Apport d'un nouveau test de PCR Multiplex pour la détection des virus respiratoires

40ème Colloque National des Biologistes des Hôpitaux
26-30 Septembre 2011 Angers

C. Bischoff, S. Fafi-Kremer, F. Stoll-Keller
CHU de Strasbourg

Infections respiratoires virales

- **Maladies infectieuses les plus fréquentes chez l'homme**
- **Plus fréquentes chez les enfants que chez les adultes**
  - **<1 an : 6 par an**
  - **1–5 ans : 3–6 par an**
  - **15–19 ans : 2 par an**
- **Sévérité variable**
- **Responsables d'un grand nombre de consultations et d'arrêts de travail ou d'absentéisme scolaire**
- **Cause importante de prescription d'antibiotiques inutile**

Anciens et nouveaux virus respiratoires

Adenoviridae :
- **Adénovirus 1,2,5,6,3,4,7,21**

***Picornaviridae* :**
- **Rhinovirus**
- **Entérovirus**

***Paramyxoviridae* :**
- **Parinfluenza 1-4**
- **Virus respiratoire syncitial**

***Coronaviridae* :**
- **OC43**
- **229E**

***Orthomyxoviridae* :**
- **Grippe A (H1, H3)**
- **Grippe B**

***Paramyxoviridae* :**
- **Metapneumovirus MPV(2001)**

Coronaviridae :
- **SRAS (2002)**
- **Co-NL63**
- **Co-HKU1 (2004)**

***Parvoviridae* :**
- **Bocavirus (2005)**

***Orthomyxoviridae* :**
- **Grippe A H1N1v 2009**

Clinique

Même si certaines associations sont plus fréquentes :

- **Rhinite – rhinovirus, coronavirus**
- **Pharyngite – adenovirus, coxsackie and enterovirus (herpangina)**
- **Croup, laryngite – parainfluenza viruses, coronavirus NL63**
- **Tracheite/bronchite – influenza viruses**
- **Bronchiolite – RSV, metapneumovirus**
- **Pneumonie – adenovirus, influenza viruses, RSV, metapneumovirus, parainfluenza viruses, SARS coronavirus**

…. les signes cliniques produits par les virus respiratoires ne sont pas spécifiques

Mesures Prophylactiques /Thérapeutiques

Prophylaxie

- **Grippe : inhibiteurs de neuraminidase, adamantanes (grippe A uniquement), vaccins inactivés (USA et Europe) et vivant-atténués (USA)**
- **RSV : Palivizumab**

Traitement

- **Grippe : inhibiteurs de Neuraminidase, adamantanes (grippe A uniquement)**
- **RSV : Ribavirine ± anticorps (IgIV, RSV Ig, or Palivizumab), bronchiolites chez immunodéprimés, administré par aérosol**
- **Adenovirus : Cidofovir (en cours d'étude, patients immunodéprimés)**

Chan-Tack KM, et al. *N Engl J Med*. 2009, Oct 22;361(17):1713-4.

Les défis du Diagnostic

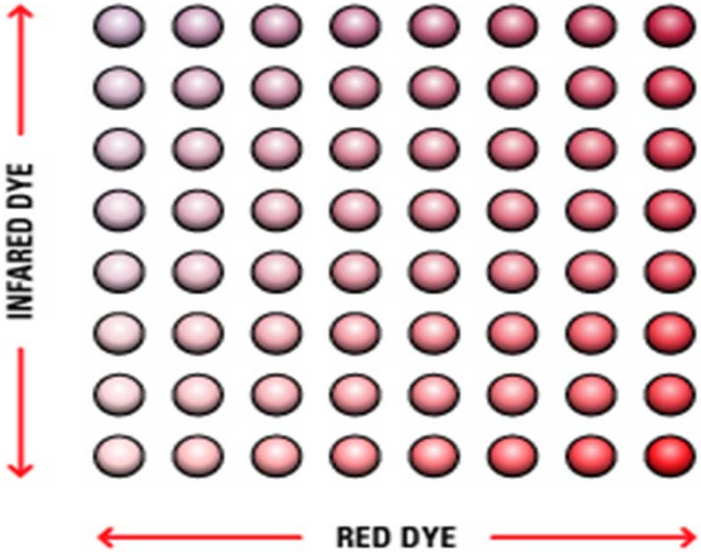
Les virus respiratoires étant tous responsables des mêmes syndromes cliniques (rhinorhée à pneumonie) : diagnostic étiologique impossible par la clinique.

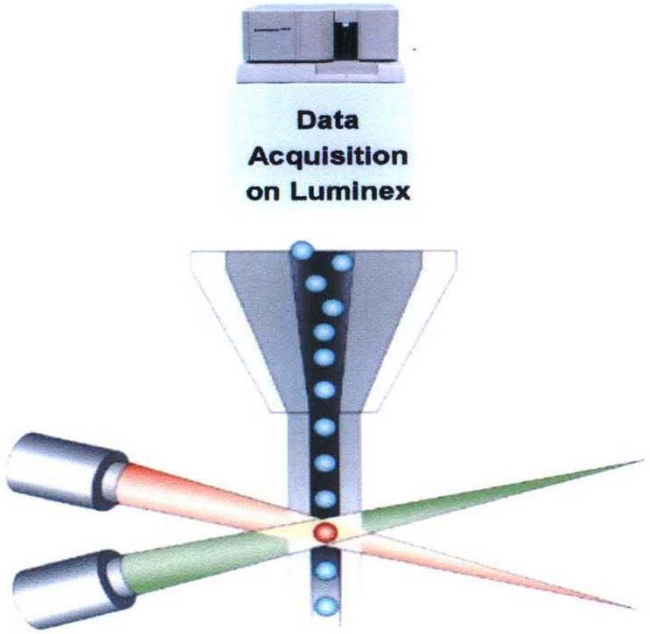
Pour améliorer la prise en charge des patients, le diagnostic doit être réalisé avec des tests virologiques moléculaires:

- **couvrant tous les virus**
- **rapides**
- **sensibles**

RT-PCR multiplex pour la détection des virus respiratoires : Le test xTAG RVP FAST

Utilise des sets de 100 microbilles, contenant 2 fluorophores dans des rapports différents, identifiées par un laser rouge dans l'appareil Luminex xMAP 100/200 systems





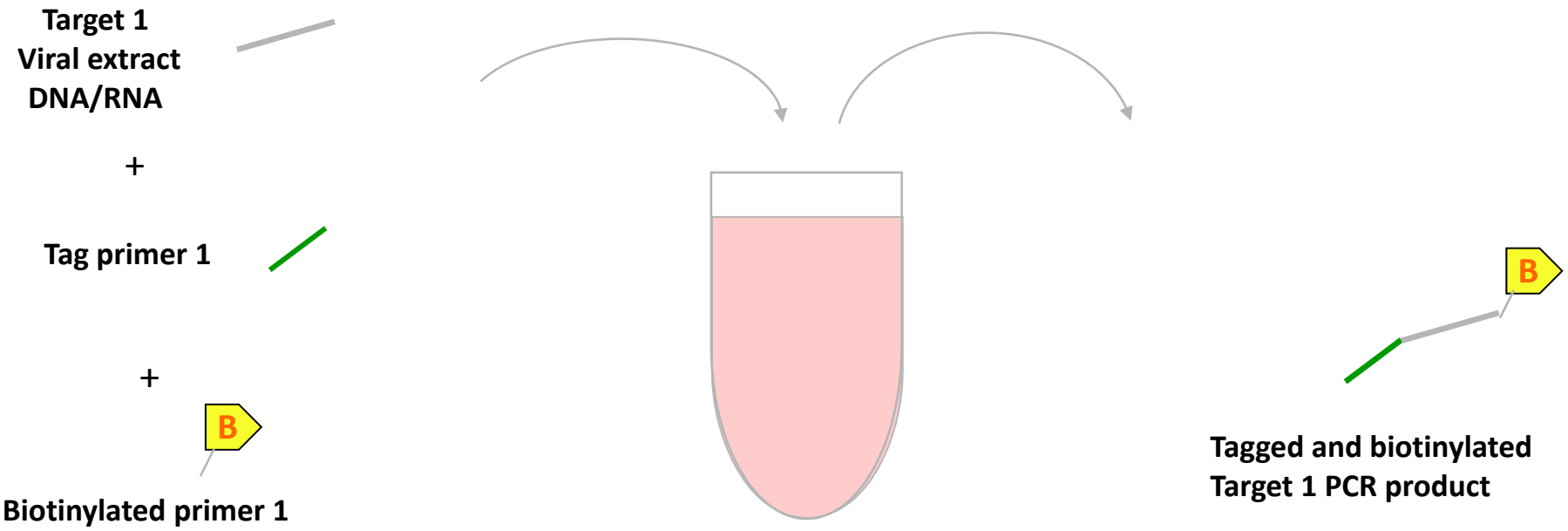
Cibles virales détectées par la technique xTAG RVP FAST

18 types/sous-types

:

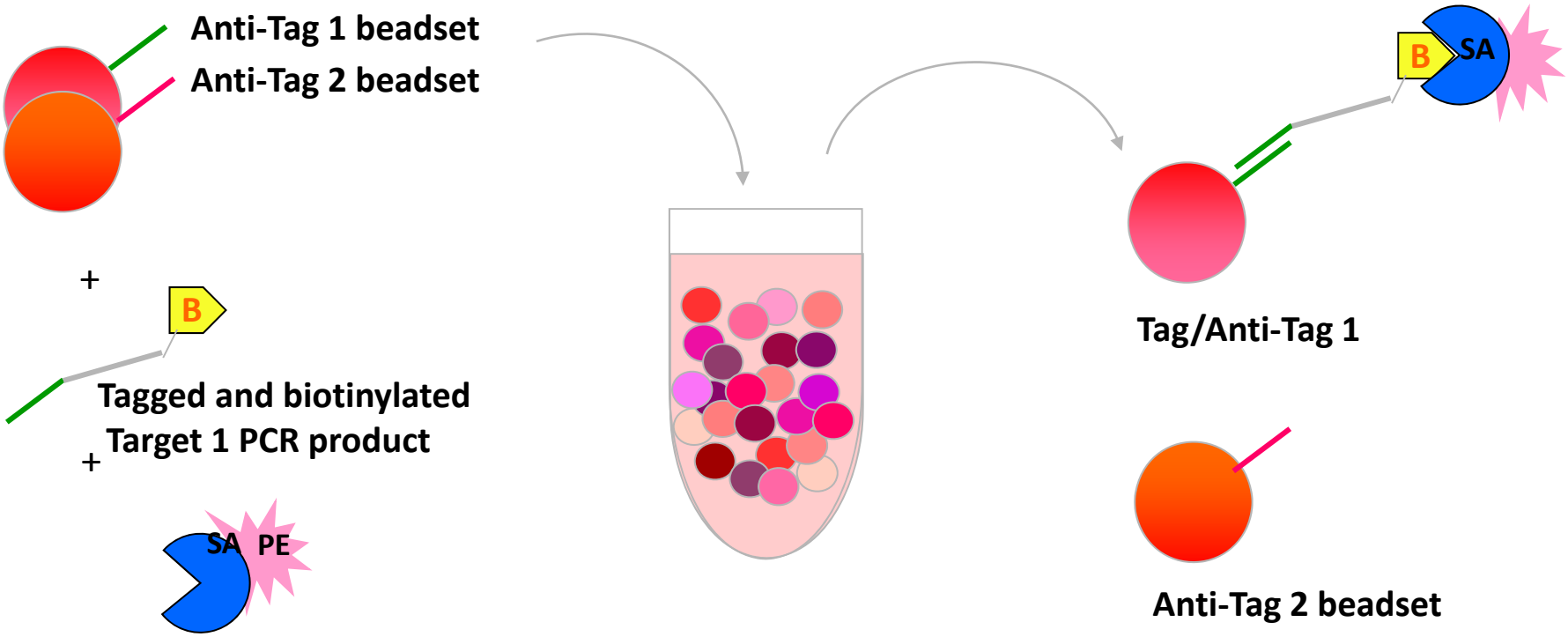
Type Virus	Sous-type
Influenza A (M)	H1
	H3
Influenza B	
Respiratory Syncytial Virus	
Coronavirus	229E
	OC43
	NL63
	HKU1
Parainfluenza Virus	Parainfluenza 1
	Parainfluenza 2
	Parainfluenza 3
	Parainfluenza 4
Human Metapneumovirus	
Entéro-rhinovirus	
Adénovirus	
Human Bocavirus	
Contrôle Interne MS-2 Bacteriophage	
ContrôlePositif Lambdaphage	

xTAG RVP FAST
étape I – RT-PCR multiplex simple



Pour chaque échantillon , 10 µL d‘ extrait viral (RNA ou DNA) est amplifié par une **RT-PCR multiplex simple**. Pour chaque cible, une des amorces comprend une séquence signal spécifique „Tag „ et l‘autre amorce est biotinylée. Chaque type (ou sous-type) de l‘échantillon produit des amplicons marqués.

xTAG RVP FAST
étape II – hybridation/détection



Un aliquot de 2 µL du produit de RT-PCR (tagé et biotinylé) est ajouté au mélange réactionnel d'**hybridation/détection** contenant les billes portant une séquence anti-tag et le conjugué Streptavidin/Phycoerythrin. Chaque population de billes détecte son amplicon spécifique par une hybridation tag/anti-tag.

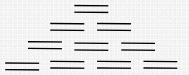
L'appareil Luminex détecte ensuite les réactions d'hybridation en mesurant l'intensité moyenne de fluorsecence (median fluorescence intensity ou MFI)qui est générée par chaque population de billes. Ces valeurs de fluorescence sont analysées pour établir la présence ou l'absence des cibles virales dans chaque échantillon.

Etapes de la technique xTAG RVP FAST

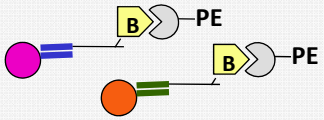
3,5 h extraction comprise

1h< temps technicien

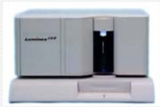
I. **Multiplex RT-PCR (amorces séquence signal)**



II. **Hybridation & Détection**



Analyse MFI (Intensité de Fluorescence Moyenne) de chaque population de billes : résultat qualitatif



Performances du test xTAG™ RVP

<u>Comparaison version Fast avec RT-PCR tr « maison » (286 frottis NP)</u>

Sensibilité moyenne (tous virus confondus) de 78.8% et spécificité de 99,6%

Mais :

étude sur petit nombre d'échantillons positifs (Grippe, Para3, Bocavirus) et

résultats discordants lorsque charges virales sont faibles (valeurs de ct>35)

Gadsby NJ et al.,J. Clin. Microbiol.,2010

Performances du test xTAG™ RVP Fast

Performance of the RVP assay for respiratory virus identification relative to those of routine multiplex and single real-time PCR assays

Virus[a]	No. of specimens with the following result:				Performance of the RVP Fast assay with real-time PCR as the gold standard	
	PCR$^+$ RVP$^+$	PCR$^+$ RVP$^-$	PCR$^-$ RVP$^+$	PCR$^-$ RVP$^-$	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Influenza A virus*	11	5	0	270	68.8	100.0
Influenza B virus*	4	0	0	282	100.0	100.0
RSV*	36	2	2	246	94.7	99.2
PIV-1*	0	0	0	286	100.0	100.0
PIV-2*	0	0	0	286	100.0	100.0
PIV-3*	1	2	0	283	33.3	100.0
PIV-4	1	0	0	285	100.0	100.0
Adenovirus*	13	8	0	265	61.9	100.0
Coronavirus 229E	0	0	0	286	100.0	100.0
Coronavirus NL63	2	0	0	284	100.0	100.0
Coronavirus OC43	7	0	2	277	100.0	99.3
Coronavirus HKU1	1	0	0	285	100.0	100.0
RhV/EV	60	7	12	207	89.6	94.5
hBoV	12	17	0	257	41.4	100.0
hMPV	8	1	0	277	88.9	100.0

[a]hBoV, human bocavirus; hMPV, human metapneumovirus. Viruses marked with asterisks were tested by multiplex real-time PCR assays; the rest were tested by single real-time PCR assays.

Gadsby et al., J. Clin. Microbiol., 2010

Diagnostic des infections respiratoires au CHU de Strasbourg

➢ **1500 échantillons respiratoires/an**

frottis nasopahryngés, lavages broncho alvéolaires

- *Avant 2007 : Culture cellulaire, tests IE directs*
  - VRS, grippe, parainfluenza, adénovirus

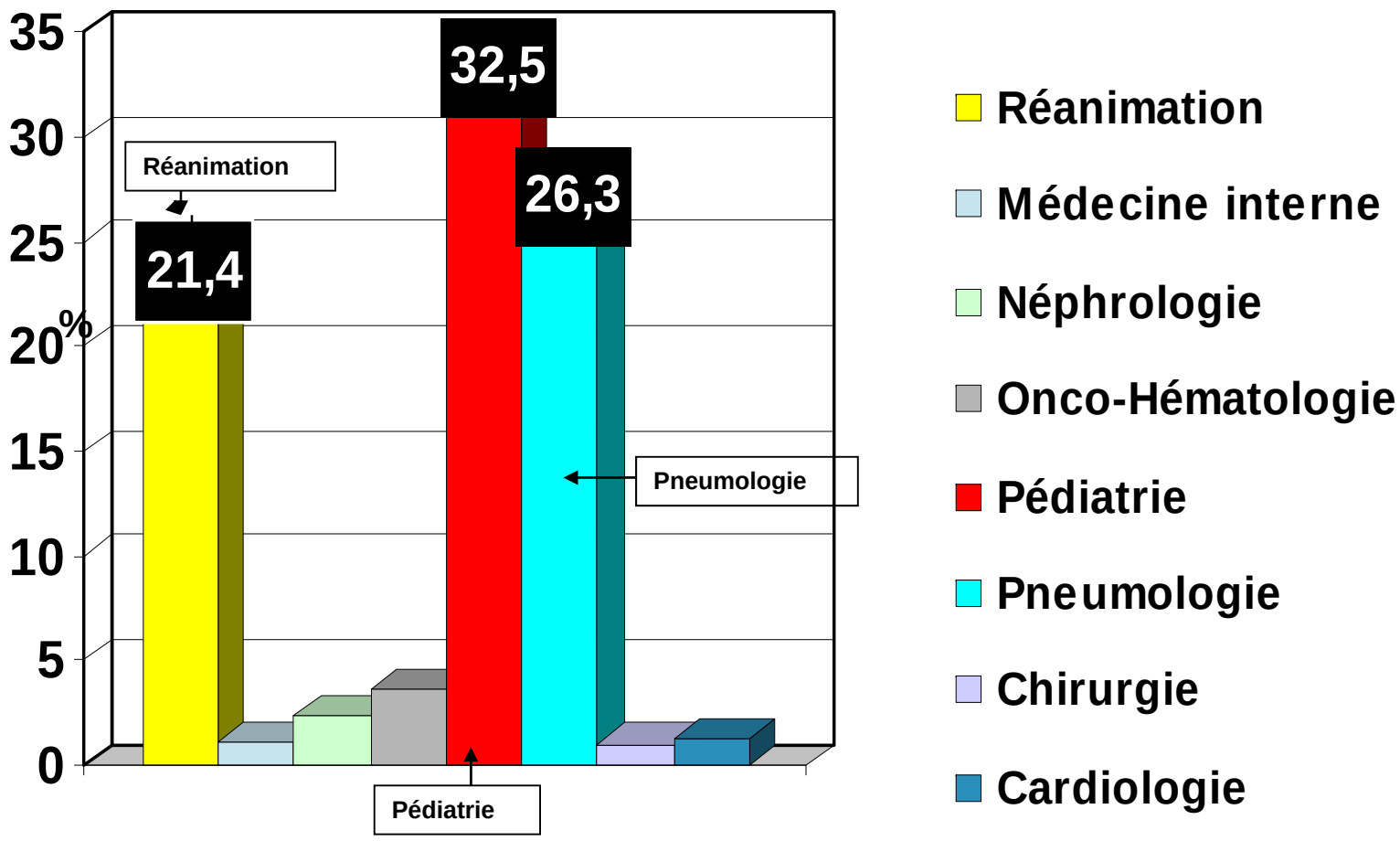
- *Octobre 2007 – juin 2010 : PCR Multiplex*

  xTAG® Respiratory Virus Panel (RVP)
  - apporter un résultat couvrant la majorité des virus respiratoires sur un prélèvement
  - remplacer la culture et tests IE par un test unique

- *Depuis Juin 2010 :*

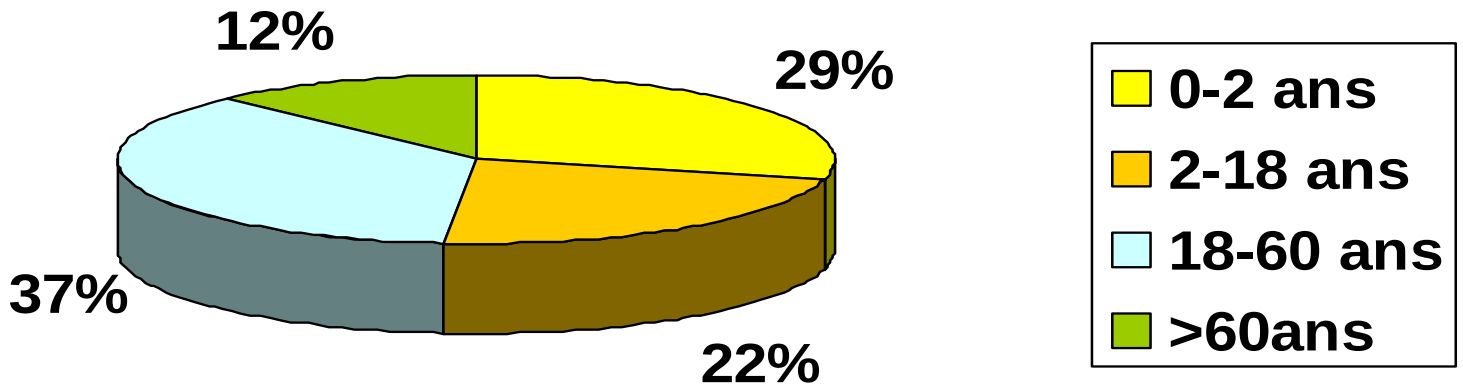
  xTAG® Respiratory Virus Panel Fast

Distribution des services (%)



Janvier à décembre 2009 (1000 HO)

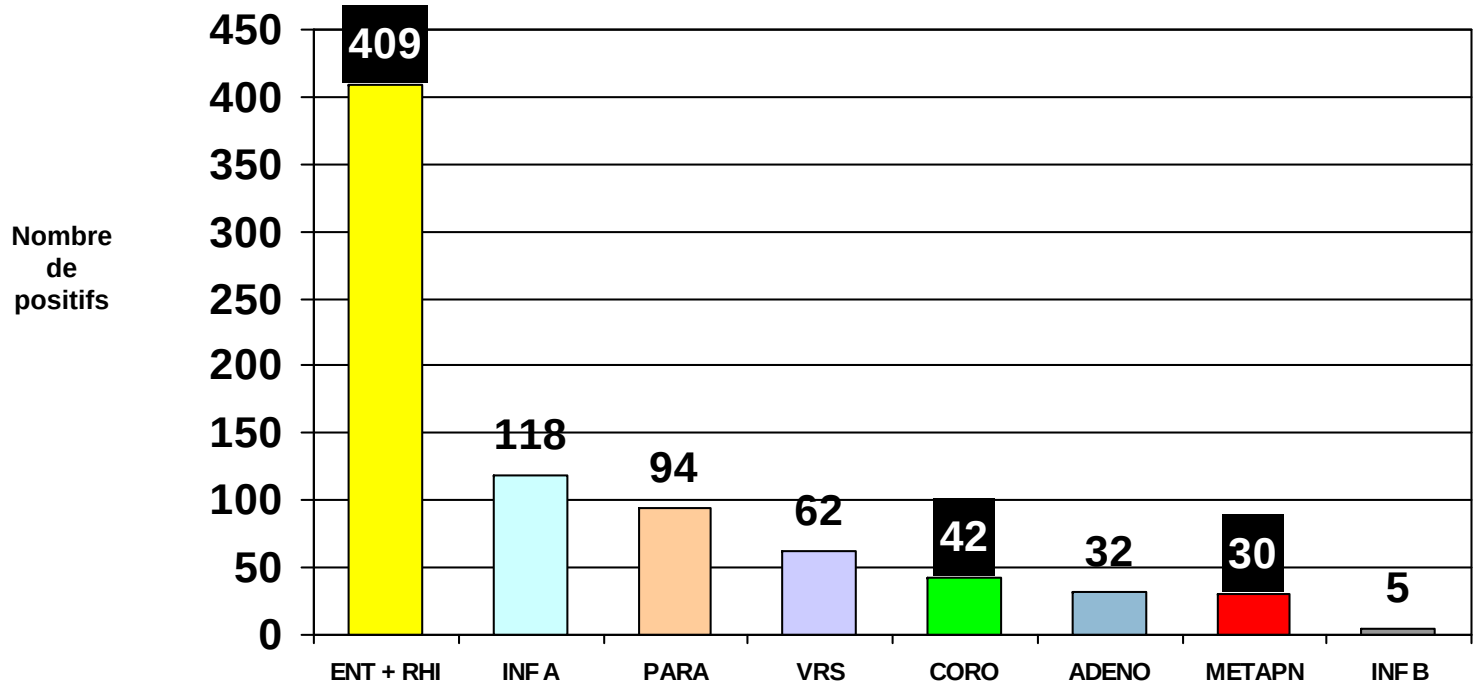
Répartition par âge des patients



Impact du test RVP sur le % résultats positifs

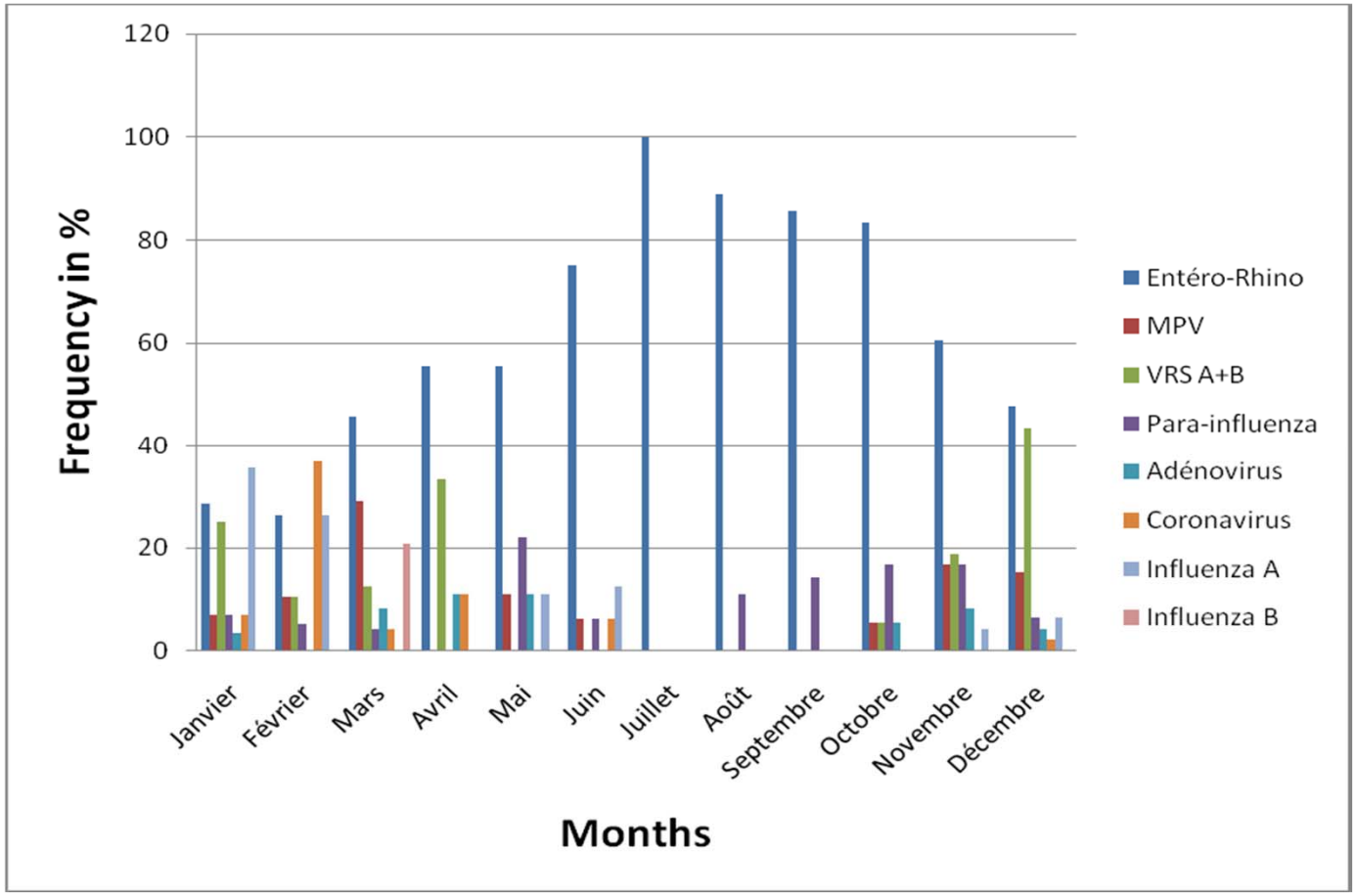
	Positive	Négative	Single	Mixed infections (2 viruses)
Techniques Conventionnelles **Culture + DEA** **2007-2008**	**27%**	**73%**	**100%**	**0%**
RVP **2009**	**41%**	**59%**	**93%**	**7%**

Distribution des virus détectés par xTAG® RVP (2009)

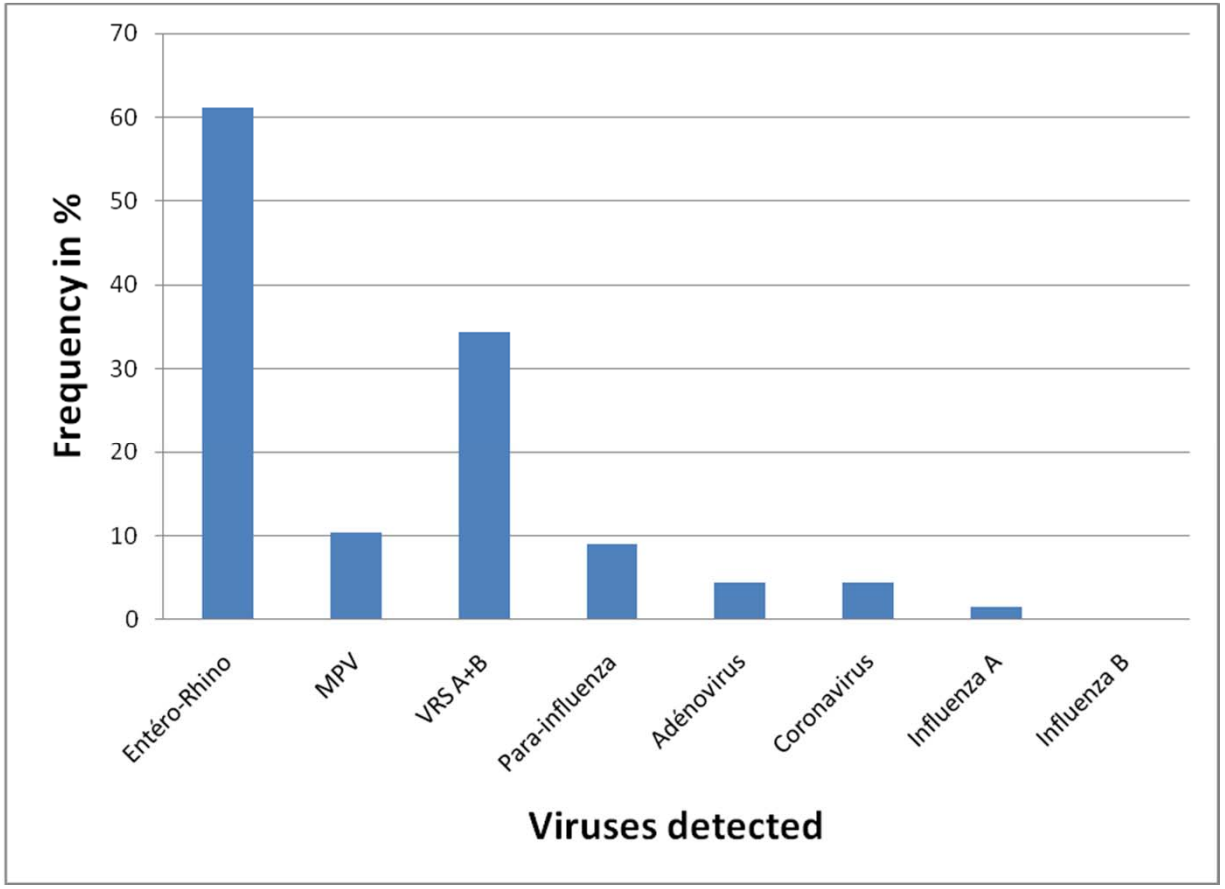


70% des virus (E-RV,CoronaV,MétapV) : non détectés par techniques conventionnelles
(à partir de juin 2010 : 2% de prélèvements positifs Bovavirus avec version Fast)

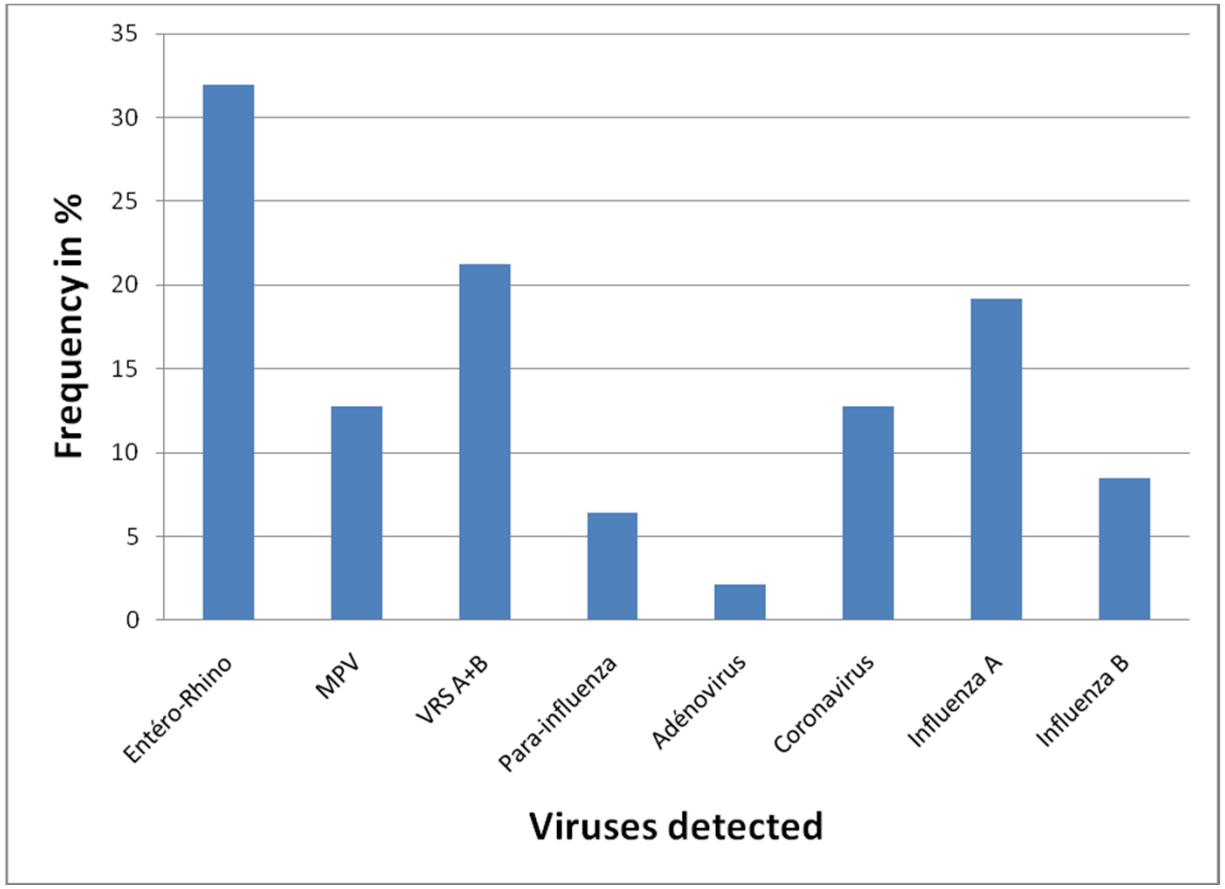
Distribution saisonnière des virus respiratoires



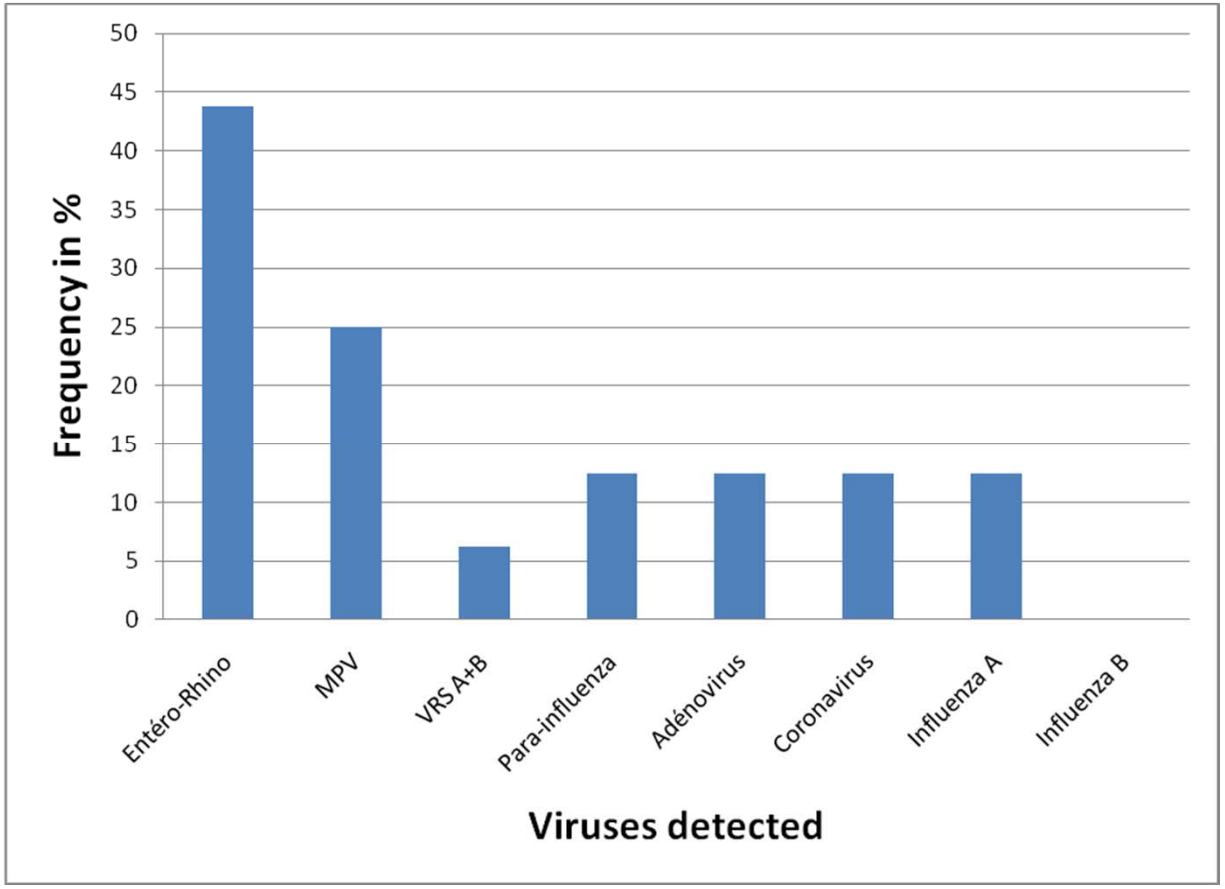
Fréquence des virus détectés dans les bronchiolites



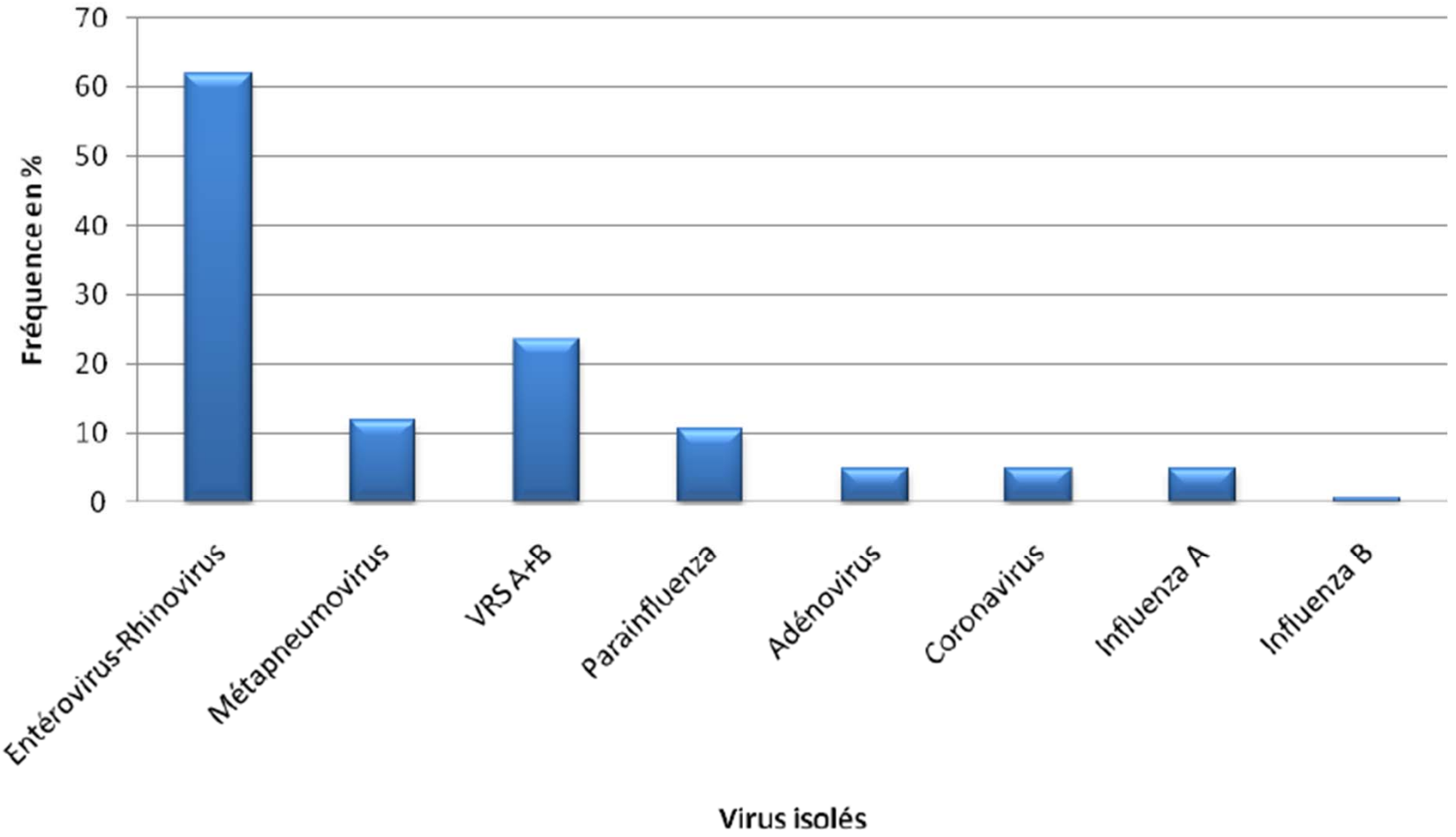
Fréquence des virus détectés dans les bronchites aiguës



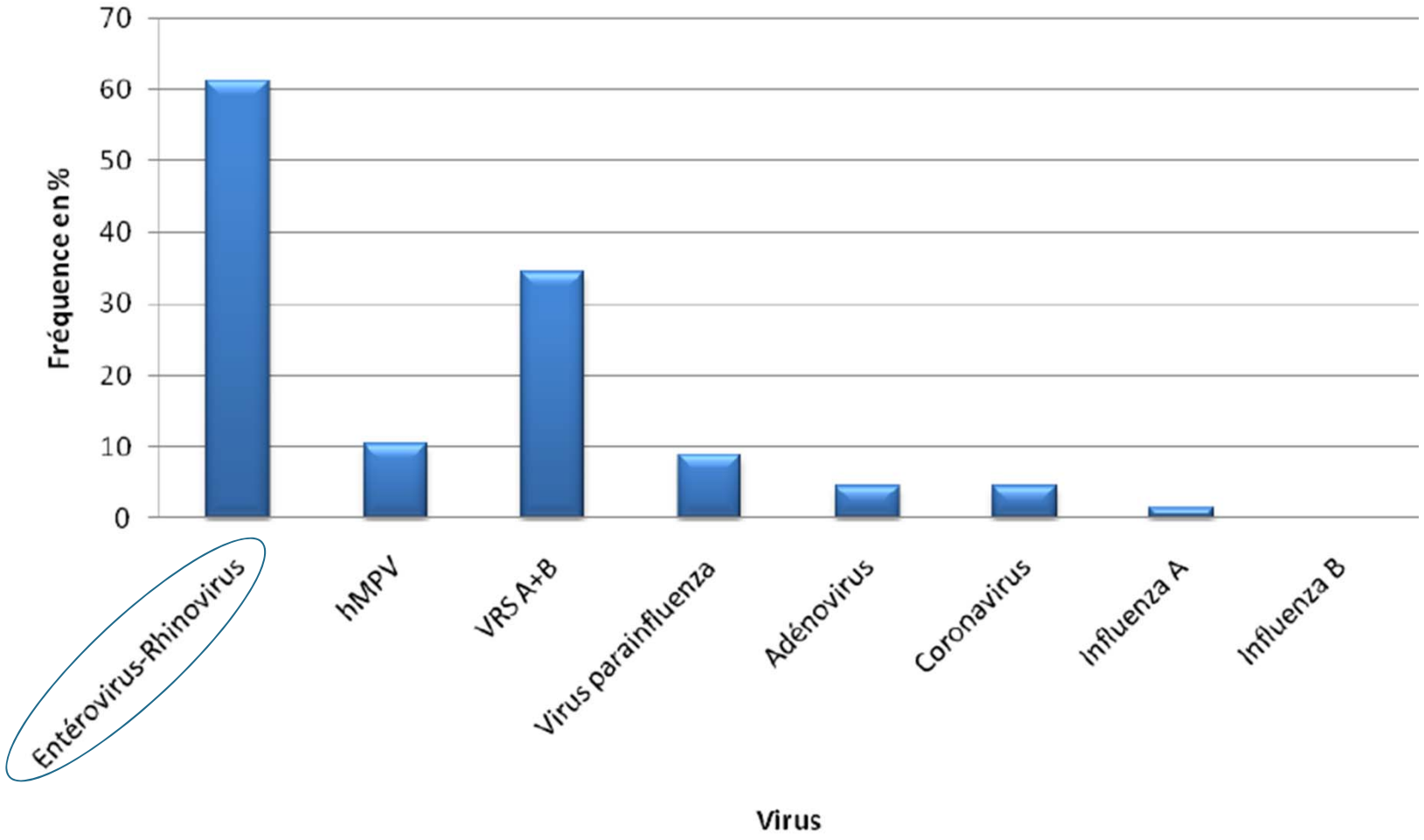
Fréquence des virus détectés dans les pneumonies



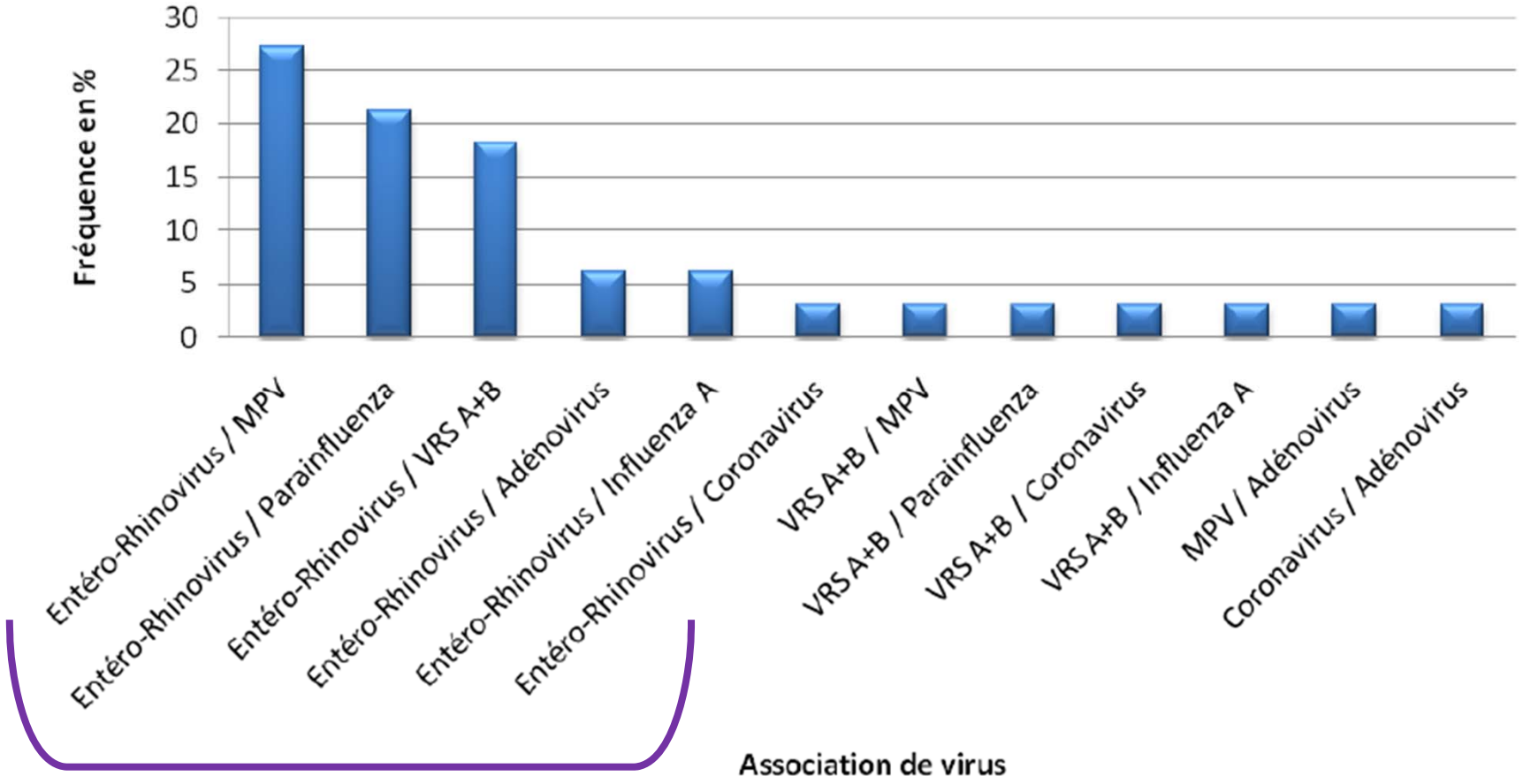
Infections respiratoires aiguës virales du nourrisson <2 ans : Distribution des virus isolés



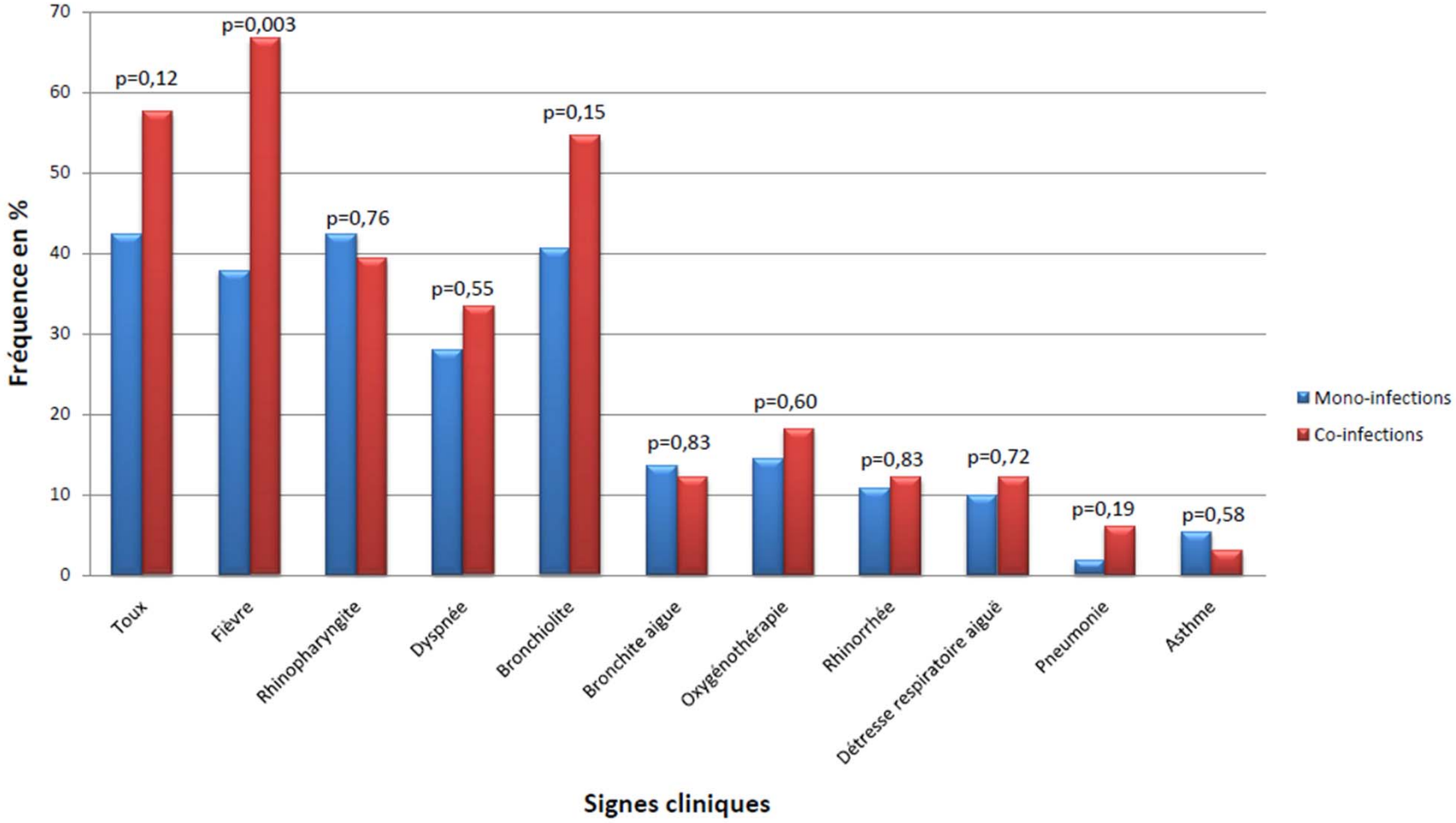
Fréquence des virus impliqués dans les bronchiolites du nourrisson (1ère cause d'hospitalisation)



Association de virus dans les infections respiratoires virales aiguës du nourrisson



Co-infections pourraient aggraver l'évolution de la maladie chez les nourrissons <2ans



Analyse du coût hospitalier du test moléculaire xTAG RVP

Étude dans le *Regional Virology Laboratory*, *Hamilton, Ontario, Canada*

Arbre décisionnel construit en utilisant 4 stratégies de détection des virus respiratoires :

- **DFA**
- **DFA+ culture cellulaire**
- **xTAG RVP seul**
- **DFA+ xTAG RVP**

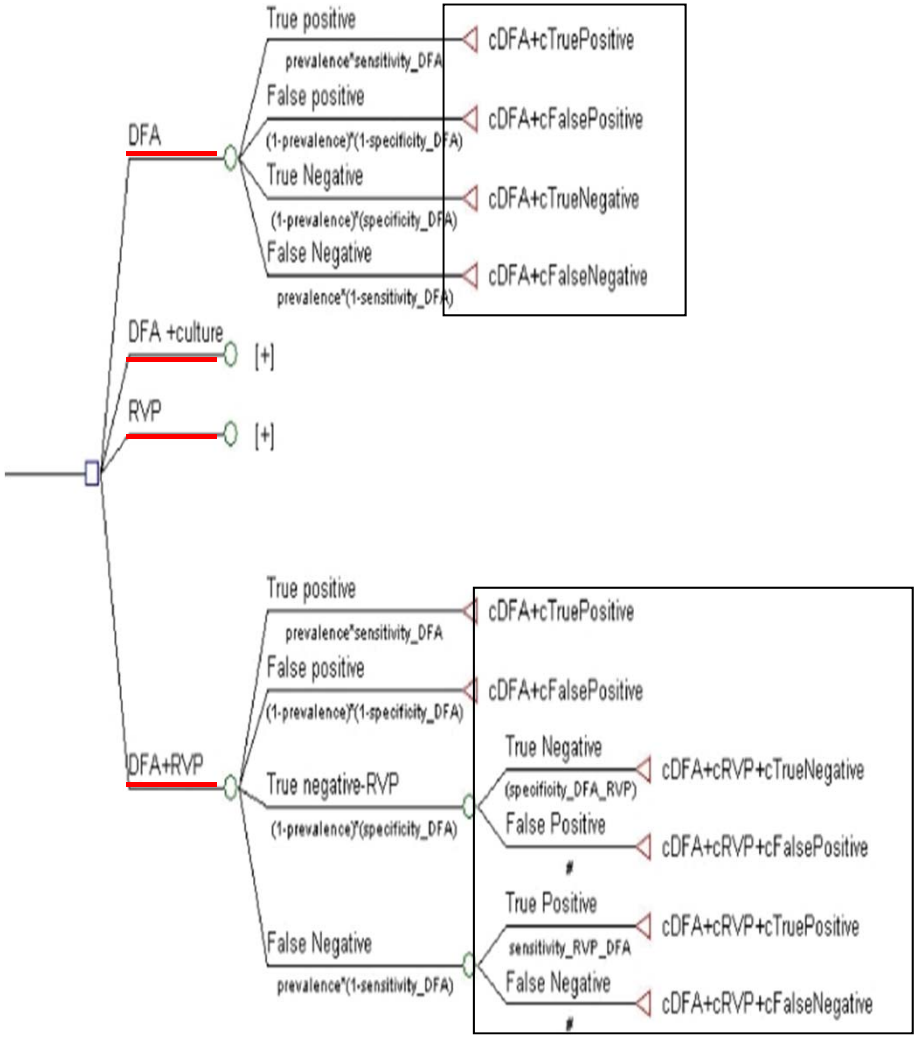
Données obtenues pour 661 patients de pédiatrie

Mahony et al., J. Clin. Microbiol., 2009

Arbre Décisionnel

Coûts pour chaque bras déterminés en utilisant :

- Prix du test
- Coûts associés à l'hospitalisation :
  - Durée hospitalisation
  - Jours en isolement
  - Antibiotiques
  - Examens complémentaires
- Statut diagnostic : vrai positif, faux positif, vrai négatif et faux négatif



Mahony JB et al., J Clin. Microbiol.2009

Coût par cas pour chaque statut diagnostic (quelque soit le test utilisé)

Diagnostic status	Cost ($)			
	Hospitalization	Tests and investigations	Antibiotics	Total
True positive	2,347	60	6	2,413
False negative	4,697	53	6	4,756
True negative	5,166	55	6	5,228
False positive	5,186	55	6	5,248

Coût d'un vrai positif = le plus faible

Coût d'un faux positif = le plus fort

Mahony JB et al., J Clin. Microbiol. 2009

Coûts pondérés par cas pour chaque stratégie

TABLE 4. Component costs used to calculate the weighted cost per case for the four testing strategies[a]

Test	Cost ($)				
	Viral diagnostic tests	Hospitalization	Other tests and procedures	Antibiotics	Total
xTAG RVP	$80	3,479	58	6	3,623
DFA	14	3,834	57	6	3,911
DFA + SVC	25	3,826	57	6	3,914
DFA + xTAG RVP	58	3,728	57	6	3,849

[a] The total cost per case was determined by the model and by using the weighted test costs and the weighted hospital costs, as shown in Table 3, and were broken down into component costs. The hospital costs were the same as those indicated in Table 3.

*** coûts pondérés prennent en compte le statut diagnostic**

xTAG RVP seul =la stratégie la moins coûteuse
Économies associées à la durée d'hospitalisation

Mahony et al., J. Clin. Microbiol., 2009

Conclusion

Impact de xTAG (RVP) :

- **Augmentation significative des prélèvements positifs**
- **Fréquence très élevée des entéro-rhinovirus**
- **Entéro-rhinovirus pathogènes importants chez les nourrissons, bronchiolites sévères**
- **Co-infections pourraient être plus sévères**
- **Outil de surveillance de l'émergence de nouveaux variants de la grippe A en dehors des périodes épidémiques**

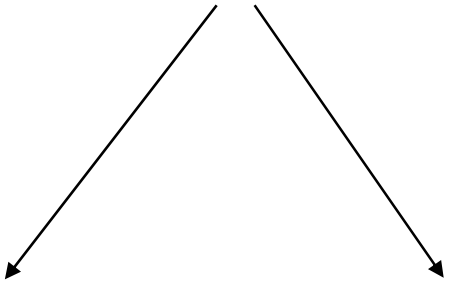
Xtag RVP et surveillance H1N1v2009

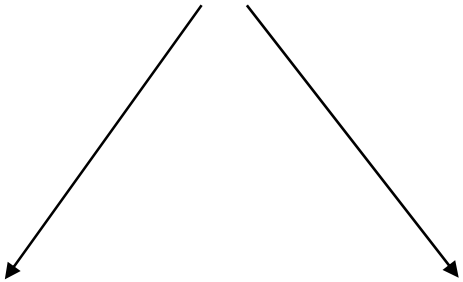
Avant juillet 2009

xTAG RVP

Après juillet 2009

Grippe H1N1v2009 (3214 plvts)
RT-PCR CNR





grippe A+
H1+ ou H3+

(45 H3, 3 H1)

grippe A+
H1- / H3-

grippe A
H1N1v2009 +
(1034)

grippe A
H1N1 v2009-

14 H1N1v 2009 confirmées
par RT-PCR CNR

si demande clinicien
xTAG RVP

Perspectives

xTAG RVP Fast version 2011 :

détection Grippe A H1N1v2009

Remerciements

Laurent Sattler, interne en biologie médicale

Christelle Bischoff, interne en biologie médicale

Samira Fafi-Kremer, MCU-PH

Plateau Technique de Microbiologie
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Simone Risch

Audrey Weber

Lola Hamied