

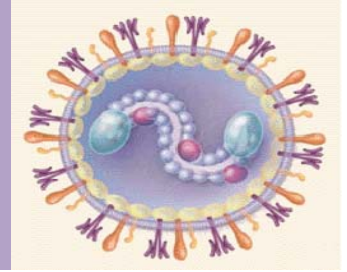


**Laboratoriumdiagnose van
respiratoire virale infecties:
evaluatie van de huidige PCR**

Sarah Ressler

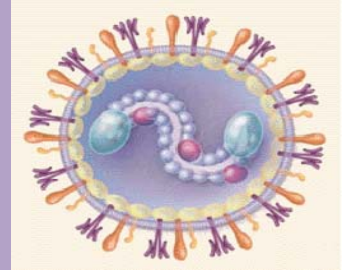
31 maart 2009

Inhoud



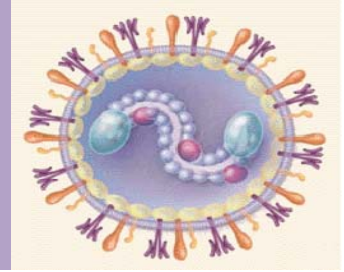
1. Algemene inleiding
2. Klinisch/diagnostisch scenario
3. CAT vraagstelling
4. Appraisal
5. To do/Actions

Inhoud



- 1. Algemene inleiding**
2. Klinisch/diagnostisch scenario
3. CAT vraagstelling
4. Appraisal
5. To do/Actions

Inleiding



Virale luchtweginfecties

Bovenste luchtweginfecties (URI)

- rhinorree
- faryngitis
- otitis media
- sinusitis
- ...

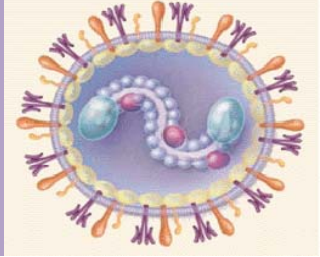


Lage luchtweginfecties (LRI)

- pneumonie
- bronchiolitis
- bronchitis
- ...



Inleiding



- URI

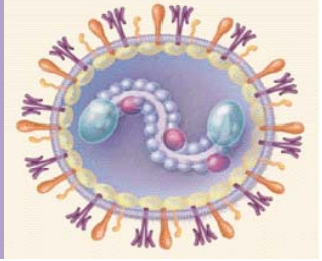
- jonge kinderen: 6-9/jaar
- adolescenten en volw.: 2-4/jaar

- LRI

- 1^{ste} levensjaar: 1/3 kinderen
- schoolgaande kinderen: 5-10%
- gezonde volw.: 5%
- ouderen: 17%

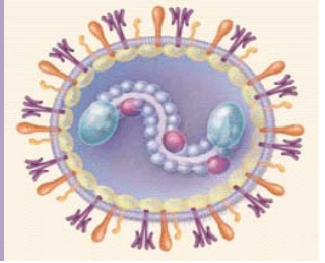
virale LRIs meest arts consulten
en hospitalisaties

Inleiding



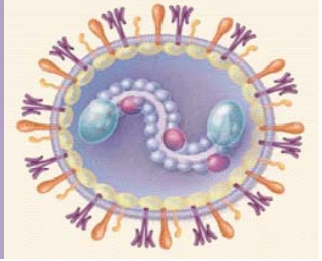
- Hospitalisaties voor virale LRIs in VS
 - 300 000 kinderen/jaar specifieke diagnose virale LRI
 - 500 000 kinderen/jaar klinische diagnose virale LRI

Inhoud



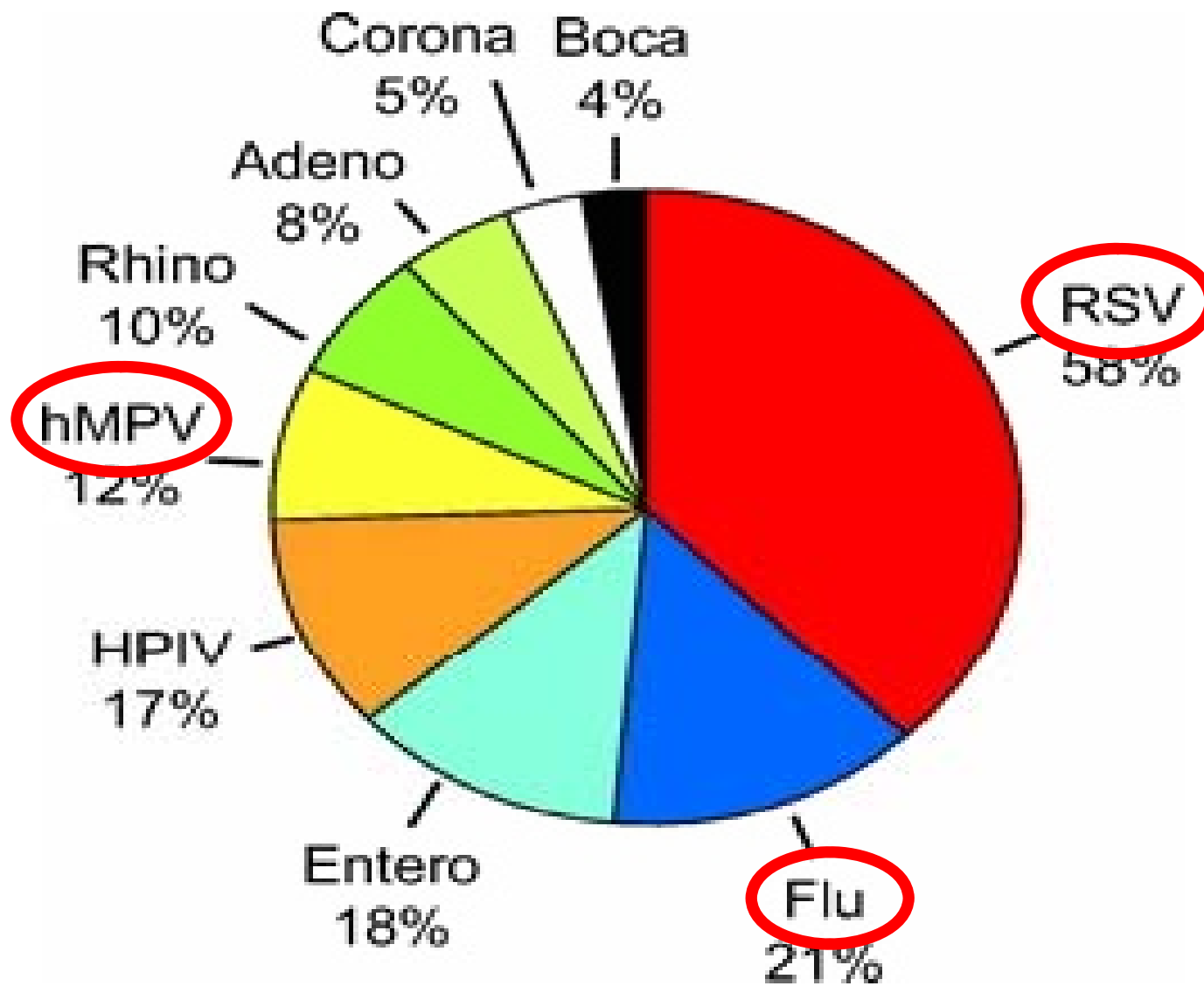
1. Algemene inleiding
- 2. Klinisch/diagnostisch scenario**
3. CAT vraagstelling
4. Appraisal
5. To do/Actions

Klinisch/diagnostisch scenario

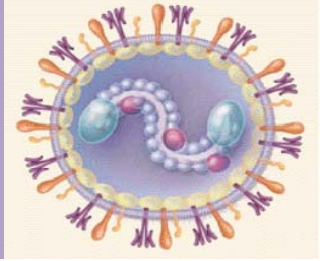


Virussen geassocieerd met LRI

- respiratoir syncytieel virus
- influenza A en B
- humaan para-influenza virus 1-3
- humaan metapneumovirus
- adenovirus
- rhinovirus
- coronavirus
- enterovirussen
- andere...



Klinisch/diagnostisch scenario



Respiratoir syncytieel virus (RSV)

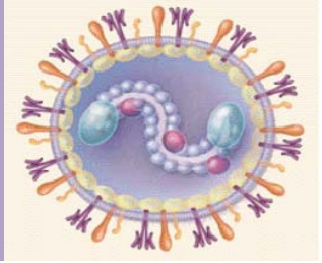
Classificatie en structuur:

- Paramyxoviridae
- enkelstrengig RNA, envelop
- 2 subtypes: RSV A en RSV B

Epidemiologie

- piekincidentie in winter
- november tot maart

Klinisch/diagnostisch scenario



Respiratoir syncytieel virus (RSV)

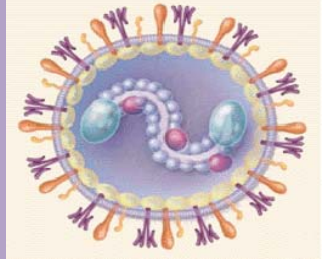
Pathogenese

- Transmissie: direct contact met besmette handen/voorwerpen; droplet
- replicatie in nasofarynx

↓ 1à3 dagen

lage luchtwegen

Klinisch/diagnostisch scenario

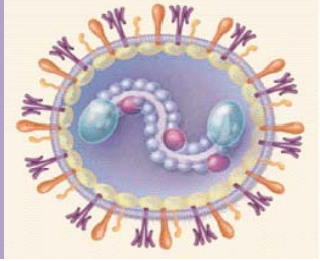


Respiratoir syncytieel virus (RSV)

Kliniek

- Primo-infecties zuigelingen:
 - (febriele) infectie BLW
 - verspreiding lagere LW: bronchiolitis, pneumonie, tracheobronchitis, minder frequent kroep
- Herinfecties oudere kinderen:
 - meestal milde infectie BLW
- Risicogroepen ernstig verloop met respiratoir falen:
 - prematuren, immuundeficiënties, onderliggende cardiopulmonale aandoeningen

Klinisch/diagnostisch scenario



Respiratoir syncytieel virus (RSV)

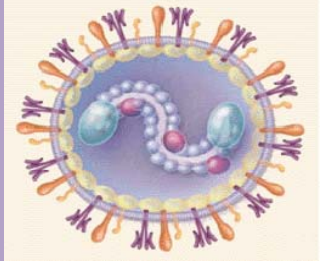
= de belangrijkste oorzaak van acute lage luchtweginfecties bij zuigelingen en jonge kinderen

- +/- 2/3 zuigelingen infectie 1ste levensjaar
- bijna alle kinderen op leeftijd van 2 jaar

= de belangrijkste oorzaak van hospitalisatie

- 50-90% van hospitalisaties voor bronchiolitis
- 5-40% van hospitalisaties voor pneumonie
- 10-30% van hospitalisaties voor tracheobronchitis

Klinisch/diagnostisch scenario



Humaan metapneumovirus (hMPV)

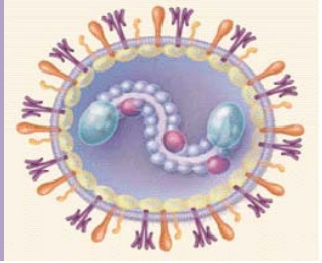
Classificatie en structuur

- Paramyxoviridae
- enkelstrengig RNA, envelop

Epidemiologie

- 2001 geïsoleerd Nederland
- piekincidentie wintermaanden en vroege lente
- belangrijke oorzaak acute LW-infecties
- Seroprevalentie studies: meeste kinderen op 5j hMPV infectie doorgemaakt

Klinisch/diagnostisch scenario

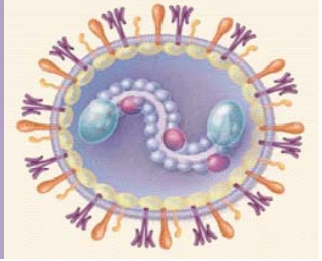


Humaan metapneumovirus (hMPV)

Kliniek

- Transmissie vermoedelijk via contact met gecontamineerde secreties.
- Klinische presentatie vergelijkbaar met RSV:
 - milde BLW infectie – lage luchtweginfectie (bronchiolitis, pneumonie, ...)
 - potentieel ernstig verloop (hospitalisatie en mechanische ventilatie).

Klinisch/diagnostisch scenario



Influenza

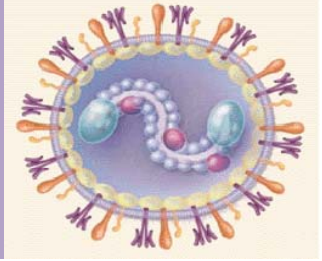
Classificatie en structuur

- Orthomyxoviridae
- enkelstrengig RNA, envelop
- 3 types: influenza A, B en C

Epidemiologie

- wintermaanden
- jaarlijks epidemieën, variërende ernst
- gemiddeld jaar: +/- 20% kinderen

Klinisch/diagnostisch scenario

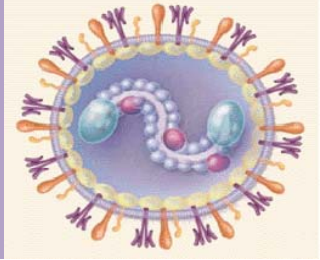


Influenza

Pathogenese

- Transmissie:
 - respiratoire droplets en secreties
 - besmette handen/voorwerpen
- Replicatie in respiratoire tractus

Klinisch/diagnostisch scenario

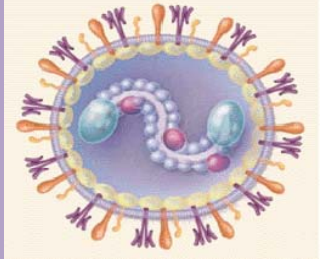


Influenza

Kliniek

- meestal acute zelf-limiterende ziekte (acute luchtweginfectie; influenza-like illness)
- meer ernstig verloop met eventueel hospitalisatie
 - jonge kinderen (studies: hospitalisatiegraad 1-2 tot 2-5 per 1000 kinderen jonger dan 2 jaar)
 - kinderen met onderliggende aandoeningen
- frequente presentaties: acute otitis media, koorts zonder duidelijke focus, infecties lage luchtwegen

Klinisch/diagnostisch scenario

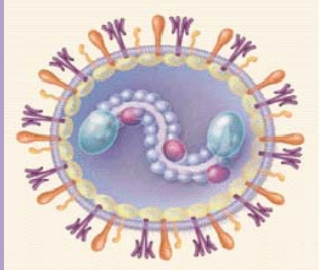


Laboratoriumdiagnostiek van virale LW-infecties

Wanneer virale diagnostiek?

- geen richtlijnen over indicaties
- American Academy of Pediatrics:
 - clinical practice guideline diagnose en behandeling bronchiolitis
 - RSV: virale diagnostiek zelden invloed op R/ of outcome van kinderen met klinische diagnose van bronchiolitis.

Klinisch/diagnostisch scenario

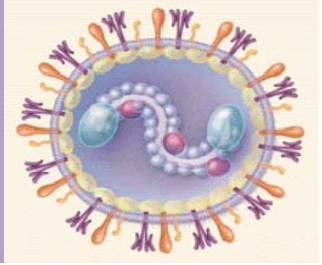


Laboratoriumdiagnostiek van virale LW-infecties

Virale kweek

- Gouden standaard
- Nadelen:
 - tijdrovend en arbeidsintensief → weinig klinische impact
 - gevoelig voor pre-analytische factoren
 - faciliteiten
 - lage sensitiviteit in vergelijking met moleculaire testen.
- Voordelen:
 - detectie van ongekende virussen en mutaties.

Klinisch/diagnostisch scenario

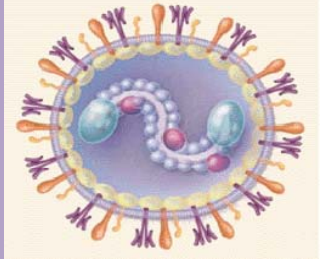


Laboratoriumdiagnostiek van virale LW-infecties

Serologie

- Niet bruikbaar in diagnostiek acute virale LW-infecties
- 10-30% bewezen virale LW-infectie serologisch negatief

Klinisch/diagnostisch scenario

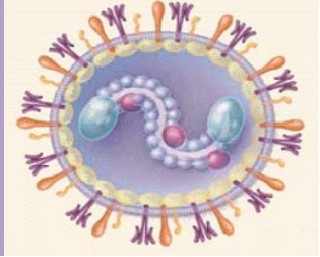


Laboratoriumdiagnostiek van virale LW-infecties

Antigen based assays (EIAs, ...)

- >30 jaar
- Voordelen:
 - snel
 - goedkoop en eenvoudig.
- Nadelen:
 - onvoldoende sensitief en specifiek, vnl bij lage prevalentie van virale LW-infecties en bij bepaalde patiëntenpopulaties.

Klinisch/diagnostisch scenario

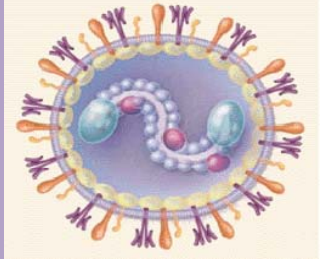


Laboratoriumdiagnostiek van virale LW-infecties

Moleculaire assays

- “nieuwe gouden standaard”
- sensitiviteit en specificiteit bijna 100% in vgl met virale kweek en antigen detectie assays
- verschillende commerciële assays beschikbaar
- meestal ‘in-huis’ assays.

Klinisch/diagnostisch scenario



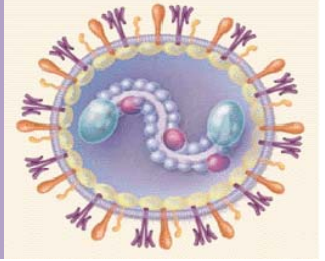
Laboratoriumdiagnostiek van virale LW-infecties

- Groot deel acute LW-infecties geen pathogeen geïdentificeerd:
 - groot aantal virussen wordt klassiek niet opgespoord
 - continue identificatie nieuwe respiratoire pathogenen (recent hMPV, 4^{de} en 5^{de} coronavirus)

UZ Gasthuisberg

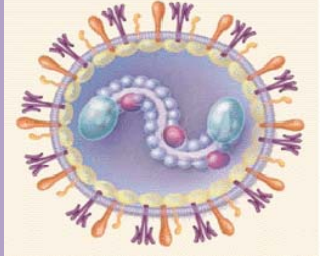
- Kweek
- real-time PCR voor RSV A/B – hMPV
- real-time PCR voor influenza A en B

Inhoud



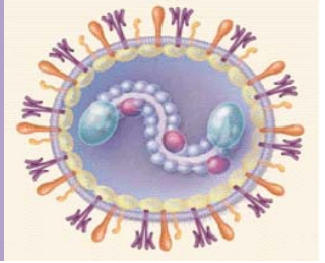
1. Algemene inleiding
2. Klinisch/diagnostisch scenario
- 3. CAT vraagstelling**
4. Appraisal
5. To do/Actions

CAT vraagstelling



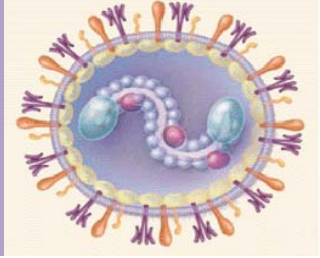
1. Voldoet de huidige PCR voor RSV/hMPV en influenza aan de verwachtingen? Wat zijn de resultaten in vergelijking met de traditionele methoden?
2. Wat is de klinische impact van de snelle detectie van virale respiratoire pathogenen voor patiënten met een (lage) luchtweginfectie?
3. Moeten we nog andere respiratoire virussen detecteren met PCR?

Inhoud



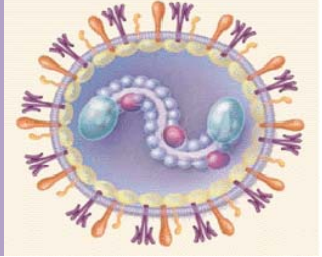
1. Algemene inleiding
2. Klinisch/diagnostisch scenario
3. CAT vraagstelling
- 4. Appraisal**
5. To do/Actions

Appraisal



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. Moeten we nog andere respiratoire virussen detecteren met PCR?

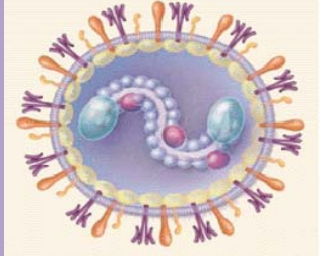
Appraisal



Literatuur: moleculaire assays versus traditionele technieken

- heel wat studies
- zowel single PCR assays als multiplex PCR assays
- zowel commerciële assays (vnl. Hexaplex) als 'in-house' ontwikkelde assays

Appraisal

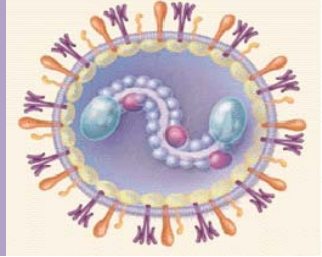


Literatuur: moleculaire assays versus traditionele technieken

Conclusies:

- moleculaire assays zijn gevoeliger
- kortere TAT (tov virale kweek), same-day results zijn mogelijk
- detectie virale pathogenen die met conventionele technieken niet/moeilijk gedetecteerd worden (hMPV, rhino, corona)
- multiplex PCR: belangrijke toename diagnostische opbrengst

Appraisal

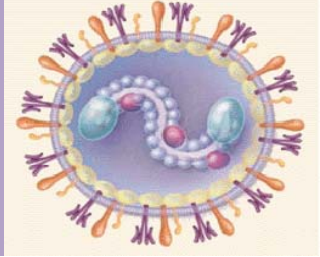


Literatuur: moleculaire assays versus traditionele technieken

Opmerkingen:

- correlatie met klinische bevindingen
 - hoge sensitiviteit van PCR → verlengt periode dat virus gedetecteerd kan worden in klinische stalen
 - positief resultaat: DD acuut ziek, recent ziek geweest, nog niet ziek
 - Ct (cycle treshold) waarden kunnen richtinggevend zijn: hoe lager, hoe hoger de waarschijnlijkheid dat een gedetecteerd agens oorzaak is van ziekte
- cave genetische variabiliteit en constante genetische drift
- kosten effectieve implementatie van moleculaire diagnostiek in routine diagnostisch laboratorium is moeilijk

Appraisal



Literatuur: moleculaire assays versus traditionele technieken

Multiplex PCR versus individuele PCR:

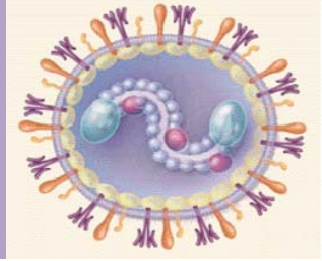
Voordelen:

- groot aantal pathogenen tegelijk opsporen
- meer kosten effectief dan individuele PCR

Nadelen:

- risico verlies sensitiviteit door target competitie (\leftrightarrow individuele PCR)

Appraisal



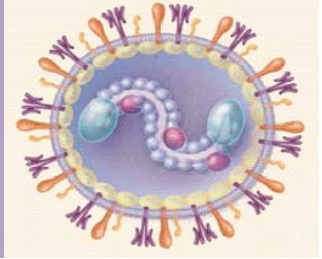
GHB: vergelijking PCR – vroegere methoden

1. RSV A/B – hMPV

- vroeger:
 - binaxNOW® RSV test (immunochromatografische assay)
 - hMPV: geen diagnostiek
- nu:
 - real-time PCR op SmartCycler voor detectie van RSV A, RSV B en hMPV



Appraisal



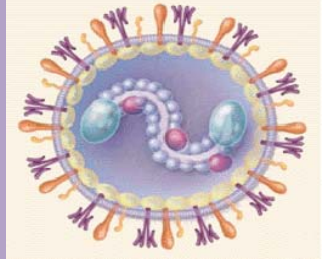
GHB: vergelijking PCR – vroegere methoden

1. RSV A/B – hMPV

- winter 2006-2007: 194 stalen zowel PCR als sneltest RSV

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

Appraisal

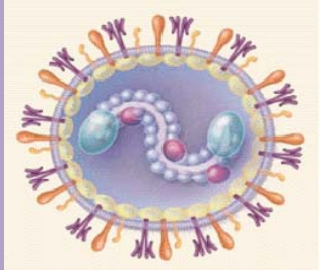


GHB: vergelijking PCR – vroegere methoden

1. RSV A/B – hMPV

- winter 2006-2007: 194 stalen zowel PCR als sneltest RSV:
 - alle RSV Binax positieve stalen zijn ook positief met PCR
 - RSV Binax positief: 15.5% stalen ↔ PCR positief: 33.5% (6 hMPV)
 - gemiddelde Ct RSV Binax negatief: 29.7
gemiddelde Ct RSV Binax positief: 20.2 } Ct intervallen overlappen
 - niet alleen PCR zwak positieve stalen zijn negatief met sneltest

Appraisal

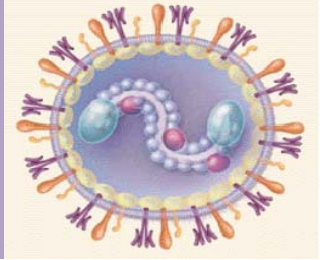


GHB: vergelijking PCR – vroegere methoden

2. Influenza A en B

- vroeger:
 - snelle kweek (Shell Vial Assay=SVA)
- nu:
 - real-time PCR op SmartCycler voor influenza A en B

Appraisal



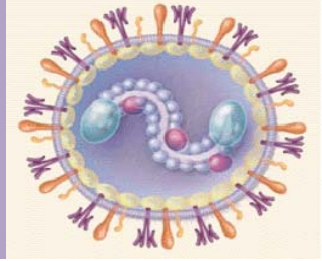
GHB: vergelijking PCR – vroegere methoden

2. Influenza A en B

- winter 2006-2007: 228 stalen zowel een snelle kweek (shell vial assay) als PCR

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

Appraisal

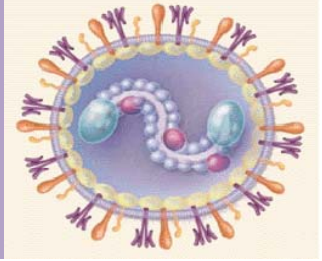


GHB: vergelijking PCR – vroegere methoden

2. Influenza A en B

- winter 2006-2007: 228 stalen zowel snelle kweek als PCR
 - alle SVA positieve stalen zijn ook positief met PCR
 - SVA positief: 8.3% stalen \leftrightarrow PCR positief: 19.3% stalen
 - | | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| gemiddelde Ct SVA negatief: 31.5 | } Ct intervallen overlappen |
| gemiddelde Ct SVA positief: 26.2 | |
 - niet alleen PCR zwak positieve stalen zijn negatief met kweek
 - rekening houden met pre-analytische fase voor kweek!

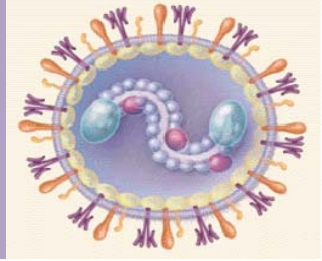
Appraisal



GHB: betekenis virale kweek in diagnose LW-infecties?

- oktober 2008-januari 2009:
 - alle stalen met aanvraag voor RSV A/B-hMPV en voor influenza A en B
 - zowel PCR als klassieke kweek op PLC/PRF/5 cellen
 - CPE: fluorescentie met specifieke monoclonalen
 - na 8 dagen: PCR positief → fluorescentie

Appraisal



GHB: betekenis virale kweek in diagnose LW-infecties?

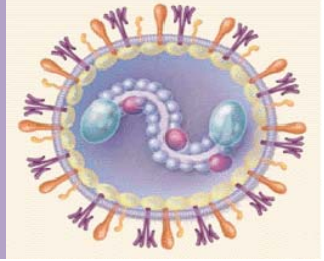
1. RSV A/B en hMPV

- 620 stalen waarvan 274 positief met PCR
- voor 537 stalen gebeurde ook een klassieke kweek met PLC/PRF/5 cellen

(opm.: hMPV moeilijk te kweken in veel frequent gebruikte cellijnen)

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

Appraisal



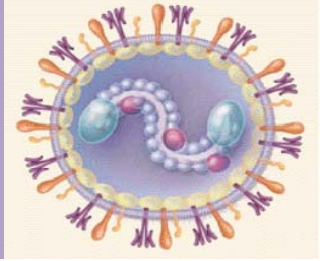
GHB: betekenis virale kweek in diagnose LW-infecties?

1. RSV A/B en hMPV

- alle kweek positieve stalen waren ook PCR positief
- opbrengst kweek met PLC/PRF/5 cellen laag tov PCR

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%)

Appraisal



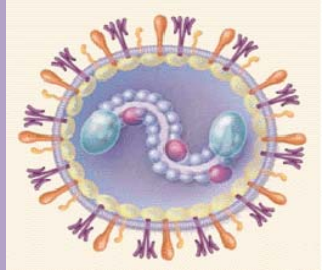
GHB: betekenis virale kweek in diagnose LW-infecties?

2. Influenza A en B

- 588 stalen waarvan 155 positief met PCR
- voor 475 stalen gebeurde ook een klassieke kweek met PLC/PRF/5 cellen

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

Appraisal



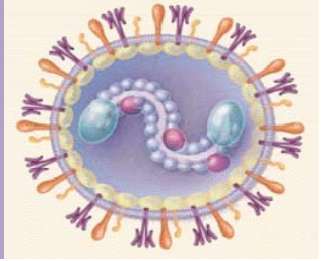
GHB: betekenis virale kweek in diagnose LW-infecties?

2. Influenza A en B

- alle kweek positieve stalen waren ook PCR positief
- opbrengst kweek met PLC/PRF/5 cellen laag tov PCR

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%)

Appraisal

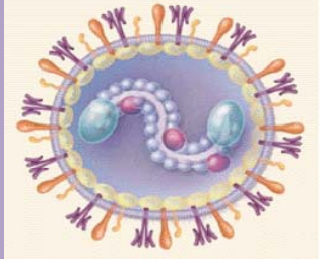


GHB: betekenis virale kweek in diagnose LW-infecties?

Conclusie:

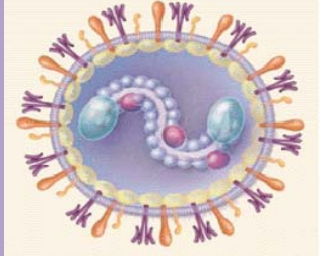
- 1) PCR heeft een zeer goede sensitiviteit en specificiteit ten opzichte van de sneltest voor RSV en shell vial assay voor influenza
- 2) De vereenvoudigde kweek PLC/PRF/5 cellen wordt niet langer uitgevoerd in routine aangezien deze geen meerwaarde biedt ten opzichte van PCR

Appraisal



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. Moeten we nog andere respiratoire virussen detecteren met PCR?

Appraisal

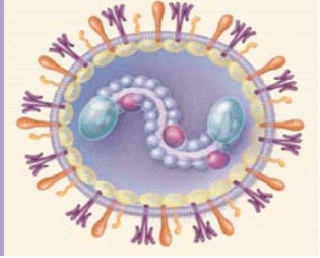


Literatuur: impact snelle diagnostiek met PCR voor LW-infecties

Factoren die een rol spelen bij een kosten effectieve implementatie van moleculaire testen in routine diagnostiek van LW-infecties:

- Laboratorium: technisch PCR duurder, eventuele meerkost indien aangeboden buiten de werkuren
- Klinisch: mogelijk reductie van de hospitalisatieduur, ↓ nosocomiale verspreiding, ↓ AB gebruik.

Appraisal

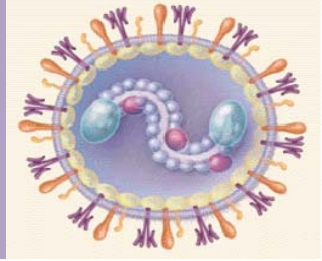


Literatuur: impact snelle diagnostiek met PCR voor LW-infecties

Vragen die zich kunnen stellen bij de implementatie van moleculaire testen in routine diagnostiek van LW-infecties:

- Welke pathogenen opsporen? Welke techniek: enkelvoudige PCR of multiplex PCR? Commerciële assays?
- Frequentie van uitvoering?
- Indicaties?
- ...

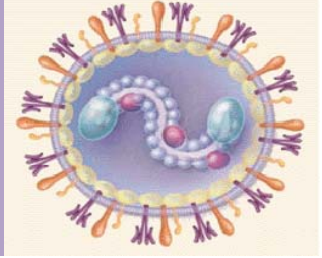
Appraisal



Literatuur: impact snelle diagnostiek met PCR voor LW-infecties

- Studies mbt klinische en economische impact eerder zeldzaam.
- 2 studies over snelle antigeen detectie (Woo et al, Barenfanger et al):
 - snelle antigeen detectie testen versus virale kweek
 - verkorting TAT → significante daling van AB-gebruik, hospitalisatieduur, diagnostische onderzoeken
- 1 studie over PCR (Oosterheert et al):
 - real-time PCR versus virale kweek
 - belangrijke toename van diagnostische opbrengst
 - geen klinische impact

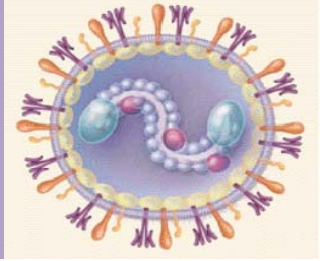
Appraisal



GHB: impact snelle diagnostiek met PCR voor LW-infecties

- januari 2008-december 2008
 - 899 intra-muros aanvragen voor RSV/hMPV waarvan 828 pediatrie
 - 888 intra-muros aanvragen voor influenza A en B waarvan 810 pediatrie
 - Steekproef 132 patiënten met duidelijk positief resultaat voor PCR
 - 87 RSV A of B, 12 hMPV, 33 influenza A of B
 - 88 patiënten gehospitaliseerd (67%), 44 terug naar huis (33%)
 - 50 van de 88 patiënten kregen AB
 - 10 van de 50 patiënten stop AB owv. positief resultaat met PCR

Appraisal

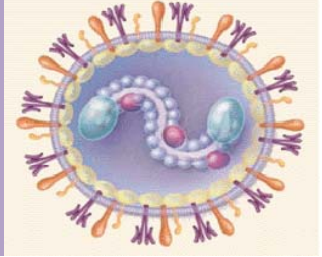


GHB: impact snelle diagnostiek met PCR voor LW-infecties

Conclusie:

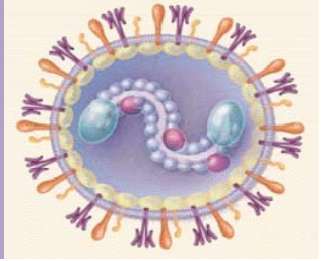
- 1) Er zijn geen studies die de klinische impact van PCR bij kinderen hebben onderzocht en slechts 1 studie bij volwassenen
- 2) Er is nood aan een prospectieve evaluatie van de impact van snelle detectie van respiratoire virussen met PCR op kosten voor het laboratorium, op hospitalisatieduur en op antibioticagebruik

Appraisal



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. Moeten we nog andere respiratoire virussen detecteren met PCR?

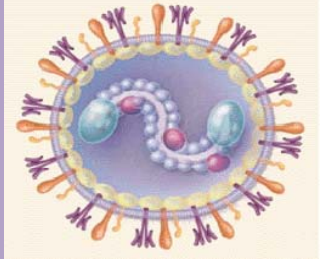
Appraisal



Literatuur: Andere respiratoire virussen

- Studie Pierangeli et al:
 - Frequentste virale pathogenen:
 1. RSV (17.2%)
 2. Rhinovirus (9.7%)
 3. Para-influenza type 3 (7.5%)
 4. Influenza A (4.4%)
 5. hMPV (3.5%)

Appraisal

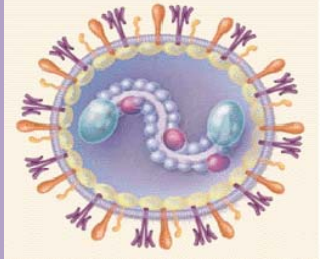


GHB: Andere respiratoire virussen

Overleg 19/09/2008:

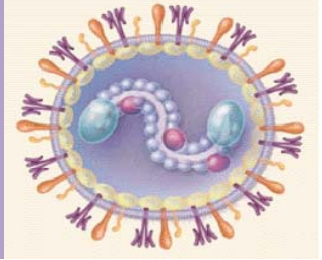
- PCR: diagnostisch panel uitbreiden met para-influenza virus en adenovirus
- vanaf winter 2009-2010

Inhoud



1. Algemene inleiding
2. Klinisch/diagnostisch scenario
3. CAT vraagstelling
4. Appraisal
- 5. To do/Actions**

To do/Actions



Is het haalbaar en aangewezen een prospectieve studie uit te voeren om de klinische impact van PCR na te gaan?

- Tijdstip: volgende winter nadat de uitbreiding van het panel met adenovirus en para-influenza gerealiseerd is.
- Opstellen van een protocol waardoor gegevens vanaf een eerste patiënten contact en gedurende de volledige hospitalisatie kunnen verzameld worden.