



Rapport annuel d'activité

2019

**Centre de national de référence
des Herpesvirus**

**Année d'exercice
2018**



SOMMAIRE :

1. Missions et organisation du CNR.....	9
2. Activités d'expertise	9
2.1 Évolution des techniques	10
2.1.1 Diagnostic de l'infection congénitale à CMV	10
Automatisation des PCR CMV sur DBS	10
2.1.2 Techniques de génotypage viral	12
Typage HHV6 par PCR digitale.....	12
Typage EBV par PCR Séquence	12
Elargissement des techniques de typage du VZV.....	13
Différenciation des génomes latents et réplicatifs d'HSV par analyse transcriptomique.....	13
Elargissement de l'offre NGS	13
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	14
2.2.1 Charge virale CMV	14
2.2.2 Charges virales HSV/VZV	15
2.2.3 Charge virale EBV	16
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	18
2.4 Collections de matériel biologique	18
2.5 Activités d'expertise	20
2.5.1 Délai moyen de restitution des résultats du CNR aux laboratoires.	20
2.5.2 Activités d'expertise 2018 :	20
2.5.3 Organisation de contrôles de qualité 2018	23
2.6 Activités de séquençage NGS	24
3. Activités de surveillance.....	26
3.1 Description du réseau de partenaires	26
3.1.1 Infection congénitale à CMV	26
3.1.2 Infections néonatales à HSV	28
3.1.3 Infections à CMV chez l'immunocompétent	28
3.1.4 Surveillance de la résistance des herpès virus aux antiviraux	28
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	29
3.2.1 Surveillance des infections congénitales à CMV	29
3.2.2 Surveillance des infections néonatales à Herpes simplex	34
3.2.3 Épidémiologie de l'infection à CMV dans la population générale.....	35
3.2.4 Surveillance des infections graves à HSV.....	36
3.2.5 Épidémiologie des infections à HHV-6	36
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	37
3.3.1 Surveillance de la résistance des CMV aux antiviraux.....	37
3.3.2 Surveillance de la résistance de HSV aux antiviraux	41
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	44
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	45
3.5.1 Infection congénitale à CMV nouveaux facteurs pronostiques	45
3.5.2 Nouveaux biomarqueurs immunologiques en transplantation	49
3.5.3 Cohorte de surveillance des non-réponses aux antiviraux (ORPhaViC PHRCN 2010).....	50
3.5.4 Épidémiologie et transmission du CMV	51
3.5.6 Participation des laboratoires du CNR à des projets de Recherche clinique dont l'investigateur principal n'est pas membre du CNR :	53
4. Alerte	53
5. Activités de rétro-information, de formation et de conseil.....	53
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé.....	54

Formation	54
Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion) ;	56
Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR , Rétro- information aux partenaires ;	56
Information/formation des professionnels de santé : site internet	56
Activités de conseil aux professionnels de santé :	56
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	57
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	58
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	58
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année 2018, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	58
6.1.1 Infection congénitale à CMV	58
6.1.2 Analyse des mécanismes d'action des antiviraux et recherche de nouvelles cibles.....	59
6.1.3 Variabilité des herpès virus	59
6.1.4 Projets de recherche EBV	60
6.2 Liste des publications et communications de l'année 2017, ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	61
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR.....	69
1.1 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	71
1.2 Locaux et équipements.....	72
1.3 Collections de matériel biologique	75
1.4 Démarche qualité du laboratoire.....	77
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	79
2.1 Liste des techniques de référence	79
2.1.1 CMV	79
2.1.2 HSV	81
2.1.3 VZV	82
2.1.4 génotypage des autres Herpesvirus HHV6, EBV à visée épidémiologique	83
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR.....	83
Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	84
3.1 Permanence du CNR	84
3.2 Autorisations MOT	84
3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale.....	84
3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo	84
3.4 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition des budgets MIGAC ou Santé publique France (texte libre)	87
3.5 Autres remarques à destination du comité des CNR (texte libre).....	87
Questionnaire de recensement en ligne des infections congénitales par le CMV : version 2018.....	88
Annexe 5 Réseaux de surveillance :	102
Réseau de partenaires pour la déclaration en ligne des cas d'infection congénitale à CMV (plateforme Voozanoo).....	102

Préambule

Les Herpesvirus sont des virus persistant toute la vie chez l'individu, après une primo-infection qui peut être inapparente. Leur pouvoir pathogène est favorisé en cas d'immunodépression sous-jacente et les manifestations cliniques telles que les zones ou herpès extensifs ou nécrotiques, les infections à cytomégalovirus (CMV) post-transplantation ou au cours du sida, les lymphomes liés au virus Epstein-Barr (EBV) post-transplantation- sont bien connus. Toutefois, la conduite à tenir pour leur diagnostic, leur traitement, ou la prise en charge des résistances aux antiviraux n'est pas parfaitement codifiée. Et les marqueurs prédictifs, notamment immunologiques, de survenue de ces infections, qui pourraient permettre d'optimiser leur prévention chez les patients les plus à risque, ne sont pas tous connus. Dans ce contexte la place d'un Herpesvirus lymphotrope comme l'Herpesvirus humain 6 (HHV-6) et les tests diagnostiques utiles et inutiles à sa prise en charge méritent également d'être redéfinis.

Certains aspects de leur pouvoir pathogène, chez des sujets moins immunodéprimés, voire immunocompétents, notamment les infections neurotropes à virus herpès simplex (HSV), les infections graves à dues au virus varicelle-zona (VZV), ou les infections à CMV au cours des maladies inflammatoires, notamment sous traitement immunosuppresseur sont mal documentées. La connaissance de l'épidémiologie dans la population générale, la surveillance de l'émergence de souches à pouvoir pathogène particulier, ou de variants d'échappement diagnostic, justifie une surveillance au niveau national. Il a en effet été récemment démontré que la variabilité de ces virus allait bien au-delà de la simple recombinaison, et les études menées grâce au séquençage haut-débit ont clairement démontré une fréquence de mutation proche de celle du virus de l'hépatite B (VHB) (Renzette et al., 2014). Les traitements antiviraux disponibles pour HSV, VZV, CMV et HHV-6 sont peu nombreux et les résistances peuvent être une cause majeure de morbidité, justifiant le développement de nouveaux antiviraux et une surveillance de l'émergence de nouvelles souches résistantes. Du fait de la fréquence élevée des infections et de leur pouvoir pathogène, ces Herpesvirus constituent un véritable problème de santé publique : l'infection à CMV reste la première cause d'infection congénitale virale, plus fréquente que celle due au virus Zika, les infections néonatales à HSV bien que moins fréquentes sont gravissimes et difficiles à prévenir chez les femmes sans antécédents, la varicelle reste une cause de morbidité non négligeable en pédiatrie ; ces différents arguments motivent les travaux de recherche sur la réponse immune vis-à-vis de ces virus et le difficile développement de vaccins contre ces virus. Enfin, l'élargissement de la vaccination contre la varicelle et le développement du vaccin anti-zona justifient la mise en œuvre, sur le territoire d'une surveillance des variants circulants.

C'est dans ce contexte que les missions du CNR des cytomégalovirus ont été élargies vers un CNR des Herpesvirus. Le présent document correspond au premier bilan de ce « nouveau » CNR.

Enjeux :

Les enjeux des infections par ces différents Herpesvirus ayant été développés dans le document de candidature nous ne les rappellerons pas ici mais nous insisterons sur les faits marquants de 2018 et les actions du CNR en regard.

En 2018 l'infection congénitale à CMV reste un enjeu de santé publique majeur. Avec 1% des nouveau-nés infectés dans le monde, dont 10% symptomatiques à la naissance et 15 à 18% développant des séquelles plus tardivement dans les six premières années de vie, l'infection congénitale à CMV se place au premier rang des infections congénitales virales. Et si aucun vaccin n'est encore disponible les essais vaccinaux se poursuivent avec une phase II chez les jeunes femmes en âge d'avoir des enfants avec un vaccin recombinant atténué de nouvelle génération intégrant les glycoprotéines d'enveloppes indispensables au tropisme endothélial du virus. Ce vaccin représente actuellement un espoir vaccinal dans le domaine, après l'échec relatif du vaccin gB recombinant, protecteur à 50% et l'absence d'effet notable lors des essais en transplantation du vaccin ADN associant gB et pp65 (Communiqué de presse 2018).

En France malgré des progrès notables dans son diagnostic, dans les facteurs pronostiques et dans la prise en charge des femmes enceintes et des nouveaux nés atteints, notamment issus des travaux du laboratoire associé de Necker, largement reconnu au niveau international **le dépistage n'a pas été recommandé par le Haut Conseil de santé Publique. Mais un renforcement du dépistage du CMV en cas de surdité notamment unilatérale, un élargissement des conseils d'hygiène, notamment aux femmes séropositives vis-à-vis du CMV ont été recommandés.** Via son site internet, les conseils téléphoniques, les conférences et les cours, le CNR participe déjà à leur diffusion et intensifiera cette activité.

De nouvelles analyses issues des cohortes mises en place par le laboratoire associé de Necker ont permis d'identifier des facteurs pronostiques nouveaux portant sur le terme et le délai après la dernière grossesse séronégative pour évaluer le risque de transmission en cas de primo-infection et sont développés dans ce rapport. La base de données nationale du CNR, dont le recrutement s'élargit chaque année est un outil majeur de surveillance, et d'analyse de la situation de l'infection congénitale à CMV en France. Une enquête sur la prise en charge des nouveaux nés infectés en France est présentée dans ce rapport.

Pour la prise en charge et la prophylaxie des infections à CMV chez l'immunodéprimé deux nouvelles molécules letermovir et maribavir sont en essais cliniques ou en ATU et la surveillance de leur efficacité et des résistances potentielles, déjà en place pour le maribavir, doit s'étendre au letermovir. Les premiers résultats de surveillance en ATU seront présentés. Le laboratoire coordonnateur du CNR joue un rôle majeur d'expertise pour définir leurs modes d'utilisation, participer aux recommandations internationales et nationales et surveiller les résistances. La place des tests immunologiques, ou de thérapeutiques adjuvantes comme les immunoglobulines fait également partie des domaines dans lesquels le CNR est amené à conseiller les laboratoires et pour lesquels une surveillance a été mise en place depuis 2018.

Les infections par les virus herpès simplex (HSV) tout particulièrement pendant la grossesse restent une préoccupation majeure en gynécologie-obstétrique et néonatalogie. Une des missions du CNR est le recensement des cas d'herpès néonatal. Actuellement effectuée sur déclaration annuelle, la base de données HSV néonatal a également vocation à évoluer vers une déclaration en ligne.

Le diagnostic des infections à Herpesvirus peut s'avérer un enjeu majeur, et reste parfois difficile notamment au cours des infections du système nerveux central, ou des infections oculaires. Le CNR a d'abord travaillé à l'harmonisation des pratiques pour la charge virale CMV, mais aussi EBV (en collaboration avec Grenoble), en instaurant les unités internationales à partir du standard WHO, et en mettant en place des contrôles de qualité nationaux, puis internationaux, pour la charge virale et la détection des résistances, en collaboration avec le QCMD. Depuis plusieurs années, le nouveau laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière a mis en place un **contrôle de qualité national pour la détection et la quantification des différents Herpesvirus dans différentes matrices biologiques**, ainsi, qu'un contrôle de qualité national pour les résistances aux antiviraux des virus herpès simplex. Il évalue aussi les nouvelles techniques de PCR et participe largement aux conseils aux laboratoires.

L'évolution du diagnostic vers la généralisation de l'usage de la PCR a suscité une proposition de modification de la nomenclature par la commission scientifique de nomenclature des actes de biologie médicale qui a été approuvée par la HAS en 2016 et mise en œuvre en janvier 2019 avec l'expertise du CNR.

Les infections à HHV6 sont probablement souvent mal reconnues, et inversement parfois diagnostiquées à tort du fait de l'intégration virale familiale. Les laboratoires de Limoges et de la Pitié ont organisé leur collaboration en 2018 pour proposer aux laboratoires demandeurs, un panel d'analyses et une expertise dans ce domaine.

Les infections à EBV qu'il s'agisse de primo-infections, parfois gravissimes, de réactivations avec risque de lymphome chez les sujets immunodéprimés ou de tableaux cliniques complexes, associés ou non à la réactivation d'autres virus, posent des problèmes diagnostiques sérologiques mais aussi cliniques et la place respective des PCRs plasmatique ou sur sang total est sujet de controverses. Dans ce champ également, l'expertise du CNR, aidée du laboratoire référent de Grenoble a permis de remettre à jour la nomenclature des actes médicaux et de redéfinir, avec la HAS les contours de ces actes de Biologie.

L'élargissement de l'offre du CNR en 2016 a donc permis d'associer des expertises diverses, pour mieux conseiller cliniciens et biologistes, et proposer une vision d'ensemble des Herpesvirus par le travail commun et les échanges entre ses différents laboratoires et par la diffusion d'informations au grand public via le site internet désormais accessible en anglais, et aux spécialistes via la coordination et l'écriture de plusieurs chapitres de la nouvelle édition du Traité de Virologie, et la participation de tous ses laboratoires à la nouvelle édition du REMIC.

Résumé analytique

Les Herpesvirus sont des virus ubiquitaires et dont l'infection est souvent inapparente. Par leur persistance, et leur caractère opportuniste, ils représentent un problème de santé publique majeur, notamment chez les personnes immunodéprimées et au cours de la grossesse. Chez les personnes immunocompétentes, les encéphalites à HSV et VZV sont la première cause d'encéphalite de l'adulte. En 2017, le CNR Cytomégalo virus a élargi son périmètre avec deux nouveaux laboratoires et devient CNR des Herpesvirus.

Ce CNR poursuit les travaux déjà en cours du CNR CMV, notamment la surveillance de l'infection congénitale à CMV. Ce problème est considéré comme majeur dans tous les pays développés et fait l'objet en 2017 d'une saisine du Haut Conseil de Santé Publique pour discuter l'opportunité d'un dépistage. Le CNR avec une base de données nationale regroupant déjà plus de 1200 cas, avec déclaration informatisée depuis 2016, participera au réseau européen mis en place par l'ECCI (groupe européen) en 2019. Les travaux du CNR ont permis grâce aux cohortes mises en place par le laboratoire de Necker de montrer dès 2017 que la moitié des enfants infectés naissent de mère séropositive et d'identifier de nouveaux facteurs pronostiques en 2018, pour de nouvelles recommandations en 2019. En parallèle il proposera à partir de 2020 un nouveau protocole thérapeutique pour les fœtus infectés in utero par le letermovir. Les travaux complémentaires des laboratoires de Necker et de Limoges ont montré que le letermovir n'était pas toxique pour le placenta. Ce point important va modifier la prise en charge des femmes enceintes.

La surveillance nationale des cas d'herpès néonatal, mise en place en 2011 montre une prévalence estimée de 0,018% en 2018 (cas rapportés au nombre de naissances) avec moins de cas déclarés qu'en 2017. Le réseau de surveillance des résistances des herpès cutanéomuqueux aux antiviraux mis en place par le laboratoire de la Pitié en 2016, a montré une prévalence de résistance parmi les patients non répondeurs de 21% pour HSV, stable en 2018.

La surveillance nationale des résistances du CMV aux antiviraux effectuée par le laboratoire coordonnateur de Limoges montre des chiffres stables de résistance avec une prévalence de 44 % chez les patients non répondeurs au traitement, avec des mutations de multirésistance dans la polymérase virale dans 24%. Ce chiffre stable laisse craindre une émergence de mutants résistants dans ces populations quel que soit l'antiviral et incite à la mise en place d'une surveillance accrue des nouvelles molécules le maribavir en phase III et en ATU en cas de résistance aux antipolymérases, et le letermovir en ATU en prophylaxie. Cette surveillance sera effective en greffe de cellules souches dès 2019 (cohorte Navire, CNR Limoges).

Les travaux de développement et d'évaluation de nouvelles techniques se poursuivent, dont les résumés seront consultables dans la rubrique dédiée aux évaluations techniques du site internet du CNR.

A noter en 2018 le développement l'offre de séquençage du CNR, le développement des techniques de séquence haut débit pour l'analyse des résistances CMV et VZV, et l'élargissement des techniques de typage des Herpesvirus. Ainsi que la poursuite des essais d'automatisation du diagnostic d'infection congénitale sur carte de Guthrie.

L'expertise élargie de ce CNR qui participe à de nombreuses décisions et consultations nationales et internationales (évolution de la nomenclature, consensus pour la prise en charge des patients, aide à la surveillance et à la politique vaccinale...), les collaborations internes, les réseaux nationaux et internationaux, et les bases de données nationales établis dans les différents domaines développés par le CNR permettent désormais d'avoir une vision d'ensemble des Herpesvirus au niveau national pour aider au mieux les pouvoirs publics.

Abstract

Herpesviruses, represent a worldwide public health concern. Though frequently asymptomatic or mild, herpesvirus infections are opportunistic infections, that may be associated with a considerable burden and life threatening infections, especially in immunocompromised patients, or in pregnant women and newborns. In immunocompetent persons, their neurotropism is also the first cause of encephalitis, with a heavy burden of sequelae. For this reason, the National Reference Center for Cytomegaloviruses extended its activities towards and is now the **National Reference Center for Herpesviruses, with two new partners: the virology laboratory from La Pitié Salpêtrière Paris is a new associated laboratory, for his specific experience in HSV, and the virology laboratory from CHU de Grenoble joins us as a referent laboratory for EBV. CMV expertise is still assumed by the virology laboratories of Limoges (resistance and new antivirals) and Necker (congenital infection). VZV and HHV6 expertise are shared between Limoges and La Pitié Salpêtrière.** This new organization allows to cover the NRC missions of counselling and survey in diagnosis, epidemiology, resistance and congenital or neonatal infections for these major herpesviruses.

This new NRC will continue his previous missions, including the survey of congenital CMV infection, the main cause of viral birth defect worldwide. In 2018 French authorities advised in defavor of congenital CMV screening thus reinforcing hearing loss screening at birth and CMV screening in case of unilateral defect. The associated recommendation for universal hygien counselling was based on the NRC expertise showing high rate of congenital infection in seropositive women. The continuous efforts of Necker laboratory through its paediatric and pregnant women cohorts give a large contribution to CMV infection knowledge and recently showed the role of pregnancy term and delay between pregnancies as prognosis factors for new recommendations. With its database developped in Limoges, of now close to 1200 cases, accessible as an electronic survey for clinicians and virologist, the NRC will join the European network put in place by the ECCI. **Neonatal HSV infections database survey** the prevalence of neonatal HSV which was estimated to be 0,018% in 2018. **The resistance network was also increased** and restructurated by these new collaborations allowing to give first exhaustive results at the National level in 2018. Prevalence of CMV resistance in non-responders is 44%, (less in marrow recipients), and for the first time HSV resistance prevalence was estimated at the national level as 21% of non-responders.

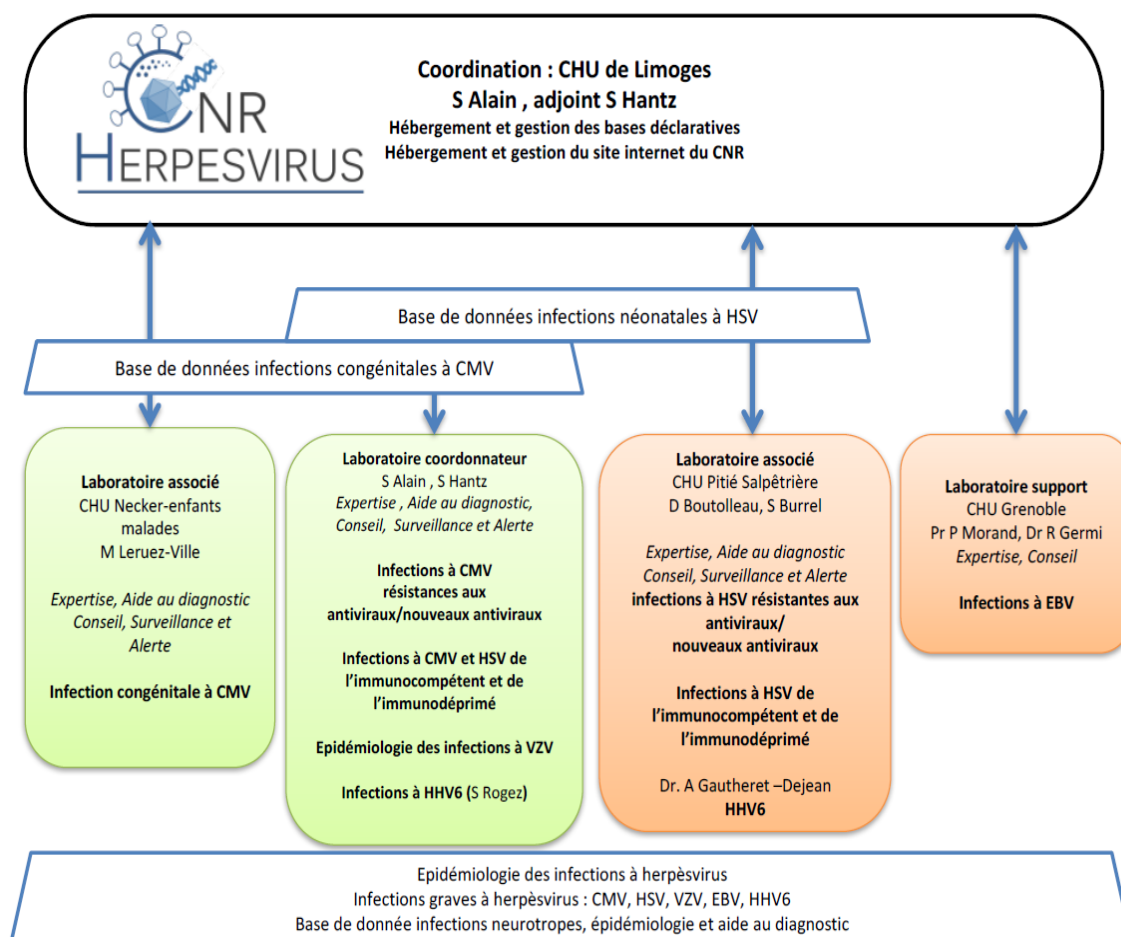
Evaluations and development of new techniques are still ongoing, with a specific highlight on the development of NGS, with development of the NGS platform, new techniques for CMV and for VZV resistance by NGS and evaluation of their input. Diagnosis kits were also evaluated (Altona Realstar CMV (Altona), Emag automated extraction, with Easy stream pipeline (BioMérieux). Summaries will be available on the CNR Website.

The NRC samples and isolates collections increase. They are progressively integrated in the biological resources centers of each laboratory hospital.

The broad expertise of this NRC participates in many national and international public health decisions or international consensus in the field such as evolution of test reimbursement, consensus for patients survey, or screening opportunities. Internal and external collaborations, national network reinforcement and national data bases notably for congenital CMV, neonatal HSV and resistances, allow a global perspective on herpesviruses infections to better assist decision makers.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme du CNR non modifié en 2018



Aucune modification n'a été apportée en 2018 à la configuration proposée pour le dossier final de renouvellement

Pour le détail se reporter à l'annexe 1.

2. Activités d'expertise

La description des techniques disponibles au CNR (telle que décrite dans le dossier de candidature déposé en début de mandat ou dans le rapport précédent) est présentée en annexe 2.

Au cours de l'année 2018 ont été mises en place plusieurs nouvelles techniques :

- Automatisation des diagnostic CMV sur Guthrie
- Utilisation de la PCR digitale pour la détection des formes intégrées d'HHV-6

Le développement des techniques de séquence haut débit s'est poursuivi.

- Nouvelle technique de séquençage NGS CMV UL56.
- Validation de la méthode nanopore Minions

Ont été évaluées, les performances des trousse suivantes :

- Performances de la trousse de charge virale CMV Altona Real star™ CMV pour le suivi clinique des patients
- Performances des trousse

2.1 Évolution des techniques

2.1.1 Diagnostic de l'infection congénitale à CMV

Automatisation des PCR CMV sur DBS

Laboratoire CNR Limoges

Afin de simplifier le diagnostic rétrospectif sur carton de Guthrie, et compte tenu des difficultés rencontrées lors des essais d'automatisation en 2017 avec l'extracteur e-Mag (BioMérieux), nous avons testé l'extracteur SaMag-12 (Sacace) que nous utilisons également au laboratoire pour les génotypages de résistances sur sang total en alternative à l'automate Easy mag (BioMérieux). La méthode utilisée est la méthode de Boom mais avec une silice non anfractueuse.

Nous avons adapté la méthode transmise par le laboratoire associé de Necker pour utiliser, après la partie préanalytique, une extraction automatisée, suivie d'une PCR avec la trousse CMV Rgene.

Les résultats ont été validés pour la répétabilité, la sensibilité, et par deux campagnes de contrôles externes de la qualité QCMD, par comparaison avec la technique manuelle préalablement publiée et utilisée à Necker, sur 19 sangs totaux de charge virale connue issus de la collection du CNR au CRB CRBioLIM, déposés sur cartons de Guthrie (PerkinElmer 226 Sample Collection Device).

- 2 panels du QCMDs (15 cartons, 2012 et 2013)

- 6 cartons reçus en 2012 pour évaluer la stabilité de l'ADN

- 3 cartons reçus en 2018 et 2019

Les résultats détaillés sont présentés dans le poster page suivante.

Résultats :

La qualité de l'extraction a été validée par quantification du gène de l'albumine selon la méthode que nous avons préalablement publiée pour la quantification du VHB dans les lymphocytes et utilisée dans tous les protocoles du CNR (Wagner et al., 2012) avec un nombre de copies de 10^5 à 10^6 copies/ml quel que soit le résultat de la charge virale CMV.

L'automatisation avec l'automate saMag permet d'obtenir des résultats répétables jusqu'à 4 mois de conservation des cartons sur lesquels ont été déposés 50uL de sang total, avec un seuil de sensibilité à 3,38 log copies/mL (95%) et un coefficient de variation de entre 2.23 and 4.74% (répétabilité à J1, à J7 et à J14) et de 1.72% pour 5 log et 5.69% pour 3.82 log (reproductibilité à J1-J14-M3). Certaines charges virales en dessous de 3 log n'ont pas été détectées. L'utilisation de deux spots au lieu d'un spot pour l'extraction ne modifie pas les résultats.

Les résultats du contrôle de qualité QCMD sont conformes en termes de réponses quantitatives et qualitatives ; pour mémoire les résultats obtenus par la méthode Easy Mag avec le même protocole par ailleurs ne permettaient pas de quantifier les échantillons de QCMD titrés à moins de 4 logs. De façon intéressante, les cartons de 2012 et de 2013 ont démontré une excellente conservation à température ambiante.

Conclusion : La technique développée est donc sensible et utilisable sur cet automate.

Evaluation of SaMag-12 DNA extractor for partial automation of CMV PCR on DBS

S. Hantz^{1,2,3}, C. Courivaud³, M. Mayeras³, E. Ribot³, S. Alain^{1,2,3}

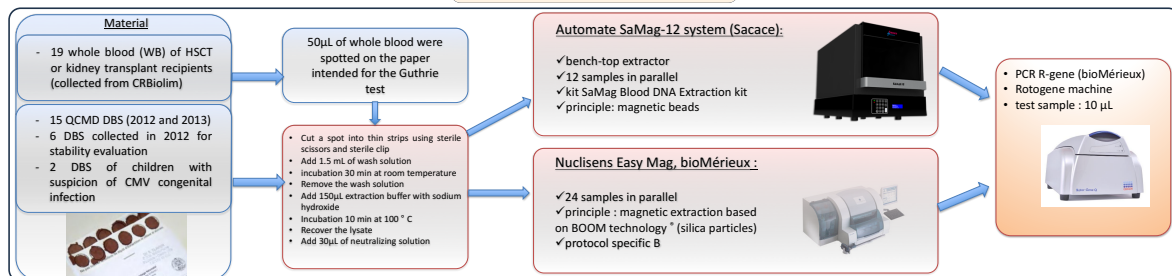
⁽¹⁾ Univ. Limoges, UMR 1092, Limoges, France; ⁽²⁾ INSERM, UMR 1092, Limoges, France; ⁽³⁾ National Reference center for Herpesviruses, Virology department, CHU Limoges, Limoges, France

UMR-S 1092
Anti-infectieux : supports moléculaires des
résistances et innovations thérapeutiques

INTRODUCTION

DBS (Dried Blood Spot) PCR is an indispensable tool for retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. Despite full automation trials of extraction, the technique used at CNR Herpesviruses (Leruez et al., 2011) remains the most sensitive. It is based on a division of the DBS, lysis with sodium hydroxide and elimination of the paper then a column extraction of the lysate. The entire extraction process is long and complex and due to the impossibility of automating the entire process, we wanted to perform the second step of the extraction on extractor. In this context, we tested the performance of the SaMag kit on SaMag-12 (Sacace) extractor.

MATERIAL and METHODS



RESULTS

✓ Comparison of performances of bioMérieux and SaMag extractions:

Samples	Nb copies/mL	Log copies/mL	Delta log	Extractions
110 404 687	8 326	3.92		Easy Mag (200µL)
110 404 687	7 436	3.87	- 0.05	Easy Mag (DBS)
110 404 687	10 880	4.04	0.12	SaMag (DBS)
120 014 928	138 944	5.14		Easy Mag (200µL)
120 014 928	27 752	4.44	- 0.70	Easy Mag (DBS)
120 014 928	56 024	4.75	- 0.39	SaMag (DBS)
110 257 204	2 823	3.45		Easy Mag (200µL)
110 257 204	1 196	3.08	- 0.37	Easy Mag (DBS)
110 257 204	3 004	3.48	0.03	SaMag (DBS)

The SaMag extractor provides a better efficiency than the Easy Mag for DBS with measured viral loads often higher than those obtained from the routine extraction of 200µL of WB on EasyMag. Next experiments were performed on SaMag-12 extractor.

✓ Verification of the absence of DNA in the washing solution

Samples	Time after spotting	Nb copies/mL	Extractions
110 404 687	D+1	0	Easy Mag
120 014 928	D+1	162	Easy Mag
110 257 204	D+6	0	Easy Mag
110 257 204	D+6	0	SaMag

Among both washing solutions resulting from analyzes performed at D + 1, a low viral load is detected for one sample. No detection in the analyzes carried out at D + 6 after realization of the spot.

✓ Evaluation on QCMD external quality controls (2012 and 2013 campaign):

Samples	Nb copies/mL	Log copies/mL	Expected values	Delta Log	Albumin PCR
12 01	504	2.7	3.7	1	1.37*10 ⁻⁴
12 02	9104	3.96	4.3	0.34	5.68*10 ⁻⁴
12 04	748	2.87	3.7	0.83	1.45*10 ⁻⁴
12 05	6196	3.79	4	0.21	2.82*10 ⁻⁴
12 06	Neg	Neg	Neg	ND	4.64*10 ⁻⁴
12 07	244	2.39	3.4	1.01	9.44*10 ⁻⁶
12 08	3836	3.58	4	0.42	2.30*10 ⁻⁴
13 01	660	2.82	3.7	0.88	1.20*10 ⁻⁴
13 02	Neg	Neg	Neg	ND	1.30*10 ⁻⁵
13 03	444	2.65	3.4	0.75	2.33*10 ⁻⁴
13 04	3636	3.56	4	0.44	3.23*10 ⁻⁴
13 05	208	2.32	3.7	1.38	8.12*10 ⁻³
13 06	356	2.55	3.69	1.14	7.96*10 ⁻⁴
13 07	1820	3.26	4	0.74	2.47*10 ⁻⁴
13 08	60	1.78	3.4	1.62	1.96*10 ⁻⁴

✓ Evaluation of repeatability at D + 1

Expected values (Log10 copies/mL)	Results (Log10 copies/mL)	Delta log	Mean	SD
3.82	3.82	0		
	3.62	-0.20		
	3.64	-0.18	3.72	0.15
	3.93	0.11		
	3.57	-0.25		
	3.59	-0.32		
	3.75	-0.16		
	3.66	-0.25	3.58	0.7
	3.63	-0.28		
	3.29	-0.62		
	5.07	0.60		
	4.89	-0.12		
	4.96	-0.05	4.92	0.11
	4.91	-0.10		
	4.78	-0.23		

✓ Evaluation of repeatability at D + 7

Expected values (Log10 copies/mL)	Results (Log10 copies/mL)	Delta log	Mean	SD
3.82	3.79	-0.03		
	3.71	-0.11		
	3.99	0.17	3.76	0.14
	3.7	-0.12		
	3.62	-0.2		
	3.25	-0.66		
	3.42	-0.49		
	3.58	-0.33	3.43	0.22
	3.71	-0.20		
	3.2	-0.71		
	5.2	0.19		
	5.06	0.05		
	5.13	0.12	5.07	0.10
	5.01	0		
	4.96	-0.05		

✓ Evaluation of repeatability at D + 14

Expected values (Log10 copies/mL)	Results (Log10 copies/mL)	Delta log	Mean	SD
3.82	4.39	0.57		
	4.16	0.34		
	4.09	0.27	4.12	0.20
	4.14	0.32		
	3.83	0.01		
	3.58	-0.33		
	3.98	0.07		
	3.9	-0.01	3.79	0.16
	3.79	-0.12		
	3.69	-0.22		
	5.06	0.05		
	5.18	0.17		
	5	-0.01	5.07	0.08
	5.05	0.04		

✓ Evaluation of repeatability at D + 131

Expected values (Log10 copies/mL)	Results (Log10 copies/mL)	Delta log	Mean	SD
5.01	4.95	-0.06		
	5.27	0.26	5.09	0.16
	5.05	0.04		

For viral loads between 3.8 and 5 log10 copies / mL, the repeatability at D1 (5 replicates) is very good with coefficients of variation between 2.23 and 4.74% for the SaMag kit. The repeatability is equivalent with coefficients of variation between 1.97 and 6.41% at day 7 and between 1.57 and 4.85% at day 14. Reproducibility is also very satisfactory with coefficients of variation between 1.72% for a sample at 5 log10 and 5.69% for a sample at 3.82 log10.

✓ Clinical samples analysis:

N° DBS	Nb copies/mL	Log copies/mL	Albumin PCR (copies/mL)
2012 01	0	0	1.08*10 ⁻⁵
2012 02	0	0	2.08*10 ⁻⁵
2013 01	0	0	1.18*10 ⁻⁵
2013 02	0	0	1.13*10 ⁻⁵
2018 01	0	0	5.32*10 ⁻⁵
2018 02	0	0	2.98*10 ⁻⁵
2019 01	772 400	5.88	4.35*10 ⁻⁵

✓ Determination of sensitivity:

Samples with a viral load under 3 log10 copies / mL are not routinely detected. Probit analysis yielded 95% sensitivity at 3.38 log10 copies / mL. The analysis of 2 spots in parallel is recommended in front of the difficulty to improve the sensitivity of this technique.

CONCLUSION

The extraction of DBS is a technique that requires manual pre-lysis. Fully automated extractions used for the detection of other viruses such as HCV or HIV are not satisfactory for the detection of CMV. Nevertheless, the last step can be done on automates to avoid the use of columns. We validated the use of a small bench-top automaton, the SaMag-12 (Sacace). Its use coupled with the CMV R-gene PCR (bioMérieux) allowed the detection of the CMV DNA from D1 to more than 4 months after the spot production, as well as all QCMD quality controls (2012 and 2013). Only one of the tested patients was found positive but the quantity of albumin evaluated by PCR between 10e⁶ and 10e⁸ copies / mL is in favor of a very good quality of extraction for all samples.

Références : Leruez-Ville M, Vaulouf-Fellous C, Couderc S, Parat S, Castel C, Avettand-Fenoel V, Guillemot T, Grangeot-Keros L, Ville Y, Grabar S, Magny JF. Clin Infect Dis. 2011 Mar 1;52(5):575-81.

2.1.2 Techniques de génotypage viral

Typage HHV6 par PCR digitale

Laboratoire associé Pitié Salpêtrière

En 2018, nous avons comparé la méthode de droplet digital PCR (ddPCR) avec la méthode de qPCR que nous utilisons dans le laboratoire pour des patients porteurs ou non d'iciHHV-6.

Les deux méthodes sont comparables et très bien corrélées ($p < 0,0001$; R^2 0,917 et 0,952 selon la méthode). La ddPCR semblait cependant un peu moins sensible que la qPCR (Figure 1, tableau 1).

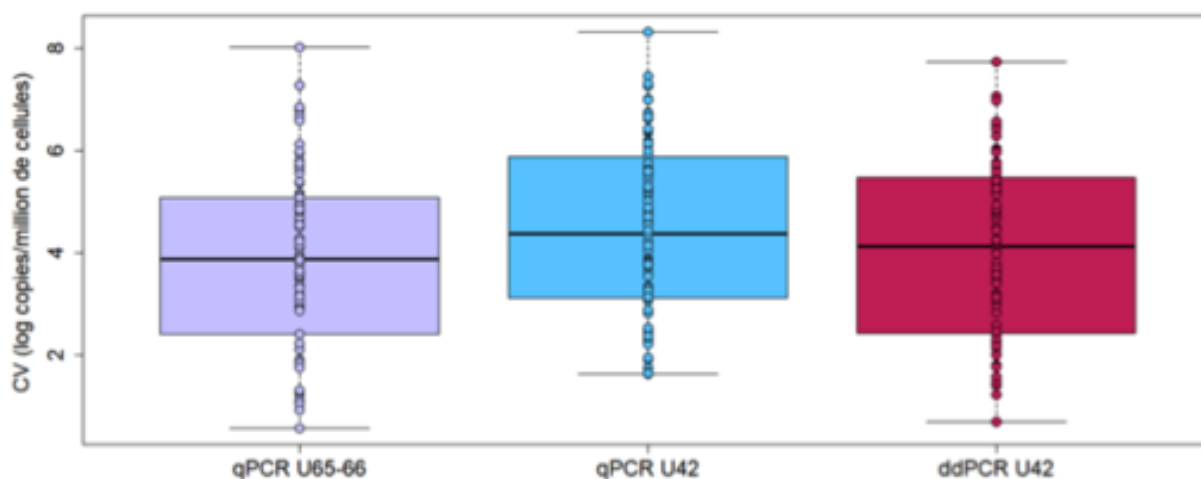


Figure 1 : graphe de comparaison des CV HHV-6 mesurées en qPCR et ddPCR pour les gènes U65-66 et U42

Tableau 1 : Comparaison des charges virales entre qPCR et ddPCR pour les gènes U65-66 et U42 du HHV-6

	Nombre de positifs	CV médiane	CV minimale (hors CV négatives)	CV maximale
qPCR U65-66	88	$1,30 \times 10^4$	3,73	$1,02 \times 10^8$
qPCR U42	91	$2,78 \times 10^4$	$4,26 \times 10^1$	$2,08 \times 10^8$
ddPCR U42	87	$1,79 \times 10^4$	5,07	$2,66 \times 10^7$

Typage EBV par PCR Séquence

Laboratoire référent EBV Grenoble

La technique actuelle de typage de l'EBV (EBV type 1 et EBV type 2) présente au laboratoire est réalisée par PCR spécifique sur 3 gènes de latence de l'EBV : EBNA3A EBNA3B et EBNA3C. Cette PCR permet de mettre en évidence des amplicons de taille différente en fonction du type.

En 2018

Mise au point d'une technique de typage par séquençage SANGER du gène de latence EBNA3C permettant le typage de l'EBV (EBV type 1 et EBV type 2)

Les techniques de séquençage des gènes EBNA3A EBNA3B sont en cours de développement.

Elargissement des techniques de typage du VZV

Laboratoire de la Pitié Salpêtrière

Dans le cadre du programme européen EU VZVIP (*European Varicella-Zoster Virus Identification Programme*) des laboratoires MSD Vaccins, nous avons mis en place un partenariat avec ces laboratoires afin de caractériser la nature sauvage ou vaccinale des VZV détectés dans les échantillons prélevés chez des sujets vaccinés ou des sujets contacts ayant développé des événements indésirables spécifiques suite à la vaccination par les vaccins VARIVAX®, ZOSTAVAX® ou PROQUAD®. Il s'agit d'une méthode d'identification en deux étapes :

- 1- Caractérisation VZV sauvage / VZV vaccinal par PCR en temps réel différentielle
- 2- Confirmation par séquençage et identification de différents SNP (*single nucleotide polymorphisms*) dans les ORF38 et ORF62

Nous avons aussi mis en place au laboratoire de la Pitié-Salpêtrière la technique d'identification des clades des souches de VZV par séquençage de différentes ORF et identification de SNPs spécifiques, selon la méthode publiée par Quinlivan et al., J Clin Microbiol, 2012. Cette méthode d'étude de l'épidémiologie moléculaire des souches de VZV est actuellement utilisée dans le cadre de la thèse d'une interne de biologie médicale du laboratoire.

Différenciation des génomes latents et réplicatifs d'HSV par analyse transcriptomique

Laboratoire de la Pitié Salpêtrière

Afin de définir le caractère réplicatif ou latent du génome HSV détecté dans les prélèvements biologiques dans certaines situations cliniques particulières, nous avons mis au point une technique de transcriptomique ciblée permettant la détection et la quantification i) des transcrits viraux associés à la phase de latence virale (LAT, *latency associated transcript*) et ii) de certains transcrits viraux associées à la phase lytique (ICP27, gène très précoce ; UL23, gène précoce ; UL19, gène tardif). Cette méthode a été appliquée pour un patient (CHU de Poitiers) pour lequel se posait la question d'une rechute d'un premier épisode de méningoencéphalite herpétique. Ce travail a fait l'objet d'une publication actuellement soumise.

Elargissement de l'offre NGS

Séquençage de longs fragments par technologie NGS nanopore Minion (Oxford technologies) application au CMV à HSV et VZV).

Laboratoire CNR Limoges

La sensibilité de ces méthodes à partir d'ADN extrait par la méthode de Hirt a été évaluée en 2018 pour la détection de variants connus du gène UL54, par comparaison à la technologie Ion Torrent sur Proton. Le bruit de fond, sur les Bacmides et sur les produits de PCR est équivalent à celui du Proton soit 1,4%. Sur la mutation index portée par le Bacmide H586Y dans UL54, le pourcentage d'erreur résiduelle sur le séquençage direct du Bacmide entier est de 13%, et sur séquençage après amplification d'un mélange d'amplicons UL54 et UL97 est de 1,2%. La technologie sera donc essentiellement proposée pour la recherche de co-localisation des mutations UL54 sur un même génome ou la caractérisation de souches recombinantes, tant que la sensibilité sur génome entier n'aura pas été revalidée. A noter une puce complète est nécessaire pour un génome de CMV. Le coût reste donc élevé, de l'ordre de 400 euros par souche.

Séquençage des genes UL56 et UL89 du CMV par technologie Proton et S5 (Ion Torrent)

Laboratoire CNR Limoges

Développé pour surveiller les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de terminase. Transfert de la technologie sur Proton S5 permettant une lecture de fragments plus longs et des résultats moins onéreux et plus rapides.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

2.2.1 Charge virale CMV

Laboratoire CNR Limoges

Comparaison des performances en UI/mL de la trousse Realstar® CMV PCR Kit (Altona Diagnostics) à la trousse CMV R-gene®™ (bioMérieux) sur sang total et plasma

PCR Realstar® CMV PCR Kit (Altona Diagnostics) Technologie Taqman, Validée sang total, plasma

- ✓ Contrôle interne plasmidique pour chaque échantillon exprimé en Ct
- ✓ Résultats directement calibrés en UI/mL

La limite de détection a été vérifiée sur le standard zeptomatrix : Standard NATtrol™ Cytomégalo virus

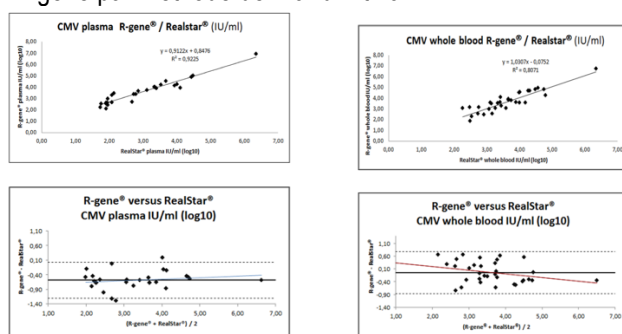
Les résultats ont été comparés sur :

- Contrôle qualité sang total QCMD (2015): valeurs attendues 1,9 à 3,4 log₁₀ UI/mL
- 37 échantillons de patients (sang total et plasma) avec une CV CMV détectable en routine sur sang total par la trousse CMV R-gene® (bioMérieux).

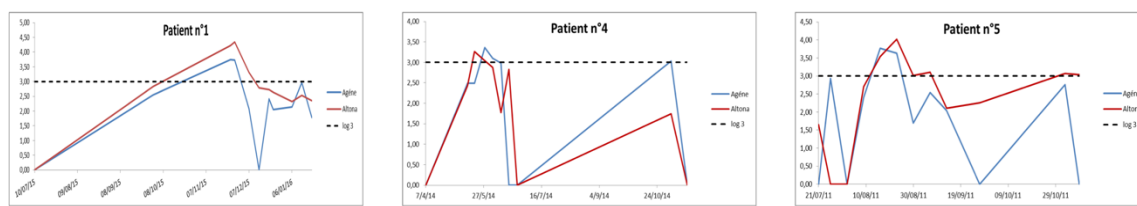
En 2018 Nous avons finalisé l'évaluation de la trousse Altona sur 91 échantillons séquentiels de patients receveurs d'allogreffe de moelle.

Résultats :

Très bonne corrélation sur plasma : $R^2 = 0,9$, sur sang total : $R^2 = 0,8$ avec sur-quantification des valeurs basses en Rgene par méthode de Bland Altman.



Les cinétiques de charge virale sont très similaires à l'exception de quelques points discordants après contrôle.



Conclusion : la trousse Realstar® CMV PCR Kit (Altona Diagnostics) donne des résultats comparables sur sang total à ceux observés avec la trousse CMV R-gene® (bioMérieux). NB Les contrôles internes n'interfèrent pas entre eux. Les deux contrôles peuvent donc être ajoutés dans un même échantillon si besoin. L'ensemble de ces résultats a été présenté en poster au congrès de l'ESCV (Société Européenne de Virologie) en septembre 2018

2.2.2 Charges virales HSV/VZV

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière

PCR quantitatives HSV-1/2 et VZV (Vela Diagnostic)

Nous avons évalué les trousse Sentosa® HSV-1/2 et VZV PCR Test sur 40 prélèvements biologiques et contrôles de qualité du QCMD précédemment caractérisés par nos techniques de routine. L'extraction et la mise en tube a été effectuée sur l'automate Sentosa SX101 et l'amplification sur un Rotor-Gene Q (QIAGEN). Les résultats ont été analysés grâce au logiciel Sentosa SA Reporter. Les résultats de cette évaluation étaient excellents, avec une concordance de 97,5% (un seul prélèvement a donné un résultat discordant), et une bonne corrélation en termes de quantification de charges virales.

PCR triplex quantitative HSV-1/HSV-2/VZV (Eurobio)

Les mêmes prélèvements ont été utilisés en parallèle pour l'évaluation de la nouvelle trousse proposée par Eurobio pour une PCR triplex quantitative HSV-1/HSV-2/VZV. Les prélèvements ont été extraits sur l'automate EMAG (BIOMERIEUX), la mise en plaque sur l'ESTREAM (BIOMERIEUX), et l'amplification sur le CFX96 (BIORAD). Les résultats de cette évaluation étaient relativement mauvais, avec 15 résultats discordants (concordance : 62,5%), mettant en évidence un problème de sensibilité de la technique. Le laboratoire EUROBIO travaille à l'amélioration de cette PCR triplex quantitative.

Adaptation des tests Simplexa® HSV1&2 direct kit et Simplexa® VZV direct kit (DIASORIN)

Nous avons commencé l'évaluation de l'utilisation de 25 µL de prélèvement de LCS (au lieu des 50 µL préconisés par le fabricant) pour les PCR HSV-1/2 et VZV effectuées avec les tests Simplexa® HSV1&2 Simplexa® VZV direct kit sur les automates LIAISON MDX. Les premiers résultats obtenus sont très bons : l'utilisation de 25 µL ne modifie pas la sensibilité de la technique. Les résultats obtenus sur 25 prélèvements et QCMD positifs pour HSV et 25 prélèvements et QCMD positifs pour VZV ont été présentés en communication orale au congrès européen de virologie (ESCV 2018 à Athènes) et à la RICAI 2018 (Paris). Cette évaluation continue actuellement afin d'augmenter le nombre de prélèvements testés en parallèle (25 µL / 50µL) pour valider définitivement l'utilisation d'un volume de 25 µL de CSF et publier ces résultats.

PCR quantitatives R-GENE® HSV1&2 et VZV (BIOMERIEUX)

Nous avons commencé l'évaluation des nouvelles trousse de PCR quantitative R-GENE® HSV1&2 et VZV fin 2018 dans 2 applications :

- Quantification du génome HSV-1 dans 50 prélèvements de lavage broncho-alvéolaire (LBA) de patients intubés/ventilés avec expression des résultats en copies virales/million de cellules (en utilisant la trousse CELL Control R-GENE®). Comparaison des résultats avec notre technique de PCR « maison » (Burrel et al., J Virol Method, 2012).
- Quantification du génome VZV dans 60 prélèvements de natures différentes : sang total, liquide cébrospinal (LCS) et prélèvements cutanéomuqueux sur milieu de transport. Comparaison des résultats avec notre technique de PCR « maison » (Burrel et al., J Virol Method, 2012).

L'évaluation est effectuée sur la chaîne Argène Solution (extracteur EMAG et distributeur ESTREAM) avec l'amplificateur LC480 (ROCHE DIAGNOSTICS). Cette évaluation est actuellement en cours de finalisation avec l'analyse des résultats obtenus. Un résumé sera soumis au prochain congrès européen de virologie (ESCV 2019 à Copenhague).

2.2.3 Charge virale EBV

Laboratoire de Grenoble

Validation de méthode PCR EBV sur chaîne bioMérieux : EMag/ Easystream

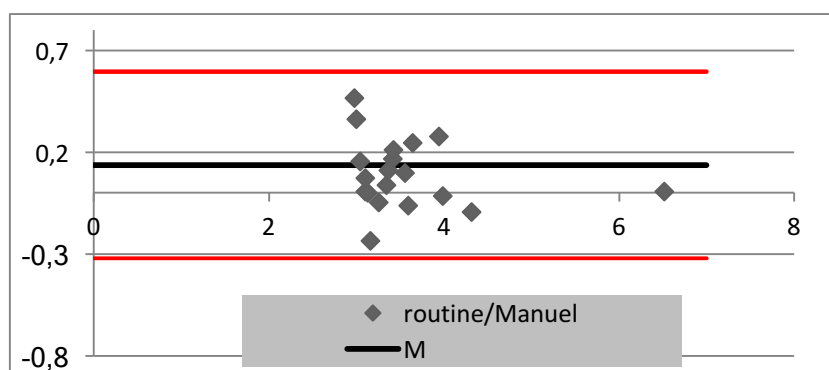
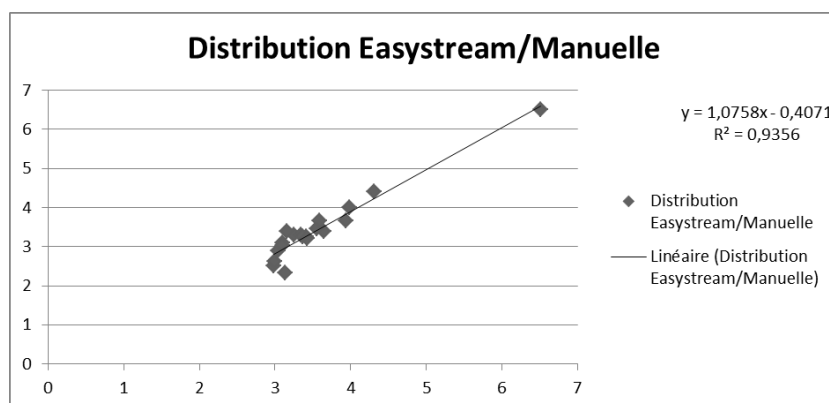
Comparaison de la méthode de distribution manuelle versus la distribution avec l'Easystream

Les résultats de la PCR EBV avec la trousse EBV-R gene (Argène-bioMérieux) après distribution manuelle ont été comparés aux résultats obtenus après distribution automatisée par l'automate Easy stream : 30 échantillons de sang totaux dont 20 connus positifs en PCR EBV et 10 connus négatifs en PCR EBV ont été sélectionnés après leur analyse en routine au laboratoire.

L'analyse qualitative des résultats (voir tableau ci-dessous) montre une excellente concordance. Deux échantillons de faible charge virale (<1000 copies/mL) sont discordants. Un est positif en distribution manuelle et négatif en distribution automatisée et l'autre est négatif en distribution manuelle et positif en distribution automatisée ce qui est normal pour des échantillons à la limite de détection de la technique.

		Distribution manuelle	
		+	-
Distribution Easystream	+	19	1
	-	1	9

L'analyse quantitative des résultats par la droite de régression, équation et coefficient de corrélation et l'étude des différences grâce à la méthode de Blant Altman montre une concordance quantitative avec un coefficient de corrélation > 0,9 et des charges virales considérés comme comparables d'après Blant Altman. Les deux techniques sont donc considérées comme similaires.



Comparaison des méthodes d'extraction automatisées MagnaPure LC et eMag

Les résultats de la PCR EBV avec la trousse EBV-R gene (Argène-bioMérieux) après extraction par l'automate le MagNa Pure LC (Roche) ont été comparés avec les résultats après extraction par l'automate eMag.

140 échantillons de sang totaux dont 32 connus positifs en PCR EBV et 78 connus négatifs en PCR EBV ont été sélectionnés après leur analyse en routine au laboratoire.

L'analyse qualitative des résultats (voir tableau ci-dessous) montre une excellente concordance

24 échantillons de faible charge virale (<1000 copies/mL) sont discordants.

La valeur du χ^2 observé est 31,841 (χ^2 théorique pour 1 ddl 3,84) et la valeur du χ^2 de Mac Nemar pour les paires appariées discordante est 0,666 (χ^2 théorique pour 1ddl : 3,84). Les 2 techniques sont donc considérées comme équivalentes.

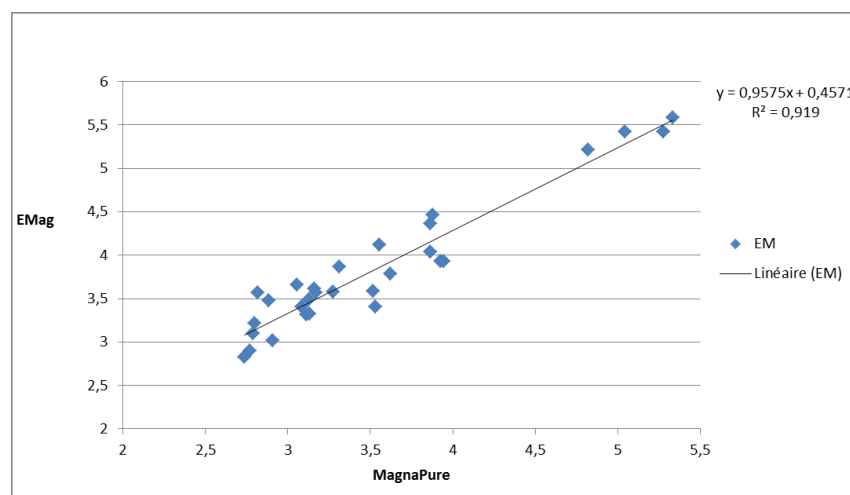
		Emag		SOMME
		EBV +	EBV -	
MagnaPure	EBV +	52	10	62
	EBV -	14	54	78
SOMME		66	64	140

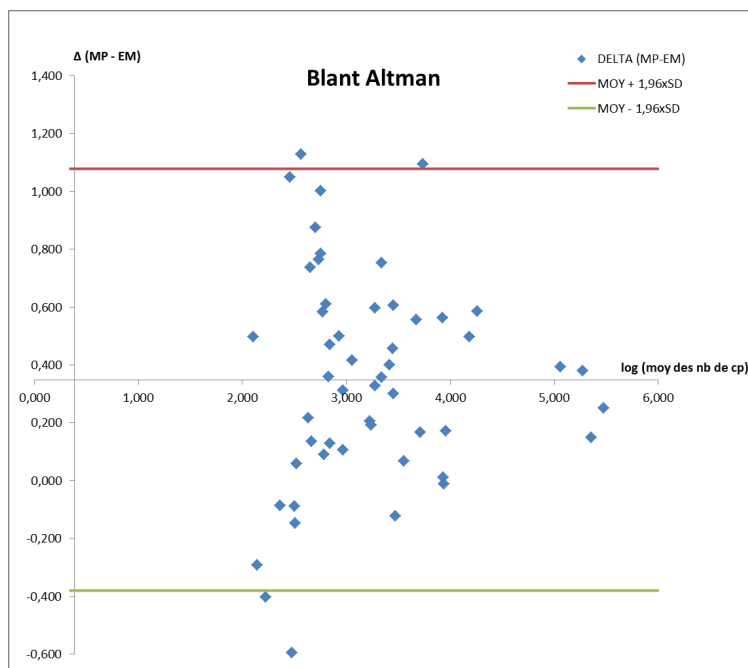
L'analyse quantitative des 52 résultats positifs dans les 2 techniques est réalisée par le calcul la droite de régression, équation et coefficient de corrélation et l'étude des différences à l'aide du graph de Blant Altman.

Le coefficient de corrélation de la courbe de régression est supérieur à 0,9 ce qui suggère que les résultats des 2 techniques sont concordants

Dans l'analyse de Bland-Altman, 4 valeurs sur 52 sont à l'extérieur des bornes 1,96xSD autour de la moyenne. Trois de ces 4 valeurs correspondent à des charges virales faibles (<1000 copies/mL).

Un échantillon correspond à une vraie discordance dans les résultats de charge virale. Il y a donc 1 résultat discordant sur 52 résultats quantitatifs ce qui paraît acceptable surtout dans le cadre de la PCR EBV qui est surtout un outil utilisé pour le suivi de la cinétique de charge virale.





2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Laboratoire CNR Limoges

- Transfert de la méthode de génotypage de résistance CMV du laboratoire CNR de Limoges vers le laboratoire de virologie de la faculté de Pharmacie de Monastir, Tunisie (Dr S JARBOUI) avec formation préalable au laboratoire CNR de Limoges de septembre 2017 à janvier 2018, dans le cadre d'une collaboration avec le Dr S HANTZ.
- Transfert de la méthode de génotypage gB, gH, gN CMV lors d'un deuxième séjour de Décembre 2018 à avril 2019 .
- Transfert de la méthode de génotypage de résistance au letermovir par séquençage des gènes *UL56* et *UL89* au Laboratoire de virologie de l'Hôpital Saint Louis, Paris (Champier et al., Antiviral Therapy 2007, 2008).

Laboratoire associé Pitié Salpêtrière

- Transfert de la technique de séquençage des gènes *UL56* et *UL89* pour la recherche des mutations de résistance du CMV au Létermovir au laboratoire de Virologie de Nantes (Dr Céline BRESSOLLETTE-BODIN) (Pilorgé et al., Antiviral Res, 2014).

2.4 Collections de matériel biologique

L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique du CNR figurent dans l'annexe 1.

L'évolution générale des collections du CNR est marquée par un accroissement progressif de l'activité, et l'intégration progressive des collections du CNR dans les Centres de Ressources Biologiques des établissements. Il n'y a pas d'incorporation de nouvelle collection en 2018.

Laboratoire CNR Limoges :

L'ensemble de la collection est présenté en annexe 1.4. Seules les modifications sont rapportées ici. **Les collections sont progressivement répertoriées dans le CRB du CHU de Limoges CRBioLim (N° Certification NF S96-900 : 140787/1258F)**

En attente : 230 échantillons pour recherche de résistance reçus en 2018

Souches intégrées au CRB pour 2018 : 8 CMV pour 3 patients, et 32 VZV pour 16 patients

Autres évolutions sur les ressources conservées dans la collection du CNR :

PHRCN OrPhaViC (observatoire pharmacologique et virologique des résistances) 2012-2018.

- 402 patients inclus : d'aliquotes de sang total des patients de Limoges et reçus des autres centres :

Rapatriement des échantillons en 2018 portant la collection à **6139** échantillons de suivi des patients (sang total).

Protocole QuantiCR+ : Quantiféron™ et prédiction d'infection à CMV chez les receveurs de rein CMV séropositifs :

Patients inclus à Limoges : sang totaux (185) + Plasma (558) : 743

Autres centres : sang totaux (916) + Plasma (1 688) : 2 604

Cession : 509 échantillons pour évaluation du potentiel de la charge virale TTV à prédire les infections à CMV par comparaison au test Quantiféron™.

Prélèvements adressés au CNR sang total, plasma, LCR, pour génotype de résistance et mis en collection : 1758 de 2006 à 2016 et 230 reçus en 2018

Prélèvements adressés au CNR pour expertise d'infection congénitale et mis en biothèque en 2018 : 131 échantillons de sérums pour confirmation diagnostique de primo-infection CMV, 7 liquides amniotiques

Laboratoire associé Necker

La biothèque du CNR de Necker est intégrée au centre de ressources Biologiques de l'Hopital Necker Enfants malades Necker (BB-033-00065).

Biothèque spécifique du CNR constituée de 2006 à 2017

- Souchothèque : cellules MRC5 infectées conservées à -80°C: **298 souches** (3 aliquots par souche) responsables d'infection materno-fœtale isolées de liquide amniotique ou d'urine de nouveau-nés.
- **1483 prélèvements de liquides amniotiques** testés en PCR CMV dont **270 positifs**. Ces prélèvements sont conservés à -80°C
- **105 prélèvements de sang fœtal total positifs** conservés à -80°C.
- **250 échantillons d'urine** PCR CMV positive conservés à -80°C
- **13750 échantillons salivaires** obtenus de nouveau-nés et caractérisés en PCR CMV dont environ **750 positifs en PCR CMV**. Ces prélèvements sont conservés à -80°C
- **600 échantillons de sérum** obtenus chez des femmes enceintes en primo-infection et dont les caractéristiques (IgG et IgM et avidité des IgG) sont bien répertoriées. Ces sérums sont conservés à -20°C
- **1110 échantillons de sang séché sur carton de Guthrie** caractérisés en PCR CMV : dont 1019 PCR CMV négative provenant de nouveau-nés non infectés et **140 PCR CMV positive** obtenus de nouveau-nés infectés par le CMV. Ces échantillons sont conservés à température ambiante

En 2017 intégration de 244 échantillons de sérum, 178 échantillons de liquide amniotique et 5 échantillons de sang fœtal, 281 cartes de Guthrie, 1082 échantillons de salive provenant de nouveau-nés.

Biothèque propre du laboratoire de Virologie de Necker pouvant être utilisée dans le laboratoire à des fins d'expertises :

- **Environ 3000 échantillons (0.5 à 2 ml) de sang total PCR CMV positive** conservés à -80°C

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière :

La biothèque du laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière comprend l'ensemble des prélèvements biologiques positifs en PCR HSV et en PCR VZV (depuis 2012) ainsi que l'ensemble des souches de HSV-1, HSV-2 et VZV isolées en culture cellulaire (depuis 2010).

Pour l'année 2018, cela représente près de 2500 prélèvements (LCS, LBA, prélèvements cutanéomuqueux, prélèvements génitaux, prélèvements oculaires, LBA ...) et 250 souches virales (HSV et VZV). Ceci inclut en particulier l'ensemble des prélèvements/souches testés au laboratoire pour la recherche de résistance aux antiviraux.

Laboratoire de Grenoble

La biothèque du laboratoire de virologie de Grenoble (Collection déclarée DC2008680) est intégrée au centre de ressources Biologiques du CHU de Grenoble cf annexes

La biothèque du laboratoire de virologie de Grenoble comprend des sangs totaux, des sérums des plasmas de salives conservées à -80°C et dont les volumes vont de 0.2 à 1.5 mL. Elle comprend aussi des lignées lymphoblastoïdes qui permettent de conserver les souches virales et qui sont conservées dans l'azote liquide. Cette biothèque comprend environ 3000 échantillons.

2.5 Activités d'expertise

Les analyses de ces données à des fins de surveillance seront détaillées dans les chapitres 3.1 et 3.2.

2.5.1 Délai moyen de restitution des résultats du CNR aux laboratoires.

Le délai correspond au délai pratiqué en routine pour les techniques diagnostiques : génotypages de résistance (une semaine, 3 jours minimum), avidités CMV ou contrôles de sérologie CMV, EBV ou HSV et PCRs CMV ou HSV (deux à cinq jours)

Pour les techniques de recherche le délai varie selon la technique et l'objectif.

2.5.2 Activités d'expertise 2018 :

Laboratoire CNR Limoges :

Pour le CMV recrutement régional et national

- 163 échantillons de sérums pour **confirmation diagnostique de primo-infection CMV** dont 110 hors CHU de Limoges. Sur ces sérums l'avidité et les IgM sont mesurés par la technique Diasorin Liaison XL.
- Le laboratoire a effectué **29 PCR CMV sur sérum** pour rechercher une répllication virale en cas d'avidité intermédiaire ou fort et présence d'IgM chez 16 femmes enceintes. Deux femmes enceintes présentaient une répllication virale très faible inférieure à 2log UI/mL.
- Le laboratoire a réalisé **145 PCR sur urine/salive** pour dépister une infection à CMV congénitale dans le cadre de RCIU. Un enfant a présenté une infection congénitale à CMV : RCIU, prématurité (35SA), pas d'anomalies à la naissance, traité par GCV. Son développement psycho-moteur est excellent à un an.
- **Activité de génotypage CMV et de séquençage NGS** : cf chapitre surveillance des résistances
- Pour mémoire : 230 génotypes de résistance adressés de toute la France, 6 séquences de génomes complets adressés du laboratoire de virologie de Lyon ou sur souches isolées à Limoges à partir de prélèvements adressés par d'autres laboratoires.
- **Tests Quantiféron™ CMV** : 71 tests réalisés pour l'ensemble des laboratoires Paris, Province.

Pour la PCR HSV, recrutement régional pour les PCRs sur LCR et sur sang total, et national + Suisse pour les recherches de résistance (cf surveillance).

508 PCR dans le LCR : 7 LCR positifs à HSV1 (7 patients)

Cas positifs à HSV1 : 3 cas sont des patients présentant des tableaux neurologiques avec une PCR HSV1 faiblement positive. Le diagnostic de méningo-encéphalite à HSV1 n'a pas été retenu par les cliniciens (céphalées fébriles sans troubles neurologiques dans un contexte de grippe/ tableau de myélite, sérologie HSV

négative : probable SEP / crises comitiales sans signe d'encéphalite et sans hyperthermie). Parmi les 4 autres patients, 2 authentiques tableaux de méningo-encéphalite herpétique, un tableau de méningite virale et une analyse demandée en confirmation d'une PCR FilmArray positive en HSV1 réalisée dans un laboratoire de Centre Hospitalier périphérique.

83 PCR sur sang total :

4 cas positifs à HSV1 :

Un homme de 27 ans, allogreffé pour LAM en 2016, a développé une GVH chronique avec atteinte hépatique et cutanée. Virémie positive à HSV1 traitée par aciclovir IV alors que le patient prenait une chimioprophylaxie par Zelitrex. Evolution défavorable.

Un patient de 26 ans, allogreffé en février 2018 pour LAL B, a présenté une virémie à HSV1 le jour de sa greffe. La mise sous prophylaxie par Zelitrex a conduit à une évolution favorable.

Une patiente de 31 ans a présenté une endométrite à streptocoque traitée par érythromycine et flagyl durant trois semaines en post-partum. Vingt-quatre heures après la fin de l'antibiothérapie, la patiente a eu des douleurs épigastriques importantes, des frissons et une fièvre remontée jusqu'à 39° accompagné d'une cytolysé hépatique à 10N. Le bilan d'imagerie (échographie, scanner et IRM) est négatif, pas d'étiologie médicamenteuse. La ponction lombaire est également négative. Le bilan a retrouvé une PCR HSV1 positive et la présence d'IgM et d'IgG anti-HSV. L'évolution a été spontanément favorable sans traitement.

Une patiente de 62 ans avec une carcinomatose péritonéale post cancer du rectum, présente une virémie HSV1 dans un contexte de fin de vie. Pas de suite donnée à ce résultat.

Laboratoire associé Necker :

- **193 échantillons de sérum** pour confirmation diagnostique de primo-infection à CMV chez des femmes enceintes. Origine des patientes : Ile de France, Nord et Bretagne. Tous ces sérums ont été expertisés avec dosage des IgG et IgM par la technique Liaison XL Diasorin. En cas d'IgM positives, l'index d'avidité des IgG est systématiquement réalisé par 2 techniques : LIAISON XL Avidity II et Vidas BioMérieux Avidity II.
- Dans le cadre de notre activité de diagnostic pré-natal nous avons reçu en 2018, **172 échantillons de liquide amniotique** et **34 échantillons de sang fœtal** pour recherche d'infection congénitale à CMV. Ces liquides amniotiques ont été prélevés pour suspicion d'infection fœtale à CMV dans 5 centres de diagnostic prénatal : Necker, Orléans, Amiens, Hôpital Américain, Hôpital Foch et Hôpital de la Pitié Salpêtrière. En 2018, **dans 31 cas la PCR était positive dans le liquide amniotique et/ou le sang fœtal**, il y a eu 4 IMG pour anomalies cérébrales sévères, 4 enfants symptomatiques (3 cas de surdité bilatérale et 1 cas de surdité unilatérale) et 18 enfants sont nés asymptomatiques et 5 ne sont pas encore nés à la rédaction de ce rapport.
- Dans le cadre de l'activité d'expertise concernant la détection du CMV dans le sang séché des cartes de Guthrie, nous avons reçu en 2018, **180 cartes de Guthrie** d'enfants avec suspicion d'infection congénitale à CMV (surdité et/ou troubles neurologiques compatibles, présence de CMV dans les urines après 3 semaines de vie). Origine des patients : Paris, Ile de France, Rouen, Orléans, Amiens, Saint Etienne, Toulouse, La réunion, Lille, Grenoble, Lyon, Limoge, Rennes, Nantes. **La PCR a été positive dans 12 cas** témoignant d'une infection congénitale à CMV chez ces enfants.
- Dans le cadre de l'activité d'expertise concernant le diagnostic de l'infection chez le nouveau-né à partir des échantillons de salive, nous avons analysé **969 échantillons de salive** en 2018 provenant de nouveau-nés d'Ile de France, **45 était positifs**.

Nombres de cas diagnostiqués à Necker en 2018 : 48 diagnostics d'infection congénitales en 2018 dont 9 avec un tableau sévère, 5 un tableau modéré et 34 étaient asymptomatiques.

26 cas en anténatal : dont 4 sévères (IMG), 3 enfants sont nés avec une surdité bilatérale, 1 enfant est né avec une surdité unilatérale et 18 enfants sont nés asymptomatiques.

13 enfants ont été diagnostiqués à la naissance (notion de séroconversion maternelle ou de symptômes néonataux) : 12 étaient asymptomatiques, 1 avait une surdité unilatérale.

12 enfants ont été diagnostiqués rétrospectivement sur carton de Guthrie : 3 avaient des signes d'appel neurologiques, 2 une surdité bilatérale profonde, 3 une surdité unilatérale profonde et 4 étaient asymptomatiques.

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière :

Infections par HSV ou VZV

Prélèvement (n)	Laboratoire d'origine	Analyses réalisées	Demande du laboratoire d'origine	Délai de rendu (j)
LCS (2)	HIA Bégin	PCR VZV quantitative (technique développée au laboratoire)	Confirmation d'un résultat obtenu avec le test ME panel sur FilmArray (BIOMERIEUX)	2
Sérums (3)	CHU Rennes	Sérologie spécifique IgG anti-HSV-1/IgG anti-HSV-2 (LIAISON XL DiaSorin)	Identification d'une primo-infection herpétique génitale chez des femmes enceintes	3
Prélèvements génitaux (2)	CHU Nantes	PCR HSV-1/2 (QIAGEN) et séquençage de l'ADN polymérase virale	Confirmation de la détection simultanée du génome du HSV-1 et du HSV-2 par PCR (technique développée au laboratoire)	7
Surnageant de culture cellulaire	CH Versailles	PCR HSV-1/2	Caractérisation d'un isolat clinique de HSV obtenu en culture cellulaire	2
Prélèvement cutanéomuqueux	CHU Montpellier	PCR HSV-1/2 (QIAGEN) et analyse en NGS (Hôpital Henri Mondor)	Suspicion d'infection par le virus B du singe	10
Prélèvement cutanéomuqueux	Genève (Suisse)	PCR différentielle VZV sauvage/ vaccinal	Zona chez un patient vacciné contre le VZV	3

Infection congénitale à CMV

En 2018, nous avons réalisé 26 PCR CMV sur liquide amniotique et 30 avidités des IgG anti-CMV.

Génotypes de résistance et séquences HSV VZV CMV : cf chapitre surveillance des infections.

Laboratoire de Grenoble :

Dans le cadre de l'activité d'expertise concernant l'EBV, le laboratoire de Grenoble a réalisé **en 2018**:

- 50 sérologies EBV pour contrôle des résultats d'un laboratoire extérieur (CH, CHU et labo privé). Ceci correspond à environ 1.5% de notre activité de sérologie EBV
- 158 PCR EBV pour des laboratoires extérieurs (CH, CHU et labo privé). Ce qui correspond à environ 3% de notre activité de PCR EBV dont 13 sur des LCR pour expertise et prestation de conseil
- 4 sérologies EBV en IF (VCA IgA et EA IgA) pour 3 patients atteint de carcinome du nasopharynx dans le cadre d'un suivi.
- 9 typages d'EBV

2.5.3 Organisation de contrôles de qualité 2018

Organisation d'un contrôle de qualité interlaboratoires pour la détection et la quantification des herpèsvirus

Le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière a organisé en 2018 un contrôle de qualité national interlaboratoires pour le diagnostic des infections neuroméningées dues aux herpèsvirus humains (HHV) : HHVBM-PSL18.

Ce contrôle avait pour objectif d'évaluer les différentes méthodes d'extraction des acides nucléiques et d'amplification génique pour la détection et la quantification du génome des HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV et HHV-6 dans des prélèvements de LCS.

Les panels ont été envoyés à chaque laboratoire le 28 mars 2018, exception faite pour La Réunion et la Martinique pour des raisons logistiques (avril 2018). Au total, 50 laboratoires ont participé à ce contrôle de qualité HHVBM-PSL18.

La composition de ce contrôle de qualité était la suivante :

Echantillons ^a HHVBM-PSL	Matrice	Contenus des échantillons ^b	Résultats qualitatifs des PCR (valeurs de Ct) ^c				
			HSV	VZV	CMV	EBV	HHV-6
18-01	LCS	HSV-1 (souche KOS) HHV-6B (souche MAR)	HSV-1 (31,1)	Négatif	Négatif	Négatif	HHV-6 (40,3)
18-02	LCS	VZV (souche Oka) EBV (souche clinique)	Négatif	VZV (27,1)	Négatif	EBV (32,1)	Négatif
18-03	LCS	HSV-2 (souche gHSV-2) EBV (souche clinique)	HSV-2 (25,9)	Négatif	Négatif	EBV (37,3)	Négatif
18-04	LCS	CMV (souche AD169) HHV-6B (souche MAR)	Négatif	Négatif	CMV (28,9)	Négatif	HHV-6 (35,7)

Ct : crossing threshold ; CMV : cytomégalovirus humain ; EBV : virus Epstein-Barr ; HHV-6B : herpèsvirus humain 6B ; HSV-1/2 : virus herpes simplex 1/2 ; LCS : liquide cébrospinal ; VZV : virus de la varicelle et du zona. ^a Echantillons distribués aux laboratoires participants. ^b Les échantillons du panel ont été obtenus par dilution dans la matrice biologique LCS de stocks des souches virales KOS (HSV-1), gHSV-2 (HSV-2), Oka (VZV) et AD169 (CMV). Pour l'EBV, un prélèvement de sang fortement positif en PCR EBV a été utilisé. ^c Valeurs de Ct obtenus après une extraction sur eMAG® (BIOMERIEUX) par : les techniques Artus® HSV-1/2, Artus® CMV et Artus® EBV (QIAGEN) réalisées sur la plateforme RotorGeneQ (QIAGEN) ; les techniques publiées et adaptées sur site pour VZV (Cohrs et al., J Med Virol, 2008) et HHV-6 (Gautheret-Dejean et al., J Virol Method, 2002) réalisées sur la plateforme LightCycler 480 (Roche Diagnostics).

L'ensemble des résultats a été analysé par le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière sur les plans qualitatifs et quantitatifs. Cette analyse a notamment permis de mettre en évidence la très grande variété de techniques utilisées par les différents laboratoires participants en termes d'extraction des acides nucléiques et de techniques d'amplification (techniques commercialisées ou « maison »). Par ailleurs, si les résultats qualitatifs étaient dans l'ensemble très bons, les résultats quantitatifs (charges virales) ont eux aussi montré une très grande variabilité.

Organisation d'un contrôle de qualité interlaboratoires pour le diagnostic de la résistance des HSV aux antiviraux par méthodes génotypiques et phénotypiques

Ce contrôle avait pour objectif d'évaluer les différentes méthodes phénotypiques (antivirogrammes) et génotypiques (séquençage) de diagnostic de la résistance des HSV aux antiviraux sur un panel de 3 souches cliniques. Le panel a été envoyé à chaque laboratoire le 9 avril 2018. Au total, 3 centres français ont accepté de participer à ce contrôle de qualité HSV-R PSL18 : laboratoire de Virologie des Hospices Civils de Lyon, laboratoire de Virologie de l'Hôpital Saint-Louis (Paris), laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges. Par ailleurs, le laboratoire de Virologie et Chimiothérapie de l'Institut REGA (Louvain, Belgique) a aussi participé à ce contrôle de qualité.

La composition du panel était la suivante :

Echantillon EIL HSV R PSL18	Typage HSV	Patient				Phénotype		Génotype	
		Sexe	Age	Lésions	Contexte clinique	ACV	FOS	TK	POL
N°1	HSV-1	F	42	Bouche	Hémopathie	S	S	+	+
N°2	HSV-1	H	52	Bouche	Greffe de CSH	R	S	+	+
N°3	HSV-2	H	50	Génital	Infection par le HIV	R	S	+	+

ACV : aciclovir ; CSH : cellules souches hématopoïétiques ; F : femme ; FOS : foscarnet ; HIV : virus de l'immunodéficience humaine ; H : homme ; HSV-1/2 : virus herpes simplex 1/2 ; R : résistant ; S : sensible ; TK : thymidine kinase ; POL : ADN polymérase.

Les résultats ont été analysés par le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière. Ils ont notamment montré que les tests phénotypiques, malgré leur hétérogénéité, donnaient des résultats concordants. Par ailleurs, ils ont montré l'intérêt d'utiliser des séquences de référence communes pour l'interprétation des tests génotypiques.

2.6 Activités de séquençage NGS

Le CNR dispose d'une plateforme de séquençage proton et illumina sur le site de Limoges, et les laboratoires associés ont accès aux plate-formes de séquence des hopitaux parisiens.

(cf moyens mis à disposition du CNR dans les annexes)

Laboratoire CNR Limoges

- **Le laboratoire a accès en interne à l'ensemble des technologies de séquençage** (S Alain dirige l'UF de génomique du CHU, localisée dans le bâtiment de Biologie du CHU). L'ingénieur bioinformaticien du CNR V. Tilloy travaille dans cette plateforme avec la cellule de bioinformatique de l'Université, localisée dans le même bâtiment, et sera disponible pour travailler avec les autres laboratoires CNR si nécessaire.
- **Technologie/matériel** de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès : Proton Illumina, Minions Pour le séquençage Sanger deux séquenceurs 16 capillaire (Life technologies) dont l'un marqué CE pour le diagnostic et pour le séquençage NGS un Proton et un MiSeq associés à deux préparateurs de bibliothèques (Biomek, Beckman et Library builder , Life technologies). A cela s'ajoute un Next Seq Illumina localisé à la Faculté des Sciences mais dépendant de la plateforme de génomique.
- Les génomes entiers et les génotypes de résistance sont séquencés avec la technologie Proton. La technologie Minion (Oxford Technology) est utilisée pour contrôler les consensus obtenus par reséquençage, ou pour contrôler les Bacmides, et pour identifier la localisation de mutations multiples sur le même gène (en cours de développement).
- Collaboration en cours Limoges-Necker pour développer une méthode de capture en technologie Illumina du génome CMV en 2018 sur les échantillons positifs pour le CMV des enfants nés infectés et répliquant le CMV à la naissance après traitement par valacyclovir in utero du protocole Cymeval, pour rechercher la présence ou l'absence de résistance aux antiviraux. (20 urines de nouveau-né transférées de Necker à Limoges pour analyse)
- Travail sur la variabilité du CMV en cours à Limoges, travail sur l'intérêt du NGS pour la détection précoce ou plus sensible des résistances (Limoges, CMV, Pitié, VZV). Cf publications et communications)
- **Expertise bio-informatique : En interne (V Tilloy, ingénieur CNR)** utilisation d'un cluster de calcul (Cali2, Université de Limoges) Outils utilisés : outils open source (bwa, samtools, bamtools, bedtools, printseq, Mira, Canu, igvtools, poretools, porechop, blast, megacc, iqtree et figtree)
- Pour le génome CMV complet et pour l'analyse des génotypes UL97, UL54, UL56 : outil « maison » mis au

- point par V Tilloy (pipeline de filtre et conversion de vcf (codé perl))
- **Analyses bio-informatiques conduites en interne :**
- Principalement détection de mutations d'intérêt (alignement contre référence, variant calling puis sélection de variants selon différents critères) et analyse de génomes entiers (construction d'assemblages de novo et de consensus pour reconstituer le génome entier d'HCMV)
- Secondairement : analyse phylogénétique
- **Applications :**
- **Santé publique** Surveillance des infections congénitales responsables d'atteinte neurologique
- **Epidémies : pas d'épidémie mais intérêt en cas de** transmission de souches de CMV, d'HSV ou de VZV
- **Surveillance :**
 - NGS (Proton, Life technologies):
 - CMV génotype de résistance 42 UL97 + 42 UL54
 - **CMV génome entier (250KPB) : 24 souches dont Toledo, Merlin, et 22 isolats + 3 Bacmides CMV**
 - Minions (Oxford technology) : 1 génome CMV et un Bacmide CMV

Modalités de sélection des souches pour séquençage : échantillonnage

- Séquence de génome complet (à partir de souche en culture) des souches d'infection congénitale
- Des génomes complets des souches associées à des infections graves (culture ou collaboration avec la CIBU de l'Institut Pasteur-V Caro)
- Pour les génotypes de résistance, séquence d'échantillons séquentiels de patients résistants pour déterminer le moment d'émergence de la résistance et séquence d'échantillons spécifiques de patients non répondeurs sans détection de résistance en Sanger

Dépôt en cours des séquences complètes dans les bases de données publiques

Conservation des séquences de recherche de résistance et de génomes complets dans la base de données du CNR.

Pour les génotypes de résistance : en Sanger format Fasta, en NGS conservation des fichiers BAM

Pour les génomes entiers conservation des données brutes et des fichiers Bam

Sécurisation : Conservation de toutes les séquences sur un NAS spécifique dédié à la plateforme de génomique, hébergé et sécurisé par les services informatiques du CHU. Conservation en double des séquences analysées sur disque dur au laboratoire CNR. Pour les données de recherche, conservation sur le serveur Cabi de L'Université de Limoges et sur un serveur de 20 terra octets au sein de l'UMR1092.

Nombre de séquences conservées depuis 2006 :

UL97, UL27, UL54, UL56, gB, gH, gN du CMV : Sanger 5162, NGS : 112

En 2018 :

NGS :

CMV génotype de résistance 10 UL97 + 10 UL54 + 5 UL56

CMV génome entier : 6 souches + mélanges de Bacmides CMV pour optimisation des Minions

Dépôt des séquences Sanger comportant de nouvelles mutations dans la GenBank. (Pas de nouveau dépôt en 2018)

Laboratoire associé Pitié Salpêtrière

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Christophe Rodriguez (Service de Virologie, Hôpital Henri Mondor, Créteil), nous effectuons différentes études en utilisant la technologie NGS (MiSeq® Illumina) :

- Séquençage NGS ciblé pour la résistance des HSV aux antiviraux : une publication est actuellement en cours de soumission
- Etude transcriptomique (virale et cellulaire) au niveau de différents types de prélèvements biologiques positifs pour HSV-1, HSV-2, et VZV

Nous poursuivons notre collaboration avec le Dr Sébastien Calvignac-Spencer (Institut Robert Koch, Berlin, Allemagne) dans le cadre d'études épidémiologiques et phylogénétiques des HSV par une approche de séquençage du génome entier par NGS (MiSeq® Illumina).

3. Activités de surveillance

Les activités de surveillance du CNR herpès virus recouvrent plusieurs champs : les points forts 2018 sont :

La surveillance des infections congénitales à CMV : Augmentation de la déclaration sur base de données informatisée et point sur la prise en charge des nouveaux-nés infectés en France

La surveillance des résistances des herpès virus aux antiviraux : poursuite de la surveillance annuelle et bilan des résistances CMV, HSV et VZV au niveau national et premiers résultats de surveillance des nouvelles molécules anti CMV en ATU

3.1 Description du réseau de partenaires

3.1.1 Infection congénitale à CMV

Les déclarations sont centralisées par le laboratoire CNR de Limoges depuis 2016 (Ingénieur responsable de la base Elodie Ribot).

On note en 2018 un élargissement net du réseau de partenaires avec plus de 50 médecins déclarants sur la plateforme de déclaration en ligne.

Pour la surveillance des infections materno-fœtales en 2018 (infections néonatales à HSV, infections congénitales à CMV), le réseau de partenaire était composé de 43 CPDPN/obstétriciens, 50 laboratoires, 52 pédiatres et autres spécialités (pour le suivi de l'enfant), réparties dans 41 villes recouvrant les 12 régions de la France métropolitaine et 5 départements d'outre mer.

Evolution du réseau de partenaires pour la surveillance des infections néonatales à HSV et des infections congénitales à CMV		
Année	2017	2018
Laboratoires	37	43
CPDPN / Obstétriciens	35	50
Pédiatres	20	52
Médecins ayant un accès à la plateforme Voozano (déclaration en ligne / CMV congénital)	43	68

Au sein de ce réseau, 68 médecins ont un accès à la plateforme de déclaration en ligne des infections congénitales à CMV, ce qui représente 25 de plus par rapport à l'année 2017.

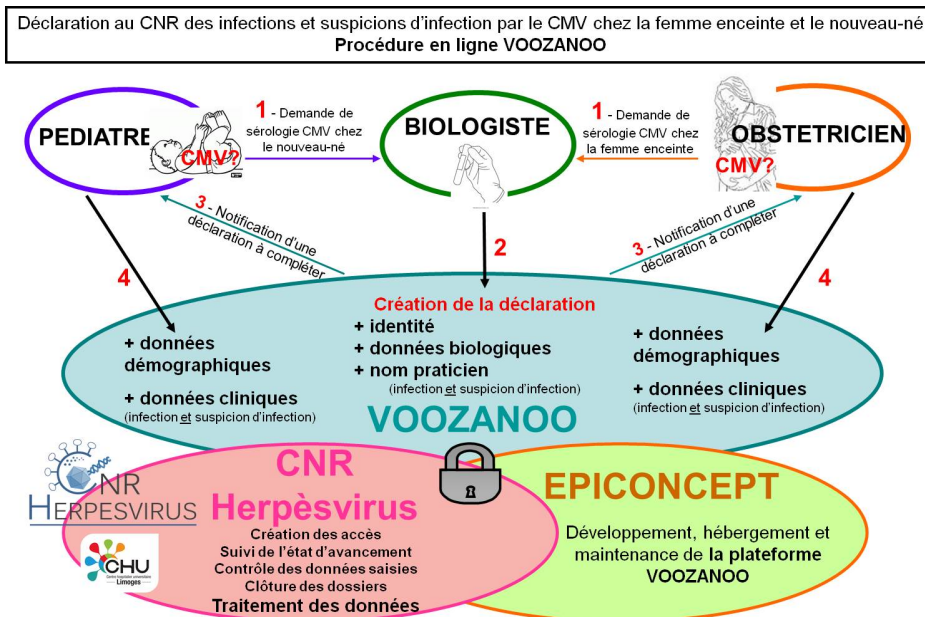
Cf annexe: Réseaux de surveillance : Réseau de partenaires pour le recueil de déclarations et de souches pour les infections materno-fœtales

Cf annexe : Réseaux de surveillance : Réseau de partenaires pour la déclaration en ligne des cas d'infection congénitale à CMV (plateforme Voozano)

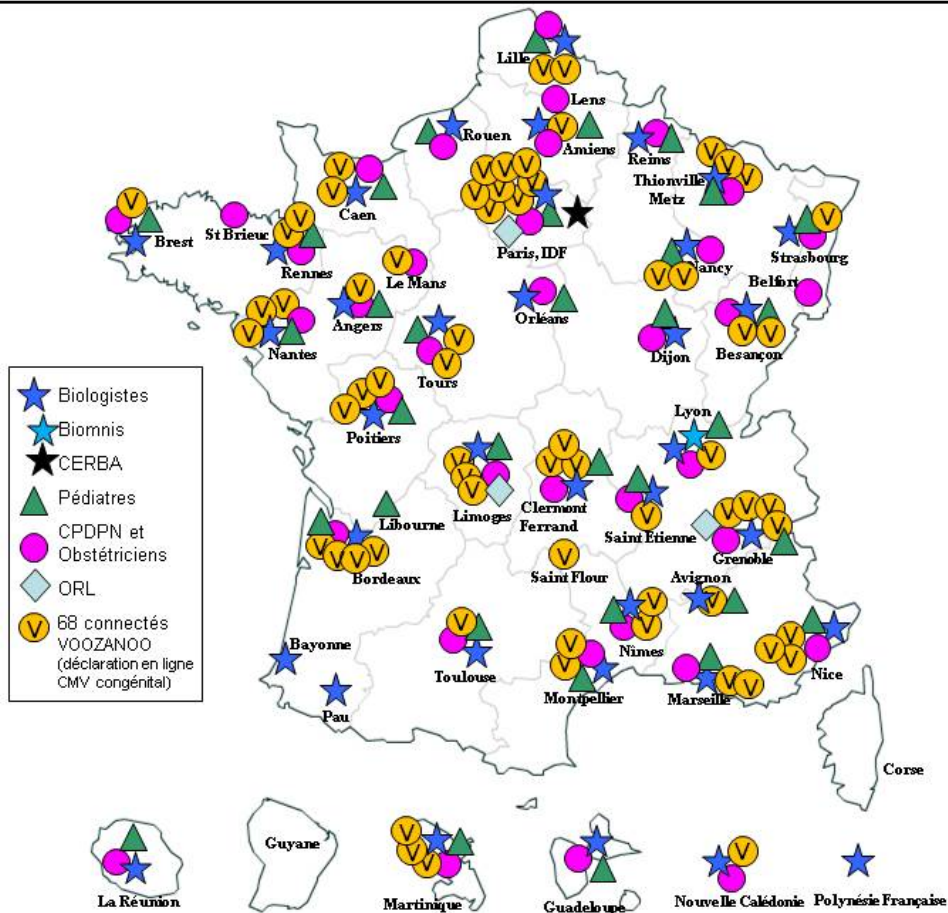
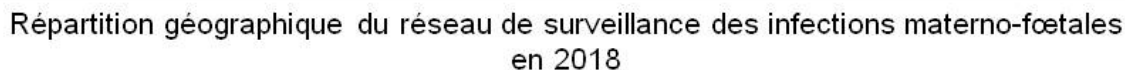
Cf site internet de « la Fédération Française des Centres Pluridisciplinaires de Diagnostic Prénatal » : <http://www.cpdpn.fr/>

La base CMV congénitale est une base de données nationale utilisant le logiciel VOOZANO, par le laboratoire coordonnateur au CHU de Limoges. Elle est opérationnelle et autorise des développements vers des bases

d'imagerie notamment échographique ou RMN permettant également aux praticiens de confronter leurs cas cliniques aux cas déjà identifiés. Cette base a reçu l'autorisation du CCTIRC et de la CNIL le 24 Novembre 2015. Le questionnaire en format texte est présenté en annexe.



Répartition géographique du réseau en 2018 :



Cf annexe 3.1 : Réseau de partenaires pour le recueil de déclarations et de souches pour les infections materno-fœtales

Cf site internet de « la Fédération Française des Centres Pluridisciplinaires de Diagnostic Prénatal » : <http://www.cpdpn.fr/>

3.1.2 Infections néonatales à HSV

Les déclarations sont centralisées au laboratoire CNR de Limoges (Ingénieur responsable de la base Elodie Loum).

A partir du même réseau de virologues, et avec le soutien des pédiatres de maternités le laboratoire CNR de Limoges a mis en place, à la demande du comité des CNRs une surveillance des cas d'infections néonatales dès 2011. La fiche de recueil a été revue avec le laboratoire associé de la Pitié salpêtrière pour les déclarations 2017 et 2018.

3.1.3 Infections à CMV chez l'immunocompétent

Pas de modification en 2018

Afin de compléter les données épidémiologiques sur l'infection à CMV, Le laboratoire CNR a mis en place un relevé complémentaire dédié à la surveillance des primo-infections de l'adulte, sur déclaration remplie par les biologistes réalisant le diagnostic, et recueil de sérum alimentant la biothèque, voire de souches lorsque cela est possible. La fiche de déclaration permet de détailler la symptomatologie clinique et biologique accompagnant ces primo-infections. Ce relevé des primo-infections est basé sur les analyses de l'avidité des IgG CMV, adressées par des laboratoires de biologie médicale privés ou hospitaliers ou pour avis spécialisé, ou dans le cadre de l'activité de diagnostic de l'infection à CMV du laboratoire de virologie.

3.1.4 Surveillance de la résistance des herpès virus aux antiviraux

Les réseaux n'ont pas été modifiés en 2018

Réseau CMV

Basée sur les facilités de transport, cette organisation permet un retour rapide des résultats et optimise les coûts du transport des échantillons. Le laboratoire coordonnateur de Limoges centralise la majorité des recherches, notamment toutes les recherches des centres de province et de région Parisienne hors AP-HP qui ne pratiquent pas la recherche de résistance (à quelques exceptions près pour des raisons organisationnelles). Le laboratoire de la Pitié-Salpêtrière reçoit toutes les demandes des centres de l'AP-HP pour lesquels un système de transport interne à l'AP-HP est organisé. Les laboratoires de l'Hôpital Saint-Louis, Paris, et du CHU de Nantes réalisent eux-même les recherches pour leur centre hospitalier et nous les déclarent annuellement. Le réseau couvre donc la totalité des CHU et CH français avec 48 centres correspondants ou déclarants (cf carte paragraphe 3.3). Le CNR de Limoges reçoit également des demandes de génotypages du CH de Genève. Les déclarations sont centralisées au laboratoire coordonnateur de Limoges.

Réseau HSV

Réseau de surveillance de la résistance des HSV aux antiviraux

Au niveau national en 2018, 4 centres ont effectué la recherche de la résistance génotypique et/ou phénotypique des HSV-1 et HSV-2 aux antiviraux : le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière (CNR associé Herpèsvirus), le laboratoire de Virologie de Lyon, le laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Saint-Louis (Paris) et le laboratoire de Microbiologie de Limoges (CNR coordonnateur Herpèsvirus).

Réseau de surveillance de la résistance du VZV aux antiviraux

Au niveau national en 2018, seul le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière (CNR associé Herpèsvirus) a reçu des recherches de résistance génotypique du VZV aux antiviraux

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1 Surveillance des infections congénitales à CMV

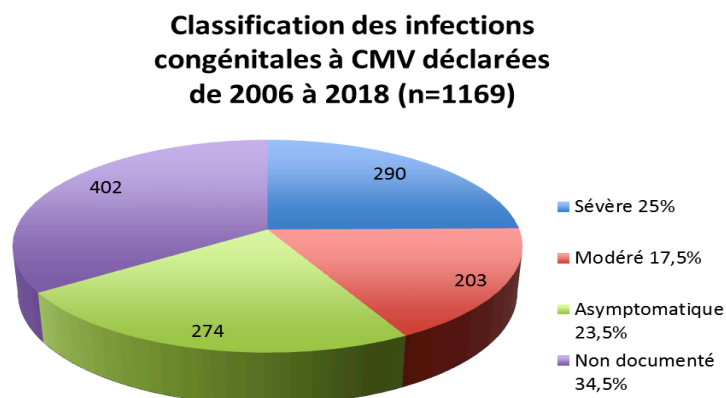
Fin 2016, a été instaurée la déclaration en ligne sur la Plateforme Voozanoo™ (Epiconcept). Les données maternelles, fœtales et néonatales sont collectées directement sur ce site. La transition vers ce mode de déclaration est encourageante.

Tous les cas ont été saisis dans cette base de données, soit par les médecins, soit par le CNR Herpès Virus à partir de fiches papier, tableur Excel ou comptes rendus d'hospitalisation.

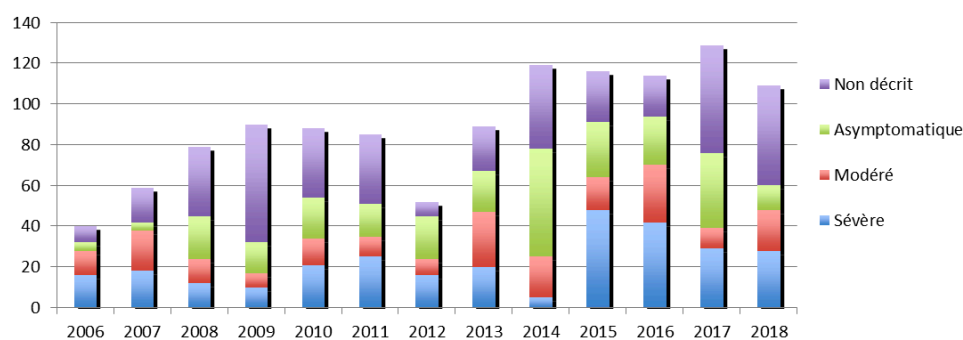
De 2006 à 2018, nous avons recueilli **1169 cas** :

Les cas déclarés ont été classés en fonction des signes cliniques associés

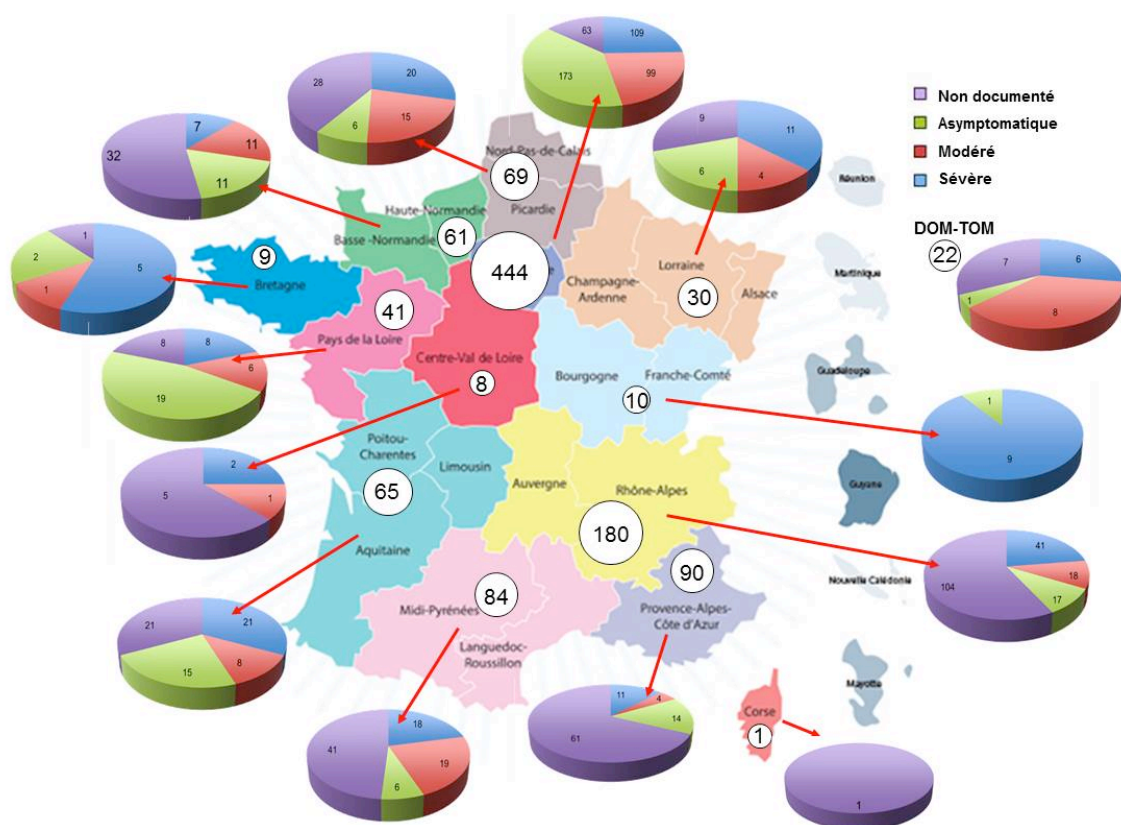
- infections sévères : cas associés à des signes cérébraux
- infections modérées : cas associés à des signes extra-cérébraux
- infections asymptomatiques
- cas non documentés



Nombre de cas d'infection congénitale par le CMV déclarés



Répartition des cas déclarés d'infections congénitales à CMV sur le territoire français de 2007 à 2018



En 2018, 164 fiches de déclaration ont été enregistrées regroupant

- Les infections maternelles
- Les suspicions d'infection maternelle (IgM détectées pendant la grossesse)
- Les infections diagnostiquées en période anténatale
- Les suspicions d'infection en période anténatale (IgM en début de grossesse)
- Les infections des nouveau-nés (déclaration de cas diagnostiqués)
- Les suspicions d'infection des nouveau-nés (RCIU, prématurité suspicion d'infection à CMV ou infection pendant la grossesse, signes échographiques pendant la grossesse)

Toutes ne sont pas complètement renseignées, selon la période à laquelle de diagnostic a été évoqué (difficulté à récolter les données sur la grossesse au moment du diagnostic du nouveau-né, grossesses perdues de vue...) :

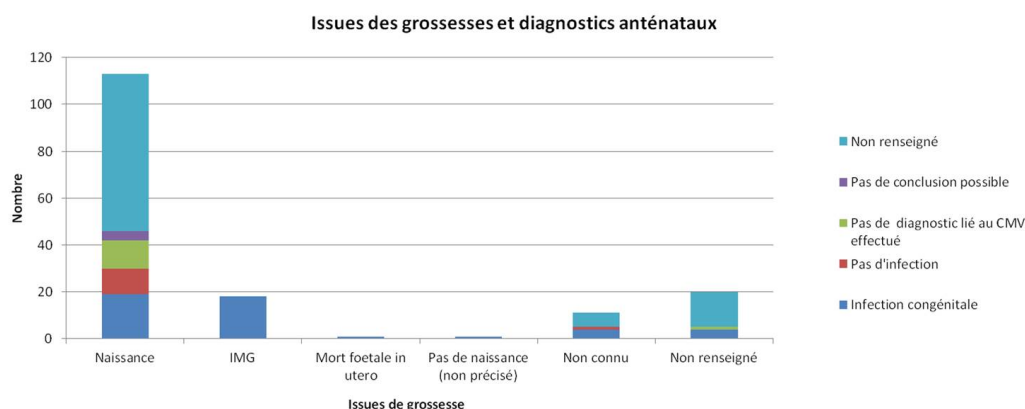
Au total,

45 diagnostics anténataux ont conclu à une infection congénitale par le CMV.

113 naissances ont été répertoriées (dont 19 diagnostics anténataux d'infection congénitale), ainsi que **18 interruptions médicales de grossesse (IMG)**, **1 mort fœtale *in utero* (MFIU)** et 1 absence de naissance dont on ne connaît pas la raison.

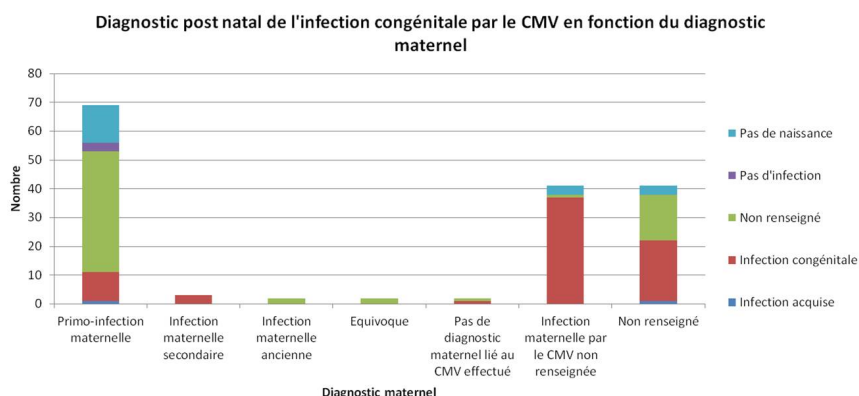
73 diagnostics à la naissance ont conclu à une infection congénitale par le CMV

Nous avons cherché à comprendre l'impact du diagnostic anténatal sur les issues de grossesse :

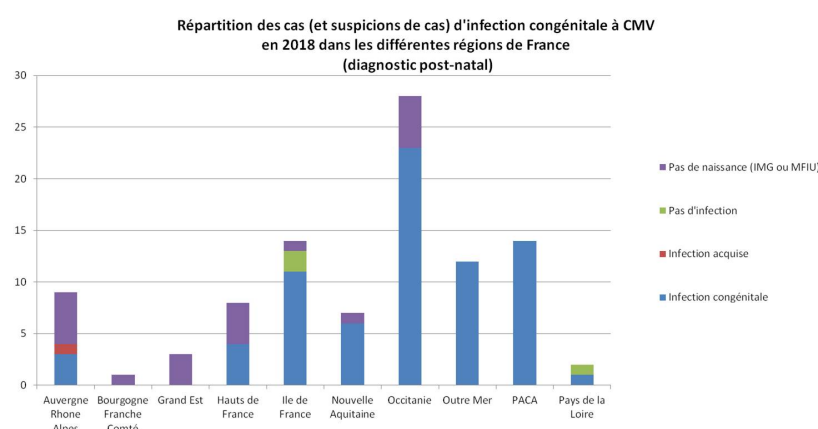


Dans les cas répertoriés, toutes les Interruptions de grossesse étaient liées à des infections congénitales prouvées.

Nous avons également analysé, pour les diagnostics d'infection congénitale évoqués à la naissance quels étaient les diagnostics maternels ayant motivé l'examen :



La répartition des cas dans les différentes régions de France est présentée ci-dessous :



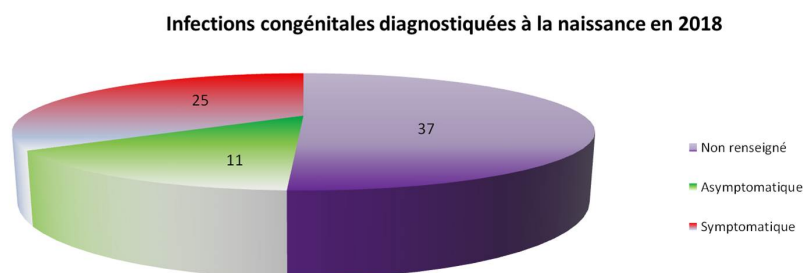
Récapitulatif des cas :

Détail des 109 cas d'infections congénitales prouvées pour 2018 :

Modes de diagnostic :

- 45 diagnostic anténatal
- 73 diagnostic post-natal.

Sur les 73 cas diagnostiqués ou confirmés à la naissance, **11 sont asymptomatiques**, **25 sont symptomatiques**, et 37 sont non documentés.



2 cas d'infection congénitale ont conduit au **décès du nouveau-né** (à 8 jours et 6 jours de vie).

Signes cliniques des cas symptomatiques en 2018 :

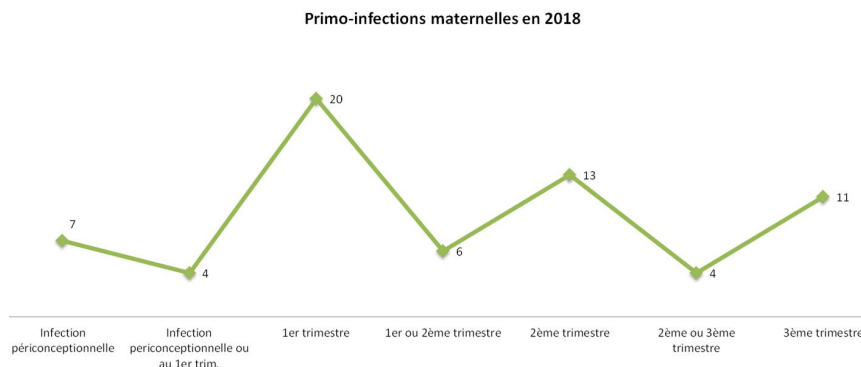
- **2 cas de surdité à la naissance**
- **14 cas de RCIU** (1 cas a conduit à un décès du nouveau-né)
- **7 cas avec d'autres signes cliniques de type :**
Cytolyse hépatique, entérocolite (décès du nouveau-né), neutropénie, anémie, pneumopathie, hyperéchogénicité Vx thalamo-striés...

11 nouveau-nés ont été **traités par un antiviral** (9 par valganciclovir, 2 par ganciclovir) :

- 6 symptomatiques,
- 4 asymptomatiques,
- 1 non document  .

Parmi les cas déclarés nous avons analysé la sous population des primo-infections maternelles:

Nombre total de **primo-infections maternelles** par le CMV en 2018 : **70** (5 dont le trimestre de séroconversion est non document  ).



Sur **66 échographies** réalisées et renseignées, sont recensés :

- 8 cas d'anomalies abdominales
- 17 cas d'anomalies cérébrales
- 22 retards de croissance intra-utérine
- 3 cas d'anomalies du liquide amniotique
- 3 cas d'anomalies du placenta
- 1 cas d'anomalie du thorax

19 IRM ont été effectuées et renseignées, qui retrouvent 6 cas d'anomalies cérébrales.

66 amniocentèses ont été réalisées et renseignées, permettant le diagnostic de **37 infections cong  nitaires** :

- 29 PCR CMV positives
- 8 cultures CMV positives

On voit donc que la grande majorité des primo-infections diagnostiquées conduisent à une amniocentèse y compris pour des anomalies échographiques non spécifiques du CMV.

Etude de pratique concernant la prise en charge des enfants infectés à la naissance :

Fin 2018 une enquête de pratique a été initiée à partir de la base de données du CNR pour mieux identifier les modalités de traitement des nouveaux-nés infectés.

Sachant que les recommandations internationales de traitement pour les enfants symptomatiques ont été

publiées en 2017 (Rawlinson et al., 2017), après la fin de l'enquête nationale Cymepedia. Pour les cas 2017-2018 et 2019 tous les pédiatres sont contactés et les décisions et modalités de traitement ainsi que les complications des traitements sont recensées.

A ce jour 70 cas ont été recensés au total
28 cas traités (11 asymptomatiques, 17 symptomatiques).

Ceci va dans le même sens que les chiffres 2018. Montrant que certains enfants asymptomatiques sont traités. L'analyse approfondie des cas et des critères décisionnels présidant à la mise sous traitement sont en cours.

3.2.2 Surveillance des infections néonatales à Herpes simplex

En 2018, la fréquence se situe aux alentours de 0.18 cas de HSV néonatal déclarés pour 1000 naissances :

Nombre de cas de HSV néonatal déclarés	Nombre de naissances annuel dans les centres concernés
10	55875
Incidence	
0,018%	

Pour l'année 2018, 10 cas d'Herpès néonatal ont été déclarés au CNR Herpèsvirus :

Cas de l'Hôpital Necker Enfants Malades, AP-HP : découverte de l'infection à 4 jours de vie, pour signes cliniques chez l'enfant (lésions vésiculaires paupière gauche). Echantillons positifs HSV1 : peau (charge virale élevée), sang (charge virale à 3.8 log copies/mL). Atteintes viscérales : hépatite (transaminases à 100). Pas de signe neurologique à l'IRM. Mise en place d'un traitement par Aciclovir en intraveineux pendant 21 jours. Récidives à deux reprises d'Herpès cutané au niveau de la paupière à 15 jrs de traitement par l'aciclovir puis à l'âge de 3 mois. Traitement curatif par Zélotrex à chaque récurrence puis traitement d'entretien. Evolution favorable.

Cas du CHU de Lille, en pédiatrie néonatalogie : infection cutanéomuqueuse à HSV1 (gorge), découverte à 3 jours de vie du nourrisson, après recherche systématique en contexte de récurrence chez la mère à 23 semaines d'aménorrhées. Enfant traité par voie intraveineuse à l'aciclovir pendant 14 jours. Evolution favorable, pas d'atteinte hépatique. ETF et fond d'œil normaux à J8, PEA normaux, biologie normale, Cet enfant est issu d'une grossesse gémellaire mono choriale, bi amniotique : prélèvements négatifs chez son frère, non traité.

Sur les 10 cas d'infection néonatale à HSV déclarés, 8 enfants ont été traités par un antiviral, et aucune infection n'a conduit à la mort du nourrisson.

Il s'agit pour chaque cas recensé d'une infection à HSV1.

		Infections cutaneo-muqueuses n=6	Encéphalite herpétique n=0	Infection disséminée à HSV n=3	Données cliniques non renseignées n=1	TOTAL n=10 HSV1 n=10 HSV2 n=0
Antécédents maternels d'herpès	Avant la grossesse	2		1		3
	Primo-infection pendant la grossesse	1				1
	Récurrence pdt la grossesse					0
	Lésions <i>perpartum</i>	1				1
	Aucun	2		1		3
	Non renseigné			1		1
Traitement du nouveau-né	Aciclovir	4		3		7
	Aucun	2				2
	Non renseigné					0
Atteinte viscérale	Oui			2		2
	Non	6		1		7
	Non renseigné					0
Evolution clinique	Evolution favorable	6		3		9
	Décès du nouveau-né					0
	Non renseigné					0

3.2.3 Epidémiologie de l'infection à CMV dans la population générale

Le laboratoire CNR de Limoges collige depuis plusieurs années les cas de primo-infections à CMV qui lui sont déclarés ou pour lesquels il est sollicité pour un conseil pour en surveiller la présentation clinique, notamment chez l'adulte.

Afin de compléter les données épidémiologiques sur l'infection à CMV, Le laboratoire CNR a mis en place un relevé complémentaire dédié à la surveillance des primo-infections de l'adulte, avec fiche de déclaration remplie par les biologistes réalisant le diagnostic, et recueil de sérum alimentant la biothèque, voire de souches lorsque cela est possible. La fiche de déclaration permet de détailler la symptomatologie clinique et biologique accompagnant ces primo-infections.

Ce relevé des primo-infections est basé sur les analyses de l'avidité des IgG CMV, adressées par des laboratoires de biologie médicale privés ou hospitaliers ou pour avis spécialisé, ou dans le cadre de l'activité de diagnostic de l'infection à CMV.

Le bilan des primo-infections de l'année 2018 est le suivant : 22 cas diagnostiqués. Parmi eux, 6 cas n'ont pas été renseignés (demandes isolées d'avidité CMV). Le sexe ratio est de 21 femmes pour 1 homme. 15 cas sont des infections survenant en cours de grossesse.

Concernant la symptomatologie observée, aucun tableau particulier n'a été relevé en 2018 avec moins de formes symptomatiques que les années précédentes parmi les cas diagnostiqués au CNR. Les circonstances de découvertes sont très variables : bilans de fièvre isolée ou avec syndrome pseudo-grippal, bilan d'altération de l'état général, hépato-splénomégalie, ou anomalies échographiques en cours de grossesse.

Parmi les primo-infections en cours de grossesse, la plupart des cas ont été diagnostiqué à partir de bilans réalisés de façon systématique ou pour des contages connus avec un individu infecté par le CMV. Deux patientes ont eu un bilan dans un contexte de signes cliniques (fièvre ou asthénie). Pour 6 grossesses, l'évolution n'est pas disponible. Cinq grossesses sont encore en cours sans signe échographique d'infection congénitale. Deux patientes ont été perdues de vue après le diagnostic de primo-infection (aucune anomalie échographique n'était visible au moment du diagnostic). Deux patientes ont accouché d'un enfant avec une virurie négative.

3.2.4 Surveillance des infections graves à HSV

La surveillance des infections graves à HSV, notamment une déclaration commune pour les encéphalites et les infections systémiques se met progressivement en place dans le nouveau CNR avec **un premier bilan national en 2019 par le laboratoire associé de la Pitié**.

3.2.5 Epidémiologie des infections à HHV-6

Les données d'épidémiologies des infections à HHV-6 sont recueillies par par le Dr Pascale BONNAFOUS et le Pr Agnès GAUTHERET-DEJEAN. laboratoire associé Pitié-Salpêtrière. **Les premières données sont ici présentées pour 2018**. Les techniques sont également disponibles à Limoges et les données seront cumulées en 2019.

La surveillance consiste, d'une part, à identifier les formes intégrées du HHV-6 (iciHHV-6) par quantification de la charge virale principalement dans les follicules pileux et les ongles et, d'autre part, à identifier l'espèce de HHV-6 présente, HHV-6A ou HHV-6B, à l'aide de PCR spécifiques d'espèce ou de séquençage nucléotidique.

En 2018, nous avons effectué des recherches d'iciHHV-6 pour 22 patients. En dehors des cheveux et des ongles, plusieurs autres types de prélèvements ont été reçus et analysés (figure 1) :

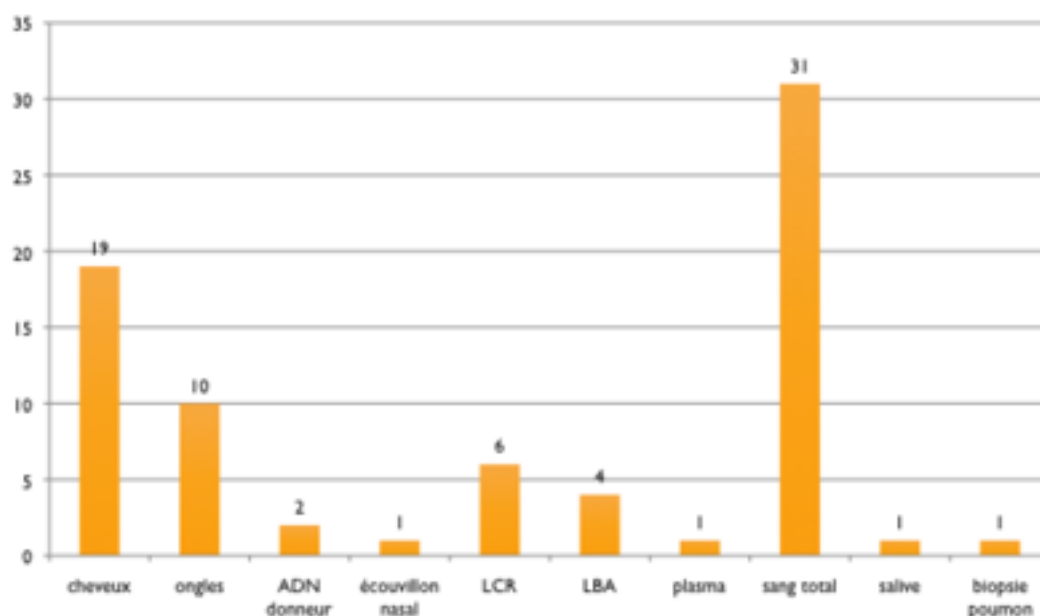


Figure 1 : prélèvements reçus en 2018 pour la recherche d'iciHHV-6

Cette confirmation de la présence d'une forme intégrée chez un patient permet de faire le diagnostic différentiel avec une infection hautement active, ce qui est parfois observé chez des patients greffés de cellules souches hématopoïétiques, et d'éviter d'instaurer un traitement antiviral dont la toxicité est élevée.

Si l'on se concentre sur les cheveux, les ongles, et l'ADN de donneur de cellules souches hématopoïétiques, les iciHHV-6 identifiés ont été les suivants (figure 2) :

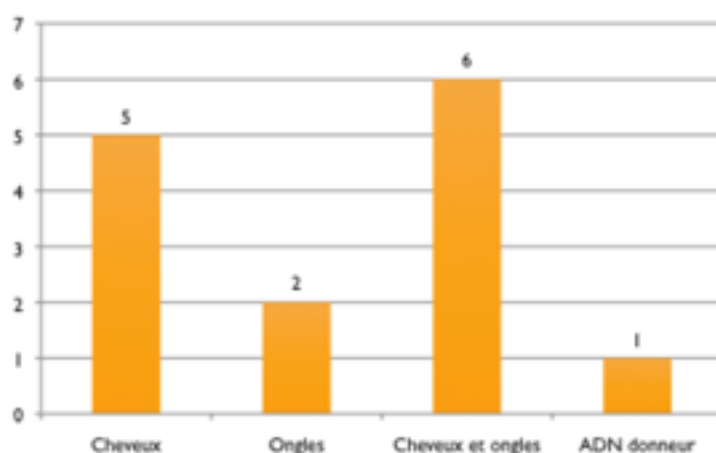


Figure 2 : identification d'iciHHV-6 en 2018

Les espèces de HHV-6 identifiées ont été les suivantes (figure 3) :

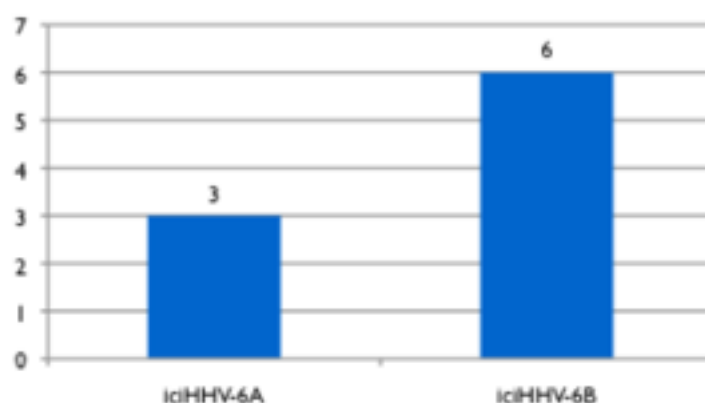


Figure 3 : identification de l'espèce de iciHHV-6

Pour certains prélèvements, la charge virale n'était pas suffisante pour effectuer un typage.

3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

3.3.1 Surveillance de la résistance des CMV aux antiviraux

Définition de l'échantillon de souches testées et définitions utilisées pour exprimer la résistance :

Les échantillons et les souches virales sont adressés au CNR soit directement, après accord téléphonique sur demande du clinicien ou du virologue, soit via la cohorte de surveillance des résistances du CNR, Orphavic, (2012-2018), soit, à la demande de l'ANSM, pour vérification du génotype de résistance avant délivrance de l'ATU pour Cytotect CP®, letermovir ou maribavir.

Critères de recherche de résistance aux antiviraux : Persistance d'une charge virale sanguine détectable après plus de trois semaines de traitement bien conduit et/ou aggravation clinique et/ou augmentation rapide de charge virale et/ou baisse de charge virale inférieure à 0,5 logs par semaine.

A noter les critères adoptés par le groupe résistance lors de la conférence de consensus internationale de 2017 (Kotton et al., Transplantation 2018) ajoutent la notion d'exposition dans les critères pour la recherche de résistance au ganciclovir : « Plus de six semaines d'exposition au ganciclovir et échec thérapeutique après plus

de deux semaines de traitement à dose curative ». Ceci permet, en cas d'exposition préalable par prophylaxie, de réaliser la recherche de résistance une semaine plus tôt.
Ces critères s'ajoutent à nos critères CNR en 2018.

Définition de la résistance génotypique : Présence d'une mutation dont le rôle dans la résistance a été démontré soit par transfert de marqueur soit par production d'un virus recombinant portant la mutation. Les mutations sont classées selon l'augmentation de la Concentration Inhibitrice 50%(CI50) par rapport à la souche de référence testée par l'antivirogramme selon les techniques de référence du CNR (inhibition de la formation de foyers ou inhibition de la production d'ADN viral (cf rapport 2010) ou de la publication.

La liste des mutations avec leur impact sur la CI50 des souches a été revue dans le groupe résistance de la Conférence de consensus en 2017. Nous avons adapté à partir de la publication et de nos données une carte de ces mutations qui sera disponible sur le site du CNR en attendant la finalisation de la base de données interactive.

Définition de la résistance phénotypique et poids des mutations : Les mutations de résistance au ganciclovir dans *UL97* sont classées en bas niveau de résistance et haut niveau de résistance selon l'augmentation de CI50 (<3 bas niveau, possibilité d'augmenter la dose de ganciclovir après dosage plasmatique ; >3 haut niveau de résistance changement de molécule antivirale conseillée.

Nombre de cas de résistance déclarés par année et par pathologie au niveau national

Le nombre de demandes augmente régulièrement non seulement en 2017 du fait d'une augmentation des déclarations (laboratoire de la Pitié nouveau dans le réseau), **mais aussi en 2018**, témoignant d'une augmentation des cas de non réponse au traitement. Le réseau couvre la totalité des CHU français et deux centres en Suisse Lausanne et Genève. Le nombre total de génotypes effectués est de depuis 2006. A noter que cette année nous n'avons pas encore reçu les déclarations de l'hôpital Saint Louis, qui seront ajoutées ultérieurement.

Nous constatons une augmentation des demandes mais aussi un meilleur signalement des mutations nouvelles, qui, selon leur position et leur impact potentiel sur la résistance, sont explorées par le CNR.

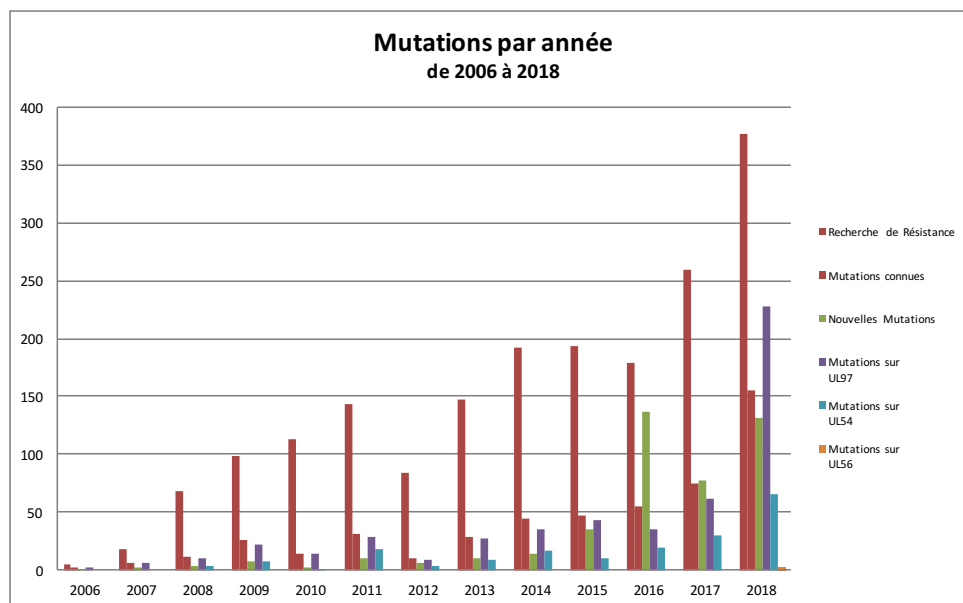
En 2018 au niveau national nous avons colligé à ce jour 423 génotypes de résistance pour 317 patients et 74 patients ont eu un test quantiféron™ CMV

Outre les patients génotypés au CNR, deux laboratoires effectuant les génotypes, Saint Louis (anciennement laboratoire associé au CNR et Nantes) nous ont adressé leurs données. **Le recueil est donc ici exhaustif pour 2018.**

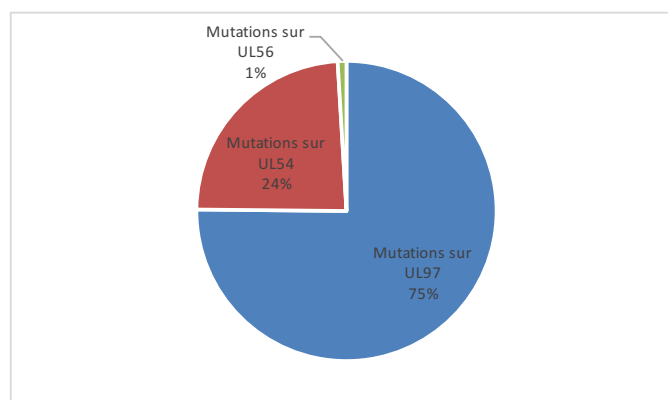
La prévalence nationale de la résistance virologique chez les patients non répondeurs (aussi appelés réfractaires) au traitement pour lesquels un génotype de résistance est demandé est donc de **44%** soit plus du tiers des patients, supérieure à celle observée en 2017 (38%), ce qui peut témoigner d'un meilleur respect des indications du génotype.

Nombre de cas de résistance et gènes en cause :

2018	Nombre de patients	Nombre de recherche de	nombre de quantiférons	Résistants	Mutations sur UL97	Nouvelles mutations sur UL97	Mutations sur UL54	Nouvelles mutations sur UL54	Mutations sur UL27	Nouvelles mutations sur UL27	Mutations sur UL56	Nouvelles mutations sur UL56
Limoges	168	230	72	78	69	16	27	37	0	1	3	0
La Pitié	88	111	0	40	40	24	5	44	0	0	0	0
Nantes	25	35	2	10	9	0	2	0	0	0	0	0
St Louis	36	47	0	13	12	49	10	110	0	0	0	0
Total	317	423	74	141	130	89	44	191	0	1	3	0



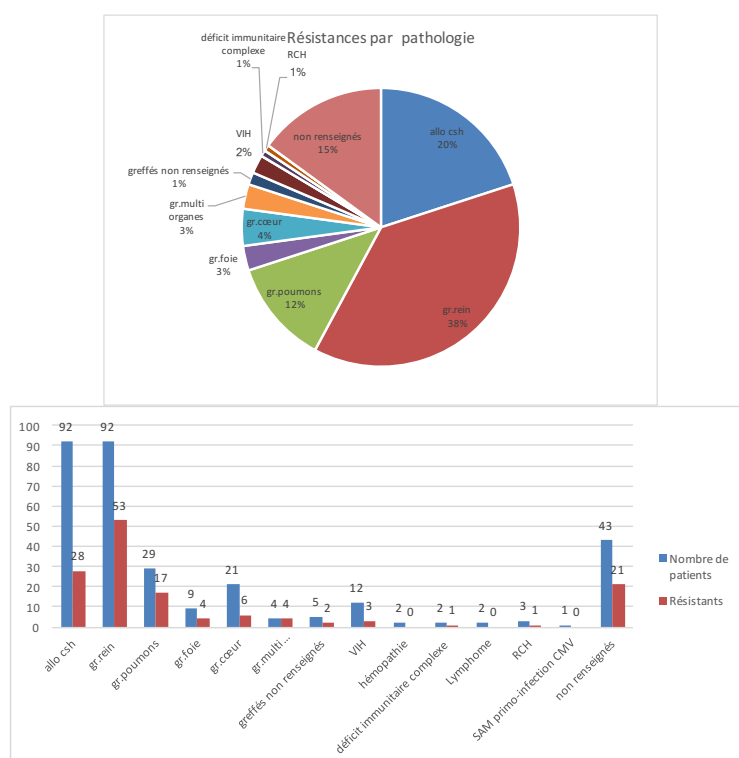
Répartition des mutations



Les mutations sont essentiellement retrouvées dans le gène *UL97* codant la kinase activant le ganciclovir et première ligne de résistance à cette molécule, qui reste la plus utilisée. Cependant **24% des patients portent des mutations dans le gène de la polymérase**, isolées pour certains, conférant des résistances croisées à deux ou trois antiviraux. Ce chiffre est stable par rapport à 2017 (24%). Ceci souligne la nécessité de nouvelles molécules. On remarque quelques mutations de résistance au letermovir (ici 1%) dans le gène *UL56*, correspondant à son utilisation en prophylaxie avec ATU en 2018, à surveiller.

Comme chaque année un pourcentage non négligeable de patients porte des mutations nouvelles dans *UL54* mais aussi dans *UL97*, qui viennent enrichir la base de données du CNR et doivent être testées pour leur impact sur la résistance par la technologie des Bacmides, après vérification de 1) leur apparition sous traitement et 2) leur localisation et leur analyse d'impact sur la structure *in silico* des protéines. Il faut noter le grand nombre de mutations signalées comme nouvelles par deux des laboratoires, qui doit être revu avec l'expertise du CNR pour trier les polymorphismes déjà connus dans sa base.

Nombre de cas de résistance par pathologie :



Cette répartition n'est pas modifiée par rapport à 2017. Pour les patients greffés elle correspond au recrutement en termes de greffes plutôt qu'à la prévalence des résistances par pathologie. Nous pouvons remarquer que d'autres pathologies justifiant des traitements prolongés comme la rectocolite hémorragique peuvent être associées à des résistances, ce qui justifie une surveillance de ces patients sous biothérapies ou immunosuppresseurs de longue durée.

Analyse du rôle des nouvelles mutations par la technologie des *Bacmides CMV recombinants*

Plusieurs nouvelles mutations sont en cours d'analyse par transfert de marqueur avec la technologie des **Ci** dessous les mutations dont l'analyse est finalisée **en 2018** :

Vecteur	Description	GCV CI50	Ratio	CDV CI50	Ratio	FOS CI50	Ratio	Référence				
BAC HCMV AD169	UL54 Del 524	15,7 ± 3,67	3,5	2,5 ± 0,5	9,7	95 ± 32,1	1,06	Hantz et al., 2013				
BAC HCMV AD169	UL54 N408S	14,0 ± 5,25	3,1	2,1 ± 0,8	7,5	92,5 ± 32,1	1,03	Hantz et al., 2013				
BAC HCMV AD169	UL54 D515Y	15,5 ± 5,3	6,2	0,22 ± 0,1	0,87	146,3 ± 23,9	4,7	Andouard et al., 2016				
BAC HCMV AD169	UL54 V787A	9,8 ± 1,4	4,7	0,22 ± 0,1	0,68	205 ± 7,5	3,2	Andouard et al., 2016				
BAC HCMV AD169	UL54 H686Y	2,7 ± 0,9	1,6	0,7 ± 0,2	3,9	85,2 ± 118	2					
BAC HCMV AD169	UL54 R799H											
BAC HCMV AD169	UL54 N710K	2,7 ± 1,9	1,3	0,3 ± 0,1	1,4	88,8 ± 79,1	1,2					
BAC HCMV AD169	UL54 I726T	1,7 ± 0,3	0,7	0,3 ± 0,2	2,6	29 ± 27	0,5					
BAC HCMV AD169	UL54 Y538C	3,2 ± 0,9	1,7	1 ± 0,5	5	101,7 ± 82,5	2					
BAC HCMV AD169	UL54 P747L	1,4 ± 0,7	0,6	0,3 ± 0,2	1,3	58,1 ± 25	2,7					
BAC HCMV AD169	UL54 G698V	4,3 ± 2	1,6	1,7 ± 0,7	2,2	246,5 ± 133	6,6					
Vecteur	Description	GCV CI50	Ratio	CDV CI50	Ratio	FOS CI50	Ratio	MBV CI50	Ratio	Référence		
BAC HCMV AD169	UL97 H393Y	2,8 ± 1,5	1,2	0,4 ± 0,2	1,2	33,9 ± 17,7	1	0,4 ± 0,2	1,3			
BAC HCMV AD169	UL97 N447S	Aucun foyer										
BAC HCMV AD169	UL97 P536T	2,5 ± 1,5	1	0,3 ± 0,2	1,9	29,5 ± 17,5	0,6	0,5 ± 0,1	2,7			
BAC HCMV AD169	UL97 F342Y	7,9 ± 7	2,9	0,14 ± 0,04	0,9	35,8 ± 13,5	1,8	0,2 ± 0,09	1	Alain et al., Workshop CMV 2017		

A noter un Bacmide UL56 C325W en cours pour confirmation d'une mutation déjà décrite dans l'étude de phase III du letermovir identifiée chez un patient de la Pitié Salpêtrière pour publication commune des résultats.

Surveillance des résistances aux antiviraux en ATU

Maribavir et Letermovir ont été mis à disposition des cliniciens en ATU. Le laboratoire CNR de Limoges a participé à l'obtention de l'ATU en relayant et documentant les cas auprès de l'ANSM. Le laboratoire est également centre de référence pour la surveillance des ATU accordées pour les anti CMV et expertise les demandes pour l'ANSM. Ainsi que les échappements virologiques aux antiviraux en ATU. Toute suspicion de résistance doit être documentée par un prélèvement adressé au CNR de Limoges afin de réaliser un génotype de résistance et de faire un bilan global des cas d'échappement. Nous avons ainsi surveillé l'ATU du Maribavir disponible en 2017 et celle du letermovir, disponible en prophylaxie dès décembre 2017. Les premiers résultats montrent une émergence de résistance avec un taux de 3,3% mais doivent être confirmés par l'étude complète de tous les patients.

Les résultats complets seront rendus disponibles en 2019.

Nous avons également surveillé l'efficacité des immunoglobulines en traitement adjuvant chez les patients réfractaires. Les premiers résultats ont été publiés en 2018 chez 23 receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques à très haut risque d'infection à CMV recevant du cytotect^{CP} en prophylaxie secondaire pour une infection à cytomégalovirus réfractaire aux antiviraux (réplication persistant plus de 15 jours sous antiviraux) ; 17 avaient développé une réaction du greffon contre l'hôte. L'efficacité des immunoglobulines a été estimée à 78% sur la réponse virologique à J15 chez ces patients (n= 18/27) et 4 patients ont récidivé leur infection à CMV. Cependant aucune différence significative de mortalité à J100 post greffe n'a été observée. Les résultats ont été publiés en 2018 (Alsuliman et al., 2018). Ces résultats ainsi que l'absence de toxicité notée chez ces patients encouragent l'utilisation du Cytotect^{CP} chez les patients difficiles à traiter. L'analyse des résultats chez les receveurs de rein est en cours.

3.3.2 Surveillance de la résistance de HSV aux antiviraux

Surveillance de la résistance des HSV-1 et HSV-2 aux antiviraux

En 2018, les centres de la Pitié-Salpêtrière, Saint-Louis et Limoges réunis ont reçu 136 prélèvements provenant de 103 patients distincts pour effectuer une recherche de résistance des HSV aux antiviraux. Les caractéristiques de ces patients étaient les suivantes (les données pour le centre de Lyon n'étaient pas disponibles) :

Sexe	
Homme	49
Femme	54
Age médian (années)	
Minimum	2
Maximum	83
Origine géographique	
Paris, Ile-de-France	50
Province	49
Outre-mer	1
Suisse	3

Immunodépression	
Aucune	32
Greffe de CSH	20
Greffe d'organe solide	4
Greffe de cornée	4
Infection par le HIV	15
Hémopathie	8
Pathologie auto-immune	5
Déficit immunitaire primitif	2
Autre	3
Non renseigné	10
Traitements antiviraux	
VACV et/ou ACV	112
FCV	1
GCV	1
FOS	2
VACV et/ou ACV + FCV	1
VACV et/ou ACV + TFT	1
VACV et/ou ACV + FOS	10
Aucun	1
Non renseigné	7
Prélèvements biologiques (n=136)	
Ecouvillon cutanéomuqueux*	47
Ecouvillon ano-génital	40
Ecouvillon cornéen	19
Humeur aqueuse	1
Sang	8
LBA	3
LCS	3
Biopsie	9
Souche virale	6

* hors écouvillons ano-génitaux et cornéens

(V)ACV : (val)aciclovir ; CSH : cellules souches hématopoïétiques ; FCV : famciclovir ; FOS : foscarnet ; GCV : ganciclovir ; HIV : virus de l'immunodéficience humaine ; LBA : liquide broncho-alvéolaire ; LCS : liquide cébrospinal ; TFT : trifluridine

Le bilan des recherches de résistance des HSV aux antiviraux est le suivant :

Non fait ^a	7
Non amplifiable ^b	13
Sensibilité aux antiviraux	50
Résistance à l'ACV seul	45
Résistance à l'ACV et au FOS	2
Indéterminé	19

^a Demande non justifiée ; ^b Charge virale trop faible

Au total, sur les 116 prélèvements/souches de HSV analysés, 47 montaient une résistance, soit 40,5%. Les mutations de résistance identifiées étaient :

Résistance à l'ACV seul (n=45)	
Changement d'acide aminé dans la TK	24
Codon stop dans la TK	11
<i>Frameshift</i> (décalage du cadre de lecture) dans la TK	9
Changement d'acide aminé dans l'ADN polymérase	1

Résistance à l'ACV et au FOS (n=2)	
Changement d'acide aminé dans l'ADN polymérase	1
Changement d'acide aminé dans la TK et dans l'ADN polymérase	1

Au total, 25 nouvelles mutations dans la TK et 17 nouvelles mutations dans l'ADN polymérase ont été identifiées. Grâce à la réalisation, au laboratoire de la Pitié-Salpêtrière, d'un test phénotypique pour certaines souches virales porteuses de nouvelles mutations, nous avons pu caractériser 5 nouvelles mutations de résistance et 6 nouveaux polymorphismes :

Nouvelles mutations de résistance à l'aciclovir dans la TK :

- HSV-1 : G56D, R176K, L217P
- HSV-2 : Y330S

Nouvelle mutation de résistance à l'aciclovir et au foscarnet dans l'ADN polymérase :

- HSV-1 : D907A

Nouveaux polymorphismes naturels dans la TK :

- HSV-1 : R163S, D286E
- HSV-2 : D677N

Nouveaux polymorphismes naturels dans l'ADN polymérase :

- HSV-1 : T62N
- HSV-2 : M910V, I927T

Surveillance de la résistance du VZV aux antiviraux

Le diagnostic de la résistance du VZV aux antiviraux est effectué à la Pitié-Salpêtrière. En 2018, nous avons reçu 27 prélèvements provenant de 21 patients distincts. Les caractéristiques de ces patients étaient les suivantes :

Sexe	
Homme	10
Femme	11
Age médian (années)	
Minimum	5
Maximum	86
Origine géographique	
Paris, Ile-de-France	15
Province	6
Immunodépression	
Aucune	7
Greffe de CSH	5
Greffe d'organe solide	3
Infection par le HIV	2
Pathologie auto-immune	1
Déficit immunitaire primitif	1
Non renseigné	2
Traitements antiviraux	
VACV et/ou ACV	19
VACV et/ou ACV + FOS	5
Non renseigné	3
Prélèvements biologiques (n=27)	
Ecouvillon cutanéomuqueux*	6
Ecouvillon cornéen	2
Humeur aqueuse	9
Larmes	2
Sang	7

* hors écouvillons cornéens

(val)ACV : (val)aciclovir ; CSH : cellules souches hématopoïétiques ; FOS : foscarnet ; HIV : virus de l'immunodéficience humaine ; LCS : liquide cébrospinal.

Le bilan des recherches de résistance du VZV aux antiviraux est le suivant :

Non fait ^a	7
Non amplifiable ^b	4
Sensibilité aux antiviraux	16
Résistance aux antiviraux	0

^a Demande non justifiée ; ^b Charge virale trop faible

En 2018, aucune souche de VZV résistante aux antiviraux n'a été identifiée.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

- **Via les bases de données** : la base de données CMV congénital a été présentée au groupe ECCI pour un développement européen en avril 2016 et au Workshop CMV en avril 2017 ; la traduction est en cours les premiers résultats ont été présentés à l'ECCI 2018 le 15 mai. Elle va être proposée à plusieurs partenaires tels que le Danemark ou l'Allemagne et pourra s'interfacer avec la base européenne pédiatrique en cours de mise en place au Royaume Uni.
- **Via le site internet** : Une base de données interactive pour l'interprétation des résistances du CMV aux antiviraux a été développée par le laboratoire coordonnateur sur le nouveau site internet du CNR CMV elle est en cours de révision et sera accessible à tous les laboratoires consultant le site. Elle permet également un enregistrement des mutations pour lesquelles des recherches sont effectuées et donc un dépistage avancé des nouvelles mutations.
- La base de données HSV néonatale existante sera implémentée en 2018 dans le même système.
- Le Dr M Leruez-Ville Participe au **groupe Européen ECCI** (European congenital Cytomegalovirus Initiative pour la mise en place de collaborations européennes et de recommandations.
- Le Pr S Alain collabore :
 - avec l'**ANSM** pour la surveillance des ATU pour les nouveaux anti-CMV en collaboration avec l'ANSM (avis expert sur le protocole et le choix des solutions antivirales en ATU) Recherche de résistance en cas d'échappement.
 - Avec la **CNAM** dans le cadre de la commission scientifique en charge des propositions de modification de la nomenclature des actes médicaux. A la suite de ses travaux, la PCR HSV, VZV et CMV ont notamment été acceptées en avril 2018 par la Commission de Hiérarchisation et sont en attente de validation par le Ministère.
 - avec le **HCSP** en tant que membre de la commission mise en place pour répondre à la saisine du HCSP sur le dépistage de l'infection congénitale à CMV. Et pour la mise en œuvre des avis du HCSP délivrés en décembre 2018.
- Le Dr Hantz a participé à la commission de la **HAS** chargée d'évaluer la demande d'AMM du letermovir en tant qu'expert virologue.
- Le Pr S Alain collabore avec le **QCMD** (European Quality Control in Molecular Diagnosis) pour la conception et l'analyse des contrôles européens de charge virale dans le sang total et le plasma et de génotype de

résistance CMV

- Le Dr D Boutolleau, collabore avec le **QCMD** pour la conception et analyse des résultats des contrôles de qualité pour la détection/quantification des génomes HSV et VZV et pour la résistance génotypique des HSV aux antiviraux.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3.5.1 Infection congénitale à CMV nouveaux facteurs pronostiques

Laboratoire Necker :

Etude de l'importance du trimestre de l'infection maternelle à CMV pour la survenue des séquelles

Jusqu'à notre étude en 2018, la littérature rapportait que les séquelles liées à l'infection congénitale à CMV survenaient majoritairement après une infection maternelle du 1^{er} trimestre mais qu'environ 10 à 15% des enfants avec séquelles avaient été infectés au 2^{ème} voir au 3^{ème} trimestre (Table 1 ci-dessous).

Table 1 : Etudes ayant étudié l'influence du terme de la primo-infection maternelle sur les séquelles de l'infection dans la littérature

	T1	T2	T3
Pass B et al, 2005, 79 neonates included between 1980-1993			
Any symptoms at birth	8/35 (23%)	5/44 (11%)	
HL at birth	NA	NA	
Long-term any-sequelae	11/34 (32%)	6/40 (15%)	
Long-term HL	8/34 (24%)	1/40 (2.5%)	
Foulon I et al, 2008, 28 neonates included between 1996-2007			
Any symptoms at birth	NA	NA	NA
HL at birth	NA	NA	NA
Long-term any-sequelae	NA	NA	NA
Long-term HL	4/5 (80%)	1/12 (8%)	0/11 (0%)
Gindes et al, 2008, 21 neonates included between 1998-2005			
Any symptoms at birth	0	0	0/21
HL at birth	0	0	0/21
Long-term any sequelae	NA	NA	NA
Long-term HL	NA	NA	NA
Enders G et al, 2011, 74 neonates included between 1990-2010			
Any symptoms at birth	7/20 (35%)	4/28 (14%)	0/26 (0%)
HL at birth	NA	NA	NA
Long-term any sequelae	NA	NA	NA
Long-term HL	NA	NA	NA
Picone et al, 2013, 40 neonates between 2004-2012			
Any symptoms at birth	3/20 (14%)	0/14 (0%)	0/6 (0%)
HL at birth	NA	NA	NA
Long-term any sequelae	NA	NA	NA
Long-term HL	NA	NA	NA
Lipitz et al, 2013, N= 137/ 2004-2012			
Any symptoms at birth	NA	NA	NA
HL at birth	NA	NA	NA
Long-term any sequelae	13/66 (20%)	4/71 (6%)	NA
Long-term HL	10/66 (15%)	1/71 (1%)	NA

NA= not available; HL= hearing loss; T1= first trimester; T2= second trimester; T3= third trimester

Nous avons voulu étudier le lien entre trimestre de survenue de la contamination et gravité de l'infection chez le fœtus dans nos cohortes où les primo-infections maternelles ont été datées prospectivement avec des outils sérologiques plus performants (combinaison de dosage d'IgG, IgM et avidité des IgG) que ceux utilisés dans les études antérieures notamment dans les plus anciennes où les tests d'avidité n'étaient pas encore disponibles. Cette étude a été faite en combinant les cas documentés et datés de primo-infection maternelle dans plusieurs études (CYMEPEDIA, CYMEVAL II et BIOCMV) afin de donner plus de puissance. Nous avons pu ainsi montrer que tous les enfants avec des séquelles avaient été contaminés après une infection maternelle du premier trimestre. Les fœtus infectés après une infection du 2^{ème} ou 3^{ème} trimestre n'avaient aucune séquelle (Table 2).

Table 2 : Séquelles à long terme en fonction de l'âge gestationnel à la primo-infection maternelle

	First trimester (<14 weeks) N=119	Second trimester (≥ 14 and <28 weeks) N=64	Third trimester (≥ 28 weeks) N=32	P(1)	P(2)
Neurologic sequelae*	15 (12.6%)	0	0	0.007	0.041
Hearing loss **	30/108 (27.7%)	0/55 (0%)	0/29 (0%)	$<.0001$	0.003
Any sequelae **	35/108 (32.4%)	0/55 (0%)	0/29 (0%)	$<.0001$	0.001

Data are n (%) or n/N (%) if missing data.

(1) First trimester was compared to second trimester. (2)

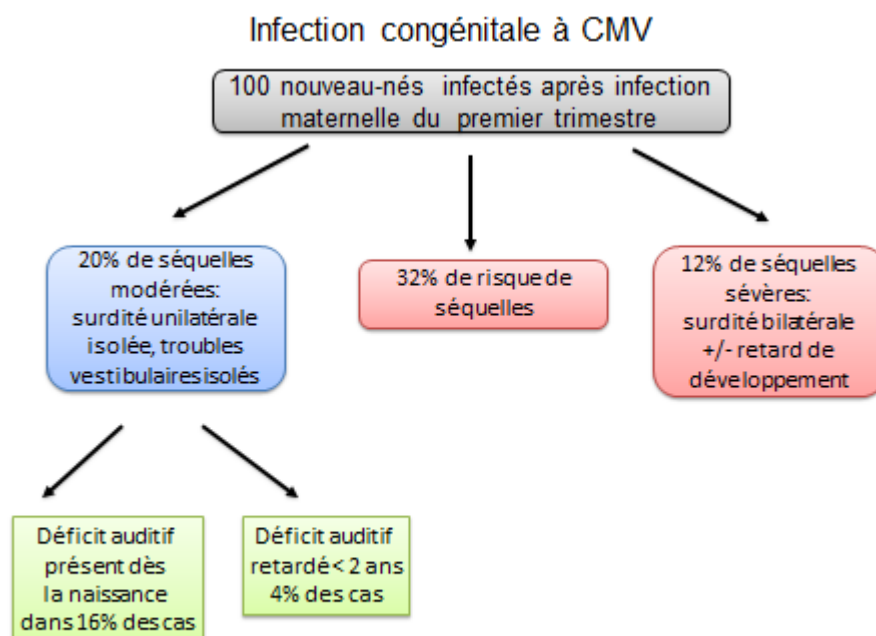
(2) First trimester was compared to third trimester.

*11 with vestibular syndrome, 1 with severe global retardation, 1 with arm monoplegia, 1 with severe autistic presentation, 1 with spastic diplegia

**11, 9 and 3 children had an uninterpretable audiological test at the last visit because of the presence of otitis media in the first trimester group, second trimester group and the third trimester group respectively

Cette étude a un impact très important puisqu'elle permet de revisiter le pronostic des infections. Ainsi alors que classiquement était annoncé un risque d'environ 10% à 15% de séquelles chez les nouveau-nés infectés, ce risque devient nul pour tous les nouveau-nés infectés après une primo-infection maternelle du 2ème ou 3ème trimestre. En revanche, le risque de séquelles est plus important, jusqu'à 30 à 35%, dans le groupe des nouveau-nés infectés après primo-infection maternelle du premier trimestre (Figure 1). Cette étude ne concerne pas les infections maternelles secondaires que l'on ne sait pas dater.

Figure 1 : Séquelles chez les nouveau-nés infectés après une infection maternelle primaire



Ces données ont été publiées en décembre 2018: Sequelae of congenital cytomegalovirus (cCMV) following maternal primary infection are limited to those acquired in the first trimester of pregnancy. **V Faure-Bardon**, JF Magny, M Parodi, S Couderc, P Garcia, AM Maillotte, M Benard, D Pinquier, D Astruc, H Patural, P Pladys, S Parat, B Guillois, A Garenne, L Bussières, **T Guillem  not**, J Stirnemann, I Ghout, Y Ville, **M Leruez-Ville**. *Clin Infect Dis*, 2018 Dec 31. doi: 10.1093/cid/ciy1128.

Etude de du risque d'infection congénitale à CMV chez les femmes séronégatives à leur première grossesse.

Nous avons montré dans une étude précédente que la parité est un facteur de risque majeur de survenue d'une infection congénitale à CMV après primo-infection maternelle. En revanche, dans notre étude ce n'était pas un risque de survenue d'une infection congénitale après infection maternelle non-primaire (Leruez-Ville M et al, Clin Infect Dis, 2017).

Méthode :

Afin de quantifier plus précisément ce risque d'infection congénitale lié à la parité, nous avons fait une recherche dans la base de données du laboratoire. Nous avons retrouvé 21112 sérologies pratiquées à 12 SA entre 2009 et 2018, le croisement de ce fichier avec celui de la maternité nous a permis de repérer une cohorte de femmes enceintes séronégatives à leur première grossesse et ayant eu ensuite au moins une autre grossesse et des résultats de sérologie CMV à chaque grossesse. Au total, 739 femmes séronégatives à leur première grossesse et 971 grossesses de rang 2 et plus (739 femmes ont eu 2 grossesses, 164 ont eu 3 grossesses, 45 ont eu 4 grossesses et 2 plus de 4 grossesses).

Dans notre centre, les sérologies sont faites à 12 SA et parmi les femmes ayant fait une séroconversion entre 2 grossesses, celles qui avaient à 12 SA des IgG positives sans IgM ont été classées comme des primo-infections survenues avant la grossesse en cours. Pour celles qui présentaient une sérologie avec des IgG et des IgM positives, un test d'avidité des IgG a été réalisé. Lorsque ce test d'avidité était élevé la séroconversion a été considérée comme étant survenue avant la grossesse, en revanche lorsque l'avidité était basse ou intermédiaire il a été considéré que la séroconversion était en lien avec une primo-infection survenue pendant le premier trimestre de la grossesse en cours ou en période péri-conceptionnelle de celle-ci. Tous les nouveaux nés des mères ayant eu une primo-infection au premier trimestre ont été testés à la naissance par PCR CMV dans un échantillon de salive.

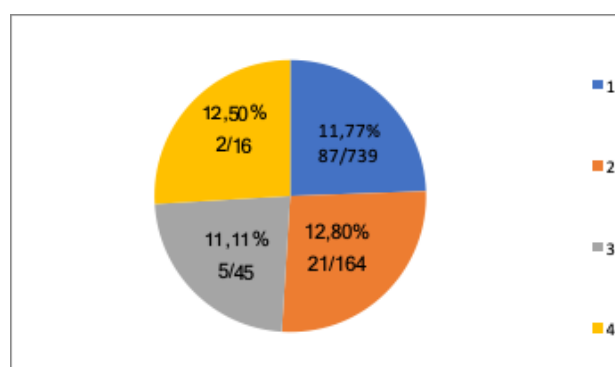
Résultats :

Dans cette cohorte de femmes séronégatives à leur première grossesse et ayant eu au moins 2 grossesses 115 ont sero-converties entre 2 grossesses soit une prévalence de 15% (115/739) dans la population totale de ces femmes et de 12% (115/971) sur l'ensemble des grossesses testées. La fréquence de séroconversion était identique quel que soit le rang de grossesse (Figure 1).

Parmi ces 115 séroconversions, 33 primo-infections ont eu lieu au premier trimestre de la grossesse suivante soit une prévalence de primo-infection au premier trimestre de la grossesse de 3,3% (33/971) et 12 nouveau-nés de ces grossesses avec primo-infection étaient infectés soit une transmission materno-fœtale de 36% (12/33). La prévalence de l'infection congénitale à CMV après primo-infection au premier trimestre est particulièrement élevée 12/971 (1,2%) dans la population des femmes séronégatives à la grossesse précédente, 10 fois plus élevée que dans la population générale des femmes enceintes (11/11713, 0,09%), $p < 0,001$ (Leruez-Ville M, CID, 2017).

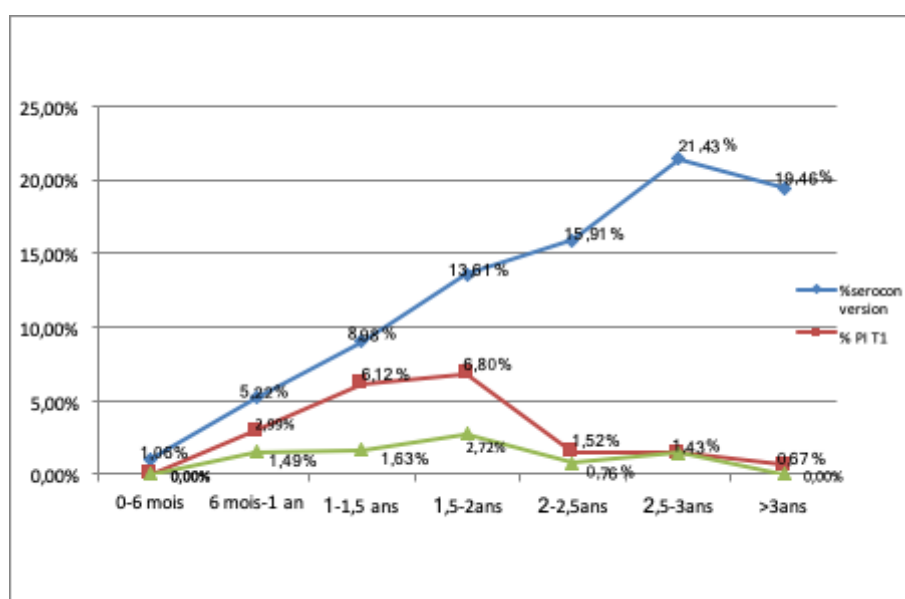
La fréquence de séroconversion, de primo-infection au premier trimestre et d'infection à la naissance a été calculée en fonction de l'intervalle de temps entre 2 grossesses (Figure 2). On peut constater que la prévalence de l'infection congénitale à CMV après primo-infection maternelle au premier trimestre est particulièrement élevée lorsque l'intervalle entre 2 grossesses est compris entre 1 et 2 ans : 2,2% (9/392) soit 20 fois plus élevé que dans la population générale des femmes enceintes, $p < 0,001$.

Figure 1 : Fréquence de la séroconversion en fonction du rang de grossesse



1= séroconversion entre 1^{ère} et 2^{ème} grossesse 2= séroconversion entre 2^{ème} et 3^{ème} grossesse
3= séroconversion entre 3^{ème} et 4^{ème} grossesse 4=séroconversion après 4^{ème} grossesse

Figure 2 : prévalence de la séroconversion de la primo-infection au premier trimestre et de l'infection du nouveau-né suite à une primo-infection maternelle au premier trimestre



Courbe bleue : prévalence de séroconversion entre 2 grossesses (n=115)

Courbe rouge : prévalence de primo-infection entre 2 grossesses (n=33)

Courbe verte : prévalence d'infection du nouveau-né suite à une primo-infection maternelle du premier trimestre

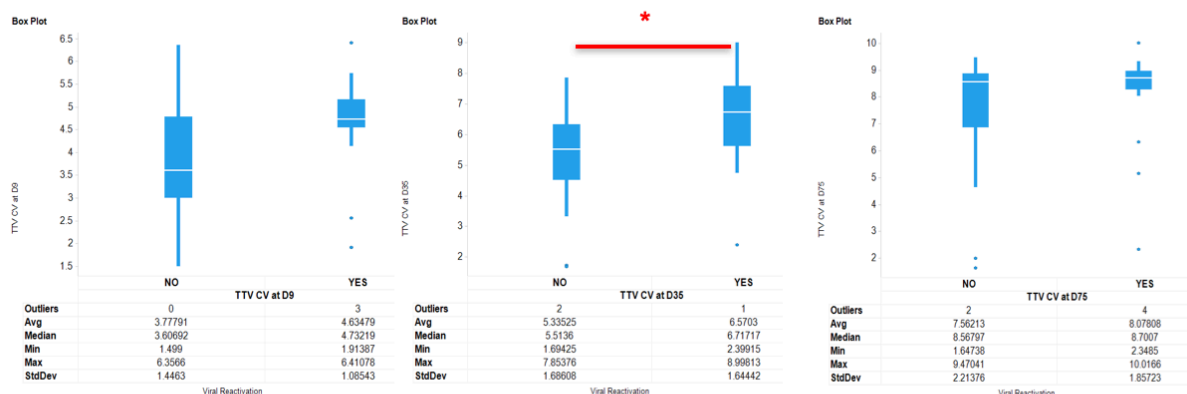
Conclusion : la population des femmes enceintes séronégatives à leur grossesse précédente et qui accouche dans les 2 ans qui suivent leur premier accouchement a un risque 20 fois supérieur d'accoucher d'un nouveau-né infecté par le CMV après une primo-infection maternelle du premier trimestre que la population générale des femmes enceintes (séropositives ou non). En sachant que 30 à 35% de ces nouveau-nés infectés sont à risque de séquelles et que 16 à 20% sont à risque de séquelles sévères.

3.5.2 Nouveaux biomarqueurs immunologiques en transplantation

TTV

Les torquetenovirus sont des virus orphelins, de la famille des anellovirus, dont la séroprévalence est supérieure à 90%, et dont la charge virale fluctue en fonction du degré d'immunosuppression. La question du rôle prédictif de ces fluctuations est posée. Le laboratoire CNR de Limoges a participé à la validation clinique de la mesure de la charge virale TTV Rgene (bioMérieux) chez les patients receveurs de reins à partir de la cohorte de transplantés rénaux de Limoges. **Les résultats ont été publiés en 2018 (Kulifaj et al., J clin Virol 2018).** Nous montrons que la charge virale atteint un plateau environ 75 jours après la greffe. Cette étude, la première publiée chez les greffés rénaux a également montré que la charge virale TTV à la fin du premier mois post greffe était corrélée avec la survenue d'une infection virale, CMV ou autre dans l'année post greffe (données complémentaires non publiées).

- All viral reactivations (>3log) are pooled: 9 CMV, 13 EBV, 1 HHV6 and 2 BK



- At D35, TTV VL is significant different ($p=0.0277$ between reactivating patient and not reactivating patient)
- No significant difference was observed in TTV viral load at d9 ($p=0.052$) or at the peak with respect to viral reactivation (whatever the virus)

(Test de Student $p<0,05$)

Ces résultats ont été confirmés par l'équipe italienne de F Maggi, référent international en matière de TTV, dans une étude de cohorte rétrospective associant receveurs de rein et de foie, et qui précise que **l'augmentation précoce de charge virale de plus de 3,4 logs entre J0 et J10 post greffe est prédictive d'infection à CMV dans les 4 mois** (Maggi et al., Scientific Reports 2018).

Nous disposons donc d'un nouveau marqueur prédictif, à intégrer dans les algorithmes de suivi des patients transplantés, pour en affiner la valeur prédictive positive et négative.

En parallèle, nous avons intégré ce marqueur à l'analyse des données de l'essai QuantiCR+ visant à définir la valeur du test Quantiféron™ chez les patients receveurs de rein séropositifs. La valeur prédictive d'infection à CMV ayant été mesurée et validée cliniquement par deux études interventionnelles il est intéressant de comparer ces deux tests qui sont complémentaires, l'un (TTV) mesurant l'immunité globale, l'autre Quantiféron mesurant la réponse CD8 spécifique du CMV et la réponse T globale aux mitogènes. Cette étude est en cours et sera présentée dans le rapport 2019.

Place du quantiféron CMV dans l'évaluation immunologique des patients résistants

Nous avons analysé de façon rétrospective tous les patients receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques ou d'organes solides pour lesquels un génotype de résistance a été effectué au CNR de Limoges et pour lesquels un test Quantiféron™ CMV a été prescrit moins d'un mois avant ou après le génotype

de résistance. Ceci entre 2015 et 2018. Nous avons classé les patients en « résistants, porteurs d'une ou plusieurs mutations de résistance » ou non résistants (pas de mutation détectée) et analysé les résultats du test Quantiféron™ CMV, et lorsque ces données étaient disponibles, l'évolution des patients. 49 patients ont été ainsi analysés ; 11 patients avaient eu plusieurs tests Quantiféron™ CMV. Les réponses aux antigènes du CMV (seuil 0,2 UI/mL d'interféron dans le plasma après stimulation) et au mitogène ont été analysées. En restreignant l'analyse aux 25 receveurs de reins, population plus homogène, la réponse globale CD8 était significativement plus élevée que la réponse spécifique dans le groupe résistant ($p=0,060$), et la différence était non significative chez les patients non résistants ($p=0,342$) (Test de Fischer). Ceci témoigne de la présence de deux catégories de patients ayant un profil immunologique différent, justifiant une prise en charge différente.

L'évolution immédiate était disponible pour les 43 patients et sur le long terme pour 11 patients :

Sur 11 patients ayant > 2 mesures consécutives, la résolution de l'infection s'accompagne d'une amélioration de la réponse immunitaire, et la persistance d'une absence de réponse est plus fréquemment associée à un défaut de réponse immunitaire. Ces données sont à compléter avec la prise en charge des patients.

Conclusion : Le test Quantiféron™ CMV peut être utile dans la prise en charge des patients au moment de la recherche de résistance et pourrait permettre d'identifier les patients pour lesquels une thérapie adjuvante (immunoglobulines hyperimmunes ou changement d'immunosuppresseurs pour une molécule à effet anti CMV pourrait être bénéfique). Nous allons donc recommander un test Quantiféron™ CMV ou un équivalent (Elispot) en parallèle du génotype, à répéter le mois suivant, et réévaluer le bénéfice de cette pratique à un an.

Ces résultats ont été présentés au congrès de la RICAI en décembre 2018 (François et al., RICAI 2018) en communication orale et sont en cours de rédaction pour publication.

3.5.3 Cohorte de surveillance des non-réponses aux antiviraux (ORPhaViC PHRCN 2010)

Rappel des objectifs : *Objectif principal :* évaluer l'incidence de la résistance (non réponse au traitement) du cytomégalovirus après transplantation d'organe solide ou greffe de cellules souches hématopoïétiques.

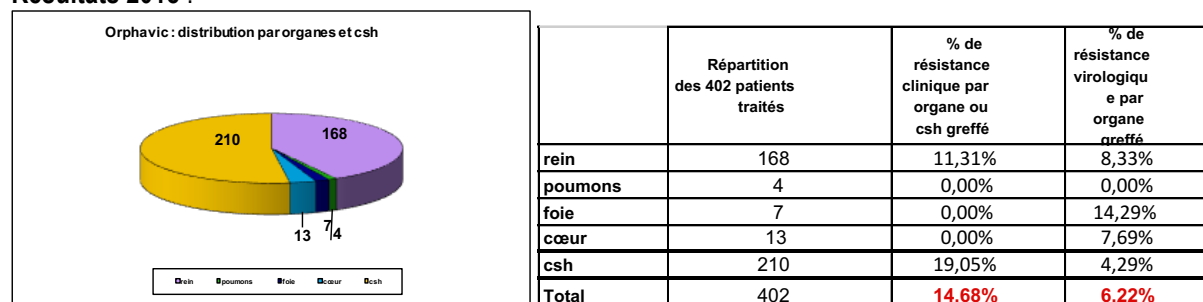
Objectifs secondaires :

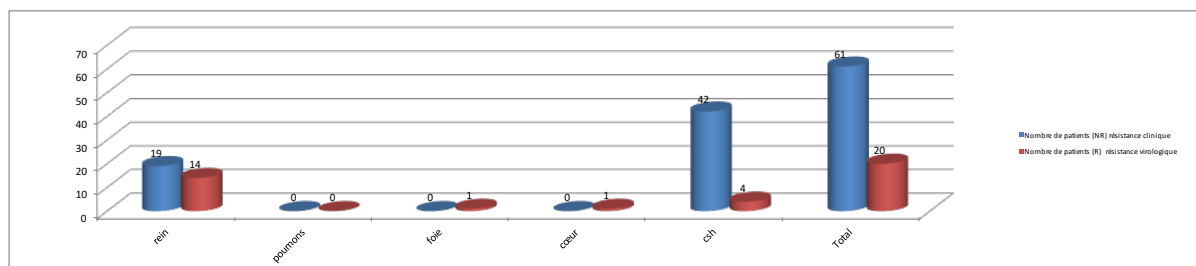
- Déterminer l'incidence respective des résistances d'origine virologique et des résistances d'origine pharmacologique
- Étudier les mutations de résistance (mutation déjà connues pour conférer une résistance) et les nouvelles mutations associées à une résistance virologique
- Étudier la cinétique d'émergence des souches résistantes
- Analyser la morbi-mortalité liée à la résistance clinique, virologique ou pharmacologique
- Post amendement 2015 : étudier également les causes immunologiques de la non-réponse.

Inclusions : fin des inclusions en janvier 2017 ; 402 patients inclus suivis jusqu'à 2 ans post greffe soit au 31 mai 2018.

Analyses pharmacologiques en cours. Rapatriement de l'ensemble des prélèvements pour détermination en NGS du moment d'émergence de la résistance aux antiviraux chez les patients résistants effectué. Gel de la base de données en cours.

Résultats 2018 :



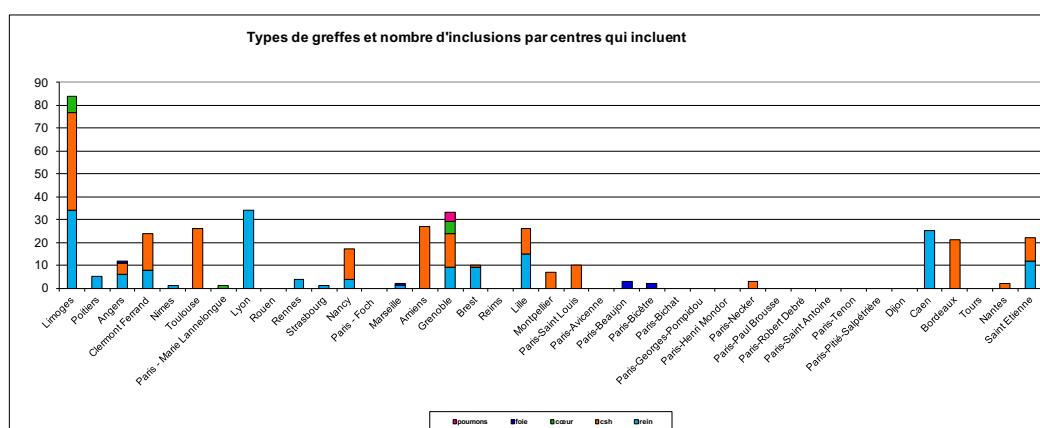


Les résultats de cette cohorte prospective confirment les analyses précédentes tout en précisant la fréquence des résistances dans la population des receveurs de cellules souches allogéniques. (Ces chiffres sont proches des 3,1% retrouvés dans la cohorte 2006-2010). Chez ces patients, dans deux cas sur 3 les patients non répondeurs ne présentent pas de mutation (résistance clinique). D'autres facteurs doivent donc être pris en compte, incluant la présence d'une GVH ou une très faible reconstitution immunologique, facteurs qui seront analysés dès le gel de la base de données.

Le chiffre nul en transplantation pulmonaire est lié au faible recrutement dans la cohorte. Il contraste avec les demandes de recherche de résistance et leurs résultats ci-dessus.

En foie comme en cœur, les effectifs de patients sont faibles et doivent être interprétés avec prudence, les résultats de surveillance rapportés au nombre de greffes sont probablement moins biaisés.

Il faut noter dans cette cohorte la très faible participation des centres parisiens qui n'ont pas inclus de patients dans la cohorte à l'exception de Saint Louis (10), Beaujon (3), Bicêtre (2) et Necker (3).



3.5.4 Epidémiologie et transmission du CMV

Séroprévalence de l'infection à cytomégalovirus en métropole et dans les départements d'outre-mer Comparaison entre la population Française et roumaine

Laboratoire CNR Limoges

L'étude de séroprévalence décrite dans le rapport 2018 a été complétée par l'analyse statistique et les résultats de séroprévalence comparée par tranche d'âge dans la population roumaine. Les résultats ont été communiqués en poster au 19ème Workshop CMV, Avril 2019, Birmingham USA, La publication est en cours de rédaction.

Les résultats de cette étude confirment les données de séroprévalence sur le territoire métropolitain et une grande différence avec les départements d'outre-mer. Elle met en évidence la nécessité de mettre en place de larges études prospectives dans les départements d'outre-mer devant la particularité de chaque territoire, et d'adapter à ces départements l'information donnée aux femmes enceintes afin de mieux prévenir les primo-

infections chez les quelques femmes séronégatives, mais aussi les réinfections. La différence en termes de séroprévalence et d'âge d'acquisition de l'infection en Roumanie, souligne les différences possibles entre deux pays d'Europe et la nécessité d'adapter les conseils d'hygiène aux différents contextes.



CONCLUSION

Etude TransfeCMV (NCT02694484) Capacité du CMV à être transmis lors d'une transplantation fécale.

Laboratoire CNR Limoges

Etude en collaboration avec l'ANSM et le CHU de Lille. Recherche du CMV par PCR dans les selles de 250 volontaires sains rentrant dans les critères de sélection des donneurs de selles pour transplantation. Recherche de virus infectieux par culture sur les selles des donneurs positifs en PCR. Identification des primo-infections éventuelles, et recherche du virus dans le sang total pour valider ou infirmer la valeur de la PCR dans le sang comme marqueur potentiel de transmission. Etude terminée fin 2017, bases gelées, analyses statistiques en cours. De cette étude nous pouvons d'ores et déjà retirer la séroprévalence du CMV chez les volontaires sains en Limousin : 37%. **En 2018 l'ensemble des selles a été analysé et aucune selle n'a été retrouvée positive pour la détection du génome du CMV par PCR. S'il ne permet pas de l'exclure de façon absolue, Ce résultat encourageant n'est pas en faveur d'une transmission par le transfert de selles d'une infection à CMV. Le rapport est en cours de préparation pour l'ANSM ainsi que la publication.**

3.5.6 Participation des laboratoires du CNR à des projets de Recherche clinique dont l'investigateur principal n'est pas membre du CNR :

- Promotion académique : « preemptive treatment for *herpesviridae* », PTH, Laurent PAPAIZIAN, Marseille (laboratoire de Grenoble, laboratoire CNR, Limoges, Laboratoire associé de la Pitié)
- Promotion industrielle, Shire : Aurora 302 : Maribavir en traitement préemptif des infections à CMV après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. co-investigateur (laboratoire CNR Limoges et laboratoire de Grenoble)
- Promotion industrielle, Shire : Solstice 303 (maribavir en traitement des infections réfractaires aux inhibiteurs de polymérase) : laboratoire CNR investigateur principal France, laboratoire de Grenoble, laboratoire associé Necker, co-investigateurs

Laboratoire de Grenoble

-Etude des biomarqueurs EBV chez des patients VIH+ avec un lymphome de Hodgkin : Participation à l'étude clinique prospective multicentrique nationale soutenue par l'ANRS portant sur une cohorte de patients atteints de lymphomes et infectés par le VIH (ANRS CO16 Lymphovir, inclusion 2008-2015, investigateur principal Dr Caroline Besson).

4. Alerte

Fin 2018-2019 signalement à l'ANSM des cas de résistance (3 cas) au Letemovir adressés au CNR de Limoges. Analyse en cours.

5. Activités de rétro-information, de formation et de conseil

Ce chapitre concerne principalement les activités à destination des professionnels de santé (notamment formation aux techniques de laboratoire) ; les activités liées à l'enseignement et la formation universitaires sont exclues.

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Formation

Laboratoire CNR Limoges :

*Enseignement post-universitaire :

- **Cours de Virologie Fondamentale de L'Institut Pasteur, Paris** « Cytomegalovirus », Paris S Alain , 1^{er} Octobre 2018
- Responsables de l'Unité d'enseignement de master 1 Sciences de la Vie et de la Santé depuis 2012 (S Alain puis S Hantz depuis 2016): « Epidémiologie et mécanismes de résistance aux anti-infectieux des agents anti-infectieux et parasitaires » 48 heures de cours, préparation d'articles et organisation des stages
 - o Coordination des cours de virologie aux DES et cours de DES : S Alain 16H dont Herpès virus, et TP de culture cellulaire 20 H, S Hantz 10H)
 - o Référent enseignement pour le site de Limoges pour le DHU transplantation SUPORT Tours, Poitiers, Limoges, créé en 2013 noté A+ et validé en 2014. (S Alain).
 - o M2 Infectiologie cellulaire et moléculaire, vaccinologie, anticorps thérapeutiques/ Université de Tours : UE agents infectieux et chimiorésistance : Résistance des Herpesvirus au traitement antiviral (S Hantz, 2h30)
 - o M2 Université de Limoges « résistance aux antiviraux » S Alain, « Virome » S Hantz
 - o DU transplantation pulmonaire : Marie Lannelongue, Paris Janvier 2015, nov 2016, **Nov 2018** : Les infections à CMV (S Alain)
 - o DIU Médecine interne et grossesse Limoges 2016, 2017, **2018**: cytomégalovirus (S Alain)

*Formation aux professionnels de santé :

- FMC IPC Nouveaux anti CMV **S Alain** FMC cas clinique Journées de l'Institut Paoli Calmette, Marseille 6 avril 2018
- J2I : Cytomegalovirus : pathologies CMV et populations à risque, quelles prises en charge aujourd'hui? S Alain 26 novembre 2018

*Accueil de stagiaire/collègue étranger :

En 2018 2 thésards : C Jacquet (modèles ex vivo et in vivo d'infection placentaire, évaluation de nouveaux antiviraux) et Carmen Cristescu , en co-tutelle avec l'Université de Bucarest sur la thématique « Impact du CMV sur le placenta et la prééclampsie ».

Laboratoire associé Necker : Dr M Leruez-Ville

*Enseignement universitaire en 2017-2018

- Séminaire de DES socle de Biologie Médicale Université Paris Descartes : « Infections materno-fœtales ».
- Travaux dirigés de DCEM1 Faculté Paris Descartes Module 7 : « Diagnostic des infections virales et grossesse ».
- Cours magistral de DCEM1: Faculté Paris Descartes Module 7 : « Diagnostic de l'infection à cytomégalovirus».
- Cours au Master 2 de Diagnostic Prénatal Faculté Paris Descartes Université Paris V : « Interprétation des sérologies pendant la grossesse ».
- Cours Master 2 : Infectiologie : Microbiologie, Virologie, Immunologie (IMVI) ; Paris VII. Infections à CMV : physiopathologie et diagnostic
- Cours Master I : INFECTIOLOGIE : MICROBIOLOGIE, VIROLOGIE, IMMUNOLOGIE (IMVI) MICROBIOLOGIE. S4 Pathologie Infectieuse: CMV mère-enfant
- Cours Diploma Course in fetal Medicine, UMP, HCMV , Vietnam

***Enseignement formation continue 2018**

-Organisation d'un « staff » mensuel sur la thématique de l'infection congénitale à CMV multidisciplinaire (obstétriciens, pédiatres, neurologues, radiologues, ORL) : discussion de cas, bibliographie.

-Formation continue pour des microbiologistes : Journées scientifiques BioMérieux, octobre 2018

-Formation continue pour les obstétriciens, pédiatres et sages-femmes au niveau national et international: Journée du Collège national des sages-femmes de France février 2018, Charenton ; Salon de Gynécologie Pratique, Mars 2018 ; Fetal Medicine expert Workshop, Londres, mars 2018 ; Diploma course in fetal medicine, avril 2018, Vietnam, Journées des Pédiatres de Maternité Paris 28 juin 2018, Soirée scientifique CDPN Foch novembre 2018

Accueil de stagiaire/collègue étranger :

En 2018 : accueil dans le cadre des activités du CNR : d'un stagiaire de M1 en juillet 2018, d'1 stagiaire Master 2 (2018)

Laboratoire associé Pitié Salpêtrière :

Enseignements postuniversitaires :

Titre de l'enseignement	Niveau	Etablissement	Intervenant
Herpèsvirus	DES	Faculté de Médecine (Paris Descartes)	DB et SB
Méningites et encéphalites virales	DES	Faculté de Médecine (Paris Descartes)	DB
Infections cutanées	DES	Faculté de Médecine (Paris Descartes)	SB
Diagnostic virologique : virus à expression cutanée	DIU	Faculté de Médecine (Paris-Est Créteil et UPMC)	DB
Antiviraux pour le traitement des infections à herpèsvirus	DIU	Faculté de Médecine (Paris Diderot, Paris Descartes, Sorbonne Université, Versailles Saint Quentin, Bordeaux Segalen)	DB
Pathologie de la muqueuse buccale	DIU	Faculté de Médecine (Sorbonne Université et Tours)	SB
Infections virales latentes : exemple du HSV	M1	Faculté de Médecine (Sorbonne Université)	DB et SB
Stratégies antivirales pour les virus latents. Ex : les herpèsvirus	M2	Faculté des Sciences (Paris Descartes, Sorbonne Université, Paris Diderot)	DB

DB : David Boutolleau ; SB : Sonia Burrel

DES : Diplôme d'Etudes Spécialisées ; DIU : Diplôme Interuniversitaires ; M : Master

Enseignements aux professionnels de santé

Titre de l'enseignement	Niveau	Etablissement	Intervenant
Infection par les virus herpes simplex	Biologistes	Siemens Académie	DB

Laboratoire de Grenoble

Prestation de conseil en sérologie, Mérieux Université, Tassin-La Demi-Lune, Mars 2018 : P Morand.

« Maladies associées au virus d'Epstein Barr : actualités Physiopathologie et Diagnostiques ».

Organisation de la réunion mensuelle multidisciplinaire (greffeurs, infectiologues réanimateurs, virologues, pharmacologues, immunologues) de concertation sur la thématique des infections virales de l'immunodéprimé (discussion de cas, bibliographie): O Epaulard, R Germi, CHU de Grenoble.

Participation à la réunion multidisciplinaire (infectiologues, neurologues, bactériologiste) de concertation sur la thématique des infections neuroméningées (discussion de cas, bibliographie): R Germi, CHU de Grenoble.

Participation au DU de thérapeutiques anti-infectieuses organisé à l'université Grenoble Alpes Grenoble pour les professionnels de santé (médecins et Pharmaciens) sur les thématiques :

-« Infections à CMV » : R Germi, O Epaulard

-« qu'est-ce qu'un antiviral » :P Morand

Cours national du DES de biologie médicale « la mononucléose infectieuse ». Power point commenté enregistré sur SIDES : R Germi.

Responsable de la Formation continue courte: vaccin et pratique vaccinales pour les pharmaciens d'officine. R Germi, université Grenoble Alpes Grenoble

Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion) ;

- Recommandation de la SFGMTC (Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire) recommandations pour la prise en charge des infections à Herpesvirus, actualisation (Brissot et al., Bul Cancer, 2018) diffusées sur le site de la SFGMTC
- Consensus international pour la prise en charge des infections à cytomégalovirus après greffe d'organe (publié Kotton et al., 2018)
- Plaquette de conseils d'Hygiène, sur le site du CNR

Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR , Rétro-information aux partenaires ;

- Newsletter annuelle pour le recensement des infections congénitales et pour la surveillance des infections néonatales à HSV,
- Nombreuses conférences invitées permettant la diffusion des données de surveillance de résistance (notamment FMC RICAI 2017 S Alain et D Boutolleau)

Information/formation des professionnels de santé : site internet

- Adresse du site internet : www.unilim.fr/cnr-cytomegalovirus/
- **Elargi en 2018 aux autres herpesvirus et traduit en anglais (en cours de finalisation)**
- Mise à jour et diffusion des évaluations techniques et des recommandations du CNR sur le site du CNR
- Diffusion du rapport annuel
- Lien avec d'autres sites sur le sujet notamment dans le cadre de l'infection congénitale à CMV
- Diaporamas des conférences et FMCs
- Création d'une page spécifique HSV en cours
- Intégration de la base de données résistance CMV 2018 en cours.

Activités de conseil aux professionnels de santé :

- Infections congénitales à CMV : Nous recevons des appels téléphoniques quotidiens ou des emails de médecins, sages-femmes ou de patients (ayant trouvé nos coordonnées par internet) pour des conseils concernant l'interprétation de résultats de tests sérologiques pendant la grossesse ou dans le cadre des dons de gamètes. Il s'agit parfois de conseils pour entreprendre une grossesse après une primo-infection, de conseils sur la prise en charge de l'infection fœtale puis pédiatrique. Par ailleurs, nous conseillons aussi nos collègues biologistes sur les performances et interprétation des techniques (sérologie mais aussi PCR CMV sur salive...). Le Pr Sophie Alain et le Dr S Hantz assurent la permanence du conseil sur l'infection

congénitale à CMV au laboratoire CNR, avec environ 1 appel ou mail par jour. A Necker, le Dr Leruez-Ville reçoit environ 2 à 3 appels par jour. Nous recevons par ailleurs de nombreux tubes pour expertise sérologique et diagnostics prénatal et néonatal tant à Limoges qu'à Necker, ainsi que de nombreuses demandes de conseil et de diagnostic rétrospectif sur carton de Guthrie, majoritairement à Necker.

- Traitement des infections à CMV : conseil par mail ou téléphone auprès de S Alain ou S Hantz qui centralisent les conseils aux cliniciens au laboratoire CNR de Limoges.
- En 2018 nous avons noté au laboratoire CNR de Limoges une augmentation des demandes concernant la prise en charge des infections congénitales et une augmentation très importante des conseils sur les choix thérapeutiques chez les enfants infectés et en cas de multirésistance chez les patients immunodéprimés, notamment sur la place des nouveaux antiviraux et des immunoglobulines et les demandes d'ATU (appels et mails quotidiens).
- Infections à HSV et VZV : Les Dr David Boutolleau et Sonia Burrel reçoivent quotidiennement plusieurs appels téléphoniques pour le diagnostic des infections par les HSV ou VZV, leur prise en charge thérapeutique, et la recherche de résistance aux antiviraux.
- Une RCP « Immunité et Infection » est organisée tous les 15 jours sur le site de la Pitié-Salpêtrière pour discuter de la prise en charge des infections opportunistes par les herpèsvirus chez les patients immunodéprimés.
- Le Dr S Alain et le Dr S Hantz reçoivent également des appels pour des cas difficiles d'infection à HSV ou VZV. Ils transfèrent les cas complexes au laboratoire associé de la Pitié Salpêtrière
- Infection à EBV : La majorité des conseils sont donnée par le laboratoire de Grenoble, qui assure une prestation de conseil téléphonique ou par email
- Les personnes qui nous contactent sont principalement des médecins cliniciens et des collègues biologistes.
- Concernant l'EBV, la prestation de conseil porte le plus souvent sur l'interprétation de résultats de tests sérologiques EBV ou sur la discussion autour de cas graves ou atypiques d'infection à EBV. Globalement le laboratoire gère par année une 30aine de prestations de conseil sur l'EBV dont environ 5 à 10 nous sont envoyés par les coordonnateurs du CNR Herpesvirus, à Limoges.
- S Alain et P Morand participent à une **RCP nationale sur les encéphalites infectieuses**

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- Le CNR participe en tant que membre du comité scientifique au réseau ECCI (European Congenital CMV Initiative). Il s'agit d'un réseau d'experts travaillant sur l'infection congénitale à CMV et dont le but est d'accroître les connaissances du public et des professionnels de santé sur l'infection congénitale à CMV et de promouvoir la recherche sur cette thématique. Ce groupe se réunit au moins une fois par an sous forme restreinte (comité scientifique) et organise un meeting tous les 2 ans. **Le prochain meeting est organisé à Paris en 2020 par le Dr Leruez Ville.**
- Le CNR a participé à la consultation du HCSP en 2017-2018 sur la question du dépistage de l'infection congénitale à CMV. Sophie Alain était membre de la commission. Marianne Leruez-Ville a été auditionnée en tant qu'expert (23 février 2017). **Le rapport et l'avis ont été publiés en décembre 2018.**
- S Alain est expert auprès de l'ANSM pour les demandes d'ATU concernant les nouveaux antiviraux et les immunoglobulines hyperimmunes.
- Et auprès de la CNAM pour la **révision de la nomenclature des actes de Biologie Médicale (NABM)** qui a

abouti **en janvier 2019** avec l'inscription à la NABM des actes de détection/quantification des génomes des alpha et beta herpesvirus (HSV, VZV, CMV), avec révision des actes de sérologie et indications d'aide à la prescription. La révision de la NABM pour EBV étant prévue en 2019.

- Elle participe au groupe de travail SOGAT pour la validation des standards WHO internationaux.
- Elle est expert auprès du QCMD pour les contrôles de qualités CMV pour la charge virale dans le sang total , le plasma et pour la détection des résistances aux antiviraux.
- L'étude TransfeCMV dédiée à la recherche du CMV dans les selles de volontaires sains candidats au don de selle pour transplantation fécale a été réalisée au laboratoire CNR de Limoges, à la demande de l'ANSM.
- Le laboratoire de Grenoble a été contacté par l'ANSM pour La réalisation du contrôle national de qualité sur la sérologie EBV pour l'année 2019-20
Contact : **Elisabeth FRANCOIS-BURG**, DMDPT/DMDIV , Contrôle National de Qualité des examens de biologie médicale **Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé**
143/147 bld Anatole France
F-93285 Saint-Denis cedex

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

- S Alain : aide à la rédaction de documents d'information destinés aux pharmaciens sur l'infection congénitale à CMV
- Diffusion des précautions d'hygiène sur le site du CNR herpesvirus
- David Boutolleau : E=M6 (Mac Lesggy) : **fièvre, antibiotiques, varicelle : comment se soigner ?** (M6, 14 janvier 2018)

6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année 2018, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.1.1 Infection congénitale à CMV

Deux études de recherche clinique sont en cours :

-Protocole CYMEPEDIA (NCT01923636):

L'objectif principal de l'étude est d'élaborer une classification pronostique précoce (en période néonatale) de la survenue de séquelles neuro-développementales et sensorielles à un an et à 2 ans chez des enfants infectés in utero par le CMV. L'objectif principal sera étudié fin 2019 après la fin du suivi à 2 ans des enfants inclus.

Les objectifs secondaires sont :

- 1) Estimer la prévalence de l'infection congénitale à CMV en Ile de France dans une population de 12000 nouveau-nés issus du dépistage systématique : **fait et publié en 2017 (Leruez-Ville et al, CID, 2017)**
- 2) Comparer la fréquence de survenue des séquelles neuro-développementales et sensorielles à 1 an et 2 ans en fonction de l'échographie et de l'IRM cérébrale anténatales : objectif en cours de réalisation. **Mémoire de fin d'étude de sage-femme (Sally Ren) sera terminé en 2019.**
- 3) Evaluer l'intérêt pronostique de la mesure périodique de la cinétique d'excrétion de la charge virale de la naissance à 2 ans pour la survenue des séquelles neuro-développementales et sensorielles à 1 et 2 ans : en cours d'étude. **Voir résultats préliminaires dans l'annexe 3**

- 4) Comparer la fréquence de survenue des séquelles neuro-développementales et sensorielles à 1 an et 2 ans en fonction du trimestre de survenue de la primo-infection maternelle : fait, voir chapitre 3.5, **résultats publiés en 2018 (Faure-Bardon, CID, 2018)**
- 5) Evaluer la sensibilité de la PCR CMV sur sang séché sur carton de Guthrie par rapport au diagnostic conventionnel sur urine ou salive ou sang frais : en cours d'analyse

-Protocole CYMEAUDIT (NCT02139423):

Dans cette étude tous les nourrissons ayant échoués au dépistage universel de la surdité réalisé en maternité à J3 de vie sont testés pour l'infection congénitale à CMV par le recueil d'un écouvillon salivaire. L'objectif principal de cette étude est de tester la faisabilité de connaître dans le premier mois de vie : le statut infecté ou non et la confirmation ou non d'un déficit auditif chez un nourrisson avec un dépistage positif de la surdité à J3 afin de pouvoir instaurer un traitement antiviral précoce. **L'étude est terminée et ses résultats sont en cours d'analyse par le biostatisticien.**

Laboratoire CNR Limoges :

- **Evaluation du potentiel inhibiteur et de la toxicité du letermovir dans le placenta** (travail en cours sur les modèles d'histoculture et de souris humanisée développés au laboratoire)

Les résultats sur cultures cellulaires et histocultures ont été obtenus en janvier 2019 et ont été présentés au 19eme workshop CMV Avril 2019, Birmingham USA.

- Evaluation des immunoglobulines hyperimmunes CytotectCP et de nouveaux dérivés d'artésunate dans le modèle d'infection placentaire, en cours.

6.1.2 Analyse des mécanismes d'action des antiviraux et recherche de nouvelles cibles

Le laboratoire CNR de Limoges travaille depuis 2007 sur les terminases du CMV et a été le premier à en décrire le polymorphisme et à identifier les domaines fonctionnels de UL56 et UL89. La synthèse des travaux récents que nous avons publiée en 2018 (**Ligat et al., FEMS 2018**), et les résultats favorables de l'étude de phase III du letermovir en prophylaxie des infections à CMV après allogreffe de moelle montrent tout l'intérêt de ce complexe comme cible antivirale. Les terminases forment un complexe sans équivalent dans les cellules eucaryotes, ce qui laisse espérer une faible toxicité des inhibiteurs, confirmée par nos travaux ex vivo sur le placenta (Andouard et al. CMV Workshop 2019). Nous avons décrit en 2017 plusieurs domaines essentiels à l'activité de la protéine UL56, (**Ligat et al, Scientific Reports 2017**) et analysons l'impact de mutations de ces domaines sur la formation du complexe et son inhibition par le letermovir.

Le projet actuel vise à étendre le choix des cibles potentielles au sein de ce complexe à partir des domaines fonctionnels que nous avons définis.

En parallèle, et compte tenu de l'intérêt de ces inhibiteurs dans les infections à Herpès simplex et Varicelle Zona, nous nous sommes intéressés à l'hélicase du CMV et nous avons, en 2018, identifié les domaines conservés de cette protéine et validé l'importance de certains acides aminés pour la réplication virale (**Ligat et al. Frontiers in Microbiology, 2018**). Nous poursuivons ces travaux plus fondamentaux par la recherche de molécules actives sur cette cible.

6.1.3 Variabilité des herpès virus

Laboratoire associé la Pitié Salpêtrière

Les activités de recherche du Laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière concernant au premier plan l'étude de la variabilité génétique des HSV et du VZV et de leurs conséquences en termes d'épidémiologie et de résistance aux antiviraux :

Poursuite des travaux de recherche sur la variabilité génétique des HSV et VZV :

- Epidémiologie et phylogénie des Simplexvirus (collaboration avec Sébastien Calvignac-Spencer) : analyse du génome entier des souches de HSV-2 de patients d'origine africaine, identification de souches supplémentaires de HSV-2 ancestral (précédemment appelé HSV-2 variant, HSV-2v), étude transcriptomique de cellules infectées par le HSV-2 classique et le HSV-2 ancestral pour comprendre la restriction du HSV-2 ancestral au continent africain et son absence de diffusion au niveau de la population mondiale (contrairement au HSV-2 classique).
- Apport de la technologie NGS pour le diagnostic de la résistance des HSV et VZV aux antiviraux (collaboration avec le Dr Christophe Rodriguez) (Mercier-Darty et al., AVR, 2018 ; Mercier-Darty et al., AVR, en révision)
- Identification de nouveaux antiviraux anti-HSV et/ou VZV (collaboration avec Séverine Armand, Christine Bailly, Philippe Grellier, Yanyan Li, Christophe Goulard du Muséum national d'Histoire Naturelle) : identification d'une molécule d'origine naturelle avec une forte activité anti-HSV (déclaration d'invention en cours auprès de la SATT LUTEC Paris).
- Etude de l'épidémiologie moléculaire des souches de VZV isolées au laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière.

6.1.4 Projets de recherche EBV

Projets du Laboratoire de Grenoble

- biomarqueurs de l'infection à EBV
 - Evaluer l'intérêt de la quantification de la méthylation du promoteur Rta comme nouveau marqueur prédictif des lymphoproliférations associées au virus d'Epstein-Barr. Selon l'évolution des résultats de ce travail, une collaboration avec le Pr Vincent Marechal (PU, Paris V) et son équipe de La Pitié Salpêtrière est envisagée avec l'étude d'une cohorte de patients greffés de cellules souches hématopoïétiques.
 - Etude des biomarqueurs EBV chez des patients infectés par VIH atteints de lymphomes (ANRS CO16 Lymphovir, inclusion 2008-2015, investigateur principal Pr Caroline Besson) avec l'étude des charges virales et des sérologies chez les patients atteints de des lymphomes non-Hodgkinien.
 - Développement et évaluation de l'intérêt d'un test immuno-enzymatique de diagnostic précoce du SLPT : Le test Zetaquantor basé sur l'immunodétection par ELISA de la protéine Zebra soluble dans le plasma (financement obtenu par les Pr Drouet et Morand de la société d'accélération du transfert de technologies, Linksiem).
- caractérisation de l'infection à EBV
 - Etude de la réactivation des herpesviridae dans la crise d'angioedème (thèse en co-tutelle avec l'université d'Irkoutsk, Russie).
 - Etude immuno-virologique de l'infection à EBV : Mise en place de l'étude des anticorps neutralisants dirigés contre les glycoprotéines virales gH/gL et gB dans les infections par le virus d'Epstein-Barr. Selon les résultats préliminaires obtenus, un financement pourra être demandé à l'ANR.

Participation à des projets de Recherche clinique

- Promotion académique : « preemptive treatment for herpesviridae », Laurent PAPAIZIAN, Marseille
- Promotion académique : « Navire », Observatoire en vie réelle des stratégies de prévention et de traitement de l'infection à CMV chez les patients receveurs de greffe de CSH. Pr S Alain, Limoges
- Promotion académique : « Adénoclear » Traitement des infections disséminées par l'adénovirus chez des patients greffés de cellules souches hématopoïétiques avec répllication digestive de l'adénovirus. Dr J LeGoff, Hopital St Louis, paris

- Promotion industrielle, Shire :Aurora 302 : co-investigateur
- Promotion industrielle, Shire :Solstice 303 : co-investigateur

6.2 Liste des publications et communications de l'année 2017, ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Ouvrages

- **S Alain**, V Calvez, D Descamps*, F Morfin, B Visseaux* Méthodes de détermination de la sensibilité aux antiviraux REMIC actualisation 2018.
- **S Alain**, C Vauloup-Fellous. CytomégaloVirus. REMIC actualisation 2018:
- Infections à cytomégaloVirus. **S Alain**, I Garrigue : Traité de Virologie Médicale. 2^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2019
- *Anelloviridae*. J Brassard, **S Hantz**, **S Alain**. Chapitre 25. In Traité de Virologie Médicale. 2^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2019.
- Infections congénitales et périnatales **M Leruez-Ville** et Y Ville In Traité de Virologie Médicale. 2^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2019
- **M Leruez-Ville** . Congenital infection FETAL MEDICINE: BASIC SCIENCE AND CLINICAL PRACTICE, THIRD EDITION
- **Burrel S**, **Boutolleau D**, Mourez T, Rodriguez C, Pillet S. Examens virologiques en pratique médicale. Chapitre 8. In Traité de Virologie Médicale, 2^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2019 : pp 121-146.
- Rozenberg F, **Boutolleau D**. Virus herpes simplex. In REMIC, 6^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2019 : pp 645-649.
- **Burrel S**, Deback C. Virus de la varicella et du zona. In REMIC, 6^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2019 : pp 651-654.
- **Burrel S**, **Boutolleau D**. Introduction aux *Herpesviridae*. Chapitre 13. In Traité de Virologie Médicale, 2^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2019 : pp 201-208.
- **Burrel S**, **Boutolleau D**. Virus herpes simplex. Chapitre 14. In Traité de Virologie Médicale, 2^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2019 : pp 209-224.
- **Boutolleau D**, Ducancelle A, **Burrel S**. Virus de la varicelle et du zona. Chapitre 15. In Traité de Virologie Médicale, 2^e édition, Société Française de Microbiologie (Ed) ; 2019 : pp 225-237.
- **Lupo J**, Epaulard O, **Morand P**, **Germi R**. Le virus d'Epstein-Barr. Traité de virologie médicale. (2018)
- **Morand P**, Van de Perre P, **Germi R**, **Lupo J**. Virus Epstein Barr. REMIC. Actualisation.(2018)
- **Gautheret-Dejean A**, Marcelin Anne-Geneviève, Rangez Roger Sylvie. Herpesvirus humains 6, 7 et 8 (HHV-6, HHV-7, HHV-8). In REMIC 2018.

Publications nationales

- Maribavir, brincidofovir and letermovir: Efficacy and safety of new antiviral drugs for treating cytomegalovirus infections. Frange P, **Leruez-Ville M**. Med Mal Infect. 2018 Apr 9. pii: S0399-077X(17)30787-4. doi: 10.1016/j.medmal.2018.03.006.
- Infection à cytomégaloVirus chez la femme enceinte. **Leruez-Ville M**, Ville Y. Revue Francophone des Laboratoires. N°509. Février 2019
- Infections à CytomégaloVirus **S Hantz**, **S Alain**. Revue du praticien, Mars 2019
- CytomégaloVirus , Focus, (Elsevier) 1-7 mars 2018
- Outils d'évaluation de la réponse immune anti-CMV en transplantation. Focus, (Elsevier) à paraître.

Publications internationales

- Spoulou V, **Alain S**, Gabutti G, Giaquinto C, Liese J, Martinon-Torres F, Vesikari T. Implementing Universal Varicella Vaccination in Europe: The Path Forward. *Pediatr Infect Dis J*. 2019 Feb;38(2):181-188.
- **Ligat G**, Da Re S, **Alain S**, **Hantz S**. Identification of Amino Acids Essential for Viral Replication in the HCMV Helicase-Primase Complex. *Front Microbiol*. 2018 Oct 23;9:2483.
- **Kulifaj D**, Durgueil-Lariviere B, Meynier F, **Munteanu E**, Pichon N, Dubé M, Joannes M, Essig M, **Hantz S**, Barranger C, **Alain S**. Development of a standardized real time PCR for Torque teno viruses (TTV) viral load detection and quantification: A new tool for immune monitoring. *J Clin Virol*. 2018 Aug;105:118-127.
- Alsuliman T, Kitel C, Dulery R, Guillaume T, Larosa F, Cornillon J, Labussière-Wallet H, Médiavilla C, Belaiche S, Delage J, **Alain S**, Yakoub-Agha I. Cytotect®CP as salvage therapy in patients with CMV infection following allogeneic hematopoietic cell transplantation: a multicenter retrospective study. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Oct;53(10):1328-1335.
- Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A; The Transplantation Society International CMV Consensus Group. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation*. 2018 Jun;102(6):900-931.
- **Noble J**, Gatault P, Sautenet B, Gaudy-Graffin C, Beby-Defaux A, Thierry A, Essig M, Halimi JM, Munteanu E, **Alain S**, Buchler M. Predictive factors of spontaneous CMV DNAemia clearance in kidney transplantation. *J Clin Virol*. 2018 Feb - Mar;99-100:38-43.
- Devresse A, **Leruez-Ville M**, Scemla A, Avettand-Fenoel V, Morin L, Lebreton X, Tinel C, Amrouche L, Lamhaut L, Timsit MO, Zuber J, Legendre C, Anglicheau D. Reduction in late onset cytomegalovirus primary disease after discontinuation of antiviral prophylaxis in kidney transplant recipients treated with de novo everolimus. *Transpl Infect Dis*. 2018 Apr;20(2):e12846.
- Neant N; Klifa, R; Bouazza N; Moshous D; Neven B; **Leruez-Ville M**; Blanche S; Treluyer JM; Hirt D; Frange P. Model of population pharmacokinetics of cidofovir in immunocompromised children with cytomegalovirus and adenovirus infection. *Antimicrob Chemother*. 2018 Sep 1;73(9):2422-2429.
- **V Faure-Bardon**, JF Magny, M Parodi, S Couderc, P Garcia, AM Maillotte, M Benard, D Pinquier, D Astruc, H Patural, P Pladys, S Parat, B Guillois, A Garenne, L Bussi eres, **T Guillemainot**, J Stirnemann, I Ghout, Y Ville, **M Leruez-Ville**. Sequelae of congenital cytomegalovirus (cCMV) following maternal primary infection are limited to those acquired in the first trimester of pregnancy. *Clin Infect Dis*, 2018 Dec 31.
- V Faure-Bardon, **G Peytavin**, **MP L  **, T Guillemainot, **E Elefant-Amoura**, **J Stirnemann**, M Leruez-Ville, **Y Ville**. Placental transfer of Letermovir & Maribavir in the ex-vivo human cotyledon perfusion model. New perspectives for in utero treatment of congenital cytomegalovirus infection Placenta, 2019, sous presse.
- Mercier-Darty M, **Boutolleau D**, Lepeule R, Rodriguez C, **Burrel S**. Utility of ultra-deep sequencing for detection of varicella-zoster virus antiviral resistance mutations. *Antiviral Res* 2018 ; 151 : 20-23.
- Deback C, Rousseau A, Breckler M, Mollet L, **Boutolleau D**, **Burrel S**, Roque-Afonso AM, Labetoulle M. Antiviral effects of Carcicol  , an heparin sulfate biomimetic for corneal regeneration therapy, for herpes simplex virus 1 and varicella zoster virus infection. *Antivir Ther* 2018 ; 23 : 665-675.
- Natori Y, Alghamdi A, Tazari M, Miller V, Husain S, Komatsu T, Griffiths P, Ljungman P, Orchanian-Cheff A, Kumar D, Humar A, **CMV Consensus Forum**. Use of viral load as a surrogate marker in clinical studies of cytomegalovirus in solid organ transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2018 ; 66 : 617-631.
- **Lupo J**, **Germi R**, Costagliola D, **Morand P**, Besson C. Utility of Epstein-Barr Virus biomarkers in HIV-related lymphomas in the modern combined antiretroviral therapy era. *Clin Infect Dis*. 2018 Sep 11.
- Filippova A, Charles J, Epaulard O, **Germi R**, Persoons V, Templier I, Leccia MT, Dreno B, Malova I, **Morand P**, **Lupo J**. Exogenous human herpesvirus 6 reinfection after tumor-infiltrating T-lymphocyte therapy. *Cytotherapy*. 2018 Feb 9. pii: S1465-3249(17)30782-X.

- **Bonnaïfous P**, Marlet J, Bouvet D, Salamé E, Tellier AC, Guyetant S, Goudeau A, Agut H, **Gautheret-Dejean A**, Gaudy-Graffin C. Fatal outcome after reactivation of inherited chromosomally integrated HHV-6A (iciHHV-6A) transmitted through liver transplantation American Journal of Transplantation. 2018 Jan 9.

Communications nationales

- Evaluation de l'extracteur SaMag-12 pour automatisation partielle de la PCR CMV sur DBS **S Hantz, C Courivaud, M Mayeras, S Alain**. 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 17 - 18 décembre 2018.
- Intérêt du Test QuantiFERON-CMV® pour la prise en charge des infections à Cytomegalovirus réfractaires aux antiviraux. C François, **E Munteanu, S Hantz, M Gomes**, V Escuret, Q Lepiller, L Andreoletti, C Regagnon, G Lagathu, A Dewilde, C Zandotti, T Mourez, M Solis, R Germi, and **S Alain** for the French CMV resistance Group 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 17 - 18 décembre 2018.
- Trends in herpes simplex virus resistance to antivirals over the last decade in France. **Burrel S**, Roger O, Piot JC, Thévenin M, Mousnier F, Hermet L, **Boutolleau D**. 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 17 - 18 décembre 2018.
- Varicella-zoster virus resistance to antivirals: results from a 9-year survey in France. **Boutolleau D**, Roger O, Piot JC, Thévenin M, Mousnier F, Hermet L, **Burrel S**. 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 17 - 18 décembre 2018.
- Validation des trousses Simplexa™ HSV 1 & 2 et VZV Direct à partir de faibles volumes de prélèvements biologiques. **Boutolleau D**, Boivin M, Le Clec'h C, Hourcq I, Chicaud E, Piot JC, Hamm N, **Burrel S**. 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 17 - 18 décembre 2018.
- Forme intégrée du génome du sixième herpesvirus humain au génome cellulaire (iciHHV-6) : diagnostic du portage d'iciHHV-6 et estimation du nombre de copies intégrées par PCR quantitative en temps réel et par droplet digital PCR. Magnier P, Loureiro D, **Gautheret-Dejean A**, Beaulieu Q, Nguyen Quoc S, Frobert E, Henquell C, **Bonnaïfous P**. 7^{ème} journée HERPAS : herpesvirus et pathologies associées, Tours, 21 mars 2018.
- Variabilité et phylogénie des souches d'herpesvirus humains 6 intégrées aux chromosomes humains (iciHV-6A et -6B) en France. **Bonnaïfous P**, Le Gouil M, Loureiro D, Guilleminault E, Gozlan J, Agut H, **Gautheret-Dejean A**. XX^{èmes} Journées Francophones de Virologie, Paris, 22-23 mars 2018.
- Mesure de la charge virale du HHV-6 : comparaison qRT-PCR et ddPCR. Joanny M, Magnier P, Lazga H, Levu M, Nectoux J, Orhant L, Nguyen-Quoc S, **Bonnaïfous P**, **Gautheret A-Dejean A**. 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, 17-18 décembre 2018.

Communications internationales

- Comparison between the Realstar® CMV PCR kit (Altona Diagnostics) and CMV R-gene™ (bioMérieux) for CMV quantification follow-up in plasma and whole blood samples using IU and a single extraction. **Melissa Gomes-Mayeras¹, Sebastien Hantz¹, Sophie Alain**. 21st Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Athènes, Grèce. 23 - 26 septembre 2018.
- Mechanisms of emergence of resistance to Ietermovir during the French ATU program. **S. Alain**, L. Feghoul, S. Girault, Q. Lepiller, D. Michonneau, A. Berceanu, J. Le Goff, **S. Hantz**. 7th international Congenital CMV conference and 17th International CMV Workshop. 07-11 April 2019
- Impact of Ietermovir in an ex vivo first-trimester placenta model. **D. Andouard**, B. Gastineau, **N. Plaut, S. Hantz, S. Alain**. 7th international Congenital CMV conference and 17th International CMV Workshop. 07-11 April 2019.

- A highly potent trimeric derivative of artesunate shows promising profiles in experimental models. **C. Jacquet**, S. B. Tsogoeva, **D. Andouard**, C. El Hamel, T Chianea, M. Marschall, **S. Hantz**, **S. Alain**. 7th international Congenital CMV conference and 17th International CMV Workshop. 07-11 April 2019.
- Evaluation of Sa Mag-12 extractor for partial automation of CMV PCR on DBS. **S Hantz**, **C Courivaud**, **M Mayeras**, **S Alain**. 7th international Congenital CMV conference and 17th International CMV Workshop. 07-11 April 2019.
- Diversity of CMV seroprevalence in French metropole, overseas and Romania. **S Hantz**, **C Cristescu**, A Hermellin, S Roquebert, F Najjioullah, B Garin, **E Ribot**, S Ruta, **S Alain**. 7th international Congenital CMV conference and 17th International CMV Workshop. 07-11 April 2019.
- Fetal treatment for congenital cytomegalovirus infection: study of the placental transfer of Letemovir in the ex vivo human cotyledon perfusion model. V Faure, G Peytavin, M P Lê, **T Guilleminot**, J Stirnemann, **M Leruez-Ville** and Y Ville. Second ECCI (European Congenital Cytomegalovirus Initiative) Meeting. Brussels, 14 May 2018
- CMV viral load in saliva and in blood over time (birth to 2 years old) in congenitally infected children: the CYMEPEDIA study. **M Leruez-Ville**, JF Magny, M Parodi, S Couderc, P Garcia, AM Maillotte, M Benard, D Pinquier, D Astruc, P Minodier, H Patural, P Pladys, S Parat, B Guillois, A Garenne, L Bussieres, **T Guilleminot**, Y Ville. 7th international Congenital CMV conference and 17th International CMV Workshop. 07-11 April 2019
- Larivière A, Magnier P, Chessa C, Bourgoin A, Lévêque N, **Gautheret-Dejean A**, Beby-Defaux A. Comparison of a new quantitative real-time PCR assay (HHV6 R-GENE®, ARGENE®, BioMérieux) to the CMV HHV6,7,8 R-GENE® assay for detection and quantification of Human Herpes Virus 6 (HHV-6) DNA in various clinical specimens. 21th ESCV, Athènes, Grèce, 23-26 septembre 2018.
- **Bonnafe P**, Le Gouil M, Loureiro D, Guilleminault E, Gozlan J, Agut H, **Gautheret-Dejean A**. A Variability and phylogeny of community human herpesvirus 6 (HHV-6A and -6B) and inherited chromosomally integrated (iciHHV-6A and -6B) strains in France. 21th ESCV, Athènes, Grèce, 23-26 septembre 2018.
- Robinet-Perrin A, Tumiotto C, Cornut T, Santoni A, Garrigue I, **Boutolleau D**, **Burrel S**. **Acyclovir-resistant herpetic keratitis (HK) in an immunocompetent patient**. 31st International Conference on Antiviral Research (ICAR). Porto, Portugal. 11 - 15 juin 2018.
- **Boutolleau D**, Goupil-Guyette T, Bellone R, Marlet J, **Burrel S**. **Use of recombinant herpes simplex virus strains to characterize novel UL23 thymidine kinase mutations toward resistance to acyclovir**. 31st International Conference on Antiviral Research (ICAR). Porto, Portugal. 11 - 15 juin 2018.
- Robinet-Perrin A, Tumiotto C, Cornut T, Santoni A, Garrigue I, **Boutolleau D**, **Burrel S**. Acyclovir-resistant herpetic keratitis (HK) in an immunocompetent patient. 21st Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Athènes, Grèce. 23 - 26 septembre 2018.
- **Boutolleau D**, Goupil-Guyette T, Bellone R, Marlet J, **Burrel S**. **Recombinant phenotyping of herpes simplex virus UL23 thymidine kinase sequence variants for acyclovir resistance**. 21st Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Athènes, Grèce. 23 - 26 septembre 2018.
- Catroux M, Larivière A, Garcia M, Lévêque N, Le Moal G, **Boutolleau D**, Roblot G, **Burrel S**. **Post-herpetic encephalitis (HE) cerebral abscess: viral reactivation or latency site within central nervous system (CNS) ?** 21st Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Athènes, Grèce. 23 - 26 septembre 2018.
- **Burrel S**, Roger O, Piot JC, Thévenin M, Mousnier F, Hermet L, **Boutolleau D**. **Trends in herpes simplex virus resistance to antivirals over the last decade in France**. 21st Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Athènes, Grèce. 23 - 26 septembre 2018.
- **Boutolleau D**, Roger O, Piot JC, Thévenin M, Mousnier F, Hermet L, **Burrel S**. Varicella-zoster virus resistance to antivirals: results from a 9-year survey in France. 21st Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Athènes, Grèce. 23 - 26 septembre 2018.

Conférences sur invitations.

- « Nouveaux anti CMV » **S Alain** FMC cas clinique Journées de l'Institut Paoli Calmette, Marseille 6 avril 2018
- « Epidemiology and databases in France for congenital CMV » **S Alain** Second ECCI (European Congenital Cytomegalovirus Initiative) Meeting. Brussels, 14 May 2018
- « Vaccin CMV, actualités » **S Alain**, 15^{èmes} Journées de Médecine fœtale, 1^{er} Juin 2018 Paris
- « Vaccin CMV » **S Alain**, Journées nationales d'Infectiologie (JNI), Nantes 14 juin 2018
- « CMV et grossesse » 77^e Congrès de la Société Française de Médecine Interne, Lyon, 28 juin 2018
- « New Therapeutics » Symposium CMV 13^e International Congress of Lung Transplantation, 14 septembre 2018, Paris
- « TTV et transplantation, expérience du CNR Herpesvirus, » **S Alain**, Journées scientifiques BioMérieux 10-11 Octobre 2018
- «CMV quoi de neuf en 2018 ? » **S Alain**, Séminaires Hôpital Bichat, Paris, 12 Octobre 2018
- «CMV quoi de neuf en 2018 ? » **S Alain**, Séminaires du service d'Hématologie, Rouen 27 novembre 2018
- «Mécanisme d'action des anti-CMV » **S Alain**, Congrès National de la Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie cellulaire. Montpellier 22 novembre 2018.
- « Cytomegalovirus : pathologies CMV et populations à risque, quelles prises en charge aujourd'hui ? » **S Alain**, J2I, Journée de formation en infectiologie, 26 novembre 2018
- «Actualités sur le CMV en Transplantation » **S Alain, S Hantz**, 29^e congrès Ouest Transplant, 16 novembre 2018
- «TTV marqueur d'immunosuppression en greffe d'organe », **S.Alain** 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 17 - 18 décembre 2018.
- « Infections maternofoetales les nouveaux paradigmes : Cytomégalo virus » **S Alain**, A Billette de Villemeur, 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 17 - 18 décembre 2018.
- « CMV-Physiopathologie-Prévention-Prise en charge, Bilan du CNR » Journées nationales des CPDPN, Reims, 8 février 2019.
- « Actualités sur l'infection congénitale à CMV » **Leruez-Ville M.** Journée du Collège National des Sages-Femmes de France. 6 février 2018, Charenton
- « New frontiers in diagnosis: congenital CMV infection ». **Leruez-Ville M.** Expert Fetal Medecine Workshop. 1 March 2018. London, Grande Bretagne
- « Interprétation des sérologies pendant la grossesse » **Leruez-Ville M.** Salon de Gynécologie Pratique. 30 Mars 2018, Paris
- « Diagnosis of maternal cytomegalovirus infection ». **Leruez-Ville M.** Second ECCI (European Congenital Cytomegalovirus Initiative) Meeting. Brussels, 14 May 2018
- Infection congénitale à CMV. Journée des Pédiatres de Maternité. 28 Juin 2018
- "Correlates of protection for fetal infection in seronegative versus seropositive women". **Leruez-Ville M** NIAID/NICHD CMV Workshop, Cytomegalovirus infection: advancing strategies for prevention and treatment. Washington, 4-6 September 2018
- « Infection congénitale à CMV: intérêt de la charge virale CMV salivaire Etude CYMEPEDIA ». **Leruez-Ville M.** Journées scientifiques BioMérieux 10-11 Octobre 2018
- prévention et dépistage anténatal, interpréter les sérologies. **Leruez-Ville M.** Soirée du CDPN Foch : CMV et grossesse : états des lieux; Paris, 8 Novembre 2018
- Antiviral treatment. **M Leruez-Ville.** Congenital CMV 2019. From pregnancy to infancy: let's face it. Florence, 21-22 February 2019
- How to diagnose a non-primary infection? **M Leruez-Ville.** Congenital CMV 2019. From pregnancy to infancy: let's face it. Florence, 21-22 February 2019
- Epidémiologie et diagnostic de l'infection congénitale à CMV. **M leruez-Ville.** Table Ronde. Journées Nationales de Néonatalogie. 28-29 Juin 2019.
- **Boutolleau D.** Experience of the National Reference Centre for Herpesviruses with the DiaSorin Simplexa solution for the diagnosis of meningoencephalitis. DiaSorin Symposium. 21st Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Athènes, Grèce. 23 - 26 septembre 2018.
- **Patrice Morand.** Agents infectieux et cancer : vers de nouvelles mises en examen ? 38^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 17 - 18 décembre 2018.

Documents de vulgarisation

Plaquette d'information aux femmes enceintes/ Conseils d'Hygiène. Site internet du CNR Herpesvirus rubrique femmes enceinte

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

Sans objet

8. Programme d'activité pour les années suivantes (2019)

Les activités sont présentées selon l'organigramme mais sont le plus souvent collaboratives entre les différents laboratoires du CNR.

Cytomégalo virus Laboratoire CNR Limoges

Le laboratoire poursuit sa thématique de recherche principale sur les traitements anti-CMV et leur efficacité dans les différents types d'infection à CMV et les facteurs de risque d'échappement

1) Infection congénitale à CMV

- Déploiement des bases de données : **Elargissement de la surveillance du CMV congénital par la mise en œuvre des déclarations électroniques permettant une exploitation conjointe des données entre les deux laboratoires,**
- 2018 : Intégration des questionnaires pédiatriques permettant l'évaluation à long terme de l'efficacité, toxicité des traitements et des séquelles dans la base de données
- 2018-2019 : Elargissement au niveau européen (traduction anglaise du questionnaire et diffusion via l'ECDC) permettant un travail collaboratif et la mise en place d'un réseau européen, dans le cadre de l'ECCL.
- Et déploiement de l'intégration des images échographiques et IRM pour améliorer la formation des professionnels à la reconnaissance et à l'évaluation du risque lié au CMV.
- Analyse en séquence haut débit de la variabilité des souches des urines de nouveaux nés infectés par le CMV après traitement in utero dans l'étude Cyméval (Collaboration Necker-Limoges).
- Analyse de l'impact de nouveaux antiviraux et de nouveaux anticorps *ex vivo* sur le placenta sera poursuivie en parallèle à Limoges. En particulier mesure de l'efficacité du letermovir seul et en association en traitement des infections à CMV dans le placenta humain, à différents termes de grossesse, sur les modèles *ex vivo* et *in vivo* développés au laboratoire CNR

2) Epidémiologie et transmission du CMV

- Analyse finale du protocole CrechMV (NCT01704222) concernant les génotypages du CMV dans la salive des enfants des crèches françaises et l'étude des populations virales en NGS, en particulier sur les cibles vaccinales. Capture et analyse NGS Illumina en cours de développement.

3) Variabilité du CMV, thérapeutique antivirale et facteurs de risque d'échappement, nouvelles cibles thérapeutiques

- Analyse des données des études de cohorte en cours ORPhaViC et QuantiC R+ et publication des résultats
- Analyse de la pertinence de la charge virale TTV comme marqueur immunologique dans différentes conditions d'immunodépression en parallèle d'autres marqueurs et évaluation de la valeur prédictive d'infection à CMV
- Etude de la valeur prédictive de non réponse au traitement de la diversité génomique du CMV en transplantation (collaboration sur la cohorte Orphavic avec l'équipe de l'UMASS, qui a développé le modèle, mise en place de la capture génomique en cours, et analyse transcriptomique, à partir de fin 2018).

4) Infections néonatales à HSV : poursuite du recueil de données nationales et analyses de ces données avec le laboratoire associé de la Pitié Salpêtrière

Laboratoire associé Necker :

1) Amélioration, surveillance et innovation des techniques diagnostiques de l'infection congénitale à CMV

- Réactovigilance sur les techniques sérologiques pour la réalisation de l'avidité des IgG CMV : Nous continuons la surveillance des 2 techniques de mesures de l'avidité les plus utilisées (BioMérieux, Vidas et celle de DiaSorin Liaison XL) (Leruez-Ville M, CID, 2013 ; Sellier Y, JCV, 2015) mais nous avons prévu de tester l'avidité proposée par Abbott sur Architect puis sur l'Alinity i.
- L'Alinity M a été installé dans le laboratoire en mars 2019, nous avons projeté avec Abbott de faire une expertise sur les marqueurs de PCR CMV salivaire et PCR CMV dans le liquide amniotique lorsque le test de PCR CMV aura le marquage CE soit fin 2019 début 2020

2) Les enquêtes et études

-Le protocole CYMEPEDIA (NCT01923636) se terminera fin 2019 (voir chapitre 61) L'objectif principal devrait être exploitable en 2019-2020 de même que les objectifs secondaires 2.3 et 4 en cours de réalisation.

-L'étude de la pharmacocinétique du Letermovir va faire l'objet d'un approfondissement en 2019 en partenariat avec Merck qui devrait fournir des comprimés de Letermovir qui sera utilisé pour évaluer le passage transplacentaire au 2ème trimestre chez des patientes ayant une interruption médicale de grossesse.

-Protocole CYMEVAL III.

Ce protocole a été accepté au PHRC 2018 et devrait commencer en 2020. L'investigateur principal est le Pr Yves Ville, la responsable scientifique est le Dr Marianne Leruez-Ville.

Il s'agit d'un essai randomisé, en double aveugle qui inclura des mères présentant un fœtus infecté après infection maternelle du premier trimestre. Dans le bras comparateur, les mères des fœtus infectés seront traitées par 8g/j de valaciclovir, dans l'autre bras elles seront traitées par 240 mg/jour de Letermovir. Le traitement sera instauré du diagnostic de l'infection fœtale jusqu'à la naissance ou l'interruption médicale de grossesse. L'objectif principal est d'obtenir une charge virale négative par PCR CMV dans le sang du cordon ou dans le sang néonatal. L'étude de l'émergence éventuelle de résistance des souches sera faite par le Pr Alain à Limoges.

Laboratoire associé herpes cutanéomuqueux la Pitié Salpêtrière :

- Journée scientifique d'information sur les alphaherpèsvirus

Organisation par le laboratoire associé Pitié-Salpêtrière

Vendredi 14 juin 2019 à l'hôpital Pitié-Salpêtrière (cf programme joint)

- Etude nationale concernant les atteintes neuroméningées par les alphaherpèsvirus : virus herpes simplex 1 (HSV-1), virus herpes simplex 2 (HSV-2) et virus de la varicelle et du zona (VZV)

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur les années 2014 à 2018 à laquelle ont accepté de participer 50 centres français participant en France métropolitaine et d'Outre-Mer. Il s'agira d'une étude en 2 étapes :

- Recueil des données épidémiologiques, cliniques, virologiques, diagnostiques et thérapeutiques
- Envoi au laboratoire de la Pitié-Salpêtrière des LCS encore disponibles dans les congélateurs (reliquats d'échantillons) pour analyses moléculaires virales et identifications de biomarqueurs de ce type d'infection

Laboratoire référent EBV Grenoble

- Un des objectifs principaux du laboratoire de Grenoble est de trouver un financement pour la mise en place d'une activité de surveillance de la mononucléose infectieuse afin:

- i) d'évaluer le nombre de MNI mais également l'âge des patients et le nombre de cas compliqués nécessitant une hospitalisation voire une hospitalisation en soins intensifs ;
- ii) de décrire ces formes très symptomatique et/ou graves d'un point de vue clinique et biologique ;
- iii) d'évaluer le devenir des patients concernés. Pour les formes graves, l'objectif serait également d'obtenir un échantillon de sérum et de pouvoir conserver une souche du virus par l'établissement d'une lignée lymphoblastoïde à partir d'un échantillon de salive ou de sang total. Ces lignées et ces souches permettraient de développer des études plus fondamentales, comme par exemple la caractérisation génétique de ces souches.

Ce projet dont le protocole est rédigé et les partenaires identifiés, est actuellement en attente d'un financement.

-Enquêter sur les pratiques

Un second objectif serait de répertorier les différents protocoles de gestion des infections à EBV chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques dans les différents centres français

-Développer une activité de séquençage du génome EBV (gène de latence EBNA5, LMP-1 et gène lytique BZLF1 (protéine zebra), BALF4 (glycoprotéine gB) BXLF2, BKRF2 (glycoprotéines gH/gL)

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière et CNR limoges (HHV6)

- Mettre en place un observatoire des infections à HHV-6, c'est-à-dire recenser les infections, les critères retenus pour affirmer l'infection, les signes cliniques, le type de virus en cause
- Faire un recensement des ciHHV-6 dépistés : le contexte clinique, le type de virus
- Apporter un conseil ou une aide au diagnostic et/ou à la prise en charge des infections à HHV-6

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière (HHV6)

Nous allons continuer à confirmer la présence de forme intégrée de HHV-6 et identifier l'espèce en cause.

Un programme de comparaison/évaluation de nouvelles méthodes disponibles sur le marché pour analyser leur sensibilité et spécificité pour la détection et/ou la quantification du HHV-6 dans les différentes matrices utilisées en routine. En particulier, évaluation des méthodes multiplex notamment FilmArray® panel méningite / encéphalite des laboratoires Biomérieux.

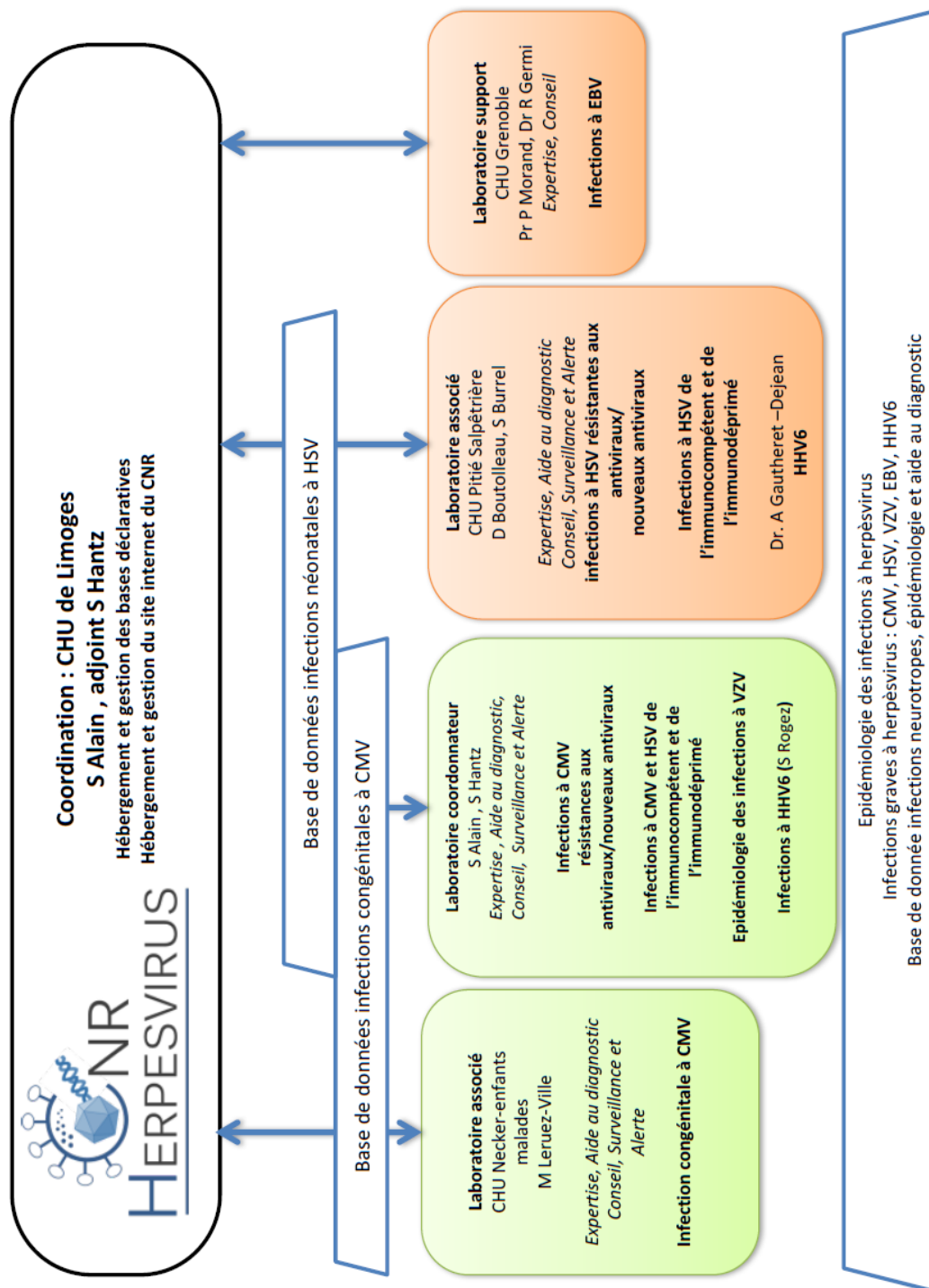
Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

1. Expertise
<ul style="list-style-type: none">- identifier et caractériser les souches virales par techniques de biologie moléculaire- typer et caractériser les souches de CMV, HSV1 et HSV2 responsables d'infections materno- fœtales et d'infections chez les immunodéprimés ;- développer une expertise sur la résistance des Herpesvirus aux antiviraux et des tests phénotypiques et génotypiques de résistance aux antiviraux et diffuser des méthodes de détection actualisées aux laboratoires demandeurs ;- apporter une aide au diagnostic des infections à CMV, HSV1 et HSV2, assurer notamment la mesure de l'avidité des IgG spécifiques du CMV dans le sérum dans le cadre du diagnostic et de la prise en charge des femmes enceintes, des nouveau-nés et des immunodéprimés ;- évaluer les trousse diagnostiques, mettre en place un contrôle de qualité inter-laboratoire pour le diagnostic moléculaire des infections herpétiques neuro-méningées.
2. Conseil
<ul style="list-style-type: none">- apporter son expertise aux autorités de santé notamment pour les questions relatives au dépistage du CMV chez les femmes enceintes ;- conseiller les cliniciens et les biologistes concernant le diagnostic des infections graves à Herpesvirus ;- contribuer, le cas échéant, à des études épidémiologiques portant sur les Herpesvirus : infections graves liées aux HSV ou au CMV, infections neuro-méningées dues aux autres Herpesvirus (varicelle, HHV- 6, EBV).
3. Contribution à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'agence nationale de santé publique
<ul style="list-style-type: none">- par la production de connaissances épidémiologiques en France concernant les infections à CMV chez les immunodéprimés et les infections materno-fœtales à Herpesvirus (CMV, HSV1 et HSV2), en particulier par le recensement des infections néonatales liées aux HSV ;- par le suivi de la résistance aux antiviraux des souches isolées chez les immunodéprimés (transplantés et receveurs de cellules souches hématopoïétiques, lymphomes, etc.) ;- en participant au réseau de surveillance européen des génotypes et des résistances aux antiviraux.
4. Contribution à l'alerte
<ul style="list-style-type: none">- pas d'exigences particulières par rapport au cahier des charges général.

Les missions de ce nouveau CNR Herpesvirus sont orientées en priorité sur le CMV et les HSV. Elles correspondent à un élargissement des missions précédemment assurées par le CNR des Cytomégalo virus pour les HSV, et à de nouvelles missions concernant les infections graves, essentiellement neuro-méningées, dues aux autres Herpesvirus. La mission de coordination reste assurée par le laboratoire de virologie du CHU de Limoges.

L'organigramme suivant résume l'organisation du CNR et les missions plus particulièrement dévolues à chaque laboratoire.



1.1 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Laboratoire coordonnateur Limoges

Plusieurs changements de technicien au niveau du CNR, avec nécessité de former les différentes personnes, au détriment du développement de nouvelles techniques.

Modification de la fiche de poste de V Tilloy désormais totalement dédiée à la bioinformatique, au sein de la plate-forme de génomique médicale du CHU pour assurer la sécurité des données patients et développer la bioinformatique notamment en microbiologie. Ceci pourrait permet d'ouvrir la plate forme à des demandes extérieures, notamment d'autres CNRs ou de laboratoires partenaires.

Médecins biologistes :

Sophie ALAIN, PU-PH, 0,3 ETP, coordonne le CNR, assure la responsabilité de l'UF de génomique médicale du CHU, Sébastien HANTZ MCU-PH 0,2 ETP. Co-directeur du CNR

Ingénieurs :

1 ETP CDD financé sur les crédits MIG CNR : Melissa GOMES-MAYERAS

En charge des recherches de résistance des évaluations techniques et du développement des techniques NGS ainsi que de la formation des autres laboratoires. Gère la biothèque du CNR et l'interface avec CRBioLim.

1 ETP CDD Ingénieur bioinformaticien en charge de la plate-forme de séquençage VALENTIN TILLOY depuis juillet 2016 **financé sur la MIG CNR mais disponible à 0,5 ETP pour le CNR :** en charge du développement des techniques de séquençage nouvelle génération avec M Gomes et de la mise en ligne et de l'entretien de la base de données de résistance sur le nouveau site internet.

1,3 ETP Attachés de recherche clinique/Ingénieurs : financés sur les crédits MIG CNR pour gestion des cohortes, bases de données, qualité et CRBioLim

Françoise GARNIER (0,5,ETP CDI), rémunérée par les PHRC Nationaux du Pr ALAIN depuis 2006, financée par la MIG CNR depuis 2017. Surveillance des résistances et bases de données cliniques sur la résistance, enquêtes du CNR en greffe de cellules souches, responsable qualité du CNR.

Elodie RIBOT (**passage de 0,5 à 0,8 ETP CDD**), Surveillance des infections congénitales à CMV et des infections néonatales à HSV, gestion des bases de données correspondantes, responsable de la collection du CNR dans CRBioLim.

Eliza MUNTEANU (0,5 ETP CDD) Surveillance des résistances et marqueurs immunologiques en transplantation d'organe. Enquêtes du CNR en transplantation d'organe.

Techniciens :

1 ETP Technicien CDD financé sur la MIG CNR Maladies transmissibles Remplacement de J FIAMETTI par Mathieu LAFARGE fin 2018. génotypes de résistance, test Quantiferon, aide aux évaluations de nouvelles techniques.

Technicien 0,5 ETP CDI financé par l'INSERM : depuis avril 2015, N PLAUT en charge des virus recombinants et de l'entretien des modèles *ex vivo* et *in vivo* en souris SCID. Aide à la mise en œuvre de l'accréditation coté INSERM.

Doctorants : Financés par Inserm et Université de Limoges

2016-2019 Chloé JACQUET : modèles *ex vivo* et *in vivo* d'infection congénitale et tests de nouveaux antiviraux/anticorps

Laboratoire associé Necker :

Le laboratoire associé France Nord Hôpital Necker-Enfants malades est intégré dans le laboratoire de bactériologie-Virologie-Parasitologie-Hygiène de l'Hôpital Necker.

Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés

Le laboratoire associé Hôpital Necker-Enfants malades est intégré dans le laboratoire de Microbiologie Clinique de l'Hôpital Necker.

Personnel affecté au CNR***Médecin biologiste : 0,8 ETP**

Dr Marianne Leruez-Ville : Praticien Hospitalier temps plein – Hôpital Necker-Enfants-Malades Assistance Publique de Paris –EHU PACT Université Paris-Descartes, Imagine et qui consacre 30% de son temps au CNR et est entièrement rémunérée par l'hôpital.

Dr Hanène Adib : Praticien Hospitalier Attaché qui a 5 vacations financées par les MIG versées à l'hôpital Necker dans le cadre du CNR.

Technicien : 1 ETP

Mme Tiffany Guillemot occupe le poste rémunéré par le budget propre du CNR depuis septembre 2009 (subvention InvS). Depuis octobre 2017 Melle Guillemot a été recrutée en CDI et est rémunérée sur les dotations MIG versées à l'hôpital Necker. Mme Guillemot consacre 100% de son temps au CNR : réalisation des PCR CMV sur Guthries, sur salive, des sérologies CMV, des expertises de trousse sérologiques CMV ou de biologie moléculaire CMV, récupération et saisies des données de déclaration de cas, biothèque du CNR.

Laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière

Dr David BOUTOLLEAU (MCU-PH) (responsable scientifique du laboratoire associé) : 0,3 ETP

Dr Sonia BURREL (MCU-PH): 0,3 ETP

Techniciens AP-HP : 1,3 ETP

(cf dossier de candidature)

Laboratoire de Grenoble :

personnel participant aux fonctions de laboratoire support

Dr R Germi, MCU-PH, laboratoire de virologie, institut de biologie et pathologie CHU de Grenoble

Dr J Lupo, MCU-PH, laboratoire de virologie, institut de biologie et pathologie CHU de Grenoble

Pr P Morand, PU-PH, laboratoire de virologie, institut de biologie et pathologie CHU de Grenoble

Mme L Grossi, technicienne de recherche, rémunérée par l'université Grenoble Alpes participe à la gestion des biothèques et au recueil des échantillons et des données.

1.2 Locaux et équipements

1) Le laboratoire coordonnateur du CNR est intégré dans le service de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges (414m²), Il est adossé pour la partie recherche à l'équipe de recherche du service labellisée UMR Inserm 1092 en 2011.

- **En 2018 intégration d'un automate de sérologie Alinity Abbott, remplacement de la chaine de biologie moléculaire ABOTT M2000 par un Panther (Hologic) et élargissement de l'offre au niveau de l'UF de génomique médicale par acquisition d'un équipement de PCR Digitale Biorad Quant studio pour l'UF de Génomique médicale du CHU et d'un séquenceur S5 (Ion Torrent Life technologies) depuis fin 2018, mis en fonction en 2019.**

Un même bâtiment, le Centre de Biologie et de Recherche en Santé CRBS, regroupe des équipes INSERM et des laboratoires de Biologie, ainsi que le Service Commun de Génomique de l'Université et l'UF de génomique du CHU (une seule structure bipartite). Les locaux du laboratoire de microbiologie (bactériologie, virologie, parasitologie) intégrant ceux du Laboratoire CNR CMV et du Laboratoire associé au CNR Toxoplasmoses sont ainsi regroupés, favorisant les échanges.

Ces locaux sont un laboratoire de microbiologie type P2, avec un laboratoire de niveau L3 regroupant trois laboratoires (Virologie, Biotox et mycobactéries) intégré dans le laboratoire P2 et une pièce dédiée aux CNRs.

Equipement du laboratoire utilisé dans le cadre des activités du CNR :

Sérologie :

2 laboratoires

- automates : Alinity (ABBOTT), 1 Vidas (bioMérieux), 1 Liaison XL Diasorin et un automate ETI Max Diasorin

Cultures cellulaires :

2 laboratoires

- postes de sécurité
- containers d'azote liquide dont un réservé à la **souchothèque du CNR**

Biologie moléculaire :

Secteur séparé du reste du laboratoire et organisé selon le circuit classique séparant physiquement les étapes de pré-amplification (1pièce), d'extraction d'ADN (laboratoire Haute Sécurité) et d'amplification (1pièce) et de post-amplification (3 pièces, pour les électrophorèses, les techniques hybridations, et le séquençage).

Il possède :

- Un poste de sécurité, deux séquenceurs sur gel (Visible genetics-Siemens pour le génotypage VHB et le génotypage de résistance du CMV)
- thermocycleurs, **dont un réservé aux activités du CNR**
- appareils de PCR en temps réel : Light cycler 1.0 (Roche) et 2 Rotor Gene (Qiagen) sur lequel sont effectuées les mesures de charge virales sanguines au cours des infections à CMV, mais aussi EBV, HHV6, BKV...
- Une chaîne d'extraction-amplification Hologic destiné à la mesure des charges virales VIH, VHB, VHC et au diagnostic des infections à *C. trachomatis*, utilisable également comme chaîne d'extraction d'acides nucléiques.
- Des locaux d'extraction spécialisés incluant deux PSM 2 et deux automates Easy-Mag

Espace de stockage des souches et des prélèvements du CNR : 2 pièces congélateurs et 1 local azote, sous alarme

- congélateurs à -80°C dont 2,5 réservés à la **Biothèque du CNR**
- 1 congélateur à -30°C réservé à l'**ADN thèque et à la sérothèque du CNR**
- containers d'azote liquide dont un réservé à la **Souchothèque du CNR**

CRB : Les locaux du CRBioLim sont intégrés aux locaux du laboratoire de Virologie pour la collection du CNR. Les congélateurs du laboratoire sont sous surveillance permanente d'un système d'alarme relié à un PC. Un dédoublement des collections de souches et d'échantillons de sang total est en cours, du fait d'un stockage dédié au sous-sol du nouveau bâtiment.

Séquençage classique et NGS :

Le CNR dispose d'un accès continu à l'Unité de séquençage que dirige le Pr S Alain avec les deux ingénieurs E Guerin (CHU) et Valentin Tilloy (Bioinformaticien MIG CNR) : (Matériel commun aux laboratoires du CHU et de la Faculté de Médecine et de Pharmacie, et des Sciences) tant pour le séquençage classique et depuis fin 2012 pour le séquençage nouvelle génération.

Cette unité est localisée au 2eme étage du CBRS côté CHU

- Un séquenceur ABI monocapillaire dédié au typage moléculaire

- **Un séquenceur 3500 XL Dx 24 capillaires CEIVD en remplacement du 16 capillaires à partir de 2017 pour les analyses génotypiques par méthode Sanger**
- Un appareil de chromatographie ADN haute performance
- **Un séquenceur haut débit Proton (Life Technologies) depuis décembre 2012. Il est accessible aux équipes hospitalières et universitaires depuis avril 2013.**
- **Un séquenceur S5 (Ion Torrent Life technologies) depuis fin 2018, mis en fonction en 2019.**
- **Un préparateur de Librairies AB Library Builder (Life Technologies) depuis 2015 au sein du laboratoire de virologie, avec une enceinte ADN.**
- Un **préparateur de Librairies** ouvert **Biomek Beckman** depuis décembre 2016.
- Un séquenceur **long range « minion »** CNR depuis décembre 2016.
- **Fin 2017 : Un Miseq Illumina**
- **2018 : PCR Digitale Quant Studio Biorad**

Le laboratoire de Virologie de Necker est intégré au laboratoire de Microbiologie (Bactériologie-Virologie-Parasitologie-Hygiène). L'ensemble du laboratoire occupe 350 m² utiles incluant des locaux dédiés spécifiquement à la virologie : techniques moléculaires (en respectant les règles strictes de trois pièces séparées pour la réalisation des techniques d'amplification) et cultures virales (dont un local de type L2 en dépression avec sas). La sérologie virale est réalisée depuis septembre 2012 dans le Laboratoire à réponse rapide (LRR) de l'hôpital qui est situé dans les locaux du laboratoire de Biochimie et qui est doté d'une chaîne d'automatisation Abbott, d'un Architect i2000 et d'un Liaison XL. Le plateau technique inclut tout l'équipement nécessaire au fonctionnement d'un laboratoire de Virologie, à savoir :

-Hottes à flux laminaire Biohazard, incubateurs pour culture, microscopes inversés, microscopes UV, système informatique d'acquisition et stockage d'images de microscopie.

-Equipement de sérologie : 2 automates Architect ABBOTT et LIAISON XL Diasorin, 1 Mini-Vidas BioMérieux, des incubateurs, laveurs de microplaques, spectrophotomètres

-Centrifugeuses, ultracentrifugeuses.

-Thermocycleurs, matériel pour électrophorèses.

-Une chaîne de biologie moléculaire BioMérieux : 3 EMag, 1 Estream et 4 thermocycleurs 7500 (Applied Biosystem)

-Deux autres appareils d'extraction des acides nucléiques : 1 MagNaPure Compact (Roche Diagnostic), 1 EasyMag (BioMérieux).

-Deux autres appareils de PCR en temps réel : 2 CFX96 Real Time system (BIORAD)

-Un AlinityM qui sera mis en production en avril 2019

-Chambres froides, congélateurs (- 30°C et - 80°C)

-Accès continu au service de séquençage de l'Hôpital situé au niveau d'un plateau technique commun équipé d'un séquenceur ABI prism (16 capillaires)

-Accès à un séquenceur haut débit sur la plateforme de l'Hôpital (MiSeq, Illumina)

Laboratoire de Grenoble

- Le laboratoire de Virologie de Grenoble est intégré au « département » des agents infectieux (Virologie bactériologie Hygiène parasitologie Mycologie) de l'institut de biologie et pathologie du CHU de Grenoble. Le département occupe environ 1500 m².
- Le matériel d'analyse du laboratoire de virologie comprend
- Hottes à flux laminaire Biohazard, incubateurs pour culture, microscopes inversés,
- Equipement de sérologie : 1 automate Architect ABBOTT, 1 Vidas bioMérieux, 3 automates de lecture de microplaques-spectrophotomètres (BEP, Siemens), 1 distributeur Tecan et des microscopes UV.

- Centrifugeuses,
- Thermocycleurs.
- Une chaîne de biologie moléculaire bioMérieux : 1 EMag ; 1 Easymag , 1 Estream et 3 thermocycleurs LC480 (Roche)
- Une chaîne de biologie moléculaire COBAS 4800 (Roche Diagnostic)
- Un automate de biologie moléculaire (extraction + PCR BDMax (BD)
- Chambres froides, congélateurs (- 30°C et – 80°C)
- Un séquenceur CEQ8000, Beckman
- Un FilmArray bioMérieux

1.3 Collections de matériel biologique

Laboratoire CNR Limoges

Les collections du CNR sont progressivement intégrées Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges CRBioLim certifié NF S96-900 (N°140787/1258F) pour pouvoir être cédées ou utilisées à des fins d'évaluation ou de collaboration. Les autres échantillons sont conservés dans la collection biologique du CNR au laboratoire (N°: DC 2008_604). Les échantillons cliniques et souches issues de l'activité du laboratoire sont progressivement intégrées aux collections du CNR puis au CRBioLim. Les souches virales et les échantillons du protocole OrPhaVic et les souches isolées ou reçues pour recherches de résistance conservées au laboratoire Saint Louis sont en cours de transfert vers le CHU de Limoges . La mise à disposition se fait via le CRBioLim par création d'une sous collection et cession. **(Responsable de collection S Alain et gestionnaire E RIBOT)**

Biothèque transférée progressivement vers la collection du CNR au sein du CRBioLim après vérification de non opposition :

- Souches d'HSV, de VZV isolées pour typage ou reçues pour phénotype de résistance antérieures à la création du CRBioLim, qui sont progressivement intégrées à la collection du CNR

Biothèque spécifique du CNR pouvant être utilisée à des fins d'expertise et conservées dans la collection du CNR au CRB CRBioLim

- 800 sangs totaux CMV positif ou négatifs aliquotés et mis en collection biologique pour les évaluations de trousse de PCR.
- 400 échantillons de sérum adressés pour primo-infection et dont les caractéristiques (IgG et IgM et avidité des IgG) sont connues. Ces sérums sont conservés à -20°C.
- 129 Echantillons de sérums de primo-infection ou de réactivation positifs pour la recherche d'IgM provenant de l'hôpital Charles Nicolle à Tunis reçus en 2009 caractérisés en 2010 pour les glycoprotéines d'enveloppe gB gH gN.
- 50 urines de nouveaux-nés positives pour la recherche de CMV par culture
- **1772** salives d'enfants en crèche (PHRC Crech MV) dont 663 positives en PCR CMV et 212 caractérisées pour leur génotype gB, gH et gN.
- 62 échantillons couplés de salive et de sérum prélevés sur volontaires sains, caractérisés pour la recherche du CMV salivaire et des anticorps sériques et salivaires issus du protocole ACMV.
- **1152** prélèvements spécifiques pour recherche de résistance de 2006 à 2016 caractérisés pour la séquence des gènes *UL97* et *UL54* dont 36 également caractérisés pour les glycoprotéines d'enveloppe gB, gH , gN.
- **3618** prélèvements issus de l'Observatoire des résistances 2006-2010
- **6139** prélèvements issus des 402 patients inclus dans ORPhaViC
- **1785** prélèvements de plasma ou de sang total issus du protocole Quantic R+

Souchothèque : Cellules infectées conservées en azote liquide. Et répertoriées au CRB CRBioLim.

Souches de référence : AD169, Towne, Toledo, Davis et Merlin (ATCC)

33 souches recombinantes HCMC Bacmids, marquées à la GFP, portant des mutations de résistance au ganciclovir, au cidofovir, ou au Foscarnet, au maribavir ou au letermovir ou des polymorphismes.

Un total de 294 isolats cliniques parmi lesquels :

- 60 souches à tropisme endothélial isolées d'urines de nouveau-né atteints d'infection congénitale à CMV provenant du CNR et de laboratoires extérieurs dont 10 caractérisées pour la séquence de leur génome entier par séquençage haut débit sur Ion Proton.
- 16 Souches à tropisme endothélial isolées de liquide amniotique ou de fœtus
- 72 souches à tropisme endothélial isolées essentiellement en 2008 de la salive d'enfants de moins de trois ans (protocole FreChMV)
- 17 souches de patients transplantés caractérisées pour leur phénotype de résistance au ganciclovir, cidofovir et foscarnet dont 6 pour leur sensibilité au maribavir
- Parmi ces souches 41 sont caractérisées pour leur génotype gB, gH et gN (21 souches d'infection congénitale à CMV), 25 pour la séquence des gènes-cible des antiviraux (UL97, UL27, UL54, UL56, UL89, UL104) et le génotype gB

Laboratoire associé Necker :

La biothèque du CNR de Necker est intégrée au centre de ressources Biologiques de l'Hopital Necker Enfants malades Necker (BB-033-00065).

Biothèque propre du laboratoire de Virologie de Necker pouvant être utilisée dans le laboratoire à des fins d'expertises :

- **Environ 3000 échantillons (0.5 à 2 ml) de sang total PCR CMV positive** conservés à -80°C

Biothèque spécifique du CNR constituée de 2006 à 2017

- Souchothèque : cellules MRC5 infectées conservées à -80°C: **298 souches** (3 aliquots par souche) responsables d'infection materno-fœtale isolées de liquide amniotique ou d'urine de nouveau-nés.
- **1653 prélèvements de liquides amniotiques** testés en PCR CMV dont **290 positifs**. Ces prélèvements sont conservés à -80°C
- **137 prélèvements de sang fœtal total positifs** conservés à -80°C.
- **270 échantillons d'urine PCR CMV positive** conservés à -80°C
- **13200 échantillons salivaires** obtenus de nouveau-nés et caractérisés en PCR CMV dont environ **790 positifs en PCR CMV**. Ces prélèvements sont conservés à -80°C
- **600 échantillons de sérum** obtenus chez des femmes enceintes en primo-infection et dont les caractéristiques (IgG et IgM et avidité des IgG) sont bien répertoriées. Ces sérums sont conservés à -20°C
- **1200 échantillons de sang séché sur carton de Guthrie** caractérisés en PCR CMV : dont 1019 PCR CMV négative provenant de nouveau-nés non infectés et **150 PCR CMV positive** obtenus de nouveau-nés infectés par le CMV. Ces échantillons sont conservés à température ambiante

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière :

La biothèque du laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière comprend l'ensemble des prélèvements biologiques positifs en PCR HSV et en PCR VZV (depuis 2012) ainsi que l'ensemble des souches de HSV-1, HSV-2 et VZV isolées en culture cellulaire (depuis 2010). Pour l'année 2018, cela représente près de 2500 prélèvements (LCS, LBA, prélèvements cutanéomuqueux, prélèvements génitaux, prélèvements oculaires, LBA ...) et 250 souches virales (HSV et VZV). Ceci inclut en particulier l'ensemble des prélèvements/souches testés au laboratoire pour la recherche de résistance aux antiviraux.

Laboratoire de Grenoble :

La biothèque du laboratoire de virologie de Grenoble (Collection déclarée DC2008680) est intégrée au centre de ressources Biologiques du CHU de Grenoble

La biothèque du laboratoire de virologie de Grenoble comprend des sangs totaux, des sérums des plasmas de salives conservées à -80°C et dont les volumes vont de 0.2 à 1.5 mL. Elle comprend aussi des lignées lymphoblastoïdes qui permettent de conserver les souches virales et qui sont conservées dans l'azote liquide. Cette biothèque comprend environ 3000 échantillons.

1.4 Démarche qualité du laboratoire

Le Laboratoire de Biologie du CHU de Limoges est accrédité COFRAC depuis 2014. La mesure de la charge virale CMV par PCR quantitative sur sang total, la sérologie VIH sur Architect et la mesure de la charge virale VIH sur automate M2000 ont été accréditées en 2016. **En 2018 ont été accréditées les analyses quantitatives de charge virale du VIH, VHB, VHC et la détection des *chlamydia* et gonocoques par les techniques de TMA Hologic. La prochaine visite est prévue en 2019 avec extension de portée aux autres PCR Herpesvirus et accréditation des sérologies virales sur Liaison XL et transfert de méthode sur Alinity.** Le laboratoire participe aux contrôles de qualité externes du QCMD (Européen) et du CTCB (Français) ce qui permet de couvrir l'ensemble des activités de virologie et du CNR (charges virales CMV, EBV, HSV, VZV, génotypes HSV, CMV sur plasma, sang total et DBS), ainsi qu'à différents contrôles interlaboratoires (**PCR HSV et génotype HSV organisés par le laboratoire associé Pitié Salpêtrière**, charge virale BK virus, etc...).

Le laboratoire de microbiologie de Necker participe à des contrôles de qualité externe en sérologie (contrôles CTCB, RCPAQAP pour les sérologies CMV dont l'avidité) et en biologie moléculaire (contrôle du QCMD pour tous les marqueurs de biologie moléculaire testés dans le laboratoire et notamment la PCR CMV sur sang total, sur plasma et sur DBS).

Le laboratoire est accrédité pour la biologie moléculaire (technique d'ARN VIH sur plasma depuis 2014 et pour les PCR HBV et HCV depuis 2016, technique de **PCR CMV sur sang total depuis 2018**. **Le laboratoire est accrédité pour la sérologie virale** (sérologie des hépatites et du VIH depuis septembre 2017 sur l'automate Architect (Abbott), sérologie CMV (IgG, IgM, Avidité des IgG) sur Liaison XL depuis 2018. L'avidité des IgG sur Vidas fait l'objet d'une extension de portée en 2019.

Le laboratoire de Grenoble est accrédité pour la PCR EBV. La sérologie EBV VIDAS est en cours d'accréditation (2018)

Participation à des contrôles de qualité externe

-sérologie : LabQuality (IgG + IgM + Avidité : CMV : HSV VZV EBV CMV) et CTCB (IgG HSV VZV IgG + IgM EBV CMV).

-biologie moléculaire : QCMD : EBV Whole Blood, EBV DNA, CMV Whole Blood, HHV6 DNA, HSV DNA, VZV DNA.

-Echange interlaboratoires (EIL) :

→ Dépistage des infections neuroméningées dues aux Herpesvirus humains (HHV) par biologie moléculaire sur liquide cébrospinal (LCS) : Organisé par le laboratoire de virologie de la Pitié Salpêtrière

→ Détection moléculaire de l'HHV8 dans le sang total : organisé successivement par le laboratoire de virologie du CHU de Toulouse, le laboratoire de virologie du CHU de Grenoble et le laboratoire Biomnis à Lyon.

Le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière participe à différents programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ) pour :

- Les sérologies Herpesvirus : contrôles du CTCB, de l'ANSM, du RCPAQAP
- La détection/quantification des génomes des Herpesvirus : contrôles du QCMD
- La résistance génotypique des HSV et du CMV aux antiviraux : contrôles du QCMD

Par ailleurs, le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière organise chaque année 2 contrôles externes de la

qualité au niveau national :

- Un EEQ pour la biologie moléculaire des Herpesvirus
- Un EEQ pour la résistance génotypique et phénotypique des HSV-1 et HSV-2 aux antiviraux

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1 CMV

	Laboratoire Coordonnateur	Laboratoire associé Necker	Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière
Techniques sérologiques			
Détection des IgG	LIAISON® CMV IgG II (Dia Sorin) Architect (ABBOTT)	LIAISON® CMV IgG II (Dia Sorin) VIDAS® CMV IgG (bioMérieux)	LIAISON® CMV IgG II (Dia Sorin) Architect (ABBOTT)
Mesure de l'avidité des IgG	LIAISON® CMV IgG II Avidity (Dia Sorin) Architect (ABBOTT) VIDAS® CMV IgG Avidity II (bioMérieux)	LIAISON® CMV IgG II Avidity (Dia Sorin) VIDAS® CMV IgG Avidity II (bioMérieux)	VIDAS® CMV IgG avidity II (BIOMERIEUX)
Détection des IgM sériques	LIAISON® CMV IgM II (Dia Sorin)	LIAISON® CMV IgM II (Dia Sorin)	LIAISON® CMV IgM II (Dia Sorin)
Tests immunologiques	Quantiféron CMV (Qiagen) Mesure de la réponse immune CD8 spécifique du CMV		
Techniques de biologie moléculaire			
Mesure de la charge virale par PCR temps réel	- CMV-R gene (bioMérieux) - PCR quantitative « maison » en place depuis 2005, (adaptée de Mengelle et al., J Med. Virol. 2003) utilisée comme deuxième technique en duplex avec PCR albumine (Wagner et al., 2011). - PCR quantitative « maison » dans le gène gH développée en 2009 par le laboratoire CNR. (Grosjean et al., RICA1 2009)	CMV R gene (bioMérieux) -PCR quantitative développée et validée dans le laboratoire depuis 2001 et utilisée en 2 ^{ème} technique si besoin ainsi que pour la PCR sur carton de Guthrie (<i>Leruez-Ville M et al. J Clin Microbiol, 2003 ; Leruez-Ville et al. J Clin Microbiol, 2008</i>)	Artus® CMV QS-RGQ (QIAGEN)
Applications :	<ul style="list-style-type: none">-Diagnostic pré-natal de l'infection congénitale à CMV (sur échantillon de liquide amniotique ou sang fœtal)-Diagnostic néonatal de l'infection congénitale à CMV (sur échantillon de sang frais, d'urines ou de salive)-Diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale à CMV sur échantillon de sang séché sur carte de Guthrie (Vauloup-Fellous, J Clin Microbiol, 2007 ; Leruez-Ville, CID, 2011).-Recherche et quantification du CMV par PCR dans le sang maternel avant amniocentèse- Suivi des charges virales chez les immunodéprimés		-Suivi des charges virales chez les immunodéprimés
Techniques de culture			
Applications	Isolement et identification des souches de CMV responsables d'infection congénitales à partir des urines du nouveau-né, ou du liquide amniotique		
	Isolement et identification des souches de CMV responsables d'infections chez les transplantés et antivirogramme		Isolement et identification des souches de CMV responsables d'infections chez les transplantés et antivirogramme

Génotypes de résistance et marqueurs épidémiologiques permettant le typage des souches, l'identification de clusters et l'identification des souches transmises lors de cas groupés

Marqueurs	Laboratoire coordonnateur	Laboratoire associé Necker-Enfants-malades	Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière
Génotype gB Génotype gH Génotype gN Génotype <i>UL144</i> Analyse des microsatellites Analyse du profil UL10-11-12-13 Polymorphisme des séquences de jonction « a »	+ ^h + ^h + ^h + + +	+ + + +	
Génotypage de résistance au ganciclovir, cidofovir foscarnet (UL97-UL54) maribavir (UL97-UL27), letermovir (UL56-UL89).	Séquençage Sanger sur 3500xl Dx genetic analyzer (CEIVD) <i>UL97, UL54^{a,b}</i> <i>UL27^c</i> <i>UL56 et UL89^{d,e}</i>		Séquençage Sanger sur ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer <i>UL97, UL54^f</i> <i>UL56 et UL89^g</i>

Caractères gras : méthodes accréditées Cofrac

Méthodes publiées : a : Alain et al, Virmet 2004 ; b : Hantz et al., JAC 2010 ; c : Hantz et al., Antiviral Ther. 2009 ; d,e : Champier et al., Antivir Ther. 2007, Champier et al., Antivir Ther. 2008 ; f : Boutolleau et al., Antiviral Res, 2009 ; Boutolleau et al., Antiviral res, 2011 ; g : Pilorgé et al., Antiviral Res, 2014 ; h : Grosjean et al. J clin Virol. 2014.

2.1.2 HSV

Techniques	Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière	Laboratoire coordonnateur Limoges
Détection semi-quantitative des IgG HSV-1 et HSV-2 Détection semi-quantitative des IgM HSV-1 et HSV-2 Détection semi-quantitative des IgG spécifiques HSV-1 Détection semi-quantitative des IgG spécifiques HSV-2	Liaison® XL HSV-1/2 IgG (DiaSorin) Liaison® XL HSV-1/2 IgM (DiaSorin) Liaison® XL HSV-1 IgG (DiaSorin) Liaison® XL HSV-2 IgG (DiaSorin)	Liaison® XL HSV-1/2 IgG (DiaSorin) Liaison® XL HSV-1/2 IgM (DiaSorin)
Applications	<ul style="list-style-type: none">- Détermination du statut sérologique vis-à-vis des HSV-1 et HSV-2- Diagnostic de primo-infection HSV-1/HSV-2- Diagnostic d'infection récurrente HSV-1/ HSV-2- Diagnostic sérologique de la primo-infection maternelle /néonatale HSV- Détermination du statut sérologique vis-à-vis du VZV	
Diagnostic virologique direct : PCR, culture cellulaire		
Détection et quantification du génome des HSV-1 et HSV-2	Simplexa HSV-1/2 (Focus) (urgence) artus HSV-1/2 QS-RGQ (Qiagen) (routine) Quantification du HSV dans les LBA par une méthode maison ^a	HSV 1/2 Smart Cyclor (Cepheid)/Multiplex HSV/VZV (Altona)
Applications	<ul style="list-style-type: none">- Diagnostic rapide des infections à HSV sur liquide céphalo-rachidien, humeur aqueuse (HA) ou vitrée, prélèvements génitaux des femmes en salle de travail, prélèvements de nouveau-né- Diagnostic des infections actives à HSV-1 ou HSV-2- Quantification de la charge virale HSV dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA) : intérêt pour la prise en charge thérapeutiques des patients intubés-ventilés (<i>Luyt et al., Am J Resp Crit Care Med, 2007</i>)- Quantification de la charge virale HSV dans le LCR ou HA pour suivi thérapeutique	
Isolement des souches de HSV en culture cellulaire	Isolement des souches virales en culture de cellules Vero et fibroblastes embryonnaires humains (MRC-5) Typage HSV-1/2 par immunofluorescence	Isolement des souches virales en culture de fibroblastes embryonnaires humains (MRC5) Typage HSV-1/2 par immunofluorescence
Applications	<ul style="list-style-type: none">- Isolement des souches cliniques de HSV-1 et HSV-2 à partir de prélèvements biologiques positifs en PCR : prélèvements cutané-muqueux, prélèvements génitaux, prélèvements respiratoires (LBA), liquides de ponction- Analyse phénotypique	

a : Burrel et al., J Virol Methods, 2012

Génotypage de résistance

Techniques	Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière	Laboratoire coordonnateur Limoges
Diagnostic de la résistance aux antiviraux		
Méthode génotypique	Séquençage Sanger sur ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer	Séquençage Sanger sur 3500xl Dx genetic analyzer (CEIVD)
Séquençage Sanger	gènes UL23 et UL30 ^b gènes UL5 et UL52 ^c	gènes UL23 et UL30 ^b
NGS	MiSeq Sequencing System (ILLUMINA)	Génome entier : Proton system (Ion Torrent)
Méthode phénotypique	Détermination de la résistance à l'aciclovir et au foscarnet par méthode de réduction du nombre de plages de lyse (antivirogramme)	Détermination de la résistance à l'aciclovir et au foscarnet par méthode de réduction du nombre de plages de lyse (antivirogramme)
Applications	- Identification des souches de HSV-1 et HSV-2 responsables d'infections résistantes aux antiviraux	

b : Burrel et al., Antimicrob Agents Chemother, 2010, ^cCollot et al., Antiviral Res, 2016

Ces différentes techniques diagnostiques sont évaluées par des contrôles externes de qualité dispensés par des organismes (QCMD, CTCB, ANSM) ou échangés entre laboratoires (EIL) au niveau national ou européen.

Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles permettant le typage et l'identification de souches

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière	Laboratoire coordonnateur Limoges
Séquençage de gènes : UL23 (TK) [HSV-1/2] UL30 (ADN polymérase) [HSV-1/2] UL5 (hélicase) [HSV-1/2] UL30 (primase) [HSV-1/2] UL42 (facteur de processivité) [HSV-1/2] ^d US4 (gG) [HSV-2] ^e US6 (gD) [HSV-2] ^e UL1 (gL) [HSV-2] ^e UL22 (gH) [HSV-2] ^e UL27 (gB) [HSV-2] ^e Séquençage du génome entier [HSV-1/2] ^f Polymorphisme des microsatellites du HSV-1 et du HSV-2 (analyse de longueur de fragments) ^g Identification du HSV-2 ancestral (HSV-2 variant : HSV-2v) ^e	Polymorphisme des gènes <i>(Séquençage Sanger sur 3500xl Dx genetic analyzer (CEIVD)) :</i> <ul style="list-style-type: none"> UL23 (TK) [HSV-1/2] UL30 (ADN polymérase) [HSV-1/2] Séquençage du génome entier sur isolat (NGS Ion Proton)

^dBurrel et al., Antiviral Res, 2012 ; ^eBurrel et al., J Virol, 2015 ; ^fBurrel et al., Mol Biol Evol, 2017 ; ^gDeback et al., J Clin Microbiol, 2009 ; Burrel et al., J Clin Microbiol, 2013 ; ^hBurrel et al., Mol Biol Evol, 2017

2.1.3 VZV

Méthode Diagnostique	Laboratoire associé Pitié salpêtrière	Laboratoire Coordonnateur Limoges
Sérologique	LIAISON® VZV IgG (DIASORIN) LIAISON® VZV IgM (DIASORIN)	LIAISON® VZV IgG (DIASORIN) LIAISON® VZV IgM (DIASORIN)
PCR qualitative (PCR en temps réel)	Simplexa® VZV Direct Kit (DIASORIN)	VZV R gene (BioMérieux)/ Multiplex HSV/VZV (Altona)
Charge virale (PCR en temps réel)	Quantification du VZV par une méthode maison ^a	
Culture cellulaire	Isolement des souches virales en culture de cellules Vero et MRC5 Antivirogramme (aciclovir et foscarnet) ^b	Isolement des souches virales en culture de cellules MRC5
Résistance génotypique aux antiviraux	Séquençage des ORF28 et ORF36 ^b → ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS) → MiSeq Sequencing System (ILLUMINA)	Séquençage des ORF28 et ORF36 ^b <i>Séquençage Sanger sur 3500xl Dx genetic analyzer (CEIVD)</i>
Marqueurs épidémiologiques (polymorphisme génétique)	Caractérisation des souches de VZV : souche vaccinale/sauvage <ul style="list-style-type: none"> PCR en temps réel différentielle ciblée sur l'ORF62 Identification de 3 SNPs dans les ORF62 et ORF38 Génotypage des souches de VZV : identification des clades Identifications de SNPs dans les ORF1, ORF21, ORF22, ORF38, ORF50, ORF54 ^c	Différenciation souches vaccinales souches sauvages : Séquence ORF 64 RFLP-typage Identification de souches : Séquence génome entier sur souche (Ion Proton)

^aBurrel et al., J Virol Methods, 2012

^bPerrier et al., J Virol Methods, 2016

^cd'après Quinlivan et al., J Clin Microbiol, 2012

2.1.4 géotypage des autres Herpesvirus HHV6, EBV à visée épidémiologique

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière (A Gautheret-Dejean)	Laboratoire coordonnateur Limoges (S Rogez)
<ul style="list-style-type: none">• HHV-6 : Typage des variants A et B par PCR-séquence Identification des génomes intégrés	<ul style="list-style-type: none">• HHV-6^a : Typage des variants A et B par PCR-séquence Identification des génomes intégrés
Laboratoire référent EBV (P Morand, R Germi)	Laboratoire coordonnateur (S Rogez)
EBV : Typage des variants par PCR-séquence	EBV : séquence de génome complet par capture (Illumina)

^a Boutolleau et al. J clin Virol. 2006

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Pour le diagnostic pas de recommandations particulières en 2018. Les différentes évaluations des techniques par le CNR sont disponibles sur le site internet du CNR.

Pour les techniques plus spécifiques (Cf liste des techniques proposées par le CNR)

Recommandation pour les géotypes de résistance : séquence des gènes impliqués dans leur totalité, éviter les séquences partielles en raison du nombre de mutations et de leur répartition potentielle sur la totalité du gène

Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)

3.1 Permanence du CNR ¹

- *Horaires de fonctionnement habituels du CNR : 8h30-19h*
- *Personne(s) à contacter en cas d'urgence en dehors de ces horaires :*
 - Sophie Alain : 05 55 05 67 28 / 06 74 84 73 82
 - Sébastien Hantz : 05 55 05 86 42 / 06 64 12 58 79
 - Necker : Marianne Leruez-Ville 06 25 62 51 86

3.2 Autorisations MOT ²

- *Sans objet*

3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale

Laboratoire CNR Limoges :

- Sophie Alain, Médecin biologiste, DES de Biologie médicale, agrément Diagnostic anténatal, PU-PH
- Sébastien Hantz, Médecin biologiste, DES de Biologie médicale, agrément Diagnostic anténatal, MCU-PH

Laboratoire associé Necker : Marianne Leruez-Ville : Médecin Biologiste, DES de Biologie médicale

Laboratoire associé Pitié salpêtrière :

- David Boutolleau : Pharmacien Biologiste DES de Biologie médicale, MCU-PH
- Sonia Burrel : Pharmacien Biologiste DES de Biologie médicale, MCU-PH

3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo

3.4.1 Laboratoire associé Necker :

Cinétique des charges virales salivaires et sanguines de 0 à 2 ans dans une cohorte d'enfants ayant eu une infection congénitale à CMV (Cymepedia) :

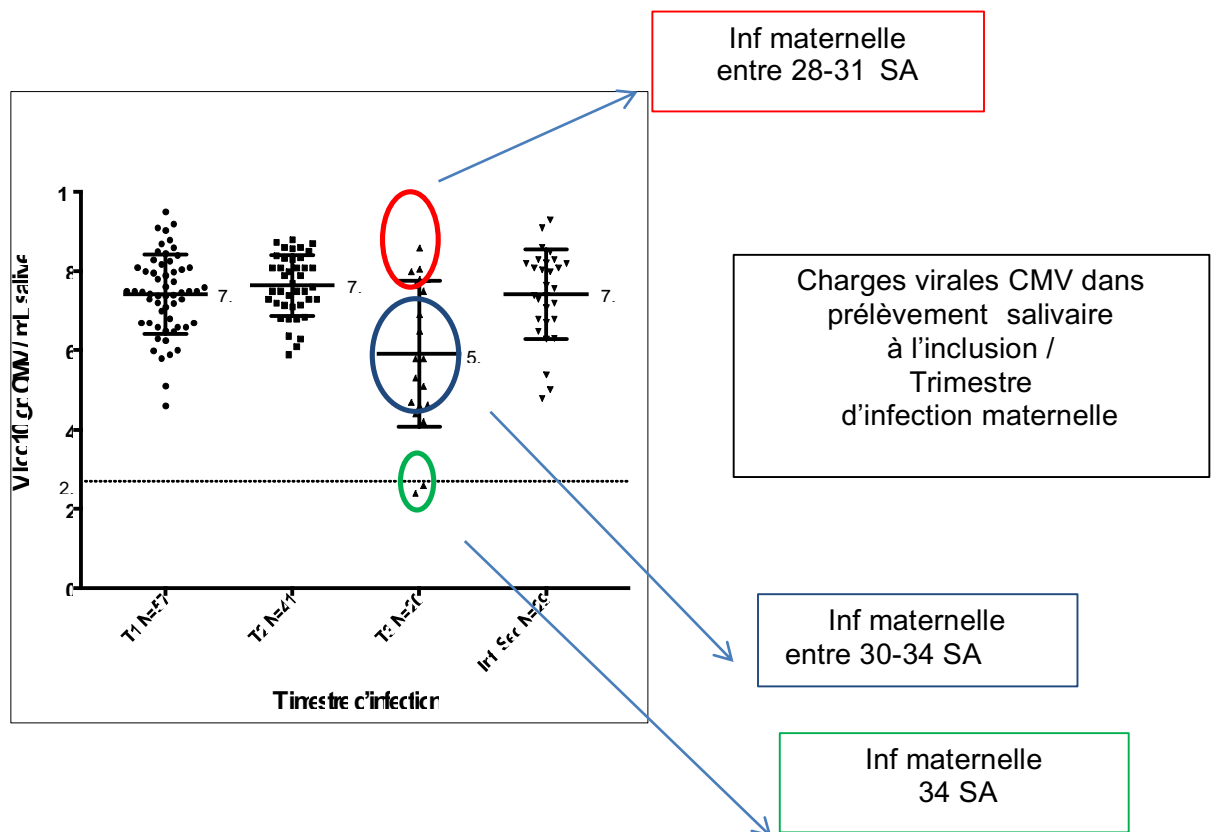
La figure 1 montre les charges virales salivaires dans le premier mois de vie chez 155 des 259 enfants inclus dans la cohorte. Chez 104 enfants la charge virale à la naissance n'a pas été analysée soit parce que l'enfant était déjà sous ganciclovir ou valganciclovir au moment de l'analyse soit parce que la mère avait été traitée par valaciclovir jusqu'à la fin de la grossesse soit parce que le prélèvement n'avait pas été fait.

La figure 1 montre les niveaux de charge virale dans la salive en fonction du trimestre de contamination maternelle lorsqu'il s'agissait d'une primo-infection maternelle. Les charges virales salivaires sont élevées (> 5.0 log) lorsque l'infection a eu lieu au 1^{er} ou au 2^{ème} trimestre. Elles peuvent être basses lorsque l'infection a eu lieu tard dans la grossesse comme le montre la figure 1.

¹ Ces informations seront conservées exclusivement par Santé publique France aux seules fins de contacter un CNR en cas d'urgence ; elles ne seront pas rendues publiques.

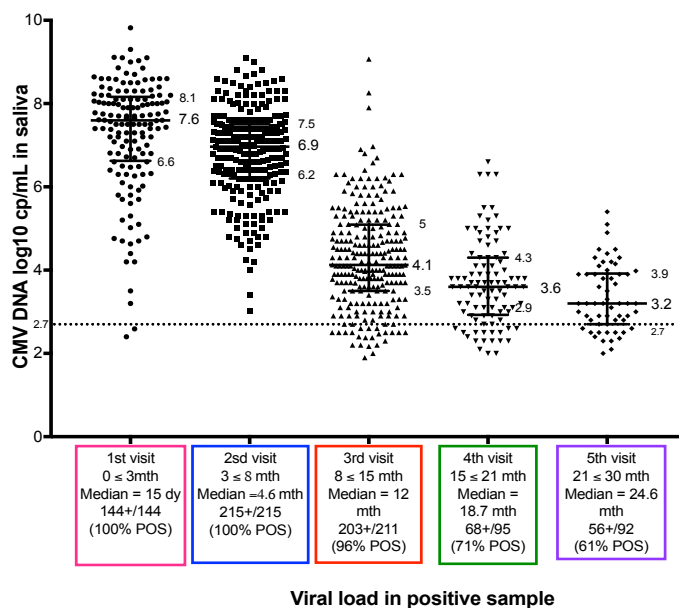
² Micro-Organismes et Toxines de la liste prévue à l'article R. 5139-1 du code de la santé publique. La liste des MOT est actuellement fixée par l'arrêté du 30 avril 2012 modifié par les arrêtés du 6 novembre 2014 et par l'arrêté du 2 octobre 2015.

Figure 1



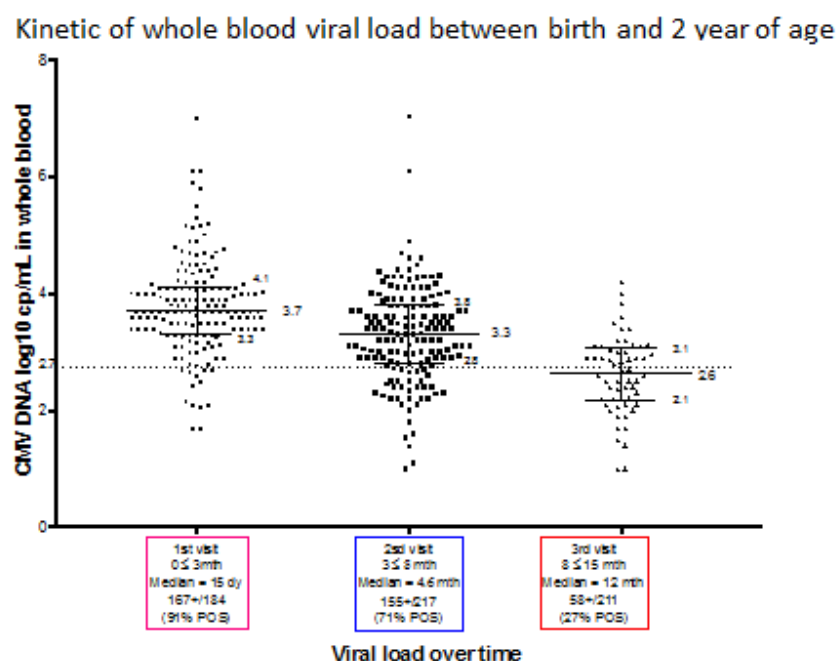
Ainsi la charge virale est élevée ($> 5,0$ log) lorsque l'infection maternelle a eu lieu au premier trimestre, les charges basses sont des faux positifs (ADN CMV sécrétions vaginales/lait) ou des infections prénatales tardives (dernière partie du 3ème trimestre).

Figure 2 : Cinétique de la charge virale dans la salive entre la naissance et 2 ans



Les charges virales dans la salive ont une médiane de 7,6 log à la naissance pour baisser jusqu'à 3.2 log à 24 mois. La PCR dans la salive est toujours positive jusqu'à 5 mois, à partir de 12 mois 4% des enfants infectés in utéro n'ont plus de virus détectable dans leur salive. Cela signifie qu'une PCR salivaire négative à 5 mois exclut une infection congénitale à CMV.

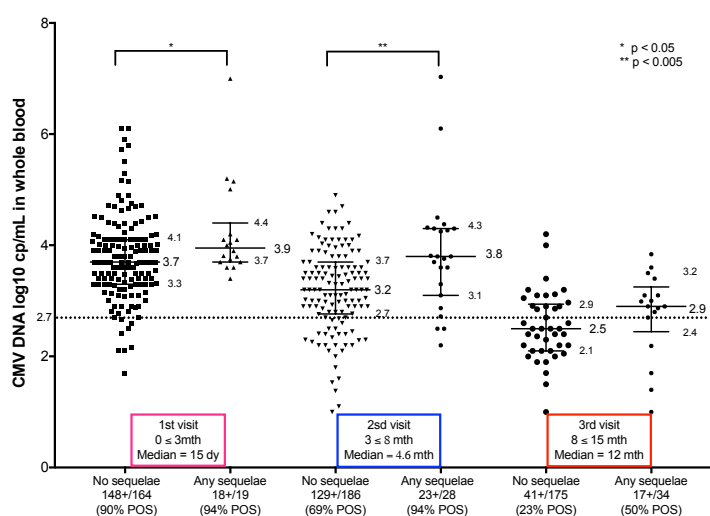
Figure 3 : Cinétique de la charge virale sanguine entre la naissance et 1 an



Les résultats de J0 et M4 des enfants traités par valganciclovir au moment du prélèvement ou ceux de J0 des enfants traités en anténatal par valaciclovir ont été exclus de l'analyse.

Les charges virales dans la salive ont une médiane de 3.7 log à la naissance à 2.6 à 1 an. Dans 9% des cas la PCR sanguine était négative à la naissance.

Figure 4 : Comparaison de charges virales sanguines à J0, M5 et M12 entre les enfants sans séquelles à 2 ans et ceux ayant des séquelles à 2 ans



Les charges virales sanguines à J0 et à M4 étaient significativement plus élevées dans le groupe des enfants avec séquelles que dans ceux sans séquelles. Les valeurs sont chevauchantes, mais aucun enfant ayant une charge virale sanguine < 3.4 log (2500 copies) à la naissance n'a développé de séquelles. Par ailleurs, la limite de détection à 90% de notre technique de PCR CMV sur Guthrie étant de 1500 cp/ml (3.1) log, la sensibilité de notre technique doit permettre de diagnostiquer rétrospectivement avec une bonne sensibilité clinique l'infection congénitale à CMV chez les enfants présentant des symptômes évocateurs et qui n'ont pas été diagnostiqués à la naissance.

3.4 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition des budgets MIGAC ou Santé publique France (texte libre)

Necker : une technicienne de recherche en CDI, budget de fonctionnement propre (Unité de Gestion CNR) , automate de PCR temps réel , le tout financé sur les MIGAC.

CHU de Limoges : Difficultés de mise à disposition des budgets MIGAC en début d'année au CHU de Limoges, puis des budgets de Santé Publique France. Tant que la notification des budgets par l'ARS nouvelle Aquitaine, ou le versement de la subvention SPF ne sont pas effectifs. Ceci rend difficile la prévision d'activités sur l'année et a bloqué notre fonctionnement notamment pour les développements de techniques NGS, les budgets ayant été débloqués par le CHU en troisième tiers d'année avec obligation d'utilisation avant fin novembre 2018.

Laboratoire associé de la Pitié Salpêtrière : En 2018, aucun accès n'a été possible au budget MIGAC (138 320 euros) versé au niveau de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière (AP-HP) pour le CNR Herpèsvirus - laboratoire associé, exactement comme ce qu'il s'était passé en 2017 (307 379 euros). Le Service Financier de l'hôpital considère que cet argent (tout ou partie) n'a pas vocation à être redistribué au niveau du CNR ...

Par ailleurs, le très faible montant de la subvention de Santé publique France (10 710 euros) pour l'année 2018 est théoriquement accessible, mais il n'a, à ce jour, pas été dépensé du fait de la proposition par l'hôpital de la possible création d'un emploi de technicien de laboratoire dédié au CNR. Malheureusement, les conditions de recrutement proposées par l'hôpital sont très peu attractives pour d'éventuels candidats et l'hôpital ne veut pas s'engager sur l'ensemble de la période du mandat du CNR (jusqu'en 2021). Les discussions sont toujours en cours, dans l'attente notamment du budget pour le CNR-LA (MIGAC et SpF) pour l'année 2019 ...

En conséquence, les différentes missions du CNR Herpèsvirus - laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière ont été réalisées en 2018 sans moyens dédiés.

3.5 Autres remarques à destination du comité des CNR (texte libre)

Sans objet

Questionnaire de recensement en ligne des infections congénitales par le CMV : version 2018

RECENSEMENT: INFECTIONS CONGENITALES PAR LE CMV

MERE

Sommaire

- Mère
- Mère: données cliniques
- Mère: données biologiques
- Mère: conclusion et traitement
- Mère: devenir de la grossesse

MERE

Numéro d'anonymat

Nom d'usage

Nom de jeune fille

Prénom

Date de naissance

Commune de résidence

Pays de naissance

Profession en lien avec des enfants de moins de 3 ans **Oui, Non, Non renseigné**

Précisez : **Dans un centre de soins, Garde d'enfants à domicile, Crèche, Autre**

Immunodépression **Oui, Non, Non renseigné**

Sérologie pour la toxoplasmose **Oui, Non, Non renseigné**

Sérologie pour le CMV effectuée avant la grossesse **Oui, non, non renseigné**

Contexte **Durant une grossesse antérieure, En vue de la grossesse actuelle, Autre, Non renseigné**

IgM recherchées **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Positif, Négatif**

IgG recherchées **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Positif, Négatif**

Valider cette partie

MERE: DONNEES CLINIQUES

Date de début de grossesse

Grossesse multiple **Oui Non**

Nombre de fœtus

Gestité

Parité

Contexte diagnostique **Demande du médecin, Demande de la mère, Dépistage systématique, Pas de diagnostic, Non renseigné**

Pour signes échographiques **Oui, Non, Non renseigné**

Merci de bien vouloir créer une fiche "Fœtus/Nouveau-né" ou de la compléter en saisissant les données requises (dans la partie "Fœtus: clinique").

Si vous n'avez pas réalisé l'échographie, merci de bien vouloir créer une fiche "Spécialistes" et d'y saisir les coordonnées de l'Obstétricien qui l'a réalisée.

Pour symptômes maternels **Oui, Non, Non renseigné**

Symptôme principal **Fièvre, Fatigue, Myalgie, Arthralgie, Maux de tête, Pharyngite, Cytolyse, Lymphocytose, Adénopathie, Autre, Non renseigné**

Valider cette partie

MERE: DONNEES BIOLOGIQUES

Sérologie pour le CMV effectuée pendant la grossesse **Oui, Non, Non renseigné**

-IgM recherchées **Oui, Non, Non renseigné**

Méthode

Date

Soit en SA

Saisir la valeur en SA calculée

Résultat

-IgG recherchées **Oui, Non, Non renseigné**

Méthode

Date

Soit en SA

Saisir la valeur en SA calculée

Résultat

-Avidité des IgG mesurée **Oui, Non, Non renseigné**

Méthode

Résultat (%)

Date

Soit en SA

Saisir la valeur en SA calculée

Analyses biomoléculaires du CMV effectuées **Oui, Non, Non renseigné**

-PCR sur sérum effectuée **Oui, Non, Non renseigné**

Date

Charge virale en UI

Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**

Interprétation

Soit en SA

Saisir la valeur en SA calculée

A défaut, charge virale en copies/ml

Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**

-PCR sur sang total effectuée **Oui, Non, Non renseigné**

Date

Charge virale en UI

Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**

Interprétation

Soit en SA

Saisir la valeur en SA calculée

A défaut, charge virale en copies/ml

Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**

Prélèvements maternels disponibles pour le CNR **Oui, Non**

-Sérum **Oui, Non**

Date du prélèvement 1

Date du prélèvement 2

Date du prélèvement 3

-Sang total **Oui, Non**
Date du prélèvement 1
Date du prélèvement 2
Date du prélèvement 3

-Souche virale **Oui, Non**
Date du prélèvement 1
Date du prélèvement 2
Date du prélèvement 3

-Génotype de la souche

Merci de bien vouloir saisir les coordonnées de tout nouveau spécialiste (obstétricien et/ou biologiste) en créant une fiche "spécialistes".

Valider cette partie

MERE: CONCLUSION ET TRAITEMENT

Conclusion **Primo-infection maternelle, Infection maternelle secondaire, Equivoque, Infection maternelle ancienne, Pas d'infection maternelle, Pas de diagnostic maternel lié au CMV effectué, Infection maternelle par le CMV non renseignée**

A quel trimestre de la grossesse **Infection périconceptionnelle, Infection périconceptionnelle ou au 1^{er} trim., 1^{er} trimestre, 2^{ème} trimestre, 3^{ème} trimestre, Non renseigné**

Traitement anti CMV pendant la grossesse **Oui, Non, Non renseigné**

Lequel **Immunoglobulines, Valaciclovir, Autre, Non renseigné**

Dose en mg/kg/jour

Durée initialement prévue en jours

Réponse au traitement satisfaisante **Oui, Non, Non renseigné**

Si Non : Décision : **Arrêt, Poursuite, Changement de molécule**

Durée effective du traitement

Raison du traitement **Essai clinique, Engagement de la responsabilité du médecin, Non renseigné**

Valider cette partie

MERE: DEVENIR DE LA GROSSESSE

Devenir de la grossesse **Naissance, IMG, Mort fœtale in utero, IVG, Non connu**

Si IMG :

Examen d'anatomie-pathologie réalisé : **Oui, Non, Non renseigné**

Si Oui : commentaires :

Terme en SA

Si l'IMG a été justifiée par des résultats d'examens chez le fœtus (imagerie, biologie), merci de remplir les parties « Fœtus : données cliniques », « Fœtus : données biologiques » et « Fœtus : conclusion ».

Si MFIU :

Examen d'anatomie-pathologie réalisé : **Oui, Non, Non renseigné**

Si Oui : commentaires :

Terme en SA

Si IVG :

Terme en SA

Si naissance :

Date de naissance

Terme en SA

Saisir la valeur en SA calculée

Merci de bien vouloir créer une fiche "Fœtus/Nouveau-né" et d'y saisir l'identité du nouveau-né.

Merci de bien vouloir créer une fiche "Spécialistes" et d'y saisir les coordonnées du pédiatre.

Valider cette partie

© voozanoo / epiconcept 2013

Sommaire

- Foetus: données cliniques
- Foetus: données biologiques
- Foetus: conclusion
- Nouveau-né: identité
- Nouveau-né: données cliniques
- Nouveau-né: données biologiques
- Nouveau-né: conclusion
- Nouveau-né: décès

FŒTUS: DONNEES CLINIQUES

Contexte diagnostique **Primo-infection chez la mère, Infection secondaire chez la mère, Découverte d'anomalies échographiques, Pas de diagnostic lié au CMV effectué, Autre, Non renseigné**

Merci de bien vouloir compléter la partie "Mère".

Echographie réalisée **Oui, Non, Non renseigné**

Si l'échographie a été réalisée par un autre Obstétricien, merci de bien vouloir créer une fiche "Spécialistes" (accessible dans la partie "Mère") et d'y saisir ses coordonnées.

Date de la plus récente

Soit en SA

Saisir la valeur en SA calculée

1- Cerveau normal **Oui, Non, Non renseigné**

-Ventriculomégalie **Oui, Non, Non renseigné**

Taille en mm

-Kyste sub-épendymal **Oui, Non, Non renseigné**

Nombre

Taille en mm

-Kyste des cornes occipitales **Oui, Non, Non renseigné**

Cloison intraventriculaire **Oui, Non, Non renseigné**

Nombre

Taille en mm

-Trouble de la gyration **Oui, Non, Non renseigné**

-Lissencéphalie **Oui, Non, Non renseigné**

-Hypoplasie cérébelleuse **Oui, Non, Non renseigné**

Taille en mm

-Calcifications **Oui, Non, Non renseigné**

-Hémorragie intraventriculaire **Oui, Non, Non renseigné**

-Hémorragie intracérébrale **Oui, Non, Non renseigné**

-Agénésie du corps calleux **Oui, Non, Non renseigné**

-Hypoplasie du corps calleux **Oui, Non, Non renseigné**

-Microcéphalie (périmètre < 5ème percentile) **Oui, Non, Non renseigné**

-Image en candélabre **Oui, Non, Non renseigné**

-Halo ventriculaire hyper-échogène **Oui, Non, Non renseigné**

2- Abdomen normal **Oui, Non, Non renseigné**

-Ascites **Oui, Non, Non renseigné**

-Intestin hyper-échogène **Oui, Non, Non renseigné**

-Calcifications hépatiques **Oui, Non, Non renseigné**

-Hépatomégalie **Oui, Non, Non renseigné**

Taille en cm

-Splénomégalie **Oui, Non, Non renseigné**

Taille en cm

3- Liquide amniotique normal **Oui, Non, Non renseigné**

-Oligo-amnios **Oui, Non, Non renseigné**

Citerne la plus profonde en cm
-Hydramnios **Oui, Non, Non renseigné**
Citerne la plus profonde en cm

4- Placenta normal **Oui, Non, Non renseigné**

-Epaisseur au niveau de l'insertion du cordon en cm
-Calcification du placenta **Oui, Non, Non renseigné**

5- Thorax normal **Oui, Non, Non renseigné**

-Cardiomégalie **Oui, Non, Non renseigné**
-Epanchement pleural **Oui, Non, Non renseigné**
-Epanchement péricardique **Oui, Non, Non renseigné**

6- RCIU < 5ème percentile **Oui, Non, Non renseigné**

IRM réalisée **Oui, Non, Non renseigné**

Merci de créer une fiche "Spécialistes" (accessible dans la partie "Mère") et d'y saisir les coordonnées du radiologue qui a réalisé l'IRM.

Date
Soit en SA
Saisir la valeur en SA calculée

Cerveau normal **Oui, Non, Non renseigné**

-Ventriculomégalie **Oui, Non, Non renseigné**
Taille en mm
-Kyste sub-épendymal **Oui, Non, Non renseigné**
Nombre
Taille en mm
-Kyste des cornes occipitales **Oui, Non, Non renseigné**
Cloison intraventriculaire **Oui, Non, Non renseigné**
Nombre
Taille en mm
-Trouble de la gyration **Oui, Non, Non renseigné**
-Lissencéphalie **Oui, Non, Non renseigné**
-Porencéphalie **Oui, Non, Non renseigné**
-Schizencéphalie **Oui, Non, Non renseigné**
-Anomalie des signaux cérébelleux **Oui, Non, Non renseigné**
-Hypoplasie cérébelleuse **Oui, Non, Non renseigné**
Taille en mm
-Calcifications **Oui, Non, Non renseigné**
-Hémorragie intraventriculaire **Oui, Non, Non renseigné**
-Hémorragie intracérébrale **Oui, Non, Non renseigné**
-Agénésie du corps calleux **Oui, Non, Non renseigné**
-Hypoplasie du corps calleux **Oui, Non, Non renseigné**
-Microcéphalie (périmètre < 5ème percentile) **Oui, Non, Non renseigné**

Valider cette partie

Fœtus: DONNEES BIOLOGIQUES

Amniocentèse réalisée **Oui, Non, Non renseigné**

Date
Soit en SA
Saisir la valeur en SA calculée

-PCR réalisée sur le liquide amniotique **Oui, Non, Non renseigné**

Charge virale en UI
Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**
A défaut, charge virale en copies/ml
Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**
Interprétation **Positif, Négatif**

-Culture réalisée sur liquide amniotique **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Positif, Négatif**

Ponction de sang fœtal réalisée **Oui, Non, Non renseigné**

Date

Soit en SA

Saisir la valeur en SA calculée

- Numération plaquettaire réalisée sur sang fœtal : **Oui, Non, Non renseigné**
Résultat par mm³

-PCR réalisée sur le sang fœtal **Oui, Non, Non renseigné**

Charge virale en UI

Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**

A défaut, charge virale en copies/ml

Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**

Interprétation **Positif, Négatif**

-Culture réalisée sur le sang fœtal **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Positif, Négatif**

-Virémie recherchée sur le sang fœtal **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Positif, Négatif**

-Présence d'IgM recherchée sur le sang fœtal **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Positif, Négatif**

Prélèvements disponibles pour le CNR **Oui, Non**

-Sang fœtal **Oui, Non**

Date du prélèvement 1

Date du prélèvement 2

Date du prélèvement 3

-Liquide amniotique **Oui, Non**

Date du prélèvement 1

Date du prélèvement 2

Date du prélèvement 3

-Souche virale (sang fœtal) **Oui, Non**

Date du prélèvement 1

Date du prélèvement 2

Date du prélèvement 3

-Souche virale (liquide amniotique) **Oui, Non**

Date du prélèvement 1

Date du prélèvement 2

Date du prélèvement 3

-Génotype de la souche

Merci de bien vouloir créer une fiche "Spécialistes" (accessible dans la partie "mère") et d'y saisir les coordonnées de tout nouveau Biologiste ou Obstétricien en charge du dossier.

Valider cette partie

FŒTUS: CONCLUSION

Conclusion du diagnostic prénatal **Infection congénitale, Pas d'infection, Pas de diagnostic lié au CMV effectué, Non renseigné**

Quelle que soit la conclusion du diagnostic prénatal, merci de renseigner le diagnostic maternel (et les traitements éventuels pendant la grossesse) en remplissant la partie « Mère : conclusion », et le devenir de la grossesse en remplissant la partie « Mère : devenir de la grossesse ».

Valider cette partie

NOUVEAU-NE: IDENTITE

Numéro d'anonymat

Nom

Prénom

Date de naissance de l'enfant déclarée dans la partie "Mère"

Date de naissance

Sexe **Masculin, Féminin, Non renseigné**

Commune de résidence de la mère au moment de la naissance

ATTENTION:

Les pages suivantes (données clinique, biologiques, etc) seront accessibles quand les titulaires de l'autorité parentale auront donné leur consentement pour l'inclusion de leur enfant dans ce recensement. Les pédiatres (autres spécialités éventuellement) devront effectuer cette démarche auprès des parents à l'aide des documents disponibles sur la page d'accueil.

Merci de votre compréhension.

Signature du consentement par les titulaires de l'autorité parentale pour l'inclusion de l'enfant **Oui, Non, Non renseigné**

Valider cette partie

NOUVEAU-NE: DONNEES CLINIQUES

Contexte du diagnostic **Diagnostic prénatal d'infection par le CMV, Primo-infection maternelle, Infection maternelle secondaire, Signes cliniques à la naissance, Anomalies échographiques, Pas de diagnostic lié au CMV effectué, Autre, Non renseigné**

Merci de créer une fiche "Spécialistes" (accessible dans la partie "Mère") et d'y saisir les coordonnées de l'Obstétricien en charge du dossier.

Merci de bien vouloir compléter la fiche "Mère: identité" dans la partie "Mère".

Merci de bien vouloir compléter les fiches "Fœtus" si vous avez les données.

Terme à la naissance en SA

Terme à la naissance en SA

Naissance par: **Voie basse non instrumentale, Voie basse instrumentale, césarienne programmée, césarienne en urgence**

Poids à la naissance en g

Taille à la naissance en cm

Périmètre crânien à la naissance en cm

APGAR à 1 minute

APGAR à 5 minutes

Signes cliniques à la naissance et jusqu'à 2 mois de vie **Oui, Non, Non renseigné**

-Prématurité **Oui, Non, Non renseigné**

-RCIU < 10ème percentile **Oui, Non, Non renseigné**

-Purpura **Oui, Non, Non renseigné**

Date de la découverte

Age du nouveau-né en jours

-Choriorétinite **Oui, Non, Non renseigné**

Date de la découverte

Age du nouveau-né en jours

-Microcéphalie **Oui, Non, Non renseigné**

-Hépatosplénomégalie **Oui, Non, Non renseigné**

Date de la découverte

Age du nouveau-né en jours

-Surdité **Oui unilatérale, Oui bilatérale, Non, Non renseigné**

Date de la découverte

Age du nouveau-né en jours

-Autres **Oui, Non, Non renseigné**

Précisez

Valider cette partie

NOUVEAU-NE: DONNEES BIOLOGIQUES

Signe biologiques à la naissance **Oui, Non, Non renseigné**

-Anémie hémolytique **Oui, Non, Non renseigné**

Date de la découverte

Age du nouveau-né en jours

Saisir la valeur en jours calculée

-Thrombopénie **Oui, Non, Non renseigné**

Date de la découverte

Age du nouveau-né en jours

Saisir la valeur en jours calculée

Résultat de la numération plaquettaire par mm³

-Hyperbilirubinémie **Oui, Non, Non renseigné**

Date de la découverte

Age du nouveau-né en jours

Saisir la valeur en jours calculée

- Augmentation des ALAT **Oui, Non, Non renseigné**

Taux sanguin des ALAT en UI/L

Date de la découverte

Age du nouveau-né en jours

Saisir la valeur en jours calculée

Recherche de CMV à la naissance **Oui, Non, Non renseigné**

-Urines du nouveau-né analysées **Oui, Non, Non renseigné**

Date

Age du nouveau-né en jours

Saisir la valeur en jours calculée

-PCR sur urines réalisée **Oui, Non, Non renseigné**

Charge virale en UI

Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**

A défaut, charge virale en copies/ml

Unité **Copies/ml, Log 10 (copies/ml)**

Interprétation **Positif, Négatif**

-Culture sur urines réalisée **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Positif, Négatif**

-Salive du nouveau-né analysée **Oui, Non, Non renseigné**

Date

Age du nouveau-né en jours

Saisir la valeur en jours calculée

-PCR sur salive réalisée **Oui, Non, Non renseigné**

Charge virale en UI

Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**

A défaut, charge virale en copies/ml

Unité **Copies/ml, Log 10 (copies/ml)**

Interprétation **Positif, Négatif**

-Culture sur salive réalisée **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Positif, Négatif**

-Sang du nouveau-né analysé **Oui, Non, Non renseigné**

Date

Age du nouveau-né en jours

Saisir la valeur en jours calculée

-PCR sur sang réalisée **Oui, Non, Non renseigné**

Charge virale en UI

Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**

A défaut, charge virale en copies/ml

Unité **Copies/ml, Log 10 (copies/ml)**

Interprétation **Positif, Négatif**

-Culture sur sang réalisée **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Positif, Négatif**

-IgM recherchées **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Positif, Négatif**

-Rétrospectif sur Guthrie réalisé **Oui, Non, Non renseigné**

Charge virale en UI

Unité **UI/ml, Log10(UI/ml)**

A défaut, charge virale en copies/ml
Unité **Copies/ml, Log 10 (copies/ml)**
Interprétation **Positif, Négatif**

Prélèvements du nouveau-né disponibles pour le CNR **Oui, Non**

-Urine **Oui, Non**

Date du prélèvement 1
Date du prélèvement 2
Date du prélèvement 3

-Salive **Oui, Non**

Date du prélèvement 1
Date du prélèvement 2
Date du prélèvement 3

-Sang **Oui, Non**

Date du prélèvement 1
Date du prélèvement 2
Date du prélèvement 3

-Souche virale (urine) **Oui, Non**

Date du prélèvement 1
Date du prélèvement 2
Date du prélèvement 3

-Souche virale (salive) **Oui, Non**

Date du prélèvement 1
Date du prélèvement 2
Date du prélèvement 3

-Souche virale (sang) **Oui, Non**

Date du prélèvement 1
Date du prélèvement 2
Date du prélèvement 3

-Génotype de la souche

Merci de bien vouloir saisir les coordonnées de tout nouveau spécialiste (biologiste et/ou pédiatre) en créant une fiche "spécialistes" (accessible dans la partie "mère").

Valider cette partie

NOUVEAU-NE: CONCLUSION

Diagnostic postnatal **Infection congénitale, Infection acquise, Pas d'infection, Pas de diagnostic lié au CMV effectué, Non renseigné**

Nouveau-né **Symptomatique, Asymptomatique, Non renseigné**

Traitement du nouveau-né pour le CMV **Oui, Non, Non renseigné**

Molécule **ganciclovir, valganciclovir, Autre, Non renseigné**

Dose en mg/kg/jour

Durée initialement prévue en jours

Réponse au traitement **Stabilisation des symptômes, Régression des symptômes, Progression des symptômes, Non renseigné**

Complication due au traitement : neutropénie $<1000/\text{mm}^3$ **Oui, Non, Non renseigné**

Si progression des symptômes et/ou neutropénie : Décision : **Arrêt, Poursuite, Changement de molécule, Non renseigné**

Durée effective du traitement en jours

L'enfant fera-t-il l'objet d'un suivi dans le cadre de son infection congénitale par le CMV? **Oui, Non, Non renseigné**

Si non, pour quelle raison **Décès du nouveau-né, Enfant perdu de vue, Souhait des parents, Enfant asymptomatique, Autre, Non renseigné**

Merci de bien vouloir saisir les coordonnées de tout nouveau spécialiste (Biologiste, Pédiatre, ORL, Neurologue, Ophtalmologue) en créant une fiche "spécialistes" (accessible dans la partie "mère").

Valider cette partie

NOUVEAU-NE: DECES

Décès de l'enfant au cours de ses deux premiers mois de vie **Oui, Non, Non renseigné**

Date

Age du nouveau-né en jours

Décès lié au CMV : **Oui, Non, Non renseigné**

Valider cette partie

© voozanoo / epiconcept 2013

Pour cette partie : autant de fiche que de visite de suivi

Sommaire

- [Enfant: identité](#)
- [Enfant: visite de suivi](#)
- [Enfant: bilan ORL](#)
- [Enfant: bilan neurologique](#)
- [Enfant: bilan ophtalmologique](#)
- [Enfant: examens complémentaires](#)
- [Enfant: décès](#)

ENFANT: IDENTITE

Pour enregistrer une nouvelle visite de suivi de l'enfant, vous devrez créer une nouvelle fiche de suivi: vous y accéderez par la partie "Fœtus/Nouveau-né", en cliquant sur le "+" de la fenêtre "Suivi de l'Enfant".

Numéro d'anonymat

Nom

Prénom

Date de naissance

Sexe **Masculin, Féminin, Non renseigné**

ENFANT: VISITE DE SUIVI

Pour chaque nouvelle visite de suivi de l'enfant, vous devrez créer une nouvelle fiche de suivi: vous y accéderez par la partie "Fœtus/Nouveau-né", en cliquant sur le "+" de la fenêtre "Suivi de l'Enfant".

Type de la visite **ORL, neurologie, Ophtalmologie, autre, non renseigné**

Date de la visite

Age de l'enfant en années

Age de l'enfant en mois

Age de l'enfant en jours

Contexte du suivi **Lié à l'infection congénitale, Liée à l'infection acquise en période néonatale, Demande de la famille ou du médecin traitant pour apparition de symptômes, Autres, Non renseigné**

Traitement anti CMV (passé ou en cours) **Oui, Non, Non renseigné**

Molécule **Ganciclovir, Valganciclovir, Autre, Non renseigné**

Dose en mg/kg/jour

Age de l'enfant ou du nouveau-né au début du traitement

Durée initialement prévue en jours

Durée effective du traitement en jours

Symptômes chez l'enfant ou le nouveau né ayant motivé le traitement : **Surdité, Atteinte neurologique, Signes biologiques, Maladie de inclusions cytom galiques, Aucun, Non renseigné**

Commentaires

Prochaine visite programm e **Oui, Non, Non renseigné**

Date

ENFANT: BILAN ORL

Résultat de l'examen ORL **Normal, Otite séreuse unilatérale, Otite séreuse bilatéral, Otite chronique unilatérale , Otite chronique bilatérale, Non renseigné**

Stade actuel du langage **Aucun, Babillages, Premiers mots, Association de mots, Phrases, Non renseigné**

Age d'acquisition en mois (si non acquis à la précédente visite)

Bilan orthophonique effectué **Oui, Non, Non renseigné**

Soutient orthophonique mis en place **Oui, Non, Non renseigné**

Surdité **Oui, Non, Non renseigné**

Méthode d'évaluation auditive utilisée **Audiogramme champ libre, Audiogramme oreilles séparées, Potentiels évoqués auditifs ASSR, Non renseigné**

Seuil auditif moyen de l'oreille gauche en dB

Résultat de l'audiogramme gauche **Normale, Partielle asymétrique, Partielle symétrique, Absente bilatérale, Non renseigné**

Seuil auditif moyen de l'oreille droite en dB

Résultat de l'audiogramme droit **Normale, Partielle asymétrique, Partielle symétrique, Absente bilatérale, Non renseigné**

Bilan vestibulaire effectué **Oui, Non, Non renseigné**

Age de tenue de tête en mois

Age de station assise en mois

Age de la marche en mois

Fonction canalaire testée **Oui, Non, Non renseigné**

Par test calorique **Oui, Non, Non renseigné**

Fonction canalaire **Normale, Partielle asymétrique, Partielle symétrique, Absente bilatérale, Non renseigné**
par EVAR **Oui, Non, Non renseigné**

Fonction canalaire **Normale, Partielle asymétrique, Partielle symétrique, Absente bilatérale, Non renseigné**

Par HIT **Oui, Non, Non renseigné**

Résultat **Fonction canalaire absente, Fonction canalaire présente, Non renseigné**

Fonction otolithique testée **Oui, Non, Non renseigné**

Par OVAR **Oui, Non, Non renseigné**

Fonction otolithique **Normale, Partielle asymétrique, Partielle symétrique, Absente bilatérale, Non renseigné**

Par PEOM **Oui, Non, Non renseigné**

Fonction otolithique **Normale, Partielle asymétrique, Partielle symétrique, Absente bilatérale, Non renseigné**

Décision

Surveillance **Oui, Non, Non renseigné**

Précisez l'âge au prochain rendez-vous

Précisez l'âge au prochain bilan auditif

Précisez l'âge au prochain bilan vestibulaire

Rééducation orthophonique **Oui, Non, Non renseigné**

Précisez le nombre de séances par semaine

Prise en charge particulière (CAMSP, ...) **Oui, Non, Non renseigné**

Prothèse auditive **Non, Oreille droite, Oreille gauche Non renseigné**

Implant cochléaire **Non, Oreille droite, Oreille gauche Non renseigné**

Autre geste chirurgical **Non, Adénoïdectomie, Pose d'aérateurs transtympaniques, Autres, Non renseigné**

Autre: précisez

Mise en place d'un traitement antiviral **Oui, Non, Non renseigné**

Molécule **Ganciclovir, Valganciclovir, Autre, Non renseigné**

Dose en mg/kg/jour

Durée initialement prévue en jours

Réponse au traitement **Stabilisation des symptômes, Régression des symptômes, Progression des symptômes, Non renseigné**

Complication due au traitement : neutropénie <1000/mm³ **Oui, Non, Non renseigné**

Si progression des symptômes et/ou neutropénie : Décision : **Arrêt, Poursuite, Changement de molécule, Non renseigné**

Durée effective du traitement en jours

ENFANT: BILAN NEUROLOGIQUE

Maintien acquis de la position assise **Oui, Non, Non renseigné**

Age d'acquisition en mois (si non acquis à la précédente visite)

Marche acquise **Oui, Non, Non renseigné**

Conclusion du bilan neurologique **Examen normal, Retard psychomoteur, autre, Non renseigné**

Précisez

Mise en place d'un traitement antiviral **Oui, Non, Non renseigné**

Molécule **Ganciclovir, Valganciclovir, Autre, Non renseigné**

Dose en mg/kg/jour
 Durée en jours
 Réponse au traitement **Stabilisation des symptômes, Régression des symptômes, Progression des symptômes, Non renseigné**
 Complication due au traitement : neutropénie <1000/mm³ **Oui, Non, Non renseigné**
 Si progression des symptômes et/ou neutropénie : Décision : **Arrêt, Poursuite, Changement de molécule, Non renseigné**
 Durée effective du traitement en jours
 Commentaires

ENFANT: BILAN OPHTALMOLOGIQUE

Conclusion du bilan ophtalmologique **Examen normal, Troubles visuels, Autre, Non renseigné**
 Mise en place d'un traitement antiviral **Oui, Non, Non renseigné**
 Molécule **Ganciclovir, Valganciclovir, Autre, Non renseigné**
 Dose en mg/kg/jour
 Durée initialement prévue en jours
 Réponse au traitement **Stabilisation des symptômes, Régression des symptômes, Progression des symptômes, Non renseigné**
 Complication due au traitement : neutropénie <1000/mm³ **Oui, Non, Non renseigné**
 Si progression des symptômes et/ou neutropénie : Décision : **Arrêt, Poursuite, Changement de molécule, Non renseigné**
 Durée effective du traitement en jours
 Commentaires

ENFANT: EXAMENS COMPLEMENTAIRES

Examens complémentaires liés à l'infection par le CMV réalisés **Oui, Non, Non renseigné**
 Précisez

ENFANT: DECES

Décès de l'enfant depuis sa dernière visite **Oui, Non**
 Date
 Age de l'enfant
 Lié au CMV : **Oui, Non, Non renseigné**

© voozanoo / epiconcept 2013

Réseau des correspondants inscrits en 2018 pour la déclaration en ligne des cas d'infection congénitale par le CMV (plateforme voozanoo)

NOM	Spécialité	Centre	accès à la déclaration en ligne créée le
Dr TEISSIER Natacha	ORL	AP-HP	27/11/2016
Dr ZANDOTTI Christine	Biologie	AP-HM	09/12/2016
Dr GARRIGUE Isabelle	Biologie	CHU Bordeaux	19/12/2016
Dr JOLIVET Eugénie	Obstétrique	CHU Martinique	13/02/2017
Dr FOULONGNE Vincent	Biologie	CHU Montpellier	13/02/2017
Dr TRASTOUR Cynthia	CPDPN	CHU Nice	13/02/2017
Dr MOUSTY Eve	Obstétrique	CHU Nîmes	13/02/2017
Dr PILLET Sylvie	Biologie	CHU Saint-Etienne	13/02/2017
Dr PESENTI Delphine	Biologie	CH Avignon	17/02/2017
Dr OLIERIC Marie-France	Obstétrique	CHR Metz-Thionville	17/02/2017
Dr WELTER Eric	Obstétrique	CHR Metz-Thionville	17/02/2017
Dr MOZA Anca	Obstétrique	CHR Metz-Thionville	17/02/2017
Dr LUPO Julien	Biologie	CHU Grenoble	09/03/2017
Dr JACOMO Véronique	Biologie	BIOMNIS	21/03/2017
Dr SALIOU Anne-Hélène	Obstétrique	CHRU Brest	23/03/2017
Dr BENOIST Guillaume	Obstétrique	CHU Caen	23/03/2017
Dr BOUTOLLEAU David	Biologie	AP-HP	23/03/2017
Dr CARLES Marie-Josée	Biologie	CHU Nîmes	23/03/2017
Dr VEQUEAU-GOUA Valérie	Obstétrique	CHU Poitiers	23/03/2017
Dr SEGARD Christine	Biologie	CHU Amiens	27/03/2017
Dr DEWILDE Anny	Biologie	CHRU Lille	27/03/2017
Dr GAUDY-GRAFFIN Catherine	Biologie	CHU Tours	27/03/2017
Dr LE BOUAR Gwenaëlle	Obstétrique	CHU Rennes	30/03/2017
Dr COSTE-MAZEAU Perrine	Obstétrique	CHU Limoges	12/05/2017
Dr BRESSOLLETTE Céline	Biologie	CHU Nantes	12/05/2017
Dr REGAGNON Christel	Biologie	CHU Clermont-Ferrand	09/06/2017
Dr LAURICHESSE Hélène	Obstétrique	CHU Clermont-Ferrand	09/06/2017
BANASZKIEWICZ Nathalie	Obstétrique	Réseau Naissance Pays de la Loire	09/06/2017
Dr LERUEZ Marianne	Biologie	AP-HP	16/06/2017
Pr PICONE Olivier	Obstétrique	AP-HP	10/07/2017
Dr VAULOUP-FELLOUS Christelle	Biologie	AP-HP	10/07/2017
Dr BEBY-DEFAUX Agnès	Biologie	CHU Poitiers	17/08/2017
Dr VESTERGAARD Hanne Thang	Biologie	Copenhague DANEMARK	18/08/2017
Dr CANNAVO Isabelle	Biologie	CHU Nice	21/09/2017
Pr PERROTIN Franck	Obstétrique	CHU Tours	02/10/2017
Dr GALLOT Denis	Obstétrique	CHU Clermont-Ferrand	03/10/2017
Dr EQUY Véronique	Obstétrique	CHU Grenoble	03/10/2017
Dr TROUSSIER Joelle	ORL	CHU Grenoble	05/10/2017
Dr EPIARD Chloé	Pédiatrie	CHU Grenoble	12/10/2017
Dr VIGUÉ Marie Gabrielle	Pédiatrie	CHU Montpellier	12/10/2017
Dr LAZREK Mouna	Biologie	CHRU Lille	18/01/2018
Dr LEPILLER Quentin	Biologie	CHU Besançon	29/01/2018
Dr HOUHOU Nadira	Biologie	AP-HP	29/01/2018

Dr VENARD Véronique	Biologie	CHRU Nancy	29/01/2018
Dr LAFON Marie-Edith	Biologie	CHU Bordeaux	30/01/2018
Dr GOURINAT Ann-Claire	Biologie	CHT Nouvelle-Calédonie	02/02/2018
Dr COSTE-BUREL Marianne	Biologie	CHU Nantes	05/02/2018
Dr GOUARIN Stéphanie	Biologie	CHU Caen	06/02/2018
Dr LE VAILLANT Claudine	Obstétrique	CHU Nantes	06/02/2018
Dr LAGATHU Gisèle	Biologie	CHU Rennes	13/02/2018
Dr SOLIS Morgane	Biologie	CHRU Strasbourg	19/02/2018
Dr HUISSOUD Cyril	Obstétrique	CHU Lyon	26/02/2018
Dr MASIAS Charlotte	Obstétrique	CHRU Nancy	02/03/2018
Dr CHEVE Marie-Thérèse	Obstétrique	CH Le Mans	12/03/2018
Dr MARIOLI Sandrine	Pédiatrie	CHU Nice	13/03/2018
Dr VERDURME Laura	Biologie	CERBA	06/04/2018
Pr PASQUIER Christophe	Biologie	CHU Toulouse	16/04/2018
Dr MILLONES GONZALES Marco	Pédiatrie	AP-HP	27/04/2018
Dr NAJIOULLAH Fatiha	Biologie	CHU Martinique	19/06/2018
Dr KETTERER-MARTINON Sophie	Pédiatrie	CHU Martinique	19/06/2018
Pr BENACHI Alexandra	Obstétrique	AP-HP	23/07/2018
Dr MOTTET Nicolas	Obstétrique	CHU Besançon	07/08/2018
Dr LERAT Justine	ORL	CHU Limoges	16/08/2018
Pr LEVEQUE Nicolas	Biologie	CHU Poitiers	07/09/2018
Dr LOOT Maya	Pédiatrie	CHU Bordeaux	09/11/2018
Dr MINODIER Philippe	Pédiatrie	AP-HM	15/11/2018
Dr VLADIMIROV Vladimir	Obstétrique	CH Saint-Flour	15/11/2018
Pr BRISSAUD Olivier	Pédiatrie	CHU Bordeaux	18/12/2018

Annexe 5 Réseaux de surveillance :

Réseau de partenaires pour la déclaration en ligne des cas d'infection congénitale à CMV (plateforme Voozanoo)