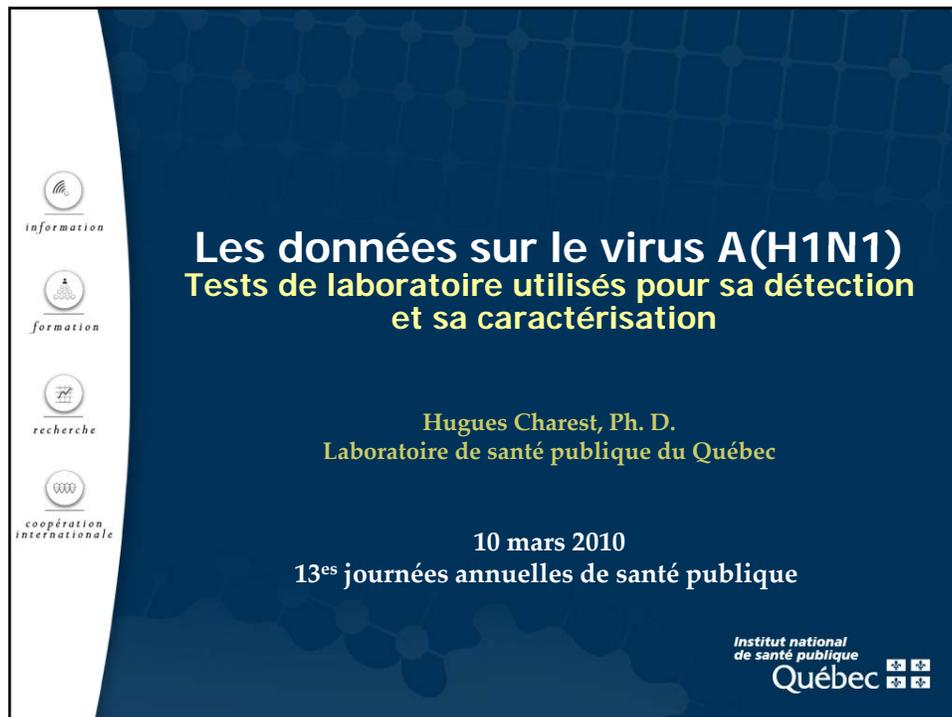


Cette présentation a été effectuée le 10 mars 2010, au cours de la journée « Qu'avons-nous appris de l'épidémie de la grippe A(H1N1)? » dans le cadre des Journées annuelles de santé publique (JASP) 2010. L'ensemble des présentations est disponible sur le site Web des JASP, à l'adresse <http://www.inspq.qc.ca/archives/>.



information

formation

recherche

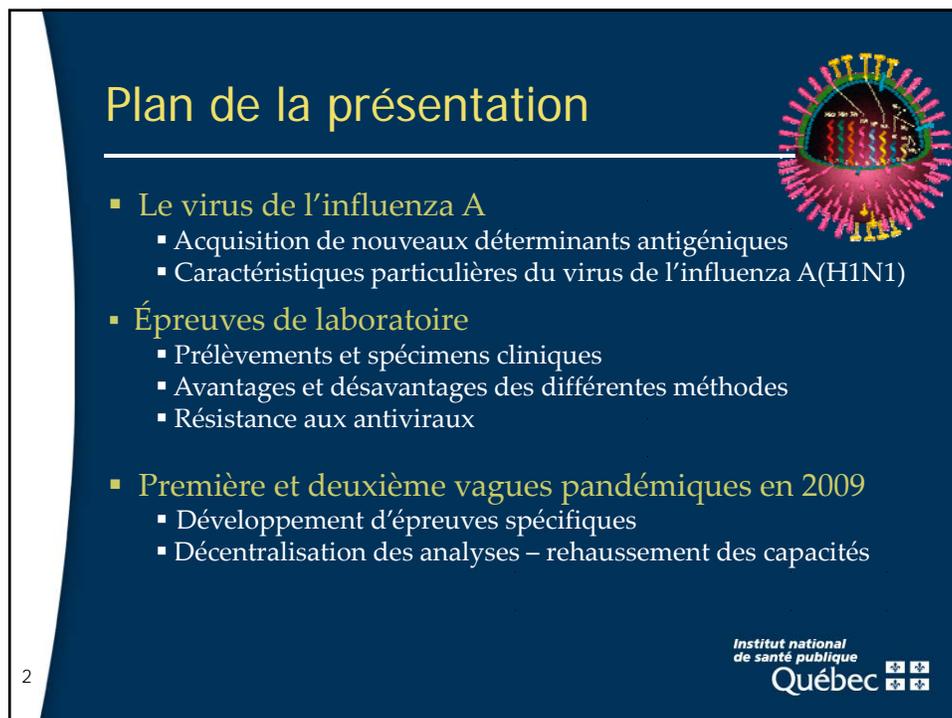
coopération internationale

Les données sur le virus A(H1N1) Tests de laboratoire utilisés pour sa détection et sa caractérisation

Hugues Charest, Ph. D.
Laboratoire de santé publique du Québec

10 mars 2010
13^{es} journées annuelles de santé publique

Institut national
de santé publique
Québec



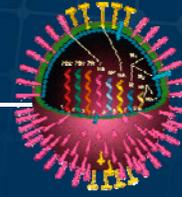
Plan de la présentation

- **Le virus de l'influenza A**
 - Acquisition de nouveaux déterminants antigéniques
 - Caractéristiques particulières du virus de l'influenza A(H1N1)
- **Épreuves de laboratoire**
 - Prélèvements et spécimens cliniques
 - Avantages et désavantages des différentes méthodes
 - Résistance aux antiviraux
- **Première et deuxième vagues pandémiques en 2009**
 - Développement d'épreuves spécifiques
 - Décentralisation des analyses – rehaussement des capacités

Institut national
de santé publique
Québec

2

Le virus de l'influenza A



- **Sérotypes des antigènes de surface :**
 - hémagglutinine (H₁-H₁₆; H₁ à H₃ chez l'humain)
 - neuraminidase (N₁-N₉, N₁ et N₂ chez l'humain)
- **Sous-types transmissibles :**
 - entre humains (et porcs) : H1N1, H3N2, H1N2 et H2N2
 - des oiseaux à l'humain : H5N1, H9N2, H7N7, H7N2 et H7N3



Hémagglutinine
(16 sérotypes)

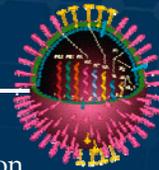
Neuraminidase
(9 sérotypes)

3



Institut national
de santé publique
Québec

Acquisition de nouveaux caractères antigéniques (drift vs shift)



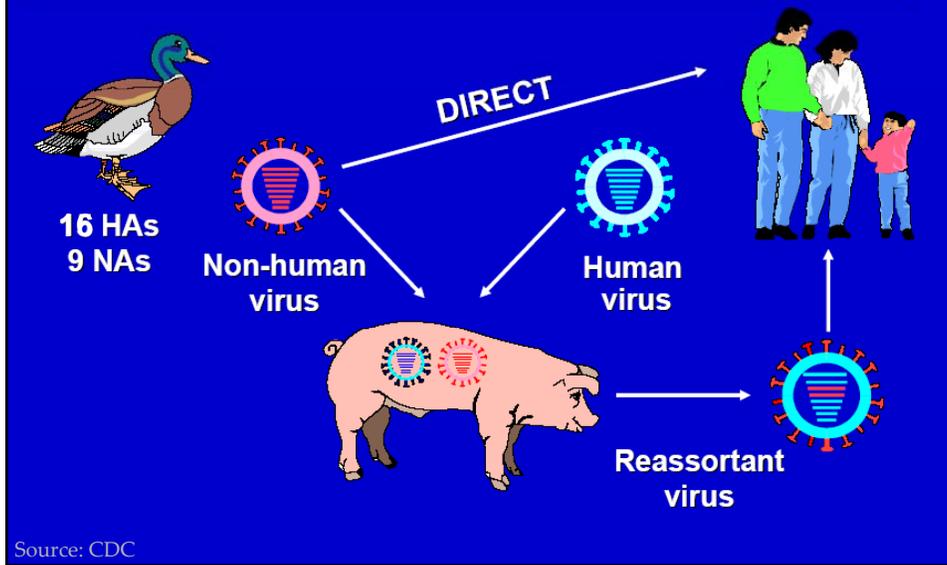
- **Dérive antigénique (drift):**
 - causée par des erreurs dans le processus de réplication (mutations ponctuelles) - changements graduels des gènes codant pour l'HA et la NA
 - responsable des réinfections par le même sous-type au cours d'une vie
 - responsable des épidémies annuelles
- **Cassure antigénique (shift):**
 - changements majeurs ou remplacement complet des gènes codant pour HA et/ou NA
 - abrupte, peu fréquent et imprévisible
 - peut causer une pandémie

4

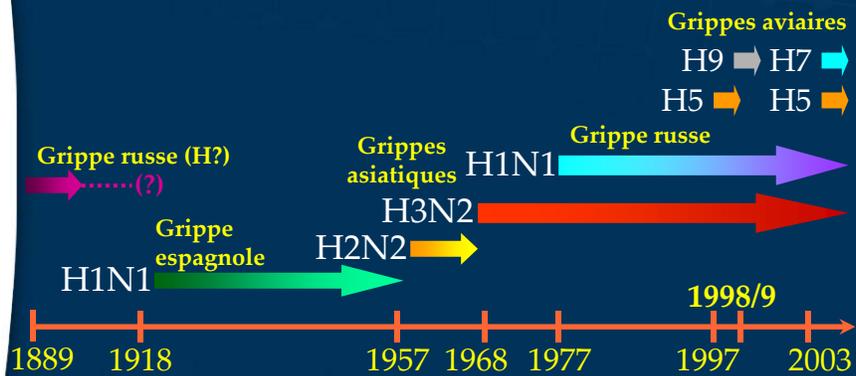


Institut national
de santé publique
Québec

Mechanisms of Influenza Virus Antigenic "Shift"



Chronologie de la grippe A



Surveillance – vigie pour H5N1

Toronto Star; novembre 2005



7



Institut national
de santé publique
Québec



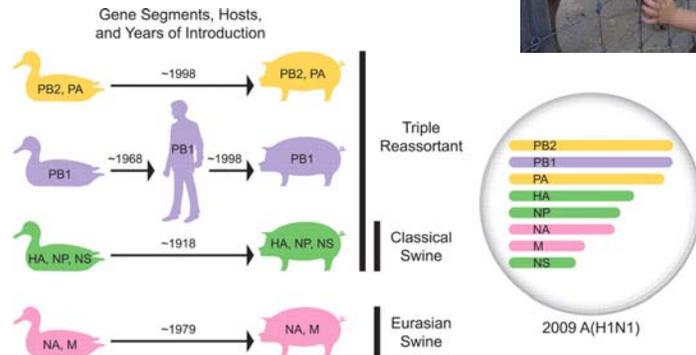
8



Institut national
de santé publique
Québec



Fig. 1 Host and lineage origins for the gene segments of the 2009 A(H1N1) virus: PB2, polymerase basic 2; PB1, polymerase basic 1; PA, polymerase acidic; HA, hemagglutinin; NP, nucleoprotein; NA, neuraminidase; M, matrix gene; NS, nonstructural gene

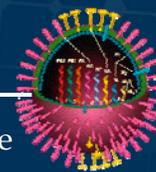


Published by AAAS

R. J. Garten et al., *Science* 325, 197-201 (2009)



Le virus de l'influenza A(H1N1) pandémique 2009



- virus réassorti - variation sur une même thème
- Origine Nord-Américaine
- Très contagieux, relativement peu virulent
- 2 vagues successives hors de la saisonnalité habituelle
- Dispersion rapide dans le monde



10



Institut national
de santé publique
Québec

Diagnostic de laboratoire



Institut national
de santé publique
Québec

Situations justifiant le diagnostic de laboratoire de l'influenza

- Opportunité de traitement (cas sévères, populations vulnérables)
- Éclosions en institutions – prophylaxie
- Échec thérapeutique – résistance aux antiviraux
- Participation à un programme de surveillance
- Vigie pour une souche virale émergente (ex. grippe aviaire)

12



Institut national
de santé publique
Québec

Méthodes de diagnostic en laboratoire

- Directes
 - Culture virale
 - Détection d'antigènes
 - Immunofluorescence
 - Test rapide (POC)
 - Détection d'acides nucléiques (TAAN)
- Indirecte
 - Sérodiagnostic

13



Institut national
de santé publique
Québec

Types d'échantillons – détection du virus

- échantillons respiratoires
 - Écouvillon nasal
 - Sécrétion nasopharyngée
 - Aspiration nasopharyngée
 - Écouvillon nasopharyngé
 - Écouvillon de gorge
 - Sécrétion endotrachéale
 - Lavage bronchoalvéolaire



14



Institut national
de santé publique
Québec

Culture virale

- « Gold Standard » ; infectiosité
- Temps réponse : 2 à 10 jours
- Confirmation par tests complémentaires
- **Avantages** : isolement pour caractérisation du sous-type par IH et de la sensibilité aux antiviraux par épreuves phénotypiques
- **Désavantages** : long; requiert infrastructure et expertise – NC3 pour nouveaux variants



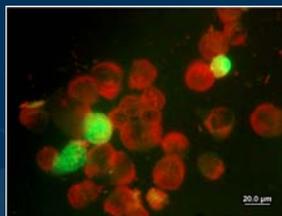
15



Institut national
de santé publique
Québec

Détection d'Ag par immunofluorescence

- Détection des antigènes du virus à l'intérieur des cellules présentes dans l'échantillon respiratoire
- Temps réponse : environ 2 heures
- **Avantages** : rapide; permet d'évaluer la qualité du spécimen
- **Désavantages** : moins sensible que la culture; requiert personnel expérimenté; pas de sous-typage (en routine)



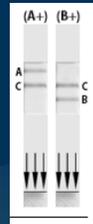
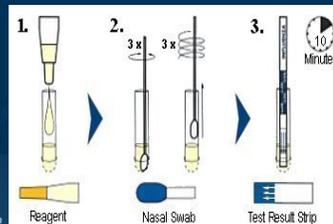
16



Institut national
de santé publique
Québec

Détection d'antigènes par tests rapides

- Détection des antigènes du virus dans un lysat préparé à partir de l'échantillon clinique
- Temps réponse : 20 à 30 minutes
- **Avantages** : très rapide; exécution simple
- **Désavantages** : sensibilité et spécificité variables; pas de sous-typage – pas adapté pour nouveaux variants



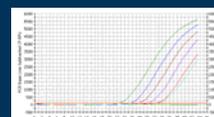
Institut national
de santé publique
Québec

17



Détection d'acides nucléiques (TAAN)

- Détection du génome du virus par amplification spécifique (RT-PCR, par exemple)
- Temps réponse : 8 heures
- **Avantages** : très sensible et spécifique; permet l'identification des sous-types
- **Désavantages** : peu ou pas de trousse commerciales homologuées; nécessite équipement et expertise spécialisés

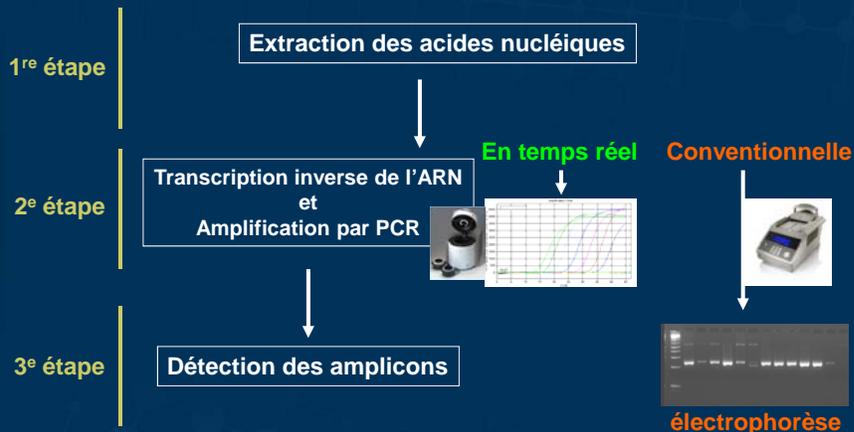


Institut national
de santé publique
Québec

18



Épreuves de détection par RT-PCR



19



Institut national
de santé publique
Québec

Capacité de diagnostic de laboratoire de la grippe au Québec (février 2009)

Nombre de laboratoires du réseau québécois offrant des épreuves pour le diagnostic de l'influenza : 83/114.

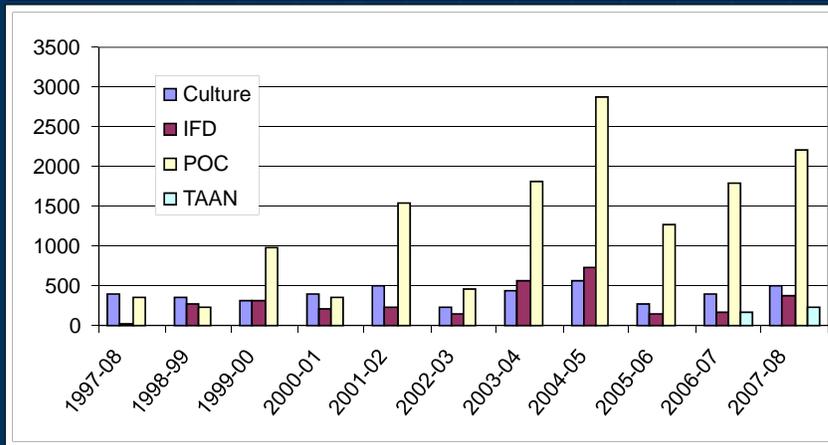
Service	Nombre	Seul service
Culture virale	7	0
Détection d'Ag (POC ou IFA)	80	71
TAAN	3	1

20



Institut national
de santé publique
Québec

Répartition des cas positifs selon la méthode de détection (1997-2008); labos sentinelles

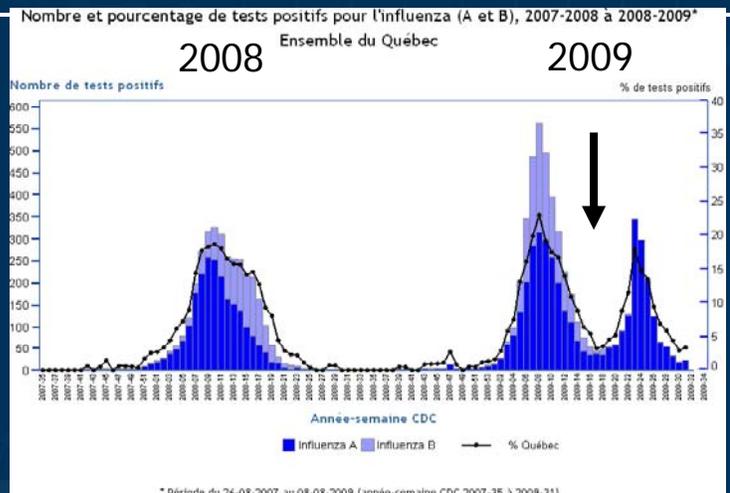


21



Institut national de santé publique Québec

Saisons influenza 2007 à juillet 2009.



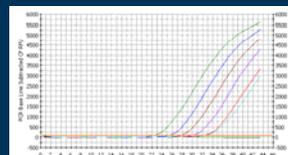
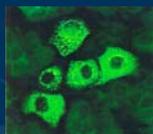
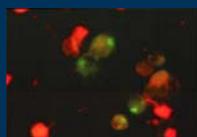
22



Institut national de santé publique Québec

Capacité de diagnostic de la grippe A(H1N1) au Québec; avril 2009.

- Culture virale : efficacité inconnue (lignées?), long
- DFA : efficacité inconnue (plusieurs trousses)
- Tests rapides (POC) : efficacité inconnue – sensibilité probablement faible (plusieurs trousses)
- TAAN : sensibles, facilement adaptables



23



Institut national
de santé publique
Québec

Préparation à une pandémie au LSPQ (2005 -)

- Stock de réactifs et jetables pour TAAN, > 5000 tests
- Extracteur d'acides nucléiques à grande capacité
- Protocoles RT-PCR avec détection conventionnelle et en temps réel pour la recherche, le typage et le sous-typage des virus de l'influenza
 - Variété et redondance; sous-typage H1, H3, H5, H7
- Participation à des contrôles externes de la qualité
- Implications dans divers groupes de travail aux échelles provinciale, nationale et nord-américaine (GPSVI – PILPN – EBHI)

24



Institut national
de santé publique
Québec

Début des tests diagnostiques pour la recherche du virus de la grippe A(H1N1)

- 20 avril : L'ASPC informe que le LNM contribuait aux investigations de laboratoire pour des grappes de maladies respiratoires sévères au Mexique.
- 22 avril : les CDC confirment deux cas de grippe porcine H1N1 chez des enfants du sud la Californie.
- 24 avril : réception du protocole du LNM du Canada pour la grippe porcine A(H1N1)
- 25 avril : premiers cas positifs confirmés au Canada (NE/LNM)

25



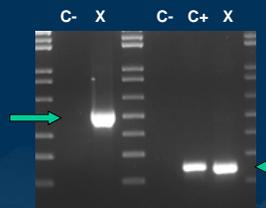
Institut national
de santé publique
Québec

Premiers tests diagnostiques pour la la grippe A(H1N1) au Québec (LSPQ)

- 25 avril : premier échantillon clinique reçu
- 26 avril : première batterie de tests
- 27 avril : premier positif influenza A/non sous-typable
- 29 avril : confirmation d'un positif A(H1N1)op

RT-PCR H1N1op
(protocole NML)

RT-PCR influenza A
(protocole Fouchier)



Patient HMR:

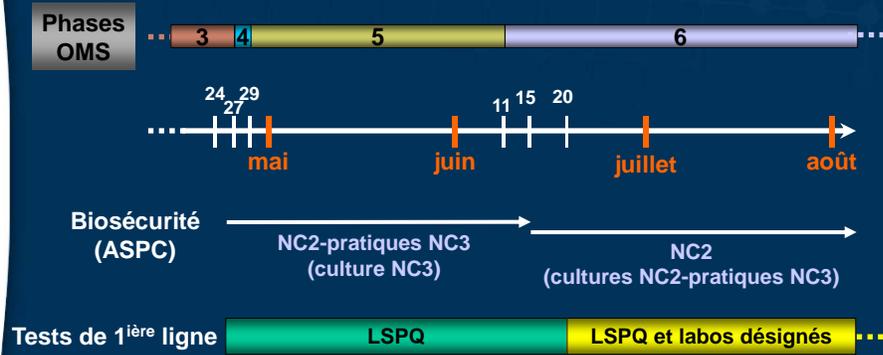
- Homme 20aine
- Retour du Mexique – golf
- Sans maladie sous-jacente
- Urgence - SAG

26



Institut national
de santé publique
Québec

Diagnostic de la grippe pandémique au Québec - Première vague

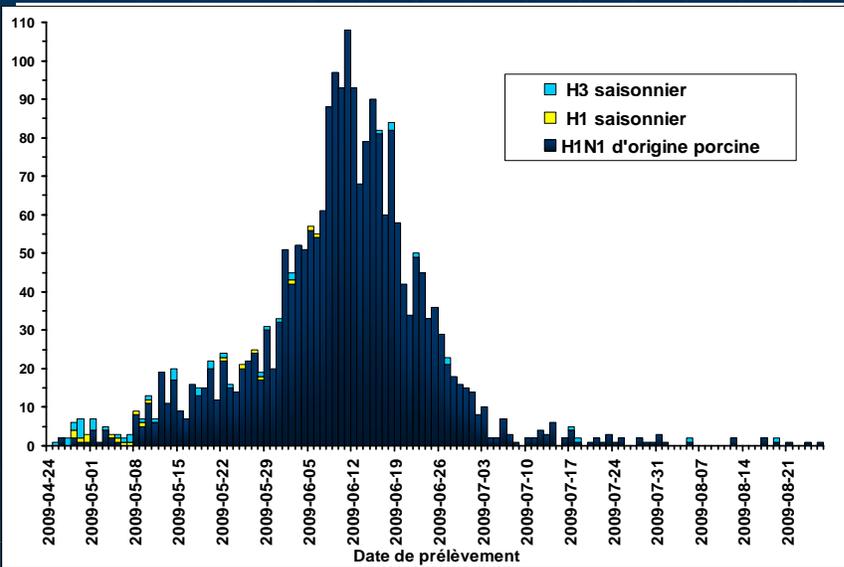


27



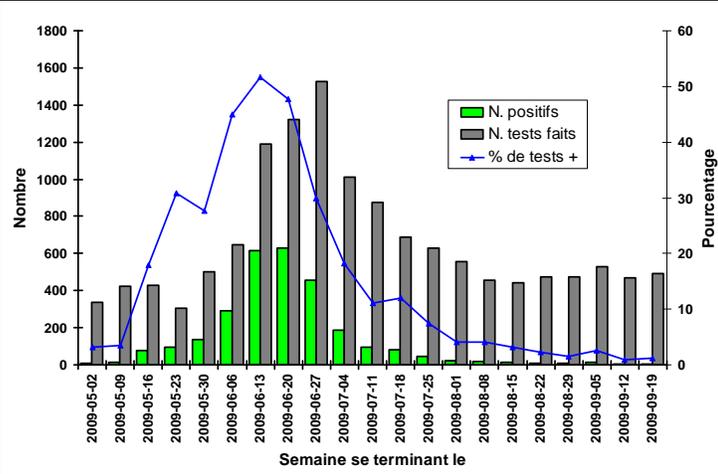
Institut national de santé publique
Québec

Nombre d'échantillons positifs pour l'influenza A (24 avril – 29 août 2009) - LSPQ



28

Volume d'analyse – taux de positivité A(H1N1)op LSPQ et labos désignés – première vague.

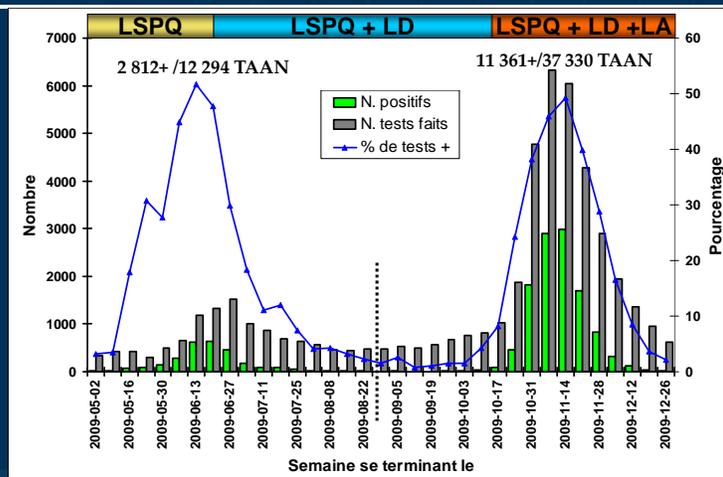


29



Institut national de santé publique Québec

Volume d'analyse – taux de positivité A(H1N1)op LSPQ, 4 labos désignés (LD) et 5 associés (LA).



30



Institut national de santé publique Québec

Résistance aux antiviraux des isolats circulants au Canada; saison 2008-2009.

Données du LNM de Winnipeg

Amantadine

- H₁N₁: 100% étaient **susceptibles** (n = 319)
- H₃N₂: 100% étaient **résistantes** (n = 396)
- H₁N₁ op: 100% étaient **résistantes** (n = 361)



Oseltamivir

- H₁N₁: 99,7% étaient **résistantes** (n = 320)
- H₃N₂: 100% étaient **susceptibles** (n = 194)
- H₁N₁ op: 100% étaient **susceptibles** (n = 527)



Zanamivir

- H₁N₁: 100% étaient **susceptibles** (n = 257)
- H₃N₂: 100% étaient **susceptibles** (n = 190)
- H₁N₁ op: 100% étaient **susceptibles** (n = 280)



31



Institut national de santé publique
Québec

Distribution de la résistance à l'oseltamivir chez les isolats H1N1 au Canada saison 2007-2008.



32



Ref. Yan Li, Laboratoire National de microbiologie à Winnipeg

Institut national de santé publique
Québec

Tests de résistance au Tamiflu au Québec

- Deux laboratoires ont la capacité d'effectuer des épreuves de résistance à l'oseltamivir, soit le CHUQ-CHUL et LSPQ.
- En juin, un premier cas de résistance est rapporté par le CHUQ-CHUL, lié à la mutation H275Y, chez un patient du Bas St-Laurent traité avec le Tamiflu en prophylaxie – plusieurs autres cas identiques détectés dans la monde pendant la première vague.
- Appréhendant une deuxième vague à l'automne, il apparaissait essentiel d'exercer une surveillance virologique et d'offrir des épreuves analytiques génotypiques pour la détection de la résistance à l'oseltamivir.

33



Institut national
de santé publique
Québec

Méthodes pour déterminer la résistance aux antiviraux

- **Phénotypiques, par culture en présence d'antiviraux ou tests d'inhibition enzymatique**
 - gold standard
 - isolement de la souche nécessaire
 - NC3 pour souche hautement pathogène
 - temps réponse ~ 7 jours
- **Génotypique par séquençage**
 - temps réponse 2-3 jours
 - hautement spécialisé; appareillage \$\$\$
 - ne recherche que les mutations qui sont connues pour conférer la résistance aux antiviraux

34



Institut national
de santé publique
Québec

Nombre de souches résistantes à l'oseltamivir selon le type d'analyse et le sous-type

Type d'analyse	Nombre cumulatif 2009-2010	
	Période du 2009-11-01 au 2009-12-26	
	Résistantes	Total
Phénotypique (CHUO-CHUL)		
Influenza A (H1N1) pandémique	0	164
Influenza A (H1N1)	0	0
Influenza A (H3N2)	0	0
Génotypique (LSPO)		
Influenza A (H1N1) pandémique	6	171
Influenza A (H1N1)	0	0
Influenza A (H3N2)	0	0
Ensemble du Québec	6*	335

35



* Présence de la mutation H275Y – cas cliniques associés à un traitement au tamiflu.

Institut national
de santé publique
Québec

Résumé

- Les deux vagues de grippe A(H1N1) pandémique 2009 ont été causées par un virus réassorti, composé de segments géniques provenant de virus habituellement transmis chez le porc, l'humain, et dans le réservoir aviaire
- Les TAAN se sont avérés les épreuves les plus efficaces pour le diagnostic de laboratoire de la grippe A(H1N1)
- La préparation à une pandémie de grippe aviaire appréhendée a largement contribué à adapter rapidement des méthodes TAAN pour offrir des tests diagnostiques au réseau
- La décentralisation rapide des épreuves TAAN du LSPQ aux laboratoires du réseau a permis d'augmenter substantiellement l'offre de service en diagnostic clinique de la grippe au Québec

36

Institut national
de santé publique
Québec

À suivre....

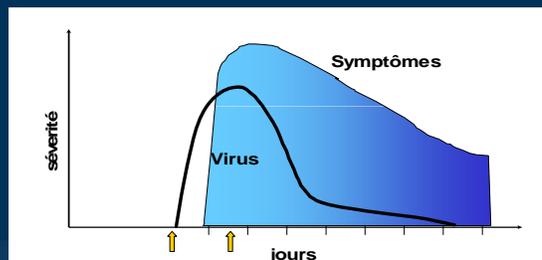
- Une troisième vague pandémique en Amérique du Nord? Pourquoi pas déjà?
- Autres réassortiments possibles avec des virus humains, porcins et/ou aviaires
- Mutations aux sites de reconnaissance des marqueurs cellulaires (D222G sur HA, par exemple)
- Augmentation de la virulence
- Dérive antigénique – vaccins annuels
- Résistance au Tamiflu
- Qu’advientra-t-il des H3N2 et H1N1 saisonniers?

37

Institut national
de santé publique
Québec

Le virus de l’influenza A

- Modes de transmission :
 - gouttelettes
 - contacts directs ou indirects
 - aérienne?
- Incubation : 1 à 3 jours
- Période de contagiosité: -1 à 7 jours



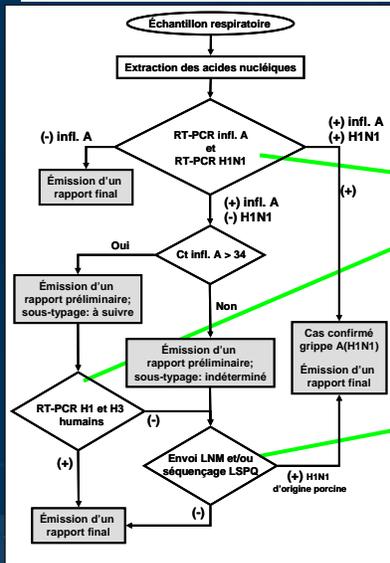
38

formation

Incubation → jour 7

Institut national
de santé publique
Québec

Algorithme du LSPQ – grippe A(H1N1)



Deux RT-PCR complémentaires

Sous-typage H1(saisonnier)/H3

Confirmation par séquençage et/ou envoi au LNM