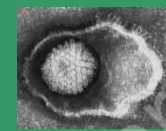


Validation des trousse Simplexa™ HSV 1 & 2 et VZV à partir de faibles volumes de prélèvements biologiques

Dr David Boutolleau

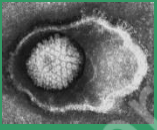
Centre National de Référence Herpèsvirus
Service de Virologie, Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière - Charles Foix
Persistent Viral Infections (PVIs), INSERM U1135, Sorbonne Université





- **Intervenant :**
 - Siemens Healthcare SAS
 - bioMérieux
 - DiaSorin Molecular

- **Consultant**
 - bioMérieux



■ Nombreuses étiologies

- **Etiologies infectieuses : virus +++**, bactéries, champignons, parasites
- Etiologies non infectieuses : maladies auto-immune, cancers, médicaments
- Etiologies indéterminée (encéphalites)

Méningites virales

Entérovirus (EV)

Virus de la varicella et du zona (VZV)

Virus herpes simplex 2 (HSV-2)

Encéphalites virales

Virus herpes simplex 1 (HSV-1)

Virus de la varicella et du zona (VZV)

Entérovirus (EV-A71)

Mailles et al., 2009
Granerod et al., 2010
Lopez-Sanchez et al., 2017
Ai et al., 2017
Bodilsen et al., 2018



Recommandations de prise en charge des encéphalites infectieuses de l'adulte

- **Traitement anti-infectieux initial empirique :**
 - Aciclovir (10mg/kg/8h) + Amoxicilline (200mg/kg/j)
- **Diagnostic microbiologique**
 - PCR **HSV**, **VZV** et **EV** dans le LCS ; coloration de Gram et culture
 - Hémocultures

48 premières heures

PCR HSV
Positive

Aciclovir
10 mg/kg/8h
Arrêt AMX

PCR VZV
Positive

Aciclovir
15 mg/kg/8h
Arrêt AMX

PCR EV
Positive

Arrêt ACV et AMX

PCR HSV et VZV négatives
Bactérie positive (culture)

Traitement antibiotique spécifique
Arrêt ACV

Tous les résultats négatifs

Aciclovir maintenu jusqu'à réévaluation des diagnostics HSV et VZV

Dans les 4 jours après le début des signes neurologiques





Stratégie en plusieurs étapes en fonction du type de patient

Patient immunocompétent (pas de notion de voyage)

HSV-1
HSV-2
VZV
Entérovirus

**90% des cas des méningites
et des encéphalites aiguës
virales**

Patient immunodéprimé

HSV-1
HSV-2
VZV
Entérovirus

CMV, EBV, HHV-8
JCV
HIV

Voyageur

HSV-1
HSV-2
VZV
Enterovirus

Arbovirus (DENV, CHIKV, ZIKV,
WNV...)

Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



- **Tests rapides de PCR en temps réel de type « *sample to result* »**
 - Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct Kit :
 - HSV-1 et HSV-2 (gène cible : ADN polymérase) + contrôle interne
 - LCS, prélèvements génitaux (milieux de transport)
 - Limite de détection : ~ 500 copies/mL (ddPCR)
 - Simplexa™ VZV Direct Kit :
 - VZV (gène cible : ADN polymérase) + contrôle interne
 - LCS
 - Limite de détection : ~ 1000 copies/mL (ddPCR)

■ Procédure

50 µL de mélange réactif (R)
50 µL de prélèvement (SAMPLE)



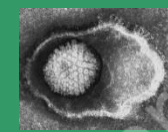
Direct Amplification Disc (DAD)



LIAISON MDX



**Résultat
en ~ 1 heure**



Rapport

Direct Amplification: Simplexa HSV 1&2 Direct_1 Segment Report

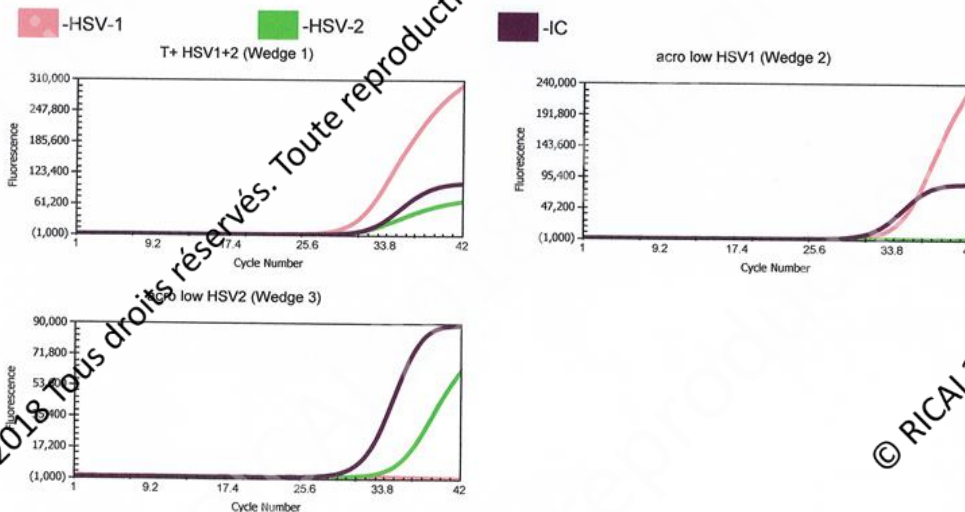
Assay Name	Simplexa HSV 1&2 Direct.2	Run Name	Run 12-11-2018 At 1219
Test By	labo viro la pitie	Report By	labo viro la pitie
Lot Number	3547N	Lot Expiration	01/2020
Instrument	200110	Software	1.1.0.2
Disc Id	B50142138	Test Date	12/11/2018 12:23:04 PM

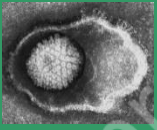
Ct Values

Wedge	Sample Id	Sample Type	HSV-1 (CFR610)	HSV-2 (FAM)	IC (Q670)	QC Statement/Notes
1	T+ HSV1+2	Unknown	29	29.5	29.6	
2	acro low HSV1	Unknown	32.9	0	29.1	
3	acro low HSV2	Unknown	0	33.3	29.2	

Results

Wedge	Sample Id	Sample Type	HSV-1 (CFR610)	HSV-2 (FAM)	IC (Q670)	QC Statement/Notes
1	T+ HSV1+2	Unknown	Detected	Detected	Valid	
2	acro low HSV1	Unknown	Detected	Not Detected	Valid	
3	acro low HSV2	Unknown	Not Detected	Detected	Valid	





■ Mise en place dans le laboratoire de virologie

■ Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct Kit :

- Depuis 2015
- Méningoencéphalites : LCS
- Herpès génital chez la femme enceinte (accouchement)
- Herpès néonatal

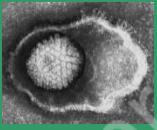
■ Simplexa™ VZV Direct Kit :

- En cours ...
- Diagnostic de méningoencéphalite : LCS

■ Volume de prélèvement biologique

- Volume indiqué dans la notice : 50 μ L
- Volume réellement utilisé dans la chambre réactionnel : 10 μ L
- En règle général, volumes limités de LCS au laboratoire

➔ Utilisation d'un volume de prélèvement < 50 μ L pour les techniques Simplexa™

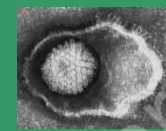


Adaptation du protocole HSV 1 & 2 (utilisation hors marquage CE)

- **Evaluation réalisée à la Mayo Clinic (2015)**
 - 50 LCS positifs pour HSV testés en parallèle avec 50, 40, 25, 20 et 10 μ L
 - Tous les échantillons étaient positifs jusqu'à 25 μ L (96% avec 20 μ L)
- **Evaluation réalisée au laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière (2017)**
 - 21 prélèvements positifs pour HSV testés en parallèle avec 50 et 25 μ L
 - 10 échantillons du QCMD HSVDNA
 - 4 LCS
 - 3 milieux de transport
 - 2 sangs totaux
 - 1 LBA
 - Contrôle positif Simplexa™ HSV

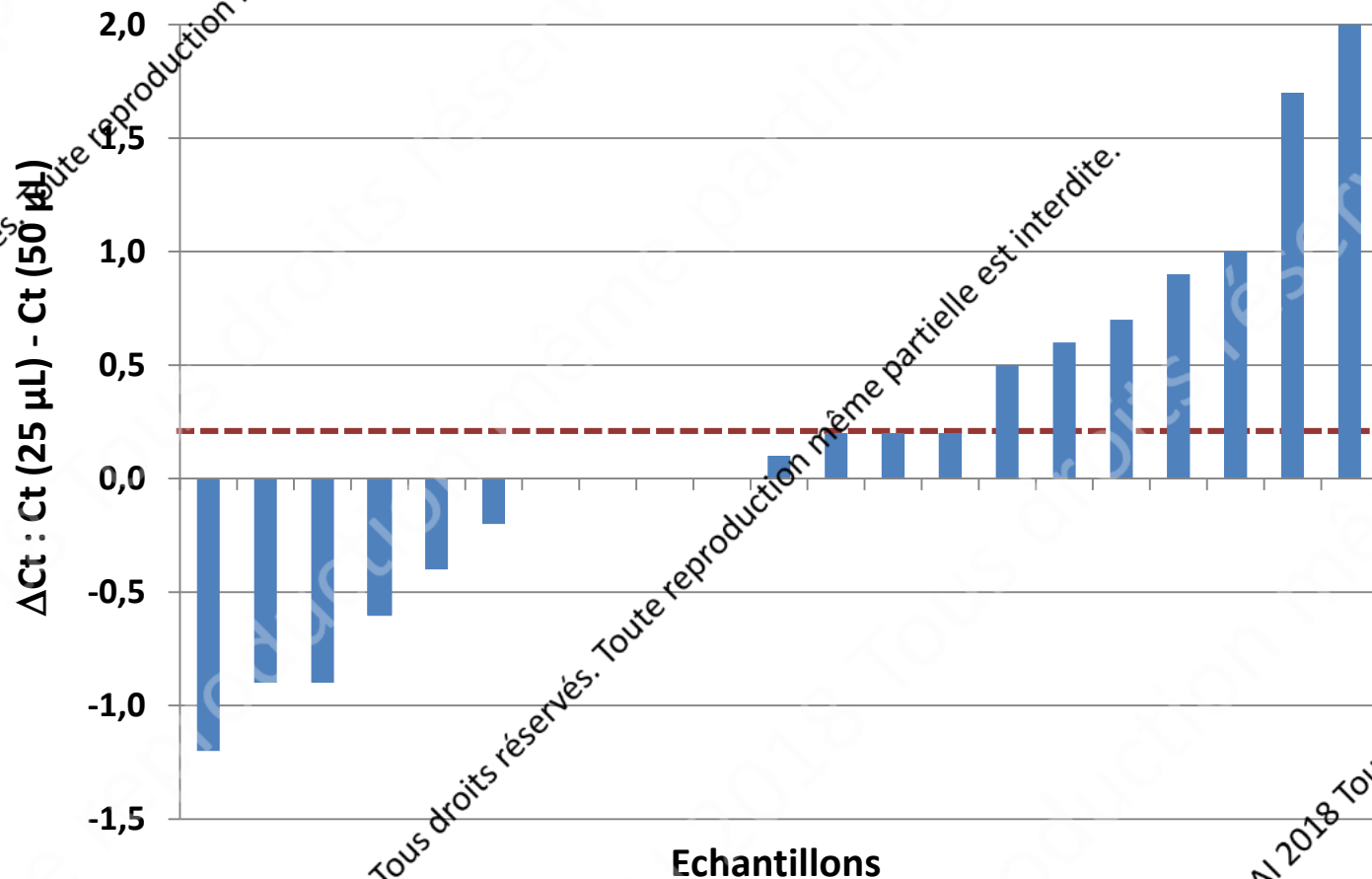
➔ Validation de l'utilisation d'un volume de 25 μ L pour le test Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct

Trousses Simplexa™ HSV 1 & 2 et VZV Direct (5)

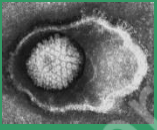


Adaptation du protocole HSV 1 & 2 (utilisation hors marquage CE)

Volume de 25 µL : 100% des prélèvements positifs pour HSV



Moyenne de
ΔCt : **+0,23**



Démarche qualité

■ Contrôle positif de trousse

- Simplexa™ HSV 1 & 2 positive control
- Passage hebdomadaire
- HSV-1 (Ct) : moyenne = 29,6 ; ET = 1,5
- HSV-2 (Ct) : moyenne = 29,4 ; ET = 1,5

■ Contrôle interne de la qualité (CIQ)

- Acrometrix™ HSV-1 et HSV-2 (niveau bas)
- Passage hebdomadaire
- HSV-1 (Ct) : moyenne = 33,9 ; ET = 1,7
- HSV-2 (Ct) : moyenne = 34,6 ; ET = 1,7

■ Evaluation externe de la qualité (EEQ)

- Programme HSV-DNA du QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics)
- Deux programmes par an
- *Detection score* : 0 pour les deux challenges en 2018



Adaptation du protocole VZV (utilisation hors marquage CE)

■ Evaluation réalisée au laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière (juillet 2018)

- 23 prélèvements positifs pour VZV testés en parallèle avec 50 et 25 μ L
 - 14 échantillons du QCMD VZVDNA
 - 4 LCS
 - 4 milieux de transport
 - Contrôle positif Simplexa™ VZV

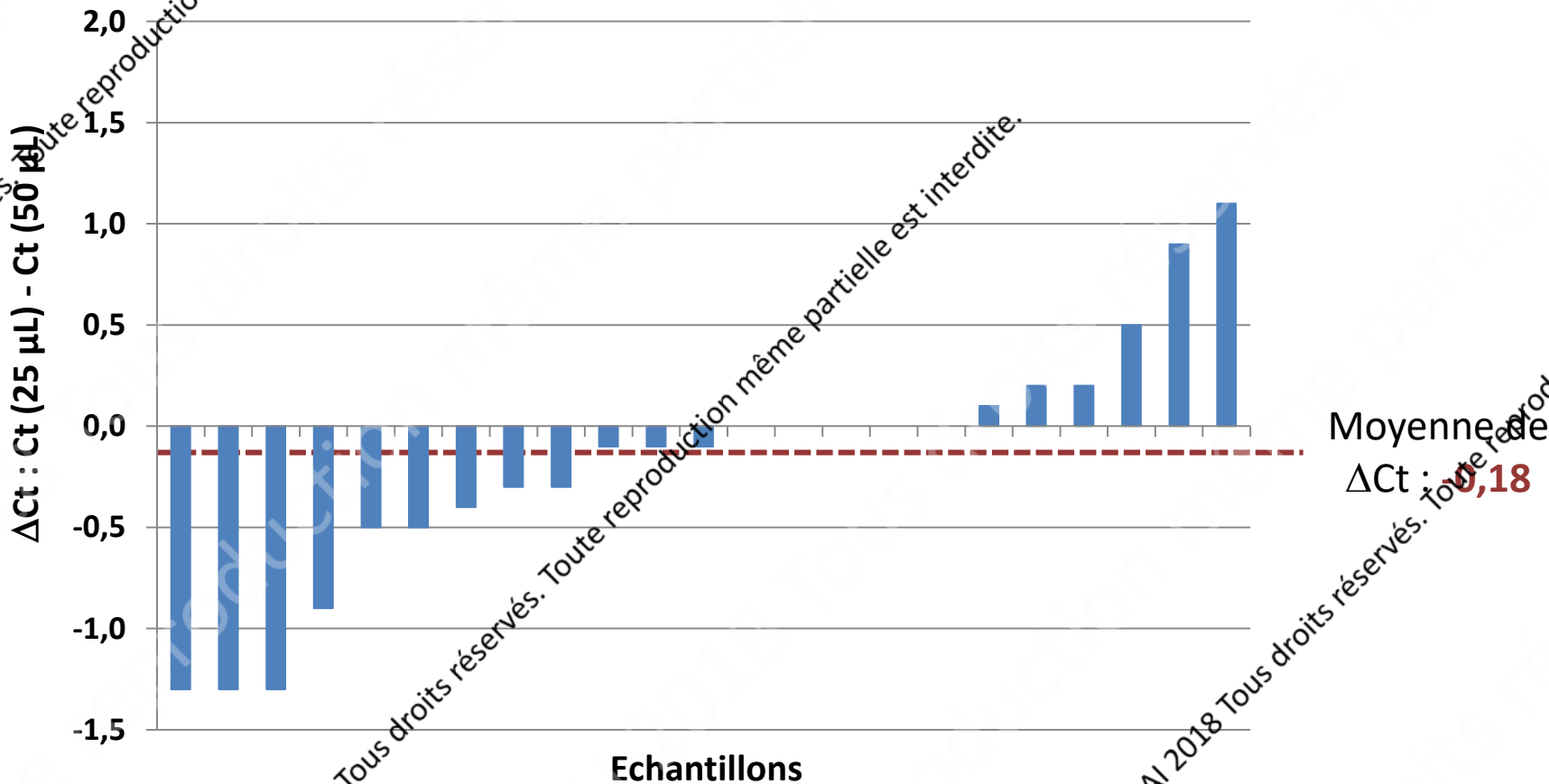
➔ Validation de l'utilisation d'un volume de 25 μ L pour le test Simplexa™ VZV Direct

Trousses Simplexa™ HSV 1 & 2 et VZV Direct (7)



Adaptation du protocole VZV (utilisation hors marquage CE)

Volume de 25 µL : 100% des prélèvements positifs pour VZV





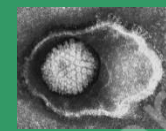
Inconvénients et améliorations

- Connexion unidirectionnelle au SIL

Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

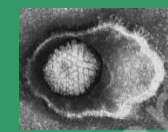
© RICA I 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICA I 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



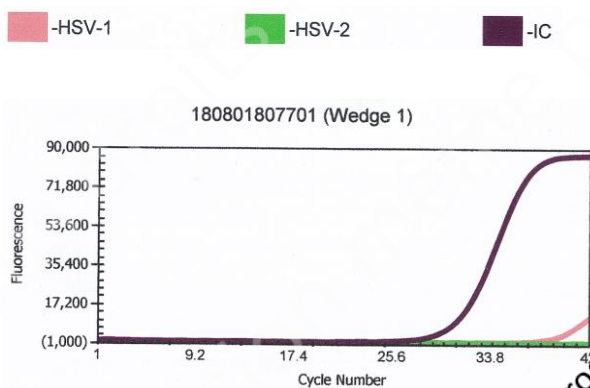
Inconvénients et améliorations

- **Connexion unidirectionnelle au SIL**
- **Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct Kit**
 - Interprétation différente pour HSV-1 (négatif si Ct>40) et pour HSV-2 (négatif si Ct>42)



Inconvénients et améliorations

- Connexion unidirectionnelle au SIL
- Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct Kit
 - Interprétation différente pour HSV-1 (négatif si Ct>40) et pour HSV-2 (négatif si Ct>42)

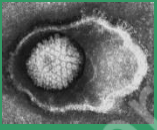


Wedge	Sample Id	Sample Type	HSV-1 (CFR610)	HSV-2 (FAM)	IC (Q670)
1	180801807701	Unknown	41.6	0	28.7

Wedge	Sample Id	Sample Type	HSV-1 (CFR610)	HSV-2 (FAM)	IC (Q670)
1	180801807701	Unknown	Not Detected	Not Detected	Valid

➔ Nouveau test avec 50 µL (si assez de prélèvement)

➔ PCR HSV-1/2 classique (extraction puis amplification en temps réel)



Inconvénients et améliorations

- Connexion unidirectionnelle au SIL
- Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct Kit
- PCR Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct moins sensible qu'une PCR classique



Inconvénients et améliorations

- Connexion unidirectionnelle au SIL
- Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct Kit
- PCR Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct moins sensible qu'une PCR classique

	Simplexa HSV 1 & 2 Direct Kit (Ct)	Extraction EMAG (bioMérieux) + artus HSV-1/2 (Qiagen) (Ct)	Δ Ct
HSVDNA 18C1-01	39,7	32,4	7,3
HSVDNA 18C1-02	29,4	24,8	4,6
HSVDNA 18C1-03	33,1	29,0	4,1
HSVDNA 18C1-04	25,2	20,9	4,3
HSVDNA 18C1-05	32,8	28,3	4,5





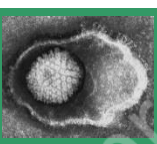
Inconvénients et améliorations

- **Connexion unidirectionnelle au SIL**
- **Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct Kit**
- **PCR Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct moins sensible qu'une PCR classique**
- **PCR Simplexa™ HSV 1 & 2 et VZV Direct**
 - Ne peuvent pas être effectuées sur le même automate -> 2 LIAISON MDX qui fonctionnent en parallèle
 - Compatibilité sur un même automate : prévue 1^{er} trimestre 2019 ...
 - Test multiplex HSV-1 / HSV-2 / VZV / contrôle interne : quand ???



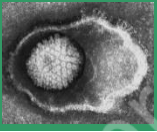
Inconvénients et améliorations

- Connexion unidirectionnelle au SIL
- Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct Kit
- PCR Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct moins sensible qu'une PCR classique
- PCR Simplexa™ HSV 1 & 2 et VZV Direct
- Nécessité d'un SAV très efficace pour les tests moléculaires d'urgence
 - Remplacement d'automate rapide ++
 - Il n'y a pas de parc d'automates disponibles en France (Italie)

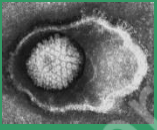


Inconvénients et améliorations

- Connexion unidirectionnelle au SIL
- Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct Kit
- PCR Simplexa™ HSV 1 & 2 Direct moins sensible qu'une PCR classique
- PCR Simplexa™ HSV 1 & 2 et VZV Direct
- Nécessité d'un SAV très efficace pour les tests moléculaires d'urgence
- Test entérovirus (voire entérovirus/parechovirus)
 - Diagnostic rapide virologique de 1^{re} ligne dans le cadre des méningoencéphalites : HSV-1, HSV-2, VZV et entérovirus



- HSV, VZV et E₁₉ sont les principales causes de méningites et d'encéphalites
- Besoin de tests moléculaires rapides et sensibles de diagnostic virologique pour la prise en charge des patients
- Les trousse **Simplexa™ HSV 1 & 2 et VZV Direct** constituent une solution efficace :
 - Obtention du résultat en 1 heure
 - Possibilité de tester un volume réduit de 25 µL
 - Améliorations : tests multiplex, test entérovirus, remplacement rapide des automates



Laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière

Dr. Sonia BURREL

Morgane BOIVIN

Coralie LE CLEC'H

Isabelle HOURCQ

Elodie CHICAUD

Jean-Claude PIOT

Nathalie HAMM

DiaSorin Molecular

Alexandre MARIE

Fanny KAMELEDDINE

Fabrice MASSON

Alfonso NATALE

Merci pour votre attention



Dr David Boutolleau

david.boutolleau@aphp.fr