

CAT

Critically Appraised Topic

Laboratoriumdiagnose van respiratoire virale infecties: evaluatie van de huidige PCR.

Author: Sarah Ressler
Supervisor: Prof. Dr. J. Van Eldere
Date: 31/03/2009
Expiry date: 31/03/2011

CLINICAL BOTTOM LINE

Acute luchtweginfecties zijn de belangrijkste reden voor het consulteren van een arts en voor hospitalisatie van kinderen. Een significant deel van deze infecties worden veroorzaakt door virale pathogenen. Hoewel het grootste deel van deze infecties een gunstig verloop kent, kan hospitalisatie toch noodzakelijk zijn. Het is vaak moeilijk voor klinici om een onderscheid te maken tussen virale en bacteriële oorzaken, voornamelijk bij ernstige lage luchtweginfecties, wat kan resulteren in onnodig antibioticagebruik. Effectieve laboratoriumdiagnose van virale luchtweginfecties kan hierbij van groot belang zijn.

Virusisolatie met behulp van celculturen, meestal in combinatie met directe immunofluorescentie, is de gouden standaard voor de laboratoriumdiagnose van virale respiratoire infecties. Deze methoden zijn echter zeer arbeidsintensief, hebben lange turn around tijden, een beperkte gevoeligheid en kunnen niet alle belangrijke virale respiratoire pathogenen detecteren. Moleculaire technieken hebben een hogere sensitiviteit en specificiteit dan de traditionele methoden en laten de detectie van een groter aantal pathogenen toe. Theoretisch verwacht men dat een snellere detectie van respiratoire virussen een klinische impact heeft, door een effect op de hospitalisatieduur en het antibioticagebruik, en daardoor ook economische voordelen. In werkelijkheid leidt de implementatie van uitgebreide moleculaire diagnostiek tot een belangrijke toename van het aantal geïdentificeerde respiratoire virussen, maar ziet men geen duidelijke klinische impact (antibioticagebruik, hospitalisatieduur, bijkomende onderzoeken). Moleculaire technieken zijn superieur ten opzichte van traditionele technieken in de diagnostiek van virale respiratoire infecties, maar bieden slechts een meerwaarde als ze kosten effectief worden geïmplementeerd in de klinische praktijk.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Virussen kunnen op verschillende plaatsen van de respiratoire tractus een infectie veroorzaken en zo aanleiding geven tot heel wat verschillende klinische presentaties. Bovenste luchtweginfecties zijn het meest frequent, met symptomen als rhinorree, conjunctivitis, faryngitis, otitis media en sinusitis. Jonge kinderen maken gemiddeld 6 tot 9 bovenste luchtweginfecties per jaar door, bij adolescenten en volwassenen daalt dit tot gemiddeld 2 tot 4 bovenste luchtweginfecties per jaar. Lage luchtweginfecties zoals pneumonie, bronchitis,

bronchiolitis, kroep, etc., zijn veel minder frequent. Ongeveer één derde van de kinderen maakt een lage luchtweginfectie door in het eerste levensjaar, bij schoolgaande kinderen daalt dit tot 5-10%, en deze incidentie daalt verder tot ongeveer 5% bij gezonde volwassenen om dan weer toe te nemen tot ongeveer 17% bij ouderen. Kleine kinderen, immuungecompromitteerden, onderliggende aandoeningen (vnl. cardiopulmonaal), ouderen zijn de belangrijkste risicogroepen voor virale lage luchtweginfecties. Deze virale lage luchtweginfecties zijn de belangrijkste groep luchtweginfecties waarvoor artsen geconsulteerd worden en jonge kinderen gehospitaliseerd worden. In de Verenigde Staten worden jaarlijks ongeveer 300 000 kinderen gehospitaliseerd met een specifieke diagnose van een virale lage luchtweginfectie, en nog eens 500 000 kinderen worden gehospitaliseerd met een klinische diagnose van een virale lage luchtweginfectie. (R1, R2)

De virussen die het meest frequent geassocieerd zijn met lage luchtweginfecties zijn respiratoir syncytieel virus A en B (RSV), influenza A en B, humaan para-influenza virus type 1, 2 en 3, adenovirussen, rhinovirussen en enterovirussen. Recent beschreven respiratoire pathogenen zijn humaan metapneumovirus (hMPV), coronavirus SARS en bocavirus. Bij een groot deel van de lage luchtweginfecties bij kinderen kan er geen virus aangetoond worden. Bij kinderen jonger dan één jaar is RSV de belangrijkste oorzaak van luchtweginfecties en de pathogeen die het vaakst resulteert in hospitalisatie. Er kunnen regelmatig twee of meer respiratoire virussen geïsoleerd worden bij een acute lage luchtweginfectie, deze co-infecties kunnen gepaard gaan met een ernstiger verloop van de ziekte. (Attachment 1) (R1,R3)

Welke virale respiratoire pathogenen kunnen momenteel in UZ Gasthuisberg met PCR gediagnosticeerd worden?

Respiratoir Syncytieel Virus (RSV)

RSV is de belangrijkste oorzaak van respiratoire infecties bij kinderen jonger dan één jaar, en heeft een belangrijke impact op de kosten van de gezondheidszorg daar deze infecties frequent aanleiding geven tot hospitalisatie. Bijna alle kinderen hebben een RSV infectie doorgemaakt op de leeftijd van twee jaar.

RSV is een enkelstrengig RNA-virus met envelop en behoort tot de familie Paramyxoviridae. Er zijn twee RSV subtypes beschreven, RSV A en RSV B, die beiden op hetzelfde ogenblik circuleren. RSV heeft een voorspelbaar epidemisch voorkomen met een piekincidentie in de winterperiode, van november tot maart.

Transmissie van het virus gebeurt in belangrijke mate door direct contact met besmette handen of voorwerpen, RSV kan gedurende enkele uren overleven op handen en voorwerpen, of door droplet infectie in neus en ogen, minder langs de mond. Na replicatie in de nasofarynx verspreidt het virus zich na één tot drie dagen naar de lagere luchtwegen.

Primo-infecties bij zuigelingen presenteren zich meestal eerst als een (febriele) infectie van de bovenste luchtwegen, verspreiding naar de lagere luchtwegen manifesteert zich enkele dagen later als bronchiolitis, pneumonie, tracheobronchitis of minder frequent kroep. Herinfecties bij oudere kinderen manifesteren zich meestal als milde bovenste luchtweginfecties (Attachment 2). RSV is de oorzaak van 50 tot 90% van de hospitalisaties voor bronchiolitis, 5 tot 40% van deze voor pneumonie en 10 tot 30% van deze voor tracheobronchitis. Kinderen met onderliggende aandoeningen, zoals chronische longaandoeningen, congenitale cardiale aandoeningen, immuundeficiënties en prematuren hebben een hoog risico op een ernstig verloop van de infectie met respiratoir falen. (R4,R5)

Humaan metapneumovirus (hMPV)

hMPV werd in 2001 voor het eerst geïsoleerd bij kinderen en volwassenen met een acute luchtweginfectie in Nederland. De rol van hMPV in luchtweginfecties bij kinderen is in een aantal studies onderzocht geweest en wordt beschouwd als een belangrijke oorzaak voor luchtweginfecties. Net zoals RSV zijn respiratoire infecties veroorzaakt door hMPV frequent bij jonge kinderen, maar primaire infecties treden op iets oudere leeftijd op dan RSV. Seroprevalentie studies hebben aangetoond dat de meeste kinderen op de leeftijd van vijf jaar een hMPV infectie hebben doorgemaakt. (R6, R7, R8)

hMPV is een enkelstrengig RNA-virus met envelop en behoort tot de familie Paramyxoviridae, subfamilie Pneumovirinae waar ook RSV toe behoort. Het virus circuleert voornamelijk in de wintermaanden en de vroege lente.

De wijze van transmissie van het virus is nog niet bestudeerd, maar zal meest waarschijnlijk via contact met gecontamineerde secreties plaatshebben.

De symptomen zijn in belangrijke mate vergelijkbaar met luchtweginfecties veroorzaakt door RSV, variërend van een milde bovenste luchtweginfectie tot ernstige bronchiolitis, kroep, pneumonie, vaak geassocieerd met hoge koorts, en otitis media is een frequente complicatie. Net zoals bij RSV infecties kan bij een ernstig verloop van de infectie hospitalisatie en mechanische ventilatie aangewezen zijn. (R6, R7, R9)

Influenza

Influenza is verantwoordelijk voor jaarlijkse epidemieën van influenza-like illness (ILI) en/of acute luchtweginfecties. Deze epidemieën variëren in ernst en attack rate. In een gemiddeld jaar zal ongeveer 20% van de kinderen een influenza infectie doormaken, hoewel dit percentage hoger kan liggen tijdens sommige jaren of in sommige populaties zoals kinderen in kinderdagverblijven.

Het influenzavirus is een enkelstrengig RNA virus met envelop en behoort tot de familie Orthomyxoviridae. Er zijn drie types geïdentificeerd namelijk influenza A, B en C. In onze streken komt influenza epidemisch voor, voornamelijk in de wintermaanden.

Transmissie gebeurt via respiratoire droplets en secreties en via besmette handen of voorwerpen. Replicatie van het virus vindt plaats in de respiratoire tractus.

Bij gezonde kinderen presenteert een influenza infectie zich meestal als een acute, zelf-limiterende ziekte, vaak met respiratoire symptomen, zonder complicaties. De infectie kan echter ook een meer ernstig verloop hebben, voornamelijk bij jonge kinderen en bij kinderen met onderliggende ziekten. Studies tonen een hospitalisatie graad aan die kan variëren van 1-2 tot 2-5 per 1000 gezonde kinderen jonger dan twee jaar aan. De klinische presentaties bij deze jonge kinderen zijn onder andere otitis media met later lage luchtweginfecties (bronchiolitis, pneumonie,...), koorts zonder duidelijke focus. (R10)

Wat zijn de recente trends in de laboratoriumdiagnostiek van virale respiratoire infecties?

Hoewel respiratoire luchtweginfecties de belangrijkste oorzaak zijn van het consulteren van artsen en hospitalisatie van jonge kinderen, is laboratoriumdiagnostiek niet bij iedereen en onder alle omstandigheden aangewezen. Specifieke richtlijnen over de indicaties van laboratoriumonderzoek bij luchtweginfecties zijn er niet. De American Academy of Pediatrics heeft een clinical practice guideline opgesteld voor de diagnose en behandeling van bronchiolitis, de meest voorkomende infectie van de lage luchtwegen bij jonge kinderen tot 2 jaar. Voor RSV, de meest frequente oorzaak van bronchiolitis, stellen zij dat, hoewel tijdens de jaarlijkse piekincidentie virologische testen voor RSV een hoge predictieve waarde hebben, virale diagnostiek zelden een invloed heeft op de behandeling of outcome van kinderen met een klinische diagnose van bronchiolitis.

Virale kweken op celculturen werd gedurende lange tijd beschouwd als de gouden standaard voor de diagnose van respiratoire infecties. Deze techniek heeft echter nadelen; het is namelijk zeer tijdrovend, is zeer gevoelig voor pre-analytische factoren (staalcondities zijn hier belangrijk om het virus in leven te houden), een lage sensitiviteit in vergelijking met moleculaire testen, en het laboratorium moet over de nodige faciliteiten beschikken. Voor epidemiologische doeleinden blijven virale kweken op celculturen echter wel nuttig.

Serologische testen zijn meestal niet nuttig voor de diagnostiek van acute virale luchtweginfecties, 10 tot 30% van patiënten met een bewezen virale luchtweginfectie blijven serologisch negatief.

Er is al heel wat vooruitgang geboekt in de snelle diagnostiek van virale luchtweginfecties. Antigen detectie assays zijn al meer dan 30 jaar ter beschikking, en worden nog altijd zeer frequent gebruikt omdat het goedkope en eenvoudige testen zijn. De sensitiviteit en specificiteit van deze assays zijn echter onvoldoende, voornamelijk bij een lage prevalentie van virale luchtweginfecties (buiten het seizoen) of in bepaalde patiëntenpopulaties, zoals immuungecompromitteerden en ouderen.

Moleculaire assays worden beschouwd als de nieuwe gouden standaard de detectie van respiratoire virussen. In de literatuur zijn de sensitiviteit en specificiteit bijna 100% vergeleken met virale celkweken of antigen detectie assays. Er zijn een aantal commerciële moleculaire assays beschikbaar, maar vaak wordt er gebruik gemaakt van “in-house assays” zoals ook het geval is in UZ Gasthuisberg. (R1,R2)

Bij veel patiënten met een virale luchtweginfectie zal men geen viraal agens kunnen identificeren. Er zijn verschillende verklaringen hiervoor, o.a. slechte staalafname, het virus wordt niet opgespoord met de gebruikte middelen, aanwezigheid van virale inhibitoren in het staal....

Het is de bedoeling van deze CAT de PCR te evalueren en na te gaan of een uitbreiding van het aantal pathogenen dat opgespoord wordt met PCR wenselijk is.

QUESTION(S)

1. Voldoet de huidige PCR voor RSV/hMPV en influenza aan de verwachtingen? Wat zijn de resultaten in vergelijking met de traditionele methoden?
2. Wat is de klinische impact van de snelle detectie van virale respiratoire pathogenen voor patiënten met een (lage) luchtweginfectie?
3. Is er vanuit de kliniek behoefte aan een uitbreiding van de PCR respiratoire virussen? Met andere woorden moeten we nog andere respiratoire virussen opsporen met PCR?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: “respiratory tract infection”, “respiratory syncytial virus”, “human metapneumovirus”, “polymerase chain reaction”, “influenza”, “bronchiolitis”.
Other key words: “real-time PCR”, “molecular assays”, “diagnosis of RSV”, multiplex-PCR”, “implementation”.
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews, Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)

- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), Belgian Infection Control Society (<http://www.belgianinfectioncontrolsociety.be>), Centers for Disease Control and Prevention (<http://www.cdc.gov>), Infectious Diseases Society of America (<http://www.idsociety.org/>), European Society Clinical Microbiology and Infectious Diseases (<http://www.escmid.org/>).
- 4) UpToDate Online version 16.3 (2008)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)

- American Academy of Pediatrics Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics* 2006;118:1774-1793.

2. Reviews

- Henrickson KJ. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23(1 Suppl):S6-10. R1
- Henrickson KJ, Hall CB. Diagnostic assays for respiratory syncytial virus disease. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26 (11 Suppl):S36-40. R2
- Henrickson KJ. Viral pneumonia in children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 1998;9(3):217-233. R3
- Greenough A. Respiratory syncytial virus infection: clinical features, management, and prophylaxis. *Curr Opin Pulm Med* 2002;8(3):214-217. R4
- Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001;344(25):1917-1928. R5

3. Original Articles

- van den Hoogen B, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7(6):719-724. R6
- Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, Wright PF, Crowe JE. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004; 350(5):443-450. R7
- Jartti T, van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;360(9343):1393-1394. R8
- Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N, Goldberg MD, Dagan R. Comparison of human metapneumovirus, respiratory

syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25(4):320-324. R9

- Neuzil KM, Zhu Y, Griffin MR, Edwards KM, Thompson JM, Tollefson SJ, Wright PF. Burden of interpandemic influenza in children younger than 5 years: a 25-year prospective study. *J Infect Dis* 2002;185(2):147-152. R10
- Gruteke P, Glas AS, Dierdorp M, Vreede WB, Pilon JW, Bruisten SM. Practical implementation of a multiplex PCR for acute respiratory tract infections in children. *J Clin Microbiol* 2004;42(12):5596-5603. R11
- Pierangeli A, Gentile M, Di Marco P, Pagnotti P, Scagnolari C, Trombetti S, Lo Russo L, Tromba V, Moretti C, Midulla F, Antonelli G. Detection and typing by molecular techniques of respiratory viruses in children hospitalized for acute respiratory infection in Rome, Italy. *J Med Virol* 2007;79(4):463-468. R12
- Oosterheert JJ, van Loon AM, Schuurman R, Hoepelman AI, Hak E, Thijsen S, Nossent G, Schneider MM, Hustinx WM, Bonten MJ. Impact of rapid detection of viral and atypical bacterial pathogens by real-time polymerase chain reaction for patients with lower respiratory tract infection. *Clin Infect Dis* 2005;41(10):1438-1444. R13
- Woo PC, Chiu SS, Seto WH, Peiris M. Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1579-1581. R14
- Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Trout T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin Microbiol* 2000;38(8):2824-2828. R15
- Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson LM, Lindh M. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2008;41(1):53-56. R16
- Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, Fan J. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1696-1701. R17
- Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1564-1569. R18
- Tiveljung-Lindell A, Rotzén-Ostlund M, Gupta S, Ullstrand R, Grillner L, Zwegberg-Wirgart B, Allander T. Development and implementation of a molecular diagnostic platform for daily rapid detection of 15 respiratory viruses. *J Med Virol* 2009;81(1):167-175. R19
- Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, Gouarin S, Petitjean J, Eckart P, Brouard J. Comparison of multiplex PCR assays and

conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* 2006;78(11):1489-1504. R20

4. *Reference Works, Handbooks and Databases*

- Hall CB, McCarthy CA. Respiratory syncytial virus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. Vol.2. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005:2008-2021.
- Falsey AR. Human metapneumovirus. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. Vol.2. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005:2026-2030.

APPRAISAL

1. Voldoet de huidige PCR aan de verwachtingen? Wat zijn de resultaten in vergelijking met de traditionele methoden?

Met behulp van moleculaire technieken is er een enorme vooruitgang geboekt in de detectie van respiratoire virale pathogenen. Bij een groot deel van de acute luchtweginfecties wordt echter geen pathogeen geïdentificeerd. Dit heeft te maken met het grote aantal virussen die betrokken kunnen zijn in luchtweginfecties. Er is ook een continue toename van nieuwe respiratoire pathogenen die worden geïdentificeerd met moleculaire technieken, zoals in 2001 hMPV dat nu beschouwd wordt als een belangrijke verwekker van lage luchtweginfecties, en een vierde en vijfde coronavirus. (R12)

Overzicht van de literatuur

De superioriteit van PCR ten opzichte van conventionele methoden voor de diagnose van acute respiratoire infecties bij gehospitaliseerde kinderen is reeds lang aangetoond. Een tweede belangrijk voordeel is het gebruik van multiplex PCR assays daar op die manier verschillende respiratoire virussen tegelijkertijd gedetecteerd konden worden. Er wordt steeds meer gebruik gemaakt van in-house ontwikkelde PCR assays voor een snelle detectie van een groot aantal respiratoire virussen. Hieronder volgt een korte samenvatting van enkele studies die moleculaire technieken vergeleken hebben met conventionele methoden.

De oudste en meest gebruikte commerciële assay is de Hexaplex, die gebruik maakt van multiplex PCR om de zeven meest voorkomende respiratoire virussen te detecteren, namelijk para-influenza type 1, 2 en 3, RSV A en B, influenza A en B. Kehl et al evalueerden deze assay in vergelijking met conventionele virale celculturen en met snelle enzyme immuno-assays (EIAs) voor RSV en influenza A voor 363 pediatrische respiratoire stalen. Hun conclusie was dat Hexaplex een snelle, gevoelige en specifieke assay voor de detectie van zeven van de meest frequente virale oorzaken van lage luchtweginfecties. Een kosten effectieve implementatie van moleculaire diagnostiek in routine laboratoria is moeilijk. Kostenbesparingen zouden het gevolg kunnen zijn van (1) een vermindering van het aantal hospitalisaties door de snelle diagnostiek, (2) een vermindering van de nosocomiale spreiding van infectie en (3) een verminderd antibioticagebruik.(R17)

Templeton et al ontwikkelden een real-time multiplex PCR voor de detectie van RSV, influenza A en B, para-influenza type 1, 2 en 3, en vergeleken deze met de traditionele virale celcultuur. De PCR detecteerde alle cultuur positieve stalen en in 20 (van 358)

bijkomende stalen kon met PCR een virus aangetoond worden, meest waarschijnlijk kan dit verklaard worden door de hoeveelheid en de leefbaarheid van het virus aanwezig in de klinische stalen. De gemiddelde Ct (cycle threshold) voor de cultuur positieve stalen was 26, tegenover 38 voor de cultuur negatieve stalen, wat indiceert dat er minder virus aanwezig was in de cultuur negatieve stalen. Aangezien de 20 bijkomende positieve stalen allen afkomstig waren van patiënten met respiratoire symptomen, is het eerder onwaarschijnlijk dat deze vals positief zijn.(R18)

Tiveljung-Lindell et al ontwikkelden en implementeerden een moleculair diagnostisch platform voor een snelle detectie van 15 respiratoire virussen. Met het PCR panel kon in 57% van de stalen een virus aangetoond worden, terwijl dat met immunofluorescentie en virale celculturen slechts in 37% van de stalen het geval was. Deze real-time PCR werd geïmplementeerd en aangevuld met snelle immunochromatografische antigen testen voor dringende aanvragen voor RSV en influenza. Naast een grotere gevoeligheid voor RSV, influenza B en adenovirus was het belangrijkste voordeel in vergelijking met de traditionele methode het grote spectrum van virussen dat op deze manier gedetecteerd kan worden, vooral van virussen die voorheen niet opgespoord werden zoals rhinovirussen, hMPV, coronavirussen.(R19)

Freyth et al bestudeerden de performantie van vier multiplex PCR assays in vergelijking met directe immunofluorescentie assays en virale celkweken voor de detectie van virussen bij 263 kinderen opgenomen in het ziekenhuis met een acute luchtweginfectie. De multiplex PCR assays waren gevoeliger, sneller en goedkoper dan directe immunofluorescentie assay en virale celcultuur. Voor de detectie van influenza A en adenovirus was de opbrengst van moleculaire assays niet hoger dan met directe immunofluorescentie en virale celkweken. Hun conclusie was dat in een klinisch virologisch laboratorium, rekening houdend met de snelheid, kosten en sensitiviteit van de methoden, directe immunofluorescentie en multiplex PCR samen gebruikt zouden worden. De meer conventionele virussen (vnl. RSV en influenza A en B) zouden gedetecteerd kunnen worden met directe immunofluorescentie technieken, terwijl multiplex PCR assays gebruikt kunnen worden voor de andere virussen (vnl. hMPV en rhinovirus). Indien men echter slechts één methode wenst te gebruiken, gaat de voorkeur naar multiplex PCR assays. (R20)

Conclusie:

Moleculaire assays voor de diagnostiek van respiratoire infecties zijn gevoeliger dan de traditionele methoden en hebben een kortere turn around tijd (minder dan een dag bij een dagelijkse uitvoering van de test ten opzichte van gemiddeld 2-5 dagen voor virale kweek). Er is een veel hogere diagnostische opbrengst, vooral doordat men meer virussen kan detecteren met PCR dan met traditionele methoden. Gezien de zeer goede sensitiviteit en specificiteit van PCR en de korte TAT, kan worden verwacht dat het implementeren van PCR zal resulteren in een meer adequate behandeling van lage luchtweginfecties en een kortere hospitalisatieduur. Gezien de meerkost voor het laboratorium is het echter aangewezen na te gaan dat de implementatie van deze assays effectief resulteert in een kostenbesparing in de kliniek.

Vergelijking PCR-kweek UZ Gasthuisberg

1. Vergelijking van een 'in-huis' ontwikkelde real-time PCR met de vroegere analyse

RSV A/B - hMPV

Er werd een real-time PCR op Smartcycler ontwikkeld voor de detectie van RSV A, RSV B en hMPV. Voor de respiratoire stalen in viraal transportmedium met een aanvraag voor

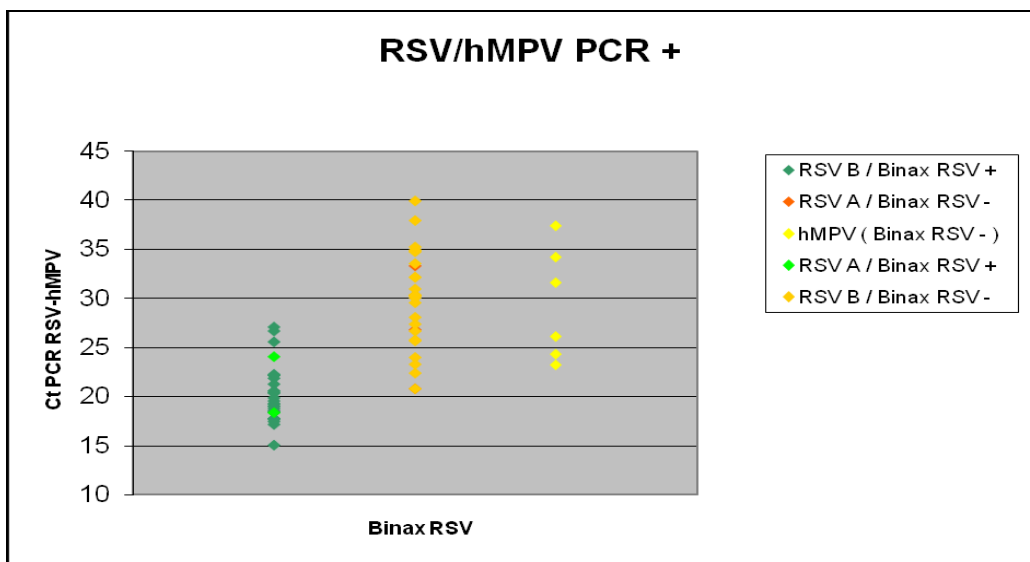
RSV werd naast de sneltest RSV (Binax) ook de PCR uitgevoerd. Voor hMPV werd gebruik gemaakt van de hMPV Antigen EIA (Biotrin), deze werd echter niet in routine gebruikt (er was geen test voor hMPV in ons laboratorium).

De gevoeligheid van de PCR enerzijds en de sneltest voor RSV en de hMPV EIA anderzijds werd vergeleken op verdunningsreeksen, en PCR was zowel voor RSV als voor hMPV een stuk gevoeliger.

Tijdens het RSV seizoen van de winter 2006-2007 werd op 194 stalen met aanvraag voor RSV, zowel PCR als de sneltest RSV (Binax) uitgevoerd.

RSV / (hMPV)	194		RSV Binax	
			POS	NEG
RSV / hMPV PCR	POS		30	35 (6 hMPV)
	NEG		0	129 (5 inh)

Alle RSV sneltest positieve stalen zijn ook positief met PCR. Met PCR wordt echter in 33.5% van de stalen een positief resultaat bekomen waaronder ook 6 hMPV positieve stalen, ten opzichte van 15.5% positieve stalen met de sneltest. De gemiddelde Ct-waarde van de sneltest negatieve stalen is 29.7, deze is hoger dan de Ct van de sneltest positieve stalen (Ct 20.2). De Ct intervallen overlappen echter in grote mate, dus het is niet zo dat enkel de stalen die zwak positief zijn met PCR negatief zijn met de sneltest.



Influenza A/B

Er werd een real-time PCR ontwikkeld op SmartCycler voor de detectie van influenza A en influenza B.

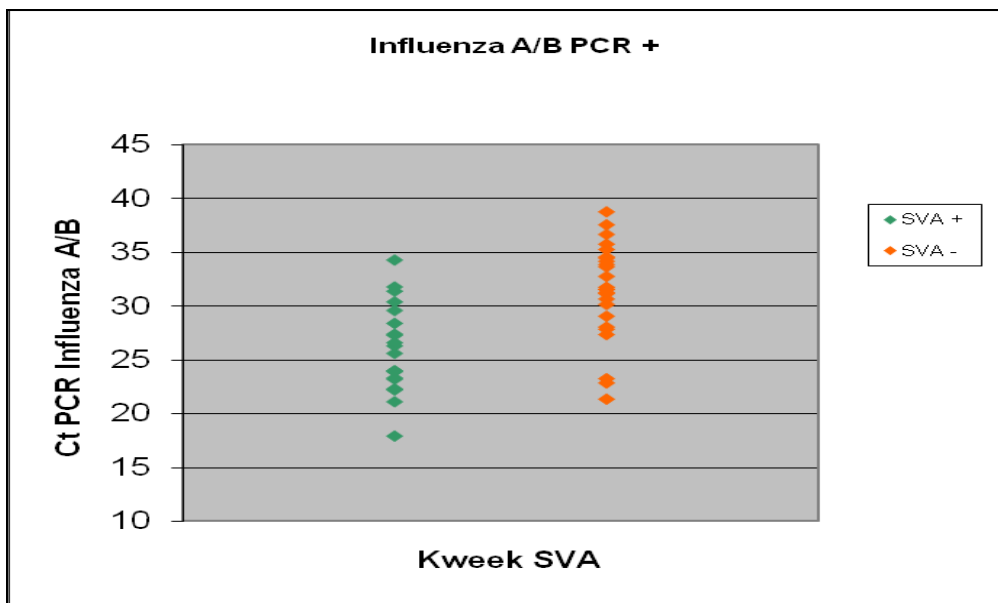
De sensitiviteit van de PCR werd bepaald op basis van resultaten van PCR op verdunningsreeksen, en vergeleken met de snelle kweek (SVA) + fluorescentie en met de sneltest Influenza A/B (Binax). Voor influenza A is de PCR minimum even gevoelig als

de kweek en gevoeliger dan de sneltest. Voor influenza B is de PCR duidelijk gevoeliger dan de kweek en de sneltest (cave: verminderde gevoeligheid van de kweek mogelijk door vries/dooien van gebruikte virus stock waardoor een groot deel van het aanwezige virus niet meer opgegroeid kon worden).

Tijdens het influenza seizoen van de winter 2006-2007 werd op 228 stalen met aanvraag voor influenza zowel de snelle kweek (Shell Vial Assay, SVA) als PCR uitgevoerd.

Influenza	228		Snelle kweek	
			POS	NEG
Influenza A/B PCR	POS		19	25
	NEG		0	184 (4 inh)

Alle SVA-positieve stalen zijn ook positief met PCR. Met PCR wordt in echter in 19.3% van de stalen een positief resultaat bekomen, tegenover 8.3% positieve stalen met SVA. Ook hier is de gemiddelde Ct waarde voor de SVA negatieve stalen (Ct 31.5) hoger dan deze van de SVA positieve stalen (Ct 26.2), maar overlappen de Ct intervallen in grote mate. De sterk positieve PCR stalen die SVA negatief zijn, zijn vermoedelijk negatief voor cultuur omwille van de aanwezigheid van viruspartikels die niet meer aangerijkt kunnen worden via cultuur (pre-analytische fase).



Conclusie

De RSV A/B / hMPV PCR op Smartcycler kan gebruikt worden voor analyse van respiratoire stalen met aanvraag voor RSV/hMPV.

De influenza A/B PCR op Smartcycler kan gebruikt worden voor de analyse van respiratoire stalen met aanvraag voor influenza.

2. Studie: vergelijking RSV A/B – hMPV enerzijds en influenza A/B anderzijds via smartcycler – Kweek op PLC/PRF/5 oktober 2008-januari 2009

Van oktober 2008 tot en met januari 2009 werd voor alle stalen (niet enkel pediatrisch) met aanvraag voor RSV A/B – hMPV en voor stalen met aanvraag voor influenza A/B ook een klassieke kweek ingezet op een buisje met PLC/PRF/5 cellen. De buisjes werden dagelijks nagekeken op de aanwezigheid van een cytopathogeen effect (CPE). Bij aanwezigheid van een CPE werd op een celuitstrijkje fluorescentie uitgevoerd met specifieke monoclonalen, afhankelijk van wat positief was met PCR (RSV-A en/of RSV-B en/of hMPV; influenza A en/of influenza B). Indien er na 8 dagen geen CPE werd waargenomen en de PCR wel positief was deed men ook een fluorescentiebepaling met specifieke monoclonalen afhankelijk van wat positief was met PCR. Indien ook de PCR negatief was gebeurde er geen fluorescentiebepaling.

RSV A/B - hMPV

Er waren tijdens deze periode 620 aanvragen voor RSV A/B – hMPV PCR waarvan er 274 positief waren, voor 537 stalen gebeurde er ook een klassieke kweek. De ontbrekende stalen zijn niet meegenomen omwille van inhibitie van de PCR of omdat de kweek niet werd uitgevoerd bijvoorbeeld omwille van te weinig staal.

Resultaten:

537 stalen		PCR RSV-A/B- hMPV	
		POS	NEG
PLC/PRF/5 - fluorescentie	POS	49	0
	NEG	179	309

Bespreking:

Er waren 228 PCR positieve stalen, slechts van 49 stalen was ook de kweek positief. Geen enkel PCR negatief staal was positief met de klassieke kweek op PLC/PRF/5. Dit werd nog nooit waargenomen sinds de invoering van de PCR (januari 2008 – januari 2009).

De opbrengst van de kweek is laag ten opzichte van de PCR. Van de 179 PCR positieve stalen waarvan de kweek negatief was, waren 4 celculturen overgroeid door adenovirus en 1 celcultuur door enterovirus. Van de 309 negatieve stalen waren 14 celculturen overgroeid door adenovirus, 6 celculturen door enterovirus, 1 celcultuur door para-influenzavirus, en 5 celculturen waren positief voor influenza (die ook influenza PCR positief waren). De incidentie van deze respiratoire virussen gedetecteerd in klinische stalen was 49 van 537 (9.1%) met virale kweek en 219 van 537 (40.8%) met PCR. (Tabel 1)

Tabel 1: resultaten van PCR en virale kweek voor 537 klinische stalen met aanvraag voor RSV/hMPV.

Virus	Aantal stalen met een positief resultaat voor:	
	PCR	Virale celkweek
RSV A	78	21
RSV B	114	27
hMPV	27	1
Totaal (%)	219 (40,8%)	49 (9,1%)

Van de 49 stalen die zowel PCR als kweek positief waren 20 stalen RSV A positief, 26 stalen RSV B positief en 1 staal hMPV positief. In 2 stalen was er sprake van een duo-infectie met RSV en hMPV (één met RSV A en één met RSV B). De kweek van beide stalen was positief voor RSV. Voor de 48 RSV PCR en kweek positieve stalen was varieerden de Ct waarden van 13.7 tot 38.6 met een mediaan van 19.2.

Van de 170 stalen die PCR positief waren en kweek negatief (exclusief de stalen die overgroeid zijn door andere virussen) waren 52 stalen RSV A positief, 85 stalen RSV B positief en 26 stalen hMPV positief. In 3 stalen werd zowel RSV A als RSV B gedetecteerd, in 4 andere stalen was er sprake van een duo-infectie met RSV en hMPV (2 met RSV A en 2 met RSV B). Voor de 144 RSV PCR positieve en kweek negatieve varieerden de Ct van 14.6 tot 41.6 met een mediaan van 23.5.

Besluit van deze evaluatie:

De fluorescentiekleuring op celuitstrijkjes van een PCR positief staal wordt niet langer uitgevoerd, de resultaten van de kweek worden niet langer gerapporteerd. Gedurende de wintermaanden zal de klassieke kweek wel nog geënt worden op PLC/PRF/5 cellen, en van de PCR positieve stalen zullen deze geïncubeerd en gestockeerd worden voor epidemiologische doeleinden.

Influenza A/B

Voor influenza A/B waren er in deze periode 588 aanvragen waarvan er 155 positief waren, voor 475 stalen gebeurde er ook een klassieke kweek. De ontbrekende stalen zijn niet meegenomen omwille van inhibitie van de PCR of omdat de kweek niet werd uitgevoerd bijvoorbeeld omwille van te weinig staal.

Resultaten:

475 stalen		PCR Influenza A/B	
		POS	NEG
PLC/PRF/5 - fluorescentie	POS	9	0
	NEG	104	362

Bespreking:

Er waren 113 PCR positieve stalen, slechts van 9 stalen was ook de kweek positief. Geen enkel PCR negatief staal was positief met de klassieke kweek op PLC/PRF/5, en dit werd ook nooit waargenomen sinds de invoering van de PCR (januari 2008 – januari 2009).

De opbrengst van de kweek is zeer laag ten opzichte van de PCR. Van de 104 PCR positieve stalen waarvan de kweek negatief was, was 1 celcultuur overgroeid door adenovirus en 1 celcultuur positief voor RSV (PCR RSV B sterk positief). Van de 362 negatieve stalen waren 27 celculturen overgroeid door adenovirus, 1 celcultuur door para-influenzavirus, 17 celculturen waren positief voor RSV (deze waren ook PCR RSV positief) en 1 celcultuur was positief voor hMPV. De incidentie van influenzavirus gedetecteerd in klinische stalen was 49 van 537 (9.1%) met virale kweek en 219 van 537 (40.8%) met PCR. (Tabel 2)

Tabel 2: resultaten van PCR en virale kweek voor 475 klinische stalen met aanvraag voor influenzavirus.

Virus	Aantal stalen met een positief resultaat voor:	
	PCR	Virale celkweek
Influenza A	96	7
Influenza B	16	2
Totaal (%)	112 (23,6%)	9 (1,9%)

Van de 9 stalen die zowel PCR als kweek positief waren, waren 7 stalen positief voor influenza A, 1 staal voor influenza B en 1 staal was met PCR positief voor influenza A en B en met kweek voor influenza B. De range van de Ct was 17.4-40.7, met een mediaan van 18.8.

Van de 102 stalen die positief waren met PCR en negatief met virale kweek (exclusief 1 staal dat overgroeid was door adenovirus en 1 staal dat met kweek RSV positief was en met PCR zowel RSV als influenza B positief was) waren 88 stalen influenza A positief en 14 stalen influenza B positief. De range van de Ct was 17.9-41.5 met een mediaan van 27.5.

Besluit van deze evaluatie:

De fluorescentiekleuring op celuitstrijkjes van een PCR positief staal wordt niet langer uitgevoerd, de resultaten van de kweek worden niet langer gerapporteerd. Gedurende de wintermaanden zal de klassieke kweek wel nog geënt worden op PLC/PRF/5 cellen, en van de PCR positieve stalen zullen deze geïncubeerd en gestockeerd worden voor epidemiologische doeleinden.

2. Wat is de klinische impact van de snelle detectie van virale respiratoire pathogenen voor patiënten met een (lage) luchtweginfectie?

Diagnose van virale luchtweginfecties door middel van virale celkweken, antigeen detectie of serologie is ofwel te traag ofwel onvoldoende gevoelig om een belangrijke klinische impact te hebben. Omwille van hoge kosten en technische redenen is een brede moleculaire diagnose van respiratoire infecties nog niet algemeen aanvaard.

Studies hebben potentiële voordelen van moleculaire diagnostiek in de diagnose van acute luchtweginfecties kunnen aantonen, zoals snellere diagnose en detectie van een bredere waaier van pathogenen, doch geven weinig informatie over de implementatie van deze testen in de praktijk. Vragen die zich kunnen stellen bij het introduceren van moleculaire diagnostiek voor luchtweginfecties zijn o.a. welke pathogenen moeten opgespoord worden, hoe vaak moet de test uitgevoerd worden en moeten de testen enkel bij welbepaalde patiëntenpopulaties uitgevoerd worden of bij iedereen? (R11)

Brittain-Long et al gingen de klinische toepasbaarheid van een multiplex real-time PCR na in de diagnostiek van luchtweginfecties. Hiervoor werd een assay ontwikkeld die simultaan influenza A en B, para-influenza 1-3, hMPV, RSV, rhinovirus, adenovirus, enterovirus, humaan coronavirus 229E, OC43 en NL63 detecteerde. Daarnaast werden ook *M.pneumoniae* en *Ch.pneumoniae* geïncorporeerd in het panel. Voor 48% van de 954 stalen kon er een oorzakelijk organisme geïdentificeerd worden. Zij zijn van mening dat een uitgebreid gebruik van moleculaire diagnostiek voor respiratoire infecties van groot klinisch belang is. Men moet dan wel rekening houden dat door het gebruiken van een zeer gevoelige methode de detectie van een viraal agens mogelijk in kader van een asymptomatische infectie kan zijn eerder dan de verklaring voor de ziekte-toestand, en dat het vinden van een virus een gelijktijdige bacteriële infectie niet uitsluit. In deze context zou de probabilmiteit dat een gevonden virus ook de oorzaak is van de infectie gerelateerd moeten worden aan de Ct waarde: hoe lager de Ct waarde, hoe hoger de probabilmiteit. Verdere studies met betrekking tot de etiologie van respiratoire infecties in verschillende patiënten categorieën, en van de klinische bruikbaarheid van multiplex assays moeten echter nog uitgevoerd worden. (R16)

Studies die de klinische en financiële impact van virologische diagnostiek nagaan zijn eerder zeldzaam. Daar waar in het verleden virale diagnostiek met celculturen traag was en vaak enkel retrospectief een diagnose kon ondersteunen, is nu voor een groot aantal virussen snelle diagnostiek binnen een klinisch aanvaardbare tijdsperiode mogelijk. Nadeel is echter dat deze methoden relatief duur zijn.

Oosterheert et al gingen de klinische en economische impact van een snelle detectie van virale en atypische bacteriële pathogenen door real-time PCR na bij volwassen patiënten met een lage luchtweginfectie. Er was een toename van de etiologische diagnose van 21% naar 43%, er was echter nauwelijks een klinische impact, antibioticagebruik, hospitalisatieduur en bijkomende diagnostische onderzoeken werden niet beïnvloed. (R13)

Woo et al toonden aan dat snelle virale diagnostiek van respiratoire infecties bij kinderen kosteneffectief is. Snelle detectie van virale antigenen in nasofaryngeale aspiraten door middel van immunofluorescentie werd vergeleken met de virale celkweken. Een snelle diagnose van respiratoire virale infecties bij kinderen resulteerde in een significante daling van de hospitalisatieduur, antibioticagebruik en laboratoriumaanvragen in vergelijking met de virale celculturen. (R14)

Ook Barenfanger et al toonden aan dat een belangrijke verkorting van de turnaround tijd van de diagnostiek van virale respiratoire infecties geassocieerd was met een daling van de mortaliteit, hospitalisatieduur, en kosten en met een beter antibioticabeleid. Hiervoor maakten zij gebruik van immunofluorescentie testen op cytospinpreparaten in vergelijking met traditionele methoden als enzym immunoassays en virale celculturen. De studie werd uitgevoerd op alle respiratoire stalen waarop virale diagnostiek werd aangevraagd, niet enkel pediatrische stalen. (R15)

Tijdens de periode januari 2008 tot en met december 2008 waren er 899 intra-muros aanvragen voor RSV/hMPV. Hiervan waren 828 stalen afkomstig van pediatrie en 71 stalen van volwassenen (diverse eenheden). Aangezien het grootste aantal stalen, zoals verwacht, afkomstig is van pediatrie is het de bedoeling na te gaan of het nuttig is een prospectieve studie op te zetten die de mogelijke klinische impact van een snel resultaat met PCR nagaat en zo eventueel te komen tot een bepaald algoritme dat een correct gebruik van de PCR toelaat zodat een kosten effectieve implementatie van deze testen kan bekomen worden. Voor dezelfde periode ontvingen we 888 intra-muros stalen met aanvraag voor influenza. Hiervan waren 810 stalen afkomstig van pediatrie en 78 stalen van volwassenen (diverse eenheden).

Bij 132 kinderen met een (sterk) positief resultaat met PCR werd daarom nagegaan of het resultaat een impact had op het verdere beleid, voornamelijk met het oog op stoppen van antibioticatherapie indien deze gestart werd. Van deze 132 stalen waren 87 stalen positief voor RSV A of B, 12 voor hMPV en 33 voor influenza A of B. 88 patiënten werden gehospitaliseerd, en bij 50 patiënten werd antibioticatherapie gestart. Bij 10 van deze patiënten resulteerde een positief resultaat met PCR in een onderbreking van de antibioticatherapie. Het was niet altijd mogelijk terug te vinden waarom antibiotica werd verdergegeven bij een positief resultaat met PCR. Impact op hospitalisatieduur, verdere onderzoeken kon op deze manier niet nagegaan worden.

3. Is er vanuit de kliniek behoefte aan een uitbreiding van de PCR respiratoire virussen? Met andere woorden moeten we nog andere respiratoire virussen opsporen met PCR?

In een studie van Pierangeli et al in 2007 werd gedurende één jaar bij kinderen gehospitaliseerd voor een acute luchtweginfectie nagegaan welke virale pathogenen geïdentificeerd konden worden. Hiervoor maakte men gebruik van PCR voor de detectie van 13 respiratoire virussen. In totaal werden 227 stalen, bekomen via neusspoeling, van kinderen met klinische presentatie van bronchiolitis, bronchopneumonie, laryngo-tracheobronchitis, astma, getest op de aanwezigheid van één of meerdere van deze respiratoire virussen (kinderen met onderliggende medische problemen werden weerhouden). In 42.7% van de stalen kon men virale pathogenen identificeren, en zoals men verwacht binnen een pediatrische populatie was RSV de belangrijkste pathogeen (17.2%). Rhinovirus was de tweede meest frequente pathogeen (9.7%) waarbij de helft van deze kinderen zich presenteerde met een pneumonie, gevolgd door para-influenza virus type 3 (7.5%), influenza type A (4.4%), en hMPV (3.5%). (R12)

Door de detectie van RSV A/B, hMPV en influenza A en B sporen wij met PCR momenteel al een groot deel van de (gekende) verwekkers van lage luchtweginfecties op. De bedoeling is in de toekomst in eerste instantie een PCR te ontwikkelen voor de detectie van para-influenza virus en adenovirus. Verder overleg is aangewezen voor een eventuele verdere uitbreiding van PCR in de diagnostiek van respiratoire infecties.

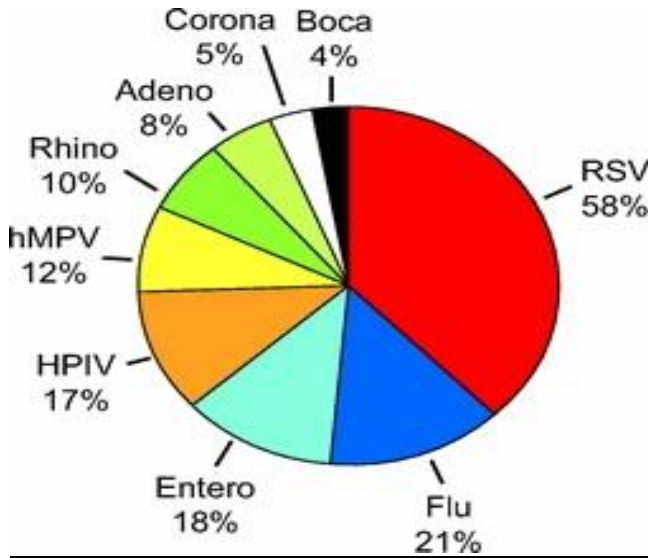
TO DO/ACTIONS

1. Is het haalbaar en aangewezen een prospectieve studie uit te voeren om de klinische impact van PCR na te gaan?
 - a. Tijdstip: volgende winter als de uitbreiding van het panel met adenovirus en para-influenza gerealiseerd is.
 - b. Opstellen van een protocol waardoor gegevens vanaf een eerste patiënten contact en gedurende de volledige hospitalisatie kunnen verzameld worden.

ATTACHMENTS

Attachment 1:

Laboratory-confirmed common viruses causing serious respiratory infections requiring hospitalization or emergency room visitation in children/adults younger than 19 years of age.



Attachment 2:

Incidentie van pneumonie of bronchiolitis, kroep, tracheobronchitis, otitis media, of bovenste luchtweginfecties bij niet gehospitaliseerde patiënten volgens leeftijd.

