

Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

Article original

Diagnostic et surveillance épidémiologique des infections grippales et à virus respiratoire syncytial : intérêt de la PCR *multiplex*

Diagnosis and epidemiological surveillance of influenza and respiratory syncytial virus infections: interest of *multiplex* PCR

C. Plouzeau^a, M. Paccalin^b, A. Beby-Defaux^a, G. Giraudeau^{a,d}, C. Godet^c, G. Agius^{a,*}

^aLaboratoire de virologie, CHU de Poitiers, 2, rue de La Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers cedex, France

^bPôle de gériatrie, CHU de Poitiers, 2, rue de La Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers cedex, France

^cService des maladies infectieuses et tropicales et de médecine interne, CHU de Poitiers, 2, rue de La Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers cedex, France

^dCoordination du groupe régional d'observation de la grippe (GROG) Poitou-Charentes, CHU de Poitiers, 2, rue de La Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers cedex, France

Reçu le 10 octobre 2006 ; accepté le 9 février 2007

Disponible sur internet le 08 juin 2007

Résumé

Objectif. – Le diagnostic étiologique des infections respiratoires nécessite d'être réalisé rapidement pour une prise en charge efficace des patients. Nous avons évalué une PCR *multiplex* pour le diagnostic et l'épidémiologie des infections grippales et à virus respiratoire syncytial (VRS).

Patients et méthodes. – Notre étude a porté sur 278 patients (âge moyen : $37,2 \pm 22,9$ ans) présentant un syndrome grippal ou pseudogrippal, consultant des médecins vigies du GROG Poitou-Charentes ou hospitalisés au CHU de Poitiers. Une PCR *multiplex* détectant les virus grippaux A(H3), A(H1), B et les VRS A et B, a été réalisée en parallèle à un examen direct par immunofluorescence et une culture cellulaire.

Résultats. – Nous avons mis en évidence une infection virale chez 139 (50,0 %) patients : 99 cas de grippe A(H3), deux cas de grippe A(H1), 28 cas de grippe B et 11 cas d'infection à VRS. Le rendement diagnostique chez les patients du GROG (52,3 %) était significativement plus élevé que celui observé chez les hospitalisés (34,5 %) ($p = 0,04$). Nous avons obtenu une concordance technique de 61 %. La PCR *multiplex* a permis un gain de positivité de 22,3 % par rapport aux techniques traditionnelles. Tous les prélèvements positifs par les techniques traditionnelles l'ont été également en PCR *multiplex*. Nous avons observé une parfaite corrélation entre les types et les sous-types viraux déterminés par PCR et par culture cellulaire.

Conclusion. – La PCR *multiplex* est une technique sensible permettant un diagnostic efficace et rapide des infections respiratoires dues aux virus grippaux et au VRS.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Objective. – Respiratory infections require a rapid etiological diagnosis for efficient management of cases. We evaluated *multiplex* PCR used for the diagnosis and the epidemiological surveillance of influenza and respiratory syncytial virus (RSV) infections.

Patients and methods. – Our study included 278 patients (mean age: 37.2 ± 22.9 years) with flu or flu-like syndromes, consulting physicians affiliated with the GROG Poitou-Charentes or hospitalized in the Poitiers teaching hospital. A *multiplex* PCR detecting A(H3), A(H1) and B influenza viruses, and RSV A and B, was performed with both a direct examination by immunofluorescence and cell-culture.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : g.agius@chu-poitiers.fr (G. Agius).

Results. – We diagnosed a viral infection in 139 (50.0%) patients: 99 cases of influenza A(H3), 2 cases of influenza A(H1), 28 cases of influenza B and 11 cases of RSV infections. The diagnosis yield in GROG patients (52.3%) was significantly higher than that observed in hospitalized patients (34.5%) ($P=0.04$). All techniques were correlated in 61% of cases. The *multiplex* PCR yielded 22.3% more positive samples compared to the conventional techniques. All positive samples by conventional techniques were also positive by *multiplex* PCR. We observed a perfect correlation between viral types and subtypes determined by PCR and cell-culture.

Conclusion. – *Multiplex* PCR is a sensitive technique allowing an efficient and rapid diagnosis of respiratory infections due to influenza and RSV.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Épidémiologie ; Diagnostic virologique ; PCR multiplex ; Virus influenza ; Virus respiratoire syncytial

Keywords: Epidemiology; Virological diagnosis; Multiplex PCR; Influenzavirus; Respiratory syncytial virus

1. Introduction

Les infections respiratoires sont la cause la plus fréquente de consultation en médecine générale et une des causes majeures de la surconsommation d'antibiotiques. Pourtant, les virus sont à l'origine d'une part importante de ces infections mais le diagnostic étiologique à partir de la présentation clinique demeure difficile. En effet, les agents pathogènes responsables sont nombreux et les symptômes peu spécifiques. Parmi les virus impliqués, les virus de la grippe et le virus respiratoire syncytial (VRS) sont les plus fréquemment mis en cause et apparaissent chaque hiver sur un mode épidémique. L'identification rapide d'une étiologie virale permet de diminuer la prescription d'antibiotique et d'examen complémentaires ainsi que le temps d'hospitalisation et le risque de transmission nosocomiale [1,2]. D'autre part, l'apparition récente de nouveaux antiviraux actifs contre les virus de la grippe, pose le problème d'un diagnostic virologique efficace et rapide. En effet, ces traitements n'agissent que sur les virus grippaux et d'autant mieux qu'ils sont prescrits tôt [3]. Enfin, le diagnostic virologique est indispensable à la surveillance épidémiologique des souches virales circulantes afin de rassembler les informations nécessaires pour prévoir la composition du vaccin de l'année suivante. Cette surveillance épidémiologique est, notamment effectuée par les Groupes régionaux d'observation de la grippe (GROG) qui ont également pour mission d'informer les praticiens du déroulement des épidémies et de vérifier l'efficacité du vaccin en cours d'utilisation [4].

Classiquement, le diagnostic virologique des infections respiratoires repose sur l'association d'un examen direct et d'un isolement en culture cellulaire. La diversité des virus impliqués et le nombre de souches virales différentes rendent ce diagnostic long et difficile.

Depuis quelques années, il a été montré que l'utilisation de la PCR (*poymerase chain reaction*) pouvait améliorer le diagnostic des viroses respiratoires en alliant sensibilité, spécificité et rapidité [5]. La PCR *multiplex* présente l'avantage de permettre, à partir du même échantillon, l'amplification de plusieurs séquences génomiques virales différentes [6]. Il est particulièrement intéressant de rechercher simultanément les virus grippaux et le VRS car les épidémies surviennent le plus souvent de façon concomitante.

Notre étude avait pour objectif d'évaluer une PCR *multiplex* (PCRm), permettant le diagnostic des virus grippaux A(H3), A(H1) et B ainsi que des VRS A et B, sur une série d'échantillons prélevés chez des patients, présentant un syndrome grippal ou pseudogrippal, hospitalisés ou consultant un médecin vigie du GROG Poitou-Charentes, en la comparant aux techniques virologiques traditionnelles.

2. Patients et méthodes

2.1. Patients

Les données recueillies pour chaque patient étaient l'âge, le sexe, le département de résidence, les signes cliniques, la notion d'une vaccination antigrippale et le traitement prescrit. Pour les patients prélevés par les médecins vigies du GROG, un écouvillonnage nasopharyngé a été réalisé à l'aide du dispositif Virocult (Medical Wire & equipment Co). Les patients hospitalisés dans les services de maladies infectieuses et de médecine interne ont été prélevés en utilisant le même protocole d'écouvillonnage ou par aspiration nasopharyngée effectuée à l'aide d'un aspirateur de muco-sités à usage unique (Vygon) après instillation nasale de 0,5 ml de sérum physiologique préchauffé à 37 °C.

2.2. Examen direct en immunofluorescence (IF)

Les écouvillons ont été exprimés dans du milieu essentiel minimum (MEM) à pH 7,0, supplémenté en sérum-albumine et en antibiotiques, les aspirations ont été diluées au demi dans du MEM. Puis, les milieux ont été centrifugés à 2000 tr/min pendant 20 minutes. Le surnageant a été inoculé à des cultures cellulaires. Après fixation à l'acétone à -30 °C, l'examen direct a été réalisé sur le culot de centrifugation par IF, à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-VRS A + B et anti-influenza A et B marqués à la fluorescéine (*Monofluo Screen RSV, Monofluo Kit Influenza ; Biorad*). Une réaction positive se traduisait par une fluorescence verte granulaire dans le cytoplasme des cellules infectées.

2.3. Culture cellulaire

Les produits pathologiques ont été inoculés sur des cellules diploïdes humaines MRC-5 et des cellules hétéroïdes canines MDCK en présence de trypsine. Les cultures de cellules ont été maintenues au moins trois semaines, en effectuant deux passages aveugles et un renouvellement hebdomadaire du milieu de survie. Les cultures ont été observées quotidiennement au microscope inversé à la recherche d'un effet cytopathique caractéristique. La présence d'un virus grippal ou d'un VRS a été détectée par IF. Le typage des souches de VRS a été effectué par IF directe à l'aide d'anticorps monoclonaux 92-11C pour le sous-type A et 102-10B pour le sous-type B (Chemicon International Inc.). Les virus grippaux ont été typés par inhibition de l'hémagglutination avec des antisérums spécifiques de furet anti-A(H3N2) et anti-A(H1N1) provenant du centre de référence OMS de Lyon.

2.4. PCR multiplex

La PCRm a été mise en œuvre selon un protocole précédemment décrit [7]. Cette PCR nichée permet de détecter les VRS A et B et les virus influenza en circulation A(H1N1), A(H3N2) et B. La rétrotranscription a été réalisée avec la transcriptase inverse du MMLV (*Moloney murine leukemia virus*). Les deux PCR ont été réalisées avec des couples d'amorces ciblant le gène de l'hémagglutinine (H) des virus influenza A (H1), A(H3), et B et une séquence chevauchante sur le gène N de capside et le gène P de la phosphoprotéine des VRS. Les programmes d'amplification comportaient les étapes suivantes : 2 min à 94 °C, 35 cycles de 1 min à 94 °C, 1 min à 50 °C pour la première PCR et 1 min à 60 °C pour la deuxième PCR, puis 1 min à 72 °C. La révélation a été réalisée par électrophorèse en gel d'agarose à 2,5 % (NuSieve ; FMC BioProduct) dans du tampon Tris-borate-EDTA. Une amplification des transcrits de la GAPDH a été réalisée pour chaque prélèvement afin de vérifier la conservation des ARN et l'absence d'inhibiteur de la PCR.

2.5. Analyse statistique

L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel *Epi-info* version 6.04 élaboré par le Center for Disease Control

Tableau 1
Caractéristiques démographiques des patients

Table 1 Demographic features of patients			
Origine du patient	Nombre (%) de patients	Sexe (M/F)	Âge moyen ± ETM (extrêmes) en années
GROG Poitou-Charentes	243 (87,4)	115/128	32,8 ± 19,5 (2–86)
Vienne	137 (49,3)	58/79	37,0 ± 19,0 (2–86)
Deux-Sèvres	79 (28,4)	48/31	24,6 ± 17,9 (2–84)
Charente	14 (5,0)	5/9	35,6 ± 20,3 (4–81)
Charente maritime	13 (4,7)	4/9	34,9 ± 19,0 (3–62)
CHU de Poitiers	35 (12,6)	12/23	67,7 ± 22,2 (22–94)
Maladies infectieuses	23 (8,3)	9/14	68,1 ± 22,2 (22–94)
Médecine interne	12 (4,3)	3/9	67,1 ± 23,1 (22–92)
Total	278 (100)	127/151	37,2 ± 22,9 (2–94)

M : masculin ; F : féminin ; ETM : écart-type à la moyenne ; GROG : groupe régional d'observation de la grippe.

d'Atlanta, États-Unis. Les différents paramètres ont été corrélés entre eux à l'aide d'un test de χ^2 ou d'un χ^2 de Mac Nemar avec un risque de 5 % ou par un test exact de Fischer.

3. Résultats

Notre étude a porté sur 278 patients (âge moyen ± écart-type à la moyenne : 37,2 ± 22,9 ans ; extrêmes : 2–94 ans) présentant un syndrome pseudogrippal d'octobre 2001 à avril 2002. Ces 151 femmes (56 %) et 127 hommes (46 %) étaient soit hospitalisés au CHU de Poitiers, soit consultants des médecins vigies du GROG de la région sanitaire (Tableau 1).

Les prélèvements ont été répartis tout au long de la saison hivernale avec un pic observé au cours du mois de janvier. Les virus grippaux ont été détectés à partir de novembre et jusqu'à fin mars. Le virus de la grippe B a circulé moins intensément que le virus influenza A(H3N2), et le virus A(H1N1) n'a été que très rarement isolé. Les infections à VRS ont été diagnostiquées entre la mi-novembre et la fin février et les deux types de virus ont cocirculé pendant toute la saison. Nous avons mis en évidence une infection virale chez 139 (50,0 %) patients parmi les 278 explorés : 129 (92,1 %) cas d'infections grippales dont 99 Influenza A(H3), 28 Influenza B et 2 Influenza A (H1), et 11 (7,9 %) cas de VRS dont sept de type B et quatre de type A (Tableau 2). Un seul patient présentait une co-infection associant grippe A(H3) et grippe B.

Le taux d'infections virales diagnostiquées chez les patients du GROG (52,3 %) était significativement plus élevé que celui

Tableau 2

Nombre de cas d'infections grippales et à VRS diagnostiquées par examen direct, culture cellulaire et PCR multiplex chez les 278 patients présentant un syndrome pseudogrippal

Table 2

Number of cases of influenza and RSV infections diagnosed by direct examination, cell-culture and multiplex PCR in the 278 patients with a flu-like syndrome

Virus	Examen direct	Culture cellulaire	Examen direct et culture cellulaire	PCR multiplex	p
Grippe A(H3)	34 (12,2 %)	41 (14,7 %)	49 (17,6 %)	99 (36,5 %)	< 0,001
Grippe A(H1)		0 (0 %)	1 (0,4 %)	2 (0,7 %)	
Grippe B	7 (2,5 %)	9 (3,2 %)	10 (3,6 %)	28 (10,1 %)	< 0,001
VRS A	5 (1,8 %)	1 (0,4 %)	4 (1,4 %)	4 (1,4 %)	< 0,02
VRS B		0 (0 %)	1 (0,4 %)	7 (2,5 %)	
Total	46 (16,5 %)	52 (18,7 %)	65 (23,4 %)	140 ^a (50,3 %)	< 0,001

p : corrélations entre examen direct et culture combinés et PCR multiplex ; NS : non significatif.

^a dont une co-infection grippe A et grippe B.

observé chez les patients hospitalisés (34,5 %) ($p = 0,04$). Les taux d'infection virale diminuaient progressivement quand l'âge augmentait : 60,6 % (37/61) pour la catégorie inférieure à 16 ans, 50,4 % (61/121) pour celle de 16 à 44 ans, 48,3 % (28/58) pour celle de 45 à 65 ans et 34,2 % (13/38) pour les plus de 65 ans. La proportion de viroses diagnostiquées chez les hommes (72/127 = 56,7 %) était significativement plus élevée que celle observée chez les femmes (67/151 = 44,3 %) ($p = 0,04$).

Parmi les 128 patients ayant une infection grippale, les principaux signes cliniques observés étaient fièvre (93,8 %), toux (84,4 %), rhinorrhée (84,4 %), céphalées (82,8 %), myalgies (72,7 %), asthénie (67,2 %), pharyngite (56,6 %), bronchite (21,9 %), douleurs abdominales (13,3 %), otite (10,9 %), conjonctivite (10,2 %), vomissement (8,6 %) et diarrhée (6,2 %). La proportion de patients ayant une toux, une rhinorrhée et des céphalées était respectivement plus élevée pour les patients ayant une grippe que pour les autres ($p < 0,01$, $p < 0,01$, $p = 0,03$).

Seuls 27 patients étaient vaccinés contre la grippe. Parmi eux, 14 infections à Influenza A(H3N2) dont une co-infection par Influenza A(H3N2) et B ont été diagnostiquées. Pour les patients du GROG, le traitement prescrit comprenait des anti-pyrétiques dans 95,8 % des cas, des mucolytiques dans 48,8 % des cas et des antibiotiques dans 25,8 % des cas. Une étiologie virale a été détectée pour 32 (57,1 %) des 56 patients ayant reçu une antibiothérapie.

En comparant les résultats obtenus par les trois techniques, nous avons obtenu une concordance dans 61,0 % des cas : 139 cas négatifs et 32 cas positifs (Tableaux 2,3). La PCRm était en accord avec l'IF dans 66,5 % des cas (139 cas négatifs et 46 cas positifs), et avec la culture cellulaire dans 68,3 % des cas (139 cas négatifs et 51 cas positifs). La PCRm était en accord avec le diagnostic traditionnel (IF combinée à la culture) dans 73 % des cas (139 cas négatifs et 65 cas positifs). Nous avons observé une parfaite corrélation (100 %) entre les types et les sous-types déterminés par la PCR et par culture cellulaire. Tous les résultats positifs obtenus par IF ou culture l'étaient également par PCR (Tableau 3).

Les résultats couplés de l'examen direct et de la culture fournissent 23,4 % de positifs comparés à 50,3 % pour la PCRm (Tableau 2). Le cas de co-infection n'a été diagnostiqué que par PCRm.

Tableau 3
Résultats combinés de l'examen direct par IF, de la culture cellulaire et de la PCR *multiplex* pour les 140 diagnostics virologiques positifs

Table 3
Combined results of direct examination by immunofluorescence assay, cell-culture and *multiplex* PCR for the 140 positive diagnosis

	Virus influenza			VRS		Total
	A(H1)	A(H3)	B	A	B	
IF+/culture+/PCR <i>multiplex</i> +	0	25	6	1	0	32
IF+/culture-/PCR <i>multiplex</i> +	1	8	1	3	1	14
IF-/culture+/PCR <i>multiplex</i> +	0	16	3	0	0	19
IF-/culture-/PCR <i>multiplex</i> +	1	50	18	0	6	75 ^a
Total	2	99	28	4	7	140 ^a

IF : immunofluorescence.

^a un cas de co-infection.

La sensibilité de la PCRm était de 100 %, la spécificité de 64,8 %, la valeur prédictive positive de 46,4 % et la valeur prédictive négative de 100 % en prenant comme référence l'examen direct en IF couplé à la culture.

Le taux d'excrétion virale diminuant au cours du temps, nous avons étudié l'influence du délai entre l'apparition des signes cliniques et le prélèvement qui variait de moins de 12 heures à plusieurs jours. La majorité des patients (75 %) a été prélevée moins de 48 heures après le début des symptômes. La proportion de positivité était significativement plus élevée chez les patients prélevés moins de 48 heures (111/207 = 53,6 %) après le début des signes cliniques que chez ceux prélevés au-delà de 48 heures (28/71 = 39,4 %), à la fois pour les techniques traditionnelles ($p = 0,01$) et par PCRm ($p = 0,04$).

4. Discussion

Notre étude a permis la mise en place au laboratoire d'un diagnostic virologique efficace et rapide des infections grippales et à VRS à l'aide d'une PCRm. La faisabilité technique en routine et l'utilité pour la prise en charge des patients ont été évaluées au cours d'une saison hivernale où la cocirculation des différents virus grippaux en région Poitou-Charentes a été comparable à celle observée au niveau national [8]. Les virus isolés étaient très proches des souches retenues dans la composition vaccinale (A/Panama/2007/99(H3N2) et B/Sichuan/379/99). Cependant, le diagnostic de 14 cas de grippe chez des patients vaccinés souligne que l'adéquation entre souches vaccinales et souches circulantes n'était pas parfaite. En effet, un défaut de protection vaccinale allant de 10 à 40 % est habituellement observé chez l'enfant ou l'adulte et peut être plus élevé chez les personnes âgées [9]. Dans le groupe des 243 patients du GROG, 56 (23,0 %) ont reçu une antibiothérapie. Parmi ces derniers, 32 (57,1 %) présentaient une infection virologiquement prouvée. Les études publiées mentionnent des taux d'antibiothérapie beaucoup plus élevés allant jusqu'à 95 % dans des séries où trois quarts des patients avaient une bronchite aiguë [10]. Ce faible taux de prescription peut s'expliquer par le fait que les médecins du GROG sont des praticiens bien informés sur les infections respiratoires et disposent de résultats virologiques [4]. Le taux d'infections respiratoires grippales ou à VRS dans le groupe des patients hospitalisés était plus faible que celui observé chez les patients prélevés en ville. Les malades hospitalisés présentaient une atteinte cliniquement plus sévère et un diagnostic différentiel plus difficile à établir. De plus, la réalisation plus tardive des prélèvements chez ces malades plus âgés (âge moyen de 67,7 vs 32,8 ans pour les patients du GROG) a probablement diminué le rendement diagnostique, lié à la diminution d'excrétion virale au cours du temps [11]. La faible proportion d'infections à VRS diagnostiquées peut s'expliquer par le modeste recrutement pédiatrique de notre série.

La sensibilité de la PCRm était de 100 % par rapport à l'examen direct couplé à la culture traduisant une absence de faux négatifs [12]. La PCRm a permis un gain de positivité de 22,3 % par rapport au diagnostic traditionnel, avec une parfaite

corrélation des types et des sous-types viraux mis en évidence par PCRm et culture cellulaire. Ces données confirment les résultats de nombreuses études montrant une sensibilité bien supérieure des techniques de PCR par rapport aux techniques classiques pour les virus grippaux [13–15] comme pour le VRS [14–16]. Le manque de sensibilité des examens directs comme l'immunofluorescence est souvent observé lorsque l'inoculum est faible [17]. La détection d'un fragment de génome viral par PCR ne préjuge pas du caractère viable du virus et pourrait correspondre à des séquences virales résiduelles d'une infection résolue [5]. Nous n'avons observé aucune réaction croisée en PCRm lorsque d'autres virus respiratoires (Herpès simplex, adénovirus, entérovirus) étaient isolés en culture (résultats non montrés), ce qui plaide en faveur de l'absence de fausse positivité. De plus, les précautions nécessaires habituelles ont été prises afin d'éviter les contaminations.

Les techniques de PCRm permettent de mettre en évidence des co-infections qui ne sont pas détectées par la culture cellulaire [18]. En effet, la multiplication d'un virus peut inhiber celle d'un autre virus et un faible inoculum viral de chaque souche peut conduire à un résultat faussement négatif [19].

Le coût des techniques moléculaires est habituellement plus élevé que celui des techniques classiques mais la PCRm permet la recherche de plusieurs virus par la même technique, elle est donc moins onéreuse [20]. Par ailleurs, un diagnostic étiologique rapide des infections respiratoires permet de diminuer la durée d'hospitalisation, la prescription d'antibiotiques ou d'examens complémentaires [1,2]. Enfin, la complexité de la technique est relative comparée à la culture cellulaire qui impose une logistique et des compétences réservées à des laboratoires spécialisés. La culture cellulaire reste cependant une technique indispensable pour la surveillance épidémiologique permettant l'élaboration de la composition du vaccin antigrippal de l'année suivante.

5. Conclusion

La PCRm est un outil puissant permettant un diagnostic efficace et rapide des infections respiratoires dues aux virus grippaux A(H1), A(H3), B et aux VRS A et B avec un gain de temps et de sensibilité très important par rapport aux techniques traditionnelles. D'autres protocoles proposent une ou plusieurs PCRm permettant le diagnostic d'un grand nombre de virus ou de bactéries intracellulaires responsables d'infections respiratoires (virus para-influenzae, métagaenovirus, coronavirus, adénovirus, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* ...) [12,18,21–23]. Enfin, des protocoles de PCRm en temps réel sont aujourd'hui développés [24,25]. Ces techniques permettent un diagnostic encore plus rapide avec, pour le VRS et les virus grippaux, une sensibilité équivalente à celle des PCR monospécifiques [24]. Les techniques moléculaires devront être standardisées et automatisées pour être accessibles à un plus grand nombre de laboratoires. Le développement des extracteurs automatiques ainsi que de la PCR en temps réel faciliteront cette évolution. Les techniques de biologie moléculaire contribueront à diminuer le temps d'hospitalisation, les examens complémentaires, et à mieux

adapter la prescription thérapeutique comportant encore trop souvent une antibiothérapie inutile.

Remerciements

Nous tenons à remercier les médecins vigies du GROG Poitou-Charentes pour leur efficace collaboration : Dr F. Boucard, Dr B. Bouline, Dr D. Chambenoit, Dr W. Collin, Dr P. Coussoou, Dr M. Dominault, Dr Y. Filloux, Dr J. Gautier, Dr S. Girardeau, Dr B. Giraudeau, Dr F. Girault, Dr C. Gras, Dr S. Lahoussine, Dr E. Mahé, Dr S. Marquet, Dr Y. Morillon, Dr P. Parthenay, Dr D. Reynaud, Dr D. Tessier.

Références

- [1] Adcock PM, Stout GG, Hauck MA, Marshall GS. Effect of rapid viral diagnosis on the management of children hospitalized with lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:842–6.
- [2] 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;35:1579–81.
- [3] Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 2000;355:827–35.
- [4] Cohen JM, Mosnier A, Valette M, Bensoussan JL, Van Der Werf S. GROG-I. Médecin généraliste et veille sanitaire : l'exemple de la grippe en France. *Med Mal Infect* 2005;35:252–6.
- [5] Freymuth F, Vabret A, Petitjean J, Gouarin S, Gueudin M, Campet M. Diagnostic des deux principales viroses respiratoires épidémiques : la grippe et les infections à virus respiratoire syncytial. Place de la virologie moléculaire. *Med Mal Infect* 2000;30:191–201.
- [6] Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR : optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:559–70.
- [7] Stockton J, Ellis J, Saville M, Clewley JP, Zambon C. Multiplex PCR for typing and subtyping Influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 1998;36:2990–5.
- [8] GROG. Bulletin hebdomadaire semaine 15/2002. Sur [http:// www.grog.org](http://www.grog.org).
- [9] Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999;354:1277–82.
- [10] Taytard A, Daures JP, Arsac P, Chirumberro JL, Grignet JP, Micoud M, et al. Prise en charge des infections respiratoires basses en médecine générale en France. *Rev Mal Respir* 2001;18:163–70.
- [11] van der Werf S. Structure et variation des virus grippaux. In: Freymuth F, editor. *Guides Médi-Bio Infections virales respiratoires*, tome 1. Paris: Elsevier; 2001. p. 49–60.
- [12] Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods* 2005; 126:53–63.
- [13] Vabret A, Sapin G, Lezin B, Mosnier A, Cohen JM, Burnouf L, et al. Comparison of three non-nested RT-PCR for the detection of influenza A viruses. *J Clin Virol* 2000;17:167–75.
- [14] Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, et al. New Vaccine Surveillance Network Study Group. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* 2004;189:706–10.
- [15] Grondahl B, Puppe W, Weigl J, Schmitt HJ. Comparison of the BD Directigen Flu A+B Kit and the Abbott TestPack RSV with a multiplex RT-PCR ELISA for rapid detection of influenza viruses and respiratory syncytial virus. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:848–50.
- [16] Freymuth F, Vabret A, Galateau-Salla F, Ferrey J, Eugene G, Petitjean J, et al. Detection of respiratory syncytial virus, para-influenza virus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. *Clin Diagn Virol* 1997;8:31–40.

- [17] Casiano-Colon AE, Hulbert BB, Mayer TK, Walsh EE, Falsey AR. Lack of sensitivity of rapid antigen tests for the diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults. *J Clin Virol* 2003;28:69–74.
- [18] Gröndahl B, Puppe W, Hoppe A, Kühne I, Weigl JAI, Schmitt HJ. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 1999;37:1–7.
- [19] Waner JL. Mixed viral infections: detection and management. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:143–51.
- [20] Symmis MW, Whiley DM, Thomas M, Mackay IM, Williamson J, Siebert DJ, et al. A sensitive, specific, and cost-effective multiplex reverse transcriptase-PCR assay for the detection of seven common respiratory viruses in respiratory samples. *J Mol Diagn* 2004;6:125–31.
- [21] Osiowy C. Direct detection of respiratory syncytial virus, para-influenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1998;36:3149–54.
- [22] Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004;72:484–95.
- [23] Puppe W, Weigl JA, Aron G, Gröndahl B, Schmitt HJ, Niesters HG, et al. Evaluation of a multiplex reverse transcriptase PCR ELISA for the detection of nine respiratory tract pathogens. *J Clin Virol* 2004;30:165–74.
- [24] 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 para-influenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004;42:1564–9.
- [25] Boivin G, Cote S, Dery P, De Serres G, Bergeron MG. Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 2004;42:45–51.