



41^e Journées Régionales Hygiène Hospitalière et prévention des infections associées aux soins

«Méthodes diagnostiques des viroses épidémiques »

Sébastien Hantz

Faculté de Médecine, Université de Limoges

Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, CHU Limoges

UMR Inserm 1092 - Anti-infectieux : Supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques

28 mars 2019



Virus impliqués dans les épidémies nosocomiales

❑ virus à transmission entérique:

- = contamination orale par un agent infectieux excrété dans les selles.
- soit directement via les mains,
 - soit indirectement via certains aliments ou l'eau

Longue persistance dans l'environnement de ces virus

=> contagiosité +++

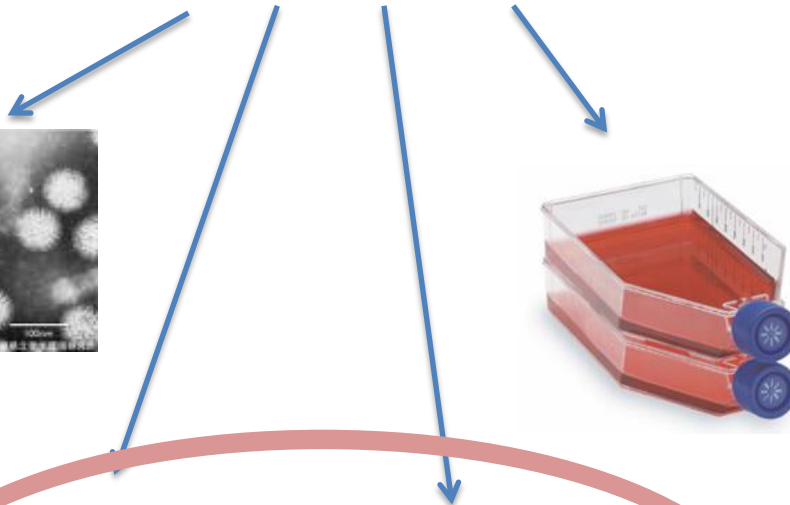
❑ virus à transmission respiratoire

= projection de gouttelettes de sécrétions respiratoires, ou d'aérosols capables de pénétrer dans les voies respiratoires.

Outils diagnostiques en virologie

Direct

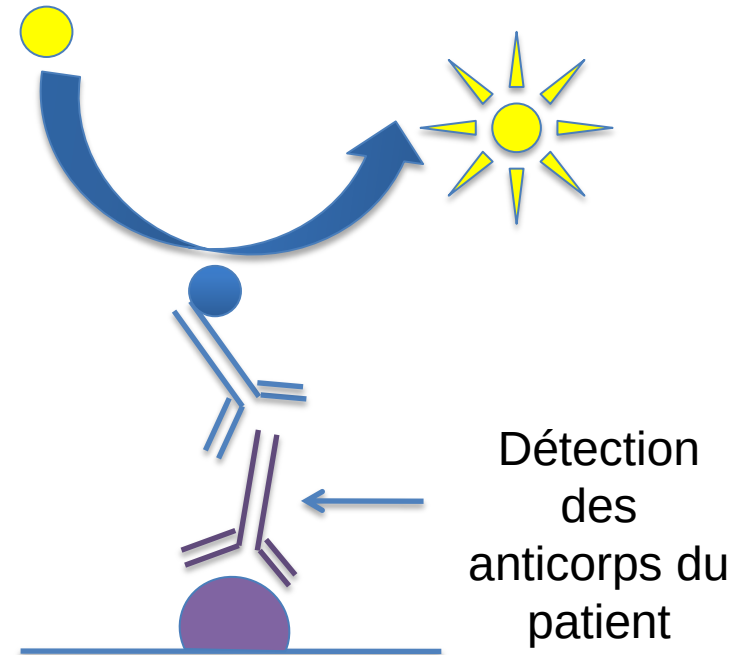
= détection du pathogène



Antigènes

Indirect

= sérologie



Détection
des
anticorps du
patient

Tests de détection d'antigène(s)

TEST IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUE VIKIA Rota-Adeno (BioMérieux)

Antigènes viraux

Microsphères colorées de polystyrène sensibilisées avec Ac monoclonaux de souris anti-rotavirus et anti-adenovirus

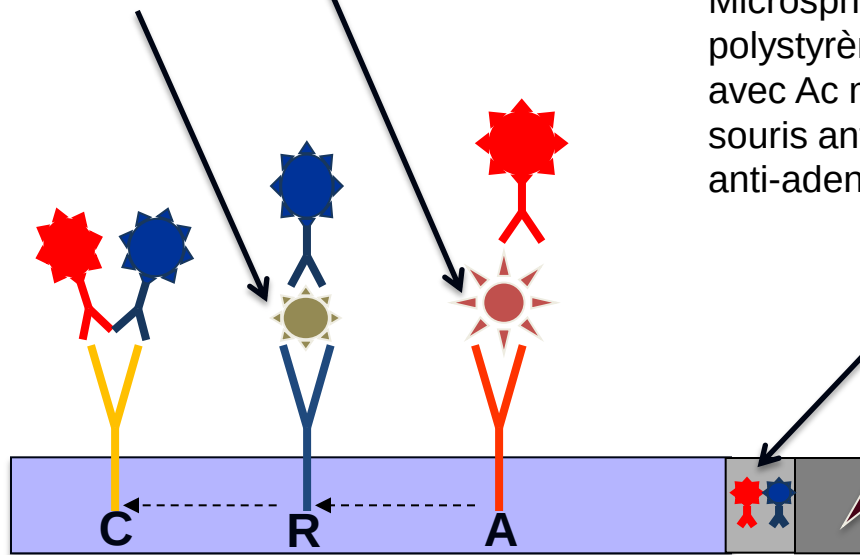
Suspension de selles

antigène rotavirus

antigène adénovirus

Anticorps polyclonaux de mouton anti-IgG de souris

Anticorps anti-rotavirus
Anticorps anti-adénovirus



Approche moléculaire : PCR simplex /multiplex

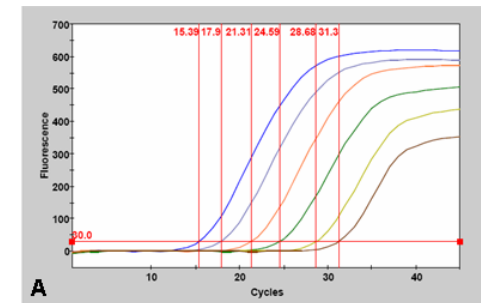
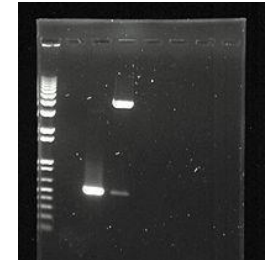
- ❑ détection du génome d'un ou de plusieurs agents pathogènes
- ❑ PCR maison vs PCR commerciale
- ❑ technique en plusieurs étapes ou technique one-step
- ❑ approche ciblée vs approche syndromique
- ❑ discuter le coût

=> on ne détecte que ce que l'on cherche !!!

PCR simplex

- ❑ PCR point final ou quantitative en temps réel
 - technique manuelle : expertise technique
 - nécessite extraction préalable

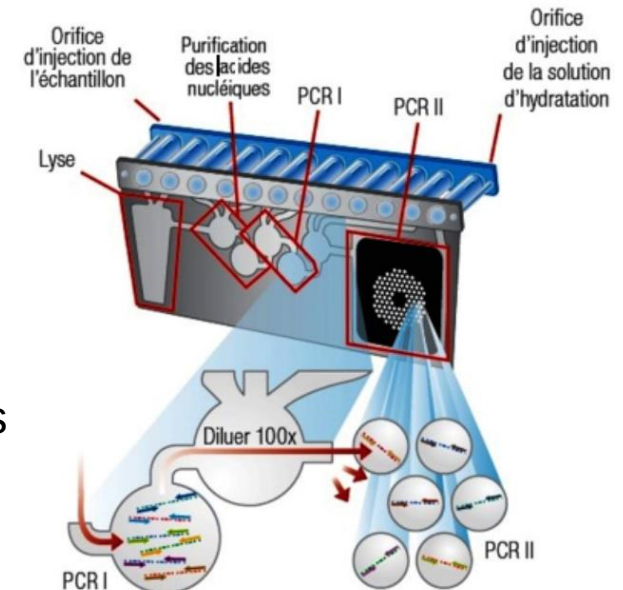
- techniques automatisées : (pas/peu d'expertise)
 - GeneXpert® (Cepheid)
 - 20-30min à 2h
 - sur échantillon



PCR multiplex



- ❑ PCR multiplex automatisées, ciblant les différents germes responsables d'un grand syndrome infectieux
 - environ 1 heure
 - Sur échantillon
 - très peu d'expertise technique requise
- ❑ Limites :
 - cher (environ 150 €)
 - performances + faibles pour certains pathogènes



Insérer la cassette
dans la station
de chargement

Injecter la solution
d'hydratation

Ajouter le tampon
de l'échantillon et
l'échantillon

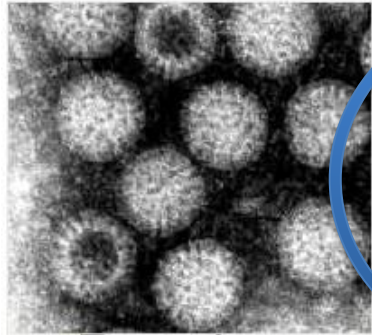
Injecter
l'échantillon

Insérer la cassette
dans l'instrument
et lancer l'analyse

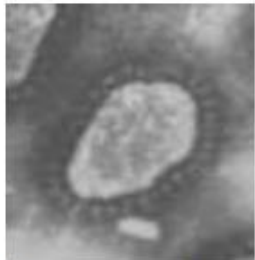
Virus à transmission entériques

- rotavirus
- calicivirus
- astrovirus
- adénovirus
- coronavirus
- virus de l'hépatite A

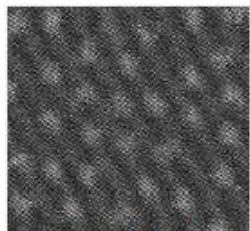
Virus des gastro-entérites



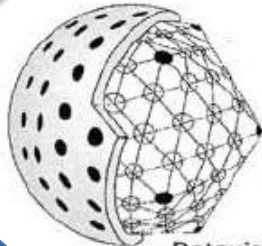
Rotavirus



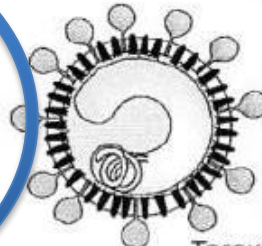
Coronavirus



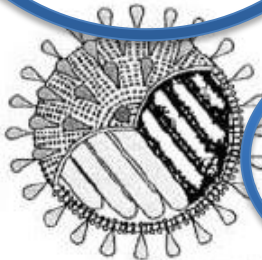
Astrovirus



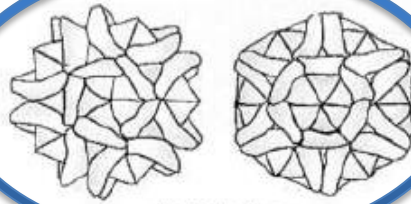
Rotavirus



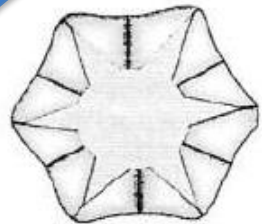
Torovirus



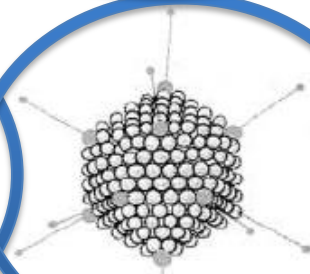
Coronavirus



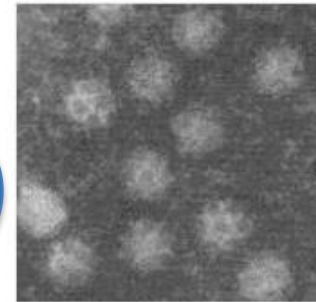
Calicivirus



Astrovirus



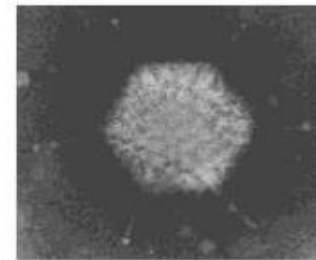
Adénovirus



→ Norovirus

Calicivirus

→ Sapovirus



Adenovirus 40 et 41

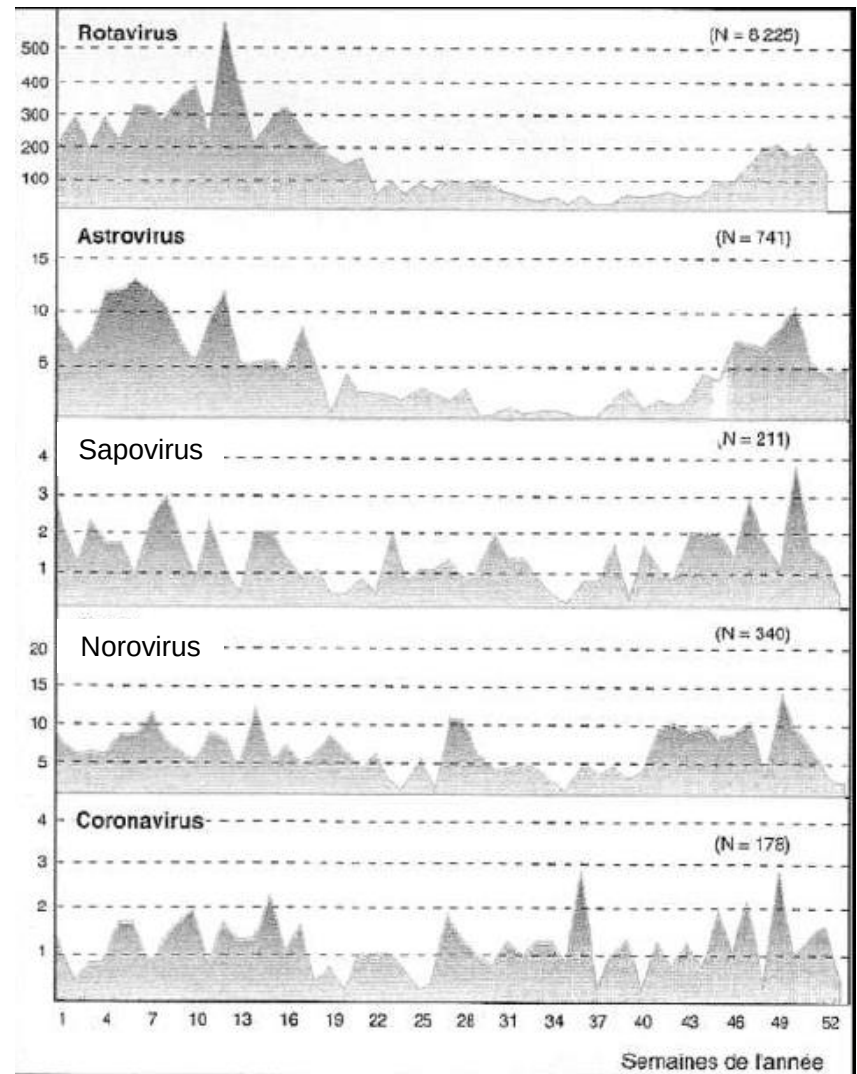
❑ Rotavirus

- Virus extrêmement contagieux
- Virus nus, très résistants dans le milieu extérieur
- Transmission essentiellement féco-ORALE autour de cas
- Quelques particules virales suffisent pour générer une infection
- Jusqu'à 10^{10} particules virales / gr de selles à la phase aiguë de la maladie

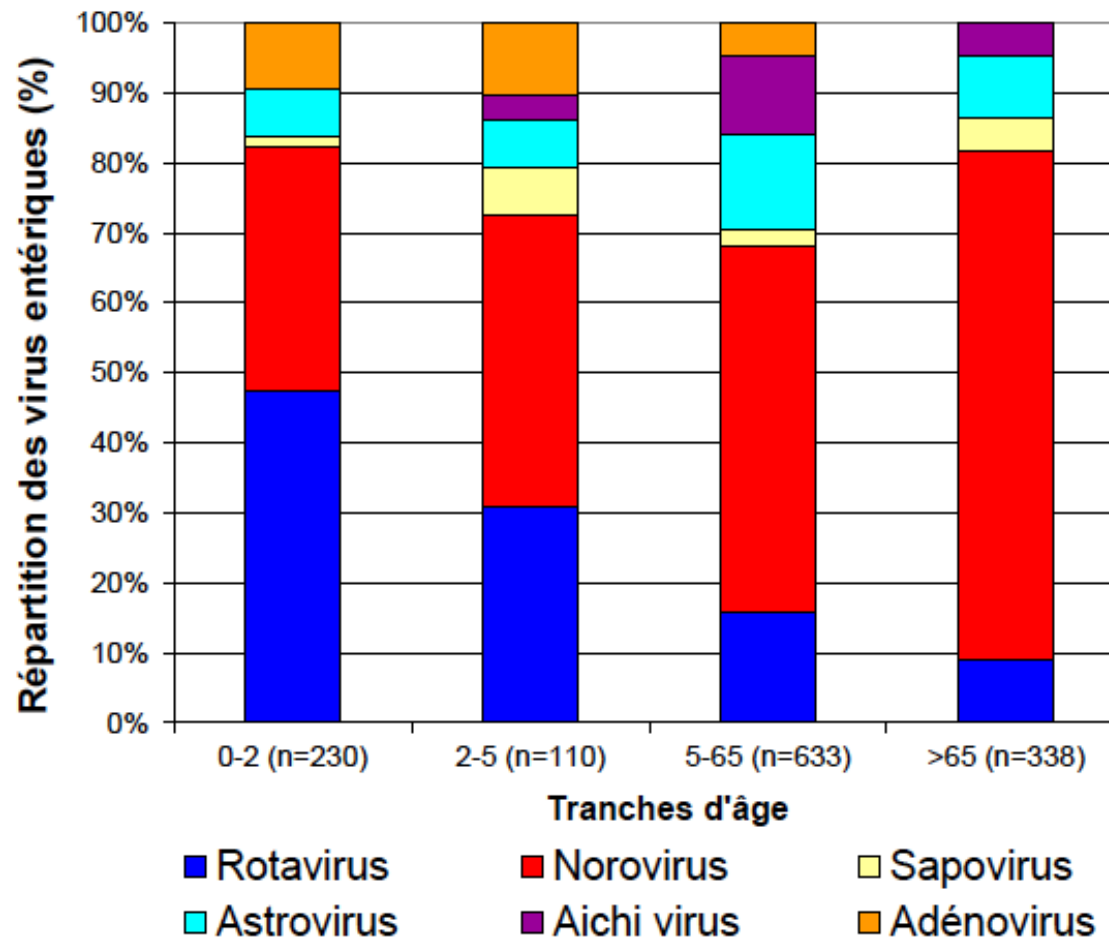
❑ Calicivirus

- Transmission féco-ORALE favorisée par leur résistance.
- Contamination indirecte par l'environnement contaminé
- Contamination par voie alimentaire (eau, aliments surtout coquillages)

- ❑ Epidémies saisonnières pour les rotavirus, les astrovirus
- ❑ Saisonnalité moins marquée pour les adénovirus ou pour les calicivirus (sapovirus et norovirus) et coronavirus, responsables de petites épidémies, en collectivité, d'origine hydrique ou alimentaire



Distribution en fonction des tranches d'âge



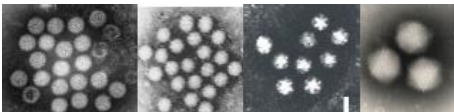
Données Pr Pothier, CNR virus gastro-entérites, 2017

Outils diagnostic

- ❑ virus non cultivables
- ❑ durée d'incubation très courte, nécessité d'un diagnostic rapide
⇒ pas de tests sérologiques

Diagnostic direct à partir des selles

~~Microscopie
électronique~~



PCR

simplex

multiplex

Tests rapides:

- agglutination
- immunochromatographie



Investigation d'une épidémie: quels outils? (1)

➤ Tests immunochromatographiques de détection des norovirus (évaluation du CNR des VE)

Nom du kit	RidaQuick Norovirus		Immunocard STAT Norovirus		Norotop		SD Bioline Norovirus		actim Noro	
Fabricant	R-Biopharm AG. (Allemagne)		Denka Seiken Co. Ltd. (Japan)		Biosynex Immunodiagnostic (France)		Standard Diagnostics Inc. (Corée)		Oy Medix Biochemica Ab. (Finlande)	
Distributeur	R-Biopharm AG		Meridian Bioscience Europe		All Diag SA		Alere		Fumouze Diagnostics	
SENSIBILITE % (nombre de positifs / nombre d'échantillons testés)										
Globale	52%	(113/218)	35%	(62/175)	51%	(76/148)	41%	(78/189)	56%	(45/80)
Génogroupe I	17%	(10/58)	22%	(13/49)	52%	(32/61)	23%	(19/81)	43%	(13/30)
Génogroupe II	64%	(103/160)	39%	(49/126)	50%	(44/87)	54%	(59/108)	64%	(32/50)
Génotype GII.4	78%	(60/77)	59%	(32/54)	61%	(17/28)	67%	(22/33)	73%	(11/15)

Spécificité des tests = 100%

Coût: 4,5 €

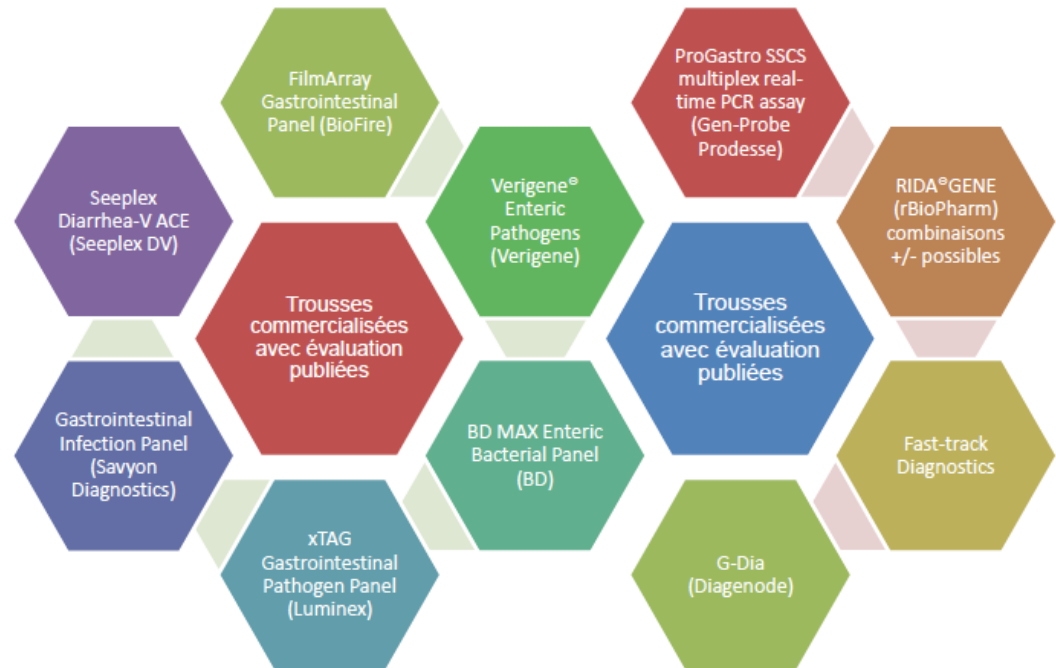
(GII.4 responsable de la majorité des infections en institution)

Investigation d'une épidémie: quels outils? (2)

➤ Tests moléculaires (non inscrits à la NABM, actes RIHN)

- ✓ PCR simplex standard (home-made ou commerciale): environ 15 à 20€, délai de 4 à 6h de réalisation, souvent réalisée par série (24-48h)
- ✓ Genexpert Norovirus: 40€ , résultat en 1 heure

- ✓ PCR multiplex panel GI:
 - standard: cf PCR simplex avec un coût autour de 30€
 - automatisée 150€, résultat en 1heure





- ❑ Système intégré, coup par coup
- ❑ durée = 1 h, 2 min de manipulations
- ❑ Le plus complet ! **22 cibles**
- ❑ **Performances:** 98.5% sensibilité and 99.2% spécificité

- ❑ Recommandations de l'*American College of Gastroenterology*:
 - Personnes présentant des symptômes modérés à sévères associés à une diarrhée aiguë
 - Personnes à haut risque de propagation de la maladie à d'autres et lors d'épidémies connues ou présumées
 - Personnes atteintes de dysenterie
 - Personnes souffrant de diarrhée aiguë de plus de 7 jours
 - Personnes immunodéprimées souffrant de diarrhée aiguë

Panel agents infectieux testés sur FilmArray

Bactéries	E. coli resp diarrhées/Shigella
<i>Campylobacter (jejuni, coli, and upsaliensis)</i> <i>Clostridium difficile (toxin A/B)</i> <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Salmonella</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Vibrio (parahaemolyticus, vulnificus)</i> <i>Vibrio cholerae</i>	<i>E. coli</i> enteroaggregative (EAEC) <i>E. coli</i> enteropathogénique (EPEC) <i>E. coli</i> enterotoxigénique (ETEC) lt/st <i>E. coli</i> produisant Shiga-like toxine (STEC) stx1/stx2 <i>E. coli</i> O157 <i>E. coli</i> Shigella/enteroinvasive (EIEC)
Virus	Parasites
Adenovirus F40/41 Astrovirus Norovirus GI/GII Rotavirus A Sapovirus (I, II, IV, and V)	<i>Cryptosporidium</i> <i>Cyclospora cayetanensis</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>

Evaluation comparative de troussees disponibles

No.	Pathogen	Verigene EP		Biofire GI Panel		Luminex GPP	
		% Sens ^a (95% CI) ^c	% Spec ^b (95% CI)	% Sens (95% CI)	% Spec (95% CI)	% Sens (95% CI)	% Spec (95% CI)
12	<i>Campylobacter</i>	83.3 (52.0–97.9)	99.3 (96.1–100)	100 (73.5–100)	100 (97.4–100)	91.7 (61.5–99.8)	100 (97.4–100)
24	<i>Salmonella</i>	83.3 (62.6–95.3)	100 (97.2–100)	95.8 (78.9–100)	100 (97.2–100)	79.2 (57.9–92.9)	100 (97.2–100)
43	<i>Shigella</i>	95.4 (84.2–99.4)	99.1 (95.0–100)	100 (91.8–100)	100 (96.7–100)	100 (91.8–100)	100 (96.7–100)
12	Shiga toxin	91.7 (61.5–99.8)	100 (97.4–100)	100 (73.5–100)	100 (97.4–100)	91.7 (61.5–99.8)	100 (97.4–100)
19	Norovirus	89.0 (67.0–98.7)	100 (97.3–100)	94.7 (74.0–100)	99.3 (95.9–100)	89.5 (67.0–98.7)	100 (97.3–100)
7	Rotavirus	71.4 (29.0–96.3)	100 (97.5–100)	100 (59.0–100)	98.6 (95.2–99.8)	100 (59.0–100)	100 (97.5–100)

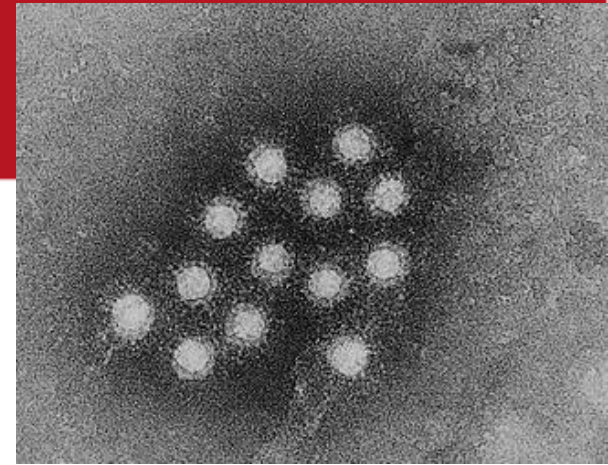
Huang et al, 2016

Quels tests choisir?

- ❑ décision complexe car multifactorielle:
 - connaissance de l'origine de l'épidémie:
 - tests immunochromatographiques Norovirus adaptés pour épidémie en EPHAD
 - tests immunochromatographiques Rotavirus ont une sensibilité globale de 75-80% => efficaces pour détecter un cas mais insuffisant pour portage
 - disponibilité des tests dans la laboratoire de proximité
 - rapidité de rendu des résultats souhaitée

- ❑ en pratique, encore souvent test immunochromatographique mais recours possible à la PCR en temps réel qui demeure la référence si persistance d'un doute après un test immunochromatographique négatif

Virus de l'hépatite A

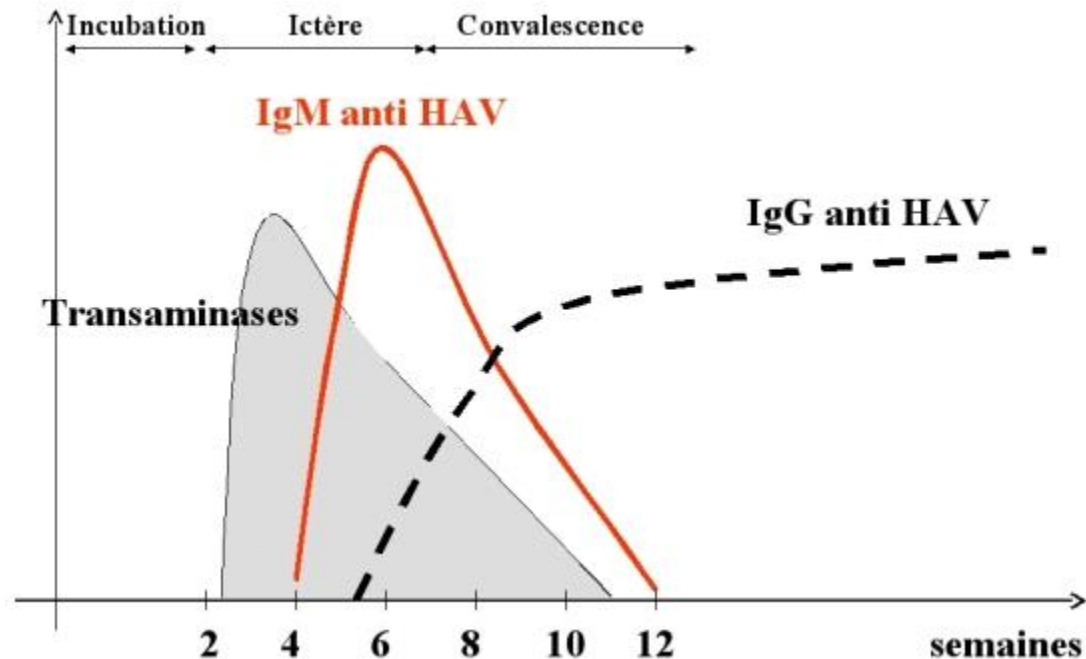


- ☐ Famille des Picornaviridae
- ☐ Virus nu non enveloppé
- ☐ Très résistant dans le milieu extérieur. Survie dans l'eau durant de longues périodes.
- ☐ Transmission par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés ou par contact direct avec une personne infectée (cas fréquents dans communauté de gens du voyage)
- ☐ Hépatite aiguë => pas de forme chronique
- ☐ Risque : forme fulminante

Diagnostic cas hépatite A

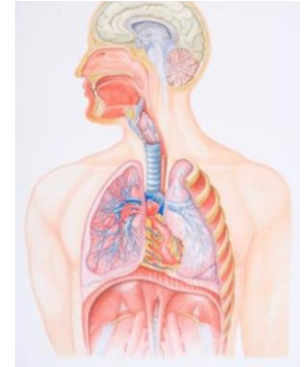
- ❑ Diagnostic: sérologie car incubation longue (moy de 1 mois)

⇒ **IgM VHA +**

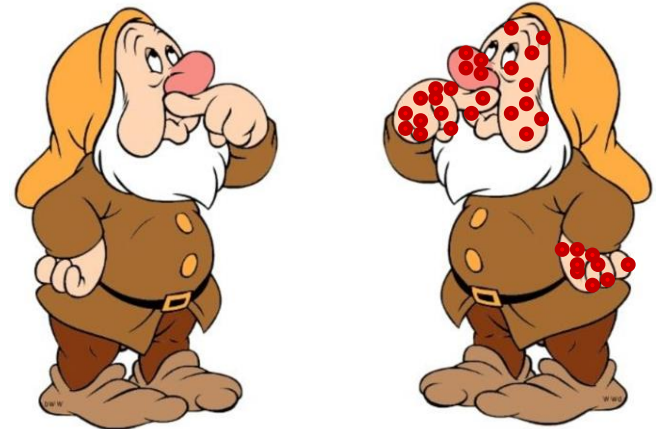


- ❑ Envoi des selles au CNR pour typage des souches

Virus à transmission respiratoire



- grippe
 - VRS
 - virus parainfluenza
 - adénovirus
 - coronavirus
 - metapneumovirus
 - bocavirus
-
- virus de la rougeole



Caractéristiques des virus à tropisme respiratoire

- ❑ Transmission par voie respiratoire: forte contagiosité
 - ❑ Infection localisée aux cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire
- => Incubation courte (<1 semaine)
- Tous les étages de l'arbre respiratoire peuvent être touchés
 - Des tableaux cliniques voisins peuvent correspondre à des virus différents

Principaux virus responsables

- ❑ *Orthomyxoviridae* => Grippe A, B ou C = virus influenzae
- ❑ *Paramyxoviridae*
 - Virus parainfluenzae (PIV)1, 2, 3 ou 4
 - Virus respiratoire syncytial (VRS, bronchiolite du nourrisson)
 - Metapneumovirus (2eme cause de bronchiolite chez l' enfant)
- ❑ Rhinovirus (*Picornaviridae*)
- ❑ Coronavirus (classique et coronavirus du SARS CoV/MersCoV)
- ❑ Metapneumovirus, Bocavirus

Diagnostic (1)

- SEROLOGIE INUTILE: très nombreux virus, incubation courte
- Diagnostic direct => Prélèvement local +++
Précoce
 - Nez/Gorge
 - Sécrétions nasopharyngées à l'écouvillon ou par aspiration nasopharyngée (cellules++)
 - LBA
- EN MILIEU DE TRANSPORT SPECIFIQUE



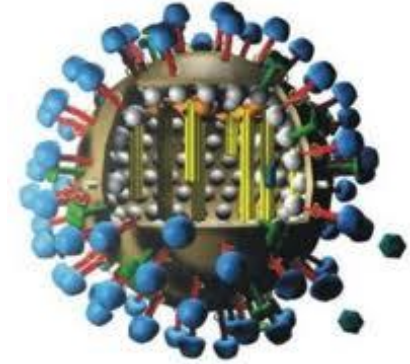
❑ Indications du diagnostic direct :

- En début d'épidémie
- Dans les cas graves (pneumonie/détresse respiratoire aigue)
- Sur terrain fragile (immunodéprimés, cardiopathie, asthme, nourrissons)

❑ Principe :

- tests immunochromatographiques
- détection de l'ARN ou ADN génomique par biologie moléculaire (PCR).

GRIPPE

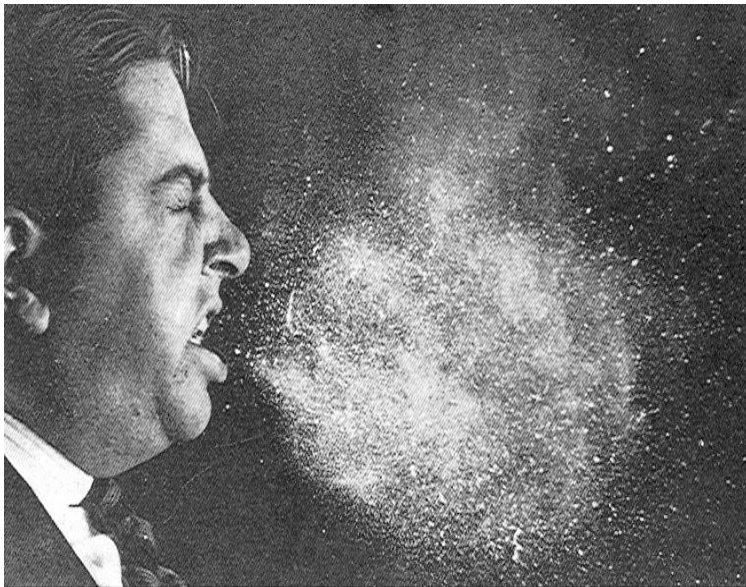


Orthomyxovirus-virus influenzae

- ❑ Epidémies annuelles
- ❑ Touche 5 à 15% de la population chaque année sur 5 à 9 semaines
- ❑ Les enfants puis les adultes puis les sujets âgés
- ❑ 0,1% de décès dont 90% personnes âgées
- ❑ soit 1500 à 5000 décès / an en France
- ❑ Première cause de mortalité par maladie infectieuse en France

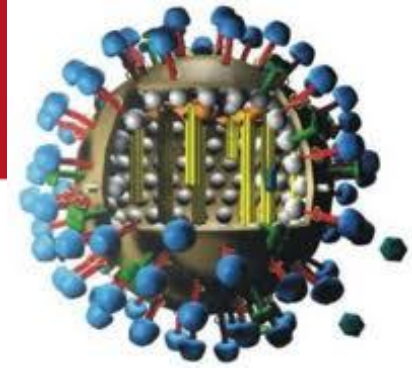
La transmission

- ❑ Maladie hautement contagieuse
- ❑ Se transmet de **manière directe** d'un sujet infecté à un sujet sain via les gouttelettes expulsées sous forme d'aérosols pendant la respiration, éternuement, toux, écoulement nasal (jusqu'à 10^7 virus/mL)



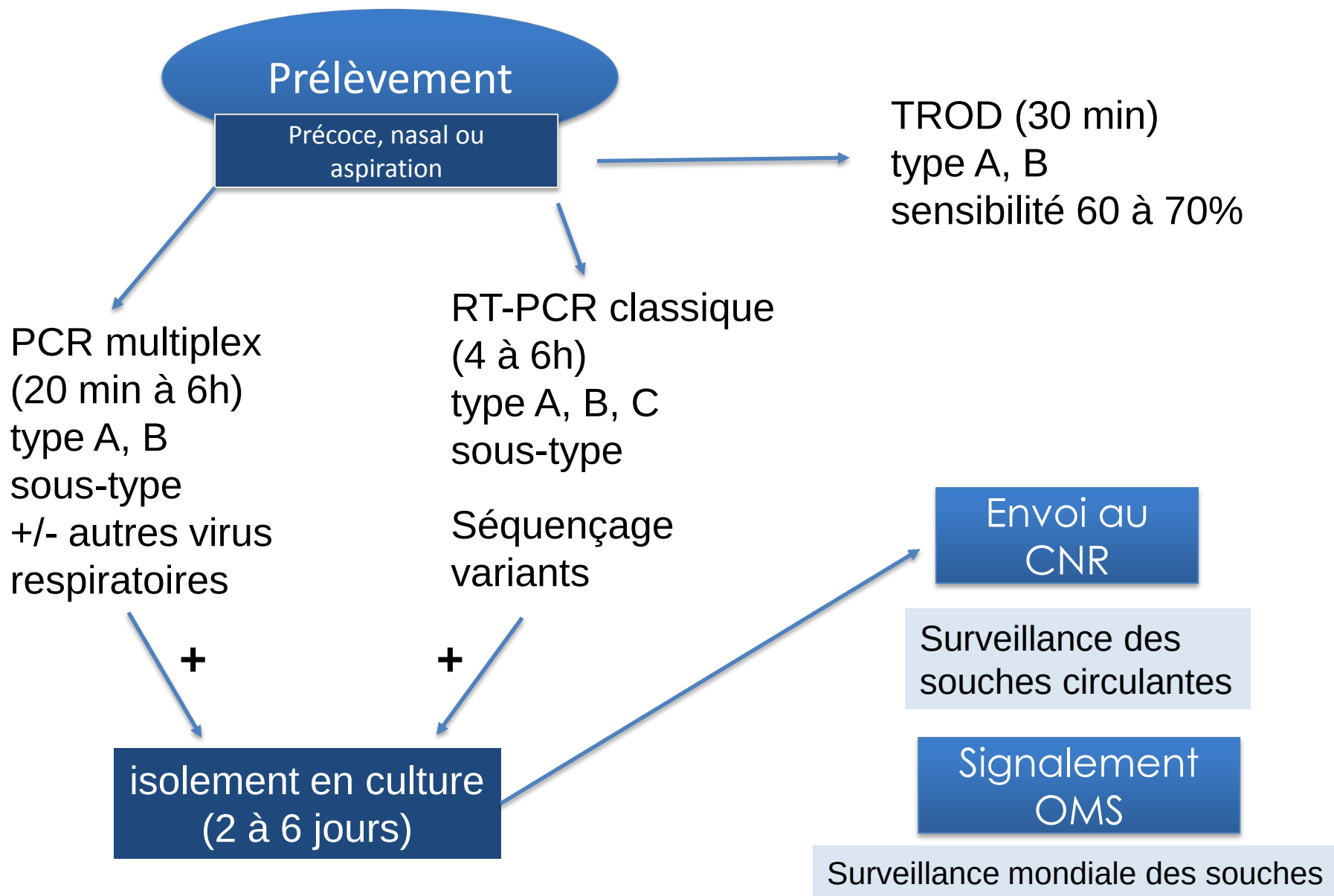
- ▶ Transmission également possible par voie indirecte (surfaces contaminées) mais survie du virus très limitée

Les virus de la grippe (influenza)



- ❑ Famille des *Orthomyxoviridae*
 - ❑ Virus enveloppés à ARN
 - ❑ 3 types de virus grippaux dotés d'une morphologie similaire : A, B et C
 - ❑ La surface des virus grippaux A et B est hérissée de spicules constitués par 2 catégories de glycoprotéines d'enveloppe qui permettent de définir les sous-types du virus :
 - La neuraminidase (N)
 - L'hémagglutinine (H)
- nomenclature: H1N1, H3N2, ...**
- ❑ Les mutations du virus grippal ont entraîné la mise au point d'une appellation complète et précise de chaque souche qui tient compte du type, de la formule hémagglutinine et neuraminidase et du lieu où il a été isolé pour la première fois.

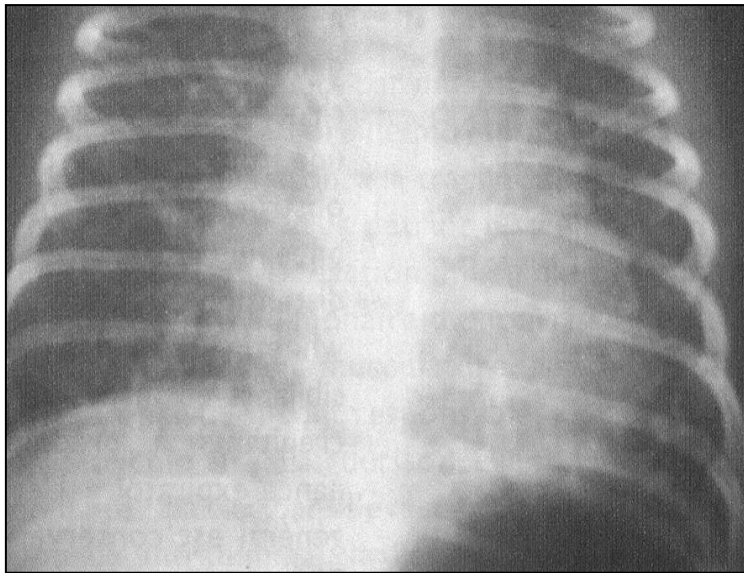
Diagnostic de la grippe



Le virus respiratoire syncytial (VRS)

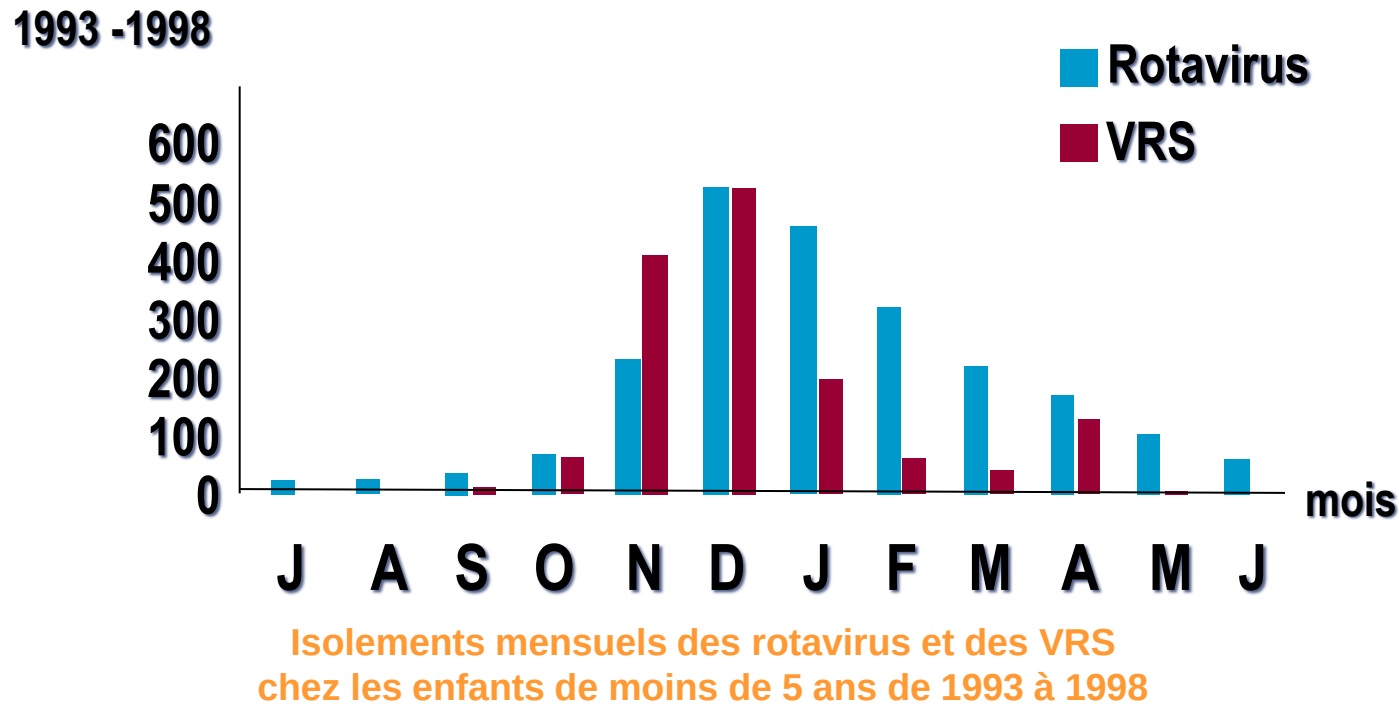
Agent de la bronchiolite du nourrisson,
représente une cause majeure d'infections
respiratoires chez le petit enfant

Le VRS, agent fréquent de pathologies respiratoires graves



- ❑ Bronchiolites aiguës chez l'enfant (2-3% hospitalisés)
- ❑ 0,5-2% d'insuffisance respiratoires graves
 - Prématurité
 - Jeune âge (2-3 mois)
 - Cardiopathie, asthme
 - immunodépression
- ❑ Problème de santé publique mais pas de vaccin disponible à ce jour

Le VRS sévit sous forme d'épidémies hivernales, débutant en octobre et durant 3 à 5 mois



Gendrel D & Al BEH 1999 N° 24

Période précédant l'épidémie de grippe

Diagnostic

- ❑ Détection d'antigène par immunochromatographie



- ❑ **le plus souvent RT-PCR simplex, duplex ou multiplex**

- PCR simplex: plusieurs heures
- Xpert® Xpress Flu/RSV (20-30 min)
- Filmarray panel respiratoire



Approche syndromique par Filmarray panel respiratoire

Pathogène	SENSIBILITÉ Prospective PCP (2)	SENSIBILITÉ Retrospective PCP (2)	SPÉCIFICITÉ Prospective PCN (3)
Adénovirus	94.6%		96.9%
Coronavirus HKU1	91.7%		99.7%
Coronavirus NL63	100%		99.2%
Coronavirus 229E	100%	100%	99.4%
Coronavirus OC43	80.5%		99.7%
MERS Coronavirus	n/a	100%	100%
Métapneumovirus humain	97.3%		99.5%
Rhinovirus humain/Entérovirus	97.5%		93.5%
Virus de la grippe A	100%	100%	100%
Virus de la grippe A/H1	n/a	100%	100%
Virus de la grippe A/H3	100%	100%	100%
Virus de la grippe A/H1-2009	100%		100%
Virus de la grippe B	100%	100%	99.9%
Virus parainfluenza 1	100%	100%	99.9%
Virus parainfluenza 2	97.9%	100%	99.5%
Virus parainfluenza 3	95.6%	100%	99.4%
Virus parainfluenza 4	100%	100%	99.6%
Virus respiratoire syncytial	99.4%		98.3%
<i>Bordetella parapertussis</i>	85.7%	100%	100%
<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)	66.7%	96%	99.9%
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	100%	100%	99.9%
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	95.8%	100%	99.7%

10 min préparation

45 min réalisation



Avantages approche syndromique

- ❑ Amélioration du diagnostic étiologique :
 - sensibilité – délai – disponibilité
 - détection de co-infection
 - meilleure maîtrise du risque des infections virales: isolement, traitement
 - ❑ Diminue les prescriptions antibiotiques
 - moindre pression de sélection antibiotique
 - moindre développement de résistance
 - meilleur pronostic
 - moindres coûts
 - ❑ Mais... ATB poursuivis dans 40 à 63% des cas malgré l'identification d'un virus respiratoire et une radio pulmonaire normale
- => Pas de différence de prescription entre résultats négatifs et présence de virus non grippaux (Green et al., J. Clin. Microbiol., 2016)

- ❑ Techniques difficiles à faire évoluer
Variabilité des souches – nouveaux virus
- ❑ Contrôles monoparamétriques : pas de validation de détection simultanée
- ❑ Techniques de biologie moléculaire: germe « vivant »? infectieux?
- ❑ Tests qualitatifs:
 - Quelle interprétation pour des germes commensaux?
 - Colonisation versus infection
- ❑ Co-détection de plusieurs agents infectieux
- ❑ Pas de détection de résistance aux antibiotiques (ou rare)

Virus de la rougeole

La rougeole est une des maladies infectieuses les plus contagieuses

Un malade peut contaminer jusqu'à

20 personnes



Les jeunes enfants, les adolescents
et les jeunes adultes sont
les plus concernés



Responsable d'infection généralisée + tropisme neurologique/respiratoire

Incubation: 10 à 14 jours

Contagiosité 5 j avant à 5 j après rash

Prodrome: fièvre, malaise, énanthème
(signe de Koplik)

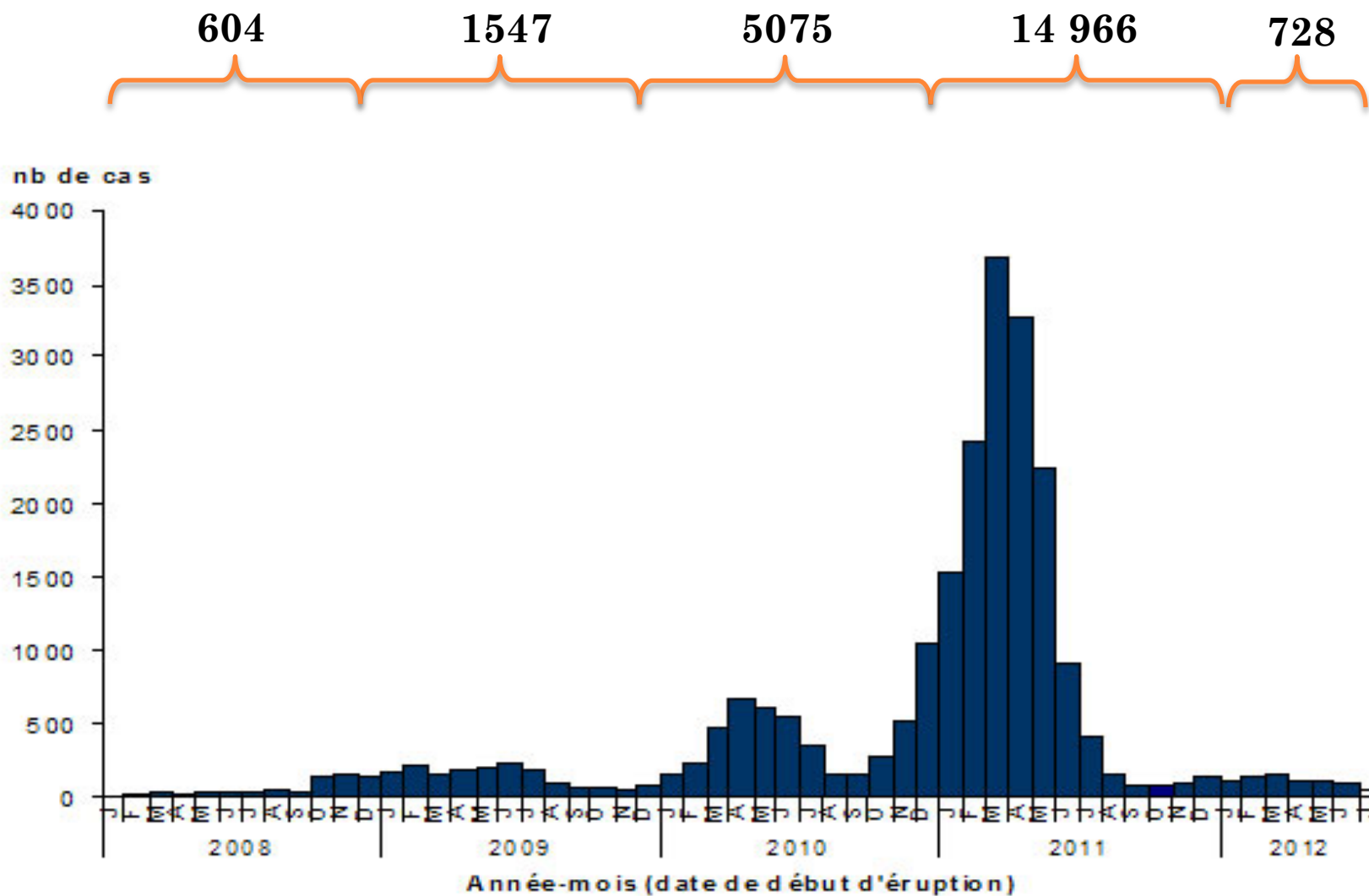
Forme commune: catarrhe oculo-nasal,
fièvre $>38^{\circ}\text{C}$, rash maculo-papuleux

Complications:

- encéphalites
- respiratoires: virale ou
surinfections bactériennes



Recrudescence de la rougeole depuis 10 ans



Données issues des déclarations obligatoires InVS puis SPF

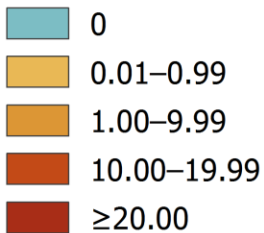
La rougeole en France en 2018

- ❑ Recrudescence de la rougeole depuis novembre 2017
- ❑ Au 14 octobre 2018, 2805 cas déclarés depuis le 6 novembre 2017 dont 2727 en 2018
- ❑ 85 départements ont déclaré au moins 1 cas au cours de la période
- ❑ Incidence la plus élevée chez les moins de 1 an: 30,7 cas/100 000 habitants
- ❑ 23 % des cas déclarés ont été hospitalisés
- ❑ 89 % des cas de rougeole sont survenus chez des sujets non ou mal vaccinés
- ❑ 3 décès au cours de l'année 2018

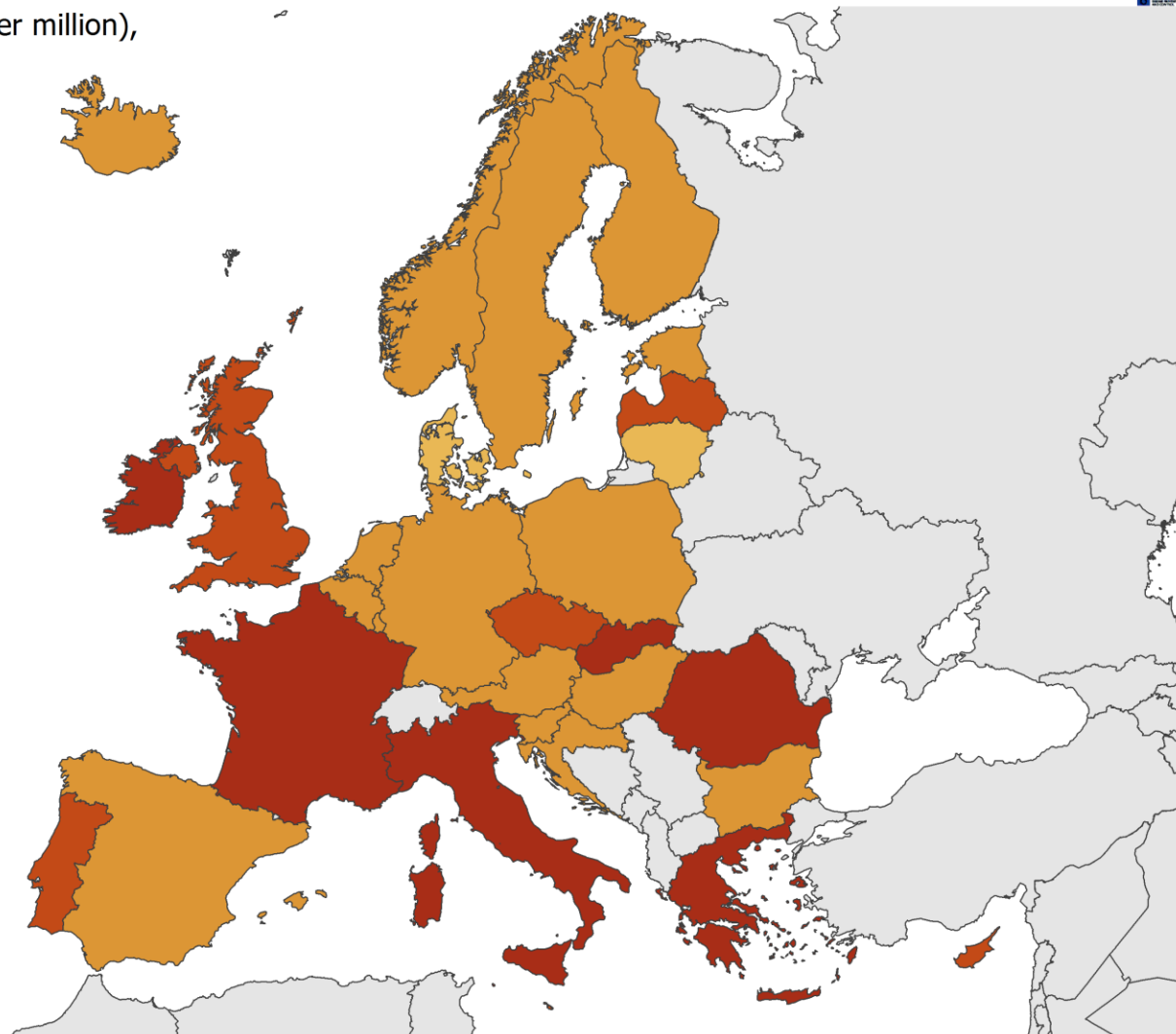
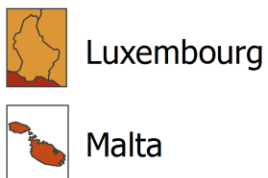
=> Déjà un décès de nourrisson en 2019 !

Epidémiologie de la rougeole en Europe

Notification rate of measles (per million),
September 2017–August 2018



Not included



La rougeole dans le monde

- ❑ dépêche **février 2019**: selon l'OMS, à la mi-janvier, près de 229.000 cas de rougeole avaient été signalés dans le monde pour 2018, contre environ 120.000 en 2017.
- ❑ Selon ces données provisoires, les régions les plus touchées par la rougeole en 2018 étaient l'Europe avec plus de 82.000 cas et l'Asie du Sud-Est avec plus de 73.000 cas.
- ❑ L'Afrique arrive en troisième position avec près de 34.000 cas, dont près de 4.400 rien qu'à Madagascar.

Diagnostic

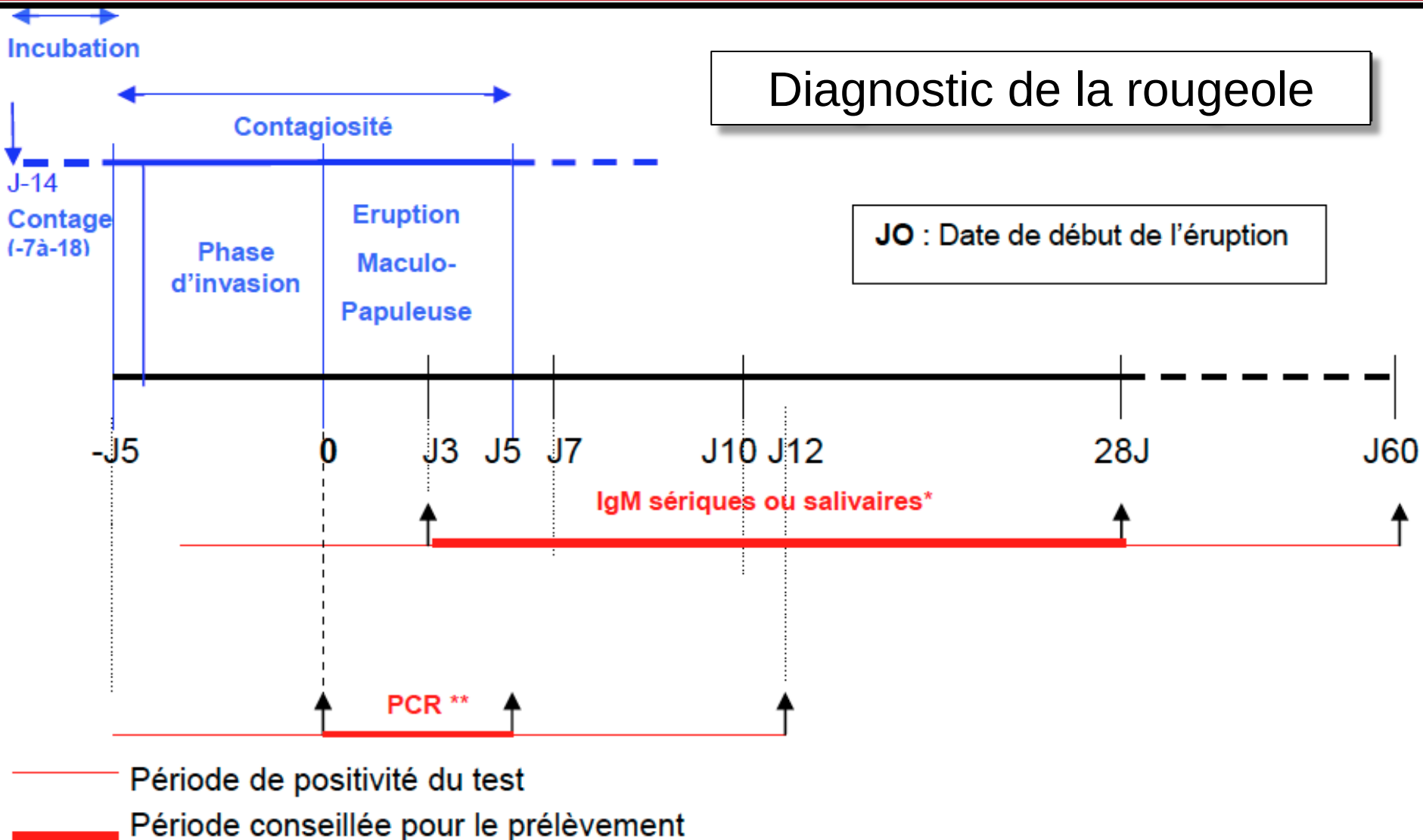
- ❑ Diagnostic avant tout clinique
- ❑ **Diagnostic direct**
 - culture: syncytia (pas utilisé en routine)
 - **PCR**: salive, urine, sang
- ❑ **Diagnostic indirect**: sérologie (test ELISA)
 - IgM: + dès 24-48 h → 30 j
 - IgG: décalées dans le temps, persistent à vie

=> choix des tests dépend du moment du diagnostic et des outils disponibles dans le laboratoire



Diagnostic de la rougeole

JO : Date de début de l'éruption



* Les anticorps IgM peuvent être détectés depuis l'apparition de l'éruption jusqu'à environ 60 jours après ; ils sont le plus souvent positifs entre +J3 et +J28 dans la salive et le sérum.

** L'ARN viral peut être détecté dans la salive, le nez, la gorge et l'urine de environ -J5 à +J12. La période de détection optimale dans le sang, la salive le nez ou la gorge s'étend de l'apparition de l'éruption à +J5.

Conclusion

- ❑ les tests immunochromatographiques et la sérologie peuvent garder une place en fonction de la situation clinique et du pathogène suspecté
- ❑ orientation de plus en plus fréquente vers les tests de biologie moléculaire
 - diagnostic rapide
 - approche syndromique
- ❑ ces nouvelles approches sont cependant très coûteuses
=> veiller à une utilisation raisonnée



Merci de votre attention

