

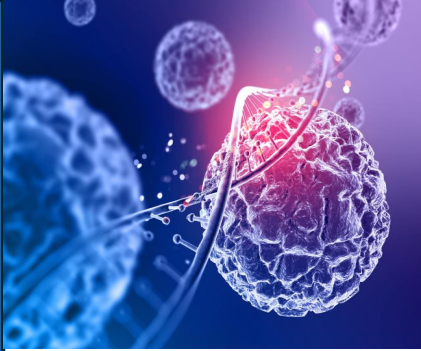
Actualités et Expérience Tunisienne

Pr Ag. Saba GARGOURI

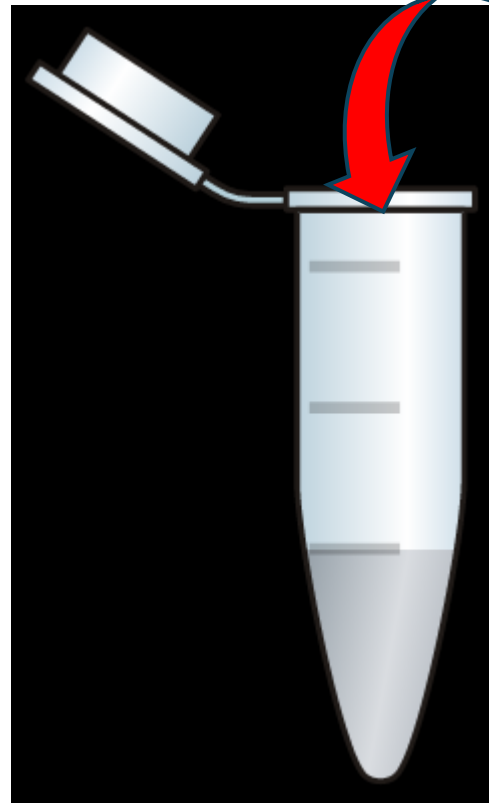
*Unité de Virologie, Laboratoire de Microbiologie
CHU Habib Bourguiba, Sfax, Tunisie*

10/05/2024

33^{ème} Congrès National de la STPI



C'est quoi le Multiplexage?



Tube PCR

ADN polymerase

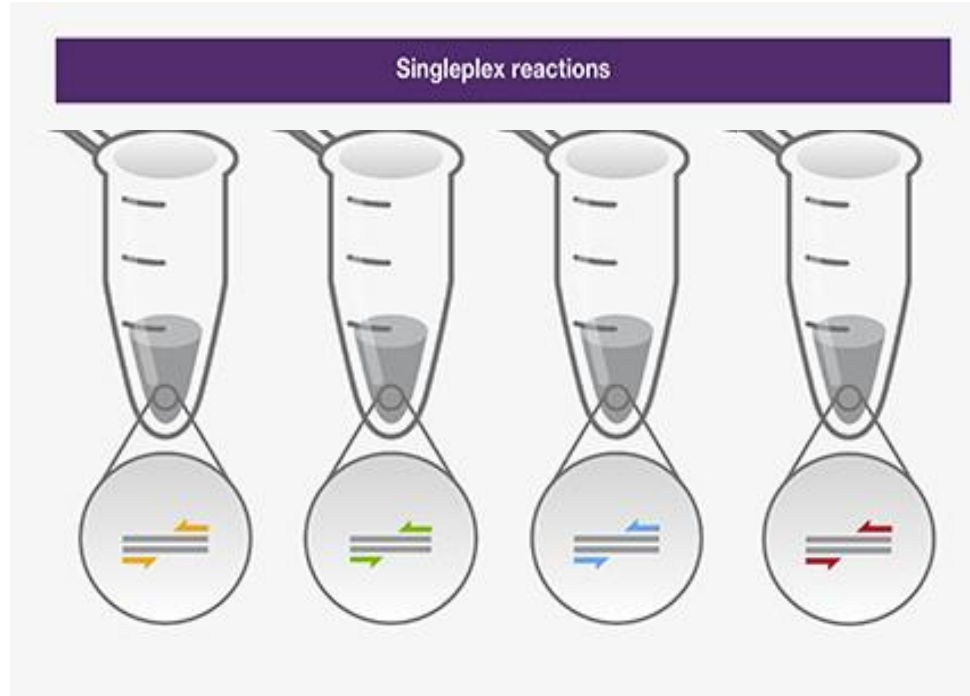
A T C G

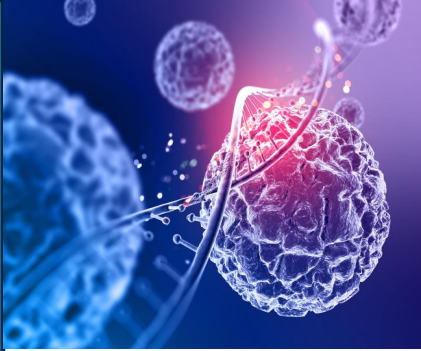
Couple d'Amorces
GACCACATTA

MgCl₂
MnSO₄

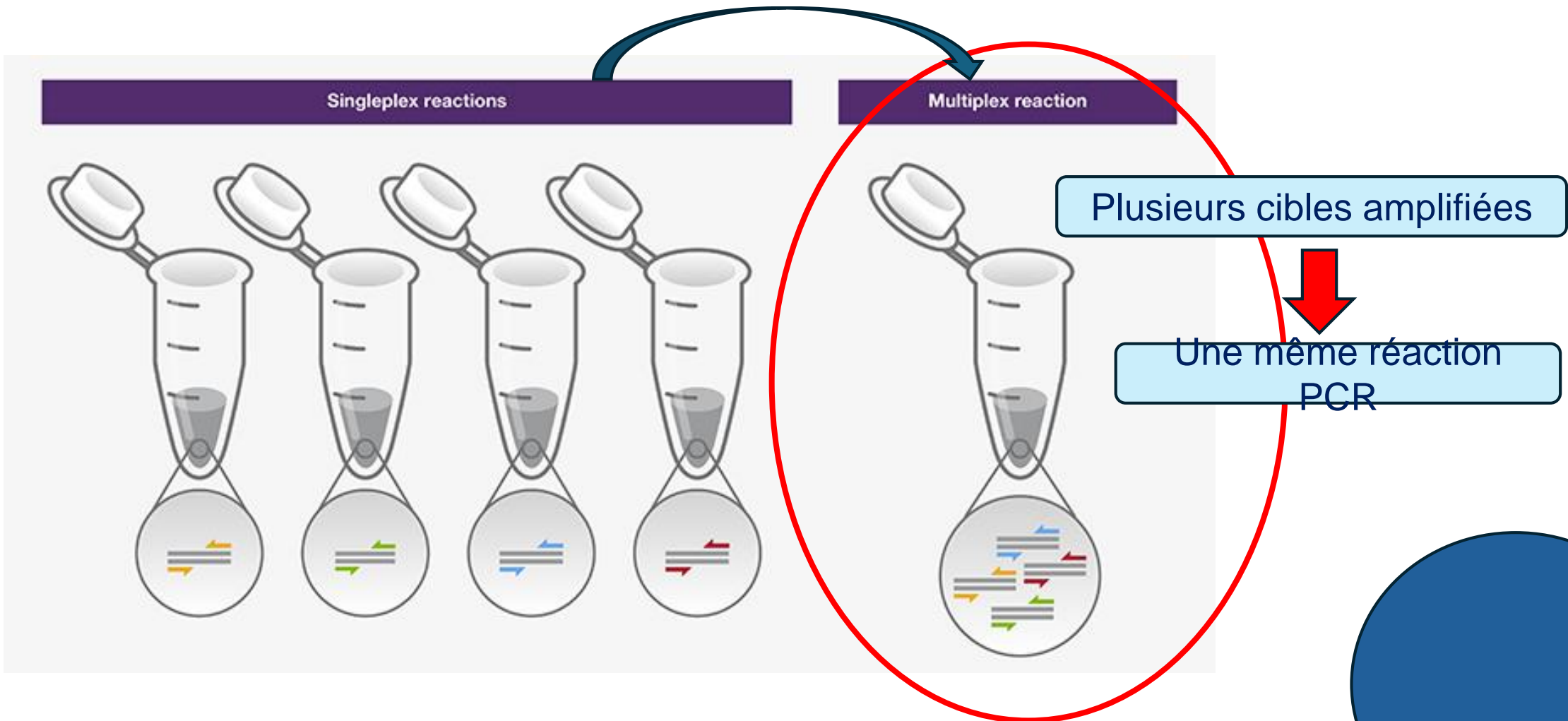


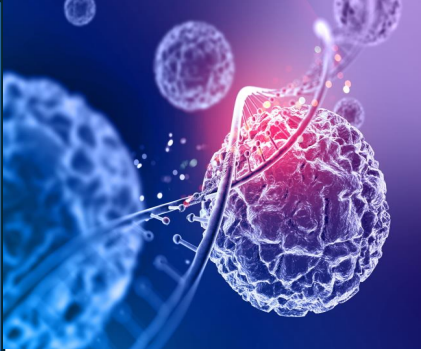
Matrice (ADN)





C'est quoi le Multiplexage?



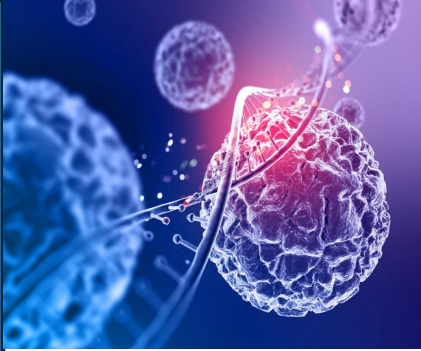


Evolution des techniques de PCR Multiplex

PCR en point-final

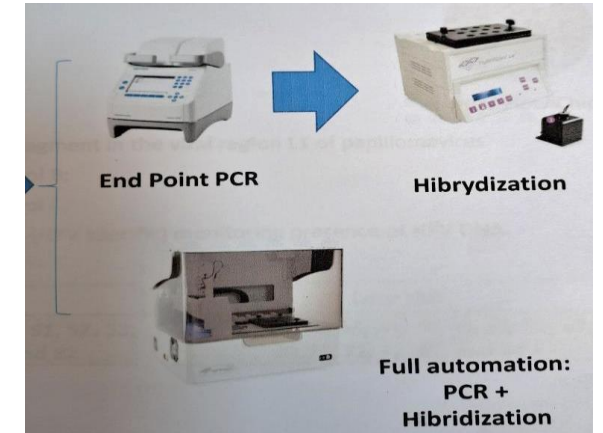
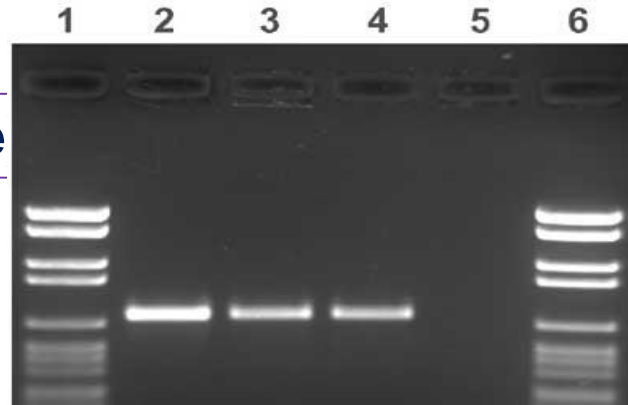
PCR digitale



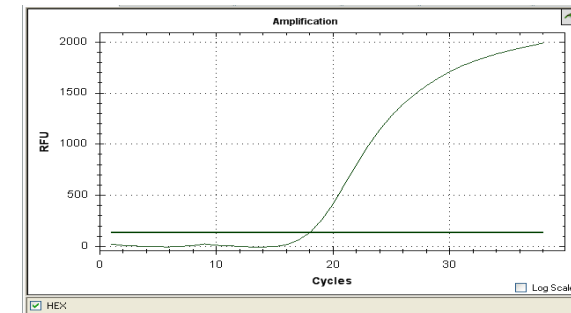


Evolution des techniques de PCR Multiplex

PCR en point-final (conventionnelle)



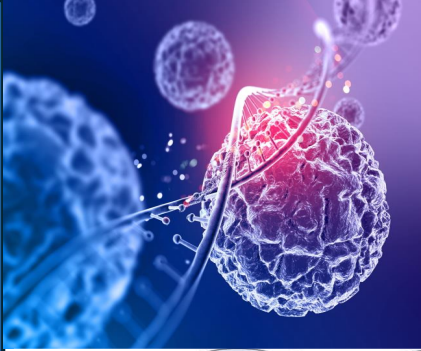
PCR en temps réel



PCR Duplex/Triplex rapides

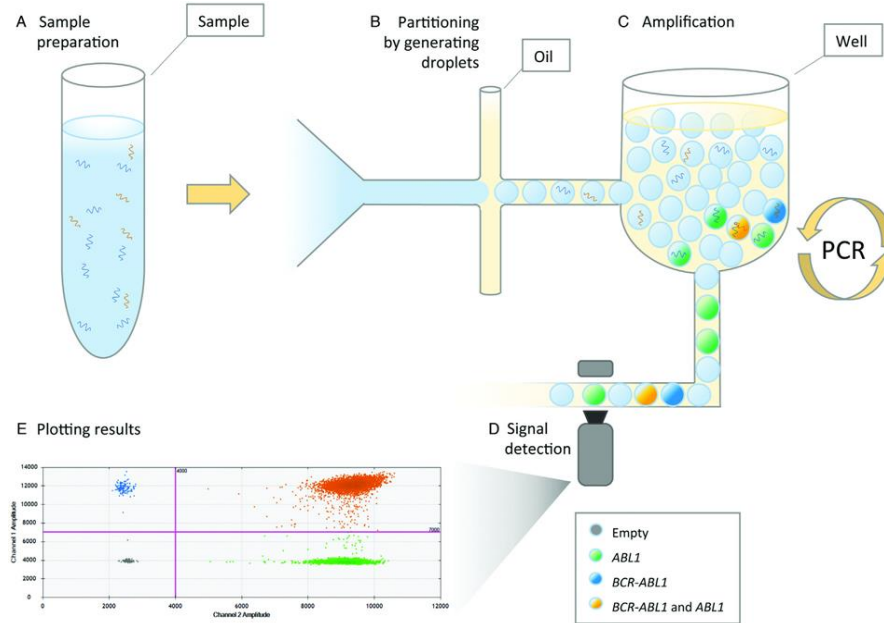
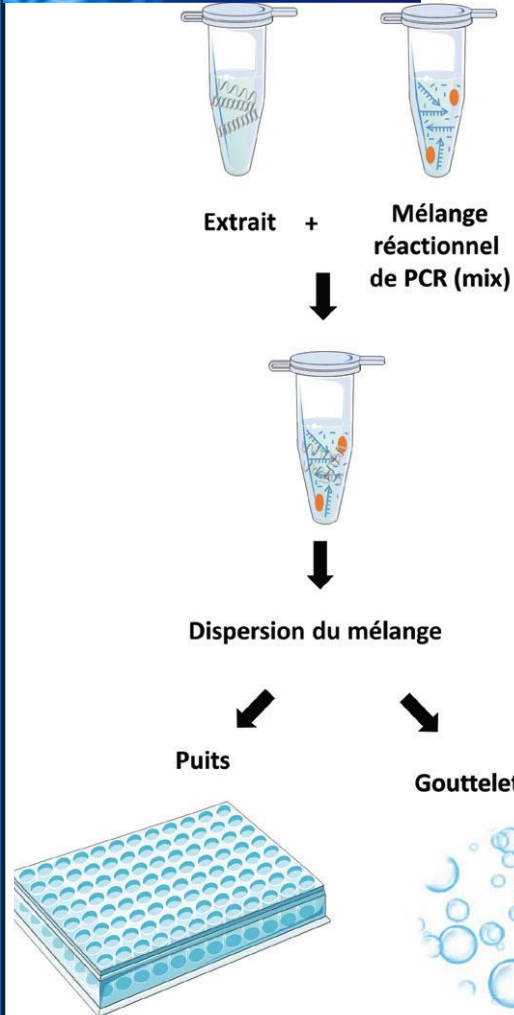
PCR Multiplex syndromiques ultrarapides





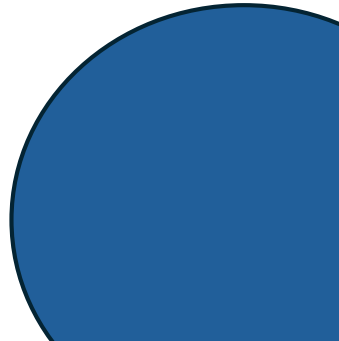
Evolution des techniques de PCR Multiplex

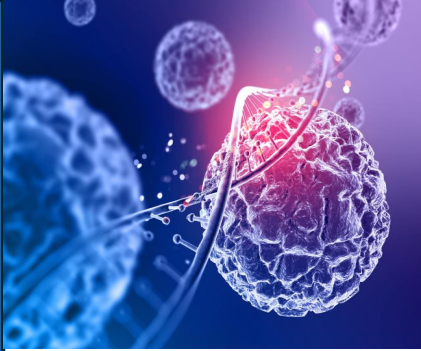
PCR digitale



- Sensibilité meilleure
- Quantification absolue
- Traitement des échantillons complexes
- Sensibilité moindre aux inhibiteurs

Identification des altérations génétiques dans le domaine de la **cancérologie et le diagnostic prénatal +++**





PCR Multiplex: applications ?

Détection du génome de plusieurs agents infectieux
(approche syndromique)

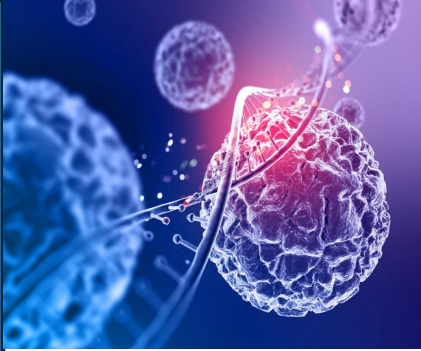


Identification des gènes
de résistance

Multiplexage

Caractérisation des variants
moléculaires de l'agent
infectieux

Caractérisation des populations de la flore du
prélèvement (microbiote)



Le diagnostic moléculaire syndromique

Plusieurs panels pour l'exploration de la quasi-totalité des infections +++

Un syndrome



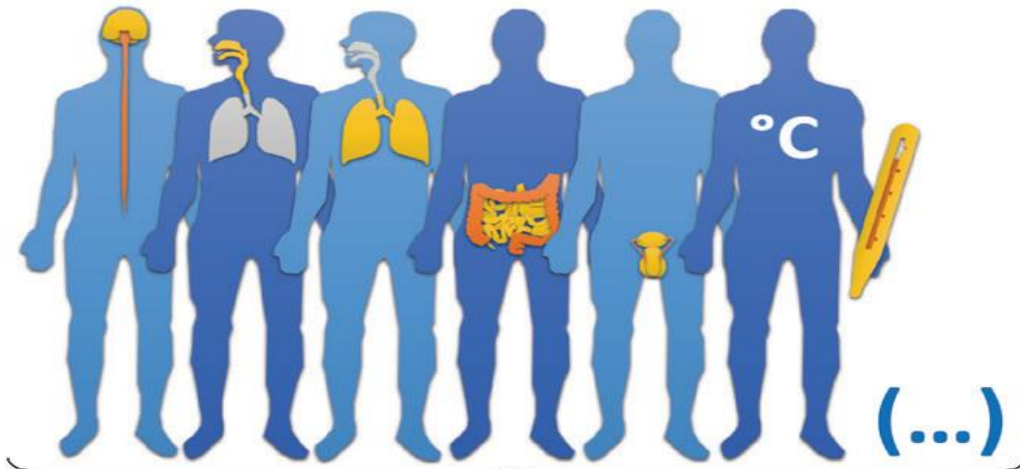
Un seul prélèvement



Un seul test



Un seul compte rendu



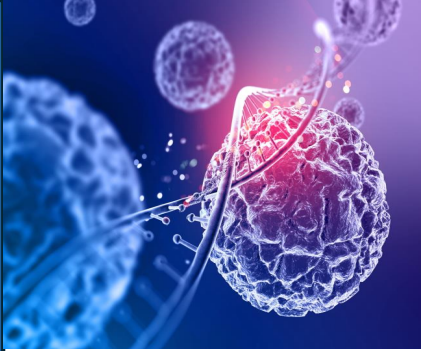
Bactériologie



Virologie



Parasitologie



Le diagnostic moléculaire syndromique

PCR multiplex non unitaire ou système intégré ?

Approches « usuelles » de biologie moléculaire :



Approches « intégrées » :

Toutes les étapes sont intégrées et réalisées au sein d'une cartouche de réactif.

Seul l'échantillon est ajouté avant passage sur un automate dédié.

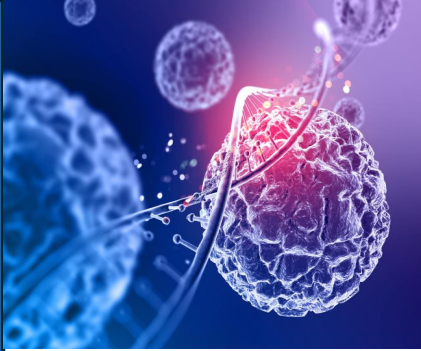


Plateformes « sample-to-answer »

Implantable en laboratoire d'urgence

Panels encore plus figés

< 5 min
< 2 h
€ ++++



Le diagnostic moléculaire syndromique

Systeme intégré de PCR multiplex: quels avantages?

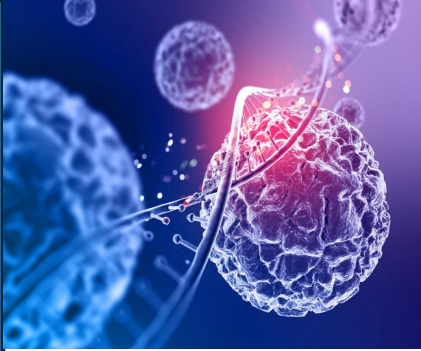
Panels syndromiques unitaires

- + Rapide
Pour peu d'échantillons
- + Facilité d'utilisation
Manipulation simple
- + Grands nombres d'agents pathogènes détectés simultanément
- + Détection de co-infections

vs

Techniques conventionnelles (PCR classique, cultures..)

- + Efficacité
Moins rapide mais traite un grand nombre d'échantillons
- + Quantification possible et plus fiable
- + Sensibilité souvent meilleure
- + Meilleure adaptabilité
En cas d'émergence d'un nouvel agent



Le diagnostic moléculaire

Infection respiratoire affectant l'arbre respiratoire haut



Virus indispensables (tri patients, Prévention/épidémiologie) :
SARS-CoV-2, Virus influenza type A et B, VRS

Virus souhaitables (Prévention/épidémiologie) :
Rhinovirus/Entérovirus, Métapneumovirus, Adénovirus, Bocavirus, Coronavirus 229E, OC43, NL63, HKU1, Virus parainfluenza 1, 2, 3 et 4

Bactéries souhaitables (traitement spécifique) :
Mycoplasma pneumoniae, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis*

Autres cibles inconstamment présentes :

Virus : MERS-CoV

Bactéries : *Legionella pneumophila*, *B. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*

- **Si *L. pneumophila* dans les cibles: prélèvement profond+++ (expectoration, aspiration, LBA)**

Nombreuses techniques (liste non exhaustive) :

BioFire Respiratory 2,1 plus (BioFire/bioMérieux), AUR 45', NQ, B+V

QIAstat-Dx® Respiratory Panel 2 (Qiagen), AUR 70', SQ, B+V

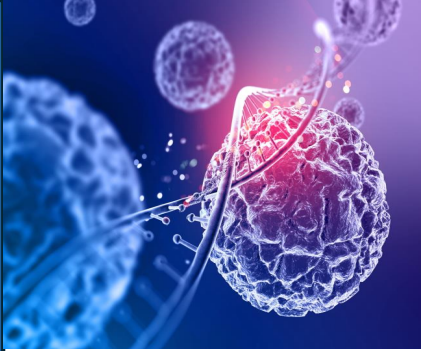
ePlex® Respiratory Pathogen 2 (GenMark Dx), AUR 70', NQ, B+V

Allplex™ Respiratory Panel Assays (Seegene), SAS 4h30, SQ, B+V

Respifinder® SMART-22 Fast (PathoFinder), SAS 6h, NQ, B+V

xTAG® Respiratory Viral Panel Fastv2 (Luminex), SAS 4h, SQ, V





Le diagnostic moléculaire

Infection respiratoire affectant l'arbre respiratoire profond



Virus indispensables (si utilisation mixte pneumonies communautaires/nosocomiales) : **SARS-CoV-2, Virus influenza type A et B, VRS**

Bactéries indispensables (traitement spécifique) : ***H. influenzae, S. pneumoniae, L. pneumophila, M. pneumoniae, C. pneumoniae, S. aureus, Acinetobacter, Enterobacter, Klebsiella, Proteus, Serratia, Pseudomonas aeruginosa***

Gènes de résistance indispensables (adaptation traitement) : **résistance à l'oxacilline si *S. aureus* (*mecA/C*), BLSE (*ctxM*) si entérobactérie**

Virus souhaitables (Prévention/épidémi.) :
SARS CoV-2, Rhinovirus/Entérovirus, Métapneumovirus, Adénovirus, CMV, Bocavirus, Coronavirus humains, Virus parainfluenza, MERS-CoV

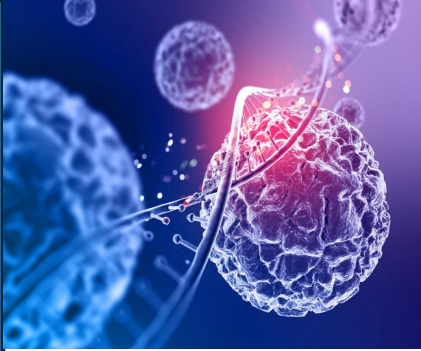
Autre cible souhaitable (traitement spécifique) : ***Pneumocystis jirovecii***

Autres cibles inconstamment présentes :

Bactéries : ***Citrobacter freundii, Morganella morganii, Stenotrophomonas maltophilia, S. agalactiae, S. pyogenes***

Filmarray® Pneumonia Panel plus (BioFire/bioMérieux),
AUR 1h, SQ, B+V

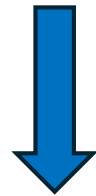
Unyvero Hospitalized Pneumonia Panel (OpGen),
AUR 5h, NQ, B+P (bactéries + *Pneumocystis jirovecii*)



Le diagnostic moléculaire syndromique des infections respiratoires

- Performances analytiques en général satisfaisantes:

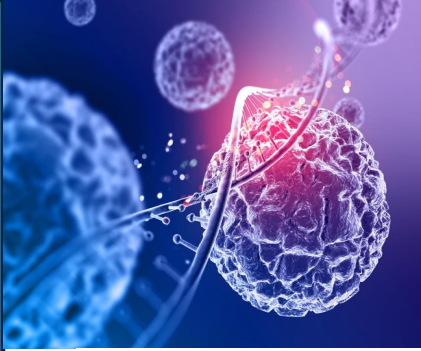
Pourcentages de concordance positive et négative > 90%



Variable



- d'un panel à un autre
- D'un pathogène à un autre au sein du même panel



Le diagnostic moléculaire syndromique des infections respiratoires



Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Respiratory Panel 2 for Detection of Viruses and Bacteria in Nasopharyngeal Swab Samples

Amy L. Leber,^a Kathy Everhart,^a Judy A. Daly,^b Aubrey Hopper,^b Amanda H. Kathleen McKinley,^c Matthew Jones,^d Kristen Holmberg,^d Bart Kensing^e

Concordance globale 99,2%

TABLE 4 Performance summary and characteristics of FilmArray RP2 versus those of the control

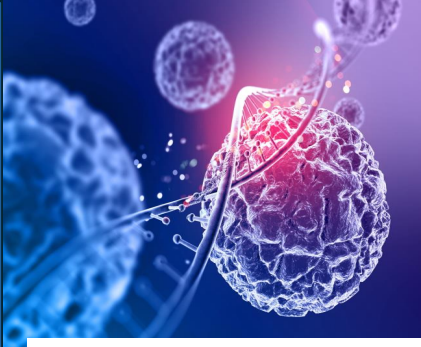
Analyte	PPA ^b			NPA		
	TP/(TP + FN)	%	95% CI	TN/(TN + FP)	%	95% CI
Viruses						
Adenovirus	70/74	94.6	86.9–97.9	1,490/1,538	96.9	95.9–97.6
Coronavirus 229E	11/12	91.7	64.6–98.5	1,595/1,600	99.7	99.3–99.9
Coronavirus HKU1	43/43	100	91.8–100	1,557/1,569	99.2	98.7–99.6
Coronavirus NL63	40/40	100	91.2–100	1,562/1,572	99.4	98.8–99.7
Coronavirus OC43	33/41	80.5	66.0–89.8	1,566/1,571	99.7	99.3–99.9
Human metapneumovirus	73/75	97.3	90.8–99.3	1,529/1,537	99.5	99.0–99.7
Human rhinovirus/enterovirus	425/436	97.5	95.5–98.6	1,099/1,176	93.5	91.9–94.7
Influenza virus A	78/78	100	95.3–100	1,531/1,531	100	99.7–100
H1	0/0			1,609/1,609	100	99.8–100
H1-2009	74/74	100	95.1–100	1,535/1,535	100	99.8–100
H3	4/4	100	51.0–100	1,605/1,605	100	99.8–100
Influenza virus B	14/14	100	78.5–100	1,596/1,598	99.9	99.5–100
Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)	0/0			1,612/1,612	100	99.8–100
Parainfluenza virus 1	9/9	100	70.1–100	1,602/1,603	99.9	99.6–100
Parainfluenza virus 2	46/47	97.9	88.9–99.6	1,557/1,565	99.5	99.0–99.7
Parainfluenza virus 3	43/45	95.6	85.2–98.8	1,557/1,567	99.4	98.8–99.7
Parainfluenza virus 4	9/9	100	70.1–100	1,596/1,603	99.6	99.1–99.8
Respiratory syncytial virus	175/176	99.4	96.9–99.9	1,412/1,436	98.3	97.5–98.9
Bacteria						
<i>Bordetella parapertussis</i> (IS1001)	6/7	85.7	48.7–97.4	1,605/1,605	100	99.8–100
<i>Bordetella pertussis</i> (ptxP)	2/3	66.7	20.8–93.9	1,608/1,609	99.9	99.6–100
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	5/5	100	56.6–100	1,606/1,607	99.9	99.6–100
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	23/24	95.8	79.8–99.3	1,583/1,588	99.7	99.3–99.9

Multicenter Evaluation of the BioFire Respiratory Panel 2.1 (RP2.1) for Detection of SARS-CoV-2 in Nasopharyngeal Swab Samples

Gregory J. Berry^{a,b}, Wei Zhen^a, Elizabeth Smith^a, Ryhana Manji^a, Suzane Silbert^c, Amorice Lima^c, Amanda Harington^d, Kathleen McKinley^d, Bart Kensing^e, Crissy Neff^e, Daisy Lu^e



Le panel 2.1 présente des % de concordance excellents (PPA et NPA > 98%), en comparaison avec les autres tests moléculaires disponibles



Le diagnostic moléculaire syndromique des infections respiratoires

Journal of Infection 86 (2023) 462–475



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Infection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinf



Rapid multiplex PCR for respiratory viruses reduces time and improves clinical care: Results of a systematic review

- Méta-analyse (27 études, 17,321 patients)
- Impact de l'utilisation des PCR multiplex « sample-to-answer » chez les patients hospitalisés pour infection respiratoire

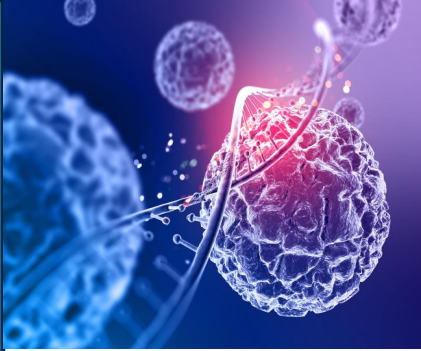
Réduction du délai de rendu des résultats (- 24.22 h (95% CI -28.70 to -19.74 h))

Réduction de la durée de séjour -0.82 days (95% CI -1.52 to -0.11 days)

Administration <6h des inhibiteurs de neuraminidase chez les patients infectés par le virus de la grippe (RR 1.25, 95% CI 1.06–1.48)

Application à temps des mesures préventives (RR 1.55, 95% CI 1.16–2.07)

**Utilisation « en routine »
de ces tests pour la
recherche des virus
respiratoires en milieu
hospitalier**

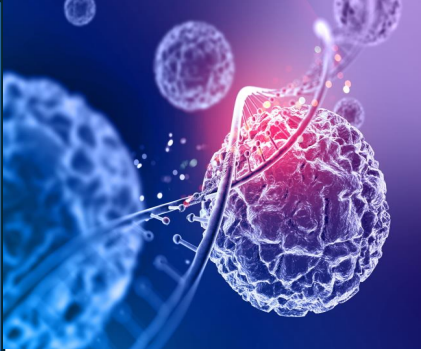


Le diagnostic moléculaire syndromique des infections respiratoires

- Ces tests syndromiques restent chers+++, mais ils sont essentiels dans une population ciblée avec des symptômes respiratoires tels que:

- Patients transplantés
- Personnes immunodéprimées
- Patients aux soins intensifs
- Patients avec une maladie respiratoire chronique
- Enfants en détresse respiratoire
- Nouveau-nés

- **Introduction d'un ttt spécifique (si celui-ci existe)**
- **Réduction de la morbi-mortalité**

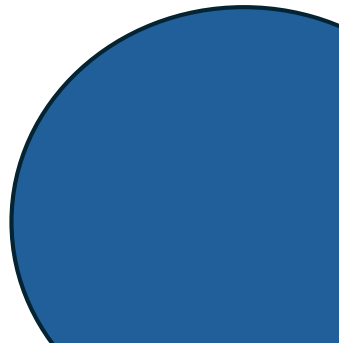


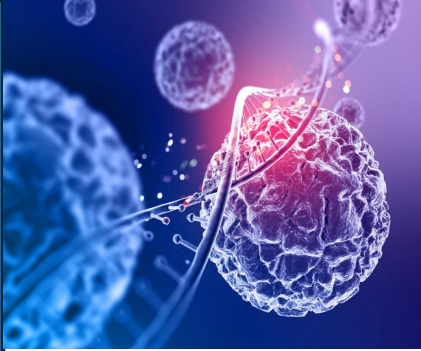
Le diagnostic moléculaire syndromique des infections respiratoires: limites?



- Coût élevé (notamment des systèmes intégrés), intérêt des études médico-économiques?
- Détection d'un fragment de génome (s'agit-il d'une infection active? passée? ou d'un portage asymptomatique?)
- **Manque de quantification de la plupart des techniques multiplex**

(signification des coinfect





Le diagnostic moléculaire syndromique des infections respiratoires

BioFire Respiratory 2,1 plus (BioFire/bioMérieux)



Respifinder® SMART-22 Fast (PathoFinder),

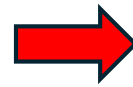


Allplex™ Respiratory Panel Assays (Seegene),

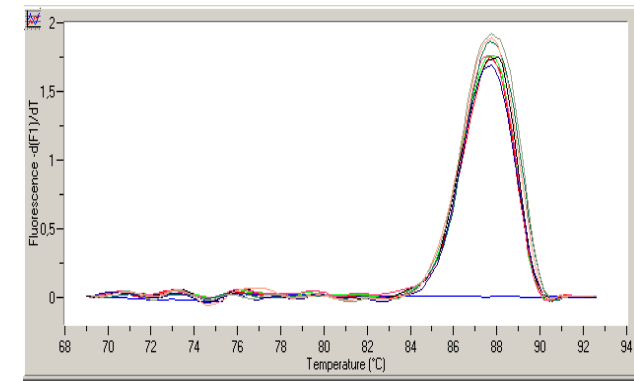
QIAstat-Dx® Respiratory Panel 2 (Qiagen),



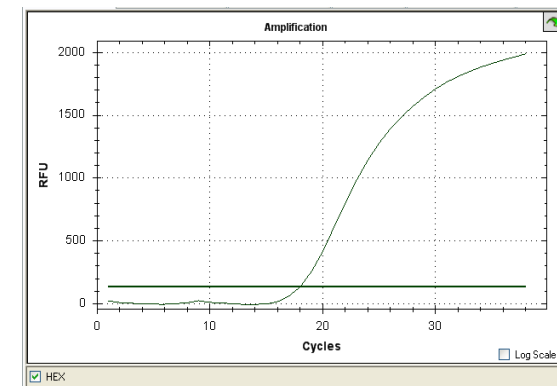
xTAG® Respiratory Viral Panel Fastv2 (Luminex),

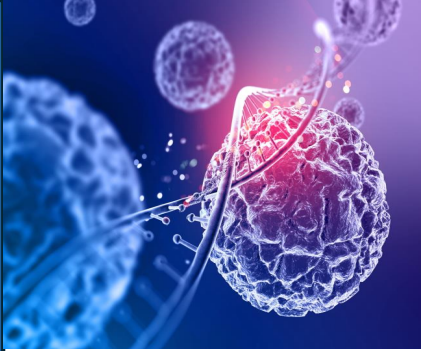


Détection qualitative, courbes de fusion



Détection semi-quantitative, Ct (cycle threshold)





Le diagnostic moléculaire syndromique des infections respiratoires

La connaissance du test est essentielle

(Quels sont les pathogènes ciblés? Pour quelles performances? Quelle est la probabilité pré-test?)

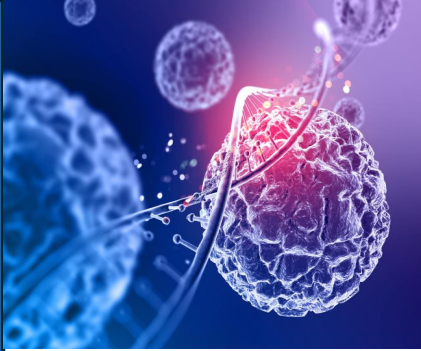


Interprétation en fonction

Prélèvement

Type de patient

Situation
épidémiologique



PCR multiplex et épidémiologie des virus respiratoires

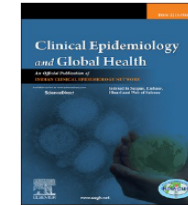
Clinical Epidemiology and Global Health 21 (2023) 101306



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Clinical Epidemiology and Global Health

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cegh



Molecular assays used for respiratory pathogens detection.

Respiratory Pathogens	End-point Multiplex RT-PCR	Real Time PCR
	Multiplex 1	
Influenza Virus A (IFVA)	✓	
Influenza Virus B (IFVB)	✓	
Human Respiratory Syncytial Virus (RSV)	✓	
Human Metapneumovirus (HMPV)	✓	
	Multiplex 2	
Human Parainfluenza Virus 1 (PIV1)	✓	
Human Parainfluenza Virus 2 (PIV2)	✓	
Human Parainfluenza Virus 3 (PIV3)	✓	
Human Parainfluenza Virus 4 (PIV4)	✓	
	Multiplex 3	
Human Enterovirus/Rhinovirus (HEV/HRV)	✓	
Influenza Virus C (IFVC)	✓	
	Multiplex 4	
Human Coronavirus (HCoV-NL63)	✓	
Human Coronavirus (HCoV-E229)	✓	
Human Coronavirus (HCoV-OC43)	✓	
Human Coronavirus (HCoV-HKU1)	✓	
Adenovirus (ADV)		✓

Significant impact of COVID-19 pandemic on the circulation of respiratory viruses in Tunisia, 2020–2021

Awatef Taktak ^{a,c,*}, Fahmi Smaoui ^a, Amel Chtourou ^{a,b}, Mouna Maâloul ^{a,b}, HÉla Karray-Hakim ^{a,b}, Adnene Hammami ^{a,b}, Lamia Fki-Berrajah ^{a,b}, Saba Gargouri ^{a,b}

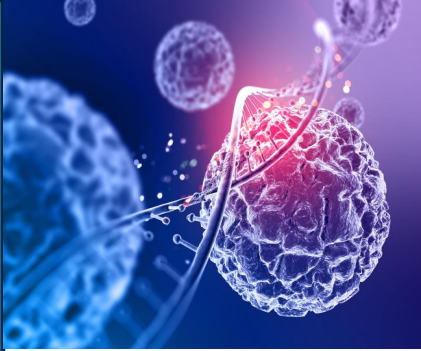
^a Laboratory of Microbiology, Habib Bourguiba University-Hospital, Rue El Ferdaous, 3003, Sfax, Tunisia

^b Faculty of Medicine, University of Sfax, Avenue Majida Boulila, 3029, Sfax, Tunisia

^c Laboratory of Molecular Biotechnology of Eukaryotes, Center of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, Sidi Mansour Street Km 6, BP 1177, 3038, Sfax, Tunisia

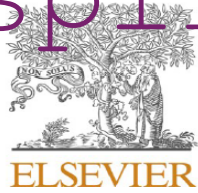
- 284 prélèvements nasopharyngés négatifs pour le SARS-CoV-2, Octobre 2020-Mai 2021
- Évaluer la prévalence des virus respiratoires saisonniers durant la pandémie COVID-19.





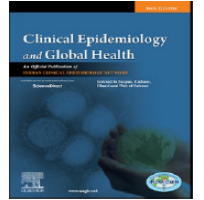
PCR multiplex et épidémiologie des virus respiratoires

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)



Clinical Epidemiology and Global Health

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cegh



Significant impact of COVID-19 pandemic on the circulation of respiratory viruses in Tunisia, 2020–2021

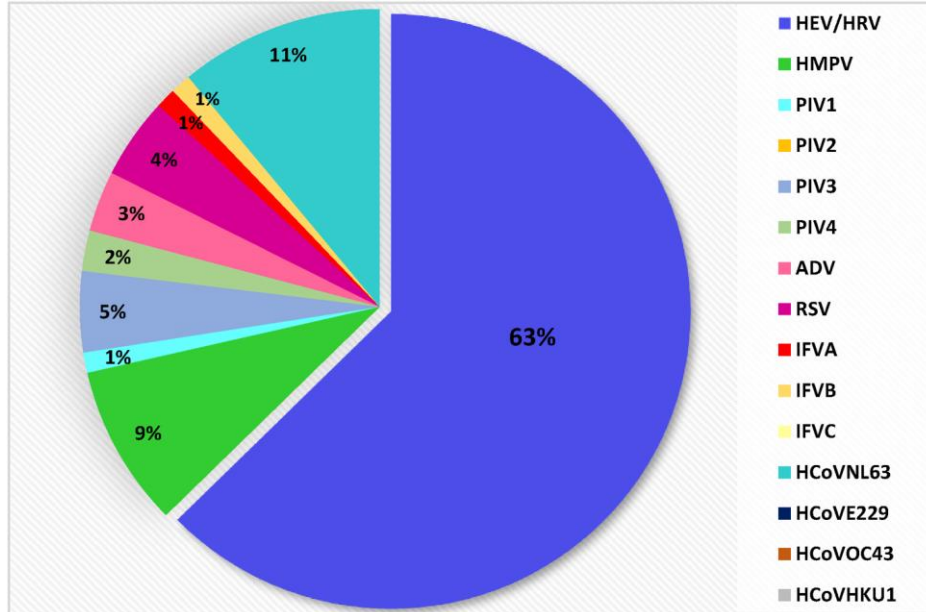
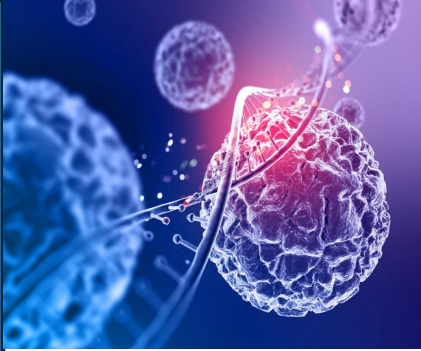


Fig. 1. Positivity rate of respiratory viruses from October 2020 to May 2021.

- Taux de positivité (au moins un virus): **30,6%**
- HEV/HRV +++++
- Activité des virus grippaux presque inexistante, de même que pour le VRS
- Taux de coinfections: **3,4%**

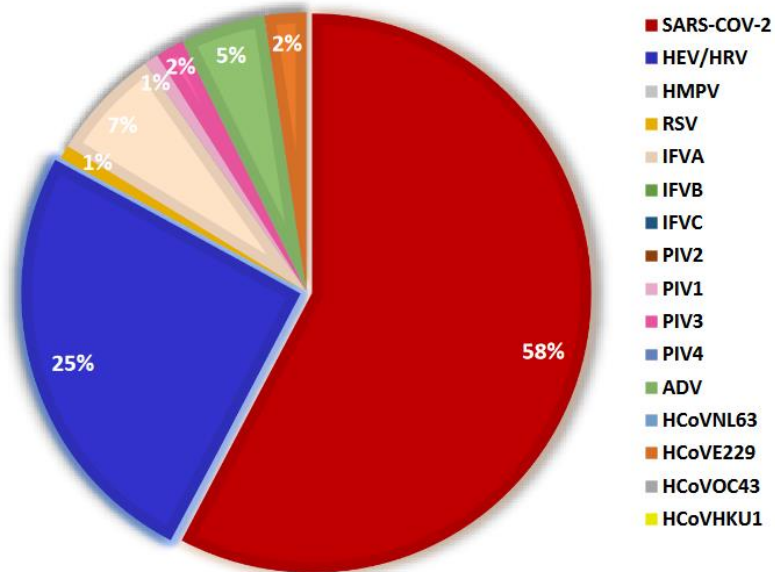


PCR multiplex et épidémiologie des virus respiratoires

Circulating respiratory viruses including SARS-CoV-2 during 2021-2022 season in Tunisia:

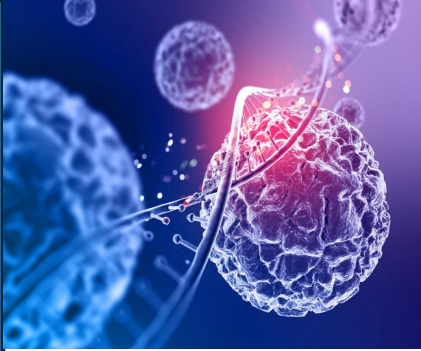
Epidemiological and dynamic changes

- 328 prélèvements nasopharyngés, Septembre 2021-Mai 2022
- Évaluer la prévalence des virus respiratoires, y compris le SARS-CoV-2 durant cette période



- Taux de positivité (au moins un virus): **35,9%**
- Reprise de l'activité des virus grippaux: **15,3%** parmi les non-SARS-CoV-2 (IFV A H3N2+++)
- Taux de coinfections: **3,3%**

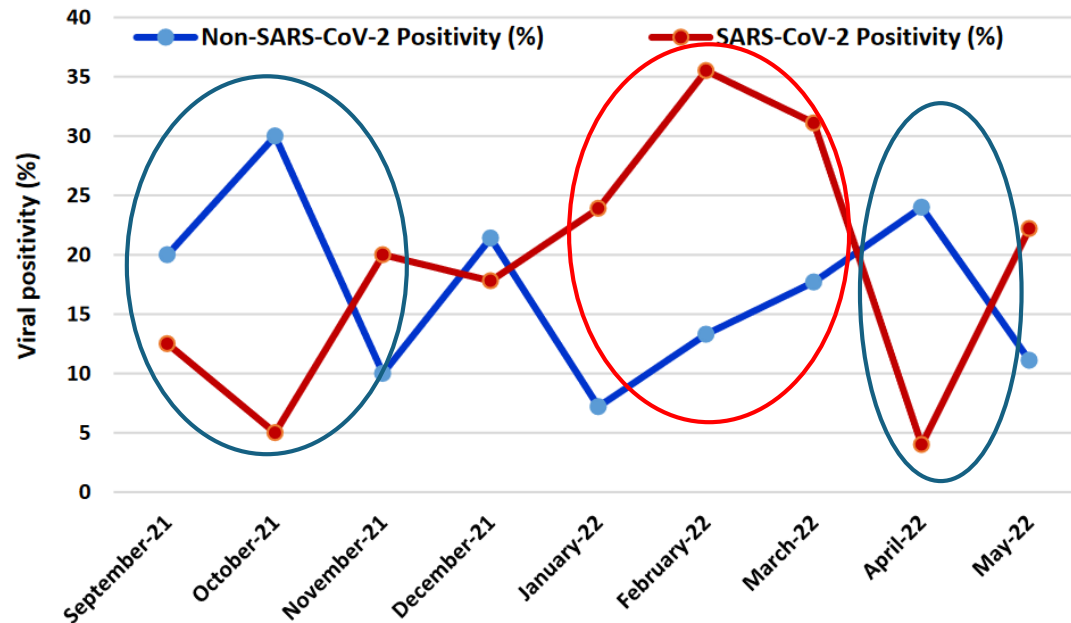
Figure 1: Positivity rate of detected viruses from September 2021 to May 2022.



PCR multiplex et épidémiologie des virus respiratoires

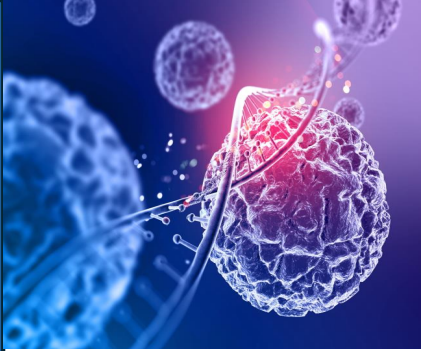
Circulating respiratory viruses including SARS-CoV-2 during 2021-2022 season in Tunisia:

Epidemiological and dynamic changes



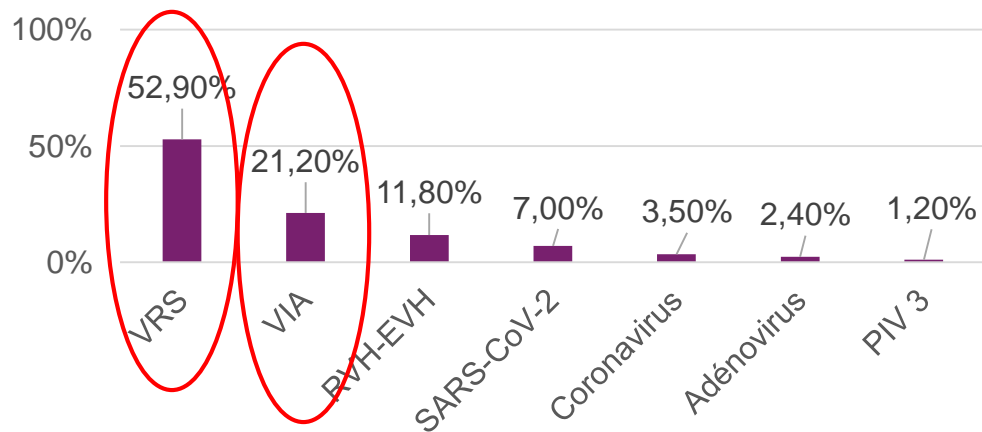
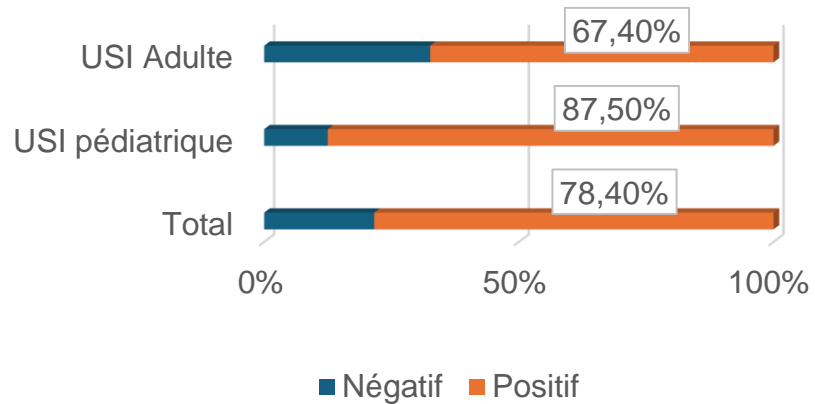
- **Interaction virale négative** très probable, exercée par le SARS-CoV-2
- Taux de positivité plus faibles des non-SARS-CoV-2 au moment de la vague Omicron (7,2%-17,7%)

Figure 3: Dynamics of circulation of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses during the study period.



PCR multiplex et épidémiologie des virus respiratoires

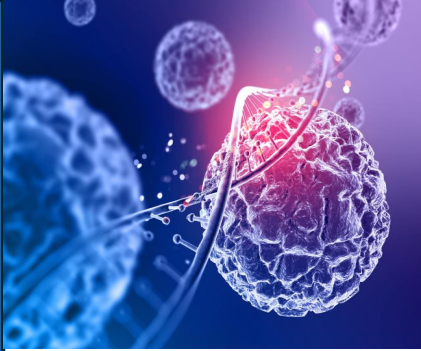
Profil épidémiologique des virus respiratoires en milieu de soins intensifs dans la région de Sfax en début 2024



- 88 prélèvements nasopharyngés provenant des patients hospitalisés en USI pour une symptomatologie respiratoire aiguë sévère

- Taux de coinfections: **23,2%+++**

- IFVA H1N1 pdm 2009 +++ (~ **80%**)



Pour conclure...

Algorithmes diagnostiques encore imprécis et peu évalués



**Rationalisation du choix du test
Interprétation fiable des résultats**

