



Rapport annuel d'activité

2018

Centre de national de référence
des Herpesvirus

Année d'exercice
2017



SOMMAIRE :

1. Missions et organisation du CNR	p 8
2. Activités d'expertise	p 8
2.1 Evolutions des techniques	p 9
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	p 11
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	p 15
2.4 Collections de matériel biologique	p 15
2.5 Activités d'expertise	p 18
2.6 Activités de séquençage	p 22
3. Activités de surveillance	p 24
3.1 Description du réseau de partenaires	p 24
3.1.1 <i>Infection congénitale à CMV</i>	p 24
3.1.2 <i>Infections néonatales à HSV</i>	p 26
3.1.3 <i>Infections à CMV chez l'immunocompétent</i>	p 26
3.1.4 <i>Surveillance de la résistance des herpès virus aux antiviraux</i>	p 26
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	p 27
3.2.1 <i>Surveillance des infections néonatales à CMV</i>	p 27
3.2.2 <i>Surveillance des infections néonatales à Herpes simplex</i>	p 31
3.2.3 <i>Epidémiologie de l'infection à CMV dans la population générale</i>	p 32
3.2.4 <i>Surveillance des infections graves à HSV</i>	p 33
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti infectieux	p 34
3.3.1 <i>Surveillance de la résistance des CMV aux antiviraux</i>	p 34
3.3.2 <i>Surveillance de la résistance de HSV aux antiviraux</i>	p 39
3.3.3 <i>Surveillance de la résistance des VZV aux antiviraux</i>	p 40
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillances nationaux ou internationaux	p 41
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	p 41
3.5.1 <i>Facteurs prédictifs de résolution spontanée d'une infection à CMV en transplantation rénale</i>	p 41
3.5.2 <i>Cohorte de surveillance des non-réponses aux antiviraux (ORPhaViC PHRCN 2010)</i>	p 42
3.5.3 <i>Apport du NGS dans la compréhension des non réponses sans résistance virologique et dans les contrôles de qualité</i>	p 43
3.5.4 <i>Séroprévalence de l'infection à cytomégalovirus en métropole et dans les départements d'outre-mer</i>	p 43
3.5.5 <i>Etude TransfeCMV (NTC02694484)</i>	p 47
3.5.6 <i>Participation à des projets de Recherche clinique dont l'investigateur principal n'est pas membre du CNR</i>	p 48
3.5.7 <i>Surveillance des Infections à EBV</i>	p 48
4. Alerte	p 48
5. Activités de rétro-information, de formation et de conseil	p 48
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	p 48
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	p 51
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public..)	p 52
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	p 52
6.1 Activités de recherche en cours de l'année 2017, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	p 52
6.1.1 <i>Infection congénitale à CMV</i>	p 52

6.1.2	<i>Biomarqueurs des infections à CMV et résistance aux antiviraux</i>	p 53
6.1.3	<i>Analyse des mécanismes d'action des nouveaux anti-CMV et recherche de nouvelles cible</i>	p 54
6.1.4	<i>Variabilité des herpès virus</i>	p 54
6.1.5	<i>Projets de recherche EBV</i>	p 55
6.2	Liste des publications et communications de l'année 2017, ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	p 55
7.	Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux	p 61
8.	Programme d'activité pour les années suivantes	p 61
Annexe 1 : Missions et organisations du CNR		p 64
1.1	Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	p 64
1.2	Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	p 66
1.3	Locaux et équipements	p 67
1.4	Collection de matériel biologique	p 70
1.5	Démarche qualité du Laboratoire	p 71
Annexe 2 : Capacités techniques du CNR		p 73
2.1	Liste des techniques de référence	p 73
2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR	p 76
Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)		p 77

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 zonas 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 immunsupresseur 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 évènements les plus importants de 2017 et les actions du CNR en regard.

En 2017, Le CMV reste un enjeu de santé publique majeur. Et si aucun vaccin n'est encore disponible des essais vaccinaux sont en cours 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 endothérial 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).

Parallèlement, 2017 a vu l'avènement de deux nouvelles molécules, le maribavir ciblant la phosphotransférase virale et le letermovir ciblant le complexe terminase du CMV. Ces molécules spécifiques du CMV sont très attendues, et les essais cliniques de phase III sont en cours, pour le maribavir ou terminés pour le letermovir, en prophylaxie en greffe de cellules souches hématopoïétiques (Marty et al., NEngland J Med 2017). Le CNR joue un rôle majeur d'expertise pour définir leurs modes d'utilisation et surveiller les résistances. De nouvelles recommandations internationales et nationales pour la prise en charge des patients transplantés ont également été publiées, en transplantation d'organe (Kotton, Transplantation 2018), en greffe de cellules souches

hématopoïétiques (SFGMTC bulletin du cancer 2017) auxquelles le CNR a contribué, ainsi que les dernières recommandations européennes en greffe de cellules souches hématopoïétiques (ECIL 2017- on line).

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. Son dépistage ou sa prévention ne sont toujours pas organisés en France malgré des progrès notables dans son diagnostic, dans les facteurs pronostiques et dans la prise en charge des nouveaux nés atteints. Les recommandations internationales élaborées en 2016 ont été publiées en 2017 (Rawlinson, Lancet 2017) avec deux points importants :

- Une recommandation en faveur d'un dépistage universel de la surdité, avec une recherche de CMV dans la salive ou les urines en cas de surdité,
- et une recommandation de traitement des enfants infectés symptomatiques.

Des recommandations européennes ont également été élaborées en 2017 par le groupe ECCI (European Initiative for Congenital Cytomegalovirus). En France, une saisine a été déposée au Haut Conseil de santé Publique, dont les conclusions seront rendues publiques avant l'été. Dans tous les cas, le CNR a été sollicité pour participer à ces travaux. Les travaux du CNR contribuent à l'amélioration des facteurs pronostiques (Sellier et al., 2016) en attendant de nouvelles approches vaccinales et de nouveaux antiviraux. Le CNR propose sur son site internet des conseils destinés aux femmes enceintes pour prévenir l'infection à CMV pendant la grossesse. Ces conseils sont indispensables pour les femmes séronégatives afin d'éviter une primo-infection, mais aussi utiles pour éviter les réinfections chez les femmes séropositives puisqu'il est désormais démontré que 50% des infections congénitales résultent d'une infection secondaire, infection ou réinfection, avec un risque de séquelles équivalent à celui des infections primaires. **La base de données globale sur l'infection congénitale à CMV par le CNR validée par la CNIL**, et désormais fonctionnelle devrait permettre de collaborer sur une base identique avec d'autres pays européens. Les praticiens ont commencé à déclarer en ligne en 2017. Elle sera traduite en anglais en 2018.

Les infections par les virus herpes simplex (HSV) tout particulièrement pendant la grossesse restent une préoccupation majeure en gynécologie-obstétrique et néonatalogie. 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 proposée à la CNAM en 2018 avec l'expertise du CNR. Des recommandations sur la prise en charge des infections herpétiques ont également été publiées par le CNGOF (Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français) fin 2017. 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. En 2017, le niveau de déclaration a nettement augmenté. Le laboratoire CNR a également retravaillé les fiches de déclaration avec le nouveau laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière. Enfin, l'impact du nouveau variant de HSV-2 décrit par le laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière est à surveiller en termes de diagnostic, de pouvoir pathogène, et de résistance aux antiviraux.

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 avait mis en place un contrôle de qualité national pour la détection et la quantification des Herpesvirus dans différentes matrices biologiques, ainsi, qu'un contrôle de qualité national pour les résistances aux antiviraux des virus herpes simplex. **En 2017**, il a bien évidemment poursuivi cette mission, dans le cadre des missions du CNR avec notamment l'organisation d'un contrôle de qualité national pour le diagnostic moléculaire des infections à Herpesvirus dans le liquide cérébrospinal. Par ailleurs, le laboratoire de la Pitié-Salpêtrière participe, en collaboration avec le QCMD, à la mise en place des contrôles de qualité internationaux pour la détection et la quantification des génomes des HSV et du VZV, ainsi que pour la résistance génotypique des HSV aux antiviraux.

Les traitements antiviraux évoluent, et des inhibiteurs ciblant de nouvelles protéines virales plus sélectifs et peu toxiques se profilent, tant dans le domaine du CMV que dans le domaine de des HSV et du VZV. Une attention particulière devra être apportée à leur barrière génétique dans le cadre de l'utilisation en clinique, ainsi qu'à leur cadre optimal d'utilisation.

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 Cytomégalovirus élargit son périmètre et devient CNR des Herpesvirus. Deux nouveaux laboratoires intègrent ce périmètre : un nouveau laboratoire associé le laboratoire de virologie de la Pitié Salpêtrière plus spécialisé dans les herpès virus cutanéomuqueux notamment HSV, mais aussi VZV dont il partage l'expertise avec le laboratoire de Limoges, et un laboratoire partenaire le laboratoire de virologie du CHU de Grenoble, en tant que référent pour l'EBV. L'expertise CMV étant assurée par le laboratoire de virologie de Limoges et le laboratoire associé de Necker et l'expertise HHV6 par les laboratoires de la pitié Salpêtrière et de Limoges. Cette nouvelle organisation permet de couvrir les missions d'aide au diagnostic de surveillance épidémiologique et de surveillance des résistances de la majorité des herpès virus.

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 1060 cas, avec déclaration informatisée depuis 2016, participera au réseau européen mis en place par l'ECCI (groupe européen) fin 2018. Les travaux du CNR ont permis grâce aux cohortes mises en place par le laboratoire de Necker de montrer que la moitié des enfants infectés naissent de mère séropositive. Ce point important va modifier la prise en charge des femmes enceintes, en particulier si des conseils de prévention sont mis en place. La surveillance nationale des cas d'herpès néonatal, mise en place en 2011 et depuis 2017 en collaboration avec le laboratoire associé de la Pitié montre une prévalence estimée de 0,034% en 2017 (cas rapportés au nombre de naissances). La surveillance nationale des résistances du CMV aux antiviraux montre des chiffres stables de résistance avec une prévalence de 38,4 % chez les patients non répondeurs au traitement, mais une émergence de mutations isolées de haut niveau de résistance (8% des cas) dans la polymérase virale. Elle conserve toute son importance du fait de l'arrivée de deux nouveaux anti CMV le maribavir en phase III et le letermovir en ATU en prophylaxie. Le réseau de surveillance des résistances des herpès cutanéo-muqueux aux antiviraux s'élargit et cette année sont présentés les premiers chiffres nationaux avec des prévalences de résistance parmi les patients non répondeurs de 21% pour HSV.

Les travaux de développement et d'évaluation de nouvelles techniques se poursuivent, avec notamment le développement de la plate forme de séquençage du CNR, le développement des techniques de séquence haut débit pour l'analyse des résistances CMV et VZV. Mais aussi, l'évaluation des performances de la trousse de charge virale CMV Altona Real star™ CMV, l'évaluation des performances de l'extracteur automatisé E Mag™ bioMérieux associé ou non à une distribution automatisée des réactifs par le pipetteur E Stream, dont les résumés seront consultables dans la rubrique dédiée aux évaluations techniques du site internet du CNR
L'évolution générale des collections du CNR est marquée par un accroissement progressif de l'activité des laboratoires de Limoges et Necker, l'apport des collections des laboratoires de la Pitié et de Grenoble, et l'intégration progressive des collections du CNR dans les Centres de Ressources Biologiques des établissements.

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...), les collaborations internes, les réseaux nationaux 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 2017 French authorities decided to study the opportunity of congenital CMV screening and ask for the NRC expertise. Result are now pending. With its database developed in Limoges, of now 1060 cases which has been made accessible as an electronic survey for clinicians and virologist, the NRC will join the European network that will be put in place in 2018 by the ECCI. And the continuous efforts of Necker laboratory through its paediatric and pregnant women cohorts give a large contribution to CMV infection knowledge. For example they demonstrate that, in France, half of the infected newborns were born from seropositive mothers, which will notably modify the counselling and the survey of CMV congenital infection in France. **Neonatal HSV infections survey** begun in 2011 by the previous NRC largely benefit from the expertise of Pitié Salpêtrière, and in 2017 the prevalence of neonatal HSV was estimated to be 0,034% in France. **The resistance network was also increased** and restructured by these new collaborations allowing to give more reliable results at the national level. In 2017 prevalence of CMV resistance in non-responders is 38,4%, 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 soon on the CNR Website.

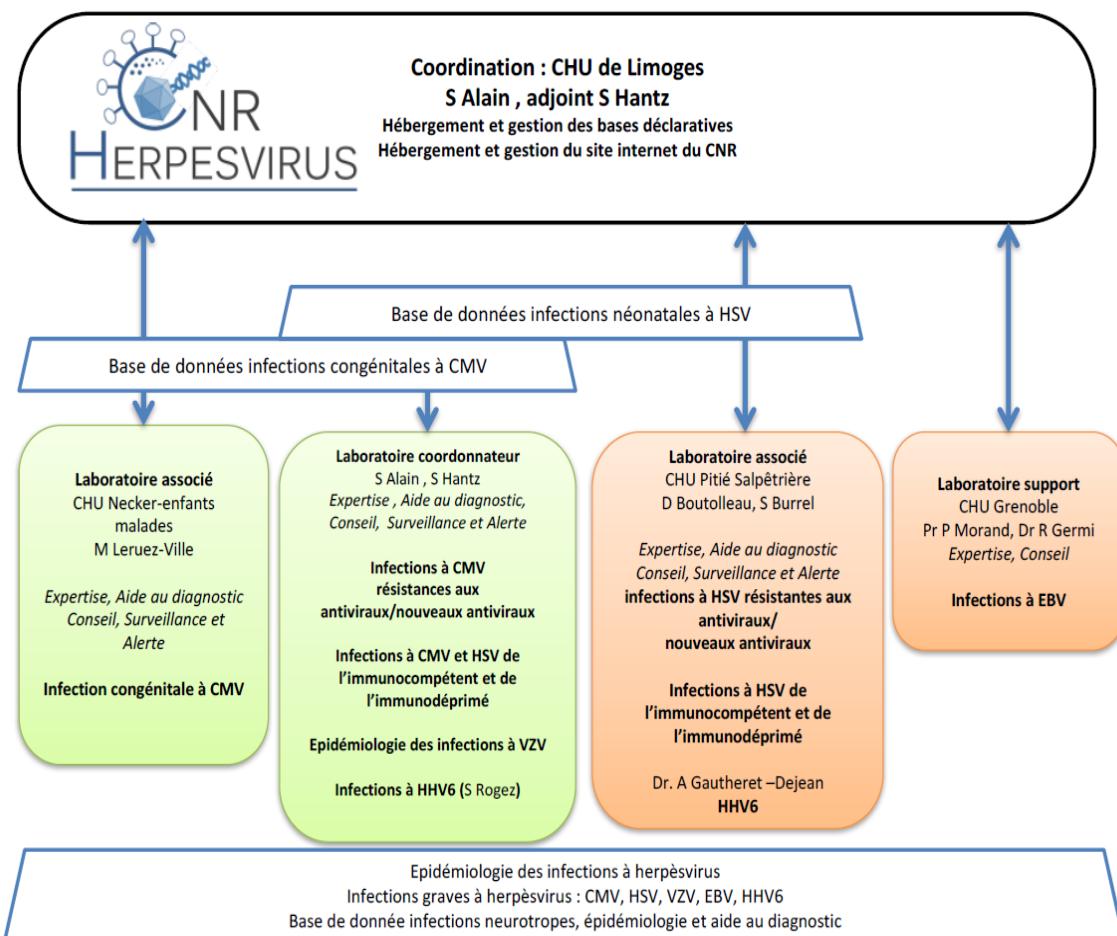
The NRC samples and isolates collections increase for Limoges and Necker and benefit from the input of La Pitié and Grenoble. They are progressively integrated in the biological resources centers of each laboratory hospital.

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

Le responsable adjoint du CNR est le Dr S Hantz , MCU-PH dans le laboratoire coordonnateur et membre du CNR depuis sa création



Aucune modification n'a été apportée en 2017 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 2017 ont été mises en place plusieurs nouvelles techniques :

- Automatisation des diagnostic CMV sur Guthrie
- Nouvelle technique de typage VZV
- Typage EBV

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

Ont été évaluées, les performances des trousse suivantes :

- Performances de la trousse de charge virale CMV Altona Real star™ CMV
- Performances de l'extracteur automatisé E Mag™ bioMérieux associé ou non à une distribution automatisée des réactifs par le pipetteur E Stream

2.1 Évolutions des techniques

Laboratoire CNR Limoges :

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

En cours de développement

Laboratoire associé Necker :

Essai d'automatisation PCR CMV sur DBS

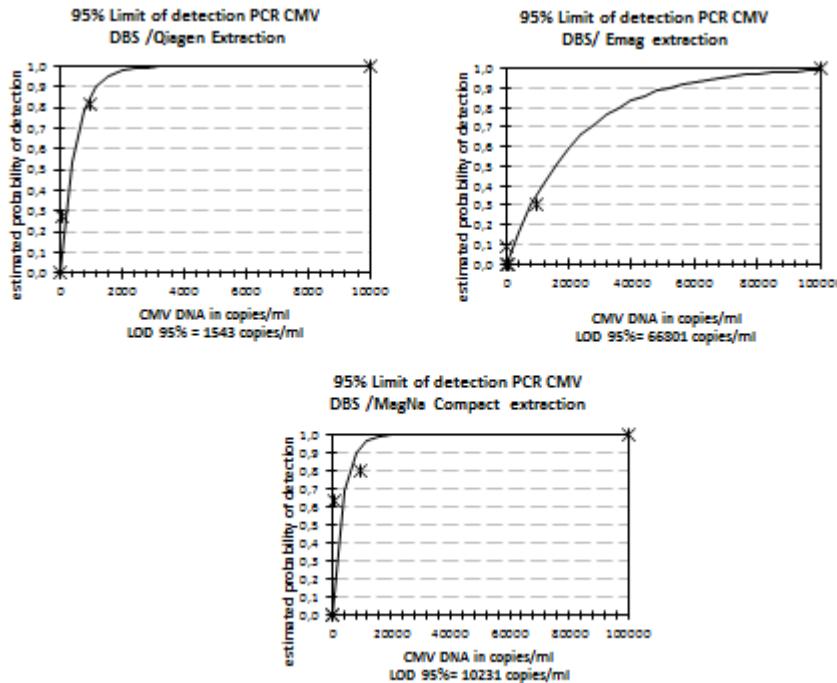
- Méthodes : Deux protocoles automatisés d'extraction ont été comparés au protocole d'extraction de référence. Ce protocole mis au point au laboratoire est utilisé depuis plus de 10 ans et a été décrit dans plusieurs publications (Vauloup-Fellous 2007 ; Leruez-Ville M, CID, 2011). Brièvement cette technique consiste à découper le spot en plusieurs fines bandelettes qui sont lavées dans un tampon de lavage puis exposées 10 min à 100°C avec la soude diluée à 0.16%. L'extraction est ensuite réalisée manuellement sur colonne avec une élution de l'ADN dans 50 µL (QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France)). Cette technique est longue et fastidieuse. Nous avons essayé 2 techniques d'extraction automatisée disponibles dans notre laboratoire. L'extraction a été faite sur l'extracteur Emag (bioMérieux, France) en suivant le protocole du fabricant : incubation de un ou deux spots de sang séché de 50µL dans 2 mL de tampon de lyse (Nuclisens EasyMag Lysis Buffer) pendant 30 min puis extraction sur l'automate Emag avec élution dans 50 µL. L'extraction a aussi été faite sur l'extracteur MagnaPure Compact (Roche, Meylan, France) à partir d'un spot de sang (50 µL) incubé dans 200 µL de tampon de lyse (Nuclisens Easy Mag Lysis Buffer) à 95°C pendant 15 min, le surnageant à été extrait dans l'automate. L'ADN du CMV a été amplifié par la technique CMV-R gene (Argène bioMérieux).

-Échantillons : Pour calculer la limite de détection de chaque protocole d'extraction, une série de buvards test a été constituée en déposant 50 µL d'échantillons de sang total de sujets infectés sur des buvards 3MM (Whatman). Ces échantillons avaient été quantifiés par la technique de routine de laboratoire respectivement à 5.0 ; 4.0, 3.0, 2.0 log₁₀ copies/mL. De 6 à 10 spots pour chaque niveau de charge virale ont été testés avec chaque protocole. Les buvards ont été séchés plusieurs jours (au moins 3 jours) à température ambiante avant d'être utilisés. Par ailleurs, 11 buvards provenant de nouveau-nés infectés ont été testés rétrospectivement et 48 buvards de nouveau-nés dont le statut infectieux n'était pas connu ont été testés prospectivement.

- Résultats :

La limite de détection 95% était bien meilleure avec le protocole maison sur colonne qu'avec les 2 techniques automatisées (Figure 1).

Figure 1 :



Concernant les 11 cartons de Guthrie provenant de 11 nouveau-nés connus infectés : 7/11 (63%) étaient positifs après extraction sur Emag et 9/11 (81%) étaient positifs après extraction sur MagNa Compact. Les 3 techniques ont été testées en prospectif sur 48 cartons de Guthrie de nouveau-nés avec une suspicion d'infection congénitale : un échantillon a été positif avec les 3 techniques ; 46 échantillons ont été négatifs avec les 3 techniques et un échantillon a été faiblement positif après extraction sur Magna Compact et négatif après extraction avec les 2 autres techniques (il ne restait plus de prélèvement pour retester ce spot).

Conclusions : la sensibilité de la technique manuelle sur colonne reste très supérieure à celles des 2 techniques d'extraction automatisées testées.

Type VZV par PCR temps réel

Laboratoire associé de la Pitié Salpêtrière

Mise en place de la technique de typage des souches de VZV sauvages et vaccinales par PCR en temps réel et par séquençage.

Type EBV par PCR Séquence

Laboratoire de 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.

Le laboratoire a engagé un travail pour le développement d'une technique de typage par séquençage SANGER de ces gènes.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

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
- ✓ 4 points de gamme
- ✓ Contrôle interne pour chaque échantillon exprimé en Ct
- ✓ Résultats directement calibrés en UI/mL

La limite de détection a été vérifiée sur le standard zaptometrix : Standard NATtrol™ Cytomégalovirus Zepmetrix dilué en sang total (souche de référence AD169), dilué de $4,5 \log_{10}$ à $1 \log_{10}$ UI/mL.

Les CV Altona et R-gene® diffèrent en moyenne de $0,26+/-0,10\log_{10}$ et respectivement de $0,36+/-0,10$ et $0,63+/-0,12\log_{10}$ avec la valeur attendue.

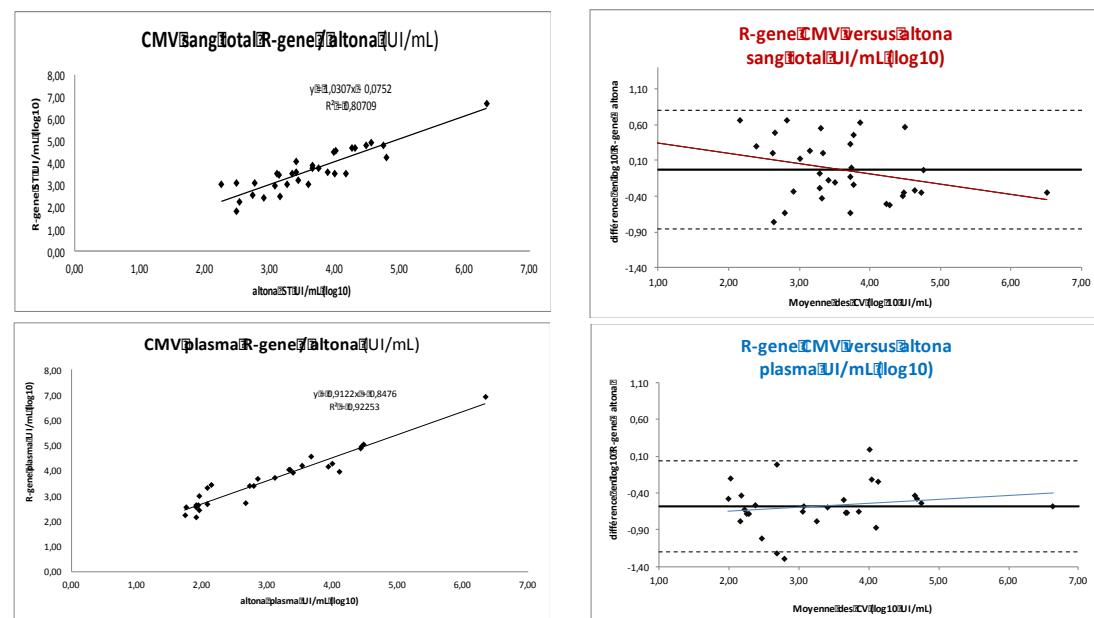
La limite de détection est de $3,0 \log_{10}$ UI/mL pour Altona (LOD₉₅ 124,5 UI/mL) et $2,5 \log_{10}$ UI/mL pour R-gene® (LOD₉₅ 150 UI/mL).

Comparaison sur :

- Contrôle qualité sang total QCMD (2015): valeurs attendues 1,9 à $3,4 \log_{10}$ UI/mL

Les CV Altona et R-gene® sur les échantillons du QCMD 2015 diffèrent en moyenne de $-0,08+/-0,38\log_{10}$ et respectivement de $0,06+/-0,31$ et $0,14+/-0,17\log_{10}$ avec la valeur attendue par le consensus des réponses au QCMD. Tous les échantillons attendus positifs ont été trouvés positifs, à l'exception d'un échantillon (QCMD #7 : $1,9 \log_{10}$), indétectable par les deux techniques qui avait le statut « educational ».

- 37 échantillons de patients (sang total et plasma) avec une CVCMV détectable en routine sur sang total par la trousse CMVR-gene® (bioMérieux)



Les résultats obtenus à partir des échantillons de sang total montrent une très bonne concordance en termes de détection d'une ADNémie (1 discordant non détecté par Altona) et une bonne corrélation pour la quantification entre les 2 techniques avec un $R^2=0,8$.

Cependant les différences entre les charges virales mesurées par les 2 techniques varient en fonction de la virémie, la trousse R-gene® ayant tendance à surquantifier les CV basses et inversement pour la trousse Altona.

Les résultats obtenus à partir des échantillons de plasma montrent une corrélation meilleure que sur sang total pour la quantification entre les 2 techniques ($R^2=0,9$). 4 échantillons non détectés par R-gene® sont détectés par Altona. On notera le comportement légèrement différent des trousse dans le plasma, alors que les échantillons et la

méthode d'extraction sont les mêmes.

Conclusion : bonne corrélation entre les trousse mais comportement différent sur les valeurs basses.
A confirmer sur l'étude d'échantillons séquentiels.

Publié sous forme de poster au congrès de la RICAI 2017.

Laboratoire associé Necker :

Validation de méthode PCR CMV sur chaîne bioMérieux : EMag/Estream

- Les résultats de la PCR CMV et de PCR EBV avec la trousse CMV-R gene et EBV-R gene (Argène-bioMérieux) ont été comparés entre une analyse des échantillons après extraction sur le MagNa Pure LC (Roche) suivie d'une PCR sur amplificateur CFX96 et d'une analyse des échantillons sur la chaîne bioMérieux (extraction EMag, distribution Estream, amplification sur 7500 Applied Biosystem).

41 échantillons dont 33 connus positifs en PCR CMV et 8 connus négatifs en PCR CMV ont été sélectionnés rétrospectivement dans la biothèque du laboratoire : 8 échantillons de liquide amniotique, 8 de LBA, 8 de salive, 8 d'urine et 12 de sang total.

13 échantillons de sang totaux dont 10 connus positifs en PCR EBV et 3 connus négatifs en PCR EBV ont été sélectionnés rétrospectivement dans la biothèque du laboratoire.

Le delta moyen de quantification pour la PCR CMV entre les 2 types d'analyse MagNa Pure LC / Emag Estream était de + 0.2 log. Pour 3 échantillons le delta de log était supérieur à 0.5 log : il s'agissait d'un échantillon d'urine et d'un échantillon de sang total faiblement positifs proches du seuil de détection (2.7 log) et d'un échantillon de LBA très fortement positif sous-quantifié d'un log en technique Emag (Figure 2).

Le delta moyen de quantification pour la PCR EBV entre les 2 types d'analyse MagNa Pure LC / Emag Estream était de + 0.3 log. Un prélèvement négatif avec l'ancienne technique du laboratoire s'est avéré très faiblement positif après extraction avec l'Emag : ce résultat a été considéré comme un vrai positif après analyse des résultats précédents et ultérieurs du patient.

Figure 2 A

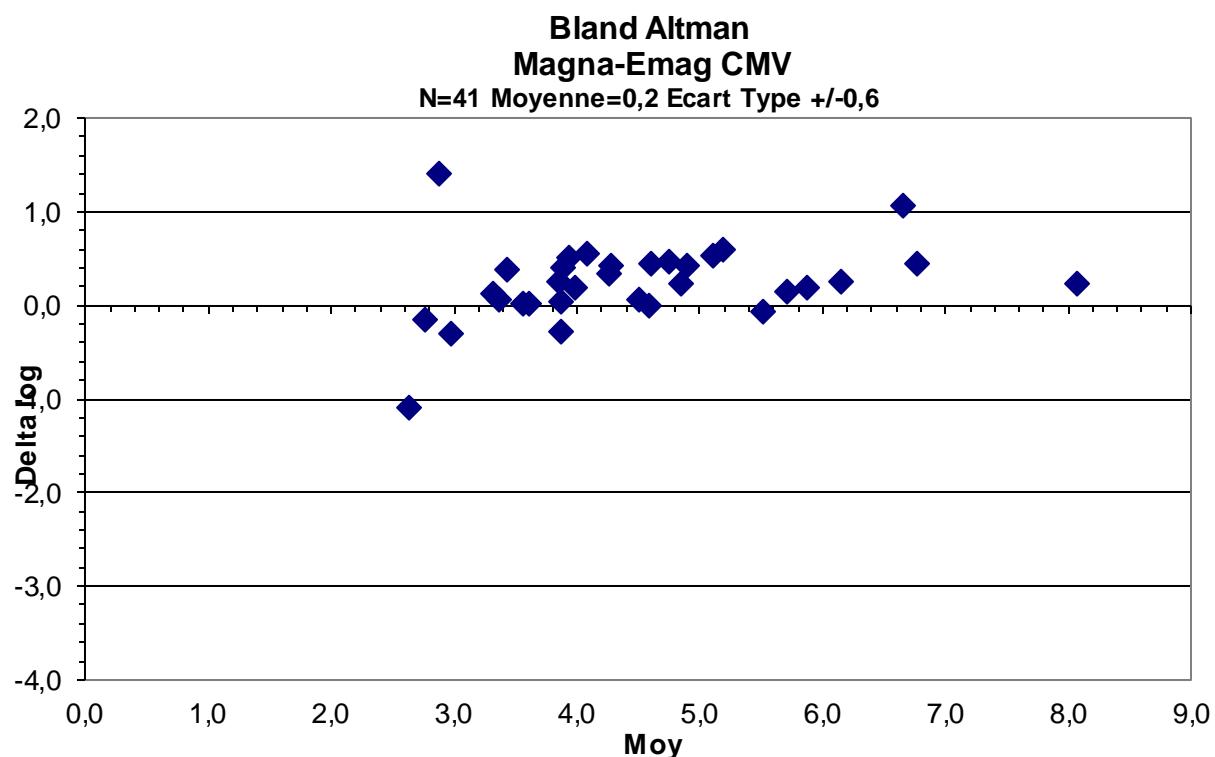
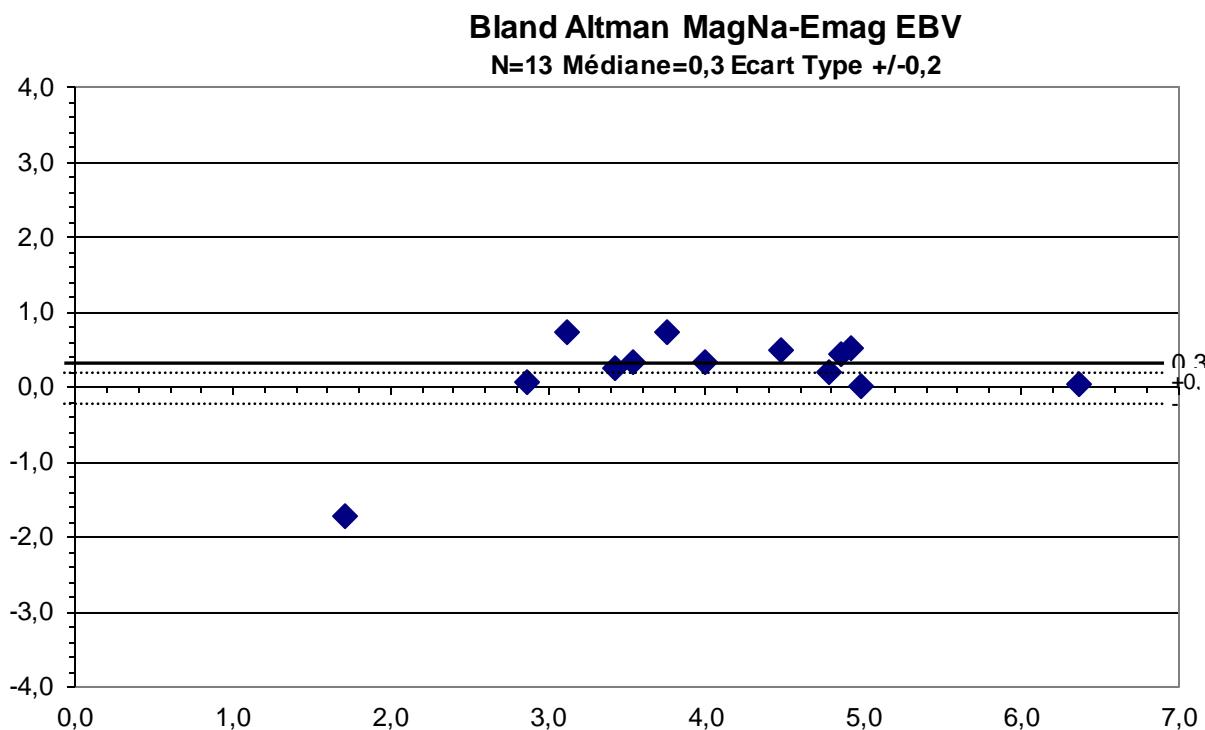


Figure 2B



Les comparaisons sont donc correctes.

Laboratoire de Grenoble :

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

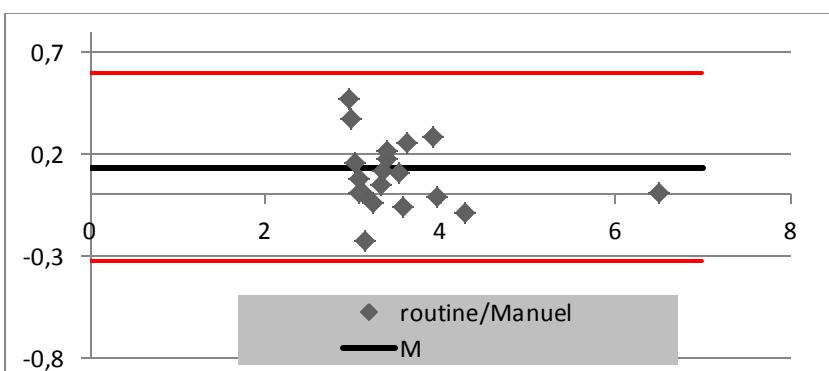
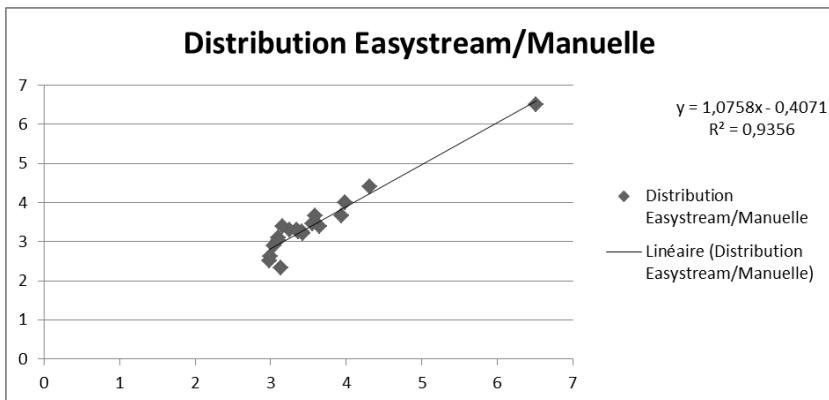
Comparaison de la méthode de distribution manuelle versus la distribution avec l'Easystream

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 considérées 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 1 ddl : 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

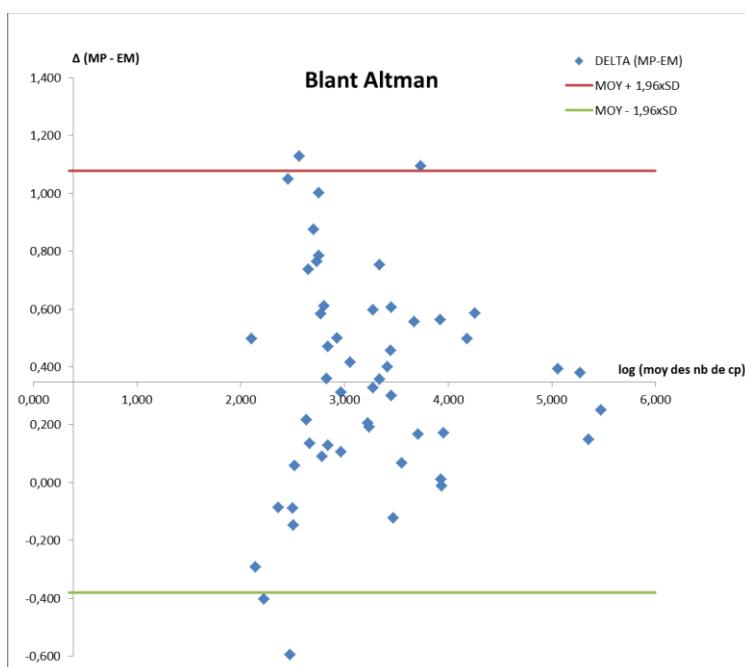
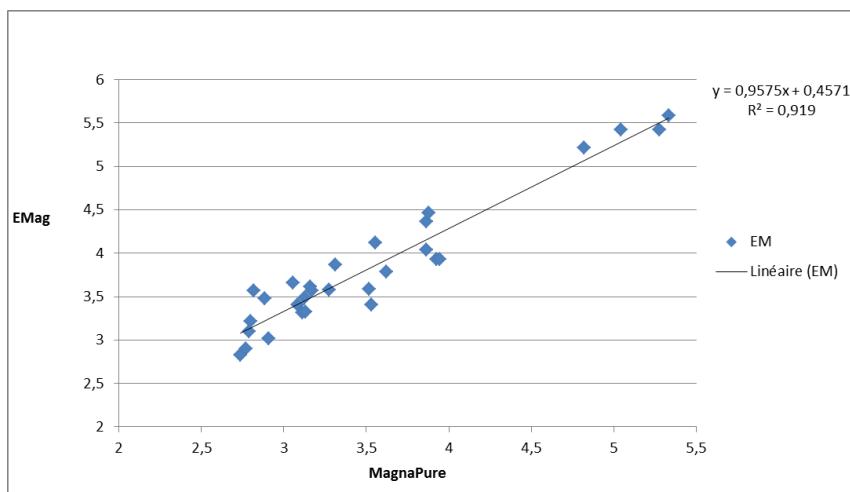
L'analyse quantitative des 52 résultats positifs dans les 2 techniques est réalisée par le calcul la droite de régression, équation et coefficient de corrélation et l'étude des différences à l'aide du graph de Blant Altman.

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 Blant Altman, 4 valeurs sur 52 sont à l'extérieur des bornes $1,96 \times SD$ 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 utilisée pour faire un suivi de la cinétique de charge virale.



2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

-Transfert de la méthode de génotypage de résistance CMV 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.

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, l'apport des collections des laboratoires de la Pitié et de Grenoble, et l'intégration progressive des collections du CNR dans les Centres de Ressources Biologiques des établissements.

Laboratoire CNR Limoges :

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

Ci dessous le récapitulatif et les mouvements 2017

Collection CRB	Ressources globales	Nature de la ressource	Nombre de ressources réceptionnées	Nature de la ressource	Mise à disposition 2017
Sang total CNR Herpès Virus		sang total issus de suivi de patients transplantés	670	sang total issus de suivi de patients transplantés	182 (évaluation PCR CMV Altona)
Souches CMV d'enfants en crèche	73	cellules infectées conservées en azote liquide	0	-	(sous embargo)
PHRC CrechMV	1 772 dont 663 positives en PCR CMV et 2012 caractérisées pour leur génotype gB, gH et gN	Salive d'enfants en crèche	0	-	(sous embargo)
Protocole ANSM TransfeCMV		Selles et sérum du protocole TransfeCMV	93 +250	93 selles et 250 sérum de statut sérologique CMV connu	

Collection de souches virales hors protocole : intégration de nouvelles souches au CRB

Souches mises en CRB	2013	2014	2015	2016	2017	total
nombre d'échantillons	39	59	12	-	33	143
virus	39 CMV	57 CMV, 2 HSV2	6 HSV2, 6 HSV1	-	33 CMV	
Nombre de patients	20 patients avec 1 à 2 aliquotes par patients	27 patients à 1 à 4 aliquotes par patients	6 patients à 2 aliquotes/patients	-	10 patients à 3 ou 4 aliquotes par patients	63

Souches en attente d'intégration 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. Rapatriement des échantillons en cours.

- 402 patients inclus : nombre d'aliquotes de sang total des patients de Limoges et reçus des autres centres : 3399

Année		2012	2013	2014	2015	2016	2017	Total
Prélèvements conservés (biothèques)		79	1050	667	595	327	681	3399

Protocole QuantiCR+ : Quantiféron™ et prédition 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 : 1248 de 2006 à 2016 et 280 reçus en 2017

Prélèvements adressés au CNR pour expertise d'infection congénitale et mis en biothèque en 2017 : 169 échantillons de sérums pour confirmation diagnostique de primo-infection CMV, 8 liquides amniotiques 1 positif.

Laboratoire associé Necker

La biothèque du CNR de Necker est intégrée au centre de ressources Biologiques de l'Hôpital 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 du GHPS 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 2017, cela représente près de 2100 prélèvements (LCR, LBA, prélèvements cutanéo-muqueux, prélèvements génitaux, prélèvements oculaires ...) et 250 souches virales. Ceci inclut en particulier l'ensemble des prélèvements/souches testé au laboratoire pour la sensibilité 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 sanguins totaux, des sérum 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 lymphoblastoides 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.

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.

Activités d'expertise :

En 2017 les laboratoires participant au CNR ont reçu :

Laboratoire CNR Limoges :

Pour le CMV recrutement local et national

- **169 échantillons de sérum** pour confirmation diagnostique de primo-infection CMV dont 109 hors CHU de Limoges. Sur ces sérum l'avidité et les IgM sont mesurés par la technique Diasorin Liaison XL. 14 cas correspondaient à des primo-infections en cours de grossesse.
- **9 souches de CMV congénital** pour séquence du génome
- Le laboratoire a effectué 29 PCR CMV sur sérum pour rechercher une réPLICATION virale en cas d'avidité intermédiaire ou forte et présence d'IgM chez 16 femmes enceintes. Deux femmes enceintes présentaient une réPLICATION virale très faible inférieure à 2 log UI/mL.
- Le laboratoire a réalisé **221 PCR CMV sur urine/salive** pour diagnostic d'une infection congénitale à CMV dans le cadre de RCIU. Un seul enfant était infecté.

Pour HSV, recrutement essentiellement local à l'exception des 6 prélèvements adressés pour recherche de résistance.

- **146** prélèvements réalisés dans le cadre de **lésions cutanéo-muqueuses**. Devant le constat d'une efficacité peu satisfaisante des examens directs en 2016, la stratégie diagnostique s'est orientée sur une recherche directe par PCR puis mise en culture des prélèvements positifs en HSV-1 ou 2. Ainsi, la recherche d'HSV a été effectuée par immunofluorescence directe et mise en culture sur les 3 premiers mois puis changement de stratégie diagnostique avec PCR puis mise en culture des positifs sur les mois suivants. 33 prélèvements positifs : 27 à HSV1 et 6 à HSV2 ; 13 souches ont pu être isolées (11 HSV-1 et 2 HSV-2)
- 94 prélèvements réalisés chez les nouveau-nés de mère séropositive pour HSV 1 ou 2 ou ayant des antécédents d'herpès cutanéo-muqueux au CHU de Limoges. La PCR HSV est réalisée en parallèle sur prélèvements conjonctivaux, nasaux et pharyngés : 1 nouveau-né positif HSV 2 sur le prélèvement conjonctival réalisé à 2 reprises. Sa sérologie présentait un profil d'immunité ancienne d'origine maternelle avec des IgG sans IgM. Il n'a pas présenté d'évolution péjorative. Les prélèvements de LCR et/ou de sang total étaient tous négatifs
- **611 PCR dans le LCR** : 6 LCR positifs à HSV1(3 patients) et 2 à HSV2 (1 patient). Cas positifs à HSV1 : 2 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, l'un étant une SEP en poussée et l'autre un tableau de vertiges isolés. Le 3^e cas concerne un nouveau-né d'1 mois (cf infections graves à HSV). Cas positif à HSV2 : Patient de 29 ans hospitalisé dans un tableau de syndrome méningé fébrile. Le bilan biologique ne retrouve aucun syndrome inflammatoire, pas d'hyperleucocytose. La sérologie HSV-1 et 2 était positive en

IgM et négative en IgG. Les sérologies VIH, VHB et VHC sont négatives. La ponction lombaire objectivait 315 éléments dont 70% de lymphocytes, une hyperprotéinorachie à 0.89 g/l, sans hypoglycorachie. La PCR HSV-2 était positive dans le LCR. Devant la persistance de céphalée, même en l'absence d'hyperthermie, il a bénéficié d'une deuxième ponction lombaire 3 jours plus tard qui retrouvait une normalisation de la protéinorachie mais une élévation des éléments à 700/mm³ à prédominance toujours de lymphocytes avec toujours une PCR HSV-2 positive. Aucun traitement spécifique n'a été mis en place et l'évolution s'est avérée spontanément favorable

- **142 PCR HSV sur prélèvements ophtalmologiques** : 7 positifs à HSV1 et aucun à HSV2.
- **15 prélèvements respiratoires** (LBA essentiellement) : aucun positif
- **69 PCR sur sang total** : une positive à HSV1 et une positive à HSV2 (cf surveillance des infections graves à HSV)
- **8 PCR sur biopsies** : 1 positif à HSV1
- **94 prélèvements réalisés chez les nouveau-nés** de mères séropositives pour HSV 1 ou 2 ou ayant des antécédents d'herpès cutanéomuqueux au CHU de Limoges. La PCR HSV est réalisée en parallèle sur prélèvements conjonctivaux, nasaux et pharyngés : 1 nouveau-né positif HSV 2 sur le prélèvement conjonctival (cf surveillance herpes néonatal)

Laboratoire associé Necker :

- **244 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 2017, **178 échantillons de liquide amniotique** et **5 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 et Hôpital Foch. En 2017, **dans 20 cas la PCR était positive dans le liquide amniotique et/ou le sang fœtal**, il y a eu 6 IMG pour anomalies cérébrales sévères, 2 enfants symptomatiques et 12 enfants nés asymptomatiques.
- 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 2017, **281 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, Limoges, Rennes, Nantes. **La PCR a été positive dans 20 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 **1082 échantillons de salive** en 2017 provenant de nouveau-nés d'Ile de France.

Nombres de cas diagnostiqués à Necker en 2017 : 58 diagnostics d'infection congénitales en 2017 dont 18 avec un tableau sévère, 7 un tableau modéré et 33 étaient asymptomatiques.

- 20 cas en anténatal : dont 6 sévères (IMG), 1 enfant est né avec une surdité bilatérale, 1 enfant est né avec une surdité unilatérale et 12 enfants sont nés asymptomatiques.
- 19 enfants ont été diagnostiqués à la naissance (notion de séroconversion maternelle ou de symptômes néonataux) : 16 étaient asymptomatiques, 3 avaient une surdité unilatérale.
- 19 enfants ont été diagnostiqués rétrospectivement sur carton de Guthrie : 4 avaient des signes d'appel neurologiques, 7 une surdité bilatérale profonde, 3 une surdité unilatérale profonde et 5 étaient asymptomatiques.

Laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière :

- 20 sérum (Paris AP-HP et CHU de province) pour effectuer les sérologies spécifiques IgG anti-HSV-1 et IgG anti-HSV-2 (LIAISON XL, DiaSorin)
- 5 sérum (Paris AP-HP et CHU de province) pour confirmer une sérologie IgG anti-VZV
- 50 prélèvements biologiques (prélèvement cutanéo-muqueux, LCR, sang total, LBA...) ; Paris AP-HP et CHU de province) pour effectuer les PCR spécifiques HSV-1 et HSV-2

- 40 prélèvements biologiques (prélèvement cutanéo-muqueux, LCR, sang total, LBA... ; Paris AP-HP et CHU de province) pour effectuer une PCR VZV quantitative

Laboratoire de Grenoble :

Dans le cadre de l'activité d'expertise concernant l'EBV, le laboratoire de Grenoble a réalisé en 2017:

- 80 sérologies EBV pour contrôle des résultats d'un laboratoire extérieur (CH, CHU et labo privé). Ceci correspond à 2% de notre activité de sérologie EBV
- 154 PCR EBV pour des laboratoires extérieurs (CH, CHU et labo privé). Ce qui correspond à 3% de notre activité de PCR EBV dont 19 sur des LCR pour expertise et prestation de conseil
- 5 sérologies EBV en IF (VCA IgA et EA IgA) pour 2 patients atteint de carcinome du nasopharynx dans le cadre d'un suivi.
- 5 établissements de lignées lymphoblastoïdes
- 2 typages d'EBV

Organisation de contrôles de qualité

Le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière a organisé en 2017 un contrôle de qualité national interlaboratoires HHVBM-PSL17 concernant la détection et la quantification du génome des Herpesvirus humains.

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, et CMV dans différentes matrices biologiques : sang total, liquide de lavage broncho-alvéolaire, milieu de transport pour virus pour le **Panel A**, et liquide céphalorachidien pour le **Panel B**.

Les panels ont été envoyés à chaque laboratoire le 28 mars 2017, exception faite pour La Réunion et la Martinique pour des raisons logistiques (26 avril 2017). Au total, 52 laboratoires ont participé à ce contrôle de qualité HHVBM-PSL.

La composition des panels A et B était la suivante :

PANEL A

Echantillon HHVBM-PSL	Matrice	Contenu de l'échantillon			Statut de l'échantillon ^a
		Virus	Souche ^b	Dilution ^c	
A 17-01	LBA	VZV	Oka	10 ⁻⁴	Fréquemment détecté
A 17-02	LBA	HSV-1	KOS	10 ⁻³	Fréquemment détecté
A 17-03	SGT	HSV-1	KOS	10 ⁻³	Détecté
A 17-04	SGT	HSV-2	gHSV-2	10 ⁻³	Détecté
A 17-05	MTV	VZV + HSV-1	Oka + KOS	10 ⁻³ + 10 ⁻⁴	Fréquemment détecté

HSV-1/-2 : virus herpes simplex de type 1/de type 2 ; LBA : liquide de lavage broncho-alvéolaire ; MTV : milieu de transport pour virus ; SGT : sang total EDTA ; VZV : virus varicelle-zona.

^aStatut de l'échantillon : un statut est attribué à chaque échantillon en fonction de l'ensemble des résultats qualitatifs de tous les participants. Un échantillon est « fréquemment détecté » s'il est trouvé positif et correctement typé par plus de 95% des participants. Un échantillon est « détecté » s'il est trouvé positif et correctement typé par 60% à 95% des participants. Un échantillon est « rarement détecté » s'il est trouvé positif et correctement typé par moins de 65% des participants. Un échantillon est « négatif » s'il ne contient pas la cible et s'il n'est effectivement détecté par aucun des participants.

^bLes échantillons du panel ont été obtenus par dilution dans les différentes matrices biologiques de stocks des souches virales KOS (HSV-1), gHSV-2 (HSV-2), Oka (VZV).

^cFacteurs de dilution des stocks viraux dans les différentes matrices biologiques.

PANEL B

Echantillon HHVBM-PSL	Matrice	Contenu de l'échantillon			Statut de l'échantillon ^a
		Virus	Souche ^b	Dilution ^c	
B 17-01	LCR	VZV	Oka	10 ⁻⁴	Fréquemment détecté
B 17-02	LCR	HSV-2	gHSV-2	10 ⁻²	Fréquemment détecté
B 17-03	LCR	Négatif	-	-	Négatif
B 17-04	LCR	HSV-1	KOS	10 ⁻³	Fréquemment détecté
B 17-05	LCR	CMV	AD169	10 ⁻⁴	Fréquemment détecté

CMV : cytomégalovirus ; HSV-1/-2 : virus herpes simplex de type 1/de type 2 ; LCR : liquide céphalo-rachidien ; VZV : virus varicelle-zona.

^aStatut de l'échantillon : un statut est attribué à chaque échantillon en fonction de l'ensemble des résultats qualitatifs de tous les participants. Un échantillon est « fréquemment détecté » s'il est trouvé positif et correctement typé par plus de 95% des participants. Un échantillon est « détecté » s'il est trouvé positif et correctement typé par 60% à 95% des participants. Un échantillon est « rarement détecté » s'il est trouvé positif et correctement typé par moins de 65% des participants. Un échantillon est « négatif » s'il ne contient pas la cible et s'il n'est effectivement détecté par aucun des participants.

^bLes échantillons du panel ont été obtenus par dilution dans la matrice biologique LCR de stocks des souches virales KOS (HSV-1), gHSV-2 (HSV-2), Oka (VZV) et AD169 (CMV).

^cFacteurs de dilution des stocks viraux dans la matrice biologique LCR.

L'ensemble des résultats recueillis (56 ensembles de données différents) 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.

- Le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière a organisé en 2017 un contrôle de qualité national interlaboratoires HSV-R PSL17 concernant le diagnostic de la résistance des virus herpes simplex (HSV) aux antiviraux.

Ce contrôle avait pour objectif d'évaluer les différentes méthodes phénotypiques (antivirogramme) 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 11 avril 2017. Au total, 4 centres français ont accepté de participer à ce contrôle de qualité HSV-R PSL17 : laboratoire de Virologie des Hospices Civils de Lyon, laboratoire de Virologie de l'Hôpital Saint-Louis (Paris), laboratoire de Virologie de l'Hôpital Bichat-Claude Bernard (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 HSVR PSL17	Typage HSV	Patient				Sensibilité aux antiviraux	
		Sexe	Age	Lésions	Contexte clinique	ACV	FOS
N°1	HSV-1	F	8	Bouche	Déficit immunitaire combiné par déficit en DOCK8	R	S
N°2	HSV-2	H	55	Sacrum	Greffé rénal	S	S
N°3	HSV-2	H	51	Scrotum	Patient HIV + et greffé rénal	R	S

ACV : aciclovir ; F : femme ; FOS : foscarnet ; HIV : virus de l'immunodéficience humaine ; H : homme ; HSV-1/2 : virus herpes simplex 1/2.

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

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 bioinformatien 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 librairies (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** : Sans objet
- **Surveillance** :
 - Sanger pour génotype de résistance CMV : 280 UL97 + 280 UL54
 - Sanger pour génotype de résistance HSV :
 - NGS (Proton, Life technologies):
 - CMV génotype de résistance 42 UL97 + 42 UL54
 - CMV génome entier (250KPB) : 9 souches + 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 4932, NGS : 71

En 2017 :

Sanger pour génotype de résistance CMV : 280 UL97 + 280 UL54

Sanger pour génotype de résistance HSV :

NGS :

CMV génotype de résistance 42 UL97 + 42 UL54

CMV génome entier : 9 souches + 3 Bacmides CMV

Dépôt des séquences Sanger comportant de nouvelles mutations dans la GenBank. (Pas de nouveau dépôt en 2017)

Laboratoire associé Pitié Salpêtrière

Le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière effectue la recherche des mutations de résistance des Herpesvirus (HSV-1, HSV-2, VZV, CMV) par séquençage des gènes cibles à l'aide de la technique Sanger.

Le CNR ne possède pas de séquenceur de type NGS. L'utilisation de cette technique de séquençage est effectuée dans le cadre de la recherche grâce à la mise en place de collaborations :

- Séquençage des gènes UL23 et UL30 (HSV) et ORF36 et ORF28 (VZV) par une approche amplicon sur la plateforme MiSeq (Illumina) en collaboration avec le Dr Christophe Rodriguez (Hôpital Henri Mondor, Créteil, France) pour l'étude de la résistance aux antiviraux (cf publications).
- Séquençage du génome entier de HSV-1 et HSV-2 sur la plateforme MiSeq (Illumina) en collaboration avec le Dr Sébastien Calvignac-Spencer (Institut Robert Koch, Berlin, Allemagne) pour la caractérisation et l'étude

épidémiologique d'une nouvelle souche de HSV-2 d'origine africaine (cf publications).

3. Activités de surveillance

Les activités de surveillance du CNR herpès virus recouvrent plusieurs champs : les points forts 2017 sont :

La surveillance des infections congénitales à CMV : mise en œuvre progressive de la déclaration sur base de données informatisée

La surveillance des infections néonatales à herpes simplex : augmentation du nombre de cas déclarés (meilleure déclaration des cas)

La surveillance des infections graves ou des nouveaux variants des herpès virus : 3 cas d'infections mortelles à HSV dont deux hépatites chez l'adulte immunocompétent

La surveillance des primo-infections à CMV chez l'immunocompétent : poursuite de la surveillance annuelle sur déclaration et bilan

La surveillance des résistances des herpès virus aux antiviraux : poursuite de la surveillance annuelle et bilan

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 Loum/Ribot).

Pour la surveillance des infections materno-fœtales en 2017 (infections néonatales à HSV, infections congénitales à CMV), le réseau de partenaire était composé de 35 CPDPN/obstétriciens, 37 laboratoires, 19 pédiatres et autres spécialités (pour le suivi de l'enfant), réparties dans 39 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	2016	2017
Laboratoires	31	37
CPDPN / Obstétriciens	33	35
Pédiatres	19	20
Médecins ayant un accès à la plateforme Voozanoo (déclaration en ligne / CMV congénital)	5	43

Au sein de ce réseau, 43 médecins ont un accès à la plateforme de déclaration en ligne des infections congénitales à CMV, ce qui représente 38 de plus par rapport à l'année 2016.

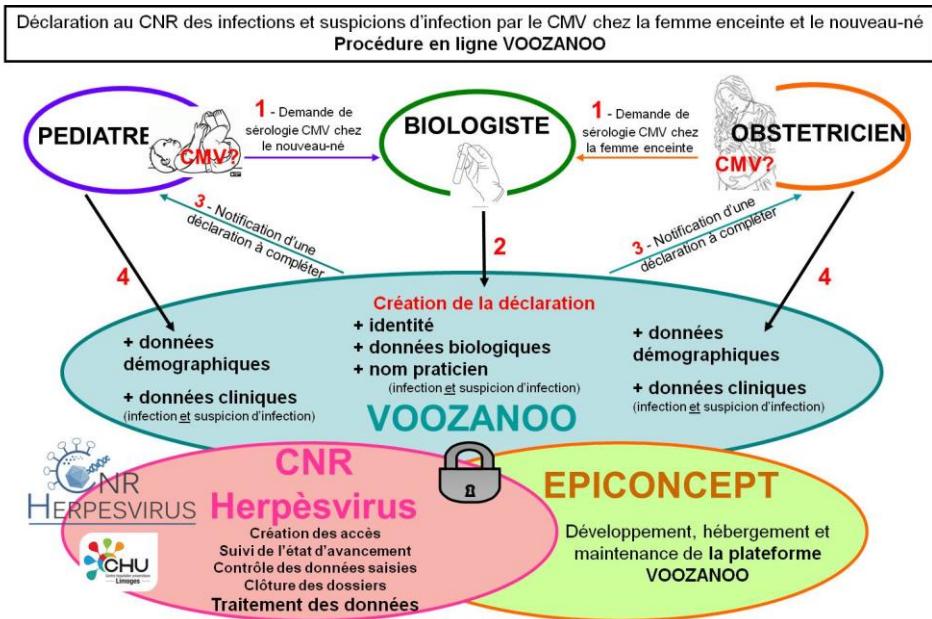
Cf annexe: Réseaux de surveillance : Réseau de partenaires pour le recueil de déclarations et de souches pour les infections materno-fœtales

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

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

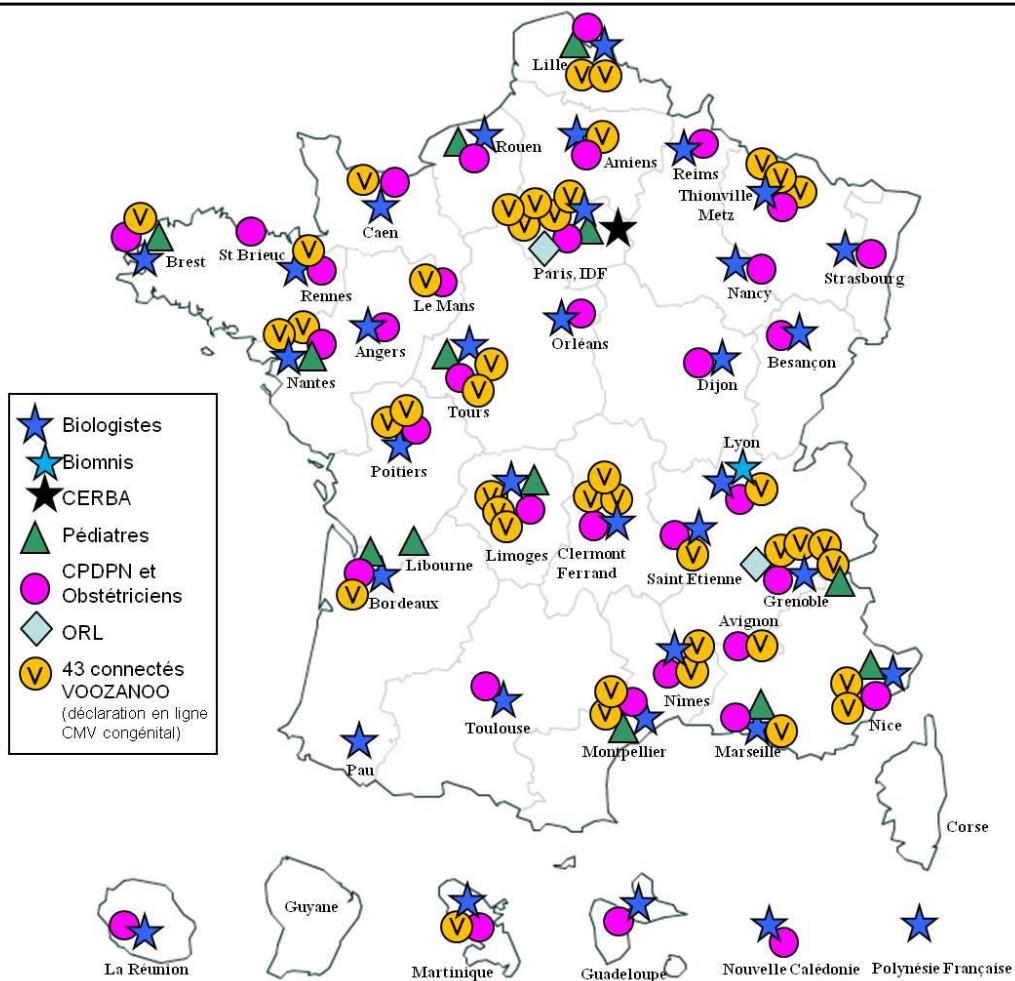
La base CMV congénital est une base de données nationale utilisant le logiciel VOOZANO, par le laboratoire coordonnateur au CHU de Limoges. Elle est opérationnelle et autorise des développements vers des bases d'imagerie notamment échographique ou RMN permettant également aux praticiens de confronter 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 2017 :

Répartition géographique du réseau de surveillance des infections materno-fœtales en 2017



Le réseau de partenaires est composé de **31 laboratoires** sollicités pour leur pratique du diagnostic de l'infection à CMV en anténatal ou en post natal et volontaires pour participer, **33 centres pluridisciplinaires de diagnostic prénatal**, et **19 services de pédiatrie**

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 maternité

Mise en place, à la demande du comité des CNRs dès 2011.

Bilan des cas d'herpès néonatal 2011-2017 auprès des services de Pédiatrie et Laboratoires (CNR Limoges)

Tendance 2017 : réaugmentation du nombre de cas déclarés par rapport à 2016

3.1.3 Infections à CMV chez l'immunocompétent

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

Réseau CMV

En 2017 le réseau de recueil des résistances s'est réorganisé pour suivre la nouvelle configuration du CNR. 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

La répartition a été également modifiée en 2017.

Au niveau national, 4 centres principaux effectuent 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 Herpesvirus) assure la majorité des génotypages, 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 Herpesvirus), qui reçoit également des demandes de génotypages du CH de Genève. Les déclarations sont centralisées au laboratoire associé Pitié-Salpêtrière.

Pour le VZV les génotypes se partagent entre La Pitié (pour la majorité) et Limoges.

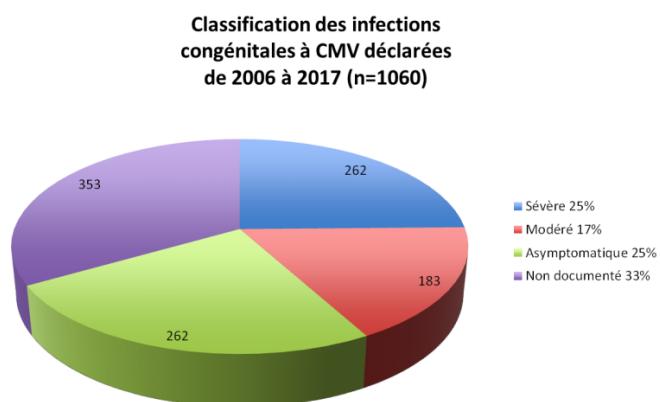
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1 Surveillance des infections congénitales à CMV

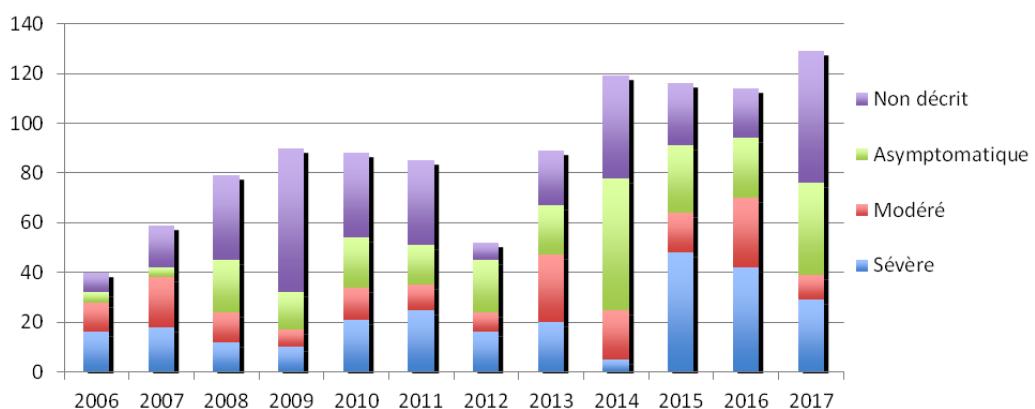
Fin 2016, a été instaurée la déclaration en ligne sur la Plateforme Voozanoo™ (Epiconcept). Les données maternelles, fœtales et néonatales sont collectées directement sur ce site (crf en annexe). La transition vers ce mode de déclaration se fait progressivement, certains sites ayant préféré déclarer les cas 2017 sur l'ancien formulaire papier.

De 2006 à 2017, nous avons recueilli **1060 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

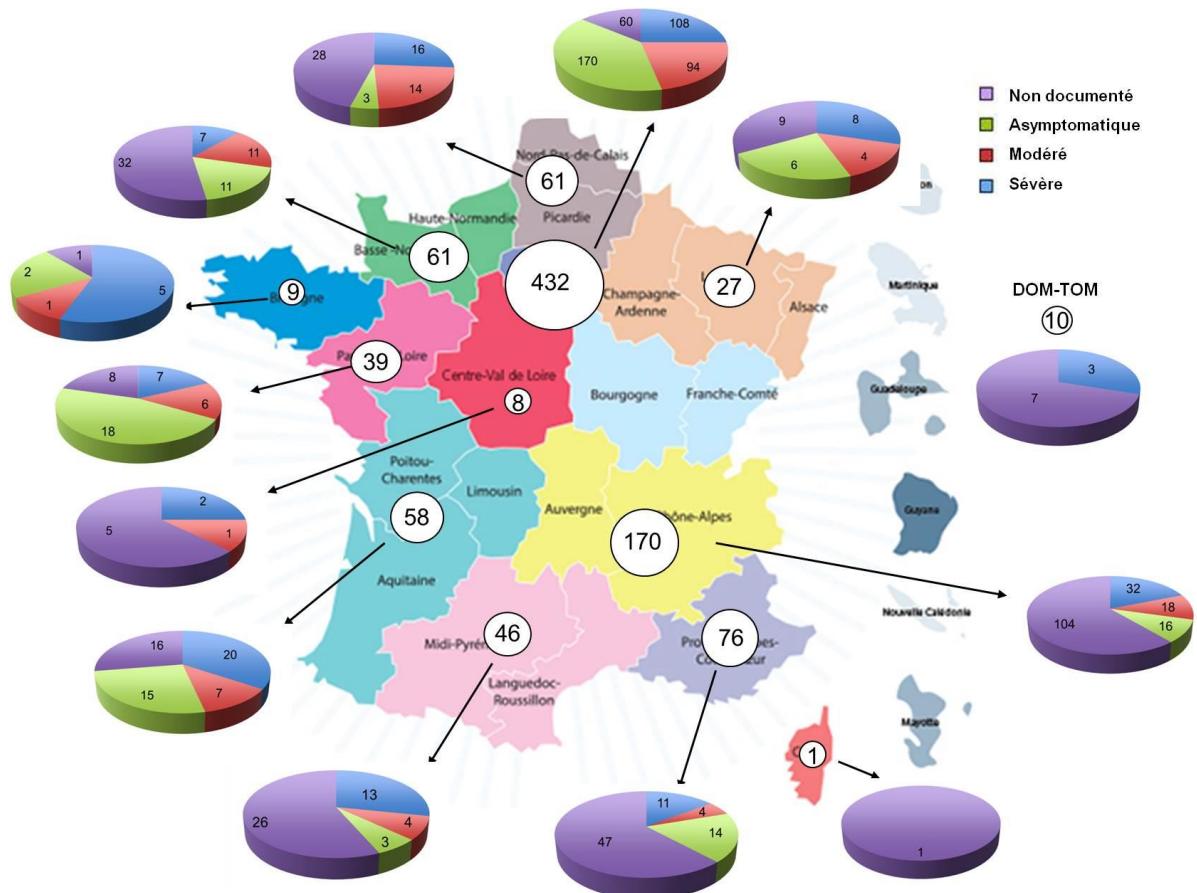


Depuis 2006 on observe une augmentation progressive des cas asymptomatiques, ce qui indique une amélioration du nombre d'infections reconnues ou déclarées et une meilleure exhaustivité du recensement.

Répartition des cas sur le territoire français (2007-2017) :

Sur cette carte, nous pouvons voir les régions où le réseau doit être renforcé :

Répartition des cas déclarés d'infections congénitales à CMV sur le territoire français de 2007 à 2017

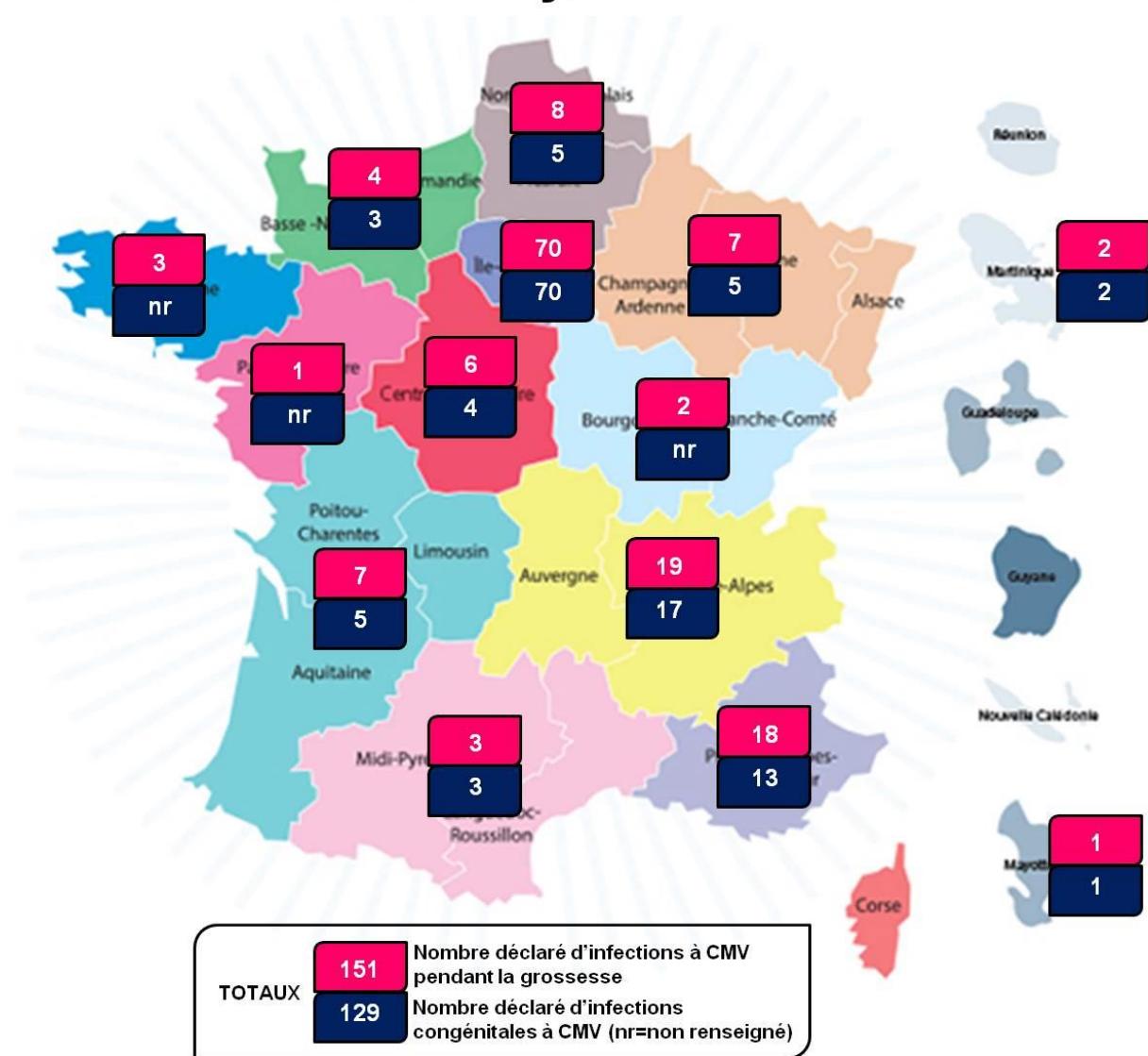


Dans la région de la Bourgogne Franche Comté, aucun cas d'infection congénitale par le CMV n'est pour le moment recensé, même si en 2017 2 primo infections maternelles par le CMV pendant la grossesse ont été décrites, mais n'ont pas conduit à un diagnostic d'infection congénitale chez l'enfant.

Les cas de cette région sont probablement dans les statistiques des régions voisines, et en particulier ceux de l'Ile de France.

En 2017, 151 infections maternelles par le CMV pendant la grossesse ont été déclarées. Toutes n'ont pas conduit à une déclaration d'infection congénitale, soit parce que le diagnostic chez le nouveau-né a permis d'écartier une infection congénitale, soit parce que les données concernant le nouveau-né sont manquantes :

Répartition des cas déclarés d'infections maternelles et congénitales à CMV sur le territoire français en 2017

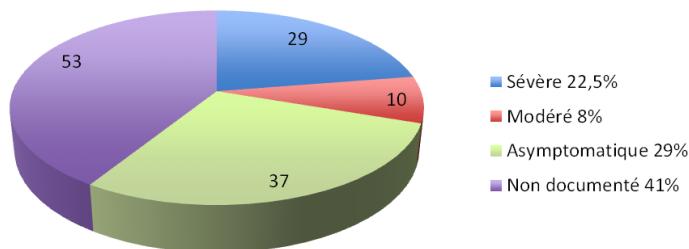


Sur les 151 infections à CMV pendant la grossesse déclarées, 11 ont conduit à une interruption médicale de grossesse (IMG), 2 à une mort fœtale *in utero* (MFIU) et 1 à un décès à 3 jours de vie.

Issues des 151 infections à CMV pendant la grossesse déclarées en 2017		
Naissance		106 dont 1 décès à J3
Pas de naissance	MFIU	2
	IMG	11
	pas de précisions	2
Issue non documentée		30

En 2017, sur les 151 infections à CMV pendant la grossesse déclarée, 129 cas d'infection congénitale à CMV ont été recensés dans le territoire français et les DOM-TOM :

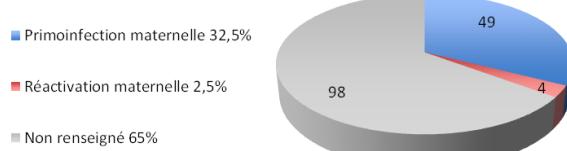
Classifications des infections congénitales à CMV déclarées en 2017 (n=129)



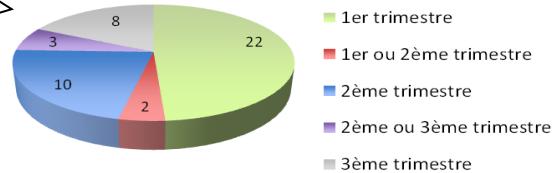
41% des cas sont pour le moment non documentés. Les données cliniques manquantes ont été demandées ou sont en cours d'incrémentation dans la base de données.

En 2017, 49 cas étaient des primo-infections documentées, 4 étaient des infections secondaires et 98 n'étaient pas documentés :

Infections maternelles à CMV ayant conduit à une déclaration en 2017



Primo infections maternelles à CMV déclarées en 2017: stade documenté de la grossesse au moment de l'infection



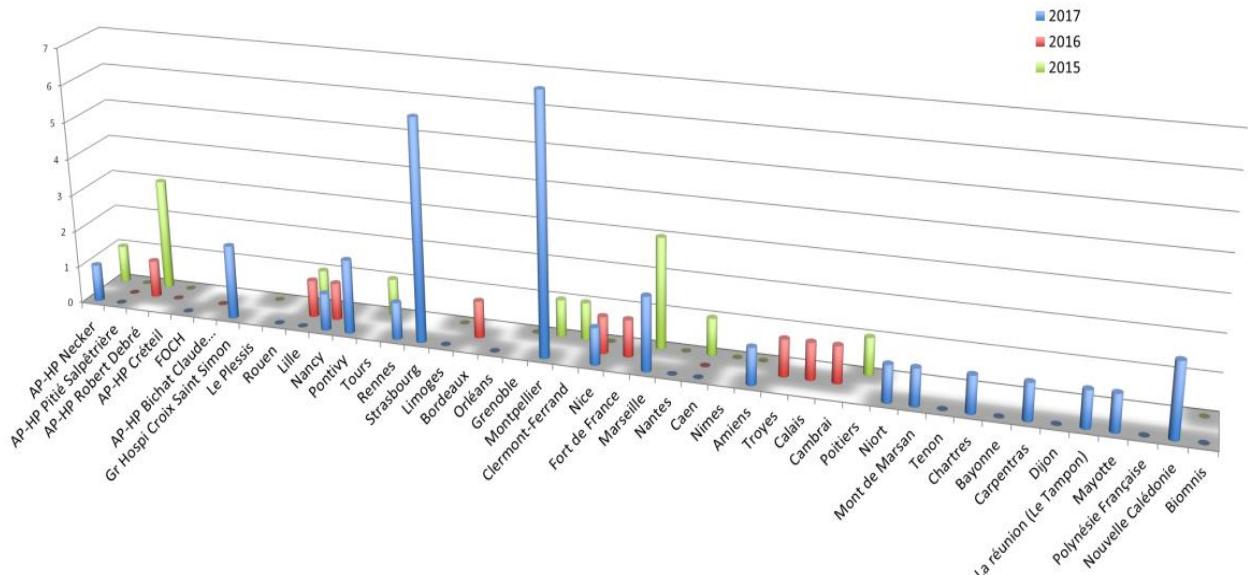
Près de la moitié des primo-infections déclarées sont survenues au cours du premier trimestre de la grossesse.

3.2.2 Surveillance des infections néonatales à Herpes simplex

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.

Bilan des cas d'herpès néonatal : enquête 2015-2016-2017 auprès des services de Pédiatrie et Laboratoires :

Déclarations des infections néonatales à HSV de 2015 à 2017



25 réponses (positives et négatives) réparties sur 30 centres	
Nombre de cas de HSV néonatal déclarés	Nombre de naissances annuel dans les 30 centres concernés
32	93670
Incidence	
0,034%	

Pour l'année 2017, 32 cas d'Herpès néonatal ont été déclarés au CNR Herpesvirus :

Cas du service de réanimation pédiatrique/maternité/réanimation néonatale à Necker, AP-HP : nourrisson à 6 jours de vie en hypothermie, hypotonie, difficulté alimentaire, altération de l'éveil. Pas d'antécédent maternel d'Herpès génital. Infection disséminée à HSV1 : charge virale positive dans le sang et le LCR. IRM et EEG normales. Atteinte viscérale : hépatite cytolytique 100 fois la normale. Mise en place d'un traitement par aciclovir (21 jours en intraveineux, 6 mois per os). Régression de l'hépatite après 5 jours de traitement. Evolution clinique favorable.

Cas de l'Hôpital de La Timone, AP-HM : découverte de l'infection à 12 jours de vie. Pas d'antécédent maternel d'Herpès génital. Echantillons positifs HSV2 : gorge, yeux, nez, sang et LCR. Atteintes viscérales et méningo encéphalite gravissime avec lésions à IRM sévères et diffuses, cortico sous corticales. Mise en place d'un traitement

par aciclovir en intraveineux. Décès de l'enfant à 44 jours de vie.

	Infections cutaneo-muqueuses n=18	Encéphalite herpétique n=3	Infection disséminée à HSV n=2	Données cliniques non renseignées n=9	TOTAL n=32 HSV1 n=28 HSV2 n=4
Antécédents maternels d'herpès	Avant la grossesse	8			8
	Primo-infection pendant la grossesse	1	1		2
	Récurrence pdt la grossesse	6			6
	Lésions <i>perpartum</i>	3			3
	Aucun	2	2	2	6
	Non renseigné	1			1
Traitement du nouveau-né	Aciclovir	17	3	2	22
	Aucun				0
	Non renseigné	1			1
Atteinte viscérale	Oui	3	1	1	5
	Non	8	2	1	11
	Non renseigné	7			7
Evolution clinique	Evolution favorable	17	2	2	21
	Décès du nouveau-né		1		1
	Non renseigné	1			1

Sur les 32 cas d'infection néonatale à HSV déclarés, 9 cas ne renseignent pas les données cliniques associées, 22 enfants ont été traités par un antiviral, et 1 infection a conduit à la mort du nourrisson :

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.

Le bilan des primo-infections de l'année 2017 est le suivant : 26 cas diagnostiqués. Parmi eux, 13 cas n'ont pas été renseignés (demandes isolées d'avidité CMV). Le sexe ratio est de 24 femmes pour 2 hommes. 14 cas sont des infections survenant en cours de grossesse.

Concernant la symptomatologie observée de 13 cas décrits, 6 (46%) ont présenté de la fièvre, 8 (61%) une asthénie, 7 (54%) des adénopathies, et 1 (8%) une rhinorrhée. Sur le plan biologique, on retrouve une cytolysé hépatite d'intensité variable dans 8 cas (61%), une inversion de formule avec des lymphocytes activés dans 3 cas (23%) et une thrombopénie dans 1 cas (8%). Les circonstances de découvertes sont très variables : bilans de fièvre isolée ou avec syndrome pseudo-grippal, bilan d'altération de l'état général, hémato-splénomégalie, ou anomalies échographiques en cours de grossesse

Parmi les primo-infections en cours de grossesse, différents tableaux cliniques se sont présentés. Nous avons la notion de retard de croissance in utero (RCIU) pour 4 cas parmi les 14, les autres n'ayant pas été rapportés. Sur les 2 cas pris en charge au CHU de Limoges, une transmission materno-fœtale du CMV a été objectivée chez une patiente de 22 ans. Un bilan a été réalisé pour RCIU sévère au 3^e trimestre. D'après les résultats d'avidité, la primo-infection a eu lieu au début de 3^e trimestre. La PCR sur liquide amniotique était à 6 log copies/mL. Aucune anomalie cérébrale n'est visible *in utero*. Elle a accouché d'un enfant infecté par le CMV (urine positive à 6 log copies/mL). L'enfant a été traité pendant 6 semaines par du valganciclovir. Il ne présente aucun trouble neuro-sensoriel à l'âge de 3 mois ; l'IRM cérébrale est normale.

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.

Pour 2017 nous rapportons 3 infections particulièrement graves à HSV diagnostiquées au CHU de Limoges :

Cas N°1 (HSV1) un nouveau-né d'1 mois adressé pour vomissements, alimentation difficile avec asthénie. A l'arrivée aux Urgences Pédiatriques, hypotonie, teint pâle, cris plaintifs. Fontanelle antérieure tendue. La ponction lombaire est hémorragique à chaque tentative. Au scanner, hémorragie intra-ventriculaire bilatérale sans dilatation associée, hémorragie sous-arachnoïdienne diffuse plus marquée à gauche et multiples plages hypotendues du parenchyme cérébral extensible touchant les lobes temporaux, les régions occipitales et lobe frontal gauche. Une première IRM confirme les lésions hémorragiques. Les 2 LCR sont positifs à HSV1, entraînant la mise sous Zovirax. Deux jours plus tard, apparaissent des lésions vésiculeuses positives à HSV1 au niveau cutané. 15 jours plus tard, une IRM de contrôle montre une importante perte de substance du parenchyme cérébral sus-tentoriel concernant l'ensemble des lobes à gauche et concernant une partie étendue du lobe frontal, le lobe pariétal droit ainsi que la totalité du lobe occipital et du lobe temporal droits avec remaniement nécrotico-hémorragique en cours et saignement également en cours au niveau de la fosse cérébrale postérieure. Les lésions se sont nettement étendues comparativement à l'IRM du 28/09/2017. Une décision d'arrêt de soins a été prise à cette date.

Cas N°2 (HSV1) : Un homme de 69 ans a consulté pour fièvre à 39°C, myalgies et douleurs thoraciques. Une péricardite virale aiguë a été suspectée. Par conséquent, un traitement ambulatoire à l'aspirine a été instauré. Un jour plus tard, il consulte de nouveau pour l'apparition d'érosions muqueuses orales aux urgences. À l'admission, il était asthénique, anorexique et la température était de 38,5 °C. Les transaminases étaient initialement légèrement élevées, mais la bilirubine se situait dans la normale et l'hémogramme a révélé une leucopénie modérée. 5 jours après l'admission, le statut général du patient s'est dégradé, l'échelle de Glasgow a chuté à 12 et un œdème pulmonaire était suspecté (détresse respiratoire aiguë, diminution des bruits respiratoires basaux bilatéraux et radiographie thoracique). Le scanner a exclu une embolie pulmonaire. En même temps, la numération plaquettaire et le nombre de globules blancs diminuaient et les paramètres de la fonction hépatique s'aggravaient, conduisant au transfert en réanimation. Un dépistage viral large a été effectué et une thérapie empirique a été débutée par spiramycine en cas d'infection bactérienne sous-jacente. Une ponction de moelle osseuse a été réalisé pour poursuivre l'étude de la cytopénie et a suggéré un syndrome mononucléosique (de nombreux lymphocytes et monocytes hyper-basophiles). La PCR HSV1 a été trouvée positive et un traitement IV par aciclovir a été commencé à J9. La fonction hépatique s'est aggravée (pic d'ASAT 13587 UI/L et ALAT 2690 UI/L), le TP et le facteur V ont chuté à 48 et 41% respectivement. Le patient a développé une insuffisance rénale aiguë et une encéphalopathie conduisant à une ventilation mécanique au 10ème jour. Le patient est décédé un jour après d'une défaillance multiviscérale liée à une insuffisance hépatique herpétique réfractaire aiguë.

Cas N°3 (HSV2) : Une femme de 66 ans, traitée par AVK, a présenté une fièvre aiguë et des douleurs épigastriques avec une sensibilité abdominale prédominant dans le quadrant supérieur droit. Pas de consommation récente de champignons, d'automédication, ni de voyages récents. Les examens de laboratoire ont mis en évidence une lymphopénie, une élévation majeure des transaminases et un INR de 1,47. La tomodensitométrie abdominale a montré un œdème pariétal discret de la vésicule biliaire et une cholécystite aiguë est initialement suspectée. Un traitement par céftriaxone et méthronidazole a été débuté. Au jour 2 après l'admission, une cholécystectomie a été effectuée mais la vésicule biliaire était non inflammatoire. De plus, le foie présentait des macules parenchymateuses blanches et une biopsie a été réalisée. Au 4ème jour, la patiente a développé une tachycardie, une polypnée et une hypotension, associées à une aggravation de la cytolyse hépatique, une coagulopathie (TP 16% et plaquettes à 81000 / mm³) et une cholestase. Un nouveau scanner retrouve une hépatomégalie stéatosique sans lésion localisée. La patiente est transférée à l'unité de soins intensifs où une défaillance d'organes est observée nécessitant une ventilation mécanique et des vasopresseurs. Des PCR pour les virus hépatotropes ont été réalisés au moment de l'admission à l'unité de soins intensifs. Entre-temps, la patiente a été transférée dans un centre de transplantation spécialisé, mais elle est décédée le sixième jour de l'hospitalisation initiale à cause d'une insuffisance hépatique réfractaire accompagnée d'une défaillance multiviscérale. Les résultats biologiques ont suggéré une infection récente avec HSV2 (IgG et IgM positifs pour HSV1 + 2 et PCR positive pour HSV2 avec PCR HSV1 négatif) et le dépistage d'autres virus était négatif.

Pour ces trois cas le laboratoire CNR a conservé des prélèvements pour analyse de la variabilité des souches HSV1. Deux souches virales ont été séquencées les résultats sont en cours d'analyse.

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 vont compléter nos critères CNR en 2018.

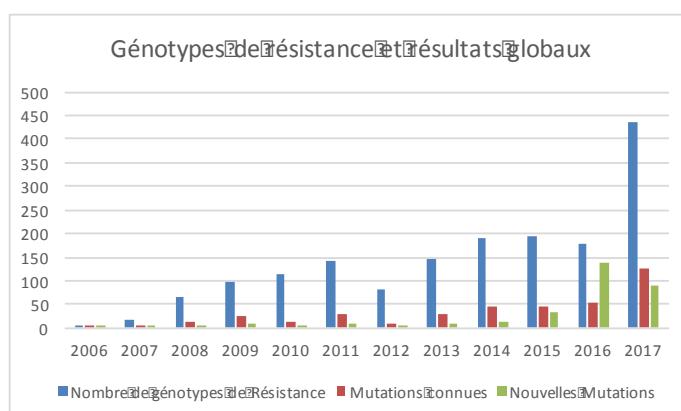
Définition de la résistance génotypique : Présence d'une mutation dont le rôle dans la résistance a été démontré soit par transfert de marqueur soit par production d'un virus recombinant portant la mutation. Les mutations sont classées selon l'augmentation de la Concentration Inhibitrice 50% (CI50) par 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 vraisemblablement du fait d'une amélioration des pratiques mais aussi, en 2017, du fait d'une augmentation des déclarations (laboratoire de la Pitié nouveau dans le réseau), avec une couverture de la totalité des CHU français et des centres en Suisse. Le nombre total de génotypes effectués est de 1679 depuis 2006



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 2017 au niveau national nous avons colligé 436 génotypes de résistance pour 349 patients se répartissant de la manière suivante :

Centres effectuant des recherches de résistance	Nombre de patients	Nombre de recherches de résistance	Nombre de quantiféron™ CMV	Nombre de patients Résistants	Mutations sur D97	Nouvelles mutations sur D97	Mutations sur D54	Nouvelles mutations sur D54
Limoges	178	258	48	75	62	19	30	58
La Réunion	123	123	0	41	44	6	17	6
Nantes	19	19	0	9	12	1	1	0
Saint-Denis	29	36	0	9	7	NR	2	NR
Total	349	436	48	134	125	26	50	64

*Par défaut non précisée

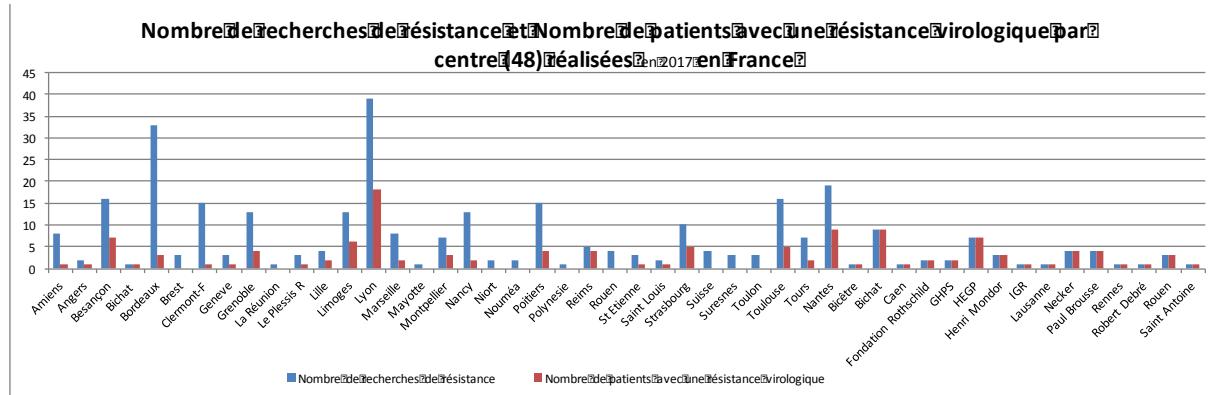
NR non renseigné

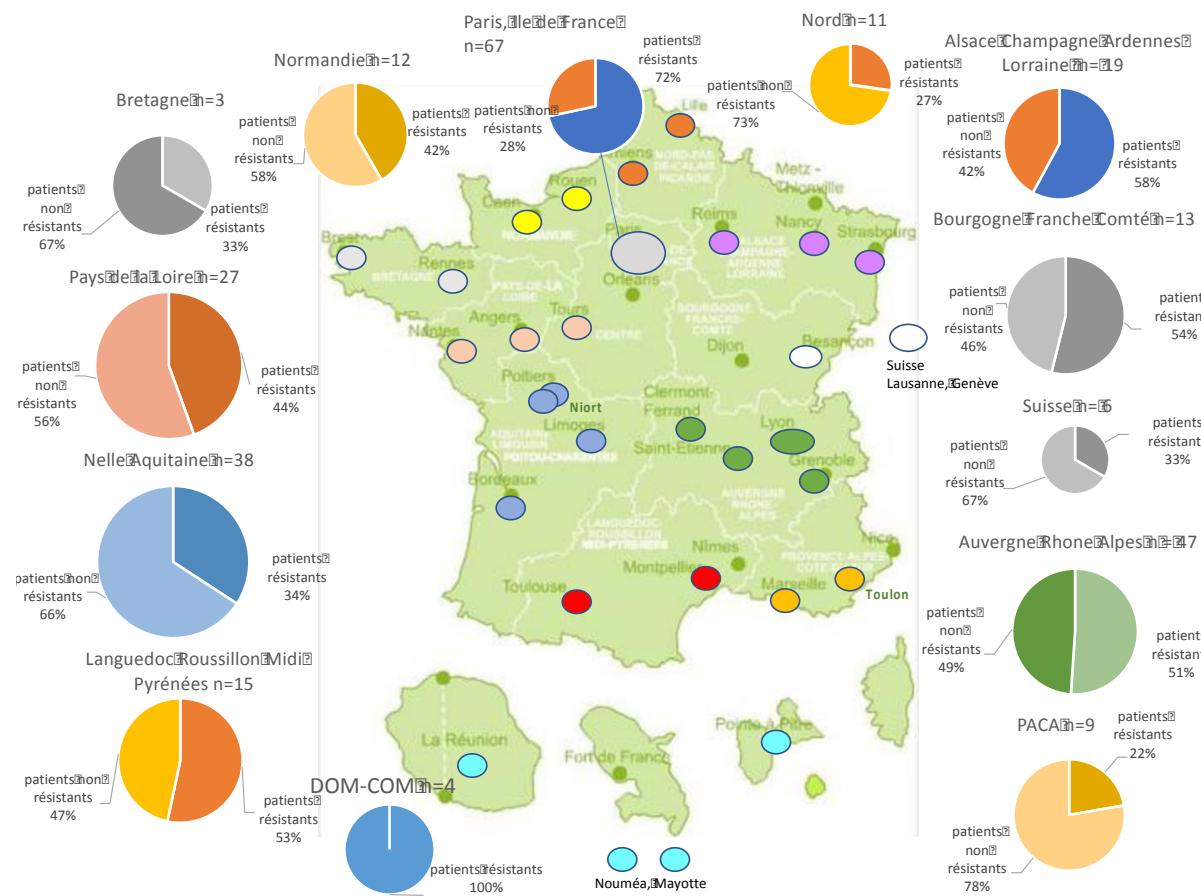
La prévalence nationale de la résistance virologique chez les patients non répondeurs (aussi appelés réfractaires) au traitement est donc de **38,4%** soit plus du tiers des patients.

Répartition des génotypes de résistance et des patients porteurs de résistance en 2017 sur le territoire français

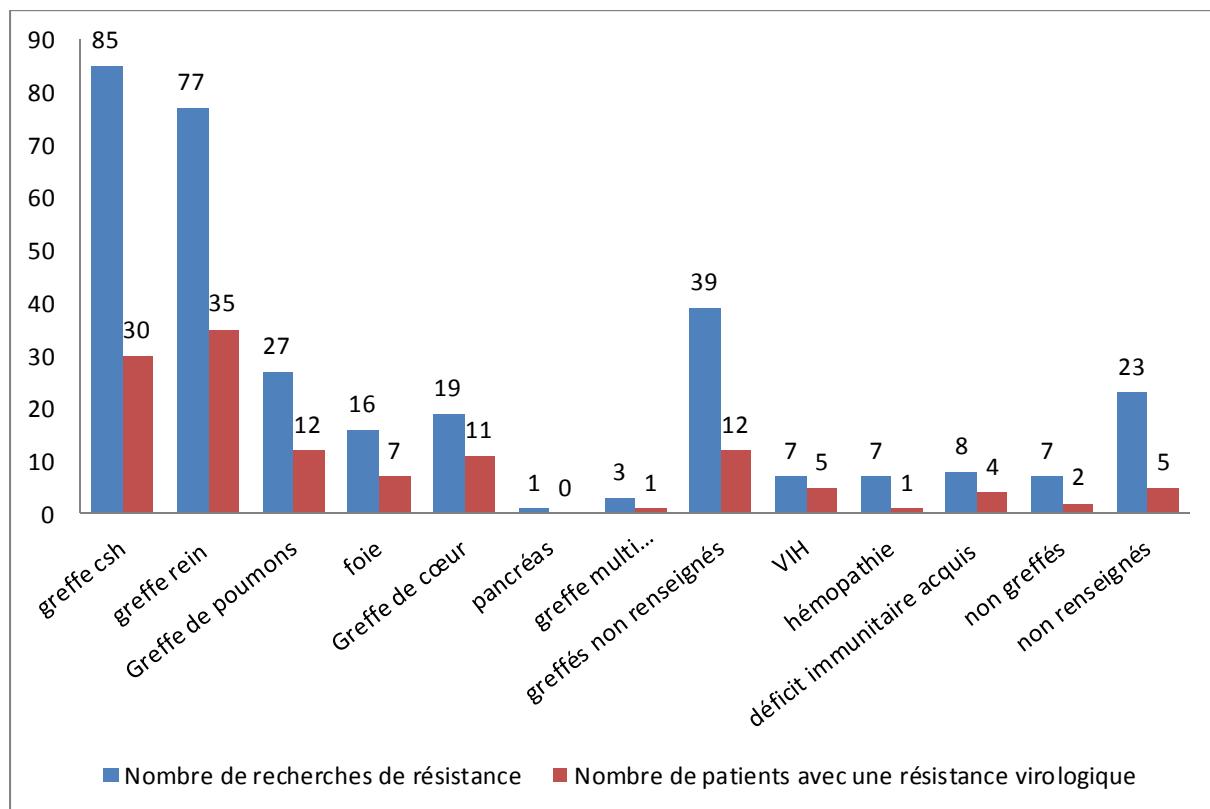
(A) par centre et (B) avec représentation du réseau au sein des régions de France + Suisse

A

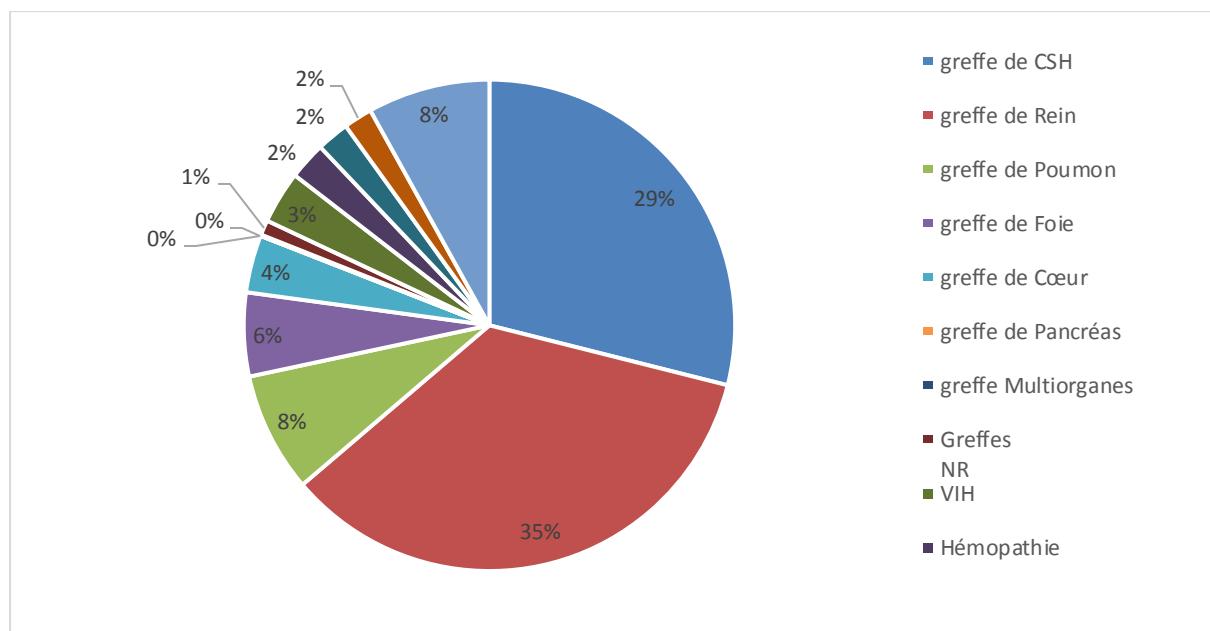


B

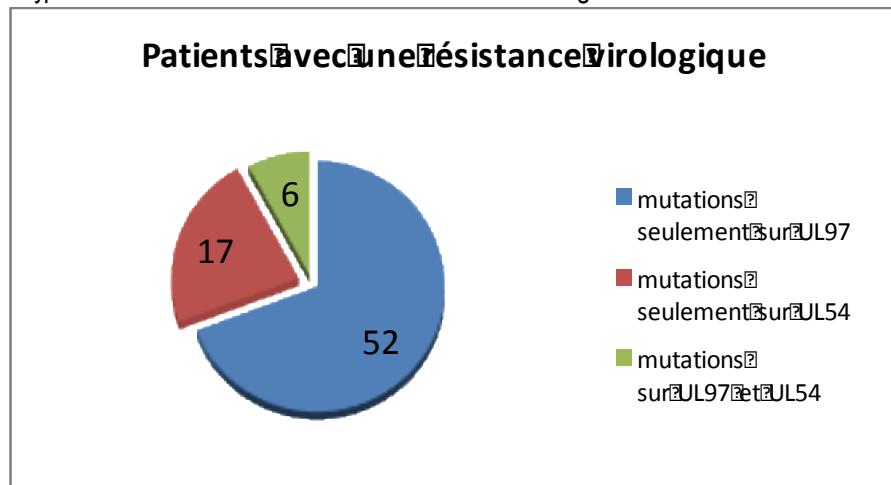
Distribution des résistances par type de pathologie en 2017 : Patients avec résistance virologique et nombre de patients pour lesquels une recherche de résistance est effectuée, par pathologie.



Répartition des résistances par pathologie depuis 2010 (chiffres cumulés sur 1217 patients) Le pourcentage correspond à la part de la pathologie dans la totalité des résistances.

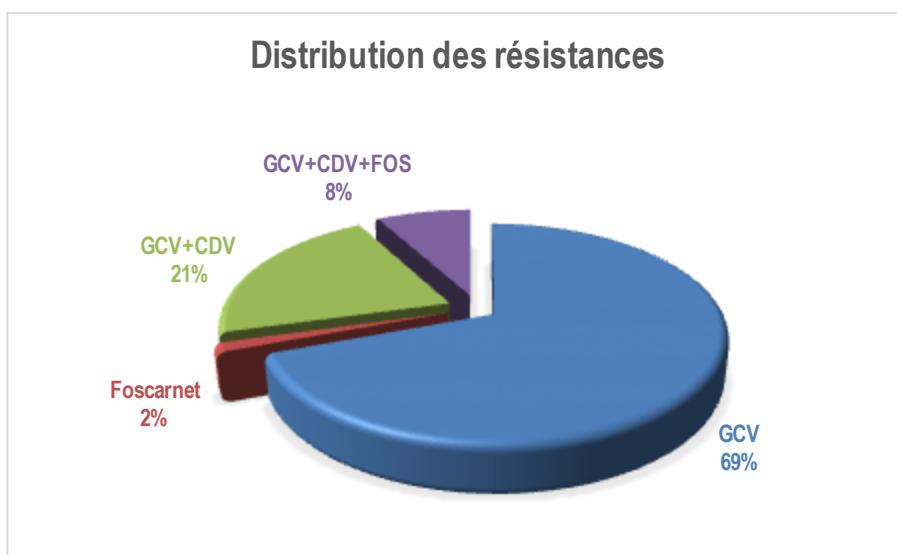


Répartition des mutations observées, sur les 75 patients porteurs de souches résistantes sur les 178 pour lesquels des génotypes ont été adressés au laboratoire CNR de Limoges en 2017



Comme les années précédentes, un nombre non négligeable de patients (31%) porte des mutations sur la polymérase, avec un haut niveau de résistance d'emblée au cidofovir-ganciclovir ou au foscarnet et pour certains patients (8%) en l'absence de mutations détectables sur UL97. Il serait intéressant de comprendre les modes de sélection de la résistance chez ces patients particuliers.

Parmi ces 75 patients, 52 présentent une résistance isolée au ganciclovir (69%), 1 une résistance isolée au foscarnet (2%), 16 une résistance au ganciclovir-cidofovir (21%) et 6 une résistance croisée au 3 molécules (8%).



Plusieurs nouvelles mutations sont en cours d'analyse par transfert de marqueur avec la technologie des Bacmides :
UL97 : 5 mutations
UL54 : 8 mutations

Surveillance des résistances aux antiviraux en ATU :

Déjà décrite dans le précédent rapport, pas de nouvelle émergence de résistance.

Publication des résultats en cours, présentés au workshop international CMV2017, Leuvenhof. Hollande. (Alain et al, 2017)

3.3.2 Surveillance de la résistance de HSV aux antiviraux

En 2017, le bilan de l'activité de diagnostic de la recherche de résistance des HSV aux antiviraux au niveau national en termes de prélèvements biologiques et souches virales analysés et de résultats obtenus est le suivant :

Centre	Virus	Prélèvements biologiques/ souches virales testées (n)	Evaluation de la sensibilité aux antiviraux (aciclovir et foscarnet)	
			Sensible	Résistant
Pitié-Salpêtrière (Paris)	HSV-1	46	14	32
	HSV-2	29	17	12
Lyon	HSV-1	340	306	34
	HSV-2	29	21	8
Saint-Louis (Paris)	HSV-1	24	12	12
	HSV-2	14	9	5
Limoges	HSV-1	4	4	0
	HSV-2	2	2	0
Total	HSV-1	414	336	78
	HSV-2	74	49	25

Au total, au niveau national, la sensibilité aux antiviraux a été analysée pour 488 souches de HSV (141 HSV-1 et 74 HSV-2). La prévalence de la résistance aux antiviraux (aciclovir et foscarnet) était de 21%.

En 2017, le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière a reçu 112 prélèvements biologiques provenant de 83 patients différents (prélèvements cutanéo-muqueux, LCR, sang total, LBA ... ; Paris AP-HP et CHU de province) Les caractéristiques de cette cohorte de patients sont indiquées ci-dessous :

Sexe	
- Hommes	42
- Femmes	41
Age médian (années)	53
Contexte clinique	
- Immunocompétence	21
- Greffe de cellules souches hématopoïétiques	18
- Infection par le VIH	13
- Hémopathie	5
- Déficit immunitaire d'origine génétique	3
- Greffe d'organe solide	6
- Non renseigné	14
- Autre	3
Origine géographique	
- Paris, Ile-de-France	42
- Province	37
- Etranger	4

Le bilan des recherches de résistance est le suivant :

Non fait^a	11
Non amplifiable^b	8
Sensibilité aux antiviraux	36
Résistance à l'aciclovir seul	41
Résistance au foscarnet seul	1

Résistance à l'aciclovir et au foscarnet	2
Résultat indéterminé^c	13

^aDemande non justifiée

^bCharge virale trop faible pour permettre l'amplification des gènes UL23 et UL30

^cDétection de mutations non connue

La résistance à l'aciclovir seul (mutation dans le gène UL30) était le résultat d'une substitution nucléotidique dans 17 cas (41%) et d'une insertion/délétion nucléotidique dans 24 cas (59%). Par ailleurs, 10 tests phénotypiques (antivirogrammes) ont pu être effectués afin de déterminer le rôle potentiel de certaines mutations non connues.

3.3.3 Surveillance de la résistance des VZV aux antiviraux

Nous n'avons pas encore organisé le recensement national pour le VZV.

En 2017, le laboratoire de Virologie de la Pitié-Salpêtrière a reçu 26 prélèvements biologiques provenant de 18 patients différents. Les caractéristiques de cette cohorte de patients sont indiquées ci-dessous :

Sexe	
- Hommes	12
- Femmes	6
Age médian (années)	63
Contexte clinique	
- Immunocompétence	7
- Greffe de cellules souches hématopoïétiques	2
- Hémopathie	4
- Greffe d'organe solide	1
- Corticothérapie	2
- Non renseigné	2
Origine géographique	
- Paris, Ile-de-France	13
- Province	5

Le bilan des recherches de résistance est le suivant :

Non fait^a	2
Non amplifiable^b	6
Sensibilité aux antiviraux	13
Résistance à l'aciclovir seul	1
Résultat indéterminé^c	4

^aDemande non justifiée

^bCharge virale trop faible pour permettre l'amplification des ORF36 et ORF28

^cDétection de mutations non connues

La résistance à l'aciclovir seul (mutation dans l'ORF36) était le résultat d'une insertion nucléotidique.

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 seront présentés à l'ECCI 2018 le 15 mai. Elle est 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 coordinateur sur le nouveau site interne 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, (travail en cours).
- Le Pr S Alain et le Dr D Boutolleau collaborent avec le QCMD (European Quality Control in Molecular Diagnosis) pour la conception et l'analyse des contrôles européens de charge virale et de génotype de résistance CMV, et HSV et VZV, respectivement.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Prise en charge des infections à CMV en transplantation

3.5.1 Facteurs prédictifs de résolution spontanée (clairance spontanée) d'une infection à CMV en transplantation rénale

(Laboratoire CNR Limoges)

L'étude a été menée par le laboratoire CNR de Limoges en collaboration avec les centres de transplantation rénale de la Fédération Hospitalo-Universitaire de Transplantation SUPPORT (Tours, Limoges Poitiers). Son objectif était d'identifier les patients capables de contrôler leur infection à CMV en l'absence de traitement, afin de limiter l'exposition aux antiviraux sans obérer la morbidité.

Après avoir harmonisé les pratiques cliniques et effectué un contrôle de qualité inter laboratoires de la charge virale CMV sur sang total (organisé en 2016 par le laboratoire CNR) pour vérifier que les charges virales en unités internationales étaient comparables, de rechercher sur la cohorte de la FHU les marqueurs cliniques et biologiques les plus prédictifs. Parmi l'ensemble des facteurs analysés, le seul facteur prédictif dès lors que les charges virales sont standardisées, en analyse multivariée, est une charge virale inférieure à 2,75 log UI/mL (OR 33,8) et une augmentation de moins de 1log entre deux analyses (OR 128,0).

Ce projet a fait l'objet de la thèse d'Université de Johan noble (Université de Tours) et a été publié en 2018 (Noble et al., J Clin Virol 2018). Ses conclusions sont appliquées dans la FHU et ce seuil a été utilisé pour les essais cliniques sur le maribavir.

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

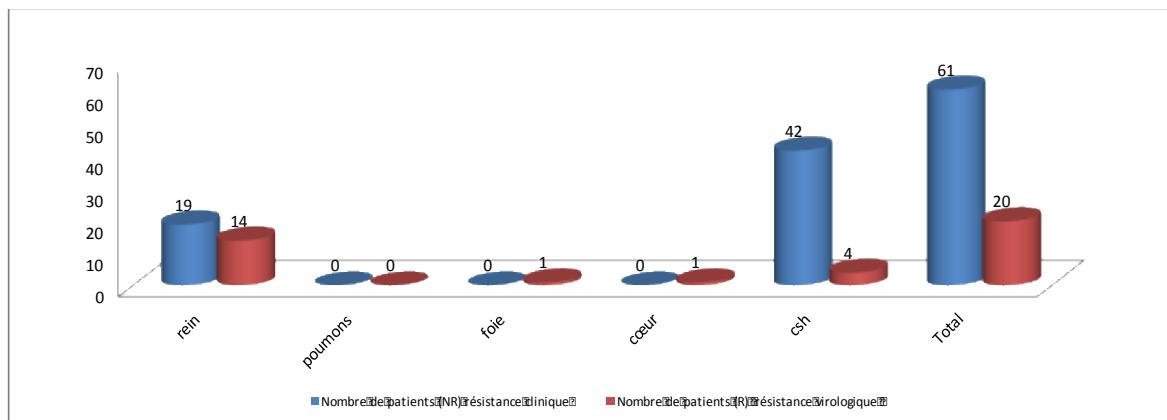
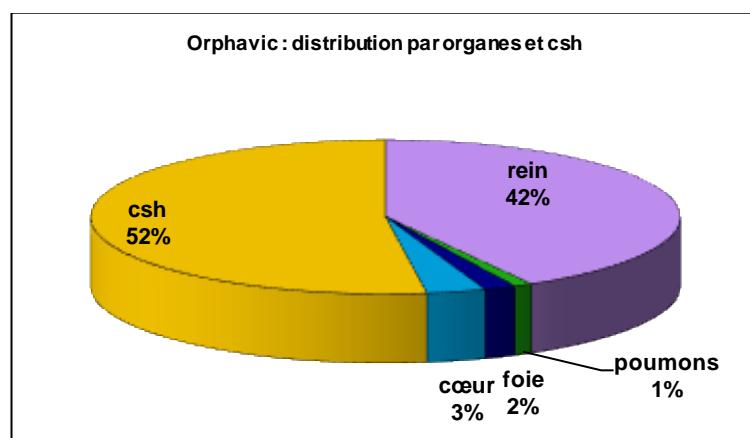
Rappel des objectifs : Objectif principal : évaluer l'incidence de la résistance (non réponse au traitement) du cytomégalovirus après transplantation d'organe solide ou greffe de cellules souches hématopoïétiques. Objectifs secondaires :

- Déterminer l'incidence respective des résistances d'origine virologique et des résistances d'origine pharmacologique
- Etudier les mutations de résistance (mutation déjà connues pour conférer une résistance) et les nouvelles mutations associées à une résistance virologique
- Etudier la cinétique d'émergence des souches résistantes
- Analyser la morbi-mortalité liée à la résistance clinique, virologique ou pharmacologique
- Post amendment 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 et rapatriement de l'ensemble des prélèvements pour détermination en NGS du moment d'émergence de la résistance aux antiviraux chez les patients résistants.

Résultats actualisés des recherches de résistances chez les patients virémiques :



3.5.3 Apport du NGS dans la compréhension des non-réponses sans résistance virologique et dans les contrôles de qualité :

Laboratoire CNR Limoges

Travail de mémoire de DESC d'infectiologie de C Danthu, néphrologue au CHU de Limoges, présenté en communication orale à l'ATC 2017 et en cours de rédaction pour publication. Ce travail a porté sur les patients de la première cohorte de surveillance 2006-2010 dont les échantillons étaient conservés en biothèque au CNR. Nous avons vérifié en NGS (Proton) l'absence de mutation de résistance chez les patients non répondeurs, à baseline, puis analysé les échantillons au moment de la non-réponse. 20% portaient des mutations nouvelles ou connues de résistance (article en cours de rédaction).

Nous avons également utilisé le séquençage des gènes UL97 et UL54 pour vérifier les contrôles de qualités génotype de résistance du QCMD (constitués de souches virales) et identifié a posteriori certaines mutations retrouvées par quelques participants en Sanger mais non répertoriées initialement dans le contrôle de qualité. Nous avons également vérifié ainsi l'absence de quelques mutations retrouvées par certains participant (faux positifs). Ceci a permis de pondérer les scores et d'expliquer les écarts, au-delà du consensus utilisé pour définir les vrais positifs.(cf conférences invitées , S Alain)

3.5.4 Séroprévalence de l'infection à cytomégalovirus en métropole et dans les départements d'outre-mer.

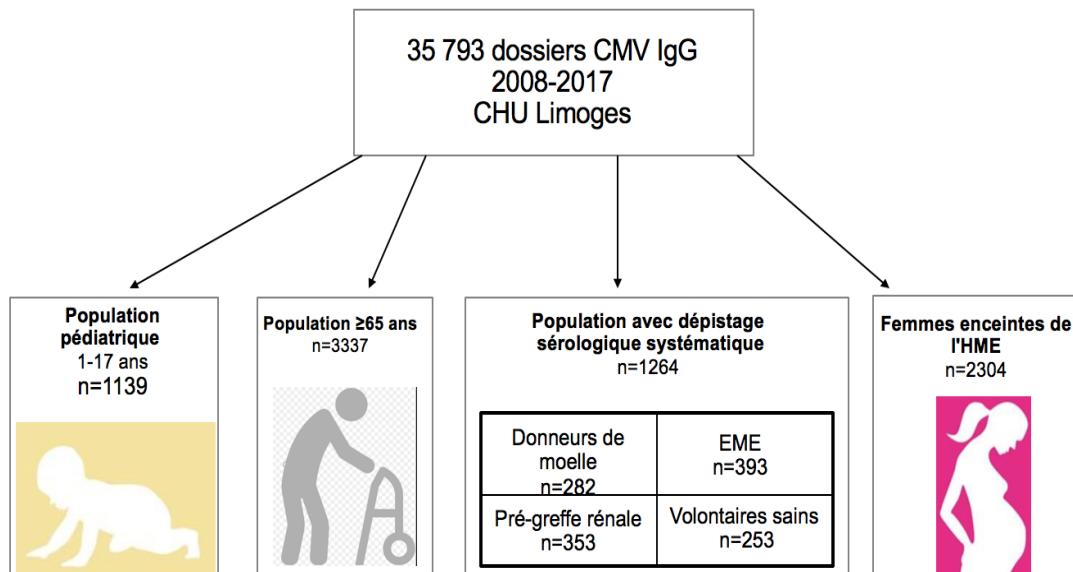
Laboratoire CNR Limoges

Objectifs : Comparer la séroprévalence du cytomégalovirus (CMV) en métropole et dans les départements d'outre-mer (Réunion et Guadeloupe) et étudier les facteurs conduisant à une séropositivité CMV chez les femmes enceintes.

Méthodes :

1. Analyse des sérologies CMV de la base de données du laboratoire de virologie du CHU de Limoges (2009-2015) et comparaison avec celles des volontaires sains (étude Transfec-MV ou collection biologique de l'Hôpital Mère-enfant) et de patients hors contexte infectieux (donneurs de moelle, d'organe, bilan pré-greffe du receveur). Analyse des sérologies CMV sur une collection biologique de la Réunion et à partir de données extraites du CHU de Pointe-à-Pitre
2. Recueil des caractéristiques des femmes enceintes dans la base de données Filemaker du service de gynécologie-obstétrique du CHU.

Étude de séroprévalence en métropole



Résultats :

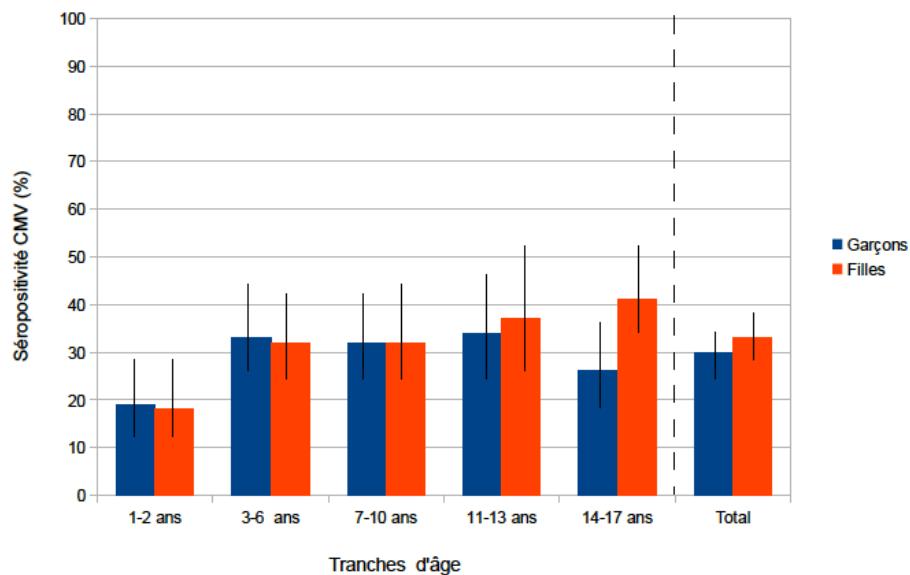
A. Données de séroprévalence CMV

La séroprévalence du CMV était de 49,1% pour la population générale du Limousin vs 89,5% pour la population réunionnaise ($p < 0,0001$) et 98% pour la Guadeloupe ($p < 0,0001$).

1. La métropole

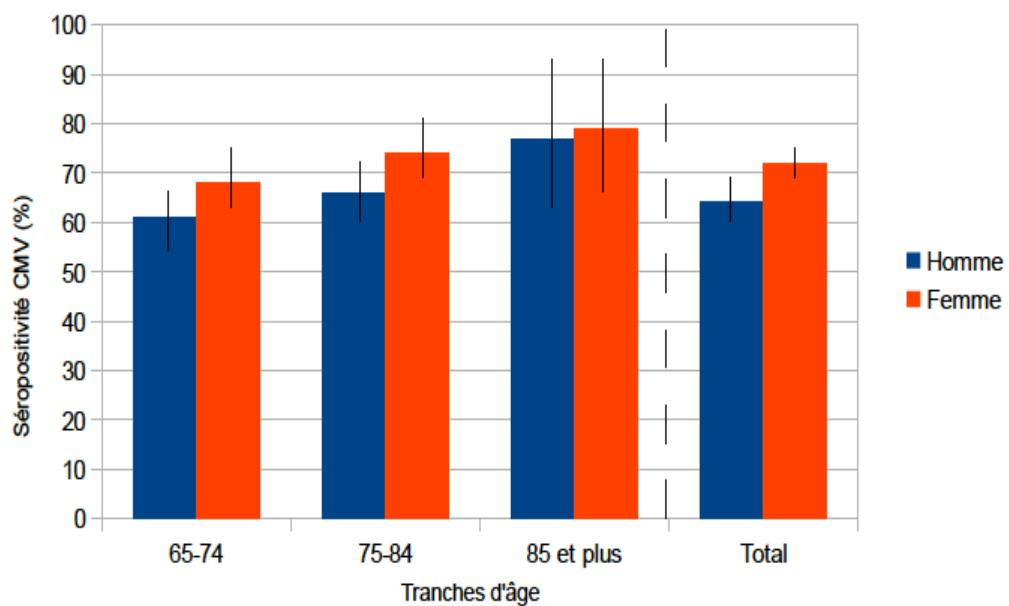
Population pédiatrique :

Concernant la métropole, La séroprévalence globale en population pédiatrique (1-17 ans) était de 31% (IC à 95%, 28-34). Il n'y avait pas de différence significative entre les garçons et les filles au sein des mêmes tranches d'âge de 1 à 13 ans. Pour la tranche d'âge 14-17 ans une différence significative des séroprévalences CMV entre les garçons 26% (IC à 95%, 18-36) et les filles 41% (IC à 95%, 32-51) a été observée ($p = 0,0209$). Chez les filles, on a observé deux pics de séroprévalence dans les tranches d'âge de 3-6 ans et de 14-17 ans associés à une augmentation graduelle de la séroprévalence de l'enfance jusqu'à l'adolescence. Chez les garçons, on a noté également un pic de séroprévalence pour la tranche d'âge des 3-6 ans.



Population de plus de 65 ans :

Notre population de plus de 65 ans était non représentative ($p<0,0000001$) par rapport à la population de référence Limousine en 2013 au sein des différentes tranches d'âge avec globalement un excès d'hommes (56,2% vs 42,0%). La séroprévalence globale était de 68% (IC à 95%, 65-71) avec une différence significative entre les hommes et les femmes ($p= 0,0081$). Il n'y avait pas de différence significative entre les hommes et les femmes au sein des mêmes tranches d'âge. La séroprévalence vis-à-vis du CMV augmentait avec l'âge de nos patients.



Population générale avec dépistage sérologique systématique :

Population	Moyenne d'âge (années)	Nombre total d'échantillons	Nombre d'échantillons IgG CMV positifs	Séroprévalence CMV (%)	IC à 95%
Donneur de moelle osseuse	31*	282	113	40,1	33,0-48,2
EME	59 (8-90)	394	223	56,6	49,4-64,5
Pré-greffe	55 (16-80)	353	195	55,2	47,7-63,5
Volontaires sains (TRANSFEC-MV)	35 (18- 64)	235	89	37,9	30,4-46,6
Total		1264	620	49,1	45,3-53,1

Une différence significative a été trouvée lors de la comparaison globale des séroprévalences de nos 4 sous-groupes ($p=0,000000108$). L'analyse de la dispersion des intervalles de confiance des résultats de séroprévalence a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre les sous-groupes EME (état de mort encéphalique) et pré-greffe rénale ainsi qu'entre les donneurs de moelle osseuse et les volontaires sains (TRANSFEC-MV). Il existe cependant une différence significative entre le sous-groupe des volontaires sains (TRANSFEC-MV) et les patients en pré-greffe rénale ainsi qu'entre les volontaires sains et les patients en EME.

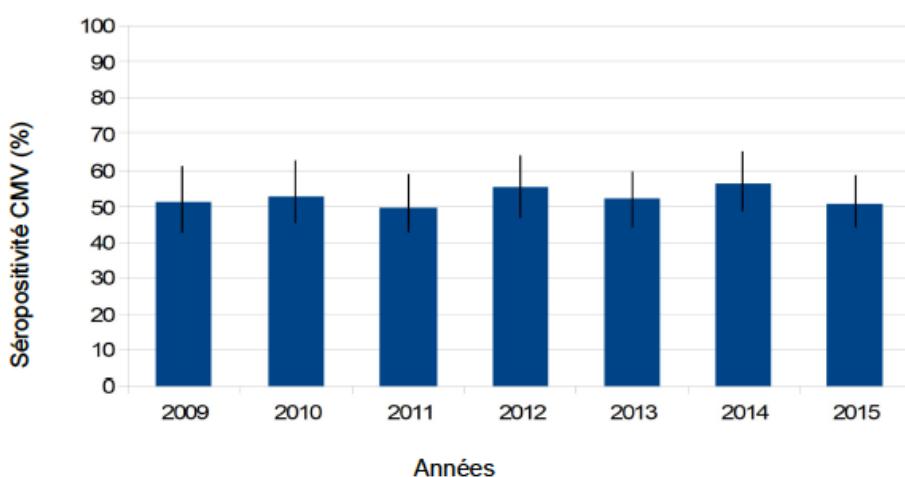
Patients enceintes de l'Hôpital Mère-Enfant (HME) :

Nous avons comparé les séroprévalences des femmes enceintes de la collection biologique de l'HME et de la base de données de notre SIL Glims de 2015.

La séroprévalence globale de la collection biologique de l'HME de 2015 était de 51,4% (IC à 95%, 44-59). La séroprévalence globale des femmes enceintes de notre base de données Glims en 2015 était de 50,9% (IC à 95%, 44-58).

Nous n'avons pas noté de différence statistiquement significative entre les résultats des séroprévalences de nos deux échantillonnages ($p=0,92$). Nous avons donc considéré que la base de données Glims pouvait être utilisée sur l'ensemble de la période de temps considéré pour la suite de notre analyse.

Nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre les résultats de séroprévalence chez nos femmes enceintes d'une année sur l'autre ($p=0,5472$)



2. La Réunion :

Les caractéristiques sociodémographiques de notre échantillon de 371 patients ne sont pas représentatives de la population Réunionnaise notamment pour les < 20 ans. Cependant les résultats obtenus donnent déjà une tendance de la situation locale. La séroprévalence globale du CMV de notre population réunionnaise était de 89,5% (IC à 95%, 80,1-99,6). La séroprévalence du CMV était plus élevée chez les femmes que chez les hommes (93,7% vs 81,2%) mais sans différence significative ($p=0,2375$)

Séroprévalence du CMV selon l'âge (n=371)			
Age (ans)	Nombre d'échantillons	% positifs	IC95%
< 20	21	57,1	29,5-99,8
20-29	34	94,1	64,4-132,9
30-39	61	88,5	66,5-115,5
40-49	88	87,5	69,1-109,4
50-59	70	94,3	72,9-119,9
60-69	56	94,6	70,9-123,8
70-79	28	92,8	60,7-136,1
80 et +	13	100,0	53,25-171
Population globale	371	89,5	80,1-99,6

3. La Guadeloupe

La séroprévalence globale du CMV de notre population guadeloupéenne est de 98,4% (IC à 95%, 95-102).

Séroprévalence du CMV selon le sexe (N=3779)			
Sexe	Nombre d'échantillons	% positifs	IC95%
Homme	1402	98,6	93,4-103,9
Femme	2373	98,4	94,4-102,5
Total *	3779	98,4	95,3-101,7

*4 patients sans information sur le sexe

B. Etude des facteurs associés à une séropositivité CMV chez les femmes enceintes du Limousin.

Parmi la population de femmes enceintes du CHU de Limoges, les facteurs associés à une séropositivité pour le CMV étaient de résider en zone urbaine OR 1,8 (IC à 95% : 1,1-3,2); être sans emploi OR 2,2 (IC à 95% : 1,3-3,7), avoir une parité = 1 OR 2,0 (IC à 95% : 1,1-3,6) et une parité ≥2 OR 2,6 (IC à 95% : 1,3- 5,3). Les facteurs d'association à un risque de séroconversion pendant la grossesse étaient : un âge ≤ 28 ans OR 2,70 (IC à 95% : 1,01-7,14), être célibataire OR 3,57 (IC à 95% : 1,12-11,11) et avoir un enfant de moins de 6 ans à domicile OR 4,24 (IC à 95% : 1,48-12,17).

Conclusion : 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, dans la perspective d'un meilleur suivi des femmes enceintes pour prévenir l'infection congénitale à CMV

3.5.5 Etude TransfeCMV (NCT02694484)

Laboratoire CNR Limoges

Capacité du CMV à être transmis lors d'une transplantation fécale. 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% qui vient en complément de l'étude ci-dessus.** Résultats finaux 2018.

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 », Laurent PAPAZIAN, Marseille (laboratoire de Grenoble)
- 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

3.5.7 Surveillance des infections à EBV

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

Aucune en 2017

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

Laboratoire CNR Limoges :

***Enseignement post-universitaire :**

- 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 DU transplantation pulmonaire : Marie Lannelongue, Paris Janvier 2015, nov 2016 : Les infections à CMV (S Alain)
- o DESC Pathologie Infectieuse et Tropicale Séminaire n°1 Module 2 : Résistances du CMV aux antiviraux en janvier 2017 (S. Alain),
- o DIU Médecine interne et grossesse Limoges 2017: cytomégalovirus (S Alain)

***Formation aux professionnels de santé :**

- *FMC RICAI 2017 « CMV épidémiologie Diagnostic et Résistances » **S Alain**, FMC cas cliniques, Réunion interdisciplinaire de Chimiothérapie Antivirale (RICAI) Decembre 2017
- FMC IPC Nouveaux anti CMV **S Alain** FMC cas clinique Journées de l'Institut Paoli Calmette, Marseille 6 avril 2018

***Accueil de stagiaire/collègue étranger :**

- En 2017, 2 thèsards : G Ligat sur l'analyse fonctionnelle des terminases du CMV (cf publications) et C Jacquet (modèles ex vivo et in vivo d'infection placentaire, évaluation de nouveaux antiviraux) et un ou deux M1 par an sur les virus recombinants.

Laboratoire associé Necker : Dr M Leruez-Ville

***Enseignement post universitaire en 2017-2018**

- Responsable du séminaire de DES de Biologie Médicale Université Paris Descartes : « Infections materno-fœtales ».
- 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 2017-2018**

-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 : conférence sur infection à CMV : Journées SFM octobre 2017 ; Académie Siemens, juin 2017

-Formation continue pour les obstétriciens, pédiatres et sages-femmes au niveau national et international : Journée nationale de l'AFOP mars 2017, Séminaire prise en charge pré et postnatale des anomalies congénitales et leur traitement PACT mars 2017 ; 13ème Congrès National Marrakech, Maroc, avril 2017 ; 33ème journée du GPIP juin 2017 ; Journée du Collège national des sages-femmes de France février 2018 ; Journée du Collège national des sages-femmes de France, février 2018, Charenton ; Salon de Gynécologie Pratique, Mars 2018 ; Fetal Medicine expert Workshop, Londres, mars 2017 ; Diploma course in fetal medicine, avril 2018, Vietnam

Accueil de stagiaire/collègue étranger :

En 2017-2018 : accueil dans le cadre des activités du CNR : d'une stagiaire de M1 en juillet 2017, de 2 stagiaires Master 2 (2016-2017) (2017-2018)

David Boutolleau (DB) et Sonia Burrel (SB) :

Type d'enseignement post universitaire	Niveau	Etablissement	Intervenant
Cours : ED Herpesvirus	DES	Faculté de Médecine (Paris Descartes)	DB
Cours ED : Méningites et encéphalites virales	DES	Faculté de Médecine (Paris Descartes)	DB
Cours Diagnostic virologique : virus à expression cutanée	DIU	Faculté de Médecine (Paris-Est Créteil et UPMC)	DB
Cours : Antiviraux pour le traitement des infections à Herpesvirus	DIU	Faculté de Médecine (Paris Diderot, Paris Descartes, Sorbonne Université, Versailles Saint Quentin, Bordeaux Segalen)	DB
Cours : Herpesvirus humains	L3	Faculté des Sciences (Université Bretagne-Sud)	DB
Cours : Infections virales latentes : exemple du HSV	M1	Faculté de Médecine (Sorbonne Université)	DB et SB
Cours Herpesviridae : antiviraux (Master Virologie Fondamentale)	M2	Faculté des Sciences (Paris Descartes, Sorbonne Université)	DB

		Paris Diderot)
Cours : Stratégies antivirales pour les virus latents. Ex : les Herpesvirus (Master Virologie Moléculaire et Médicale)	M2	Faculté des Sciences (Paris Descartes, Sorbonne Université, Paris Diderot)
Cours : Traitement des infections virales et détermination de la sensibilité aux antiviraux au laboratoire	3 ^e année	IFTLM DB

- DES : Diplôme d'Etudes Spécialisées ; DFGSM : Diplôme de Formation Générale en Sciences Médicales ; DIU : Diplôme Interuniversitaires ; ED : Enseignement Dirigé - IFTLM : Institut de Formation des Techniciens de Laboratoire Médical - L : Licence - M : Master - TP : Travaux Pratiques -

Laboratoire de Grenoble

Enseignements post-Universitaires :

- 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.

Formation aux professionnels de santé

- Prestation de conseil en sérologie, Mérieux Université, Tassin-La-Demi-Lune, Mars 2017 : P Morand.
« Maladies associées au virus d'Epstein Barr : actualités Physiopathologie et Diagnostiques ».
- Prestation de conseil en sérologie, Mérieux Université, Tassin-La-Demi-Lune, Novembre 2017 : P Morand.
« Maladies associées au virus d'Epstein Barr : actualités Physiopathologie et Diagnostiques ».
- Soirées UTIP pour les pharmaciens d'officine, Grenoble, 26/01/2017 : R Germi. Vaccins, calendrier vaccinal et polémiques vaccinales.
- 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 (avril 2017, 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/
- **En cours de modification pour élargir aux Herpesvirus**
- 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
- 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, le Dr S Hantz assurent la permanence du conseil sur l'infection congénitale à CMV au laboratoire CNR, avec environ un appel ou contact 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.

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 2017 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 cas les plus difficiles sont adressés au laboratoire associé de la Pitié Salpêtrière. Les Dr David Boutolleau et Sonia Burrel reçoivent en moyenne 1 appel téléphonique par jour concernant le diagnostic des infections par le HSV ou le VZV, la prise en charge thérapeutique de ces infections, ou encore la recherche de résistance aux antiviraux.

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.

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

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 CNR a participé à la consultation de l'HCSP en 2017-2018 sur la question de l'infection congénitale à CMV. Sophie Alain est membre de la commission. Marianne Leruez-Ville a été auditionnée en tant qu'experte (23 février 2017).

- 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
- 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
- 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
- Le laboratoire a également été de centre expert pour les évaluateurs de l'ANSM dans le cadre d'une demande d'ATU chez une patiente de syndrome d'activation macrophagique.

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

- Boutolleau D. Allô Docteurs (Dr Marina Carrère d'Encausse et Dr Michel Cymes) : le zona (*France 5, 8 mai 2017*)

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 2017, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.1.1 Infection congénitale à CMV

Laboratoire associé Necker

Deux études de recherche clinique sont en cours :

-Protocole CYMEPEDIA (NCT01923636): L'objectif de l'étude est de caractériser des éléments pronostiques au sein du bilan néonatal de la présence de séquelles à l'âge de 2 ans. Les inclusions se sont terminées en novembre 2017 avec 260 nouveau-nés inclus pour un total de 250 attendus. Ces nouveau-nés ont eu un bilan néonatal complet (clinique, imagerie, virologique, immunologique) et seront suivis pendant 2 ans.

-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.

Deux études de la **pharmacocinétique materno-fœtale des nouveaux antiviraux anti-CMV : letermovir et le maribavir** sont en cours (financement Paris V)

-Une chaîne de perfusion placentaire a été installée dans le laboratoire de Virologie, ce qui a permis d'évaluer la transmission placentaire du Letermovir :

Méthodes : Des placentas à terme ont été perfusés dans un circuit ouvert avec des concentrations maternelles Letermovir autour de la Cmax (13 mg/L) et avec de l'antipyrine, comme contrôle de l'intégrité du cotylédon. Les échantillons de la circulation fœtale et maternelle ont été prélevés toutes les 5 min pendant 90 min. Les concentrations de Letermovir ont été mesurées par chromatographie liquide à haute performance couplée à de la

spectrométrie de masse. La moyenne du transfert foetal (FTR) (fœtale/maternelle concentrations de 30 à 90 min) et l'index de clearance (CLI) (Letermovir FTR / Antipyrine FTR) ont été mesurés.

Résultats : Le Letermovir est une drogue de poids moléculaire moyen, très lipophile et très liée aux protéines plasmatiques. Au décours de 5 expériences, les concentrations maternelle et fœtale moyennes étaient de 12.4 mg/L and 1.2 mg/L, respectivement. Le FTR moyen était de 10 % and le CLI moyen était de 37%.

Conclusion: ceci démontre que le Letermovir traverse le placenta à un taux faible à modéré concordant avec ses propriétés pharmacologiques. Le Letermovir devrait donc être un bon candidat pour traiter le fœtus car la quantité de molécule transférée à travers le placenta est bien supérieure à la CI50%.

Les mêmes expériences sont en cours avec le Maribavir.

Ce travail va être présenté en communication orale et en poster: « Fetal treatment for congenital cytomegalovirus infection: study of the placental transfer of Letermovir 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

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)

Evaluation des immunoglobulines hyperimmunes CytotectCP dans le modèle d'infection placentaire.

6.1.2 Biomarqueurs des infections à CMV et résistance du CMV aux antiviraux

Laboratoire CNR de Limoges

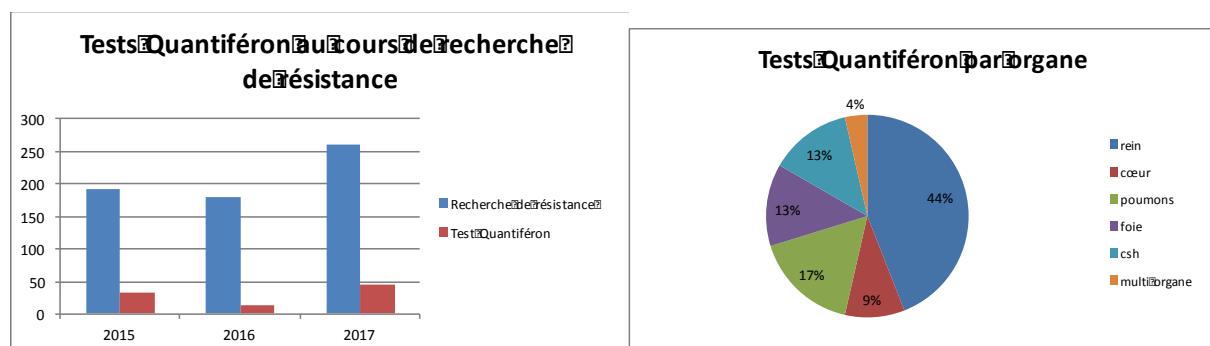
Facteurs de risques de résistance : place des tests de mesure de l'immunosuppression :

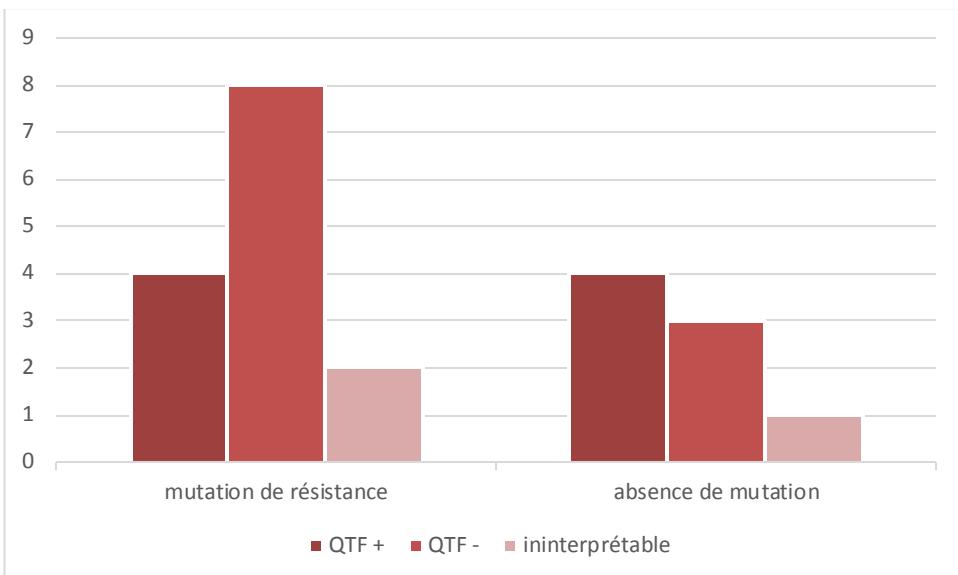
Protocole Quantic R+ : laboratoire CNR Limoges

Analyse de la charge virale TTV chez les patients de l'étude. La cinétique de la CV TTV est proche de celle retrouvée en transplantation pulmonaire ou de foie, mais à ce jour pas de valeur prédictive du test pour une infection à CMV sur les analyses préliminaires. Tests complémentaires en cours.

Intérêt du Quantiféron™ CMV dans l'évaluation de l'état immunologique des patients non répondeurs au traitement (travail en cours au laboratoire CNR Limoges)

Nombre de tests pratiqués :





QTF – test antigène negatif, QTF + réponse antigène et mitogène supérieure au seuil, Ininterprétable : réponse au mitogène trop faible pour interpréter la réponse antigène. L'analyse des résultats sur 2017 suggère une association entre forte immunosuppression globale (mitogène bas) et résistance. Analyse des données rétrospectives 2015-2017 en cours.

6.1.3 Analyse des mécanismes d'action des nouveaux anti-CMV et recherche de nouvelles cibles

Le laboratoire CNR de Limoges travaille depuis de nombreuses années sur les terminases du CMV (Ligat et al., FEMS 2018, pour revue), complexe ciblé par le letermovir, et sans équivalent dans les cellules eucaryotes, ce qui laisse espérer une faible toxicité des inhibiteurs. Nous avons décrit en 2017 des 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.

6.1.4 Variabilité des herpès virus

Laboratoire associé la Pitié Salpêtrière

Les activités de recherche du CNR-LA Herpesvirus de la Pitié-Salpêtrière concernent 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 :

- Nous avions précédemment décrit l'existence d'un nouveau variant de HSV-2 (appelé HSV-2v) chez des patients originaires de l'Afrique de l'Ouest (**Burrel et al., J Virol 2015**). En collaboration avec S. Calvignac-Spencer et F. Leendertz (Institut Robert Koch, Berlin), le séquençage du génome complet de ces souches virales africaines de HSV-2v a permis de revisiter la phylogénie des *Simplexvirus*. Ainsi, nous avons pu montrer que différents événements de recombinaison entre, d'une part, les souches ancestrales africaines de HSV-2 (correspondant au HSV-2v décrit dans notre laboratoire) qui ont vraisemblablement pour origine l'Herpesvirus du chimpanzé (ChHV), et, d'autre part, les souches de HSV-1, ont abouti à l'apparition des souches de HSV-2 actuelles réparties dans l'ensemble du monde (**Burrel et al., Mol Biol Evol 2017**). Ces recombinaisons concernent plusieurs gènes vitaux qui codent des protéines impliquées dans le cycle de multiplication virale des HSV : UL30 (ADN polymérase), UL29 (protéine de liaison à l'ADN simple brin), UL15 (terminase) et UL39 (ribonucléotide réductase). La caractérisation approfondie de ce nouveau variant africain de HSV-2 (HSV-2v) se poursuit actuellement, toujours en collaboration avec S. Calvignac-Spencer et F. Leendertz, afin notamment de comprendre la moindre capacité de ce virus concernant sa transmission interhumaine et sa diffusion : étude génétique du complexe réplicatif et des glycoprotéines, étude transcriptomique, étude de certains gènes d'intérêt avec utilisation du BAC HSV-2 (cf *infra*), étude du pouvoir pathogène spécifique. Dans le cadre du travail de Thèse d'Etat de Pharmacie de L. Castain (encadrée par le Dr S. Burrel), nous avons d'ores et déjà mis en évidence, à l'aide d'une approche transcriptomique de différents gènes très précoces, précoces, et tardifs du HSV-2, que les profils d'expression du HSV-2v et du HSV-2 actuel étaient différents, avec notamment un retard d'expression des gènes très précoces du HSV-2v.

- Afin de démontrer formellement l'implication de nouvelles mutations dans les gènes UL23 et UL30 des HSV dans le mécanisme de résistance aux antiviraux, nous utilisons la technologie BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) qui permet de cloner l'ensemble du génome viral. Nous avons ainsi pu démontrer formellement l'implication de la mutation S66P de la thymidine kinase du HSV-2 dans la résistance à l'aciclovir, alors que la mutation A72S est un polymorphisme naturel (**Burrel et al., RICAI 2017**). Nous poursuivons la caractérisation des différentes mutations de la thymidine kinase d'isolats cliniques de HSV à l'aide de la technologie BAC désormais en place au laboratoire. Ce travail aboutira à la mise en place d'une liste exhaustive de l'ensemble des polymorphismes naturels et des mutations de résistance afin de faciliter l'interprétation des tests de résistance génotypique des HSV et de proposer un algorithme d'interprétation, à l'instar de ce qui existe déjà pour la résistance du HIV aux antirétroviraux par exemple.
- Nous avons participé à l'étude nationale multicentrique prospective KERAVIR, coordonnée par le Pr M. Labetoulle (Hôpital de Bicêtre, Kremlin-Bicêtre), afin d'identifier des facteurs virologiques et/ou pharmacologiques de récidive d'herpès oculaire chez 43 patients sous traitement antiviral. Nous avons effectué l'ensemble des recherches de résistance génotypique du HSV-1. Cette étude a montré l'impact du sous-dosage en ACV chez les patients infectés par une souche résistance de HSV-1 (**Rousseau et al., Antiviral res 2017**).
- Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Christophe Rodriguez (Henri Mondor), nous étudions l'apport du séquençage de nouvelle génération (NGS) dans la détection de la résistance des HSV et du VZV aux antiviraux. Grâce à une approche amplicons, nous avons notamment pu mettre en évidence l'existence de mutations de résistance minoritaires au sein de la population virale des patients (**Mercier-Darty et al., ESCV, 2017 ; Burrel et al., Antiviral Res, 2018**).
- A ce jour, l'arsenal thérapeutique anti-HSV reste très limité (aciclovir et foscarnet), et la prise en charge thérapeutique des infections virales résistantes est compliquée. De nouvelles molécules à activité anti-HSV sont donc indispensables. En collaboration avec Séverine Armand, Christine Bailly et Philippe Grellier (Museum National d'Histoire Naturelle), nous avons procédé au « screening » d'environ 1500 molécules purifiées d'origine naturelle et identifié quatre molécules présentant une forte activité antivirale et une faible cytotoxicité. L'étude de ces molécules se poursuit actuellement avec la mesure de l'activité antivirale vis-à-vis de différents isolats cliniques de HSV-1 et de HSV-2 à la fois sensibles et surtout résistants aux antiviraux actuels (aciclovir et foscarnet). Par ailleurs, le mécanisme d'action antiviral de ces molécules va être étudié, et la sélection de mutants résistants *in vitro*, par passages successifs en culture cellulaire en présence de concentrations croissantes de molécules antivirales, devrait permettre, après séquençage, d'identifier la cible virale du fait de l'apparition de potentielles mutations de résistance.

6.1.5 Projets de recherche EBV

Laboratoire de Grenoble

- Evaluation de la méthylation du promoteur Rta comme nouveau marqueur prédictif des lymphoproliférations associées au virus Epstein-Barr
- Développement d'un test de diagnostic précoce du syndrome lymphoprolifératif post-transplantation : Test Zetaquantor = test innovant de diagnostic précoce du PTLD basé sur l'immunodétection par ELISA de la protéine ZEBRA soluble dans le plasma (SATT Linksium Univ. Grenoble-Alpes, Collaboration avec E Drouet)
- Etude de la réactivation des herpesviridae dans la crise d'angioedème (thèse en co-tutelle avec l'université d'Irkoutsk, Russie).

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 . Cytomégavirus REMIC actualisation 2018:**
- **S Alain** Que faire devant une infection aiguë virale (Rubéole, CMV, PvB19) pendant la grossesse ? Livre : Médecine et grossesse, coordination O Pourrat ed Elsevier 2017

- Infections à cytomégalovirus **S Alain**, I Garrigue : Traité de Virologie Médicale. A paraître en 2018.
- Infections congénitales et périnatales **M Leruez-Ville** et Y Ville : Traité de Virologie Médicale. A paraître en 2018.
- Infections congénitales et périnatales **M Leruez-Ville** et Y Ville : Traité de Virologie Médicale. A paraître en 2018.
- 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
- Caroline Besson, Julien Lupo, Camille Laurent, **Patrice Morand**, Sylvain Latour. Syndrome mononucléosique et pathologies hématologiques liées au virus Epstein-Barr. EMC hématologie 2017
- **A Gautheret-Dejean, S Ranger-Rogez, P Van de Perre**. Herpesvirus humains 6, 7 et 8. REMIC actualisation 2018.

Publications nationales

- P Frange, **M Leruez-Ville**. Prévention et traitement de l'infection à cytomégalovirus – état des lieux et perspectives. Revue d'Hématologie Pédiatrique. 2017
- 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.

Publications internationales

- Rawlinson W, Adler S, Boppana S, Fowler K, Kimberlin D, Lazzarotto T, **Alain S**, Daly K, Doutre S, Gibson L, Giles M, Greenlee J, Hamilton S, Harrison G, Hui L, Jones C, Palasanthiran P, Schleiss M, Shand A, And Van Zuylen W. Congenital Cytomegalovirus Infection In Pregnancy And The Neonate: Consensus Recommendations For Prevention, Diagnosis, And Therapy. Review. Lancet Infectious Diseases. Published on line 10 Mars 2017.
- Vial R, Zandotti C, **Alain S**, Decourt A, Jourde-Chiche N, Purgis R, Bornet C, Daniel L, Moal V And Legris T. Brincidofovir Use After Foscarnet Crystal Nephropathy In A Kidney Transplant Recipient With Multiresistant Cytomegalovirus Infection: A Case Report And Review Of Literature. Case Reports in Transplantation, Volume 2017, 7 pages.
- Faure E, Galperine T, Cannesson O, **Alain S**, Gnemmi V, Goeminne C, Dewilde A, Béné J, Lasri M, Lessore De Sainte Foy C, Lionet A. Case report: Brincidofovir-induced reversible severe acute kidney injury in 2 solid-organ transplant for treatment of cytomegalovirus infection. Medicine (Baltimore). 2016 Nov;95(44):e5226.
- Scherlinger M., **Alain S.**, Richez C. Monitoring Of Epstein–Barr Virus (EBV)/Cytomegalovirus (CMV)/Varicella-Zoster Virus (VZV) Load In Patients Receiving Tocilizumab For Rheumatoid Arthritis. Joint Bone Spine. 2017 Mar 28. pii: S1297-319X(17)30048-9. IF 3,329
- **Ligat G, Jacquet C**, Chou S, Couvreux A, **Alain S**, **Hantz S**. Identification of a short sequence in the HCMV terminase pUL56 essential for interaction with pUL89 subunit. Sci Rep. 2017; 7: 8796. IF 4,859
- Brissot E, Alsuliman T, Gruson B, Hermet E, Tirefort Y, Yacoub-Agha I, **Alain S**. [How to manage EBV reactivation and EBV-PTLD, CMV and human herpesvirus 6 reactivation and infection after allogeneic stem cell transplantation: A report of the SFGM-TC (update)]. Bull Cancer. 2017 Dec;104(12S):S181-S187. IF 0,853
- **Noble J**, Gatault P, Sautenet B, Gaudy-Graffin C, Beby-Defaux A, Thierry A, Essig M, Halimi Jm, Munteanu E, **Alain S***, Buchler M* (* equal contribution). Predictive factors of spontaneous CMVDNAemia clearance in kidney transplantation. J clin virol. 2018 feb - mar;99-100:38-43. IF 3,051
- Ligat G, Cazal R, **Hantz S**, **Alain S**. Human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target, a close-up view. FEMS Microbiol Rev. Invited review. Proofs on line 18 janvier 2018. IF 12,198

- Asuliman T, Kitel C, Dulery R, Guillaume T, Larosa F, Cornillon J, Labussiere Wallet H, Mediavilla C, Belaiche S, Delage J, **Alain S**, Yacoub-Agha I. Cytotect as salvage therapy in patients with cmv infection following allogeneic hematopoietic cell transplantation: a multicenter retrospective study. Bone marrow transplantation, in press. IF 3.969
- Risk Factors for Congenital Cytomegalovirus Infection Following Primary and Nonprimary Maternal Infection: A Prospective Neonatal Screening Study Using Polymerase Chain Reaction in Saliva. **Leruez-Ville M**, Magny JF, Couderc S, Pichon C, Parodi M, Bussières L, **Guilleminot T**, Ghout I, Ville Y. Clin Infect Dis. 2017 Aug 1;65(3):398-404.
- Fetal cytomegalovirus infection. **Leruez-Ville M**, Ville Y. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2017 Jan; 38:97-107. Review.
- Reduction in late onset cytomegalovirus primary disease after discontinuation of antiviral prophylaxis in kidney transplant recipients treated with de novo everolimus. 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. Transpl Infect Dis. 2018 Apr;20(2):e12846. doi: 10.1111/tid.12846. Epub 2018 Feb 21.
- Model of population pharmacokinetics of cidofovir in immunocompromised children with cytomegalovirus and adenovirus infection. Neant N; Klifa, R; Bouazza N; Moshous D; Neven B; **Leruez-Ville M**; Blanche S; Treluyer JM; Hirt D; Frange P. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, April 2018. sous presse.
- Campos AB, Ribeiro J, Branca R, Campilho F, Campos Jr A, Baldaque I, **Boutolleau D**, Sousa H. Genotypic resistance of cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients from Portugal: A retrospective study. *Antiviral Res* 2017; 138 : 86-92.
- Canavaggio P, **Boutolleau D**, Goulet H, Riou B, Hausfater P. Procalcitonin for clinical decisions on influenza-like illness in emergency department during influenza A(H1N1)2009 pandemic. *Biomarkers* 2017 ; 12 : 1-7.
- **Burrel S**, **Boutolleau D**, Ryu D, Agut H, Merkel K, Leendertz FH, Calvignac-Spencer S. Ancient recombination events between human herpes simplex viruses. *Mol Biol Evol* 2017 ; 34 : 1713-1721.
- Rousseau A, **Boutolleau D**, Titier K, Bourcier T, Chiquet C, Weber M, Colin J, M'Garrech M, Gueudin J, Bodaghi B, **Burrel S**, Agut H, Deback C, Labetoulle M. Recurrent herpetic keratitis despite antiviral prophylaxis: A virological and pharmacological study. *Antiviral Res* 2017 ; 146 : 205-212.
- Afshar B, Bibby D, Piorkowska R, Ohemeng-Kumi N, Snoeck R, Andrei G, Morfin F, Frobert E, **Burrel S**, **Boutolleau D**, Crowley B, Mbisa J. A European multi-centre External Quality Assessment (EQA) study on phenotypic and genotypic methods used for herpes Simplex Virus (HSV) drug resistance testing. *J Clin Virol* 2017 ; 96 : 89-93.
- 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. *Cyotherapy*. 2018 Apr;20(4):521-523. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.12.006. Epub 2018 Feb 9.
- Habib M, Buisson M, Lupo J, Agbalika F, Socié G, **Germi R**, Baccard M, Imbert-Marcille BM, Dantal J, **Morand P**, Drouet E. Lytic EBV infection investigated by detection of Soluble Epstein-Barr virus ZEBRA in the serum of patients with PTLD. *Sci Rep*. 2017 Sep 5;7(1):10479. doi: 10.1038/s41598-017-09798-7.
- Fourcade G, **Germi R**, Guerber F, Lupo J, Baccard M, Seigneuri A, Semenova T, **Morand P**, Epaulard O. Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a city laboratory network, 2000-2016. *PLoS One*. 2017 Apr 17;12(4):e0175574. doi: 10.1371/journal.pone.0175574. eCollection 2017.
- Stahl JP, Azouvi P, Bruneel F, De Broucker T, Duval X, Fantin B, Girard N, Herrmann JL, Honnorat J, Lecuit M, Mailles A, Martinez-Almoyna L, **Morand P**, Piroth L, Tattevin P; Guidelines on the management of infectious encephalitis in adults. reviewing group. *Med Mal Infect*. 2017 May;47(3):179-194. doi: 10.1016/j.medmal.2017.01.005. Epub 2017 Apr 12. No abstract
- Boucher A, Herrmann JL, **Morand P**, Buzelé R, Crabol Y, Stahl JP, Mailles A. Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016. *Med Mal Infect*. 2017 May;47(3):221-235. doi: 10.1016/j.medmal.2017.02.003. Epub 2017 Mar 22. Review.

- Fillatre P, Crabol Y, **Morand P**, Piroth L, Honnorat J, Stahl JP, Lecuit M. Infectious encephalitis : Management without etiological diagnosis 48hours after onset. *Med Mal Infect.* 2017 May;47(3):236-251. doi: 10.1016/j.medmal.2017.02.004. Epub 2017 Mar 15. Review.
- Lupo J, Dos Santos O, Germi R, Baccard-Longère M, Stahl JP, Epaulard O, **Morand P** Herpes simplex type 2 encephalitis and methotrexate medication: a fortuitous or causative association in a patient with spondyloarthritis? *Antivir Ther.* 2017;22(4):357-359. doi: 10.3851/IMP3110. Epub 2016 Nov 23.

Communications nationales

- **Ligat, G., Jacquet, C., Chou, S., Couvreux, A., Alain, S., Hantz, S.** A short sequence in the HCMV terminase pUL56, essential for interaction with pUL89, as a new antiviral target. Journée de l'institut GEIST 2017 (Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques) (Limoges, France). Poster n° 9.
- **Ligat, G., Jacquet, C., Chou, S., Couvreux, A., Alain, S., Hantz, S.** A short sequence in the HCMV terminase pUL56, essential for interaction with pUL89, as a new antiviral target. Congrès Immunothérapies Anti-Infectieuse 2017 (Lyon, France). Poster n° 2.
- **Sophie Alain, Chloé Jacquet**, Alix Merey², and CMV rescue therapy group Potential of Anti-CMV Immunoglobulins In Transplants Patients Refractory To CMV-antiviral Treatment. Congrès Immunothérapies Anti-Infectieuse 2017 (Lyon, France) communication orale
- **Florence Agbazahou, Lilian Roland, Valentin Tilloy, Emilie Guerin, Sébastien Hantz, Sophie Alain.** Variability of gB UL55 from whole genome sequencing of congenital isolates. 6th Int. Congenital CMVConf./16th Int. CMV/betaherpesvirus Workshop Poster B-PP-054
- **S Alain, V Escuret, P Boissonnat, C Zandotti, T Legris, S Hantz, Eliza Munteanu, M Gomes-Mayeras, A Mirand, T Galperine, M Leruez, P Frange**, A Ducancelle, A Coaquette, A Dewilde, A Lionet, JC Plantier, and BCV resistance study group. Brincidofovir resistance during rescue therapy in French transplant recipients 6th Int. Congenital CMV Conf./16th Int. CMV/betaherpesvirus Workshop Poster CD-PP-037
- **Sophie Alain, Elodie Loum, Marianne Leruez-Ville, Tiffany Lamblot, Sébastien Hantz.** Congenital CMV survey in general population in France 6th Int. Congenital CMVConf./16th Int. CMV/betaherpesvirus Workshop. Poster A-PP-024.
- **Ligat, G., Alain, S., Hantz, S.** (Juillet 2017). Highlighting an ATP-binding site in helicase pUL105 crucial for HCMV replication. Journées d'animation scientifique de la FéRI (Fédération de Recherche en Infectiologie) (Tours, France).
- **Burrel S, Bellone R, Marlet J, Boutolleau D.** Designing a novel method to generate recombinant herpes simplex viruses for the characterization of UL23 thymidine kinase mutations. 37^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 18 - 19 décembre 2017.
- Mercier-Darty M, **Boutolleau D**, Rodriguez C, **Burrel S**. Added value of ultra-deep sequencing approach for detection of genotypic antiviral resistance of herpes simplex virus. 37^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 18 - 19 décembre 2017.
- Calin R, Fekkar A, **Boutolleau D**, Aubry A, Carcelain G, Boussouar S, Tourret J, Junot H, Mayaux J, Pourcher V. Bilan à 18 mois d'une RCP "Infection et Immunodépression". 18^e Journées Nationales d'Infectiologie (JNI). Saint-Malo, France. 21 - 23 juin 2017.
- Mercier-Darty M, **Boutolleau D**, Lepeule R, Rodriguez C, **Burrel S**. A case report demonstrating the utility of next generation sequencing for detection of antiviral resistance mutations from a transplanted patient with VZV infection. 37^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI). Paris, France. 18 - 19 décembre 2017.

Communications internationales

- Contribution of New Generation Sequencing in the CMV resistance analysis in renal transplant recipients Clément Danthu, **Melissa Gomes-Mayeras**, Deborah Andouard, **Eliza Munteanu**, **Remi Moulinas**, Gaetan Ligat, **Sébastien Hantz**, Jean Philippe Rerolle, **Françoise Garnier**, Marie Essig and Sophie Alain. Oral communication American Transplant Congress, Chicago 2017.
- Risk factors for congenital CMV infection following primary and non-primary maternal infection: a prospective neonatal screening study using PCR in saliva. **Leruez-Ville** M, Magny JF, Couderc S, Pichon C, Parodi M, Bussières L, **Guilleminot** T, Ghout I, Ville Y. 6th International congenital CMV conference / 16th international CMV/betaherpesvirus Workshop. Leiden, 3th May 2017, Netherlands
- Fetal treatment for congenital cytomegalovirus infection: study of the placental transfer of Letermovir 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
- Mercier-Darty M, **Boutolleau D**, Rodriguez C, **Burrel S**. Added value of ultra-deep sequencing approach for detection of genotypic antiviral resistance of herpes simplex virus. 20th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Stresa, Italie. 13 - 16 septembre 2017.
- Mercier-Darty M, **Boutolleau D**, Rodriguez C, **Burrel S**. Herpes simplex virus: ultra-deep sequencing approach for genotypic detection of antiviral drug resistance. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Vienne, Autriche. 22 - 25 avril 2017.
- **Burrel S**, **Boutolleau D**, Ryu D, Agut H, Merkel K, Leendertz F, Calvignac-Spencer S. Ancient recombination events between human herpes simplex viruses. Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE) 2017. Austin, Etats-Unis. 2 - 6 juillet 2017.
- **Boutolleau D**, Bellone R, Marlet J, **Burrel S**. First ever use of recombinant viruses for the characterization of novel UL23 thymidine kinase mutations regarding herpes simplex virus type 2 resistance to acyclovir. 42nd Annual International Herpesvirus Workshop (IHW). Gent, Belgique. 29 juillet - 2 août 2017.
- **Boutolleau D**, Le Clec'h C, Hermet L, Kalkias L, Agut H, **Burrel S**. Human herpesvirus (HHV) seroprevalences with focus on herpes simplex virus (HSV): a 5-year hospital-based study. 20th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Stresa, Italie. 13 - 16 septembre 2017.
- Mercier-Darty M, **Boutolleau D**, Lepeule R, Rodriguez C, **Burrel S**. A case report demonstrating the utility of next generation sequencing for detection of antiviral resistance mutations from a transplanted patient with VZV infection. 20th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Stresa, Italie. 13 - 16 septembre 2017.
- Zieger J, **Burrel S**, Amiel C, **Boutolleau D**, Gozlan J, Maréchal V, Quignon F. Characterization of Epstein-Barr virus analysis of short tandem repeat polymorphism. 20th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Stresa, Italie. 13 - 16 septembre 2017.
- **Burrel S**, Bellone R, Marlet J, **Boutolleau D**. Designing a novel method to generate recombinant herpes simplex viruses for the characterization of UL23 thymidine kinase mutations. 20th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV). Stresa, Italie. 13 - 16 septembre 2017.
- G Fourcade, **R Germi**, F Guerber, M Baccard, J Lupo, **P Morand**, O Epaulard. Evolution of EBV seroprevalence and of age at EBV primary infection in France in the 2001-2015 period: analysis of 81,000 serologies. 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Poster, vienna 22-25 April 2017

Conférences sur invitations.

- CMV épidémiologie et physiopathologie. **S Alain** 33ème journée du GPIP. Nice 16 juin 2017.
- « Prévention des infections maternofoetales pendant la grossesse » **S Alain** Deuxièmes Journées Franco-Maghrébines de Virologie : Infections virales : approches préventives, Marrakech, 18 au 20 octobre 2017
- “NGS for CMV resistance” **S Alain** QCMD advisory Board, Glasgow Oct 2017.
- « CMV épidémiologie Diagnostic et Résistances » S Alain, FMC cas cliniques, Réunion interdisciplinaire de Chimiothérapie Antivirale (RICAI) Decembre 2017
- 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**, Journées de Médecine fœtale, 1^{er} Juin 2018 Paris
- « Vaccin CMV » **S Alain**, Journées nationales d’Infectiologie (JNI), Nantes 14 juin 2018
- « Nouveautés virologiques dans l’infection congénitale à CMV: poids des infections maternelles secondaires, avantages et limites du dépistage salivaire néonatal ». **Leruez-Ville M** ; Journée scientifique du réseau méditerranée de périnatalité PACA Corse Monaco. Aix en Provence. 3 février 2017.
- « Diagnostic néonatal et post-natal : comment suspecter et/ou confirmer la responsabilité du CMV devant une surdité ? » **Leruez-Ville M**, Syndromes et ORL Pédiatrique. Journée nationale de l’AFOP. Paris 10 Mars 2017
- « Infection congénitale à CMV: traitement prénatal. Séminaire prise en charge pré et postnatale des anomalies congénitales et leur traitement PACT ». **Leruez-Ville M** Paris, 3 mars 2017.
- « Interprétation des sérologies pendant la grossesse. Forum National des Médecins. **Leruez-Ville M** 13ème Congrès National. Marrakech, Maroc, 15 avril 2017.
- “Hearing loss and diagnosis of congenital CMV infection ». ENT World Congress, **Leruez-Ville M** Paris, 26 Juin 2017
- « Le cytomégalovirus: Prise en charge de l’infection péri- et post-natale ». **Leruez-Ville M** 33ème journée du GPIP. Nice 16 juin 2017.
- « Surdité et CMV: » vers un traitement précoce? **Leruez-Ville M** Congrès Société Française d’Audiologie. 20 et 30 septembre 2017.
- “CMV and pregnancy: antiviral treatments and recommendations ». **Leruez-Ville M** Société Française de Microbiologie Journées annuelles, Paris, 10 octobre 2017.
- « Actualit es sur l’infection cong  nitaire ´ CMV » **Leruez-Ville M**. Journée du Collée 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 infection». **Leruez-Ville M**. Second ECCI (European Congenital Cytomegalovirus Initiative) Meeting. Brussels, 14 May 2018
- « Diagnostic virologique des infections ´ virus herpes simplex : places respectives de la sérologie et de la biologie moléculaire ». **Boutolleau D**. 1^{res} Journées Francophones de Virologie Médicale. Bordeaux, France. 27 - 29 septembre 2017
- « Infections virales sexuellement transmissibles et prévention : infections herpétiques ». 2^e Journées Franco-Magh  bines de Virologie. **Boutolleau D**. Marrakech, Maroc. 18 - 20 octobre 2017.
- « Prise en charge thérapeutique des infections ´ virus herpes simplex (HSV) : antiviraux, resistance, perspectives. Solutions innovantes QIAGEN en diagnostic moléculaire ». **Boutolleau D**. Paris, France. 30 novembre 2017.
- « EBV et transplantation: actualit es ». Fourth International summer school in transplantation: from immunobiology to clinical medicine. **Patrice Morand** Labex Transplantex. Institut de Virologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
- « Paramètres Immunovirologiques pour définir les seuils d’interventions thérapeutiques en prévention des lymphoproliférations EBV-induites ». Réseau virus et greffe. **Patrice Morand** Paris, Hôpital Saint Louis 20 janvier 2017

- **Patrice Morand.** Agents infectieux et cancer : vers de nouvelles mises en examen ? 38^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Lundi 17 et mardi 18 décembre 2018. Palais des Congrès de Paris

Documents de vulgarisation

- **Boutolleau D.** Allô Docteurs (Dr Marina Carrère d'Encausse et Dr Michel Cymes) : le zona (*France 5, 8 mai 2017*)

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

Sans objet

8. Programme d'activité pour les années suivantes

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

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'ECCI.
- 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

- Poursuite 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

- Automatisation de la technique de PCR CMV sur sang séché sur buvard : nous avons déjà testés 2 techniques automatisées en 2017 qui n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Nous souhaitons continuer de tester d'autres possibilités techniques dans l'année à venir.
- 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 aussi projeté de tester l'avidité proposée par Abbott sur Architect.
- Dans les suites de notre étude sur le peptidome du liquide amniotique infecté (C Desveaux C, Plos Pathogen, 2016), nous collaborons avec le laboratoire « CS Mott Center for Human Growth and development », Wayne University, Detroit, pour l'étude de la protéomique et métabolomique de 50 liquides amniotiques infectés et de 50 témoins non infectés (Etude BiocCMV).

2) Les enquêtes et études

- Le protocole CYMEPEDIA (NCT01923636) se terminera fin 2019. L'objectif de cette étude est l'évaluation de la valeur pronostique de marqueurs néonataux radiocliniques, immunologiques et virologiques dans la surveillance des séquelles neuro-sensorielles à un an chez des enfants infectés in utero par le cytomégalovirus. Tous les patients sont inclus.
- L'étude (CYME-AUDIT) de la faisabilité de la réalisation dans le premier mois de vie du diagnostic d'une infection congénitale à CMV et de la confirmation d'un déficit auditif chez des nouveau-nés qui ont eu un dépistage positif de la surdité en maternité est terminée et ses résultats sont en cours d'analyse.
- L'étude de la pharmacocinétique des nouveaux anti-CMV (Letermovir et Maribavir) va continuer avec notamment une étude de la diffusion tissulaire (cerveau, oreille interne) dans des modèles animaux.
- CYMEVAL III : Les résultats favorables de la pharmacocinétique du Letermovir à travers le placenta ainsi que ses données rassurantes concernant sa toxicité nous ont encouragés à déposer un projet d'essai clinique au PHRC 2018. Il s'agit d'un essai randomisé comparant le Letermovir au Valaciclovir dans le traitement anténatal de l'infection fœtale à cytomégalovirus symptomatique.

Laboratoire associé la Pitié Salpêtrière :

Le programme des activités de recherche du CNR-LA Herpesvirus de la Pitié-Salpêtrière va consister dans les années à venir à poursuivre les recherches engagées à ce jour sur les thématiques de la variabilité génétique et de la prise en charge thérapeutique des HSV et des VZV :

- Caractérisation phénotypique et génotypique du nouveau variant de HSV-2 d'origine africaine (HSV-2v)
- Caractérisation des nouvelles mutations de la thymidine kinase et de l'ADN polymérase des HSV-1 et HSV-2 dans la résistance aux antiviraux grâce à la technologie BAC
- Apport du séquençage NGS pour la détection de la résistance des HSV et du VZV aux antiviraux dans la pratique diagnostique
- Identification de nouveaux antiviraux à activité anti-HSV

Laboratoire de Grenoble :

1) Recherche Clinique

- Mettre en place d'une activité de surveillance

Un des objectifs principaux du laboratoire de Grenoble, sera de faire un état des lieux la mononucléose infectieuse (MNI) en France. En effet il n'existe pas d'étude récente de l'épidémiologie de la MNI dans notre pays (dernière étude BEH 2002). Or à partir des années 2000 une modification de l'épidémiologie de la MNI a été observée dans les pays industrialisés (japon, Angleterre) avec un recul de l'âge de la primo-infection à EBV, l'augmentation du nombre de MNI et l'augmentation des formes graves de la maladie.

L'objectif serait d'obtenir un financement pour mettre en place un observatoire de la Mononucléose infectieuse. Le rôle de cet observatoire serait 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. Pour les cas graves, l'objectif serait 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 sang total.

- 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

- Compléter l'étude des biomarqueurs EBV chez des patients VIH+ avec l'étude des lymphomes non-Hodgkinien du patient HIV+ : 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, investigator principal Dr Caroline Besson).

2) Recherche fondamentale

- Mettre en place une étude des anticorps neutralisants dirigées contre les glycoprotéines virales gH/gL et gB dans les infections par le virus d'Epstein-Barr
- Développer une activité de séquençage du génome EBV (gène de latence EBNAs, LMP-1 et gène lytique BZLF1)

Laboratoire CNR Limoges et Pitié-Salpêtrière :

- 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

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

1. Expertise

- 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 trousseaux diagnostiques, mettre en place un contrôle de qualité inter-laboratoire pour le diagnostic moléculaire des infections herpétiques neuro-méningées.

2. Conseil

- 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

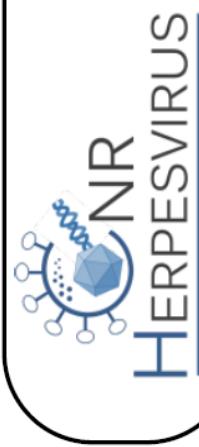
- par la production de connaissances épidémiologiques en France concernant les infections à CMV chez les immunodéprimés et les infections materno-fœtales à Herpesvirus (CMV, HSV1 et HSV2), en particulier par le recensement des infections néonatales liées aux HSV ;
- par le suivi de la résistance aux 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

- 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 Cytomégalovirus 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.

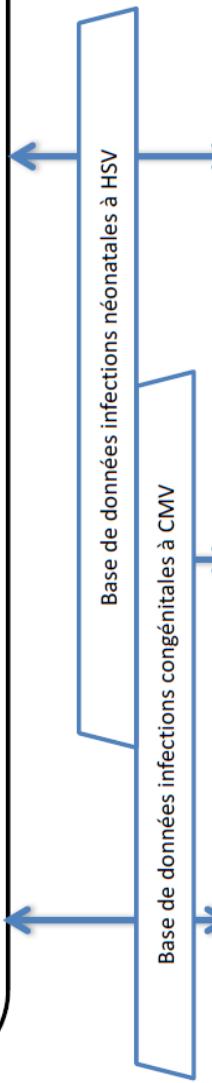


Coordination : CHU de Limoges

S Alain , adjoint S Hantz

Hébergement et gestion des bases déclaratives

Hébergement et gestion du site internet du CNR



Laboratoire associé
CHU Necker-enfants malades
M Leruez-Ville
Expertise, Aide au diagnostic, Conseil, Surveillance et Alerte

Infection congénitale à CMV
Expertise, Aide au diagnostic, Conseil, Surveillance et Alerte

Epidémiologie des infections à VZV
Infections à HHV6 (S Rogez)

Laboratoire coordonnateur
S Alain, S Hantz
Expertise, Aide au diagnostic, Conseil, Surveillance et Alerte

Infections à CMV
Résistances aux antiviraux/nouveaux antiviraux
Infections à CMV et HSV de l'immunocompétent et de l'immunodéprimé
Epidémiologie des infections à VZV
Infections à HHV6 (S Rogez)

Laboratoire associé
CHU Pitié Salpêtrière
D Boutolleau, S Burrel
Expertise, Aide au diagnostic, Conseil, Surveillance et Alerte

Infections à HSV résistantes aux nouveaux antiviraux
Infections à HSV de l'immunocompétent et de l'immunodéprimé
Dr. A Gautheret -Dejean HHV6

Laboratoire support
CHU Grenoble
Pr P Morand, Dr R Germi
Expertise, Conseil

Infections à EBV

Epidémiologie des infections à herpèsvirus
Infections graves à herpèsvirus : CMV, HSV, VZV, EBV, HHV6
Base de donnée infections neurotropes, épidémiologie et aide au diagnostic

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Laboratoire coordonnateur Limoges

Pas de changements majeurs dans l'organisation mais deux changements de personne sur le poste de technicien en CDD en 2017 (départs de B Crespy, puis de G Larraud, pour évoluer vers un CDI) et un congé de maternité pour notre ingénieur Mélissa Gomes.

Médecins biologistes :

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

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. **Congé de maternité 2017. Non remplacée.**

1 ETP CDD Ingénieur bioinformaticien en charge de la plate-forme de séquencage 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.

1,5 ETP Attachés de recherche clinique/Ingénieurs : financés sur les crédits MIG CNR pour gestion des cohortes, bases de données, qualité et CRBioLim

Françoise GARNIER (0,5ETP 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 LOUM/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 :

0,5 ETP Technicien CDD financé sur la MIG CNR Maladies transmissibles Guillaume LARRAUD (remplace B Crespy), puis Jessica FIAMETTI (juin-fin décembre 2017) 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 effectue les antivirogrammes des virus recombinants et entretient les 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

2012-2015 Gaëtan LIGAT (nouveaux antiviraux, terminases du CMV),

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.

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 vacances financées par les MIG versées à l'hôpital Necker dans le cadre du CNR.

Technicien : 1 ETP

Mme Tiffany Guilleminot occupe le poste rémunéré par le budget propre du CNR depuis septembre 2009 (subvention InvS). **Depuis octobre 2017 Melle Guilleminot a été recrutée en CDI et est rémunérée sur les dotations MIG versées à l'hôpital Necker.** Mme Guilleminot consacre 100% de son temps au CNR : réalisation des PCR CMV sur Guthries, sur salive, des sérologies CMV, des expertises de trousseuses 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.

1.3 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.

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 Toxoplasmose 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.

Les seules modifications en 2017 concernent l'UF de génomique du CHU : acquisition par le CHU d'un séquenceur 3500 XL Dx24 capillaires CEIVD et fin 2017 d'un séquenceur MiSeq, introduisant la technologie Illumina en diagnostic, par ailleurs accessible depuis 2017 à des fins de recherche sur le site de la Faculté des Sciences (Next Seq).

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

Sérologie :

2 laboratoires

- automates : Architect I2000 et I1000 (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 (1laboratoire 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 cyler 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 M2000 RT ABBOTT 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) 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 GS Junior depuis juin 2014**
- **Un séquenceur haut débit Proton (Life Technologies)** depuis décembre 2012. Il est accessible aux équipes hospitalières et universitaires depuis avril 2013.
- **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 »** depuis décembre 2016.
- **Fin 2017 : Un Miseq Illumina**

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 Vidas bioMérieux, des incubateurs, laveurs de microplaques, spectrophotomètres
- Centrifugeuses, ultracentrifugeuses.
- Thermocycleurs, matériel pour électrophorèses.
- Une chaîne de biologie moléculaire bioMérieux : 2 EMag , 1 Estream et 2 thermocycleurs 7500
- Deux autres appareils d'extraction des acides nucléiques : 1 MagNaPure Compact (Roche Diagnostic), 1 EasyMag (bioMérieux).
- Six appareils de PCR en temps réel (1 ABI Prism 7300, 1 ABI Prism 7005 (Life Technology) + 4 CFX96 Real Time system (BIORAD)
- Un extracteur Ampliprep TM couplé au Cobas TaqMan (Roche Diagnostic)
- 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

1.4 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**)

Jusqu'en 2017 :

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

- Près de 10000 échantillons de sang totaux de patients transplantés conservés à -80°C depuis 2011.
- Souches d'HSV, de VZV du laboratoire de virologie antérieures à la création du CRB, qui sont progressivement rentrées dans la collection du CNR

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

- 800 sanguins totaux CMV positif ou négatifs aliquotés et mis en collection biologique pour les évaluations de trousseuses de PCR.
- 400 échantillons de sérum recueillis au laboratoire ou adressés pour primo-infection et dont les caractéristiques (IgG et IgM et avidité des IgG) sont connues. Ces sérum sont conservés à -20°C.
- 129 Echantillons de sérum 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.
- 35 urines de nouveau-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
- **3843** 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 endothérial 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 séquencage haut débit sur Ion Proton.
- 16 Souches à tropisme endothérial isolées de liquide amniotique ou de fœtus
- 72 souches à tropisme endothérial 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'Hôpital 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

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 du GHPs 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 2017, cela représente près de 2100 prélèvements (LCR, LBA, prélèvements cutanéo-muqueux, prélèvements génitaux, prélèvements oculaires ...) et 250 souches virales. Ceci inclut en particulier l'ensemble des prélèvements/souches testé au laboratoire pour la sensibilité 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 sanguins 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.

1.5 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, la sérologie VIH et la mesure de la charge virale VIH sur automate M2000 ont été accréditées en 2016. **La prochaine visite est prévue en 2019 avec extension de portée aux autres PCR Herpesvirus et accréditation des sérologies virales sur Liaison XL.** 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), 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), **une extension de portée pour la PCR CMV est présentée en septembre 2018.**

Le laboratoire est accrédité pour la sérologie virale (sérologie des hépatites et du VIH depuis septembre 2017 sur l'automate Architect (Abbott) une extension de portée pour les autres sérologies dont celles du CMV (IgG, IgM et avidité) fait l'objet d'une extension de portée pour la visite de septembre 2018.

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 cérébrospinal (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)	LIAISON® CMV IgG II Av idity (Dia Sorin) VIDAS® CMV IgG Avidity II (bioMérieux)	LIAISON® CMV IgG II Avidity (Dia Sorin) Architect(ABBOTT)
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	<ul style="list-style-type: none"> - PCR quantitative temps réel CMV-R gene (bioMérieux) utilisée en routine - PCR quantitative « maison » en place depuis 2005, (adaptée de Mengelle et al., J Med. Virol. 2003) utilisée comme deuxième technique - PCR quantitative « maison » dans le gène gH développée en 2009 par le laboratoire CNR. (Grosjean et al., RICAI 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> -PCR quantitative temps réel CMV-R gene (Argène) utilisée en technique de routine depuis juin 2013 -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 (Leruez-Ville M et al. J Clin Microbiol, 2003 ; Leruez-Ville et al. J Clin Microbiol, 2008) 	PCR quantitative temps réel CMV-R gene (Argène) utilisée en technique de routine
Applications :	<ul style="list-style-type: none"> -Diagnostic pré-natal de l'infection congénitale à CMV (sur échantillon de liquide amniotique ou sang foetal) -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-Felibus, 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 	<ul style="list-style-type: none"> -Suivi des charges virales chez les immunodéprimés 	
Techniques de culture			
	<ul style="list-style-type: none"> - Culture virale classique (isolement viral) et test de neutralisation par des anticorps spécifiques. - Détermination du phénotype de résistance vis-à-vis des molécules disponibles (aciclovir, ganciclovir, cidofovir, foscarnet, artesunate, maribavir, letermovir) - Détermination du génotype de résistance au ganciclovir, au maribavir au foscarnet et au cidofovir par séquençage de la totalité des gènes <i>UL97</i> et <i>UL54</i> du CMV, ainsi qu'au letermovir, par séquençage du gène <i>UL56</i>. - Détermination du génotype et étude de la multiplicité des souches au sein d'un isolat par génotypage rapide des glycoprotéines d'enveloppe gB, gH, gN (technique du CNR) 	<ul style="list-style-type: none"> - Culture virale classique (isolement viral) 	<ul style="list-style-type: none"> - Culture virale classique (isolement viral). - Détermination du phénotype de résistance <p>Détermination du génotype de résistance au ganciclovir, au maribavir au foscarnet et au cidofovir par séquençage de la totalité des gènes <i>UL97</i> et <i>UL54</i> du CMV, ainsi qu'au letermovir, par séquençage du gène <i>UL56</i></p>

	Grosjean et al., J Clin Virol 2009).		
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 UL144		+	
Analyse des microsatellites		+	
Analyse du profil UL10-11-12-13	+		
Polymorphisme des séquences de jonction « a »	+		
Polymorphisme des gènes-cibles des antiviraux	+		
	UL97, UL54, UL27, terminases UL56 et UL89		UL97, UL54, terminases UL56 et UL89

2.1.2 HSV

Techniques	Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière	Laboratoire coordonnateur Limoges
Détection semi-quantitative des IgG HSV-1 et HSV-2	Liaison® XL HSV-1/2 IgG (DiaSorin)	
Détection semi-quantitative des IgM HSV-1 et HSV-2	Liaison® XL HSV-1/2 IgM (DiaSorin)	Liaison® XL HSV-1/2 IgM (DiaSorin)
Détection semi-quantitative des IgG spécifiques HSV-1	Liaison® XL HSV-1 IgG (DiaSorin)	
Détection semi-quantitative des IgG spécifiques HSV-2	Liaison® XL HSV-2 IgG (DiaSorin)	
Détection quantitative des IgG anti-HSV		
Détection quantitative des IgG anti-VZV		Liaison® XL VZV IgG/IgM (DiaSorin)
Applications		- 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, séquençage		
Détection et quantification du génome des HSV-1 et HSV-2	Simplexa HSV-1/2(Focus) (urgence) artus HSV-1/2 QS-RQ (Qiagen) (routine) PCR quantitative « maison » (Burrel et al., J Virol Methods, 2012) (LBA)	HSV 1/2 SmartCycler (Cepheid)
Séquençage	ABIPRISM 3730 genetic analyzer	
NGS	MiSeq Sequencing System, Illumina	ABIPRISM 3130 genetic analyzer Ion PGM ® system (Ion Torrent)
Applications		- 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 - Caractérisation moléculaire des souches de HSV (formes cliniques graves, résistance aux antiviraux)	
Isolement des souches de HSV en culture cellulaire	Culture de cellules Vero et de fibroblastes humains (MRC5) Typage par immunofluorescence	Culture de cellules Vero et de fibroblastes humains (MRC5) Typage par immunofluorescence
Applications	- Isolation des souches cliniques de HSV-1 et HSV-2 à partir de certains prélèvements biologiques positifs en PCR : prélèvements cutanéo-muqueux, prélèvements génitaux, prélèvements respiratoires (LBA), liquides de ponction	

Techniques	Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière	Laboratoire coordonnateur Limoges
Diagnostic de la résistance aux antiviraux		
Méthode génotypique	Détermination de la résistance à l'aciclovir, au foscarnet et au cidofovir par séquençage des gènes <i>UL23</i> (thymidine kinase) et <i>UL30</i> (ADN polymérase) (Burrel et al., <i>Antimicrob Agents Chemother, 2010</i>) Détermination de la résistance à l'aménamévir et au pritélivir (molécules en essais cliniques de phase 3) par séquençage des gènes <i>UL5</i> (hélicase) et <i>UL52</i> (primase) (Collot et al., <i>Antiviral Res, 2016</i>) ABIPRISM 3730 genetic analyzer MiSeq Sequencing System, Illumina	Détermination de la résistance à l'aciclovir, au foscarnet et au cidofovir par séquençage des gènes <i>UL23</i> (thymidine kinase) et <i>UL30</i> (ADN polymérase) (Burrel et al., <i>Antimicrob Agents Chemother, 2010</i>) ABIPRISM 3730 genetic analyzer Ion PGM ® 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) (Burrel et al., <i>Antimicrob Agents Chemother, 2010</i>)	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	

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 des souches de HSV et VZV et l'identification de souches lors d'infections nosocomiales

Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière	Laboratoire coordonnateur Limoges
Polymorphisme des gènes (séquençage Sanger) ^a : <ul style="list-style-type: none"> ▪ UL23 (TK) [HSV-1/2] ▪ UL30 (ADN polymérase) [HSV-1/2] ▪ UL42 (facteur processivité) [HSV-1/2] ▪ UL5 (hélicase) [HSV-1/2] ▪ UL52 (primase) [HSV-1/2] ▪ US4 (gG) [HSV-2] ▪ US6 (gD) [HSV-2] ▪ UL1 (gL) [HSV-2] ▪ UL22 (gH) [HSV-2] ▪ UL27 (gB) [HSV-2] 	Polymorphisme des gènes (séquençage Sanger) ^a : <ul style="list-style-type: none"> ▪ UL23 (TK) [HSV-1/2] ▪ UL30 (ADN polymérase) [HSV-1/2] ▪ Séquence génome entier sur souche VZV : <ul style="list-style-type: none"> • Séquence ORF 64 • RFLP-typage • Séquence génome entier sur souche
Polymorphisme des microsatellites du HSV-1 et du HSV-2 (analyse de longueur de fragment) ^b	
Identification du variant HSV-2v (PCR spécifique en temps réel)^c	

^a Burrel et al., *Antimicrob Agents Chemother, 2010* ; Burrel et al., *Antiviral Res, 2012* ; Collot et al., *Antiviral Res, 2016* ; Burrel et al., *J Virol, 2015*

^b Deback et al., *J Clin Microbiol*, 2009 ; Burrel et al., *J Clin Microbiol*, 2013

^c Burrel et al., *J Virol*, 2015

^d Rozenberg and Lebon, *J Neurovirol*, 1996 ; Sivadon et al., *J Neurovirol*, 1998

Liste des méthodes disponibles au CNR pour le génotypage 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)	
<ul style="list-style-type: none">• EBV : Typage des variants par PCR-séquence	

^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 2017. 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)

Une recommandation pour les génotypes 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)

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

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

MÈRE: 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

MÈRE: 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 **Immunglobulines, 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

MÈRE: 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

- Fœtus: données cliniques
- Fœtus: données biologiques
- Fœtus: 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 foetal : **Oui, Non, Non renseigné**
Résultat par mm³

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

Résultat **Positif, Négatif**

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

Résultat **Positif, Négatif**

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

Résultat **Positif, Négatif**

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

-Sang foetal **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 foetal) **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 Biogiste 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: IDENTITÉ

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**

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

Date

Age du nouveau-né en jours

Saisir la valeur en jours calculée

-PCR sur urides 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 urides 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 (biographe 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**

Traitemennt 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/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

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 (Biographe, 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

RECENSEMENT: INFECTIONS CONGENITALES PAR LE CMV

SUIVI DE L'ENFANT

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

Traitements 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 cytomégalyques, Aucun, Non renseigné

Commentaires

Prochaine visite programmée 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

Soutien 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

Réseaux de surveillance :

Réseau de partenaires pour la déclaration en ligne des cas d'infection congénitale à CMV (plateforme Voozanoo)

Réseau des correspondants inscrits en 2017 pour la déclaration en ligne des cas d'infection congénitale par le CMV (plateforme voozanoo)			
Ville	Centre	NOM	Spécialité
Amiens	Groupe Hospitalier Sud	Dr Christine SEGARD	Biogiste
Avignon	CH Avignons	Dr Delphine PESENTI	Biogiste
Bordeaux	CHU Bordeaux	Dr Isabelle GARRIGUE	Biogiste
Brest	CPDPN	Dr Anne-Hélène SALIOU	Gynécologue obstétricien
Caen	CPDPN	Dr Guillaume BENOIST	Gynécologue obstétricien
Clermont-Ferrand	CHU Clermont Ferrand	Dr Christel REGAGNON	Biogiste
	CPDPN	Dr Hélène LAURICHESSE	Gynécologue obstétricien
	CHU Clermont Ferrand	Dr Denis GALLOT	Gynécologue obstétricien
Fort de France	CHU Martinique	Dr Eugénie Jolivet	Gynécologue obstétricien
Grenoble	CHU Grenoble	Dr Véronique EQUY	Gynécologue obstétricien
	CHU Grenoble	Dr Joelle TROUSSIER	ORL
	CHU Grenoble	Dr Chloé EPIARD	Pédiatre
	CHU Grenoble	Dr Julien LUPO	Biogiste
Le Mans	CH Le Mans	Dr Marie-Thérèse CHEVE	Gynécologue obstétricien
Lille	CHU Lille	Dr Anny DEWILDE	Biogiste
	CHU Lille	Dr Mouna LAZREK	Biogiste
Limoges	CHU Limoges	Pr Sophie ALAIN	Biogiste
	CHU Limoges	Dr Sébastien HANTZ	Biogiste
Lyon	BIOMNIS	Dr Véronique JACOMO	Biogiste
Marseille	CHU Marseille	Dr Christine ZANDOTTI	Biogiste
Metz Thionville	CHR Metz Thionville	Dr Marie-France OLERIC	Gynécologue obstétricien
	CHR Metz Thionville	Dr Eric WELTER	Gynécologue obstétricien
	CHR Metz Thionville	Dr Anca MOZA	Gynécologue obstétricien
Montpellier	CHU Montpellier	Dr Vincent FOULONGNE	Biogiste
	CHU Montpellier	Dr Marie Gabrielle VIGUÉ	Pédiatre
Nantes	CHU Nantes	Dr Céline BRESSOLLETTE	Biogiste
	Réseau « Sécurité Naissance - Naître Ensemble »	Mme Nathalie BANASZKIEWICZ	Sage-femme, profil Gynécologue obstétricien
Nice	CHU Nice	Dr Cynthia TRASTOUR	Gynécologue obstétricien
	CHU Nice	Dr Isabelle CANNAVO	Biogiste
Nîmes	CHU Nîmes	Dr Eve MOUSTY	Gynécologue obstétricien
	CHU Nîmes	Dr Marie-Josée CARLES	Biogiste
Paris	AP-HP Hôpital Debré	Dr Natacha TEISSIER	ORL
	AP-HP Hôpital Louis Mourier	Pr Olivier PICONE	Gynécologue obstétricien
	AP-HP Hôpital Paul Brousse	Dr Christelle VAULOUF-FELLOUS	Biogiste
	AP-HP Hôpital Necker	Dr Marianne LERUEZ	Biogiste
	AP-HP Hôpital La Pitié-Salpêtrière	Dr David BOUTOLLEAU	Biogiste
Poitiers	CHU Poitiers	Dr Agnès BEBY-DEFAUX	Biogiste
	CPDPN	Dr Valérie VEQUEAU-GOUA	Gynécologue obstétricien
Rennes	CPDPN	Dr Gwenaelle LE BOUAR	Gynécologue obstétricien
Saint Etienne	CHU Saint Etienne	Dr Sylvie PILLET	Biogiste
Tours	CHU Tours	Dr Catherine GAUDY-GRAFFIN	Biogiste
	CHU Tours	Pr Franck PERROTIN	Gynécologue obstétricien
Danemark			
Copenhagen	Statens Serum Institut	Dr Hanne Thang VESTERGAARD	Biogiste

Annexe : Réseaux de surveillance :

Réseau de partenaires pour le recueil de déclarations et de souches pour les infections materno-fœtales de 2017

Grand-Est :

NANCY:

CPDPN :

MOREL Olivier (olivier.morel@chu-nancy.fr)

VIROLOGUES:

BERGER Sibylle (s.berger@chu-nancy.fr)

SCHVOERER Evelyne (e.schvoerer@chu-nancy.fr)

VENARD Véronique (v.venard@chu-nancy.fr)

OBSTETRICIEN ::

MASIAS Sibylle (s.berger@chu-nancy.fr)

STRASBOURG :

CPDPN :

FAVRE Romain (romain.favre@chu-strasbourg.fr)

VIROLOGUES :

FAFI-KREMER Samira (samira.fafi-kremer@chu-strasbourg.fr)

KACK KACK Wallys (wallys.kack-kack@chu-strasbourg.fr)

SOLIS Morgane (morgane.solis@chu-strasbourg.fr)

REIMS :

CPDPN :

BORY Jean-Paul (jp.bory@chu-reims.fr)

VIROLOGUES :

ANDREOLLETTI Laurent (landreolletti@chu-reims.fr)

BRODARD Véronique (v.brodard@chu-reims.fr)

METZ :

VIROLOGUE :

GAILLAT Jacques

ROUEN :

CPDPN :

DIGUET Alain (alain.diguet@chu-rouen.fr)

VERSPLYCK Eric (eric.verspyck@chu-rouen.fr)

VIROLOGUES:

BARON Adeline (adeline.baron@chu-rouen.fr)

GUEUDIN Marie (marie.gueudin@chu-rouen.fr)

MOUREZ Thomas (thomas.mourez@chu-rouen.fr)

PEDIATRE :

PINQUIER Didier

CAEN :

CPDPN :

DREYFUS Michel (dreyfus-m@chu-caen.fr)

BENOIST Guillaume (benoist-gu@chu-caen.fr)

VIROLOGUES :

GOUARIN Stéphanie (gouarin-s@chu-caen.fr)

DIJON :

CPDPN :

ROUSSEAU Thierry (thierry.rousseau@chu-dijon.fr)

SAGOT Paul (paul.sagot@chu-dijon.fr)

VIROLOGUES :

DE ROUGEMONT Alexis (alexis.de-rougemont@chu-dijon.fr)

BOUR Jean-Baptiste

Bourgogne-Franche-Comté :

BESANCON :

CPDPN :

MARTIN Alain (amartin@chu-besancon.fr)

VIROLOGUES :

HERBEIN Georges (gherbein@chu-besancon.fr)LEPILLER Quentin (q1lepiller@chu-besancon.fr)**RENNES :**

CPDPN :

LE BOUAR Gwenaelle (Gwenaelle.Le.Bouar@chu-rennes.fr)ODENT Sylvie (sylvie.odent@chu-rennes.fr)

VIROLOGUES :

PRONIER Charlotte (Charlotte.PRONIER@chu-rennes.fr)LAGATHU Gisèle (Gisele.LAGATHU@chu-rennes.fr)THIBAULT Vincent (Vincent.THIBAULT@chu-rennes.fr)**BREST :**

CPDPN :

SALIOU Anne-Hélène (anne-helene.saliou@chu-brest.fr)AUDEBERT Séverine (everine.audebert@chu-brest.fr)De VRIES Philine (philine.devries@chu-brest.fr)

VIROLOGUES :

PAYAN Christopher (christopher.payan@chu-brest.fr)PILORGE Léa (lea.pilorge@chu-brest.fr)VALLET Sophie (sophie.vallet@chu-brest.fr)

PEDIATRE

GAGNEUR Arnaud

SAINT BRIEUC :

CPDPN :

GREBILLE Anne-Gaëlle (anne-gaelle.grebille@ch-stbrieuc.fr)**TOURS :**

CPDPN :

ARLICOT Carine (C.ARLICOT@chu-tours.fr)PERROTIN Franck (franck.perrotin@med.univ-tours.fr)

VIROLOGUES :

BARIN Francis (francis.barin@univ-tours.fr)BATY Gaëlle (g.baty@chu-tours.fr)BOIREAU S (s.boireau@chu-tours.fr)CHAILLON Antoine (antoine.chaillon@univ-tours.fr)GAUDY-GRAFFIN Catherine (gaudy_c@med.univ-tours.fr)MARLET Julien (j.marlet@chu-tours.fr)

PEDIATRE :

MARCHAND Sophie

ORLEANS:

CPDPN:

ABIMELECH Martine (martine.abimelech@chr-orleans.fr)

VIROLOGUES:

GUIGON Aurélie (aurelie.guigon@chr-orleans.fr)GUINARD Jérôme (jerome.guinard@chr-orleans.fr)**MONTPELLIER :**

CPDPN :

FLANDRIN Anaïa (a-flandrin@chu-montpellier.fr)

VIROLOGUES :

FOULONGNE Vincent (v-foulongne@chu-montpellier.fr)

Bretagne :

Centre-Val-de-Loire :

Occitanie :

SEGONDY Michel (m-segondy@chu-montpellier.fr)
PEDIATRE :
CAMBONIE Gilles
NIMES :
CPDPN :
MARES Pierre (pierre.mares@chu-nimes.fr)
MOUSTY Eve (eve.mousty@chu-nimes.fr)
VIROLOGUES:
ALLARDET-SERVENT (Annick <annick.allardet.servent@chu-nimes.fr>)
CARLES Marie José (marie.josee.carles@chu-nimes.fr)
CHARACHON Sylvie (sylvie.charachon@chu-nimes.fr)
TOULOUSE :
CPDPN :
VAYSSIÈRE Christophe (christophe.vayssiere@gmail.com)
VIROLOGUES :
MANSUY Jean Michel (mansuy.jm@chu-toulouse.fr)
Mengelle Catherine (mengelle.c@chu-toulouse.fr)
IZOPET Jacques (izopet.j@chu-toulouse.fr)
PASQUIER Christophe (pasquier.c@chu-toulouse.fr)
APHP :
CPDPN :
PICONE Olivier (olivier.picone@aphp.fr)
VIROLOGUES :
LERUEZ Marianne (marianne.leruez@aphp.fr)
BOUTOLLEAU David (david.boutolleau@aphp.fr)
BURREL Sonia (sonia.burrel@psl.aphp.fr)
HOUHOU Nadira (nadira.houhou@bch.ap-hop-paris.fr)
VAULOUP-FELLOUS Christelle (christelle.vauloup@aphp.fr)
ROZENBERG Flore (flore.rozenberg@cch.aphp.fr)
PEDIATRES :
MOULIN Florence (florence.moulin@aphp.fr)
GAJDOS Vincent (vincent.gajdos@aphp.fr)
PAREZ Nathalie (nathalie.parez@aphp.fr)
GRIMPREL Emmanuel (emmanuel.grimprel@aphp.fr)
GAUDELUS Joël (joel.gaudelus@aphp.fr)
LORROT Mathie (mathie.lotrrot@aphp.fr)
AUJARD Yannick (yannick.aujard@aphp.fr)
DOMMERGUE Marie-Aliette (madommergues@wanadoo.fr)
HAU Isabelle (isabelle.hau@chicreteil.fr)
Hauts-de-France :
AMIENS :
CPDPN :
GONDRY Jean (gondry.jean@chu-amiens.fr)
VIROLOGUES :
LESUEUR Claudine (Lesueur.Claudine@chu-amiens.fr)
SEGARD Christine (segard.christine@chu-amiens.fr)
ZAWADZKI Patricia (Zawadzki.Patricia@chu-amiens.fr)
LILLE :
CPDPN :
DEBARGE Véronique (veronique.debarge@chru-lille.fr)
VAAST Pascal (pascal.vaast@chru-lille.fr)
VIROLOGUES:
DEWILDE Anny (anny.dewilde@chru-lille.fr)

	<p>ENGELMANN Ilka (ilka.engelmann@chru-lille.fr) PEDIATRE : DUBOIS François NANTES : CPDPN : WINER Norbert (norbert.winer@chu-nantes.fr) VIROLOGUES : BRESSOLLETTE Céline (celine.bressollette@chu-nantes.fr) Coste Burel Marianne (marianne.coste@chu-nantes.fr) IMBERT-MARCILLE Berthe Marie (berthe-marie.imbert@univ-nantes.fr) PEDIATRE : GRASLEGUEN Christelle LE MANS : CPDPN : JULIEN Emmanuel (ejulien@ch-lemans.fr) ANGERS : CPDPN : BIQUARD Florence (fbiquard@chu-angers.fr) VIROLOGUES: BOUTHRY Elise (elbouthry@chu-angers.fr) DUCANCELLA Alexandra (AlDucancelle@chu-angers.fr) LE GUILLOU-GUILMETTE Hélène (heleguillou@chu-angers.fr) LUNEL-FABIANI Françoise (FrLunel-Fabiani@chu-angers.fr) VEILLON Pascal (paveillon@chu-angers.fr)</p>
Provence-Alpes-Côte d'Azur	<p>MARSEILLE : CPDPN : GUIDICELLI Béatrice (Beatrice.GUIDICELLI@ap-hm.fr) HAUMONTE Jean-Baptiste (jeanbaptiste.haumonte@ap-hm.fr) PHILIP Nicole (nicole.philip@ap-hm.fr) DERCOLE Claude (claude.dercole@mail.ap-hm.fr) VIROLOGUES : GAZIN Céline (Celine.GAZIN@ap-hm.fr) ZANDOTTI Christine (christine.zandotti@ap-hm.fr) PEDIATRES : GIRE Catherine BOUBRED Farid NICE : CPDPN : PAQUIS Véronique (veronique.paquis@unice.fr) TRASTOUR Cynthia (trastour.c@chu-nice.fr) VIROLOGUES : CANNAVO Isabelle (cannavo.i@chu-nice.fr) CARAMELLA Anne (caramella.a@chu-nice.fr) Giordanengo Valérie (giordanengo.v@chu-nice.fr) PEDIATRE : HAAS Hervé</p>

Nouvelle-Aquitaine :

PAU :

VIROLOGUES :

VILLENEUVE Laurent (laurent.villeneuve@ch-pau.fr)

BOURROUILLOU Aude (aude.bourrouillou@ch-pau.fr)

BORDEAUX :

CPDPN :

COATLEVEN Frédéric (frederic.coatleven@chu-bordeaux.fr)

VIROLOGUES :

GARRIGUE Isabelle (isabelle.garrigue@chu-bordeaux.fr)

LAFON Marie Edith (marie-edith.lafon@u-bordeaux.fr)

TRIMOULET Pascale (pascale.trimoulet@chu-bordeaux.fr)

TUMIOTTO Camille (camille.tumiotto@chu-bordeaux.fr)

POITIERS:

CPDPN:

GOUA Valérie (v.goua@chu-poitiers.fr)

DUGUE MARECHAUD Martine (marechaud-dan@chu-poitiers.fr)

VIROLOGUES :

AGIUS Gérard (g.agius@chu-poitiers.fr)

BEBY-DEFAUX Agnès (agnes.bebay-defaux@chu-poitiers.fr)

BOURGOIN Anne (a.bourgoin@chu-poitiers.fr)

GIRAudeau Géneviève (g.giraudeau@chu-poitiers.fr)

LEVEQUE Nicolas (Nicolas.LEVEQUE@chu-poitiers.fr)

LIMOGES :

CPDPN :

COSTE MAZEAU Perrine (perrine.costemazeau@chu-limoges.fr)

IORENZA Maryse (maryse.fiorenza@chu-limoges.fr)

VIROLOGUES :

ALAIN Sophie (sophie.alain@chu-limoges.fr)

HANTZ Sébastien (sebastien.hantz@chu-limoges.fr)

PEDIATRE :

BEDU Antoine (antoine.bedu@chu-limoges.fr)

ORL :

LERAT Justine (justine.lerat@chu-limoges.fr)

LIBOURNE :

PEDIATRE :

NELSON Jean-René

Auvergne-Rhône-Alpes :

LYON :

CPDPN :

MASSARDIER Jérôme (jerome.massardier@chu-lyon.fr)

ATTIA Jocelyne (jocelyne.attia@chu-lyon.fr)

RUDIGOZ René (rene.rudigoz@chu-lyon.fr)

HUISSOUD Cyril (cyril.huissoud@chu-lyon.fr)

CHAMPION RASKIN Fabienne (fabienne.raskin@chu-lyon.fr)

GAUCHERAND Pascal (pascal.gaucherand@chu-lyon.fr)

VIROLOGUES :

DOMENACH Vinca (vinca.domenach-icard@chu-lyon.fr)

ESCURET Vanessa (vanessa.escuret@chu-lyon.fr)

BILLAUD Geneviève (geneviève.billaud@chu-lyon.fr)

FROBERT Emilie (emilie.frobert@chu-lyon.fr)

MEKKI Yahia (yahia.mekki@chu-lyon.fr)

MILON Marie Paule (marie-paule.milon@chu-lyon.fr)

Morfin-Sherpa Florence (florence.morfin-sherpa@chu-lyon.fr)

CLERMONT-FERRAND :

CPDPN :

LAURICHESSE Hélène (helaurichesse@chu-clermontferrand.fr)LEMERY Didier (dlemery@chu-clermontferrand.fr)

VIROLOGUES :

ARCHIMBAUD Christine (carchimbaud@chu-clermontferrand.fr)BREBION Amélie (abrebion@chu-clermontferrand.fr)HENQUELL Cécile (chenquell@chu-clermontferrand.fr)MIRAND Audrey (amirand@chu-clermontferrand.fr)REGAGNON Christelle (cregagnon@chu-clermontferrand.fr)**GRENOBLE :**

CPDPN :

JOUK Pierre-Simon (PSJouk@chu-grenoble.fr)

VIROLOGUES :

GERMI Raphaële (rgermi@chu-grenoble.fr)LUPO Julien (JLupo@chu-grenoble.fr)MORAND Patrice (pmorand@chu-grenoble.fr)SEMENOVA Touyana (Tsemenova@chu-grenoble.fr)**SAINT ETIENNE :**

CPDPN:

PRIEUR Fabienne (fabienne.prieur@chu-st-etienne.fr)

VIROLOGUES :

PILLET Sylvie (sylvie.pillet@chu-st-etienne.fr)POZZETTO Bruno (bruno.pozzetto@chu-st-etienne.fr)BOURLET Thomas (thomas.bourlet@chu-st-etienne.fr)**AVIGNON :**

VIROLOGUE:

PESENTI Delphine (pesenti.delphine@ch-avignon.fr)**LABORATOIRE BIOMNIS :**

VIROLOGUE :

JACOMO Véronique (veronique.jacomo@biomnis.com)**MARTINIQUE :**

CPDPN :

GUENERET Michèle (michele.gueneret@chu-fortdefrance.fr)SCHAUB Bruno (bruno.schaub@chu-fortdefrance.fr)

VIROLOGUES :

CESAIRE Raymond (raymond.cesaire@chu-fortdefrance.fr)NAJIULLAH Fatiha (Fatiha.NAJIULLAH@chu-martinique.fr)**GUADELOUPE :**

CPDPN :

JANKY Eustase (eustase.janky@chu-guadeloupe.fr)

VIROLOGUE :

HERMANN Cécile (cecile.hermann@chu-guadeloupe.fr)**LA REUNION :**

CPDPN :

KAUFFMANN Edouard (edouard.kauffmann@chu-reunion.fr)LAFFITTE Annick (annick.laffitte@chu-reunion.fr)DORAY Bérénice (berenice.doray@chu-reunion.fr)

VIROLOGUES :

ROQUEBERT Bénédicte (benedicte.roquebert@chu-reunion.fr)**NOUVELLE CALEDONIE :**

CPDPN :

sec.gynecoc@cht.nc

VIROLOGUE :

GOURINAT Ann-Claire (Ann-claire.gourinat@cht.nc)

POLYNESIE FRANCAISE :

VIROLOGUE :

LASTERE Stéphane (stephane.lastere@cht.pf)

3.1 Permanence du CNR¹

- 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

3.2 Autorisations MOT²

- Sans objet

3.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale

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

3.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo

3.5 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)

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

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.

Comparaison de la trousse Realstar® CMV PCR Kit (Altona Diagnostics) avec la trousse CMV R-gene®™ (bioMérieux) pour la quantification du CMV dans différentes matrices

M. Gomes-Mayeras^{1,2}, S. Hantz^{1,2}, S. Alain^{1,2}

¹CNR Herpesvirus, Laboratoire de bactériologie-virologie-hygiène, CHU de Limoges, ²UMR 1092, Faculté de médecine, Université de Limoges, Limoges, France
sophie.alain@unilim.fr / 05 55 05 67 28

Objectifs

La quantification du génome du cytomégalovirus (CMV) est un outil essentiel pour la surveillance de l'infection à CMV chez les immunodéprimés. L'harmonisation des résultats, indispensable pour définir des variations cliniquement significatives ou des valeurs seuil, nécessite une expression des charges virales (CV) en UI/mL. Néanmoins, des différences persistent, en partie liées à l'utilisation de différentes méthodes d'extraction mais aussi aux performances des trouses. Il est donc nécessaire de comparer les nouvelles trouses aux trouses de référence. Nous avons ici comparé les performances en UI/mL de la trousse Realstar® CMV PCR Kit (Altona Diagnostics) à notre trousse de référence CMV R-gene®™ (bioMérieux) sur sang total et plasma.

Matériaux

- ✓ Contrôle qualité sang total QCMD (2015): valeurs attendues 1,9 à 3,4 log₁₀ UI/mL
- ✓ Standard NATtrol™ Cytomégalovirus Zeptometrix dilué en sang total (souche de référence AD169), dilué de 4,5 log₁₀ à 1 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)

Méthodes

Extraction : Nuclisens EasyMag® bioMérieux (Protocole Specific B et Viral whole blood, 50µL elution)

PCR CMV R-gene® (bioMérieux)

- ✓ Technologie Taqman
- ✓ Validée sang total, plasma, sérum, LCR, LBA, urines, biopsies, liquide amniotique
- ✓ 4 points de gamme
- ✓ Contrôle interne pour chaque échantillon exprimé en Ct
- ✓ Résultats exprimés en copies/mL et convertis en UI/mL en fonction du coefficient de corrélation calculé pour chaque matrice selon la méthode des moyennes géométriques du CNR CMV (Semenova et al., JCM 2016)

PCR Realstar® CMV PCR Kit (Altona Diagnostics)



Amplification: automate Altona Gene Q (bioMérieux)

RÉSULTATS

Programme QCMD 2015 CMV sang total (log UI/mL)

Values du consensus QCMD	Statut de l'échantillon	R-gene® bioMérieux	Realstar® CMV Altona
2,196	Educational	2,011	2,344
2,877	Core	2,950	2,674
2,829	Core	3,133	2,785
Négatif	Core	ND	ND
2,882	Core	3,110	3,498
2,457	Educational	2,648	2,549
1,942	Educational	ND	ND
3,449	Core	3,763	3,645
Négatif	Core	ND	ND
2,771	Core	ND	2,851
			2,792

Standard Zeptometrix dilué en sang total

Les CV Altona et R-gene® diffèrent en moyenne de $0,26 \pm 0,10 \log_{10}$ et respectivement de $0,36 \pm 0,10$ et $0,63 \pm 0,12 \log_{10}$ avec la valeur attendue.

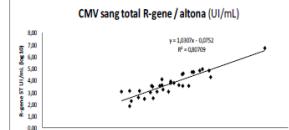
La limite de détection est de $3,0 \log_{10}$ UI/mL pour Altona ($LOD_{95} = 124,5 \text{ UI/mL}$) et $2,5 \log_{10}$ UI/mL pour R-gene® ($LOD_{95} = 150 \text{ UI/mL}$).

Comparaison des échantillons cliniques R-gene® vs Realstar® CMV par matrice

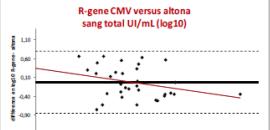
Sang total

37	Altona WB +	Altona WB -
R-gene® WB +	33	1
R-gene® WB -	0	3

CMV sang total R-gene®/altona (UI/mL)



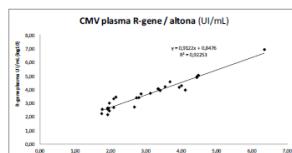
R-gene® CMV versus altona sang total UI/mL (log10)



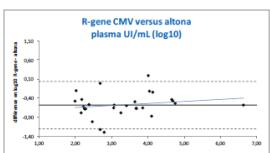
Plasma

37	Altona +	Altona -
R-gene® +	28	0
R-gene® -	4	5

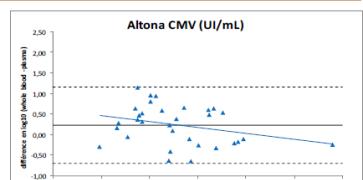
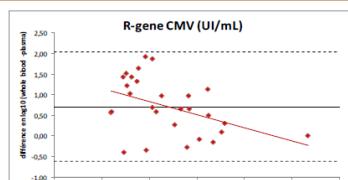
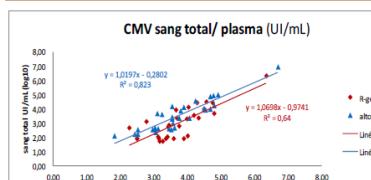
CMV plasma R-gene®/altona (UI/mL)



R-gene® CMV versus altona plasma UI/mL (log10)



Comparaison sang total/plasma pour les 2 PCR



CONCLUSION

La très bonne corrélation entre les trouses Realstar® Altona Diagnostics et CMV R-gene® après extraction sur l'automate EasyMag (bioMérieux) permet d'envisager, grâce à l'adoption des valeurs de CV en UI/mL, une utilisation des résultats issus de ces deux trouses dans des essais cliniques multicentriques ou pour la surveillance des patients. Ces données doivent être confirmées par la comparaison des cinétiques virales chez les patients transplantés.

Remerciements: Société Altona pour la fourniture des réactifs

