

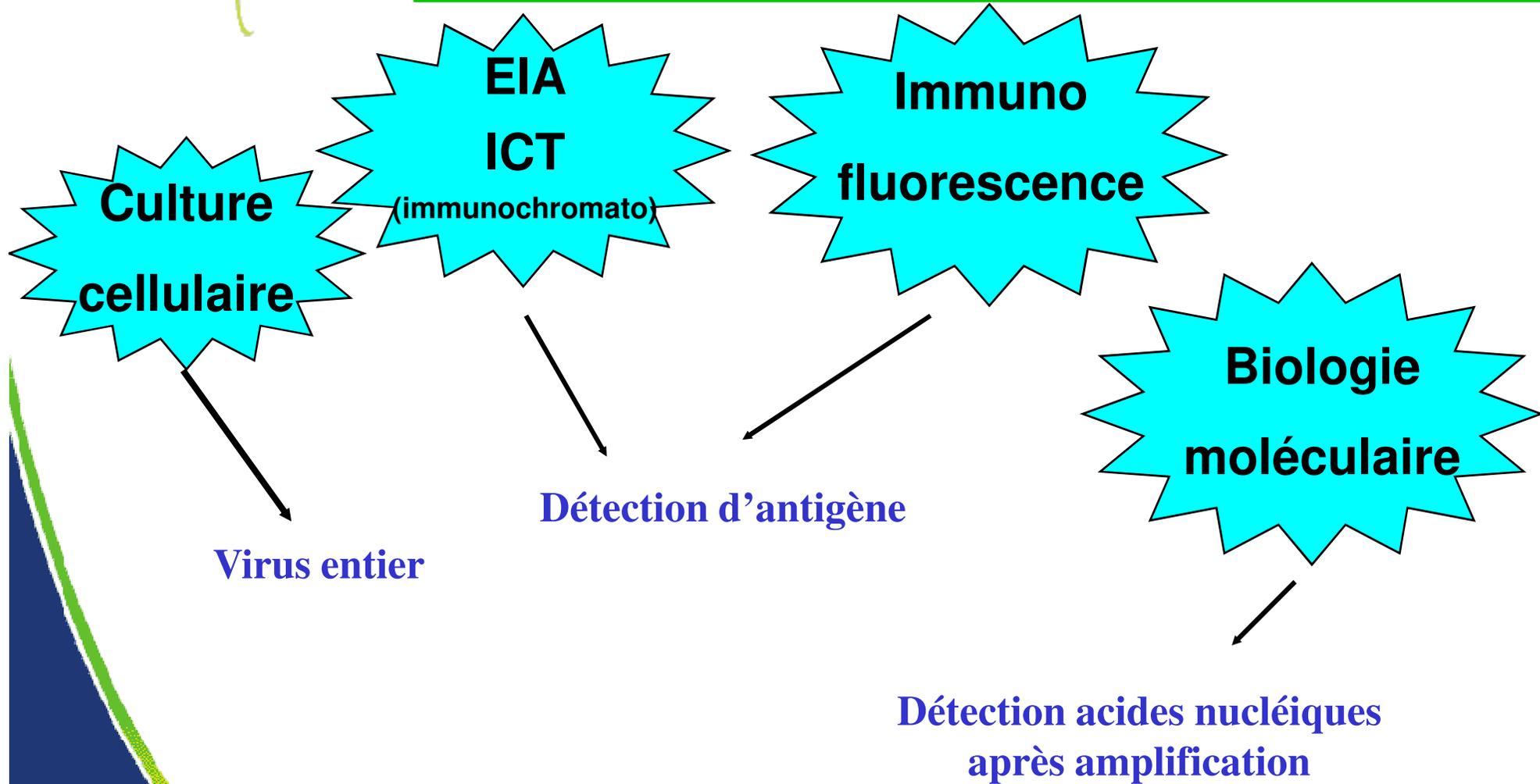
Infections aiguës respiratoires



Apport de la biologie moléculaire

Marie-Claude Bernard

Le diagnostic



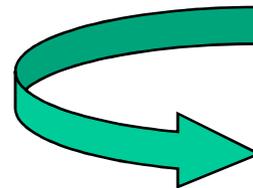
Biologie moléculaire

Caractéristiques

- Travail sur matériel génétique
- Amplification
- Automatisation
- Contrôle pour chaque échantillon

Avantages

- spécificité
- sensibilité
- standardisation
- sécurité du résultat



Confiance accrue dans le résultat

Biologie moléculaire versus IF

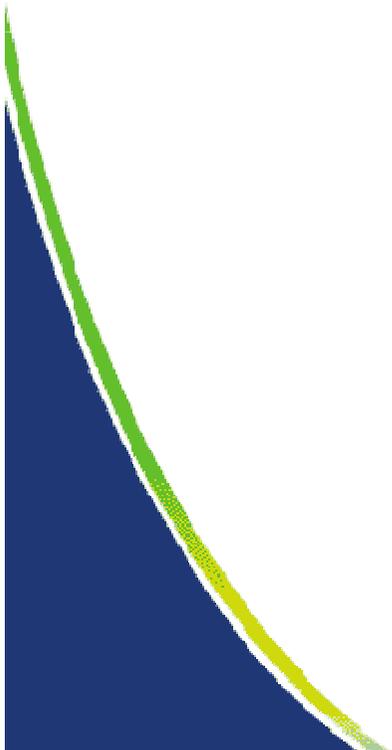
« Use of induced sputum for the diagnosis of influenza and infections in asthma journal : a comparaison of diagnostic » techniques (*Journal of Virology volume 26 april –2003 p 339-346*)

49 adultes	IFA	RT PCR
Grippe (Influenza)	Un seul cas détecté	24 % détectés
RSV	20 %	37 % détectés

La biologie moléculaire à travers un exemple ...

Virus Syncytial respiratoire

RSV A + B



Bronchiolites

RSV: un marqueur à ne pas négliger

RSV est présent dans 50 à 90% des cas de bronchiolites

RSV est lié à :

- 5 à 40% des cas de pneumonies
- 19% des hospitalisations pour des infections respiratoires basses
- Les jeunes enfants sont les plus touchés



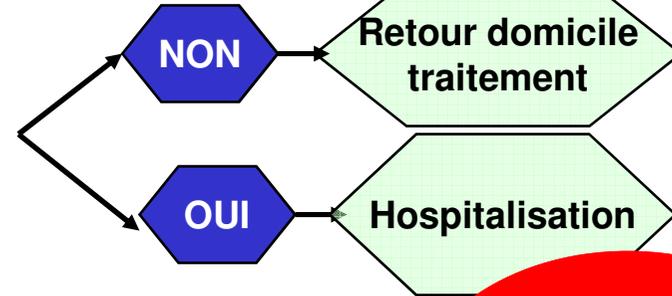
Bronchiolites

Arbre décisionnel



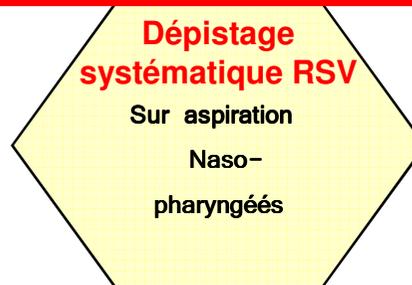
Enfant - d'un an
Avec dyspnée,
respiration difficile

1. Evaluation Sévérité des signes

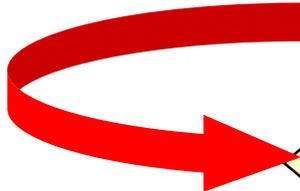


DECISION HOSPITALISATION BASEE SUR DIAGNOSTIC CLINIQUE

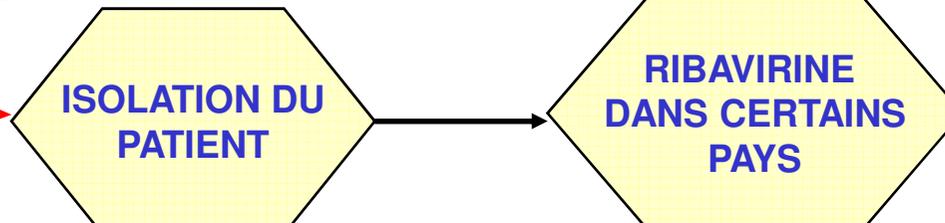
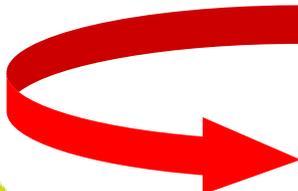
2. Diagnostic Biologique



RSV NEG



RSV POS



ISOLATION DECISION BASEE SUR LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Bronchiolites

Arbre décisionnel pour diagnostic

Enfant - d'un an
Avec dyspnée,
respiration
difficile

1. **Évaluation**
Sévérité des
signes



NON

traitement

OUI

Hospitalisation

2. **Diagnostic**
Biologique

TESTS RAPIDES
EIA/Immuno-Chromatographie (ICT)
ou
Immuno-Fluorescence (IF)

RSV NEG

RSV POS

IF post ICT/EIA
+/-Cultures

+/- Cultures

Apport biologie moléculaire

- Grande sensibilité
- Grande spécificité
- Résultat fiable dans la journée

Technique de choix pour le diagnostic

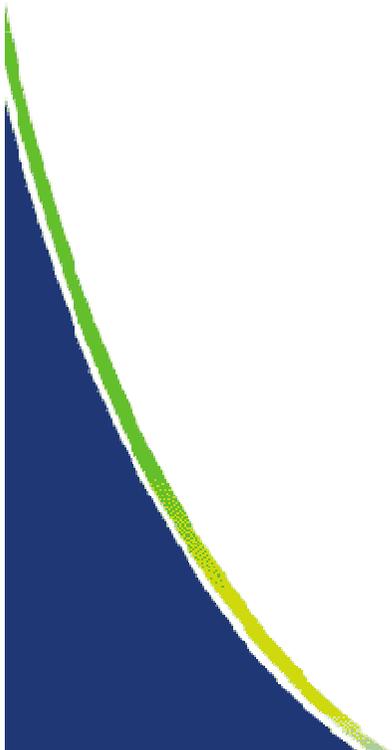
Biologie moléculaire

Bénéfice pour le médecin

- ✓ Maîtrise des infections nosocomiales
- ✓ Mise en place traitement adéquate

Bénéfice pour le biologiste

- ✓ Confiance dans le résultat
- ✓ Gain de temps



Virus Syncytial respiratoire RSV A + B

Nuclisens EasyQ
bioMérieux

NucliSens EasyQ RSV A+B

Recherche de l'ARN du virus syncytial respiratoire

- Coffret de 48 tests
- Marquage CE
- Contrôle interne séquence proche RSV
- Résultat en 3h
- Excellente sensibilité
- Excellente valeur prédictive négative

NucliSens EasyQ RSV A+B

**Évaluation de notre kit : Catherine Moore NPHS Cardiff,
university hospital of Wales**

508 échantillons saison hivers 2003/2004

- **Techniques traditionnelles :**
 - Immunofluorescence (Immunofluor – Imagen)
 - Culture cellulaire
 - Rapid test Binax NOW RSV assay
- **Biologie moléculaire**
 - EasyQ RSV A&B bioMérieux
 - RT PCR

NucliSens EasyQ RSV A+B

Évaluation de notre kit : Catherine Moore NPHS Cardiff

508 échantillons*	Techniques traditionnelles	Nuclisens RSV
RSV	21 % détectés	29 % détectés

38 % détecté en plus

* Performances évaluées sur différents spécimen respiratoires
(aspiration naso pharyngée utilisée comme référence)



Sensibilité accrue

Nuclisens EasyQ RSV A+B a détecté 14% de cas que le test rapide Binax NOW
Sensibilité 99 % - spécificité 87 % - NPV : 99 % comparé à IF

NucliSens EasyQ RSV A+B

Meilleure sensibilité = RSV dépisté



Mise en place de mesures pour éviter la
contamination

Risque diminué d'infection nosocomiale

Traitement approprié

Confort pour le patient, le clinicien et le biologiste

La technologie NucliSens

**NuclisensEasyQ real time
detection**





NucliSens

L'accord parfait des technologies :

Extraction avec

La technologie Boom

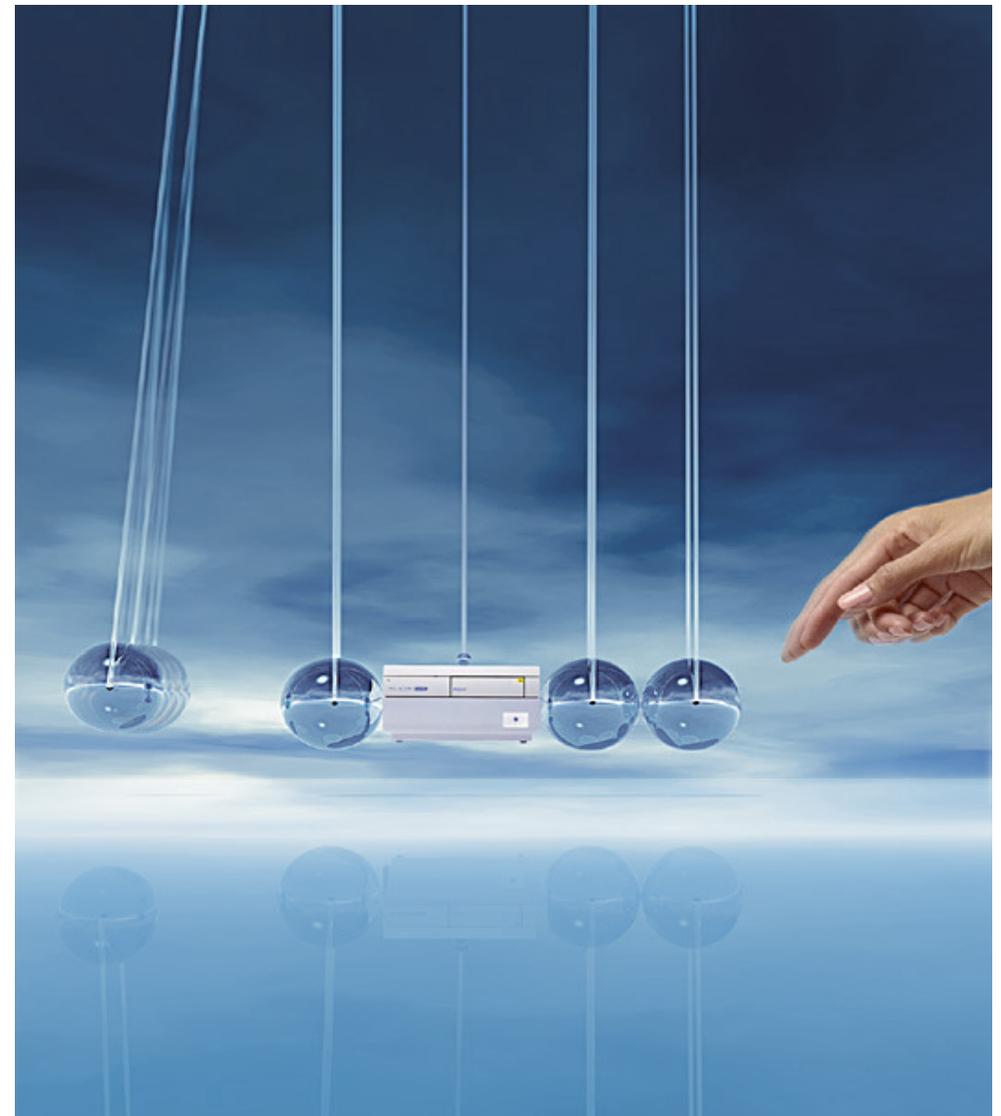
Amplification de l'Acide Nucléique

avec

NASBA

Et détection en temps réel avec

balises moléculaires



Acide Nucléique Détection en temps réel

Echantillon clinique



Lyse



Extraction de l'Acide Nucléique (Boom)



amplification



détection



Détection en temps réel

Procédure en une seule étape, dans un même tube comprenant l'amplification

NASBA et la détection basée sur
l'utilisation de balises moléculaires



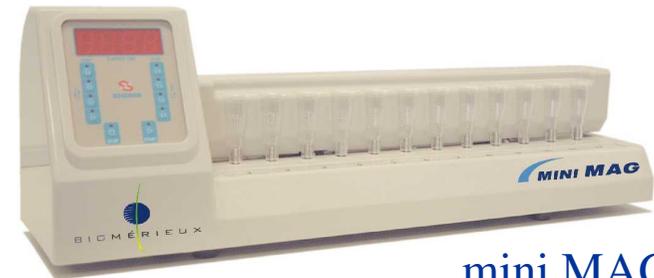
Echantillon clinique



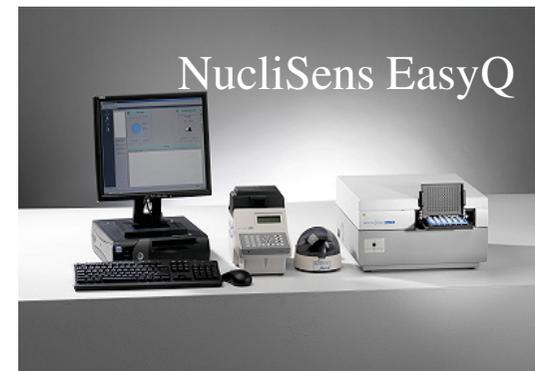
Extraction



**Amplification temps réel
&
Détection**



mini MAG



NucliSens EasyQ

1. EXTRACTION

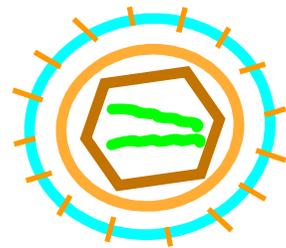


Préparation de l'échantillon

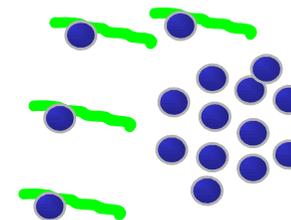
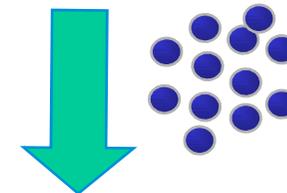
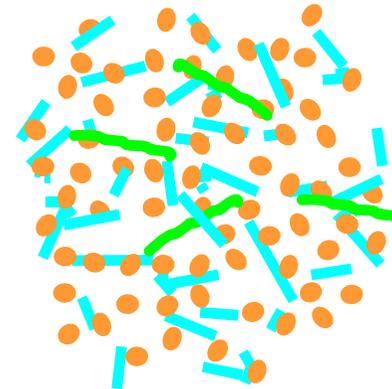
Extraction **générique** BOOM

Méthode de Référence

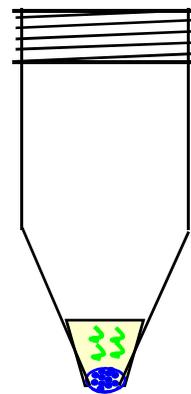
Extraction BOOM : Trois Etapes



Echantillons

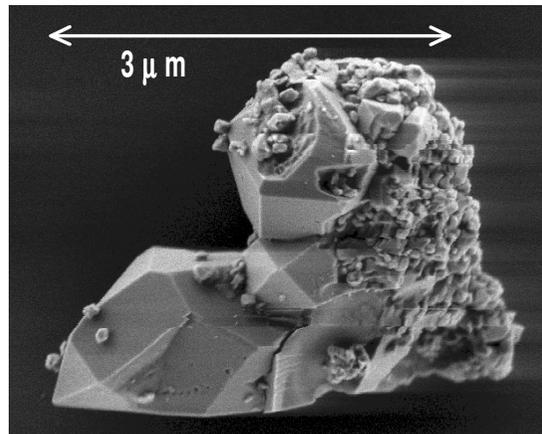


Elution

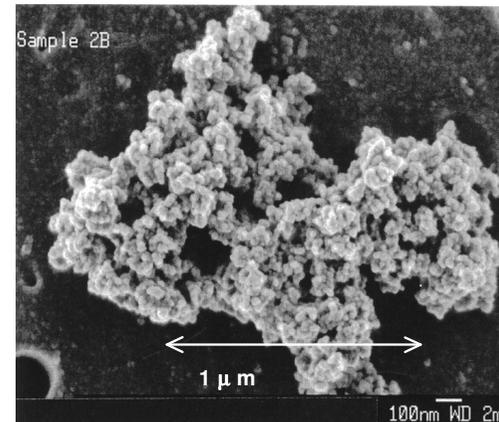


Extrait pur d'ADN et d'ARN

Composant essentiel : la silice



Silice classique (non magnétique)
Extracteur NucliSens
Extraction manuelle NucliSens



nouvelle Silice (magnétique)

- **capacité de fixation multipliée par 20**

(avec 20 fois moins de silice = même capacité de liaison, plus faible volume d'éluat possible permettant d'obtenir des concentrations de ARN/ADN plus élevées)

Pas d'ultracentrifugation

Technique NucliSens EasyQ

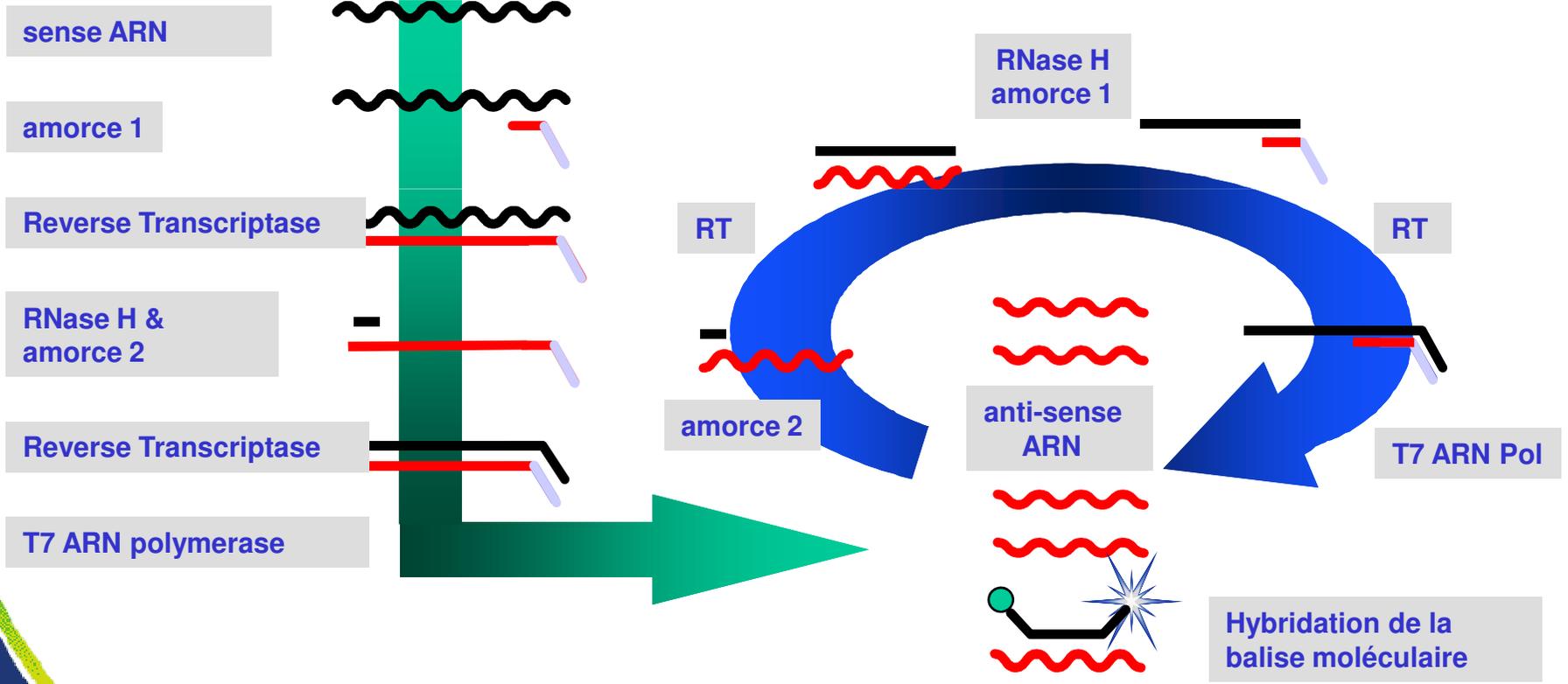
Amplification : NASBA

Détection : balises moléculaires

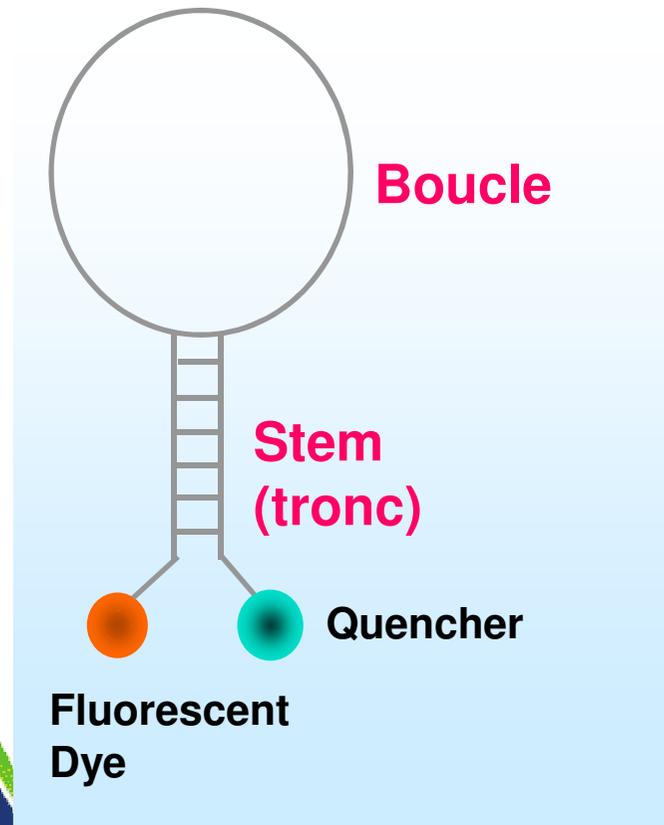
Détection en temps réel avec NASBA



balises moléculaires spécifiques de la cible



Détection : les balises moléculaires



Sondes ADN comprenant une structure en boucle et deux séquences hybridées

Boucle : Séquence de 20-25 bases complémentaire de la séquence cible

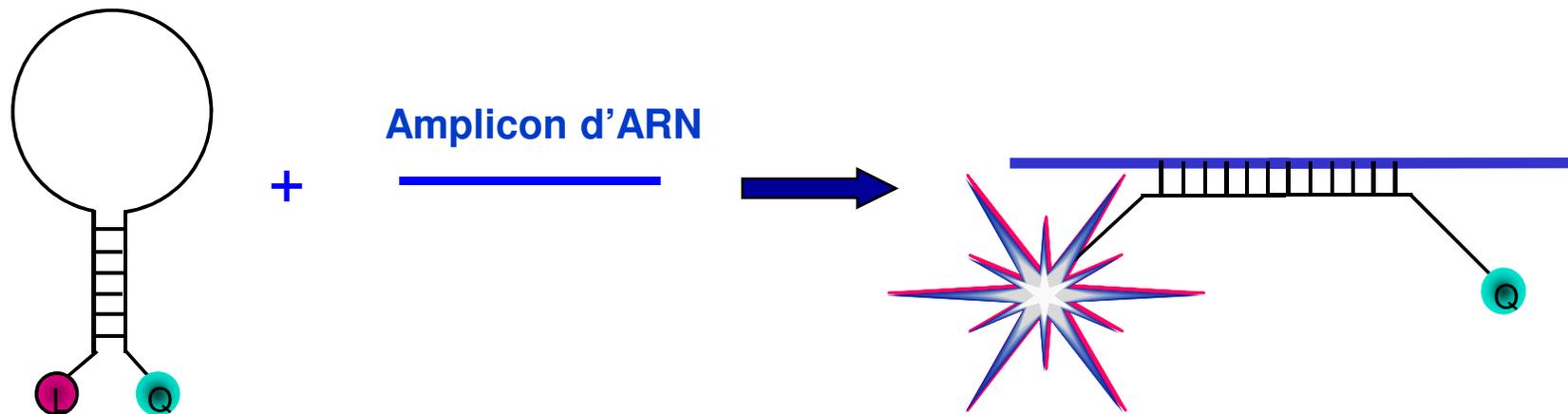
Tronc : 6-7 paires de bases

Aux deux extrémités :

- **marqueur fluorescent**
- **« quencher » extinction de la fluorescence**

Balises moléculaires - Mode d'action

La balise moléculaire s'ouvre en présence de la cible correspondante

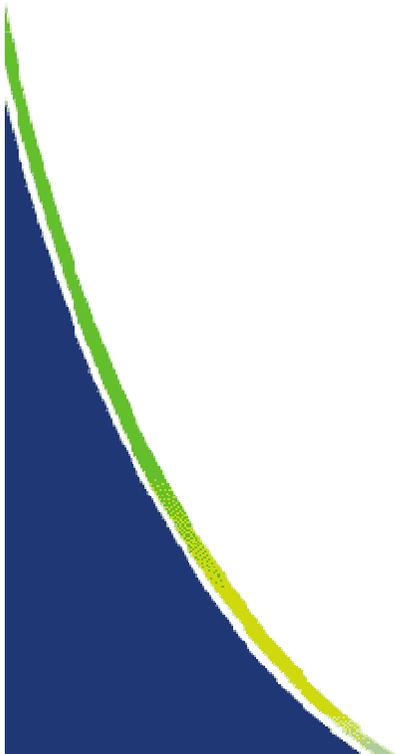


Le niveau de fluorescence augmente avec la quantité d'ARN

NucliSens EasyQ : Le matériel



Contrôle interne/ Calibrateur

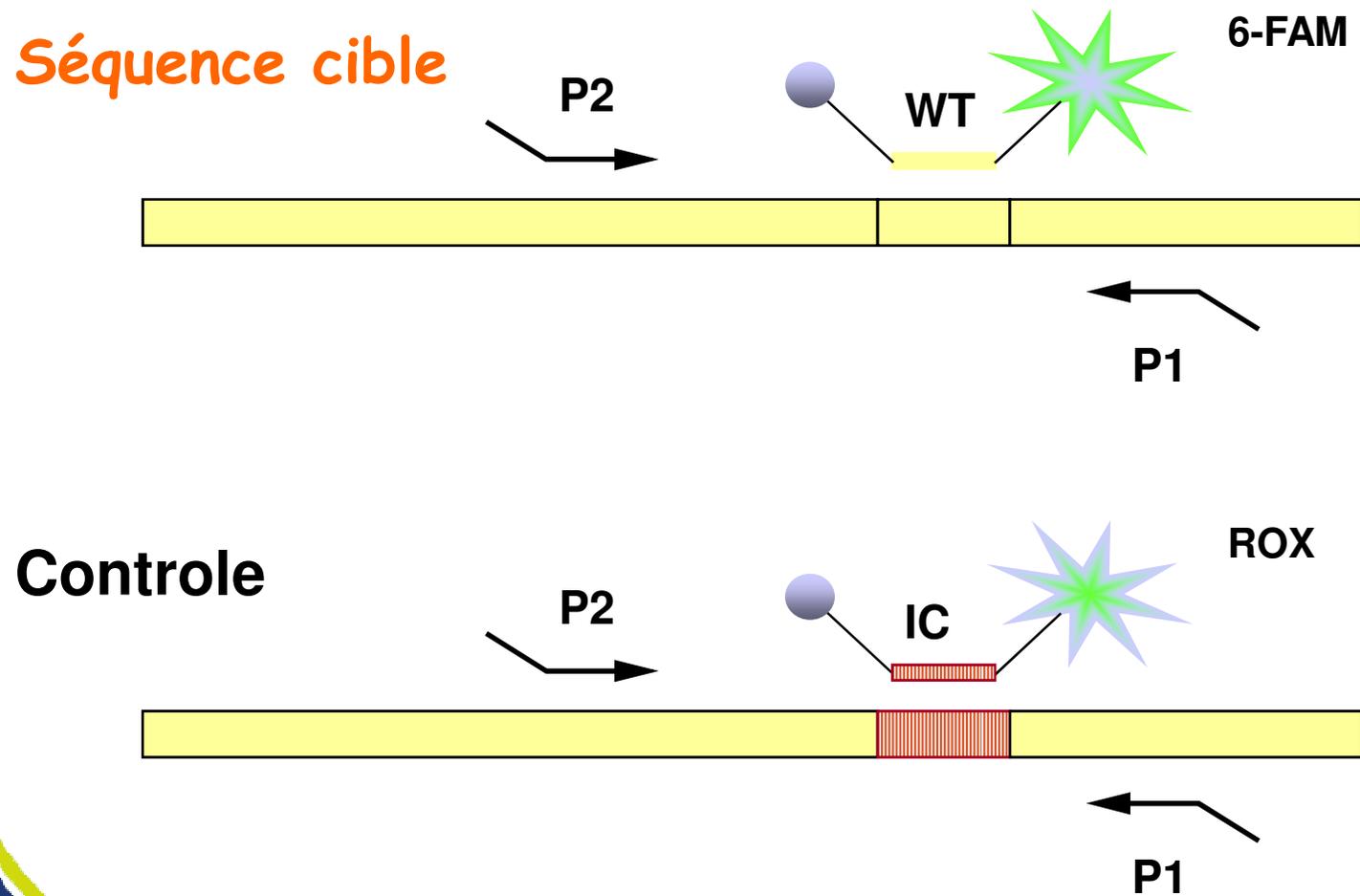


Le Contrôle interne assure la qualité des résultats

- ✓ **Identification des inhibiteurs d'amplification**
- ✓ **Qualité du réactif :**
 - Réactif de lyse et d'extraction
 - Réactif d'amplification
 - Enzyme
- ✓ **Qualité de l'instrument**
- ✓ **Manipulation du technicien**
 - Erreurs de procédure
 - Erreurs de pipetage



Choix du calibrateur/contrôle interne



Avantage d'un contrôle interne

Rappel : Le contrôle est ajouté à l'échantillon dès la phase d'extraction



Qualité du résultat

- Les variations d'efficacité de l'extraction n'affecte pas le résultat final
- Les variations d'amplification entre calibrateur et cibles sont gommées
- La présence d'inhibiteur est immédiatement révélée par le calibrateur

✓ Donnée patient

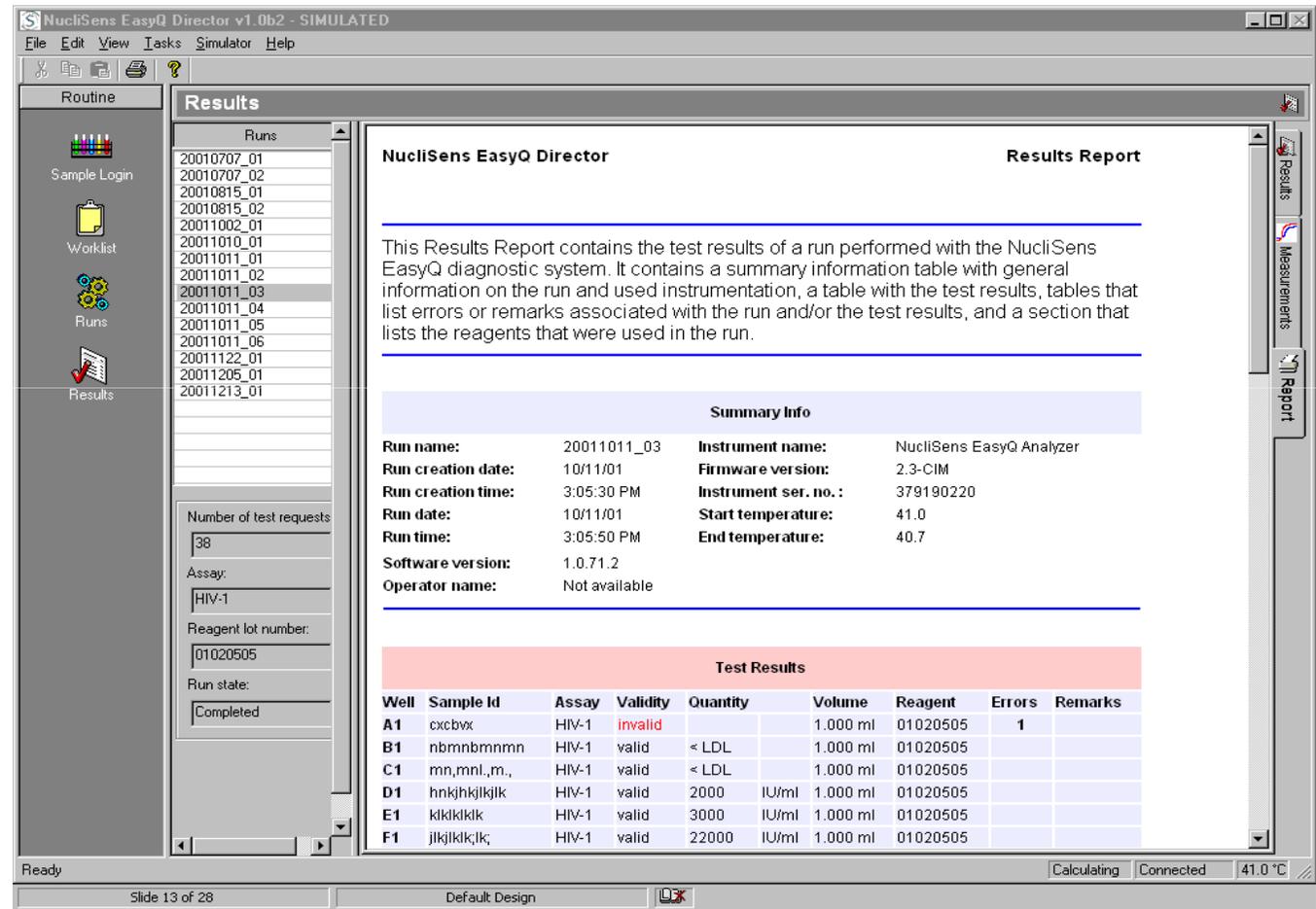
✓ Liste de travail

✓ Prise en compte de l'analyse

✓ Visualisation pendant l'analyse

✓ Calcul

✓ Rapport



NucliSens EasyQ Director **Results Report**

This Results Report contains the test results of a run performed with the NucliSens EasyQ diagnostic system. It contains a summary information table with general information on the run and used instrumentation, a table with the test results, tables that list errors or remarks associated with the run and/or the test results, and a section that lists the reagents that were used in the run.

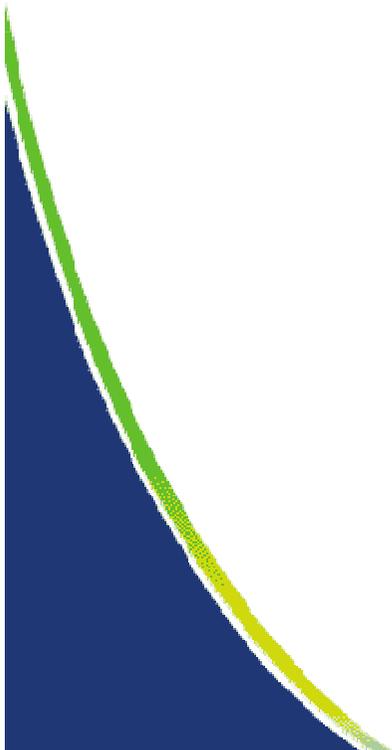
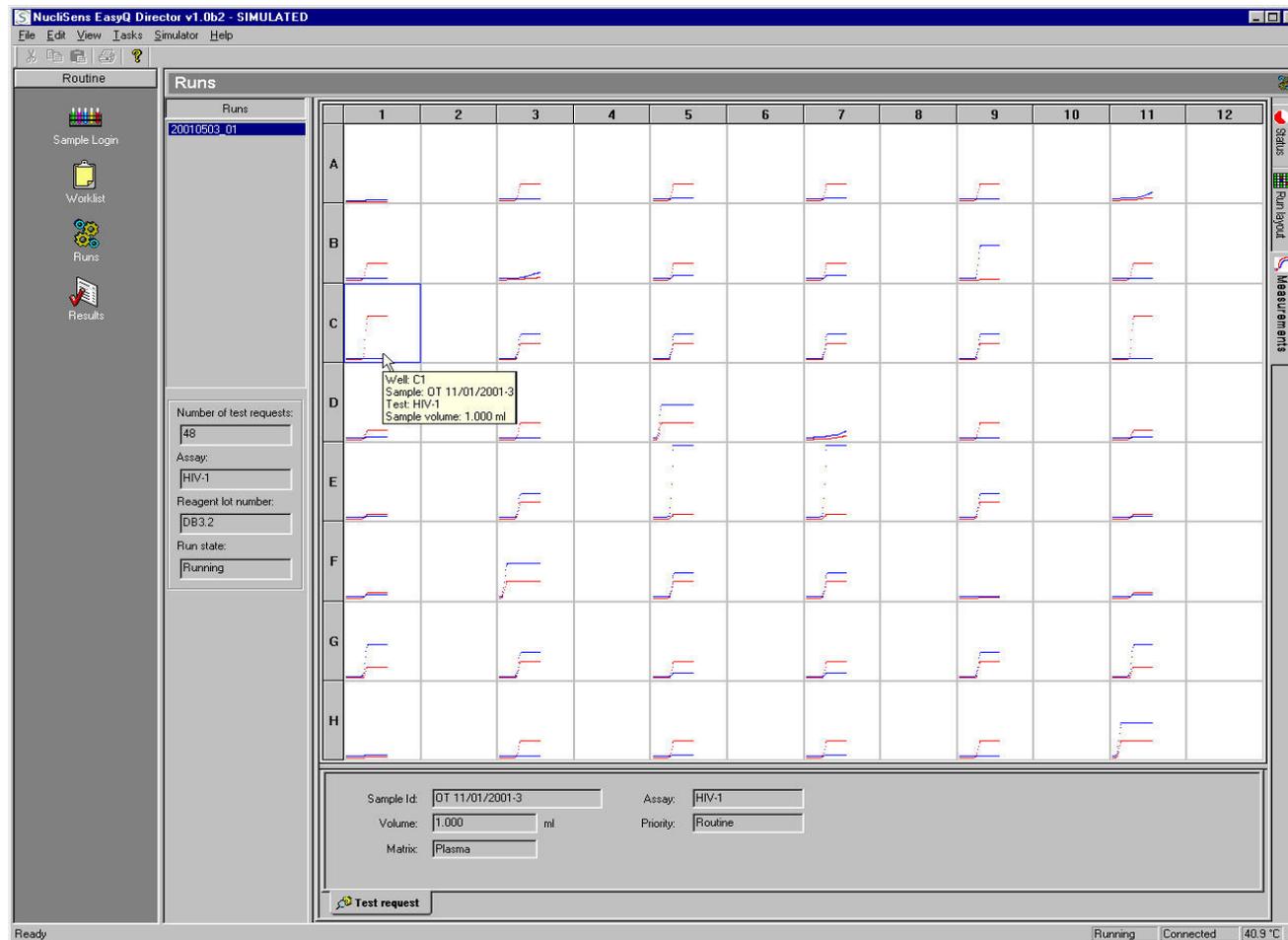
Summary Info			
Run name:	20011011_03	Instrument name:	NucliSens EasyQ Analyzer
Run creation date:	10/11/01	Firmware version:	2.3-CIM
Run creation time:	3:05:30 PM	Instrument ser. no. :	379190220
Run date:	10/11/01	Start temperature:	41.0
Run time:	3:05:50 PM	End temperature:	40.7
Software version:	1.0.71.2		
Operator name:	Not available		

Test Results								
Well	Sample Id	Assay	Validity	Quantity	Volume	Reagent	Errors	Remarks
A1	cxcbvx	HIV-1	invalid		1.000 ml	01020505	1	
B1	nbmnbmnmn	HIV-1	valid	< LDL	1.000 ml	01020505		
C1	mn,mnl,m.,	HIV-1	valid	< LDL	1.000 ml	01020505		
D1	hnhkhkjljk	HIV-1	valid	2000 IU/ml	1.000 ml	01020505		
E1	klklklkk	HIV-1	valid	3000 IU/ml	1.000 ml	01020505		
F1	jlklklk,lk,	HIV-1	valid	22000 IU/ml	1.000 ml	01020505		

Ready Calculating Connected 41.0 °C

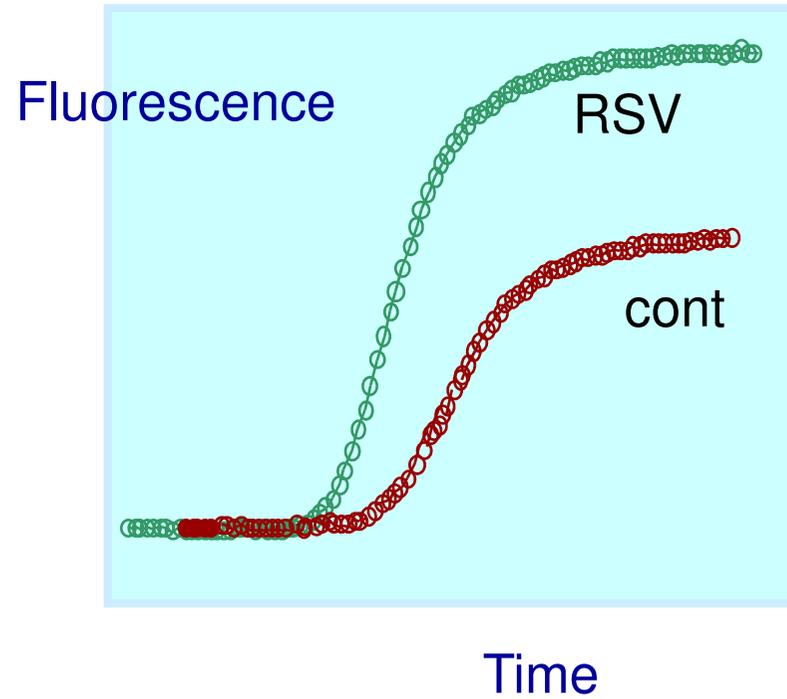
Slide 13 of 28 Default Design

Visualisation pendant l'amplification



Résultat

NucliSens EasyQ



Mesure en cinétique
(cible + 1 contrôle)

NucliSens EasyQ

**Echantillon
clinique**

Résultats



plateforme utilisée in Afrique du Sud dans le
cadre de la lutte contre le Sida

Menu EasyQ NucliSens

- **HIV-1**
- **Enterovirus**
- **RSV A/B**
- **hMPV (human metapneumovirus)***
- **HSV***
- **Mycoplasma pneumoniae***
- **Legionella spp***
- **Chlamydia pneumoniae***
- **MRSA***

* en développement



NucliSens EasyQ HIV-1

La simplicité en action ...