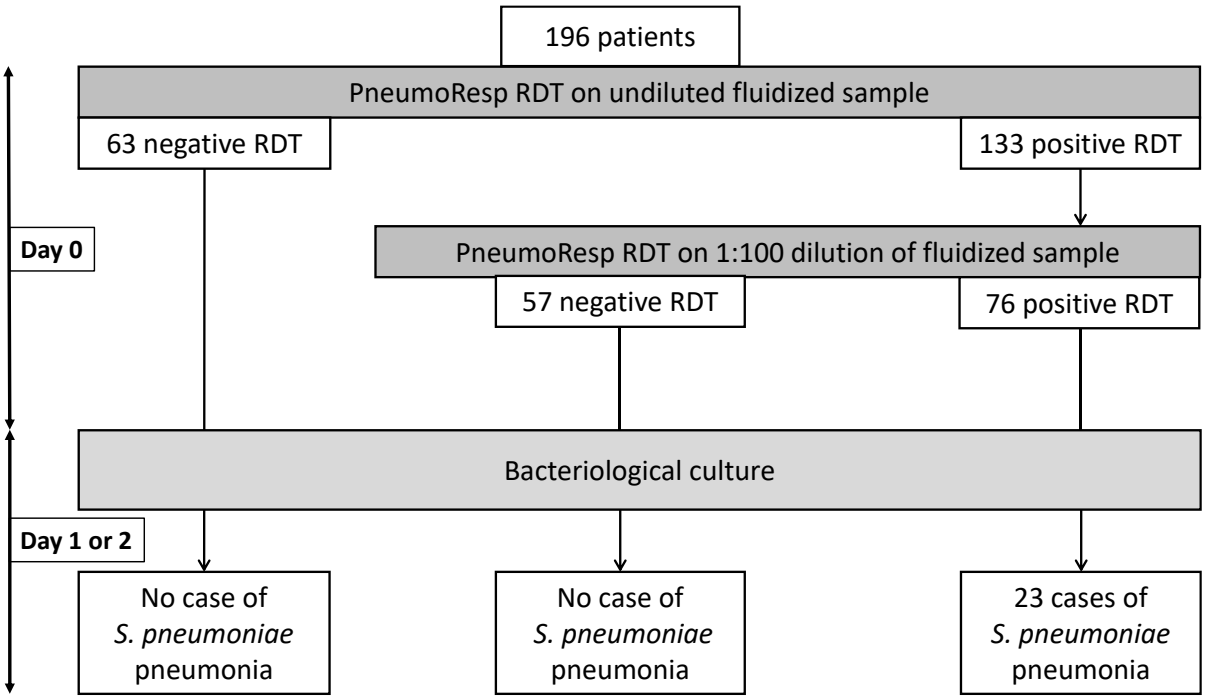


b



473 **Figure 3. Use of RDT for assisting the prediction of pneumococcal pneumonia at day 0 in**

474 **children.** RDT: rapid diagnostic test.

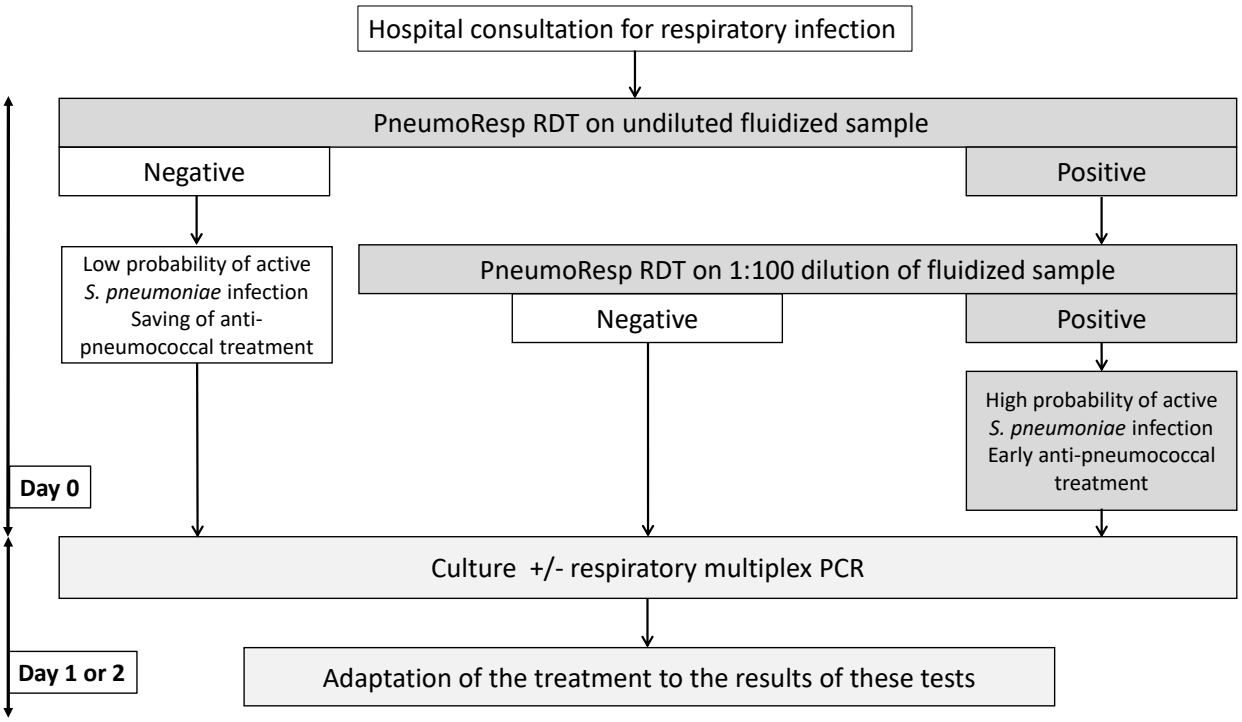


475

476 **Figure 4**. **Algorithm based on RDT for assisting the diagnosis of pneumococcal infection at**

477 **day 0.** This algorithm is proposed for children consulting at hospital for respiratory infection.

478 RDT: rapid diagnostic test.



479

480

DISCUSSION

TDR MeningoSpeed

Le test MeningoSpeed évalué dans cette étude répond à la plupart des critères ASSURED requis par l'OMS pour les TDR de diagnostic en zones à ressources limitées. Il est facile à stocker (température ambiante avec une stabilité de deux ans entre +4 °C et 30°C), facile à utiliser partout et par tous (en laboratoire, au niveau des dispensaires, au chevet du malade), facile à lire (pas d'équipement nécessaire), accessible en termes de coût (coût unitaire de l'ordre de 20 à 40€) et de volume réactionnel (moins de 90 µl de LCS pour les 3 cassettes), rapide (résultat disponible dans un délai de 15 minutes) et doté de bonnes performances (sensibilité de 92,7%, spécificité de 93,8%, VPP de 95,6% et VPN de 89,8%) par rapport à la méthode de référence basée sur la technologie PCR.

Au niveau de la détection des sérogroupes, les performances analytiques du test MeningoSpeed concordent bien avec celles des autres tests antigéniques rapides. Même si la comparaison des résultats entre études est difficile en raison de la taille variable des effectifs et de la détection partielle des sérogroupes (un seul recherché dans la plupart des études), il convient de noter que les performances du test MeningoSpeed sont au moins équivalentes et souvent supérieures à celles des TDR concurrents. Pour le sérogroupe C néanmoins, les performances sont moins bonnes que pour les autres sérogroupes. Dans une étude menée au Nigeria (Uadiale et al. 2016), une sensibilité modérée avait déjà été notée pour ce sérogroupe.

Notre étude comporte certaines limites. Premièrement, la conception rétrospective de l'étude n'est pas compatible avec une évaluation correcte de la faisabilité du TDR sur le terrain. Cependant, la technologie du MeningoSpeed est très proche de celle déjà évaluée par d'autres études ; l'étude de Collard et al. (2014) effectuées au Niger sur un large panel d'échantillons illustre la bonne concordance entre les résultats obtenus avec une bandelette testée sur le terrain et ceux délivrés par un laboratoire de référence. Deuxièmement, malgré leur très faible proportion (0,9%), il a été trouvé quelques résultats non interprétables qui ont tous été confirmés positifs pour *N. meningitidis* par PCR. Les échantillons présentant un résultat ininterprétable en TDR doivent donc être retestés impérativement par une autre technique. Troisièmement, l'absence de sérogroupe B dans le MeningoSpeed a conduit à rater 10 échantillons trouvés positifs pour ce sérogroupe en PCR. Bien que peu présent en

Afrique, ce sérogroupe est important dans les pays développés (Stephens 2007) et une future version de MeningoSpeed est envisagée qui intégrera cette valence. Enfin, la lecture visuelle du résultat introduit une forme de subjectivité dans l'interprétation du test, notamment quand du personnel non formé le réalise. Il serait donc intéressant de proposer une lecture automatisée pour une future version du test, ce qui permettrait aussi d'améliorer sa traçabilité et ses performances.

D'autres validations de MeningoSpeed sont en cours. En décembre 2017, l'OMS, en partenariat avec les ministères de la santé nigérian et burkinabé, a mis en place une étude prospective pour évaluer les performances de MeningoSpeed (et PneumoSpeed dans une moindre mesure) au lit du patient pour le diagnostic des méningites à méningocoque et l'identification des sérogroupes circulants. Le design de l'étude comporte deux TDR sur chaque échantillon, l'un au dispensaire et l'autre au laboratoire centralisé du pays. Le laboratoire vérifie aussi le résultat par PCR. Les premiers résultats sont très encourageants (données internes BioSpeedia) ; le test est réalisable en dispensaire sans grande difficulté et les résultats sont fiables. En laboratoire, la valeur prédictive positive s'est montrée excellente. En décembre 2018, 120 patients étaient inclus sur un total prévu d'environ 400. Les résultats finaux sont attendus pour la fin de l'année 2019.

Au chapitre des projets, des recherches sont entreprises pour évaluer la détection de *N. meningitidis* dans les urines. Cela éviterait la ponction lombaire qui reste un geste technique parfois difficile et potentiellement dangereux et douloureux pour le malade. Certains restent cependant à vérifier : cinétique d'excrétion des antigènes dans les urines au cours des méningites, rôle potentiel de la déshydratation, nécessité de revoir le format du test avec notamment un tampon échantillon susceptible de neutraliser l'acidité urinaire.

TDR PneumoSpeed

Le TDR PneumoSpeed a été évalué sur la matrice LCS. Il est particulièrement difficile de trouver des LCR cliniques de méningites à pneumocoques car ces pathologies sont de moins en moins fréquentes, notamment en raison du taux de vaccination en constante hausse.

PneumoSpeed a montré des résultats excellents par rapport aux tests classiques que sont l'examen direct, la culture bactérienne, les TDR concurrents ou les tests PCR. Les deux petites études menées au CHU de Saint-Etienne et à l'Institut Pasteur de Paris ont confirmé les très bonnes performances du PneumoSpeed. Compte tenu de la faible taille des échantillons, ces bons résultats méritent néanmoins d'être complétés par une étude clinique de plus grande envergure. L'étude déjà mentionnée qui a été initiée par l'OMS au Burkina Faso et au Niger permettra de remplir cet objectif.

Au chapitre des améliorations à apporter, PneumoSpeed se lit d'une manière visuelle. La mise à disposition d'un lecteur pour interpréter le résultat permettrait d'améliorer le processus, surtout dans le cadre d'un POC où les acteurs de santé n'ont pas toujours de formation biologique, tout en permettant une meilleure traçabilité et peut-être de plus grandes performances.

TDR PneumoResp

Nous avons créé une trousse permettant une approche semi-quantitative de la détection du pneumocoque dans les sécrétions respiratoires. Il y a quelques années, une trousse antigénique (ODK0501) dédiée aux expectorations a été mis au point au Japon et testée chez des patients adultes pour le diagnostic rapide de pneumonie à pneumocoque. Les résultats avaient montré une excellente sensibilité, largement supérieure à celle des tests urinaires (Ehara et al. 2008, Izumikawa et al. 2009, Fujushima et al. 2015, 2016, Ikegame et al. 2017). Cependant, cette stratégie de diagnostic est restée confidentielle et n'a jamais été testée chez des enfants présentant un taux élevé de portage asymptomatique à pneumocoque. En effet, tout le défi de cette stratégie a été de trouver une méthode permettant de différencier le portage asymptomatique de *S. pneumoniae* d'une potentielle infection par cette bactérie. Une part importante des enfants est en effet porteuse de la bactérie de façon commensale ; à titre d'exemple, Abdullahi et al. (2012) ont montré que plus de 60 % des enfants kényans étaient porteurs au niveau de l'oropharynx.

La trousse propose une analyse en deux étapes, d'abord sur les sécrétions non diluées et, si le test est positif, sur les sécrétions diluées au centième. Cette trousse peut être utilisée

comme un outil de semi-quantification. Dans les conditions de la seconde étape (après dilution au 1:100), la sensibilité du TDR était proche du seuil de 10^7 UFC/ml considéré comme significatif pour reconnaître l'implication de cette bactérie dans l'étiologie d'une infection parenchymateuse pulmonaire (Freymuth et al. 2012, Baggett et al. 2017, Botterel et al. 2018).

La culture bactériologique de *S. pneumoniae* est actuellement la méthode de référence pour la détection de cette bactérie dans les prélèvements respiratoires. Cependant, cette méthode est longue car elle requiert au moins 24h et n'est parfois pas adaptée. En effet, le pneumocoque peut s'avérer difficile à isoler et à identifier ; sa quantification en culture peut manquer de reproductibilité et varier en fonction des modalités de traitement (par exemple en cas d'antibiothérapie prise par le patient) et de dilution de l'échantillon. Le TDR permet en partie de lever ce manque de sensibilité de la culture.

De plus, PneumoResp s'est montré assez spécifique vis-à-vis de *S. pneumoniae*. Des réactions croisées ont été obtenues avec *S. pseudopneumoniae* mais cette bactérie peut être considérée comme un véritable pathogène respiratoire (Sariya et al. 2012) et le traitement antibiotique est identique à celui proposé pour *S. pneumoniae*. Concernant la réactivité croisée avec *Parvimonas micra*, cette particularité a déjà été signalée avec le test Binax-NOW dirigé contre le pneumocoque (Ploton et al. 2018) ; cette bactérie est un coccus anaérobie à gram positif du microbiote oral qui peut être responsable d'infections opportunistes de la sphère respiratoire. Les autres bactéries, proches génétiquement ou régulièrement observées dans cette matrice, n'ont pas croisé avec le test, notamment les streptocoques du groupe mitis.

Cette étude comporte certaines limites. Premièrement, *S. pneumoniae* est le seul microorganisme qui a été analysé. Bien que ce germe soit fréquemment impliqué dans les pneumonies bactériennes, d'autres bactéries respiratoires conventionnelles (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*) ou « atypiques » (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*) ainsi que les virus doivent être pris en compte, notamment chez les enfants (Cantais et al. 2014, Bénet et al. 2017, Leung et al. 2018). Bien que non analysés dans ce travail, ces germes ont également été recherchés dans toutes les pathologies pulmonaires. Deuxièmement, il s'agit d'une étude pilote rétrospective uniquement consacrée aux performances du test ; par conséquent, ces résultats restent à confirmer lors d'une étude prospective qui permettrait de voir l'impact du test sur la prise en charge du patient.

Troisièmement, nous avons ici établi qu'une charge pneumococcique élevée (≥ 10^7 UFC/ml ou l'équivalent par PCR) dans les sécrétions des voies respiratoires supérieures était prédictive d'une infection invasive à pneumocoque. Même si des recommandations européennes valident cette définition (Freymuth et al. 2012, Botterel et al. 2018) et que les données de l'étude américaine PERTH confirment la validité de ce seuil chez les enfants de moins de 5 ans (Baggett et al. 2017), d'autres ne recommandent pas l'utilisation de ces échantillons cliniques (Harris et al. 2011). Cependant, la bonne corrélation entre les résultats quantitatifs obtenus par culture et la PCR indique que ces mesures ont une véritable pertinence clinique.

La sensibilité et la VPN du TDR étaient excellentes par rapport à la culture semi-quantitative et la PCR, ce qui a permis d'exclure tous les résultats négatifs pour *S. pneumoniae* au jour 0 sans risque de manquer des échantillons hautement positifs en charge bactérienne. Enfin, le TDR utilisé sur des échantillons dilués a permis d'identifier au jour 0 tous les cas présumés de pneumonie à pneumocoque identifiés dans cette étude.

Un algorithme illustré sur la **Figure 36** résume les avantages du test PneumoResp pour la gestion des infections actives/invasives à pneumocoque chez les enfants. Lorsque le TDR est négatif sur la sécrétion non diluée, la probabilité d'infection active à pneumocoque est très faible et une autre étiologie doit être recherchée. Lorsque le TDR est positif sur la sécrétion diluée, la probabilité d'infection active à pneumocoque est élevée et un traitement anti-pneumococcique doit être discuté. Dans les situations intermédiaires (TDR positif sur la sécrétion non diluée et négatif sur la sécrétion diluée), la culture semi-quantitative reste essentielle pour décider entre portage et infection active, ainsi que la mise en œuvre d'autres tests tels que les approches multiplex moléculaires cherchant simultanément les virus respiratoires (première cause de pneumonie chez l'enfant) et les bactéries atypiques intracellulaires difficiles à cultiver et nécessitant un traitement antimicrobien différent.

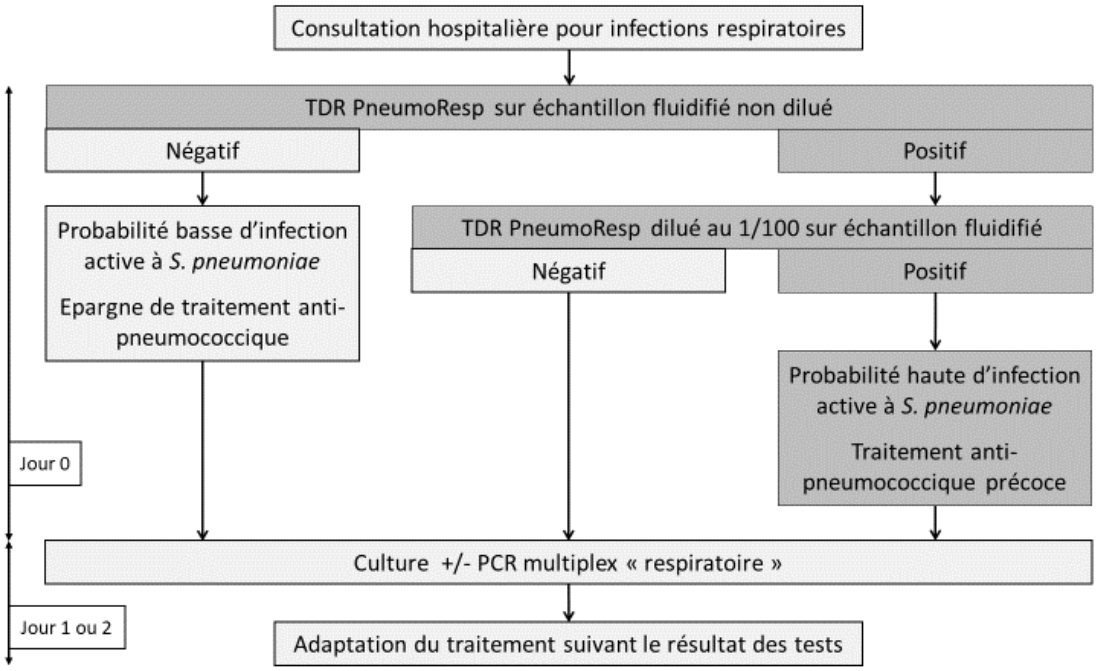


Figure 36. Proposition de stratégie de diagnostic des infections respiratoires à *S. pneumoniae* utilisant le TDR PneumoResp.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les principales conclusions de ce travail sont les suivantes :

- Le TDR MeningoSpeed détectant *N. meningitidis* dans le LCS a été testé sur une cohorte très importante d'échantillons. Il a montré la plupart des qualités d'un TDR telles que définies par le standard ASSURED.
- Le TDR MeningoSpeed est le premier test immunochromatographique permettant de tester 5 principaux sérogroupes de méningocoque, ce qui fournit, en plus de la détection, des renseignements sur le sérogroupe incriminé.
- Le TDR PneumoSpeed, déjà évalué pour la détection de *S. pneumoniae* dans l'urine, a montré de bonnes performances sur la matrice LCS dans une étude pilote. Néanmoins une augmentation du nombre de cas testés semble nécessaire avant de valider définitivement ce test pour les études de terrain. Ce travail est en bonne voie avec l'étude prospective testant en parallèle MeningoSpeed et PneumoSpeed au Niger et au Burkina Faso sous l'égide de l'OMS.
- Le TDR PneumoResp a été créé dans le cadre de ce travail de thèse CIFRE. Il est le fruit de réflexions entre des cliniciens et BioSpeedia. Le test PneumoSpeed a été adapté à la détection du pneumocoque dans les sécrétions respiratoires pour tenter de distinguer les portages des infections actives/invasives chez l'enfant. Grâce à des étapes de dilution, nous proposons une approche semi-quantitative originale du concept de TDR en infectiologie. Ainsi, la sensibilité et la valeur prédictive négative élevées de ce test pourraient en faire un outil intéressant pour le diagnostic précoce (jour 0) des pathologies à pneumocoque. Notre algorithme semble indiquer qu'un test négatif sur sécrétions non diluées permet d'exclure de façon quasi-certaine un diagnostic d'infection pneumococcique invasive alors qu'un test positif sur sécrétions diluées fait envisager très fortement une infection pneumococcique invasive dès J0, en attendant les résultats de la culture. La validation de cette stratégie – soumise à brevet – doit être envisagée dans le cadre d'une étude prospective de grande envergure.

Les perspectives du travail concernant les tests développés sont vastes et représentent un grand défi pour la jeune équipe de BioSpeedia **:**

- Pour le MeningoSpeed, il est prévu d'ajouter le sérogroupe B au panel de détection, ce qui représente un enjeu technologique de taille compte tenu du caractère assez peu immunogène des antigènes de capsule pour ce sérogroupe. Le développement d'un test pouvant détecter le méningocoque dans les urines est aussi intéressant pour proposer une approche non invasive du diagnostic de méningite, notamment dans les pays à ressources limitées.
- Pour le PneumoResp, outre l'étude prospective envisagée chez les enfants mentionnée ci-dessus, il serait intéressant d'étudier si ce test a un intérêt chez l'adulte, d'autant que les taux de portage sont beaucoup plus faibles. Par ailleurs, un projet d'adaptation du test pour lui permettre d'être réalisé en POC, voire au lit du patient, est envisagé, notamment en simplifiant l'étape de fluidification qui est difficile à pratiquer hors d'un laboratoire.
- Pour tous les tests, développer une solution avec une lecture objective permettrait d'augmenter la sensibilité et la robustesse de lecture, tout en satisfaisant aux exigences de traçabilité imposées par l'assurance qualité.
- D'autres perspectives plus ambitieuses concernent à la fois l'élargissement des panels de tests à d'autres pathogènes (voire par exemple notre expérience avec la détection de shigella par TDR relatée en **annexe 2**), l'intégration de nouvelles technologies dans la fabrication des TDR de type LFIA (nanobodies, aptamères …) et le couplage des techniques immunologiques aux tests moléculaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdullahi O, Karani A, Tigoi CC, Mugo D, Kungu S, Wanjiru E, Jomo J, Musyimi R, Lipsitch M, Scott JA. Rates of acquisition and clearance of pneumococcal serotypes in the nasopharynges of children in Kilifi District, Kenya. J Infect Dis 2012;206:1020-1029.

Abeyta M, Hardy GG, Yother J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 2003;71:218-225.

Agnememel A, Traincard F, Dartevelle S, Mulard L, Mahamane AE, Oukem-Boyer OOM, et al. Development and evaluation of a dipstick diagnostic test for *Neisseria meningitidis* serogroup X. J Clin Microbiol 2015;53:449-454.

Alsager OA, Kumar S, Hodgkiss JM. Lateral flow aptasensor for small molecule targets exploiting adsorption and desorption interactions on gold nanoparticles. Anal Chem 2017;89:7416-7424.

Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, Quesne G, Carvalho M da GS, Steigerwalt AG, et al. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of streptococcus pneumoniae and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. J Clin Microbiol 2004;42:4686-4696.

Athlin S, Iversen A, Özenci V. Comparison of the immuview and the binaxnow antigen tests in detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in urine. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017;36:1933-1938.

Austrian R. Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. Rev Infect Dis 1981;3:S1-17.

Backhaus E, Berg S, Andersson R, Ockborn G, Malmström P, Dahl M, et al. Epidemiology of invasive pneumococcal infections: manifestations, incidence and case fatality rate correlated to age, gender and risk factors. BMC Infect Dis 2016;16:367.

Baggett HC at al. Density of Upper Respiratory Colonization With Streptococcus pneumoniae and Its Role in the Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia Among Children Aged <5 Years in the PERCH Study. Clin Infect Dis 2017;64:S317-S327.

Banerjee R, Jaiswal A. Recent advances in nanoparticle-based lateral flow immunoassay as a point-of-care diagnostic tool for infectious agents and diseases. Analyst 2018;143:1970-1996.

Bénet T, Sánchez Picot V, Messaoudi M, Chou M, Eap T, Wang J et al. Microorganisms associated with pneumonia in children < 5 years of age in developing and emerging countries: the GABRIEL pneumonia multicenter, prospective, case-control study. Clin Infect Dis 2017;65:604-612.

Benton KA, Everson MP, Briles DE. A pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae* causes chronic bacteremia rather than acute sepsis in mice. Infect Immun 1995;63:448-455.

Berry AM, Yother J, Briles DE, Hansman D, Paton JC. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1989;57:2037-2042.

Berson SA, Yalow RS. General principles of radioimmunoassay. Clin Chim Acta 2006;369:125-143.

Bingen E. Place du pneumocoque en pathologie infectieuse pédiatrique. Pathol Biol 2002;50:374-379.

Botterel F, Cattoen C, Pozzetto B. Infections broncho-pulmonaires. REMIC Société Française de Microbiologie Ed. 2018;19:199-212.

Boving MK, Pedersen LN, Moller JK. Eight-Plex PCR and liquid-array detection of bacterial and viral pathogens in cerebrospinal fluid from patients with suspected meningitis. J Clin Microbiol 2009;47:908-913.

Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system. J Chem Soc Chem Commun 1994;7:801-802.

Bruyn GA. W, Zegers BJ, van Furth R. Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis 1992;14:251-262.

Burgos J, Garcia-Pérez JN, di Lauro SG, Falcó V, Pumarola T, Almirante B, et al. Usefulness of Sofia Pneumococcal FIA® test in comparison with BinaxNOW® Pneumococcal test in urine samples for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2018;37:1289-1295.

Cantais A, Mory O, Pillet S, Verhoeven PO, Bonneau J, Patural H, et al. Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. J Clin Virol 2014;60:402-407.

Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, Noah ND. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. Epidemiol Infect 1987;99:591-601.

Chanteau S, Dartevelle S, Mahamane AE, Djibo S, Boisier P, Nato F. New rapid diagnostic tests for *Neisseria meningitidis* Serogroups A, W135, C, and Y. PLoS Med 2006;3:e337.

Chen Y, Cheng N, Xu Y, Huang K, Luo Y, Xu W. Point-of-care and visual detection of *P. aeruginosa* and its toxin genes by multiple LAMP and lateral flow nucleic acid biosensor. Biosens Bioelectron 2016;81:317-323.

Cheng CM, Martinez AW, Gong J, Mace CR, Phillips ST, Carrilho E, et al. Paper-based ELISA. Angew Chem Int Ed Engl 2010;49:4771-4774.

Coffey TJ, Enright MC, Daniels M, Morona JK, Morona R, Hryniewicz W, et al. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1998;27:73-83.

Collard J-M, Wang X, Mahamane AE, Idi I, Issaka B, Ousseni M, et al. A five-year field assessment of rapid diagnostic tests for meningococcal meningitis in Niger by using the combination of conventional and real-time PCR assays as a gold standard. Trans R Soc Trop Med Hyg 2014;108:6-12.

Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarski EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol 2001;39:1553-1558.

Cuevas LE, Hart CA, Mughogho G. Latex particle agglutination tests as an adjunct to the diagnosis of bacterial meningitis: a study from Malawi. Ann Trop Med Parasitol 1989;83:375-379.

Deghmane AE, Hong E, Taha MK. Diagnosis of meningococcal infection using internally controlled multiplex real-time PCR. Methods Mol Biol 2019;1969:17-31.

Domínguez J, Blanco S, Rodrigo C, Azuara M, Galí N, Mainou A, et al. Usefulness of urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of pneumococcal pneumonia in children. J Clin Microbiol 2003;41:2161-2163.

Dowell SF, Garman RL, Liu G, Levine OS, Yang Y-H. Evaluation of Binax NOW, an Assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. Clin Infect Dis 2001;32:824-825.

Drain PK, Hyle EP, Noubary F, Freedberg KA, Wilson D, Bishai WR, et al. Diagnostic point-of-care tests in resource-limited settings. Lancet Infect Dis 2014;14:239-249.

Dretler AW, Rouphael NG, Stephens DS. Progress toward the global control of *Neisseria meningitidis*: 21st century vaccines, current guidelines, and challenges for future vaccine development. Hum Vaccines Immunother 2018;14:1146-1160.

Ehara N, Fukushima K, Kakeya H, Mukae H, Akamatsu S, Kageyama A, et al. A novel method for rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum and its application in adult respiratory tract infections. J Med Microbiol 2008;57:820-826.

Feikin DR, Jagero G, Aura B, Bigogo GM, Oundo J, Beall BW, et al. High rate of pneumococcal bacteremia in a prospective cohort of older children and adults in an area of high HIV prevalence in rural western Kenya. BMC Infect Dis 2010;10:186.

Fernebro J, Andersson I, Sublett J, Morfeldt E, Novak R, Tuomanen E, et al. Capsular expression in *Streptococcus pneumoniae* negatively affects spontaneous and antibiotic-induced lysis and contributes to antibiotic tolerance. J Infect Dis 2004;189:328-338.

Findlater A, Bogoch II. Human mobility and the global spread of infectious diseases: a focus on air travel. Trends Parasitol 2018;34:772-783.

Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. Nat Phys Sci 1973;241:20-22.

Freymuth F, Leven M, Wallet F. Lower respiratory tract infections. In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Vila J, SFM, ESCMID editors. European manual of clinical microbiology. 1st ed. France: Epernay. 2012;153-161.

Friedland IR, Paris MM, Hickey S, Shelton S, Olsen K, Paton JC, et al. The limited role of pneumolysin in the pathogenesis of pneumococcal meningitis. J Infect Dis 1995;172:805-809.

Fukushima K, Kubo T, Ehara N, Nakano R, Matsutake T, Ishimatu Y, et al. A novel method for rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* antigens in blood. J Infect Chemother 2016;22:143-148.

Fukushima K, Nakamura S, Inoue Y, Higashiyama Y, Ohmichi M, Ishida T, et al. Utility of a sputum antigen detection test in pneumococcal pneumonia and lower respiratory infectious disease in adults. Intern Med 2015;54:2843-2850.

Funk A, Uadiale K, Kamau C, Caugant DA, Ango U, Greig J. Sequential outbreaks due to a new strain of *Neisseria meningitidis* serogroup C in northern Nigeria, 2013-14. PLoS Curr 2014;6.

Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. Clin Microbiol Rev 2015;28:871-899.

Gracie K, Correa E, Mabbott S, Dougan JA, Graham D, Goodacre R, et al. Simultaneous detection and quantification of three bacterial meningitis pathogens by SERS. Chem Sci 2014;5:1030-1040.

Grau I, Ardanuy C, Calatayud L, Schulze MH, Liñares J, Pallares R. Smoking and alcohol abuse are the most preventable risk factors for invasive pneumonia and other pneumococcal infections. Int J Infect Dis 2014;25:59-64.

Gray BM, Turner ME, Dillon HC. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants the effects of season and age on pneumococcal acquisition and carriage in the first 24 months of life. Am J Epidemiol 1982;116:692-703.

Gutiérrez F, Mar M, Rodríguez JC, Ayelo A, Soldán B, Cebrián L, et al. Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community-acquired pneumonia in Spain. Clin Infect Dis 2003;36:286-292.

Halas NJ, Lal S, Chang W-S, Link S, Nordlander P. Plasmons in strongly coupled metallic nanostructures. Chem Rev 2011;111:3913-3961.

Harris M, Clark J, Coote N, Fletcher P, Harnden A, McKean M, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. Thorax 2011;66:1-23.

Hays C, Vermee Q, Agathine A, Dupuis A, Varon E, Poyart C, et al. Demonstration of the herd effect in adults after the implementation of pneumococcal vaccination with PCV13 in children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017;36:831-838.

Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 1995;33:2759-2762.

Hoban DJ, Witwicki E, Hammond GW. Bacterial antigen detection in cerebrospinal fluid of patients with meningitis. Diagn Microbiol Infect Dis 1985;3:373-379.

Howard LV, Gooder H. Specificity of the autolysin of *Streptococcus* (Diplococcus) *pneumoniae*. J Bacteriol 1974;117:796-804.

Huang X, Aguilar ZP, Xu H, Lai W, Xiong Y. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review. Biosens Bioelectron 2016;75:166-180.

Ikegame S, Nakano T, Otsuka J, Yoshimi M, Matsuo T, Kubota M, et al. The Evaluation of the sputum antigen kit in the diagnosis of pneumococcal pneumonia. Intern Med 2017;56:1141-1146.

Ikryannikova LN, Filimonova AV, Malakhova MV, Savinova T, Filimonova O, Ilina EN, et al. Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. Clin Microbiol Infect 2013;19:1066-1071.

Izumikawa K, Akamatsu S, Kageyama,A, Okada K, Kazuyama Y, Takayanagi N et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum samples from patients with lower respiratory tract infection. Clin Vaccine Immunol 2009;16:672-678.

Jauneikaite E, Tocheva AS, Jefferies JMC, Gladstone RA, Faust SN, Christodoulides M, et al. Current methods for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*. J Microbiol Methods 2015;113:41-49.

Jauset-Rubio M, Svobodová M, Mairal T, McNeil C, Keegan N, El-Shahawi MS, et al. Aptamer lateral flow assays for ultrasensitive detection of β-conglutin combining recombinase polymerase amplification and tailed primers. Anal Chem 2016;88:10701-10709.

Johri S, Gorthi S, Anand A. Meningococcal Meningitis. Med J Armed Forces India, 2005;61:369-374.

Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. Nature 1986;321:522-525.

Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nat Rev Microbiol 2008;6:288-301.

Karlsson C, Jansson PE, Skov Sørensen UB. The pneumococcal common antigen C-polysaccharide occurs in different forms. Mono-substituted or di-substituted with phosphocholine. Eur J Biochem 1999;265:1091-1097.

Kawamura Y, Whiley RA, Shu S-E, Ezaki T, Hardie JM. Genetic approaches to the identification of the mitis group within the genus Streptococcus. Microbiology 1999;145:2605-2613.

Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ, Gibbs JL, Smith MC. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. J Clin Microbiol 2001;39:3373-3375.

Kettler H, White K, Hawkes S. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections: key findings and recommendations. World Health Organization 2014. Report No.: TDR/STI/IDE/04.1.

Kim PE, Musher DM, Glezen WP, Rodriguez-Barradas MC, Nahm WK, Wright CE. Association of invasive pneumococcal disease with season, atmospheric conditions, air pollution, and the isolation of respiratory viruses. Clin Infect Dis 1996;22:100-106.

Köhler G, Milstein C. Pillars Article: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 1975;256: 495–7. J Immunol 2005;174:2453-2455.

Land KJ, Boeras DI, Chen X-S, Ramsay AR, Peeling RW. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. Nat Microbiol 2019;4:46-54.

Leung AKC, Wong AHC, Hon KL. Community-acquired pneumonia in children. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov 2018;12:136-144.

Liu W, Song H, Chen Q, Yu J, Xian M, Nian R, et al. Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. Mol Immunol 2018;96:37-47.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet 2012;380:2095-2128.

MacLeod CM, Kraus MR. Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysaccharide formed *in vitro*. J Exp Med 1950;92:1-9.

Maffert P, Reverchon S, Nasser W, Rozand C, Abaibou H. New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017;36:1717-1731.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:3140-3145.

Martin M, Turco JH, Zegans ME, Facklam RR, Sodha S, Elliott JA, et al. An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*. N Engl J Med 2003;348:1112-1121.

McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, Barnes WJ, Salmen A, Jackson GW, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. J Clin Microbiol 2001;39:3446-3451.

Merz AJ, So M. Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. Annu Rev Cell Dev Biol 2000;16:423–457.

Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. Nature 2004;430:242-249.

Morrison KE, Lake D, Crook J, Carlone GM, Ades E, Facklam R, et al. Confirmation of psaA in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. J Clin Microbiol 2000;38:434-437.

Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:6851-6855.

Moura CC, Segundo MA, Neves Jd, Reis S, Sarmento B. Co-association of methotrexate and SPIONs into anti-CD64 antibody-conjugated PLGA nanoparticles for theranostic application. Int J Nanomedicine 2014;9:4911-4922.

Murdoch DR, Reller LB. Immunochromatographic test for rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* in the Nasopharynx. J Clin Microbiol 2003;41:2271.

Nie S, Emory SR. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced raman scattering. Science 1997;275:1102-1106.

Nnadi C, Oladejo J, Yennan S, Ogunleye A, Agbai C, Bakare L, et al. Large Outbreak of *Neisseria meningitidis* Serogroup C - Nigeria, December 2016-June 2017. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2017;66:1352-1356.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000;28:E63.

O'Farrell B. Lateral flow immunoassay systems. In: The Immunoassay Handbook 4th edition, 2013, Elsevier, p. 89-107.

O'Neill AM, Gillespie SH, Whiting GC. Detection of penicillin susceptibility in *Streptococcus pneumoniae* by pbp2b PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 1999;37:157-160.

Parkhill J, and al. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491. Nature 2000;404:502-506.

Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. PLoS Biol 2006;4:e204.

Ploton MC, Caseris M, Jost C, Picard Y, Gaschignard J, Pierron C, et al. Likely false-positive pneumococcal antigen yest BinaxNOW due to *Parvimonas micra*: a four-case series. Chest 2018;153:e71-73.

Plotz CM, Singer JM. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. Am J Med 1956;21:888-892.

Quesada-González D, Merkoçi A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. Biosens Bioelectron 2015;73:47-63.

Rapport « Les infections invasives à méningocoques en 2017 » Santé Publique France et Centre National de Référence des méningocoques et *Haemophilus influenzae*. 31 décembre 2017. https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-prevention-vaccinale/infections-invasives-a-meningocoque/documents/donnees/les-infections-invasives-a-meningocoque-en-france-en-2017.

Reynolds O. An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. Philos Trans R Soc Lond 1883;174:935-982.

Rose AMC, Gerstl S, Mahamane AE-H, Sidikou F, Djibo S, Bonte L, et al. Field evaluation of two rapid diagnostic tests for *Neisseria meningitidis* serogroup A during the 2006 outbreak in Niger. PLoS One 2009;4(10):e7326.

Rosón B, Fernández-Sabé N, Carratalà J, Verdaguer R, Dorca J, Manresa F, et al. Contribution of a urinary antigen assay (Binax NOW) to the early diagnosis of pneumococcal pneumonia. Clin Infect Dis 2004;38:222-226.

Rouphael NG, Stephens DS. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. Methods Mol Biol 2012;799:1-20.

Sariya Mohammadi J, Dhanashree B. *Streptococcus pseudopneumoniae*: an emerging respiratory tract pathogen. Indian J Med Res 2012;136:877–880.

Satzke C, Turner P, Virolainen-Julkunen A, Adrian PV, Antonio M, Hare KM, et al. Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. Vaccine 2013;32:165-179.

Schito M, Peter TF, Cavanaugh S, Piatek AS, Young GJ, Alexander H, et al. Opportunities and challenges for cost-efficient implementation of new point-of-care diagnostics for HIV and tuberculosis. J Infect Dis 2012;205:S169-180.

Schoen C, and al. Whole-genome comparison of disease and carriage strains provides insights into virulence evolution in *Neisseria meningitidis*. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105:3473–3478.

Smith MD, Derrington P, Evans R, Creek M, Morris R, Dance DAB, et al. Rapid diagnosis of bacteremic pneumococcal infections in adults by using the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test: a prospective, controlled clinical evaluation. J Clin Microbiol 2003;41:2810-2813.

Spreer A, Kerstan H, Böttcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G, et al. Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae in vitro* and *in vivo* after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:2649-2654.

Sriram G, Bhat MP, Patil P, Uthappa UT, Jung H-Y, Altalhi T, et al. Paper-based microfluidic analytical devices for colorimetric detection of toxic ions: A review. Trends Anal Chem 2017;93:212-227.

Stephens DS. 2007. Conquering the Meningococcus. FEMS Microbiol Rev, 2007;31:3-14.

Taha MK, Claus H, Lappann M, Veyrier FJ, Otto A, Becher D, et al. Evolutionary events associated with an outbreak of meningococcal disease in men Who have sex with men. PLoS One 2016;11:e0154047.

Thabuis A, Tararbit K, Taha M-K, Dejour-Salamanca D, Ronin V, Parent du Chatelet I, et al. Community outbreak of serogroup B invasive meningococcal disease in Beaujolais, France, February to June 2016: from alert to targeted vaccination. Euro Surveill 2018;23(28).

Tinsley, and al. Analysis of the genetic differences between *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: two closely related bacteria expressing two different pathogenicities. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93 :11109–11114.

Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science 1990;249:505-510.

Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss Faraday Soc 1951;11:55-75.

Uadiale K, Bestman A, Kamau C, Caugant DA, Greig J. Evaluation of Pastorex meningitis kit performance for the rapid identification of *Neisseria meningitidis* serogroup C in Nigeria. Trans R Soc Trop Med Hyg 2016;110:381-385.

Vashist SK, Luppa PB, Yeo LY, Ozcan A, Luong JHT. Emerging technologies for next-generation point-of-care testing. Trends Biotechnol 2015;33:692-705.

Vicente D, López-Olaizola M, de la Caba I, Cilla G. Evaluation of Sofia Fluorescent immunoassay analyzer for pneumococcal urinary antigen detection in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. J Microbiol Methods 2017;141:25-27.

Vieusseux M. Mémoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1805. J Med Chir Pharmacol 1805;11:163.

Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. EMBO Rep 2004;5:795-800.

Wantuch PL, Avci FY. Current status and future directions of invasive pneumococcal diseases and prophylactic approaches to control them. Hum Vaccines Immunother 2018;14:2303-2309.

Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. Clin Infect Dis 1993;17:913-924.

Weichselbaum A. Ueber die Aetiologie der akuten meningitis cerebrospinalis. Fortschr Med 1887;5:573–583.

Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. Nat Rev Microbiol 2018;16:355-367.

Wellmer A, Zysk G, Gerber J, Kunst T, Von Mering M, Bunkowski S, et al. Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis. Infect Immun 2002;70:6504-6508.

Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from Nonpneumococcal Streptococci of the *Streptococcus mitis* Group by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2012;50:2863-2867.

Wong R, Tse H. Lateral Flow Immunoassay, 2009 Humana Press,Totowa, NJ.

Yezli S, et al. Prevention of meningococcal disease at mass gatherings: lessons from the Hadjj and Umrah. Vaccine 2018;36:4603-4609.

Zhang X, Shao Z, Zhu Y, Xu L, Xu X, Mayer LW, Xu J, Jin Q. Genetic characteristics of serogroup A meningococci circulating in China, 1956-2005. Clin Microbiol Infect 2008;14:555-561.

Zivich PN, Grabenstein JD, Becker-Dreps SI, Weber DJ. *Streptococcus pneumoniae* outbreaks and implications for transmission and control: a systematic review. Pneumonia 2018;10:11.

ANNEXES

Annexe 1 : Brevet FR 1905115 déposé le 16 mai 2019

Brevets d'invention
Marques & Modèles
Contrats et Valorisation
Veille Stratégique

REGIMBEAU
Creative IP

Patents
Trademarks & Designs
Contracts and IP Valuation
IP Intelligence

UNIVERSITE JEAN MONNET, SAINT ETIENNE
10, rue Tréfilerie
CS82301
42023 SAINT-ETIENNE Cedex 02
A l'attention de M. CHAVAND

Par email uniquement
[redacted]@univ-st-etienne.fr

Lyon, le 24 mai 2019

BC/LUV/VM

Objet :	Demande de brevet français n° 1905115 déposée le 16 mai 2019
Titre :	DIAGNOSTIC INFECTION STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE
Vos Réf. :	
Nos Réf. :	B251315FR D39518 - LUV

Monsieur,

Nous avons le plaisir de vous confirmer le dépôt de votre demande de brevet citée en référence le 16 mai 2019 sous le n° 1905115.

Vous trouverez ci-joint copie des documents déposés accompagnés du récépissé officiel de dépôt. Le dépôt a été effectué en revendiquant le statut de petite entité, qui permet aux déposants de bénéficier d'une réduction de 50 % sur les redevances.

A ce stade et pour régulariser votre dépôt, nous vous rappelons qu'il nous manque l'attestation de petite entité signée pour le CHU de Saint Etienne.

Le délai pour régulariser le document manquant expire le **16 juin 2019** : à défaut de produire ce document auprès de l'INPI dans ce délai, les taxes dues pour cette demande de brevet devront être régularisées sur la base du taux plein ; une facture complémentaire pour les taxes sera alors émise.

Sauf contrordre de votre part, nous considérons que nous sommes responsables de la gestion des annuités dues pour le maintien en vigueur de cette demande de brevet. Vous recevrez, en temps opportun, nos avis d'échéance concernant le paiement de ces annuités.

PARIS
LYON
87 rue de Sèze
CS 60314
F-69451 Lyon Cedex 06
Tel. : + 33 (0) 4 72 83 85 70
Fax : + 33 (0) 4 78 24 30 78
lyon@regimbeau.eu
RENNES
MONTPELLIER
GRENOBLE
TOULOUSE
CAEN
MUNICH

REGIMBEAU – Société Civile au capital de 30 489,80 euros – R.C.S. Paris D 784 661 357 - Siège social : 20 rue de Chazelles, F-75017 Paris
Tochtergesellschaft : REGIMBEAU GmbH – Sitz : München – Registergericht : AG München HRB 201280

REGIMBEAU
Creative IP

Une fois accomplies les vérifications d'usage relatives aux impératifs de la Défense nationale, l'INPI procèdera à un examen formel de votre demande, à l'issue duquel la recherche des documents de l'art antérieur pourra débuter.

Un rapport de recherche préliminaire répertoriant les documents susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la nouveauté et l'activité inventive de votre invention nous sera ensuite communiqué dans un délai que nous estimons à 9 mois du dépôt. Nous aurons donc l'occasion de revenir vers vous à ce sujet dans le courant du mois de janvier 2020.

La note de débit correspondant à nos frais et honoraires pour nos différentes interventions dans le cadre de la rédaction et du dépôt de votre demande de brevet est en cours de préparation et vous sera communiquée par notre Chargée de Facturation. Son montant est légèrement supérieur à celui estimé dans notre courrier du 17 avril 2019, les honoraires supplémentaires comptabilisés correspondant aux prestations suivantes :

- la préparation et le dépôt d'un listage de séquences ; et
- les nombreux échanges téléphoniques et par courriel avec les inventeurs, notamment en amont du travail de rédaction.

Toutefois, nous n'avons pas ajouté à ce montant les frais d'urgence qui sont classiquement comptabilisés lorsqu'une rédaction de brevet doit être réalisée en moins de 6 semaines.

Nous vous prions d'agréer, Monsieur, l'expression de nos sentiments distingués.

Lucile VERNOUX **Barbara CASADEWALL**

Par email uniquement à :

BIOSPEEDIA [redacted]*@biospeedia.com* ; [redacted]*@biospeedia.com*
CHU SAINT ETIENNE [redacted]*@chu-st-etienne.fr* , [redacted]*@chu-st-etienne.fr* . [redacted]*@chu-st-etienne.fr*

P.J.

- *Copie des documents déposés*
- *Récépissé de dépôt*
- *Attestation petite entité CHU SAINT ETIENNE*

REVENDICATIONS

1. Procédé de diagnostic *in vitro* d'une infection à pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*) comprenant au moins deux étapes de détection d'un antigène de pneumocoques :
   (i) sur un échantillon de sécrétions issues des voies respiratoire d'un patient, et
   (ii) sur le même échantillon après dilution.

2. Procédé de diagnostic selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'à l'étape (ii) l'échantillon est dilué par un facteur de dilution de 10 à 1000, préférentiellement par un facteur 100.

3. Procédé de diagnostic selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que chaque étape de détection est réalisée grâce à un test immunologique comprenant au moins un anticorps se liant spécifiquement à au moins un antigène de pneumocoque.

4. Procédé de diagnostic selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'échantillon a été préalablement fluidifié.

5. Procédé de diagnostic selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'à l'issue de chaque étape de détection, un résultat « positif » ou « négatif » est obtenu.

6. Procédé de diagnostic selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'obtention d'un résultat « négatif » à l'étape (i) de détection est représentatif d'une quantité de pneumocoques dans l'échantillon inférieure ou égale à 10^3 UFC/ml.

7. Procédé de diagnostic selon l'une des revendications 1 à 6, comprenant de plus une étape (iii) de comparaison des résultats obtenus aux étapes (i) et (ii).

8. Procédé de diagnostic selon la revendication 7, caractérisé en ce que :
   - si les deux étapes de détection (i) et (ii) ont abouti à un résultat positif, cela est représentatif d'une quantité de pneumocoques dans l'échantillon supérieure ou égale à 10^7 CFU/ml ; et

9. si l'étape (i) a abouti à un résultat positif et que l'étape (ii) a abouti à un résultat négatif, cela est représentatif d'une quantité de pneumocoques dans l'échantillon comprise entre environ 10^3 et environ 10^6 CFU/ml.

10. Procédé de diagnostic selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le patient est âgé de moins de 12 ans.

11. Procédé de diagnostic selon l'une des revendications 1 à 9, comprenant de plus une étape (iv) de culture bactériologique à partir de l'échantillon de sécrétions issues des voies respiratoire du patient.

12. Trousse de diagnostic pour la mise en œuvre du procédé *in vitro* selon l'une des revendications 1 à 10, comprenant :

    - un test immunologique comprenant au moins un anticorps se liant spécifiquement à au moins un antigène de pneumocoque ; et

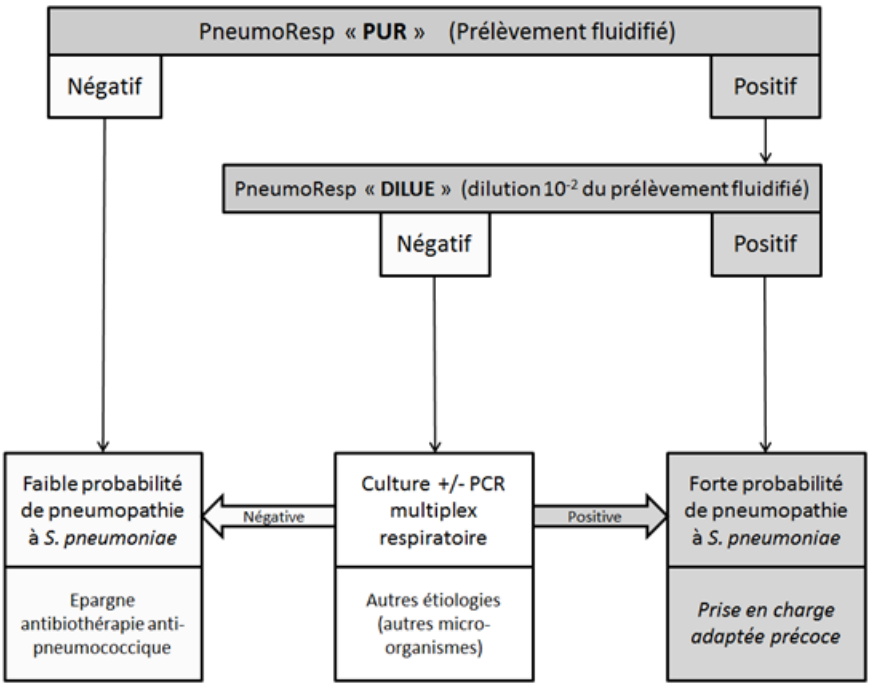
    - une solution de dilution.

ABREGE

La présente invention concerne un procédé de diagnostic *in vitro* d'une infection à pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*) comprenant au moins deux étapes de détection d'un antigène de pneumocoques :

(i) sur un échantillon de sécrétions issues des voies respiratoire d'un patient, et
(ii) sur le même échantillon après dilution.

Figure pour l'abrégé :



Annexe 2 : Article « Tests de diagnostic rapide des shigelloses »

Ce travail est une évaluation de tests immunochromatographiques développés dans l'Unité Pathogénie Microbienne Moléculaire du Pr. Sansonetti à l'Institut Pasteur de Paris sous l'égide d'Yves Germani, notre co-directeur de thèse, pour la détection de *Shigella* spp., de *Shigella flexneri* 2a, de *Shigella sonnei* et de *Shigella dysenteriae* 1 dans les coprocultures. Il s'agit d'une validation opérationnelle sur le terrain dans différents pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du sud où ces pathologies sont encore fréquentes. Ce travail a été publié dans le journal « Bulletin de la Société de pathologie exotique » en Février 2017.

Référence : Bull Soc Pathol Exot. 2017 Feb;110(1):1-8. doi: 10.1007/s13149-016-0538-6. Epub 2017 Jan 23.

©Lavoisier 2017, article (ou figure) reproduit(e) avec l'aimable autorisation de l'éditeur : C. Haddar, E. Begaud, J. Maslin, Y. Germani (2017) Test de diagnostic rapide des shigelloses. Bulletin de la société de pathologie expotique 110(1) : 1-8.

Bull. Soc. Pathol. Exot. (2017) 110:1-8
DOI 10.1007/s13149-016-0538-6

BIOLOGIE CLINIQUE / *CLINICAL BIOLOGY*

Tests de diagnostic rapide des shigelloses*

Point-of-Care Tests for the Rapid Diagnosis of Shigellosis

C. Haddar · E. Begaud · J. Maslin · Y. Germani

Reçu le 23 février 2016 ; accepté le 23 août 2016
© Société de pathologie exotique et Lavoisier SAS 2016

Résumé Dans le monde, environ 140 millions de personnes souffrent de shigellose chaque année. L'identification traditionnelle de *Shigella* spp. lors de la coproculture manque de sensibilité (Se). Un diagnostic rapide permet de prescrire un traitement antimicrobien approprié qui raccourcit la durée et la gravité de la maladie, et réduit le risque de propagation de l'infection dans une communauté. L'Institut Pasteur a développé des tests immunochromatographiques pour le diagnostic rapide de *Shigella* spp., de *Shigella flexneri* 2a, de *Shigella sonnei* et de *Shigella dysenteriae* 1. Ces tests de diagnostic rapide (TDR) ont été évalués sur différents types d'échantillons (souches isolées, selles et écouvillons rectaux), dans différents pays et dans différentes conditions. Ces TDR ne nécessitent pas l'expertise du biologiste et peuvent être lus en moins de 15 minutes. La coproculture et les TDR ont montré différents niveaux de concordance au cours des études comparatives. Le TDR *S. flexneri* 2a a été testé au Vietnam avec une spécificité (Sp) de 91,5 % et une Se de 99,2 %. Au Chili, les valeurs suivantes ont été obtenues : Sp 100 %, Se 83,3 %. Le TDR *S. dysenteriae* 1 a été évalué en différents lieux avec une Sp de 98,7 % et une Se de 91,7 %. Le TDR *S. sonnei* a été testé à quatre endroits différents avec une Sp de 96 %, une Se de 100 %. Au Chili, les résultats préliminaires sur un TDR générique pour diagnostiquer *Shigella* spp. montrent un potentiel prometteur pour devenir un outil efficace dans la prise en charge rapide des malades et pour des enquêtes épidémiologiques. Ces quatre TDR peuvent être conservés en sachets à l'abri de l'humidité, à température ambiante, ce qui les rend facilement transportables. Compte tenu de l'impact potentiel de ces outils de diagnostic rapide pour la prise en charge clinique de la maladie et pour les études épidémiologiques, l'industrialisation de ces tests est en cours.

Mots clés Test de diagnostic rapide · TDR · Shigellose · *S. flexneri* 2a · *S. sonnei* · *S. dysenteriae* 1 · Évaluation

Abstract Worldwide, it is estimated that 140 million people suffer from shigellosis annually. The traditional identification of *Shigella* spp. by culture lacks sensitivity. Rapid diagnosis of shigellosis is important because it allows to engage appropriate antimicrobial treatment that shortens the duration and severity of the illness and reduces microbial carriage, thus the spread of infection in the community. One-step immunochromatographic dipstick tests have been successfully developed at Institut Pasteur for *Shigella* spp., *Shigella flexneri* 2a, *Shigella sonnei*, and *Shigella dysenteriae* 1. The present work describes the evaluation of these four rapid diagnostic tests (RDT) that addressed the issue of rapid diagnosis of *Shigella* diarrhea and dysentery testing from bacterial cultures, stools, and rectal swabs which is usually how the specimen is often collected or received from the field or from remote settings. The evaluations have been performed in Chile, Democratic Republic of Congo, Senegal, Djibouti, Vietnam, India, and France, in dispensaries, in emergency room, on the field, in public health laboratories, and by the French Army. The dipstick method used requires minimal technical skill, and the test can be read between 5 and 15 minutes. Stool cultures and the immunochromatographic test showed concordant results in the comparative studies when RDT for *S. sonnei* was tested in Chile,

C. Haddar · E. Begaud · Y. Germani (✉)
BioSpeedia, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur-Roux,
75724 Paris cedex 15, France
e-mail : yves.germani@biospeedia.com, yves.germani@pasteur.fr

E. Begaud
Centre de ressources biologiques, Institut Pasteur,
25–28 rue du Docteur-Roux, 75724 Paris cedex 15, France

J. Maslin
Espace santé du golfe de Saint-Tropez, Cerballiance Côte d'Azur,
RD 559, 83580 Gassin, France

* Cet article est le résumé d'une présentation donnée par Y. Germani et E. Begaud lors du colloque sur les « Tests de diagnostic rapide en infectiologie tropicale. Quels besoins ? Quelles disponibilités ? Quelles bonnes pratiques ? » organisé par la SPE à l'Institut Pasteur, à Paris le 28 mai 2014. Y. Germani, E. Begaud. et C. Haddar appartiennent à la *spin-off* de l'Institut Pasteur chargée de standardiser et de commercialiser certains tests de diagnostic rapide créés en son sein.

Vietnam, India, and France; specificity (Sp) was 96% and sensitivity (Se) was 100%. When RDT for *S. flexneri* 2a was tested in Vietnam, Se was 91.5% and Sp was 99.2%. In Chile, Se was 83.3% and Sp was 100%. When RDT for *S. dysenteriae* 1 was tested in India, Vietnam, Senegal, and France by laboratory technicians and in Democratic Republic of Congo by a field technician, the Sp was 98.7% and the Se was 91.7%. In Chile, the initial finding for a simple RDT to diagnose *Shigella* spp. demonstrates its promising potential to become a powerful tool for case management and epidemiological surveys. Additionally, the dipsticks can be stored at room temperature in a humidity-proof plastic bag, making them easily transportable. Considering the potential impact these RDT have for the clinical management of the disease and for epidemiological studies, industrialization of these tests is in progress.

Keywords Rapid diagnostic test · RTD · Shigellosis · *S. flexneri* 2a · *S. sonnei* · *S. dysenteriae* 1 · Evaluation

Introduction

Les maladies diarrhéiques, aux agents pathogènes variés, sont au rang des maladies infectieuses les plus meurtrières dans le monde, notamment dans les pays en développement (PED) de la zone tropicale [9,17]. Selon le micro-organisme en cause, le traitement diffère. Le diagnostic classique requiert d'isoler et d'identifier le micro-organisme impliqué, ce qui est souvent difficile dans les PED.

Shigella, agent de dysenterie bacillaire, compte parmi les principaux agents microbiens responsables d'infections entériques graves dans le monde. En 2005, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estimait à environ 140 millions le nombre de cas de shigelloses par an, et entre 600 000 à 1 million le nombre de décès (dont deux tiers d'enfants) [11]. En santé publique, les espèces les plus importantes sont *Shigella flexneri*, responsable des formes endémiques (30 % des cas en France, notamment le sérotype 2a) ; *Shigella dysenteriae* sérotype 1, responsable d'épidémies brutales et graves dans les PED [9] ; *Shigella sonnei*, moins virulente, est prévalente dans les pays développés (70 % des cas en France [7]). *Shigella* cause un syndrome dysentérique dû à la formation de multiples abcès muqueux ulcérés dans la lumière rectocolique. Des variations liées aux souches en cause ainsi qu'à l'hôte expliquent les différences de gravité des formes cliniques observées, allant de la diarrhée à de véritables syndromes dysentériques éventuellement compliqués. Ces formes peuvent aussi être systémiques (neurologiques, hypoglycémiques, hémolytiques et urémiques) ou locales (perforation, péritonite, atonie colique). Les étapes de la rupture, de l'invasion et de la destruction inflammatoire de l'épithélium intestinal ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires en cause sont l'invasion cellulaire et les mécanismes moléculaires de la pathogénie : pénétration cellulaire par macropinocytose, dissémination intercellulaire par polymérisation de filaments d'actine, inhibition de la biosynthèse protéique eucaryote par la toxine dysentérique. Le mécanisme d'invasion et de dissémination cellulaire est essentiellement sous la dépendance de facteurs plasmidiques. La porte d'entrée des bactéries dans le côlon est l'épithélium folliculaire, riche en cellules M chargées de la capture des antigènes intraluminaux. La croissance intracellulaire et le passage d'une cellule à l'autre en utilisant le cytosquelette de la cellule envahie permettent à la bactérie d'échapper partiellement aux défenses immunitaires. L'infection déclenche un important processus inflammatoire et une réponse immunitaire locale primordiale dans la prévention de l'infection [12].

Le diagnostic de référence reste la coproculture qui nécessite un délai de 48 heures, mais l'isolement de *Shigella* spp. viables est reconnu difficile — le bacille étant très sensible aux conditions environnementales (dessiccation, changement de température et de pH) ; la coproculture doit être effectuée dans les deux à quatre heures suivant le recueil des selles. Les *Shigella* sont génétiquement des variétés invasives d'*Escherichia coli*, auxotrophes, métaboliquement moins actives que les autres colibacilles et strictement adaptées au parasitisme du côlon de l'homme. Classiquement, elles sont divisées en quatre espèces sur la base des caractères biochimiques et antigéniques, *S. dysenteriae* (16 sérotypes), *S. flexneri* (six sérotypes), *Shigella boydii* (20 sérotypes), et *S. sonnei* (un seul sérotype).

Contrairement aux espèces comme *Salmonella* spp. ou *E. coli*, le manque de milieux de culture sélectifs ou électifs appropriés et l'absence de méthode d'enrichissement ou de concentration entraînent la prolifération de la flore endogène et l'inhibition de *Shigella* spp. C'est la raison pour laquelle la coproculture peut manquer de sensibilité (Se) en raison du faible nombre de shigelles excrétées dans les selles par rapport à la flore commensale.

Les méthodes moléculaires [14], comme la *polymerase chain reaction* (PCR), permettent un diagnostic rapide des shigelloses et détectent toutes les souches virulentes des quatre groupes. Plusieurs méthodes de PCR en temps réel ont été décrites [6,14,16] et ont augmenté significativement la Se de la détection par rapport à la coproculture [14], notamment en ciblant les gènes d'invasion [16]. Cependant, ces méthodes requièrent de la technicité, un environnement de laboratoire spécialisé, un matériel spécifique et onéreux.

L'intérêt de disposer de tests de diagnostic simples, fiables, rapides, facilement utilisables au chevet du malade et sur le terrain est majeur, notamment pour orienter le praticien vers le traitement adéquat dans les meilleurs délais, développer une veille microbiologique (en dispensaires par exemple) ou mettre en place une surveillance épidémiologique à

grande échelle pour contrôler le risque épidémique. La personne habilitée à pratiquer ce type de test n'est en principe pas un professionnel de laboratoire, mais plutôt un médecin ou un infirmier.

Plusieurs équipes de l'Institut Pasteur et de son réseau international ont développé des tests de diagnostic rapide (TDR) immunochromatographiques des shigelloses. *S. flexneri* 2a [10], *S. dysenteriae* sérotype 1 [15] et *S. sonnei* [4] ont été les cibles prioritaires pour des raisons épidémiologiques. Le développement d'un TDR générique identifiant tous les sérogroupes de *Shigella* virulentes a également été initié.

Cet article est une synthèse des méthodes développées par l'Institut Pasteur dans le cadre de l'Action concertée inter-instituts Pasteur (ACIP 2004) et du Programme transverse de recherche 179 (PTR 179) ; il présente également les résultats des études complémentaires réalisées en collaboration avec le service de santé des armées (SSA) en marge du programme de recherche clinique lié au PTR 179.

Matériels et méthodes

Les étapes de développement des TDR sont les suivantes :

- caractérisation et choix des cibles antigéniques du diagnostic ;
- production et purification des antigènes ;
- construction et sélection des meilleurs anticorps monoclonaux (AcM) ;
- mise au point et optimisation de prototypes avec des essais sur des souches bactériennes et des selles reconstituées ;
- organisation des sites de validation clinique pour réaliser la preuve de concept et ajuster le prototype si nécessaire ;
- production de lots de TDR pour les évaluations (STARD [1]).

Le transfert à l'industrie est ensuite décidé selon les résultats des évaluations.

Cibles du diagnostic

Les lipopolysaccharides (LPS), et plus particulièrement ceux de l'antigène somatique O, cibles des TDR de *S. dysenteriae* 1, de *S. sonnei* et de *S. flexneri* 2a ont été produits [4,10,15] et purifiés par la méthode biphasique en présence de phénol aqueux de Westphal et Jann [18].

Le TDR générique cible la protéine IcsA (*intracellular spread*) [2] ; ce facteur n'est présent que chez les souches virulentes. IcsA est impliquée dans le mouvement intracellulaire et la dissémination de la bactérie. Elle est localisée au niveau de sa membrane externe.

Production et purification des AcM

Le principe d'obtention des AcM a précédemment été décrit [4,10,15]. L'épreuve requiert au moins deux AcM reconnaissant chacun un épitope différent des LPS et d'IcsA. Un seul anticorps est requis si l'épitope est répété. Pour les LPS, le criblage positif a été réalisé avec les LPS de *S. dysenteriae* 1, de *S. flexneri* 2a et de *S. sonnei*. Un criblage négatif a été effectué avec une série de LPS provenant des autres espèces de *Shigella*, de bactéries à Gram négatif entéropathogènes et d'*Enterobacteriaceae*. Un criblage positif a été réalisé pour IcsA avec des souches utilisées dans de précédentes études [2,3,5,8]. Pour chaque hybridome sélectionné, les ascites ont été produites chez des souris du même fond génétique que celles utilisées pour l'étape d'immunisation. Les AcM ont été sélectionnés pour leur haute affinité ($K_D < 10^{-9}$ M), purifiés par précipitation au sulfate d'ammonium, puis par chromatographie en phase liquide (FPLC) et contrôlés *in fine* par électrophorèse (SDS PAGE). Les hybridomes sélectionnés ont été déposés à la Collection nationale de cultures de micro-organismes (Paris, France).

Technologie des TDR

Les TDR utilisent le principe de la réaction antigène–anticorps en immunochromatographie sur membrane de nitrocellulose. L'échantillon mis en contact avec la bandelette va rencontrer des nanoparticules d'or colloïdal conjuguées avec des AcM dirigés contre l'un des épitopes des antigènes recherchés. Le complexe ainsi formé migre par capillarité sur la membrane de nitrocellulose où deux zones de réactions sont présentes. En cas d'interaction entre ces zones et les nanoparticules-AcM, une ligne rouge apparaît sur la bandelette. La première zone, appelée zone test, est sensibilisée par un AcM dirigé contre l'épitope répété ou un autre épitope de l'antigène recherché. La seconde, appelée zone contrôle, est sensibilisée par une immunoglobuline IgG anti-souris. Une réaction positive se traduit par l'apparition des deux bandes. En cas de réaction négative, seule la bande contrôle apparaît. Si seule la ligne test apparaît, le test est invalide.

Évaluation des tests

La qualité interne des quatre tests (spécificité [Sp], Se) a été déterminée sur des témoins négatifs et positifs en comparaison avec des épreuves de référence : la coproculture et la PCR (gene *ipaH* « *invasion plasmid antigen* », effecteur moléculaire de la virulence) lorsque celle-ci était possible (au Vietnam et au Chili). La Sp a été déterminée sur des prélèvements négatifs, des cultures d'autres bactéries entériques, notamment des espèces entéropathogènes. Les seuils de détection ont été déterminés sur des souches en cultures et

sur des selles reconstituées (10 g de selles moulées dans 1 ml de PBS en présence des espèces de shigelles cibles du diagnostic, à une concentration connue). La Se a été déterminée sur des prélèvements témoins positifs sur le terrain, et sur des cultures de shigelles de diverses origines géographiques. L'applicabilité de cette épreuve pour la santé publique et le diagnostic biologique a été déterminée par les valeurs prédictives (VPP : valeur prédictive positive et VPN : valeur prédictive négative). L'évaluation du test au laboratoire a été complétée par des études en conditions réelles d'utilisation par des agents de santé (en dispensaires par exemple). Se et Sp ont été estimées avec leur intervalle de confiance (IC) à 95 % et p inférieur à 0,05. Une fois validés au laboratoire et sur le terrain, les tests ont été protégés intellectuellement pour un éventuel transfert à l'industrie.

Le développement des TDR a impliqué la collaboration de nombreuses équipes à l'Institut Pasteur. L'unité de pathogénie microbienne moléculaire et l'unité de biologie cellulaire du parasitisme ont permis le choix des cibles moléculaires du diagnostic et ont préparé les souches recombinantes. L'unité de chimie des biomolécules a purifié les LPS. La plateforme 5 de production de protéines recombinantes et d'anticorps a construit les hybridomes, produit les AcM, construit les prototypes et fourni les TDR pour les évaluations. Le Centre national de référence des bactéries pathogènes entériques et le centre de ressources biologiques de l'Institut Pasteur ont fourni les souches. La biobanque ICAReB (Investigation clinique et accès aux ressources biologiques) a testé les TDR sur ses collections de selles. L'unité d'épidémiologie des maladies émergentes a supervisé certains protocoles d'évaluations. Dans le Réseau international des instituts Pasteur, l'institut Cantacuzène a purifié différents antigènes, les instituts de Madagascar, d'Hô Chi Minh-Ville, de Dakar et de Bangui ont réalisé des études sur le terrain et ont contribué à l'optimisation. En Inde, au Chili, en République démocratique du Congo (RDC), au Bangladesh, les bandelettes ont été éprouvées lors d'épidémies et dans des dispensaires par des agents de santé (infirmiers) chez des malades présentant un syndrome diarrhéique sévère.

Dans les études sur le terrain, tous les TDR ont été lus selon le temps optimal défini lors du prototypage, photographiés pour partager les données, analysés et archivés. Le SSA a réalisé une étude dont le but était de vérifier la valeur opérationnelle du concept de TDR et d'évaluer un possible usage par les militaires en infirmerie ou sur le terrain. Ce programme de recherche clinique a été réalisé à Djibouti auprès des forces françaises en infirmerie d'unité (13e DBLE), et au service d'urgence de l'hôpital Bouffard. Les épreuves de référence ont été réalisées au laboratoire de biologie médicale de l'hôpital Bouffard.

Toutes les études ont été approuvées par des comités d'éthique. Lors des évaluations, seuls les malades ayant des selles liquides, éventuellement avec présence de sang et de mucus, ont été éligibles.

Résultats et discussion

Évaluation sur souches et sur selles reconstituées

Sur les trois TDR spécifiques de sérotype et le TDR générique, aucune réaction faussement positive ou négative n'a été observée sur un panel de 370 souches composé des espèces bactériennes entéropathogènes les plus fréquentes (tous les sérotypes de *Shigella*, les principaux sérotypes de *Salmonella*, les *Vibrio cholerae* et autres vibrions pathogènes, Aeromonas, Plesiomonas, Campylobacter, les pathovars d'*E. coli* agents d'entérites, *Yersinia enterocolitica*, etc.), ainsi que des entérobactéries réputées commensales.

La Se analytique des trois TDR spécifiques de sérotype était de 4×10^6 UFC pour *S. sonnei* ; $4{,}9 \times 10^6$ UFC pour *S. dysenteriae* 1, et 5×10^7 UFC pour *S. flexneri* 2a. Ces seuils concordent avec les seuils en LPS (5, 15 et 20 ng de LPS/ml pour *S. sonnei*, *S. dysenteriae* 1 et *S. flexneri* 2a, respectivement). Ils sont relativement élevés, mais n'impactent pas la Se en raison du nombre important de *Shigella* par millilitre de selles diarrhéiques en phase aiguë de la maladie (on estime que les selles diarrhéiques contiennent de 10^6 à 10^8 *Shigella* par gramme).

Études cliniques

TDR S. flexneri 2a

Le TDR pour *S. flexneri* 2a a été étudié au Vietnam [10], puis au Chili [13]. Au Vietnam, la Se était de 91,5 %, la Sp de 99,2 %, la VPP de 79,6 %, la VPN de 97 % et la concordance de 92 %. Au Chili, la Se était de 83,3 %, la Sp de 100 %, la VPP de 100 %, la VPN de 99,7 % et la concordance de 99,7 % (Tableau 1).

Sur la base de ces deux premières évaluations, une étude a été entreprise par le SSA à Djibouti. Les essais étaient contrôlés par un épidémiologiste qui regroupait les fiches cliniques, les résultats des TDR et ceux du laboratoire. Une logistique a été mise en place pour garantir que la coproculture soit réalisée dans les meilleures conditions possibles. Le but pour le SSA était d'avoir une idée objective de la valeur opérationnelle du test : peut-il être utilisé en urgence par un infirmier dans un dispensaire à partir d'un simple pot à selles ? Peut-il être utilisé sur le terrain à partir d'une trousse avec un test et des gants, quel que soit le récipient contenant les selles ? Pour ce dernier point, des essais rétrospectifs immédiats ont été réalisés en extérieur (température externe de 44 °C) sur trois selles TDR *S. flexneri* 2a

Tableau 1 Évaluation au Chili et au Vietnam (Hô Chi Minh-Ville) du test de diagnostic rapide de *Shigella flexneri* 2a par rapport à la coproculture / *Detection of Shigella flexneri 2a in stool samples by the Rapid Diagnostic Shigella flexneri 2a test versus conventional culture in Chile and Vietnam.*

TDR *S. flexneri* 2a	**Coproculture**		
	Positive	**Négative**	**Total**
Positif	43 Vietnam 10 Chili	11 Vietnam 0 Chili	54 Vietnam 10 Chili
Négatif	4 Vietnam 2 Chili	133 Vietnam 734 Chili	137 Vietnam 736 Chili
Total	47 Vietnam 12 Chili	144 Vietnam 734 Chili	191 Vietnam 746 Chili

positives et trois selles TDR *S. flexneri* négatives, toutes contrôlées par coprocultures.

Cette évaluation a été mise en œuvre sur un nombre de selles limité, car il a été estimé qu'après une trentaine de tests concordants par site ou situation, l'étude était suffisamment démonstrative, comme l'indiquent les résultats (Tableau 2), et pouvait être arrêtée. Pour être statistiquement significative, c'est-à-dire à un IC de 95 % et un p inférieur à 0,05, il aurait fallu avoir au moins 100 selles positives pour *S. flexneri* 2a. Nonobstant, il a été observé, sur la base des résultats des trois sites de Djibouti, que les indicateurs étaient en faveur d'une bonne Sp et Se et corroboraient les résultats des deux autres études. Pour cette évaluation, la Se est de 100 %, la Sp de 98,7 %, la VPP de 91,6 %, la VPN de 100 % et la concordance de 98,9 %.

Tableau 2 Évaluation par le service de santé des armées à Djibouti du test de diagnostic rapide de *Shigella flexneri* 2a par rapport à la coproculture / *Detection of Shigella flexneri 2a in stool samples by the Rapid Diagnostic Shigella flexneri 2a Test versus conventional culture in Djibouti (a French Army study).*

TDR *S. flexneri* 2a		**Coproculture**	
Recrutement hôpital	Positive	Négative	Total
Positif	3	0	3
Négatif	0	18	18
Total	3	18	21
SMIA	Positive	Négative	Total
Positif	3	0	3
Négatif	0	44	44
Total	3	44	47
Infirmerie 13e DBLE	Positive	Négative	Total
Positif	5	1	6
Négatif	0	17	17
Total	5	18	23

SMIA = service médical interarmées, 13e DBLE = 13e demi-brigade de la Légion étrangère.

TDR S. dysenteriae 1

Le TDR *S. dysenteriae* 1 a été éprouvé dans le cadre d'une étude multicentrique sur 328 patients en Inde (PGIMER — Postgraduate Institute of Medical Education and Research), au Sénégal, en RDC (INRB — Institut national de recherche biomédicale), au Vietnam et en France (Paris, ICaReB) (Tableau 3). En amont de l'étude, lors de la phase d'optimisation, le retour d'expérience de l'Institut Pasteur de Dakar a permis d'ajuster le bon volume de selles (0,5 ml) à tester dans un tube à hémolyse en verre. En Inde, la région de Chandigarh a été choisie en raison d'un contexte épidémique de dysenteries récurrentes. En 2007, une première étude a été conduite sur des selles provenant de dispensaires autour de la ville de Chandigarh. Le retour d'expérience a permis de limiter le risque de faux-positif par des colorations dues aux composés colorés présents dans les selles (la stercobiline par exemple).

Tableau 3 Évaluation du test de diagnostic rapide de *Shigella dysenteriae* 1 par rapport à la coproculture en Inde, au Sénégal, en République démocratique du Congo, au Vietnam et en France / *Detection of Shigella dysenteriae 1 in stool samples by the Rapid Diagnostic Shigella dysenteriae 1 Test versus conventional culture in India, in Senegal, in Congo Democratic Republic, Vietnam and France.*

TDR *S. dysenteriae* 1	**Coproculture**		
	Positive	**Négative**	**Total**
Positif	11	4	15
Négatif	1	74 (Inde 2007) 43 (Inde 2009) 75 (Sénégal) 48 (RDC) 48 (Vietnam) 24 (France)	312
Total	12	316	328

RDC = République démocratique du Congo.

Aucune dysenterie à *S. dysenteriae* 1 n'ayant été détectée, une veille microbiologique a été mise en place pour entreprendre une seconde étude pendant la période intersaisonnière connue pour son pic d'incidence de la maladie. En 2009, une épidémie de deux mois de diarrhées avec plusieurs cas de diarrhées sanglantes a eu lieu. Plusieurs bactéries étaient présentes (Salmonella, ETEC, *Vibrio cholerae*, etc.) et les TDR ont identifié des *S. dysenteriae* 1 en fin d'épidémie, confirmées par coprocultures. L'étude multicentrique a confirmé essentiellement la Sp du test : Se 91,7 %, Sp 98,7 %, VPP 73,3 %, VPN 99,7 % et concordance 98,4 %.

En RDC, à Bunia, avec l'INRB soutenu par l'OMS et la mission belge MEMISA (Medische Missie Samenwerking, Coopération médicale missionnaire) au cours d'une épidémie de diarrhées aqueuses sévères, des trousses complètes ont été envoyées au dispensaire local. Un infirmier non formé à la technique des bandelettes a réalisé les tests seul après une formation par téléphone. Il a noté les résultats et a envoyé ses observations, les TDR et les échantillons de selles en milieu de conservation, à l'INRB (Kinshasa). Tous les tests ont été lus négatifs, et il a été vérifié qu'aucune *S. dysenteriae* 1 n'était en cause.

TDR S. sonnei

Le TDR *S. sonnei* a été évalué au Chili, au Vietnam et en France (Tableau 4). Sur les selles, ce TDR a bénéficié de l'expérience acquise sur les tests précédents, et les résultats indiquent une Se et une Sp satisfaisantes. Sur les 219 selles, la Se est de 100 %, la Sp est de 96 %, la VPP est de 72,4 %, la VPN est de 100 % et la concordance est de 96,3 %.

Au Chili, la démonstration a été faite que les TDR pouvaient être mis en œuvre à partir d'écouvillonnages rectaux. Le retour d'expérience chilienne a permis de préciser le temps de relargage des écouvillons (cinq minutes avec mouvement rotatoire et pression sur les parois du tube en verre) dans l'eau distillée et le volume à utiliser (0,7 ml). La Se (100 %) et la Sp (95,3 %) ont été déterminées sur 342 écouvillons rectaux ; la VPP est de 77 %, la VPN de 100 % et la concordance de 95,5 %.

Il est probable qu'avec l'écouvillonnage rectal, méthode répandue dans les pays anglo-saxons et en Amérique du Sud, la Se soit accrue en raison d'un recueil efficace des micro-organismes invasifs présents dans les cellules épithéliales rectales infectées et libérées lors du choc osmotique en eau distillée. En cas de dysenterie, ce point est particulièrement important, car il est fréquent que les malades aient des difficultés à déféquer. L'écouvillonnage permet aussi la réalisation du test sur les selles contenues dans des couches d'enfants. Il simplifie également le transport préanalytique (un simple écouvillon en milieu de transport au lieu d'un pot contenant des selles diarrhéiques) et évite les contaminations liées à la manutention.

Tableau 4 Évaluation du test de diagnostic rapide de *Shigella sonnei* par rapport à la coproculture au Chili, Vietnam, Inde et France / *Detection of Shigella sonnei in stool samples by the Rapid Diagnostic Shigella sonnei Test versus conventional culture in Chile, Vietnam, India and France.*

TDR *S. sonnei*	**Coproculture**		
	Positive	**Négative**	**Total**
Positif	8 (Chili) 6 (Vietnam) 7 (Inde)	3 (Chili) 3 (Vietnam) 2 (Inde)	29
Négatif	0	40 (Chili) 51 (Vietnam) 51 (France) 48 (Inde)	190
Total	21	198	219

TDR Shigella spp.

C'est au Chili qu'ont été éprouvées les TDR génériques pour détecter les *Shigella* virulentes, lors des évaluations des TDR *S. sonnei* et *S. flexneri* 2a. La mise au point de ce TDR au laboratoire a été rendue difficile en comparaison avec les tests ciblant le LPS, car le niveau de production d'IcsA sur des souches conservées depuis longtemps est très faible. L'optimisation à la paillasse n'a pu être faite que sur un nombre très réduit de souches fraîchement isolées. L'étude clinique a en effet démontré que le test doit être réalisé dans les 5 minutes qui suivent la défécation pour être optimal. En respectant cette consigne, ce test a démontré son intérêt clinique en urgence pédiatrique sur des selles d'enfants diarrhéiques. Les résultats préliminaires sur 51 selles sont très encourageants (Tableau 5).

Il a été observé une bonne Sp sur 38 selles négatives (avec les trois tests *Shigella* spp., *S. sonnei* et *S. flexneri* 2a), une bonne Se avec 5 selles à la fois positives en coprocultures et avec les TDR génériques. Sur les tests discordants, alors que le TDR *S. sonnei* était positif, la PCR n'a pas pu être faite.

Selon les retours d'expériences de toutes les équipes, les règles de bon usage de ces TDR les plus importantes sont :

- d'observer la présence de la ligne contrôle assurant que le flux immunochromatographique a été suffisant pour permettre la révélation de la ligne test ;
- de respecter le volume de selles préconisé et d'utiliser un tube en verre pour la réaction ;
- de presser l'écouvillon dans l'eau distillée contenue dans le tube en verre après au moins trois minutes d'immersion ;
- de respecter impérativement le temps de lecture qui peut varier selon les tests (le risque de faux-positif provient

Tableau 5 Résultats préliminaires obtenus avec le test de diagnostic rapide générique de *Shigella* spp. au Chili / *Preliminary results obtained with the Rapid Diagnostic Shigella spp. Test compared with stool culture technique in Chile.*

Coproculture	TDR *Shigella* spp.	Total	Observations
Positive (+)	Positif (+)	5	5 TDR Ss positifs (+)
Négative (–)	Négatif (–)	38	38 TDR Ss et Sf2a négatifs (–)
Positive (+)	Négatif (–)	3	3 TDR Ss positifs (+)
Négative (–)	Positif (+)	5	5 TDR Ss positifs (+)
		51	

Ss = *Shigella sonnei* ; Sf2a = *Shigella flexneri* 2a.

d'une lecture au-delà du temps optimal, une ligne rouge est toujours interprétée positive dans les limites imposées par le test, et le risque de faux-négatif provient surtout du non-respect du temps de lecture avec interprétation abusive dès que la ligne contrôle apparaît alors qu'il faut attendre le temps préconisé pour observer la ligne test) ;

- de respecter le temps maximum autorisé entre la défécation et le test pour limiter le risque de faux-négatif par protéolyse des cibles protéiques ;
- d'utiliser le test immédiatement après avoir ouvert le sachet protecteur.

Conclusion

Les TDR expérimentaux des shigelloses à *S. flexneri* 2a, *S. sonnei* et *S. dysenteriae* 1 sont opérationnels sur des selles et sur des écouvillonnages rectaux. L'évaluation du TDR générique des *Shigella* virulentes donne des résultats très encourageants. Les études permettent d'observer que les TDR expérimentaux sont utilisables au chevet du malade, en service d'urgence, au cabinet médical, en dispensaire, sur le terrain en contexte épidémique et en conditions de températures extrêmes ou lors de missions de veille microbiologique pour détecter les cas princeps (alerte préépidémique) et pour des enquêtes épidémiologiques à large échelle. Par ailleurs, elles montrent qu'ils peuvent être facilement acheminés ou transportés, qu'ils sont stables à température ambiante (ils peuvent être prépositionnés dans des zones à risque), mais qu'ils doivent être protégés de l'humidité, qu'ils peuvent être utilisés par du personnel non spécialisé, et qu'ils sont fiables si les consignes de mise en œuvre sont respectées. Ils ne peuvent probablement pas être utilisés pour détecter des porteurs asymptomatiques, sauf si leur seuil de détection des pathogènes est amélioré. Leur objectif n'est pas de remplacer les méthodes de bactériologie conventionnelles qui resteront indispensables, notamment pour évaluer l'antibiorésistance et pour caractériser les souches. Mais ils trouvent leur place en première ligne, dans les pays où les moyens de laboratoire sont limités et parce qu'un retard de diagnostic est la principale cause de décès et de propagation d'une épidémie.

Le SSA retient les capacités d'utilisation en contexte opérationnel attendues par les militaires en opérations extérieures, mais cette preuve de concept doit être encore consolidée. Les nombreux retours d'expérience du terrain ont permis de définir des conditions optimales pour chacun de ces TDR. Cette expérience montre l'importance d'une validation en conditions réelles, non limitée à des épreuves sur des souches de collections qui perdent leurs caractéristiques lors des repiquages successifs ou sur des prélèvements reconstitués avec ces souches.

L'ONG PATH, dont la mission est d'évaluer des solutions médicales adaptées aux PED, a évalué ces TDR. Leur conclusion confirme le caractère opérationnel d'un outil qui doit être standardisé pour être industrialisé et accessible au plus grand nombre.

Remerciements Les auteurs remercient A. Phalipon, C. Parsot, P. Sansonetti (unité pathogénie microbienne moléculaire) ; N. Guillen, M. Seigneur (unité biologie cellulaire du parasitisme) ; E. Fournié Amazouz, F. Nato, S. Dartevelle (Plateforme 5 de Production de protéines recombinantes et d'anticorps) ; M.N. Ungeheuer, C. Ottone (ICaReB) ; A. Fontanet, M. Vray (unité d'épidémiologie des maladies émergentes) ; F.X. Weill et le personnel du CNR Shigelles, Salmonelles, *Escherichia coli* ; C. Bizet et l'équipe du centre de ressources biologiques de l'Institut Pasteur ; N. Bucurenci (institut Cantacuzène) ; P. Combe, L. Rahalison (institut Pasteur de Madagascar) ; N. Thi Phuong Lan (institut Pasteur d'Hô Chi Minh-Ville) ; R. Bercion (institut Pasteur de Bangui) ; B. Garin (institut Pasteur de Dakar) ; J.J. Koyengue, J.C. Shako (INRB Kinshasa/dispensaires de Bunia en RDC) ; N. Taneeja (PGIMER en Inde) ; B. Nair (ICDDRB au Bengladesh) ; V. Prado, C. Ducan (université de Santiago, Chili) ; médecin chef (MC) C. Decam (DIASS-Djibouti) ; MC D. Delasseau (5e RIAOM) ; MC L. Journaux (13e DBLE).

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

1. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, et al (2004) Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. Fam Pract 21:4–10
2. d'Hauteville H, Dufourcq Lagelouse R, Nato F, Sansonetti PJ (1996) Lack of cleavage of IcsA in *Shigella flexneri* causes aberrant movement and allows demonstration of a cross-reactive eukaryotic protein. Infect Immun 64:511–7
3. d'Hauteville H, Sansonetti PJ (1992) Phosphorylation of IcsA by cAMP-dependent protein kinase and its effect on intracellular spread of *Shigella flexneri*. Mol Microbiol 6:833–41
4. Duran C, Nato F, Dartevelle S, et al (2013) Rapid diagnosis of diarrhea caused by *Shigella sonnei* using dipsticks; comparison of rectal swabs, direct stool and stool culture. PLoS ONE 8: e80267
5. Egile C, d'Hauteville H, Parsot C, Sansonetti PJ (1997) SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*. Mol Microbiol 23:1063–73
6. Frankel G, Riley L, Giron JA, et al (1990) Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. J Infect Dis 161:1252–6
7. Grimont F, Grimont PA (2003) Les shigelloses en France : données du Centre national de référence des *Escherichia coli* et *Shigella*. CNR *Escherichia coli* Shigella, 7 p
8. Kocks C, Marchand JB, Gouin E, et al (1995) The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. Mol Microbiol 18:413–23
9. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, et al (1999) Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ 77:651–66
10. Nato F, Phalipon A, Nguyen LPT, et al (2007) Dipstick for rapid diagnosis of *Shigella flexneri* 2a in Stool. PLoS ONE 2:e361
11. OMS (2016) Charge mondiale de morbidité. In: WHO. http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease/fr/. Accessed 29 Dec 2015
12. Parsot C (2005) *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. FEMS Microbiol Lett 252:11–8
13. Prado V, Nato F, Duran C, et al (2009) Use of dipsticks for rapid diagnosis of children with acute diarrhea caused by *Shigella flexneri* 2a from rectal swabs. In: FEMS: 3rd Congress of European microbiologists, Göteborg, Suède
14. Sethabutr O, Echeverria P, Hoge CW, et al (1994) Detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by PCR in the stools of patients with dysentery in Thailand. J Diarrhoeal Dis Res 12:265–9
15. Taneja N, Nato F, Dartevelle S, et al (2011) Dipstick test for rapid diagnosis of *Shigella dysenteriae* 1 in bacterial cultures and its potential use on stool samples. PloS One 6:e24830
16. Vu DT, Sethabutr O, Von Seidlein L, et al (2004) Detection of Shigella by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of Shigellosis in Nha Trang, Vietnam. J Clin Microbiol 42:2031–5
17. Walker CLF, Rudan I, Liu L, et al (2013) Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. Lancet 381:1405–16
18. Westphal O, Jann K (1965) Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: Whistler RL Wolfan ML (eds) Methods carbohydr chem, N Y Acad Press, pp 83–91

Annexe 3 : Synthèse des travaux personnels

Brevet

Brevet FR 1905115. Procédé de détection de pneumocoque. Déposé le 16 mai 2019. Expertise en cours.

Publications

Validation of a new Rapid Detection Test for the detection of *Neisseria meningitidis* A/C/W/X/Y antigens in cerebrospinal fluid. Haddar CH, Terrade A, Verhoeven P, Njanpop-Lafourcade BM, Dosso M, Sidikou F, Mahamamne AE, Lombart JP, Razki A, Hong E, Agnememel A, Begaud E, Germani Y, Pozzetto B, Taha MK. J Clin Microbiol, in press.

Strategy using a new antigenic test for rapid diagnosis of Streptococcus pneumoniae infection in respiratory samples from children consulting at hospital. Haddar CH, Joly J, Carricajo A, Verhoeven PO, Grattard F, Mory O, Begaud E, Germani Y, Cantais A, Pozzetto B. Soumis à BMC microbiology.

Interplay of nasal and rectal carriage of *Staphylococcus aureus* in intensive care unit patients. Gagnaire J, Botelho-Nevers E, Martin-Simoes P, Morel J, Zéni F, Maillard N, Mariat C, **Haddar CH**, Carricajo A, Fonsale N, Grattard F, Pozzetto B, Laurent F, Berthelot P, Verhoeven PO. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019;38:1811-19.

Comparison of the fully automated FilmArray BCID Assay to a 4-hour culture test coupled to mass spectrometry for day 0 identification of microorganisms in positive blood cultures. Verhoeven PO, **Haddar CH**, Rigaill J, Fonsale N, Carricajo A, Grattard F, Pozzetto B. Biomed Res Int. 2018;2018:7013470.

Tests de diagnostic rapide des shigelloses. Haddar C, Begaud E, Maslin J, Germani Y. Bull Soc Pathol Exot. 2017;110:1-8.

Effect of a lotion containing the heat-treated probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 on *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis. Blanchet-Réthoré S, Bourdès V, Mercenier A, **Haddar CH**, Verhoeven PO, Andres P. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2017;10:249-57.

Identifying hemodialysis patients with the highest risk of *Staphylococcus aureus* endogenous infection through a simple nasal sampling algorithm. Verhoeven PO, Gagnaire J, **Haddar CH**, Grattard F, Thibaudin D, Afiani A, Cazorla C, Carricajo A, Mariat C, Alamartine E, Lucht F, Garraud O, Pozzetto B, Botelho-Nevers E, Berthelot P. Medicine (Baltimore). 2016;95:e3231.

Molecular dynamics of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Hajj pilgrims. Verhoeven PO, Gautret P, **Haddar CH**, Benkouiten S, Gagnaire J, Belhouchat K, Grattard F, Charrel R, Pozzetto B, Drali T, Lucht F, Brouqui P, Memish ZA, Berthelot P, Botelho-Nevers E. Clin Microbiol Infect. 2015;21:650.e5-8.

Does pharyngeal sampling improve the detection of nasopharyngeal persistent carriers of *Staphylococcus aureus*? Verhoeven PO, **Haddar CH**, Grattard F, Carricajo A, Botelho-Nevers E, Pozzetto B, Berthelot P. J Infect. 2015;70:549-52.

Posters

P2212 - **Stratégie de diagnostic des infections respiratoires à *Streptococcus pneumoniae* chez l'enfant à l'aide d'un test immunochromatographique dans les prélèvements respiratoires.** J Joly, **C Haddar**, A Carricajo, PO Verhoeven, F Grattard, . Mory, E Begaud, Y Germani, A Cantais, B Pozzetto. 30 Septembre-2 Octobre 2019 - 15ème Congrès national de la Société Française de Microbiologie - "Microbes"– Paris, France.

Sensitive rapid detection and typing of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid using an innovative rapid diagnostic test. **C Haddar**, A Terrade, P Verhoeven, E Begaud, F Grattard, Y Germani, M. Taha, B Pozzetto. 14 Juin 2018 – Journée de la recherche EDSIS 488 - Saint-Etienne, France.

P0996 - **Sensitive rapid detection and typing of *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid (CSF) using an innovative rapid diagnostic test (RDT).** **C Haddar**, A Terrade, P Verhoeven, E Begaud, S Hamon, M Rakoto andrianarivelo, F Grattard, G Paranhos-Baccalà, C Bizet, B Pozzetto, Y Germani, M. Taha. 22 April 2018 - ECCMID 2018 - Madrid, Spain.

Tests Rapides d'Orientation du Diagnostic (TROD) d'infections à fortes prévalences en zone tropicale : TROD des méningites, du choléra, des colites hémorragiques et des dysenteries, de la typhoïde, de la filariose, et du paludisme. **C Haddar**, E Bégaud, M Yun Yuh, EL Law, Y Germani. 8-10 Novembre 2017 - 10ème Congrès international de la Société de pathologie exotique - Université de Médecine et de Pharmacie de Haïphong, Vietnam.

P0849 - **Day 0 identification of microorganisms in positive blood cultures by using the fully automated FilmArray BCID assay.** PO Verhoeven, **C Haddar**, N Fonsale, A Carricajo, F Grattard, B Pozzetto. April 23rd 2017 - ECCMID 2017 - Vienna, Austria.

P33 - **Five minutes to diagnose meningitis caused by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae* on the field and at the bedside**. **C Haddar**, A Terrade , E Bégaud, S Hamon, MK Taha, M Rakoto Andrianarivelo, G Paranhos-Baccala, C Bizet, Y Germani. November 29th to December 2nd 2016 - Institut Pasteur International Network Scientific Symposium 2016 – Paris, France.

P285 - **Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* (SA) strains colonizing the nose and the lesional skin of atopic dermatitis (AD) patients.** S Rethore,V Bourdes, A Lamquin, **CH Haddar**, P Andres, PO Verhoeven. May 13th 2016 SID Annual Meeting - Scottsdale, Arizona, USA.

P283 - **Effect of a cosmetic product containing non-replicating microorganisms (LA1) on Staphylococcus aureus (SA) colonization in atopic dermatitis (AD).** S Rethore, V Bourdes, A Lamquin, **CH Haddar**, PO Verhoeven, P Andres. May 13th 2016 SID Annual Meeting - Scottsdale, Arizona, USA.

P1055 - **Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains isolated from newborns and healthcare workers during an outbreak in a neonatal intensive care unit: effectiveness of control measures.** J Gagnaire, F Grattard, **C Haddar**, R Stéphanie, M Sophie, F Jaziri, C Fichtner, I Rayet, B Pozzetto, E Botelho-Nevers, H Patural, P Berthelot, P Verhoeven. April 11th 2016 - ECCMID 2016 - Amsterdam, The Netherlands.

P292 - **Prospective evaluation of the BD MAX™ StaphSR assay for the detection of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* from nasal ESwab™.** PO Verhoeven, A Epercieux, **CH Haddar,** A Carricajo, S Pillet, P Berthelot, B Pozzetto, F Grattard. May 10th 2014 - ECCMID 2014 - Barcelona, Spain.

P0190 - **Prospective study of the *Staphylococcus aureus* nasal and rectal colonisation in intensive care unit patients: prevalence, bacterial load and genotyping of isolates.** PO Verhoeven, J Gagnaire, **CH Haddar**, E Botelho-Nevers, C Auboyer, M Darmon, C Mariat, F Grattard, B Pozzetto, P Berthelot. May 10th 2014 - ECCMID 2014 - Barcelona, Spain.