



HAL
open science

Diagnostic prénatal de l'infection congénitale à CMV au CHU de Bordeaux : validation d'une nouvelle méthode de PCR en temps réel dans le liquide amniotique

Hélène Frech

► **To cite this version:**

Hélène Frech. Diagnostic prénatal de l'infection congénitale à CMV au CHU de Bordeaux : validation d'une nouvelle méthode de PCR en temps réel dans le liquide amniotique. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01016600

HAL Id: dumas-01016600

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01016600>

Submitted on 30 Jun 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Bordeaux 2 – Victor Segalen
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2014

N° 35

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
Par M^{elle} FRECH Hélène, Marie, Denise, Halley
Née le 25 Juin 1986 à Blois (41)

Le 30 Avril 2014 à Bordeaux

Diagnostic prénatal de l'infection congénitale à CMV au
CHU de Bordeaux :
Validation d'une nouvelle méthode de PCR en temps réel
dans le liquide amniotique

Directeur de thèse
Mme le Docteur Isabelle GARRIGUE MCU-PH

Jury

Mme le Professeur Véronique DUBOIS PU-PH	Président
Mme le Professeur Marie-Edith LAFON PU-PH	Membre
Mr le Professeur Robert SAURA PU-PH	Membre
Mme le Docteur Isabelle GARRIGUE MCU-PH	Directeur

Au président du jury,

Madame le Professeur Véronique Dubois

Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Laboratoire de Bactériologie
Hôpital Pellegrin
CHU Bordeaux

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de présider ce jury. Je vous remercie pour votre disponibilité et l'enseignement que vous m'avez fourni. Veuillez recevoir mes sincères remerciements et soyez assurée de mon plus profond respect.

A mon directeur de thèse,

Madame le Docteur Isabelle Garrigue

Maître de Conférence Universitaire
Praticien Hospitalier
Laboratoire de Virologie
Hôpital Pellegrin
CHU Bordeaux

Merci Isabelle de m'avoir proposé ce sujet et de m'avoir encadrée pour la réalisation de ce travail. Merci pour ta grande disponibilité, ta gentillesse, ta pédagogie et ton soutien, tout au long de ces quatre années d'internat. Ce fut un plaisir de travailler ensemble. Sois assurée de toute ma reconnaissance.

Aux membres du jury,

Madame le Professeur Marie-Edith Lafon

Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Laboratoire de Virologie
Hôpital Pellegrin
CHU Bordeaux

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre aide au quotidien et votre confiance. Merci pour ces six mois de stage d'interne à vos côtés et soyez assurée de mon plus profond respect.

Monsieur le Professeur Saura

Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Service de Génétique Médicale, Pôle Pédiatrie
Hôpital Pellegrin
CHU Bordeaux

*Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de faire partie de ce jury.
Veuillez recevoir mes sincères remerciements et soyez assuré de mon plus profond respect.*

Merci aux techniciens de Virologie du CHU de Bordeaux, sans vous ce travail n'aurait pu aboutir.

Merci aux membres du groupe de travail DPN : Brigitte T, Estelle M, Isabelle A, Emmanuelle C, Véronique B. Nos petites réunions me manquent déjà. J'espère que notre travail portera ses fruits et que bientôt le laboratoire recevra l'autorisation au DPN.

Merci en particulier à Simon P : je suis ravie d'avoir travaillé avec toi sur ce projet, je n'aurais pu espérer mieux.

Merci à la société Roche Diagnostics et ses représentants de nous avoir fourni les trousseaux pour la réalisation des essais.

Merci à tous mes chefs pour votre enseignement, votre disponibilité, merci de m'avoir guidée pendant ces quatre années d'internat :

Merci à Aurélie B, Vanessa A, et Somar K, pour votre patience et pour avoir été des assistants géniaux.

Merci à Valérie D, Pierre F, Stéphanie D et Maguy M, j'ai beaucoup appris grâce à vous durant mes stages d'hématologie. Merci de m'avoir fait confiance et donné confiance en moi.

Merci à Marianne LV et Véronique AF de m'avoir si bien accueillie à l'hôpital Necker. Merci pour votre enseignement, votre gentillesse et vos très bons conseils.

*A mes amis, pour les moments incroyables passés avec vous,
et tout ce qui nous reste à vivre.*

*Alla mia famiglia,
perchè non sono niente senza di voi.*

A Jean-Vincent

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES	11
LEXIQUE QUALITE.....	12
INTRODUCTION	15
GENERALITES	16
1. Généralités sur le Cytomégalovirus.....	16
1.1. Le Cytomégalovirus.....	16
1.1.1. Classification.....	16
1.1.2. Structure	17
1.1.3. Cycle de réplication virale	19
1.1.4. Physiopathologie.....	21
1.2. Epidémiologie	22
1.3. Infections à CMV	23
1.3.1. Chez l'immunocompétent	23
1.3.2. Chez l'immunodéprimé	24
1.3.3. Chez la femme enceinte et le nouveau-né	25
1.4. Diagnostic biologique.....	25
1.4.1. Diagnostic indirect.....	25
1.4.2. Diagnostic direct	26
1.4.3. Modalités de réalisation du diagnostic.....	28
1.5. Traitement de l'infection à CMV.....	29
2. Infection congénitale à CMV.....	32
2.1. Epidémiologie	32
2.2. Pathogénèse.....	34
2.3. L'infection à CMV et la femme enceinte	35
2.3.1. Infection maternelle.....	35
2.3.2. Infection fœtale	35
2.3.3. Infection congénitale chez le nouveau-né.....	37
2.4. Diagnostic CMV congénital.....	38
2.4.1. Circonstances du diagnostic	38
2.4.2. Outils diagnostiques.....	38
2.5. Prévention.....	43
2.6. Pronostic.....	46
2.7. Prise en charge thérapeutique de l'infection.....	48
2.7.1. Chez la femme enceinte	48
2.7.2. Chez le nouveau-né et l'enfant	49
3. Accréditation des laboratoires et réglementation du diagnostic prénatal	50
3.1. Management de la qualité dans les laboratoires	50
3.2. Diagnostic prénatal : réglementation en vigueur	51
OBJECTIFS.....	54
MATERIEL ET METHODES.....	55
1. Echantillons	55
2. Extraction des acides nucléiques	55
3. Amplification des acides nucléiques	57
3.1. Principe.....	57
3.1.1. PCR	57
3.1.2. PCR temps réel.....	59
3.2. Quantification.....	61
3.3. Matériel utilisé.....	63
4. Processus de Choix et Validation de la méthode	64
RESULTATS	66
1. Expression du besoin initial	66
2. Choix de la méthode.....	66

3. Analyse d'impact de la mise en place de la nouvelle méthode	66
4. Méthode fournisseur ou maison ?	67
5. Validation de méthode	68
5.1. Description du processus analytique	68
5.2. Définitions	69
5.3. Critères de performance attendus	70
5.4. Analyse et identification des points critiques	71
5.5. Choix de la portée d'accréditation	71
5.6. Plan d'expérience et exploitation statistique	72
5.6.1. Performances de quantification	72
5.6.2. Spécificité analytique	74
5.6.3. Stabilité	75
5.6.4. Comparaison à une autre méthode	77
5.7. Conclusion sur l'aptitude initiale de la méthode.....	77
5.8. Estimation de l'incertitude de mesure et analyse du risque résiduel	78
5.9. Eléments de validation continue (suivi des performances de la méthode).....	79
5.10. Documents de sortie	80
6. Mise en place de la méthode en routine	81
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	82
CONCLUSION.....	88
BIBLIOGRAPHIE	89
ANNEXES	93

LISTE DES ABREVIATIONS

Abs	Absorbance
Ac	Anticorps
ACV	Acyclovir
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
ALAT	Alanine Amino Transférase
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et Evaluation en Santé
ARN	Acide ribonucléique
CD	Cluster de différenciation
CDV	Cidofovir
CE	Conformité européenne
CHU	Centre hospitalo-universitaire
CMV	Cytomégalovirus humain
CNR	Centre national de référence
COFRAC	Comité Français d'Accréditation
Cop/ml	Copies/ml
CQI	Contrôle qualité interne
CSP	Code de la Santé Publique
CSH	Cellule souche hématopoïétique
Ct	Cycle threshold (Cycle seuil)
CV	Coefficient de variation
dNTP	Désoxy-nucléotides triphosphate
dGTP	Désoxy-guanine triphosphate
dATP	Désoxy-adénine triphosphate
dTTP	Désoxy-thymine triphosphate
dCTP	Désoxy-cytosine triphosphate
DPN	Diagnostic prénatal
E	Early
ECP	Effet cytopathique
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EEQ	Evaluation externe de la qualité
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FN	Faux négatif
FP	Faux positif
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
gB, gL, gH, gO	Glycoprotéines B, L, H et O
GCV	Ganciclovir
IC	Contrôle interne
IE	Immediate Early
Ig	Immunoglobuline
IMG	Interruption médicale de grossesse
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IV	Intra-veineux
IVG	Interruption volontaire de grossesse
L	Late
LA	Liquide amniotique
LBA	Liquide broncho-alvéolaire
LBM	Laboratoire de Biologie Médicale
LCR	Liquide céphalo-rachidien
NA	Nucleic Acide (Acide nucléique)

NF EN ISO	Norme internationale (ISO : International Standard Organisation), Européenne (EN : European Norme) et Française (NF : Norme Française)
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Open Reading Fram (cadre de lecture)
pb	Paires de bases
PFA	Foscarnet
PI	Primo-infection
PNN	Polynucléaire neutrophile
pp65	Phosphoprotéine 65
PCR	Polymerase chain reaction
PTBM	Plateau technique de biologie moléculaire
RAQ	Référent Assurance Qualité
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RLU	Relative Light Unit (Unité relative de lumière)
SA	Semaines d'aménorrhées
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
TaqPol	Taq polymérase
Tm	Melting Temperature (Température de fusion)
UL	Unique long
US	Unique short
UI	Unité Internationale
VACV	Valacyclovir
VGCV	Valganciclovir
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique des <i>Herpesviridae</i> d'après la séquence de l'ADN polymérase	17
Figure 2 : Structure du virion du Cytomégalovirus	19
Figure 3 : Cycle de réplication du Cytomégalovirus	21
Figure 4 : Effet cytopathique, observé à l'état frais, du cytomégalovirus sur cellules MRC5	27
Figure 5 : Antigénémie pp65, microscope grossissement x1000	27
Figure 6 : Effet cytopathique du Cytomégalovirus sur une coupe tissulaire	28
Figure 7 : Antiviraux anti-Cytomégalovirus	29
Figure 8 : Mode d'action des anti-herpesvirus	31
Figure 9 : Distribution des charges virales CMV (HCMV DNA) dans le LA des fœtus infectés symptomatiques (Groupe A) et des fœtus infectés asymptomatiques (Groupe B)	47
Figure 10 : Corrélation entre la charge virale CMV (HCMV DNA) et l'âge gestationnel au moment de l'amniocentèse, dans le groupe des fœtus infectés avec anomalies échographiques	47
Figure 11 : Principe de l'extraction MagNA Pure 96 utilisant des billes magnétiques	56
Figure 12 : Etapes de la PCR	58
Figure 13 : Courbes d'amplification de PCR en temps réel	59
Figure 14 : Principe FRET	61
Figure 15 : Détermination de la courbe d'étalonnage en PCR en temps réel	62
Figure 16 : Logigramme Processus analytique de la PCR CMV dans le LA	68
Tableau 1 : Spécificité et sensibilité diagnostiques des deux techniques (culture virale et PCR) dans le LA	

LEXIQUE QUALITE

Acceptabilité (critères d') : critères selon lesquels les performances d'une technique sont jugées satisfaisantes dans les conditions d'emploi définies par l'utilisateur (ces critères s'appuient en particulier sur les concepts d'imprécision, d'inexactitude et d'erreur totale acceptable).

Accréditation : reconnaissance par un organisme faisant autorité de la compétence d'un organisme à réaliser des activités spécifiées d'évaluation de la conformité.

Adapter une méthode : intégrer dans la portée d'accréditation une méthode reconnue (méthode normalisée, méthodes/équipements/réactifs « fournisseur » ...).

Biais : estimation de l'erreur de justesse.

Contamination : introduction d'un composant dans un mélange réactionnel auquel il n'appartient pas.

Contrôle de qualité :

Contrôle interne de qualité (CIQ) : réalisé au sein du laboratoire à l'aide d'échantillons de contrôles lors de la mesure d'échantillons biologiques de patients pour vérifier la maîtrise du processus analytique. L'interprétation se fera en fonction de limites de tolérance déterminées selon un protocole préétabli.

Evaluation externe de la qualité (EEQ): procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire par le biais d'une comparaison inter laboratoires réalisée par un organisateur respectant substantiellement les exigences de l'ISO 43-1₁ (cf. § 5.6.4) et la réglementation en vigueur à l'aide d'échantillon de contrôles inconnus.

Critère de performance : paramètre caractérisant la procédure analytique (linéarité, fidélité, justesse...)

Criticité : ayant un impact sur la qualité du résultat et sur son interprétation et la prise en charge du patient.

Développer une méthode : méthode modifiée et validée pour l'ajuster aux besoins du LBM/du client (patient/prescripteur).

Éléments de suivi : éléments mis en place dans la méthode permettant la maîtrise du suivi du processus analytique (exploitation des CIQ et EEQ à l'aide des cartes de contrôle...).

Exactitude : étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande.

Fidélité : étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées.

Justesse : étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

Incertitude de mesure : paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées.

Matrice : milieu dans lequel se trouve l'analyte.

Mesurande : grandeur que l'on veut mesurer.

Méthode fournisseur : méthode reconnue correspondant à l'utilisation des Dispositifs Médicaux de Diagnostic in Vitro, marquée Conformité Européenne « CE ».

Norme NF EN ISO 15189 version 2012 : norme internationale (ISO : International Standard Organisation), Européenne (EN : European Norme) et Française (NF : Norme Française) publiée par l'ISO en 2012 qui spécifie les exigences de qualité et de compétence propres aux laboratoires de biologie médicale.

Plan d'expérience : suite ordonnée d'essais d'une expérimentation, chacune permettant d'acquérir de nouvelles connaissances en contrôlant un ou plusieurs paramètres d'entrée pour obtenir des résultats validant un modèle avec une bonne économie (nombre d'essais le plus faible possible, par exemple).

Portée d'accréditation : énoncé formel et précis des activités pour lesquelles le LBM demande l'accréditation ou est accrédité.

Portée flexible standard (portée A) : portée correspondant à une demande d'accréditation du LBM souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, d'utiliser sous accréditation les révisions successives des méthodes reconnues et d'adopter des méthodes reconnues reposant sur des compétences techniques qu'il a précédemment démontrées.

Portée flexible étendue (portée B) : portée correspondant à une demande d'accréditation du LBM souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, de mettre en œuvre sous accréditation, des méthodes qu'il a adaptées ou développées.

Processus : ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforme des éléments d'entrée en éléments de sortie avec une valeur ajoutée.

Procédure : la procédure est la manière spécifiée d'effectuer une activité ou un processus. Elle représente la manière de mettre en œuvre tout ou partie d'un processus et est reproductible. Le processus représente le Quoi ?, la procédure représente le Qui fait Quoi ?, Où ? Quand ? Comment ? Combien ? et Pourquoi.

Répétabilité : fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité. Condition de répétabilité = condition de mesurage dans un ensemble de conditions identiques.

Reproductibilité : fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de reproductibilité. Condition de reproductibilité = condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires.

Sensibilité analytique : quotient de la variation d'une indication de mesure par la variation correspondante de la valeur de la grandeur mesurée

Sensibilité diagnostique : la probabilité qu'un dispositif donne un résultat positif en présence du marqueur cible.

Spécificité analytique : capacité d'un système de mesure, utilisant une procédure de mesure spécifiée, à produire des résultats de mesure, pour un ou plusieurs mesurandes, qui

ne dépendent ni les uns des autres ni de toute autre grandeur dans le système soumis au mesurage.

Spécificité diagnostique : aptitude d'une procédure d'analyse de diagnostic *in vitro* à reconnaître l'absence d'un marqueur cible associé à une maladie particulière ou à un état particulier.

Validation de méthode : confirmation par des preuves tangibles que les exigences pour une utilisation spécifique ou une application prévue ont été satisfaites. La validation est initiale puis continue dans le temps.

Validation biologique : opération permettant d'assurer qu'un résultat a été obtenu dans des conditions techniques satisfaisantes et que celui-ci est compatible avec le dossier biologique du patient. C'est le contrôle de la vraisemblance et de la cohérence de l'ensemble des résultats d'analyse d'un même dossier et leur confrontation avec les résultats antérieurs.

Vérification de méthode : Confirmation par des preuves tangibles que les exigences spécifiées ont été satisfaites.

INTRODUCTION

Le Cytomégalovirus humain (CMV) est la première cause d'infection congénitale en France avec une prévalence estimée de 0,5 à 1 % de nouveaux-nés infectés lors de la grossesse. Ce virus de la famille des *Herpesviridae*, ubiquitaire et endémique, est responsable de malformations congénitales et retard mental, et représente la première cause de surdité d'origine non génétique. Il s'agit d'un véritable problème de santé publique.

Le diagnostic de cette infection congénitale est envisagé lors de signes échographiques fœtaux évocateurs ou lors d'une suspicion de primo-infection maternelle. Il repose sur différentes analyses : sérologie maternelle en premier lieu, diagnostic prénatal par recherche du virus dans les prélèvements fœtaux, et diagnostic de confirmation chez le nouveau-né.

La recherche directe de l'ADN (acide désoxyribonucléique) viral par PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel dans le liquide amniotique est un examen de choix dans cette démarche diagnostique. En raison de l'importance du résultat et des conséquences pouvant en découler, une réglementation particulière s'applique.

Après une mise en revue bibliographique des techniques de diagnostic du CMV et des données actuelles sur l'infection congénitale, l'objectif de notre travail est la validation et la mise en place d'une méthode de diagnostic prénatal avec une nouvelle trousse commerciale au laboratoire de Virologie du Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, en respectant les exigences de la norme NF EN ISO 15189 version 2012 et les obligations réglementaires auxquelles est soumis tout examen de diagnostic prénatal.

GENERALITES

1. Généralités sur le Cytomégalovirus

1.1. Le Cytomégalovirus

Le cytomégalovirus humain (CMV) est un virus à ADN, à capsidie icosaédrique et enveloppé, appartenant à la famille des *Herpesviridae*. Son nom tient de Weller *et al.* qui l'ont ainsi qualifié pour l'effet cytopathique qu'il induit et son rôle dans la maladies des inclusions cytomégaliques du nouveau-né (WELLER *et al.*, 1960).

1.1.1. Classification

La famille des *Herpesviridae* comporte aujourd'hui plus de 130 herpèsvirus connus, dont neuf présentent un intérêt en pathologie humaine. Ils sont classés en trois sous-familles et genres selon une analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques et leur tropisme cellulaire (Figure 1).

- *Alphaherpesvirinae* :

- Genre *Simplexvirus* : herpès simplex de type 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2)
- Genre *Varicellovirus* : virus de la varicelle et du zona (VZV)

- *Bétaherpesvirinae* :

- Genre *Cytomégalovirus* : cytomégalovirus (CMV)
- Genre *Roseolovirus* : herpèsvirus humains 6A, 6B et 7 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7) (Ablashi *et al.*, 2013)

- *Gammaherpesvirinae* :

- Genre *Lymphocryptovirus* : virus Epstein-Barr (EBV)
- Genre *Rhadinovirus* : 8e herpèsvirus humain (HHV-8)

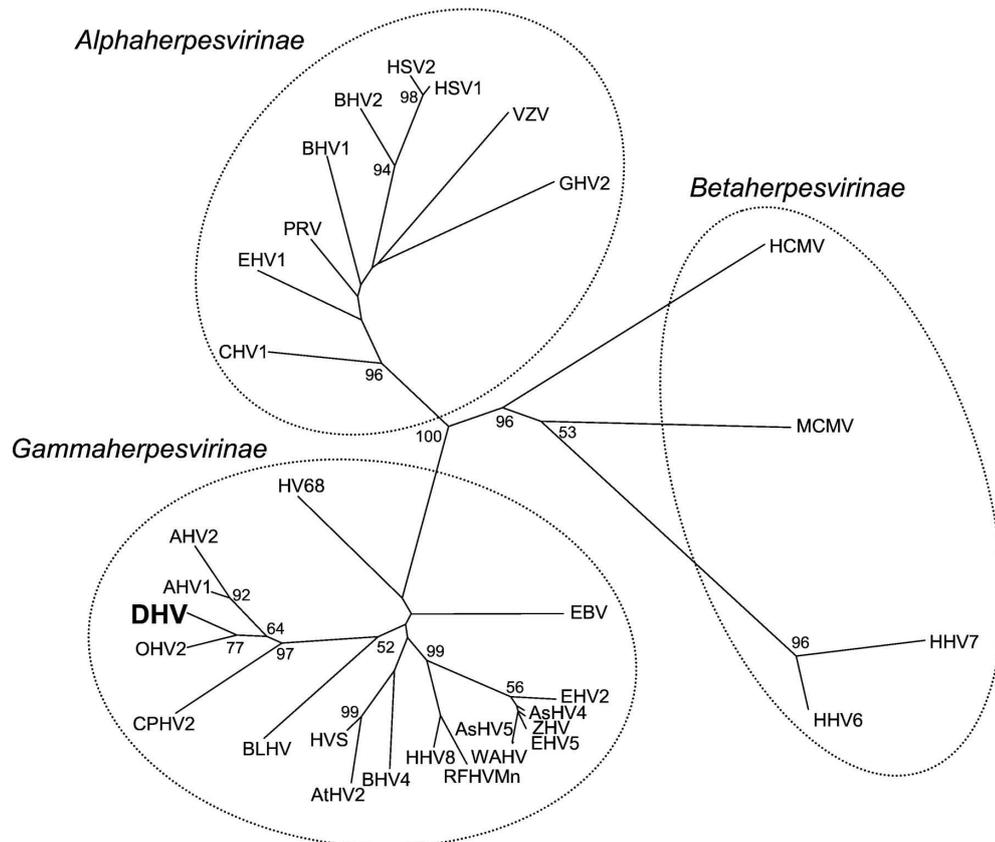


Figure 1 : Arbre phylogénétique des *Herpesviridae* d'après la séquence de l'ADN polymérase (Kleiboeker *et al.*, 2002)

1.1.2. Structure

Le CMV est un virus de grande taille (150 et 200 nm de diamètre). Le virion (particule virale) est divisé structurellement en trois parties : la capsid, structure la plus interne qui contient le génome viral, le téguent et l'enveloppe qui recouvre l'ensemble (Figure 2) (Landolfo *et al.*, 2003).

Le génome viral est un ADN double brin d'environ 230 kpb (kilo paires de bases), le plus grand de tous les herpèsvirus et certainement l'un des plus longs de tous les virus humains connus. Il est composé de deux séquences uniques et réversibles, une longue et l'autre courte (« UL » Unique Long, « US » Unique Short) et de séquences répétées, le tout codant pour 225 cadres de lecture (ORF : Open reading frame) d'environ 100 acides aminés ou plus (Cha *et al.*, 1996).

La capsid, de nature protéique, est composée de 162 capsomères (sous-unités) arrangés selon une symétrie icosaédrique. Les capsomères sont constitués des protéines UL86 (Major Capsid Protein), UL48-49 (Smallest Capsid Protein), UL85 (Minor Capsid Protein), UL46 (minor Capsid Binding Protein) et UL-80. Ils s'auto-assemblent pour former la capsid qui contient une copie de l'ADN viral double brin (Britt and Boppana, 2004) (Landolfo *et al.*, 2003).

Le tégment est un ensemble amorphe de protéines, complexe et hétérogène sans structure définie, maintenant la cohésion du virion entre la capsid et l'enveloppe. On estime qu'il existe environ 25 protéines différentes ayant une fonction structurale, un rôle dans l'assemblage de la particule virale ou encore des fonctions régulatrices comme l'accélération de la réplication virale ou la facilitation de la sortie nucléaire de la capsid contenant l'ADN viral.

Le tégment contient les protéines les plus immunogènes du virion qui sont les cibles des Anticorps (Ac) et de la réponse lymphocytaire T. La phosphoprotéine pp65 est la protéine du tégment la plus abondante (Britt and Boppana, 2004).

L'enveloppe dérive des membranes intra-cellulaires (nucléaire et cytoplasmique) de la cellule hôte : il s'agit une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées différentes glycoprotéines virales regroupées sous formes de complexes glycoprotéiques. Ces glycoprotéines sont nombreuses, leur rôle et structure ne sont pas tous déterminés. Les glycoprotéines gB (Glycoprotein Complexe I), gL, gH, et gO (Glycoprotein Complexe III) sont indispensables à la production de particules virales infectantes par leur rôle d'attachement à la cellule hôte, la fusion et la pénétration dans le cytoplasme (Britt and Boppana, 2004).

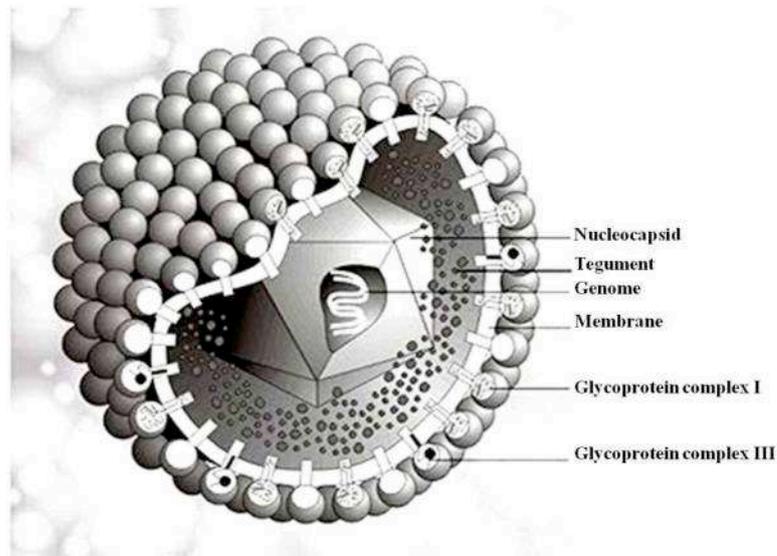


Figure 2 : Structure du virion du Cytomégalovirus
(Dr Marko Reschke, Marburg, Germany)

1.1.3. Cycle de réplication virale

Le CMV humain possède un tropisme cellulaire très large, avec la capacité d'infecter de nombreux organes. On a pu retrouver le génome du CMV dans différents types cellulaires comme les cellules fibroblastiques, endothéliales, épithéliales, les monocytes/macrophages, les lymphocytes, les cellules musculaires lisses, les progéniteurs médullaires, les granulocytes, les cellules dendritiques (Bissinger *et al.*, 2002).

L'entrée du virus dans la cellule hôte est permise par la liaison des glycoprotéines de surface à différents récepteurs cellulaires. La fixation est tout d'abord non spécifique par interaction avec l'héparane-sulfate, l'annexine II ou la β 2-microglobuline. Ensuite le virus se fixe spécifiquement par l'intermédiaire des récepteurs cellulaires. Cette étape est rapidement suivie par la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire, puis la pénétration de la capsid dans le cytoplasme. Grâce au système des microtubules, la capsid est acheminée jusqu'à un pore nucléaire. L'ADN viral alors libéré est transloqué dans le noyau pour subir la transcription en ARN viral et enfin sa traduction protéique dans le cytoplasme cellulaire (Landolfo *et al.*, 2003).

La multiplication virale est organisée selon une cascade de trois phases ordonnées successives : très précoce ou alpha (ou IE pour Immediate Early, 0 à 2 heures), précoce

béta (E, Early, <24 heures), tardive gamma (L, Late, >24 heures), chaque étape contrôlant la progression vers l'étape suivante (Figure 3) (Mocarski, 1988).

La phase très précoce est favorisée par la phosphoprotéine UL82 du tégument, et débute par l'expression des gènes alpha codant entre autres les protéines régulatrices IE1 et IE2 (Immediate Early).

L'étape suivante consiste en l'expression des gènes précoces béta, et la synthèse de protéines enzymatiques nécessaires à la réplication de l'ADN viral : ADN polymérase virale, phosphotransférase, alkaline exonucléase, ribonucléotide réductase, DNase, hélicase et d'autres enzymes impliquées dans la réplication. Quelques protéines structurales sont également synthétisées lors de cette phase précoce. A cette étape commence la réplication du génome viral.

La dernière série des gènes viraux (gènes gamma ou tardifs) est exprimée environ 24 heures après l'infection. Ces gènes codent pour les protéines structurales nécessaires au pouvoir infectieux du virion, notamment les protéines majeures et mineures de la capsid.

L'encapsidation de l'ADN viral a lieu dans le noyau, les protéines du tégument s'associent à la capsid, certaines dans le compartiment nucléaire, d'autres lorsque la capsid est en progression dans le cytoplasme. Enfin, l'enveloppe et les glycoprotéines virales sont acquises au niveau de l'ergastoplasme et/ou de l'appareil de Golgi. Le virion néo-formé sort de la cellule par exocytose.

Le cycle de réplication du CMV est lent ; la libération des nouveaux virions commence à partir de 48 à 72h après l'entrée du virus dans la cellule. La quantité libérée est maximale en 72 à 96 heures. La mort cellulaire intervient 4 ou 5 jours après l'infection (Tandon and Mocarski, 2012).

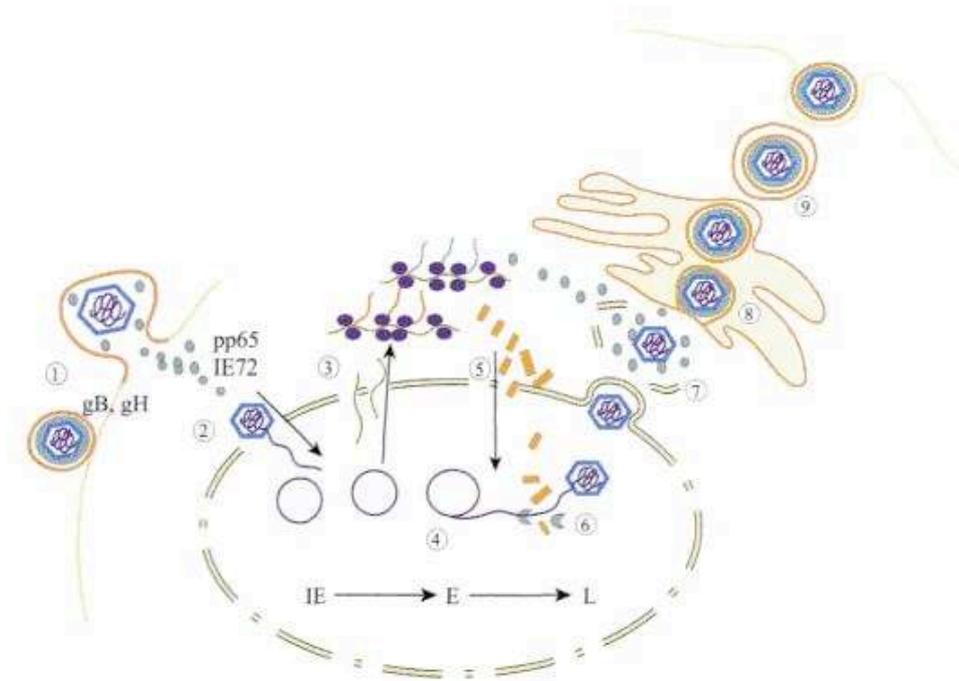


Figure 3 : Cycle de réplication du Cytomégalovirus
(Huraux, 2003)

1.1.4. Physiopathologie

Comme tous les virus de la famille des *Herpesviridae*, la physiologie est caractéristique avec une primo-infection suivie d'une persistance du virus à vie sous forme latente, et la possibilité de réactivations.

Lors de la primo-infection, le virus pénètre dans différents types cellulaires. Le tropisme est très large, l'héparane-sulfate étant présent sur de nombreuses cellules. Dans les cellules dites permissives, le virus entame un cycle de réplication intense, et aboutit à la production de particules virales infectantes. Les cellules permissives sont les cellules différenciées : cellules épithéliales, cellules endothéliales, et macrophages (dérivant des monocytes). Une importante virémie permet la dissémination du virus dans les tissus par l'intermédiaire des monocytes/macrophages, polynucléaires neutrophiles, cellules endothéliales (trophoblastes chez la femme enceinte). Il en résulte une excrétion du virus dans les fluides biologiques (Landolfo *et al.*, 2003).

La plupart des tissus peuvent subir les effets délétères cytopathiques et lytiques du CMV : foie, rein, poumons, etc.

La virémie chez les patients immunocompétents se négative quelques mois après la primo-infection. Le virus est retrouvé dans les urines pendant une période supérieure à 6 mois en général (Arora *et al.*, 2010).

Après cette phase de primo-infection, le virus persiste sous forme latente. La latence est définie comme la persistance du génome viral en l'absence de production de nouvelles particules virales infectantes, mais avec la capacité de réactiver le génome viral dans certaines conditions.

Le génome viral, sous forme épisomale, reste présent dans les cellules myéloïdes immatures CD34+ de la moelle osseuse, les monocytes circulants et les cellules endothéliales (Jarvis and Nelson, 2002). De l'ADN viral est ainsi détectable dans les cellules mononucléées issues du sang périphérique ou de moelle de donneurs sains séropositifs pour le CMV, en l'absence de cycles complets de réplication virale.

La réactivation se caractérise par la reprise du cycle viral avec la synthèse des protéines virales précoces et tardives, et la libération de particules virales infectantes, selon une fréquence variable et par intermittence. Les facteurs favorisant la réactivation sont complexes. On sait qu'une baisse de l'immunité cellulaire est impliquée dans ce mécanisme.

1.2. Epidémiologie

Le CMV humain est un virus ubiquitaire, évoluant sur un mode endémique, et dont le seul et unique réservoir est l'homme.

La séroprévalence varie de 40 à 100%. Elle augmente avec l'âge et dans les populations ayant un faible niveau socio-économique. En France, on retrouve des Immunoglobulines G (IgG) anti-CMV chez environ 50% de la population adulte (Landolfo *et al.*, 2003).

Lors des primo-infections et des réactivations, la réplication virale conduit à l'excrétion du virus dans différents fluides biologiques. Ces épisodes sont en général asymptomatiques. L'excrétion passe totalement inaperçue, ce qui participe activement à la propagation du virus. Les particules virales infectantes sont excrétées en grande quantité dans la salive, les larmes, les sécrétions génitales et nasales, les urines et permet la transmission d'un individu à un autre, par contact direct avec les sécrétions infectées ou indirectement via des objets contaminés.

Le virus infecte de manière naturelle et horizontale une grande partie de la population dès le plus jeune âge, avec 2 pics de contamination, chez les enfants en bas âge et chez les jeunes adultes. Les enfants entrent en contact très tôt avec le virus, dès l'entrée en collectivité (crèches, etc). En effet lors de cette période, les enfants se contaminent facilement les uns les autres par la proximité et l'échange d'objets contaminés (par de la salive par exemple). Le 2^{ème} pic de séroconversion a lieu au début de l'âge adulte, probablement dû à une transmission sexuelle. On note également des primo-infections fréquentes chez les femmes ayant un ou des enfants en bas âge en phase de primo-infection et excréant de grandes quantités de virus.

Les réactivations sont fréquentes, et les surinfections par une nouvelle souche virale sont possibles. Chez l'immunocompétent séropositif, le virus est retrouvé dans le sang chez 24% et dans les urines chez 39 % des individus à un moment donné, ce qui montre la fréquence des réactivations ou réinfections (Arora *et al.*, 2010).

Il existe un mode de transmission vertical de la mère à l'enfant par voie hématogène (lié à la virémie maternelle), lors de la primo-infection de la femme enceinte, ou lors d'infections secondaires, et également par l'allaitement maternel. (Ce point sera développé dans la partie 2 : CMV congénital.)

Enfin, la transmission peut être iatrogène. La transplantation d'organe d'un donneur séropositif à un receveur séronégatif (ou séropositif) est un mode de transmission du virus pouvant entraîner une primo-infection (ou une surinfection) lourde de conséquences chez un individu immunodéprimé. La transmission par don de sang est également possible, bien que largement diminuée par la déleucocytation des concentrés globulaires et l'ultrafiltration.

1.3. Infections à CMV

1.3.1. Chez l'immunocompétent

Chez un sujet immunocompétent, la primo-infection à CMV est généralement bénigne. Dans 90% des cas, elle est totalement asymptomatique. Dans les autres cas, la symptomatologie, après une période d'incubation de 2 à 4 semaines, est banale et non spécifique (syndrome pseudogrippal), si bien que la primo-infection à CMV n'est pas diagnostiquée la plupart du temps.

Cependant, dans quelques cas, elle est beaucoup plus bruyante. Cliniquement, on retrouve fièvre, céphalées, malaise, myalgies, arthralgies, toux, hépato-splénomégalie et adénopathies parfois, rarement rash ou érythème pharyngé. Biologiquement, on observe classiquement un syndrome mononucléosique avec une hyperlymphocytose constituée de lymphocytes hyperbasophiles, pouvant être associée à une thrombopénie et une élévation des transaminases hépatiques.

Enfin rarement, la primo-infection peut se compliquer avec l'atteinte de multiples organes : pneumopathie interstitielle, hépatite aiguë voire fulminante, méningo-encéphalite, myocardite, rétinite, anémie hémolytique...(Grangeot-Keros *et al.*, 2002)

Les réactivations et réinfections chez l'immunocompétent sont aussi le plus souvent inapparentes.

1.3.2. Chez l'immunodéprimé

Le CMV chez l'immunodéprimé est le premier pathogène viral opportuniste. La symptomatologie varie selon le degré d'immunodépression du patient. Les transplantés, greffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH), malades du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), patients traités par immunosuppresseurs et les sujets atteints de déficits immunitaires congénitaux sont susceptibles de développer des atteintes d'organes multiples, entraînant une forte morbidité et mortalité. La primo-infection est redoutable, et les réinfections ainsi que les réactivations sont potentiellement dangereuses.

L'infection à CMV chez l'immunodéprimé est définie comme la réplication virale sans signe clinique, à la différence de la maladie à CMV dans laquelle on retrouve une symptomatologie. La maladie à CMV peut se traduire par un « syndrome CMV » qui associe des signes généraux (fièvre, asthénie) et des signes biologiques (leuco-thrombopénie, cytolyse hépatique) ou par une « maladie invasive à CMV » avec localisation viscérale. Les atteintes préférentielles sont l'hépatite, la pancréatite et la colite chez le transplanté d'organe solide, la pneumopathie interstitielle chez le receveur de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou encore la rétinite et l'encéphalite dans le cadre de l'infection à VIH (virus de l'immunodéficience humaine) (Boutolleau and Burrel, 2011).

1.3.3. Chez la femme enceinte et le nouveau-né

L'infection à CMV chez la femme enceinte et le nouveau-né sera développée dans la seconde partie des généralités (2. Infection congénitale à CMV)

1.4. Diagnostic biologique

La symptomatologie de l'infection à CMV étant peu spécifique, le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence biologique de l'infection virale, de manière indirecte ou directe.

1.4.1. Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect de l'infection à CMV consiste en la mise en évidence d'Ac spécifiques présents dans le sérum du patient (IgG ou IgM), dirigés contre les antigènes (Ag) viraux (Mendelson *et al.*, 2006). La technique est basée sur un principe immuno-enzymatique, comme par exemple le test ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Lors d'une primo-infection, les IgM sont les premiers Ac à apparaître, suivis des IgG. Les IgG persistent toute la vie, et leur positivité signe la présence du virus dans l'organisme (forme active ou latente). Cependant, leur titre n'est en aucun cas indicatif de la date de survenue de la primo-infection. Les IgM disparaissent peu de temps après la primo-infection (dans les 3 mois en général).

La présence d'IgM peut être plus difficile à interpréter ; cela peut correspondre à une primo-infection récente, ou à d'autres situations dans lesquelles la recherche d'IgM est également positive :

- IgM persistantes à long terme après la primo-infection
- Réactivation
- Infection secondaire ou réinfection
- Réaction croisée avec d'autres IgM (lors de la primo infection à EBV, Parvovirus B19...)
- Stimulation non spécifique du système immunitaire

Le dosage des IgG et IgM spécifiques ne permet donc pas de déterminer la date de la primo-infection. En raison des difficultés rencontrées, une mesure de l'avidité des IgG peut être réalisée au laboratoire.

L'indice d'avidité des IgG représente la force de la liaison entre des Ag viraux (contenus dans le réactif) et les Ac (contenus dans le sérum du patient). L'avidité des IgG spécifiques s'accroît au cours de la réponse immunitaire : en début d'infection, l'indice sera faible, puis augmentera au fil du temps.

La détermination de l'indice d'avidité repose sur l'utilisation d'agents dénaturants dans les tests immunoenzymatiques. L'agent dénaturant (urée le plus souvent) perturbe la liaison Ag/Ac, et l'indice est ainsi calculé :

$$\text{Signal en présence d'agent dénaturant} / \text{Signal sans agent dénaturant}$$

L'indice d'avidité varie également en fonction des individus testés et des techniques utilisées (les cut-off sont différents d'une technique à l'autre et ne peuvent être comparés).

Avec la trousse VIDAS® CMV IgG Avidity II (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) utilisée au CHU de Bordeaux, il est admis qu'un indice <0,40 témoigne d'une infection récente (moins de 3 mois), et un indice élevé (cut-off >0,65) est en faveur d'une primo-infection de plus de 3 mois (Vauloup-Fellous *et al.*, 2013).

1.4.2. Diagnostic direct

Le diagnostic direct doit être privilégié chez le sujet immunodéprimé, chez lequel la réponse immunitaire est très perturbée. Les méthodes reposent sur la mise en évidence du virus par culture, détection d'Ag viraux, détection d'acides nucléiques ou examen anatomocytopathologique (Boutolleau and Burrel, 2011).

De nombreux types de prélèvements peuvent être analysés : sang total, liquide céphalo-rachidien (LCR), liquide amniotique (LA), biopsies, urine, liquide broncho-alvéolaire (LBA)...

Culture virale :

In vitro, le virus peut être isolé par une culture classique dans les fibroblastes humains (lignée MRC5 : cellules fibroblastiques de poumon embryonnaire humain, permissives pour le CMV). Un effet cytopathique (ECP) spécifique du virus (inclusions cytomégaliqes) est observé 2 à 3 semaines après l'infection des cellules (Figure 4).

La culture dite « rapide » associe une centrifugation de l'inoculum sur les fibroblastes et la détection par immunocytochimie, après 48 heures de culture, des Ag viraux très précoces synthétisés au cours du premier cycle de réplication. Même si la culture a été supplantée pour le diagnostic par d'autres techniques plus récentes, elle reste une méthode de référence et permet de conserver la souche virale (virions complets).

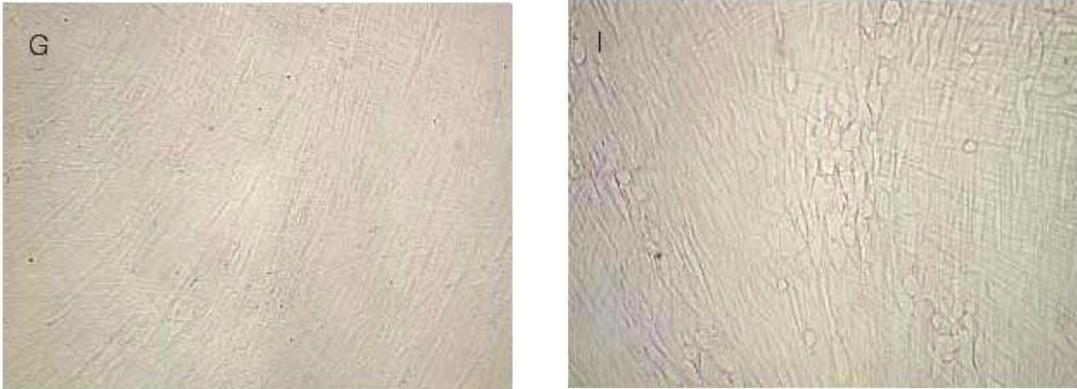


Figure 4 : Effet cytopathique, observé à l'état frais, du cytomegalovirus sur cellules MRC5 (G : contrôle ; I : ECP CMV) (Thouvenot *et al.*, 2004)

Antigénémie pp65 :

L'antigénémie CMV pp65 correspond à la détection de la présence de la phosphoprotéine pp65 (codée par le gène UL83) dans le noyau des polynucléaires neutrophiles, et est donc le reflet d'une virémie. Cette phosphoprotéine virale est captée par les polynucléaires circulants au contact des cellules endothéliales infectées. Les résultats semi-quantitatifs sont exprimés en nombre de cellules positives pour 2.10^5 leucocytes observés (Figure 5). Cette technique est sensible, facile, et relativement rapide. Mais elle est manuelle, non automatisable, contraignante du fait de l'obligation de traiter immédiatement les échantillons sanguins et subjective du fait de la lecture au microscope. De plus, l'antigénémie pp65 reste peu performante chez les patients neutropéniques (greffés de CSH par exemple).

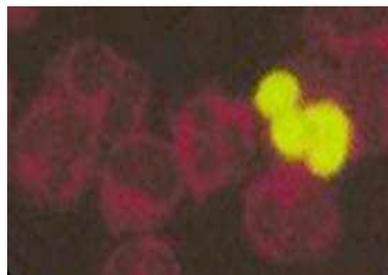


Figure 5 : Antigénémie pp65, microscope grossissement x1000 (Huraux, 2003)

Examen anatomo-cytopathologique des biopsies :

Un effet cytopathique caractéristique est observé dans les tissus infectés : cellule dite en « œil de hibou » (Figure 6). La spécificité et la sensibilité analytiques de cette technique sont grandement augmentées par l'utilisation d'Ac monoclonaux spécifiques marqués.

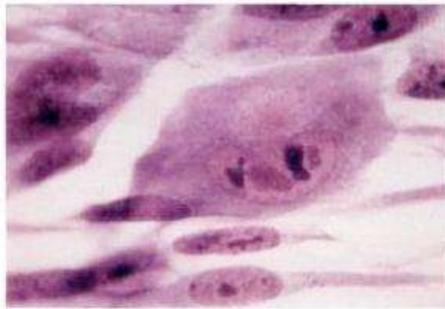


Figure 6 : Effet cytopathique du Cytomégalovirus sur une coupe tissulaire
(Huraux, 2003)

Détection du génome viral par PCR (Polymerase Chain Reaction) :

C'est la technique la plus sensible. Rapide, automatisable, et performante, il s'agit d'une méthode de choix pour le diagnostic et le suivi de l'infection à CMV.

L'avènement de la PCR en temps réel a permis de réduire considérablement le délai de rendu du résultat (quelques heures) et surtout de quantifier la charge virale en nombre de copies par ml (cop/ml) ou en Unités Internationales par ml (UI/ml), grâce à l'utilisation d'un standard OMS (Organisation mondiale de la santé) permettant une harmonisation du rendu de résultats.

A côté des techniques « maison » mises au point dans différents laboratoires, des trousse commerciales marquées « Conformité Européenne » (CE) ou non existent sur le marché.

1.4.3. Modalités de réalisation du diagnostic

La sérologie est réalisée chez un patient suspect de primo-infection ainsi que chez les receveurs / donneurs d'organes ou CSH afin de connaître leur statut sérologique en pré-greffe. Dans les cas où il est important de connaître la date de primo-infection (par exemple chez la femme enceinte), la sérologie sera complétée par la mesure de l'avidité des IgG.

La charge virale sanguine (PCR CMV dans le sang total prélevé sur anticoagulant EDTA) est l'examen de choix réalisé chez les patients immunodéprimés. Le suivi régulier de la charge virale permet la mise en évidence d'une primo-infection, d'une réactivation ou d'une surinfection, ainsi que le suivi de l'efficacité du traitement. La PCR réalisée dans d'autres prélèvements (biopsies intestinales, LBA, LA...) permet le diagnostic d'une maladie à CMV ou d'une infection congénitale.

1.5. Traitement de l'infection à CMV

A l'heure actuelle, cinq molécules sont disponibles sur le marché et sont utilisées dans la prévention et le traitement de l'infection à CMV (Figure 7) (Biron, 2006) :

- Foscarnet PFA
- Ganciclovir GCV
- Valganciclovir VGCV
- Cidofovir CDV
- Valacyclovir VACV

Le valganciclovir est la prodrogue (valylester) du ganciclovir, il possède une biodisponibilité 10 fois supérieure à celle-ci. De même, le valacyclovir est la prodrogue de l'acyclovir.

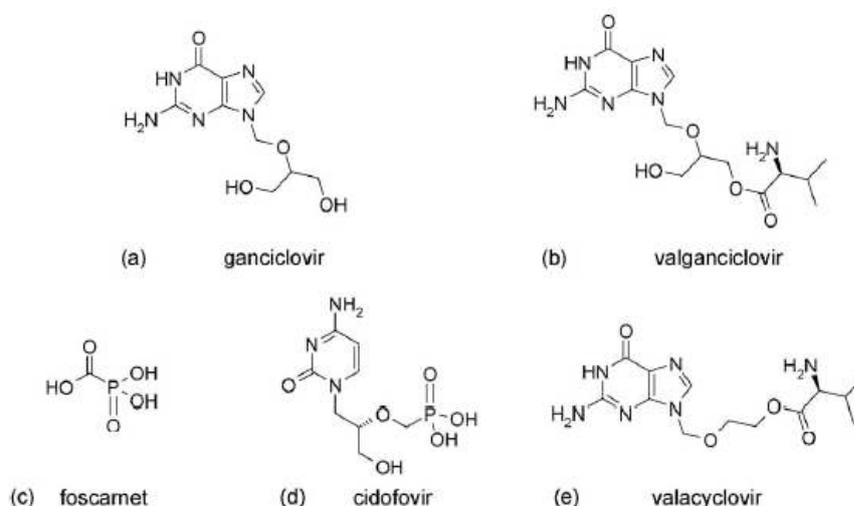


Figure 7 : Antiviraux anti-Cytomégalovirus
(Biron, 2006)

Ces molécules antivirales sont toutes des inhibiteurs de l'ADN polymérase virale (codée par le gène UL54) et entraînent un ralentissement ou un arrêt de la synthèse de la chaîne d'ADN viral, nécessaire à la formation de nouvelles particules virales infectantes.

Le PFA est directement actif : il bloque la réplication virale en se fixant de façon compétitive et réversible sur le site de liaison du résidu pyrophosphate de l'enzyme.

Le GCV (analogue nucléosidique acyclique de la guanosine) est actif sous forme triphosphate. Il sera donc successivement phosphorylé par la phosphotransférase du CMV (codée par le gène UL97) puis par des kinases cellulaires.

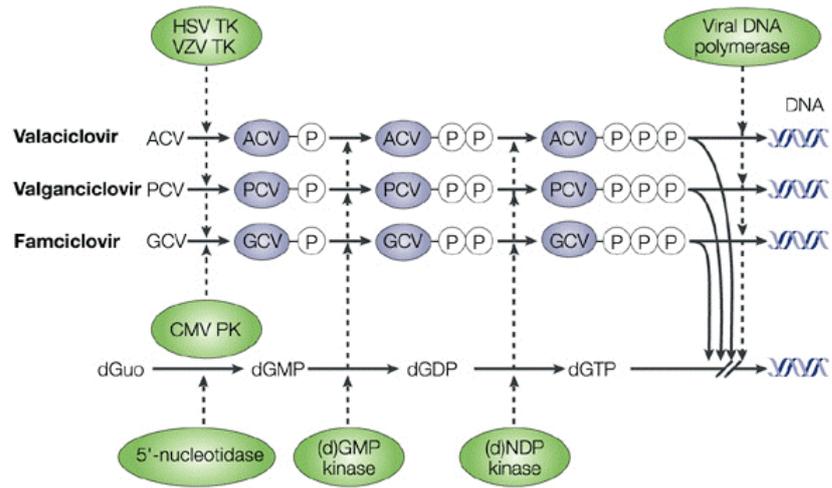
Le CDV est un analogue nucléotidique acyclique de la cytosine. Il sera doublement phosphorylé par les kinases cellulaires.

Le VACV, est un analogue nucléosidique de la guanosine qui nécessite également une triple phosphorylation. Cette molécule possède une activité antivirale moindre contre le CMV comparativement aux autres herpesvirus (VZV, HSV). Cependant, du fait de sa très bonne tolérance et faible toxicité, elle peut être utilisée en traitement préventif.

Les 3 molécules GCV, CDV et ACV, sous forme bi ou triphosphate entrent en compétition avec les désoxynucléosides triphosphates (dNTP) naturels pour l'incorporation dans la chaîne d'ADN viral, et stoppent ainsi l'élongation (Figure 8).

Ces antiviraux ne sont pas dénués de toxicité : toxicité hématologique avec le GCV (neutropénies principalement, mais aussi agranulocytoses et pancytopenies), et néphrotoxicité pour le PFA et le CDV. De plus, ces molécules ont entraîné des effets tératogènes au cours des expérimentations animales. Les données disponibles concernant leur utilisation pendant la grossesse sont insuffisantes pour permettre leur emploi chez la femme enceinte.

Le VACV est en revanche très bien toléré et on dispose d'un recul de plusieurs années concernant son utilisation pendant la grossesse. Cette molécule n'est pas tératogène, y compris à de fortes doses (Stone *et al.*, 2004).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 8 : Mode d'action des anti-herpesvirus
(De Clercq, 2004)

2. Infection congénitale à CMV

2.1. Epidémiologie

Le CMV est la cause la plus fréquente d'infection congénitale virale dans les pays développés. Le virus est également la première source de malformations congénitales, devant la trisomie 21, le syndrome d'alcoolisme foetal et la rubéole congénitale (Cannon, 2009). Il est responsable de la première cause de surdité d'origine non génétique (Morton and Nance, 2006).

Séroprévalence chez les femmes en âge de procréer :

Les taux de séropositivité chez les femmes en âge de procréer varient selon des critères socio-économiques, ethniques, l'âge et le nombre de grossesses (Cannon, 2009). La prévalence des IgG anti-CMV est également très variable selon les pays. En France, environ la moitié des femmes en âge de procréer n'a jamais rencontré le virus (prévalence séronégativité selon les études : 49,9 % (Vauloup-Fellous *et al.*, 2009) ; 53,2 % (Picone *et al.*, 2009) ; 55,4 % (Gouarin *et al.*, 2001). En revanche aux USA, la séroprévalence est de 59% dans la population totale et varie de 50 à 90 % chez les femmes de moins de 45 ans selon l'ethnie (plus forte prévalence chez les femmes non hispaniques de couleur noire) (Cannon, 2009).

Incidence des primo-infections ou infections secondaires pendant la grossesse :

Le nombre de femmes séronégatives avant la conception, et la facilité de contamination par le virus entraînent un nombre important de primo-infections pendant la grossesse.

L'incidence des primo-infections pendant la grossesse en France est d'environ 0,5 à 1% : 0,78 % des femmes enceintes au total (soit 1,4% des femmes séronégatives) selon Gouarin *et al.* (2001) et 0,71 % selon l'étude de Picone *et al.* (2013).

La primo-infection survient en général chez des femmes à risque (Picone *et al.*, 2013) au contact des jeunes enfants (personnel de crèche ou d'hôpital, sages-femmes, mères). En effet les enfants se contaminent à un jeune âge lors du début de la vie en collectivité. Ils sont peu symptomatiques et excrètent de fortes quantités de virus dans la salive, l'urine et les larmes. Ils sont donc fortement impliqués dans la transmission du virus aux adultes. Une étude a montré le taux important de séroconversion chez les femmes entre les deux premières grossesses (Fowler *et al.*, 2004).

L'incidence des réactivations ou réinfections est peu déterminée, du fait des difficultés diagnostiques. Les réinfections des individus immunocompétents par une souche différente (parmi les sérotypes 1 à 4) sont fréquentes. Chez des femmes séropositives suivies sur une période de 2 ans, 29% d'entre elles ont présenté des signes sérologiques de co-infection (apparition d'Ac spécifiques d'un autre sérotype) (Ross *et al.*, 2010).

Transmission materno-fœtale :

La transmission materno-fœtale du CMV survient le plus souvent lors d'une primo-infection maternelle.

Le taux de transmission est variable selon le stade de la grossesse. Le taux global reste relativement faible : 24,9% (Picone *et al.*, 2013) à 32 % (Kenneson and Cannon, 2007).

Le risque d'infection fœtale augmente avec le temps. L'étude de Picone *et al.* (2013) sur la survenue des primo-infections montre les taux de transmission suivants :

- pré-conceptionnel : 8,8 %
- péri-conceptionnel : 19 %
- 1^{er} trimestre : 30,6 %
- 2^{ème} trimestre : 34,1 %
- 3^{ème} trimestre : 40 %

La transmission materno-fœtale chez des femmes ayant déjà rencontré le virus avant la grossesse et donc immunisées, est tout à fait possible. De nombreux cas sont décrits. Les mécanismes sont une réactivation du virus chez la mère, avec virémie maternelle et infection placentaire, ou bien une infection secondaire par d'une souche de CMV différente. Les taux de transmission sont peu décrits, du fait de la difficulté diagnostique, mais sont bien plus faibles : selon Kenneson et Cannon (2007) le risque de transmission du virus lors d'une infection maternelle secondaire est d'environ 1,4 %. Il semblerait toutefois que l'infection congénitale soit moins sévère qu'après une primo-infection maternelle. Cependant, il ne faut pas exclure de rares cas d'infections graves. Zalel *et al.* (2008) ont étudié 6 cas d'infections congénitales sévères concernant des femmes âgées de 23 à 35 ans séropositives avant la grossesse (IgG spécifiques CMV présentes plusieurs mois avant la conception). Les fœtus infectés présentaient tous des signes majeurs d'infection congénitale à l'échographie (Zalel *et al.*, 2008).

Au final, l'immunité maternelle pré-conceptionnelle reste un facteur protecteur de l'infection congénitale à CMV avec un risque ratio (RR) calculé à 0,31 (Fowler *et al.*, 2003).

Prévalence de l'infection congénitale :

La prévalence des infections congénitales est basée sur la présence du virus chez le nouveau-né dans les urines ou le sang (mise en évidence directe du virus par culture ou présence d'ADN viral détecté par technique de PCR). D'après Dollard *et al.*, la prévalence dans le monde est estimée à 0,7 % des naissances (Dollard *et al.*, 2007). Dans les données de Kenneson *et al.* regroupant 55 articles depuis 2006, on retrouve une prévalence à la naissance de 0,64 %, très variable selon les pays et populations (Kenneson and Cannon, 2007).

En France, ces taux sont certainement inférieurs, dont l'estimation varie entre 0,2 et 0,5 % (Benoist *et al.*, 2008). Ce chiffre représente le nombre de nouveaux-nés infectés sur le nombre total de naissances vivantes, et exclut par définition les fœtus avortés (interruptions de grossesse spontanées ou provoquées). En Italie, la prévalence a été estimée à 0,18 % (Barbi *et al.*, 2006).

Une étude menée aux USA sur 7558 grossesses a montré une prévalence du virus chez le nouveau-né de 1,3 %. Chez les femmes séronégatives avant la grossesse, la prévalence du CMV chez les nouveaux-nés était de 3%, contre 1 % chez les nouveaux-nés de mères séropositives (Fowler *et al.*, 2003).

2.2. Pathogénèse

La séquence menant à la contamination du fœtus commence par une phase de virémie maternelle (secondaire à une primo-infection maternelle, une réactivation ou réinfection), suivie d'une infection placentaire et enfin la diffusion par voie hématogène au fœtus (Revello and Gerna, 2004).

Le virus, après pénétration dans l'organisme de la mère, diffuse en quelques jours par voie hématogène grâce aux leucocytes circulants infectés (PNN principalement). L'ADN viral, recherché par PCR en temps réel dans le sang total, peut être détectable pendant plusieurs semaines après la primo-infection chez un adulte immunocompétent, tout comme chez la femme enceinte.

Le virus diffuse vers le placenta. Bien que celui-ci joue un rôle important de protection du fœtus (barrière fœto-placentaire), il constitue paradoxalement un site majeur de réplication virale et un réservoir à l'origine de la transmission. Le mécanisme par lequel le CMV traverse la barrière placentaire est peu connu (passages de leucocytes infectés, transmission de

proche en proche via les fibroblastes ?) et le taux de transmission varie selon le stade de la grossesse et le type d'infection (primaire ou secondaire) (cf 2.1); il peut y avoir des infections placentaires sans infection fœtale (Revello and Gerna, 2004).

Dès que le virus a atteint le compartiment fœtal (en général 1 à 3 semaines après la primo-infection maternelle), il s'ensuit une diffusion par voie hématogène jusque dans les différents organes avec réplication virale. La virémie fœtale peut alors être détectée. Au niveau du rein fœtal, il y a réplication dans les cellules tubulaires et excrétion de particules virales dans les urines : le virus est alors présent dans le liquide amniotique et se concentre au fur et à mesure de la grossesse jusqu'à atteindre des charges virales très élevées (6-8 log UI/ml). La PCR en temps réel dans le LA se positive environ 2 à 3 semaines après la contamination fœtale, soit environ 6 semaines après la primo-infection maternelle. Après la naissance, le nouveau-né continuera à excréter en grande quantité le virus dans les urines et la salive pendant plusieurs mois.

2.3. L'infection à CMV et la femme enceinte

2.3.1. Infection maternelle

L'absence de symptômes lors de l'infection de la femme enceinte complique le diagnostic, si bien que celui-ci est rarement effectué sur signes d'appels maternels (Benoist *et al.*, 2008). Chez une faible proportion des femmes (21 %) on retrouve néanmoins quelques signes cliniques non spécifiques au moment de l'infection tels que fièvre (70%), syndrome pseudo-grippal (50%), céphalées (42 %), myalgies (28%), asthénie (10%), ou des signes biologiques comme une élévation des transaminases hépatiques (8%) (Picone *et al.*, 2013).

2.3.2. Infection fœtale

En l'absence de sérodépistage maternel, l'échographie obstétricale est actuellement le seul outil permettant d'évoquer une infection congénitale à CMV. Cependant, la plupart des fœtus infectés ne présente aucune anomalie échographique, ce qui explique pourquoi autant d'infections congénitales sont diagnostiquées tardivement ou non diagnostiquées (Benoist *et al.*, 2008).

La physiopathologie de l'infection permet d'expliquer les anomalies échographiques classiquement retrouvées.

Le placenta étant le premier organe infecté, on peut observer un épaississement de celui-ci, accompagné de calcifications et zones hypoéchogènes. Ensuite, lorsque le placenta ne joue pas le rôle de barrière, l'atteinte des organes fœtaux peut être multiple. Le rein prend un aspect hyperéchogène à l'échographie et la modification de la diurèse peut entraîner un oligoamnios.

L'atteinte du tube digestif est responsable d'une entérocolite virale se manifestant par un intestin hyperéchogène. Une hépatosplénomégalie avec ascite et œdème peuvent également être les témoins d'une insuffisance hépatocellulaire. Lors d'une atteinte de la moelle osseuse, l'insuffisance médullaire se traduit par une anémie et il existe alors un risque d'anasarque. Des calcifications éparses du foie, de la rate, et des poumons sont également les témoins de cette infection systémique.

L'atteinte cérébrale est en général assez typique et évocatrice avec la présence de calcifications intracrâniennes associées ou non à une atteinte destructive (microcéphalie) ou obstructive (ventriculomégalie, œdème) (Benoist *et al.*, 2008; Picone *et al.*, 2013).

Au delà de ces anomalies caractéristiques, l'infection congénitale peut se traduire uniquement par un retard de croissance intra-utérin (RCIU), non spécifique d'une infection virale.

Enfin, dans plus de la moitié des cas, il n'existe aucune anomalie particulière à l'échographie (Benoist *et al.*, 2008).

Les anomalies et la symptomatologie chez le fœtus sont liées à la date de l'infection. Plus l'infection est précoce, plus l'atteinte fœtale est importante (Picone *et al.*, 2013). Les anomalies échographiques décrites ci-dessus sont principalement retrouvées chez les fœtus infectés très précocement. Dans l'étude de Picone *et al.* (2013), 38,3 % de tous les fœtus infectés présentaient des anomalies échographiques. Lors d'une infection maternelle pré-conceptionnelle, 100 % des fœtus infectés présentaient des anomalies échographiques, contre 60 % lors d'une infection maternelle péri-conceptionnelle et 45,4 % au 1^{er} trimestre. Lors d'une infection tardive (2^{ème} et 3^{ème} trimestre), l'échographie était normale dans la majorité des cas.

2.3.3. Infection congénitale chez le nouveau-né

L'infection chez le nouveau-né est définie par la présence du virus à la naissance dans les urines ou le sang. Un nouveau-né symptomatique est défini par la présence d'une anomalie à l'imagerie néonatale et/ou un signe clinique. Dans les définitions publiées, un nouveau-né présentant des anomalies biologiques est également considéré symptomatique (Benoist *et al.*, 2008).

Environ 10% des nouveaux-nés infectés sont symptomatiques à la naissance (12,7 % selon Dollard *et al.* 2007). Les signes cliniques les plus fréquemment retrouvés sont les suivants : hépatosplénomégalie, microcéphalie, ictère, pétéchies, anomalies neurologiques. Du point de vue biologique, on observe assez fréquemment une élévation des transaminases, hyperbilirubinémie, thrombopénie. Parmi les nouveaux-nés symptomatiques, la moitié environ présente un tableau classique avec atteinte multiple des organes et mortalité élevée d'environ 30% : c'est la maladie des inclusions cytomégaliennes (Benoist *et al.*, 2008). Une grande partie des enfants survivants (40 à 58 % selon Dollard *et al.* 2007) présentera des séquelles à long terme, de type retard psychomoteur, surdité uni ou bilatérale, atrophie optique ou chorioretinite, épilepsie. Les enfants ayant un tableau sévère à la naissance présentaient déjà à l'échographie des anomalies de mauvais pronostic.

A contrario de ces cas relativement rares, la plupart des enfants infectés (90%) naissent sans symptomatologie particulière. Ces enfants correspondent aux infections plus tardives ou sans anomalies échographiques majeures (Picone *et al.*, 2013).

Cependant, on estime qu'environ 10 à 15 % (13,5 % selon Dollard *et al.* 2007) d'entre eux présenteront des séquelles sur le long terme. Dans les premières années de vie, une surdité uni- ou bilatérale (parfois progressive) peut apparaître. Le CMV représente la deuxième cause de surdité chez les enfants, derrière la cause génétique de mutation de la connexine (Avettand-Fenoël *et al.*, 2013). On observe également d'autres anomalies plus rares apparaissant tardivement : microcéphalie, chorioretinite, retard mental et anomalies neurologiques.

2.4. Diagnostic CMV congénital

2.4.1. Circonstances du diagnostic

Plusieurs circonstances peuvent amener le clinicien et le laboratoire vers la recherche d'une infection chez la femme enceinte ou le fœtus.

La plupart du temps, les raisons qui conduisent au diagnostic sont les anomalies échographiques détectées chez le fœtus au cours du suivi de la grossesse. Ces anomalies peuvent être caractéristiques comme la ventriculomégalie, un intestin hyperéchogène, et elles orienteront le clinicien à chercher en priorité le CMV. A l'inverse, les anomalies peuvent être absolument non spécifiques (RCIU). Dans ce dernier cas la recherche de l'infection à CMV fait partie d'un bilan complet associant de multiples investigations (infectieuses, génétiques, etc.).

Le diagnostic peut être réalisé à la suite d'un dépistage effectué en début de grossesse dans certains centres. Une sérologie maternelle est proposée à toutes les femmes quel que soit le risque, lors de la première consultation à 12 semaines d'aménorrhées (SA) environ. A l'heure actuelle, le dépistage biologique systématique de l'infection congénitale pendant la grossesse ou à la naissance n'est pas recommandé selon l'ANAES. Cependant il est de plus en plus pratiqué, selon les données des caisses nationales d'assurance maladie (ANAES, 2004). Cette pratique permet de repérer les femmes ayant séroconverti en début de grossesse, et ainsi de les suivre plus spécifiquement. De plus, les femmes enceintes sont ainsi sensibilisées aux règles d'hygiène à respecter pour éviter une éventuelle séroconversion ou ré-infection lors de la grossesse.

Enfin, rarement, le clinicien peut demander un diagnostic suite à la présence de signes cliniques évocateurs d'une infection virale maternelle (fièvre, asthénie, myalgies...) ou lors d'une notion de contagé avec un individu excréteur du CMV.

2.4.2. Outils diagnostiques

La démarche diagnostique de l'infection congénitale à CMV repose sur différentes approches, directes ou indirectes.

- Diagnostic de l'infection maternelle : sérologie maternelle et virémie maternelle
- Diagnostic prénatal : mise en évidence du virus dans le liquide amniotique ou sang fœtal
- Diagnostic chez le nouveau-né : mise en évidence du virus chez le nouveau-né dans la salive, les urines ou le sang
- Diagnostic chez l'enfant : diagnostic rétrospectif par mise en évidence du virus dans la carte de Guthrie

Diagnostic de l'infection maternelle :

La sérologie est un outil de choix pour le diagnostic de la primo-infection maternelle. Le diagnostic de certitude est posé lors d'une séroconversion et apparition d'IgG spécifiques anti-CMV chez la mère (à l'exception des Ac transférés passivement lors de transfusion ou injection d'immunoglobulines polyvalentes). Il est possible de compléter la sérologie par la recherche d'IgM spécifiques ou par l'avidité des IgG. La présence d'IgM (ou IgM proches du seuil décisionnel) témoigne en général d'une infection récente, mais la positivité de ce test peut correspondre à des IgM résiduelles (parfois après 6 mois) ou des IgM non spécifiques.

L'étude de Picone *et al.* (2009) révèle que parmi les patientes IgG positives à 12 SA, 5,7 % d'entre elles présentent des IgM positives. Parmi ces patientes, seules 9,2 % d'entre elles avaient une avidité faible des IgG, confirmant une primo-infection récente. Ces résultats montrent bien la persistance des IgM au delà de 3 mois et les IgM non spécifiques (Picone *et al.*, 2009).

Devant ces difficultés d'interprétation, le recours à la mesure de l'avidité des IgG doit être systématique. L'interprétation du résultat est également délicate : il existe une variabilité inter-individuelle dans la cinétique d'apparition/disparition des Ac et dans l'hypermutation somatique des IgG responsable d'une augmentation de l'avidité. Avec la technique Vidas par exemple, la présence d'IgM associée à une mesure de l'avidité permet de confirmer ou d'exclure une infection récente (de moins de 3 mois) dans 80 % des cas (Vauloup-Fellous *et al.*, 2009). Dans le cas où l'avidité est intermédiaire, il est impossible de conclure sur la date survenue de la primo-infection ; il faut donc se procurer des sérums antérieurs.

La recherche directe du virus dans le sang maternel peut parfois apporter une aide au diagnostic. Il est ainsi possible de mettre en évidence la virémie associée à la primo-infection et de compléter les résultats de la sérologie parfois difficiles à interpréter. Le diagnostic direct peut s'avérer également très utile dans le cas des réinfections ou réactivations. Dans ces cas d'infections secondaires, la sérologie n'apporte que très peu d'information : les IgM en général ne réapparaissent pas et le taux d'IgG ne s'élève pas forcément. La PCR en

revanche peut être positive. Malheureusement la virémie étant transitoire, un résultat négatif n'exclue pas une virémie antérieure : il est difficile de faire un diagnostic précis de ces infections secondaires.

Diagnostic prénatal :

Il s'agit exclusivement d'un diagnostic direct, qui repose sur la mise en évidence du virus dans le liquide amniotique (ou le sang fœtal). Le diagnostic prénatal est proposé aux femmes pour lesquelles on suspecte fortement une infection congénitale à CMV. L'amniocentèse, et encore plus la ponction de sang fœtal, sont des gestes à risque de fausse-couche.

La technique de choix est la PCR, beaucoup plus rapide et facile que la culture virale. Seuls certains centres pratiquent aussi la culture sur cellules afin de conserver la souche virale, mais l'obtention du résultat est retardée de 10 à 15 jours.

Lors de l'infection du fœtus, le virus diffuse par voie hématogène (virémie fœtale) jusqu'aux différents organes, notamment le rein. Il y a réplication dans les cellules tubulaires et excrétion dans l'urine fœtale. Ainsi le virus se concentre dans le liquide amniotique jusqu'à des taux très élevés (ADNémie jusqu'à 6-8 log UI/ml). Le liquide amniotique est donc le prélèvement de choix pour le diagnostic prénatal.

Afin d'éviter tout résultat faussement négatif, il est impératif de respecter certains délais pour la réalisation du diagnostic. L'amniocentèse doit être programmée au moins 7 semaines après la primo-infection maternelle et à partir de 20 SA (terme au-delà duquel la maturation du système urinaire fœtal est acquise) (Bodéus *et al.*, 1999). De plus, il faut idéalement vérifier avant le geste que la virémie maternelle est négative afin d'éviter une contamination iatrogène du fœtus. Une étude a cependant montré qu'une charge virale positive chez la mère n'est pas un facteur de risque significatif d'infection iatrogène pour le fœtus (Revello *et al.*, 2008).

L'amniocentèse présentant un risque pour le fœtus, on évite sa réalisation entre 26 et 32 SA sauf cas de force majeure : en effet le geste peut conduire à une césarienne en urgence, donnant naissance à un très grand prématuré avec risque de séquelles.

La PCR en temps réel dans le LA offre de très bonnes performances. La spécificité et la sensibilité analytiques de la méthode sont excellentes (proche de 100%), grâce à l'utilisation d'amorces très spécifiques complémentaires de régions génomiques virales conservées et grâce à la recherche systématique d'inhibiteurs de PCR. En effet, des composés présents

dans le liquide amniotique expose au risque d'inhibition de la réaction de PCR. Une extraction des acides nucléiques et une détection des inhibiteurs résiduels sont indispensables (Avidor *et al.*, 2004). L'automatisation de l'extraction et de l'amplification permet de limiter le délai de rendu du résultat et le risque d'erreur.

En se plaçant dans les conditions optimales en terme de délais (décrites ci-dessus) pour la réalisation de l'amniocentèse, les performances diagnostiques de différentes trousse commerciales ou PCR « maison » comparées ou non à la culture virale sont décrites dans la littérature (Tableau 1).

Série	Culture		PCR	
	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
(Bodéus <i>et al.</i> , 1999)	74,6		72,7	
(Gouarin <i>et al.</i> , 2001)		98,4	72,4	96,9
(Avidor <i>et al.</i> , 2004)			89-100	
(Revello and Gerna, 2004)	80,4	100	90,2	100
(Lazzarotto <i>et al.</i> , 2008)	70,3	100	80,2	100

Tableau 1 : Spécificité et sensibilité diagnostiques des deux techniques (culture virale et PCR) dans le LA

La visualisation des courbes de fluorescence et la mesure de la température de fusion (T_m) permettent d'éliminer une amplification non spécifique. Il subsiste tout de même un risque de faux-positif technique (limité dans les techniques automatisées), lié à la contamination du puits par un échantillon positif déposé dans le puits voisin et projection de microgouttelettes. Dans ce cas le résultat est faiblement positif. C'est pour cette raison que la culture virale, dont la technique limite le risque de contamination, apparaît légèrement plus spécifique (Gouarin *et al.*, 2001).

De même, il existe un risque de faux-négatif technique lié à l'inhibition de la réaction de PCR par des composés présents dans le LA.

Les bonnes pratiques de la PCR en temps réel, l'utilisation d'un contrôle interne, et l'expertise du biologiste autorisé au DPN permettent la mise en évidence des faux-positifs et faux-négatifs et la bonne interprétation du résultat.

Une technique commerciale de PCR en temps réel dans le LA a déjà démontré de très bons résultats par rapport à une technique de PCR en temps réel maison : sensibilité et spécificité analytiques égales à 100 % et limite de détection égale à 150 copies/ml (Ducroux *et al.*, 2008).

La ponction de sang fœtale est un geste plus à risque et plus compliqué à réaliser. Elle peut éventuellement permettre d'établir le diagnostic par mise en évidence directe du virus par PCR (la virémie fœtale est prolongée) voire la recherche d'IgM spécifiques, mais n'est habituellement pas réalisé dans ce sens. En effet la sensibilité diagnostique est bien moins bonne que la PCR CMV dans le LA : sensibilité recherche IgM Sang fœtal = 20 à 75 % et sensibilité PCR CMV Sang fœtal = 41 à 92,6 % (Revello and Gerna, 2004). En revanche, la ponction de sang fœtal possède un intérêt pour le dosage des marqueurs virologiques, biochimiques et hématologiques (enzymes hépatiques, l'hémoglobine fœtale, numération plaquettaire).

La PCR en temps réel dans le LA offre des performances tout à fait satisfaisantes, et s'impose donc aujourd'hui comme la technique de référence pour le diagnostic prénatal de l'infection congénitale à CMV.

Diagnostic chez le nouveau-né :

Le diagnostic néonatal repose sur la recherche directe du virus dans la salive, les urines ou le sang, par une technique de PCR. Cet examen est systématiquement réalisé en cas de primo-infection maternelle documentée ou anomalies échographiques évocatrices, que l'amniocentèse ait été réalisée ou non.

Les prélèvements doivent être effectués dans les 10 premiers jours de vie, pour ne pas interpréter une infection néonatale précoce comme une infection congénitale.

Il est possible de rechercher le virus dans la salive, mais on s'expose alors à un risque de faux-positif. Le virus présent dans les sécrétions vaginales et le lait maternel contamine le nouveau-né ; la PCR est alors positive. Ainsi toute PCR positive dans la salive devra être confirmée dans l'urine. Ce prélèvement est donc plus adapté au dépistage qu'au diagnostic.

L'urine reste le prélèvement de choix : l'excrétion du virus chez les nouveaux-nés infectés est prolongée (plusieurs mois voire jusqu'à un an après la naissance) et en grande quantité (on retrouve souvent 5 ou 6 log UI/ml d'ADN CMV). C'est également un prélèvement non invasif.

La PCR réalisée dans le sang du nouveau-né s'avère être un moins bon examen ; la virémie étant transitoire, elle peut s'être négativée avant la naissance. Cependant chez les enfants symptomatiques, la virémie est positive dans 100 % des cas à la naissance (Boppana *et al.*, 2005).

Diagnostic rétrospectif chez l'enfant :

Certaines situations chez l'enfant peuvent conduire au diagnostic rétrospectif de l'infection congénitale à CMV. C'est le cas par exemple de l'apparition d'une surdité tardive ou de toute malformation compatible avec un CMV congénital n'ayant pas été détectée à la naissance.

Si la mère est connue séropositive, l'infection pendant la grossesse ne peut être exclue. Le diagnostic pourra alors être posé sur l'analyse rétrospective du sang séché sur carton de Guthrie par PCR en temps réel. Dans une population de nouveaux-nés ayant des symptômes compatibles ou une histoire maternelle de primo-infection, la sensibilité et la spécificité diagnostiques de cette méthode sont très bonnes (95%–96,9% et 98,5%–99%, respectivement) (Leruez-Ville *et al.*, 2011).

2.5. Prévention

Si l'on considère la prévalence des nouveaux-nés infectés en France estimée de 0,2 à 0,5 % selon la littérature (Benoist *et al.*, 2008), cela représente par extrapolation 200 à 500 enfants infectés pour 100 000 naissances. L'Institut de Veille Sanitaire (InVS) estime le nombre annuel d'infections congénitales entre 2300 et 3800 par an, et seulement 5 à 20 % sont identifiées pendant la grossesse ou à la naissance (Parent du Châtelet and Lévy-Bruhl, 2007). L'infection congénitale à CMV est donc un important problème de santé publique. Des

études menées dans les pays industrialisés ont démontré que l'infection congénitale à CMV restait méconnue du public et des professionnels de santé. Aux USA, moins d'une femme sur cinq affirme avoir déjà entendu parler de cet agent infectieux (Cannon, 2009). En France, la plupart des sages-femmes interrogées ne connaissent pas les modes de transmission du virus, et 20% des professionnels de santé sont persuadés qu'il existe un traitement *in utero* disponible (Cordier *et al.*, 2012).

Plusieurs stratégies de prévention sont envisageables.

Prévention primaire :

La vaccination : à l'heure actuelle, il n'existe pas de vaccin disponible pour prévenir la primo-infection à CMV, même si les résultats pour la mise au point d'un vaccin recombinant sont encourageants (McVoy, 2013). De plus, compte tenu de l'histoire naturelle de l'infection avec possibilité de transmission du virus au fœtus lors des réinfections maternelles, l'utilisation d'un vaccin ne protégerait pas à 100 % d'une infection congénitale.

Les mesures d'hygiène : il a été montré que l'information des femmes enceintes séronégatives sur des mesures d'hygiène simples à respecter permet de réduire considérablement le taux de séroconversion pendant la grossesse (0,19 % *versus* 0,9 à 1,4 % habituellement décrit) (Vauloup-Fellous *et al.*, 2009). Ceci est encore plus vrai chez les femmes à risque, ayant déjà des enfants en bas âge, ou travaillant au contact d'enfants de moins de 3 ans. Ces mesures préventives sont basées sur le lavage fréquent des mains, en particulier après contact avec la salive ou les urines d'enfants (après manipulation des jouets, après le change, etc). Il est également recommandé d'éviter les contacts intimes avec les jeunes enfants (partage des cuillères, etc).

Ces mesures de prévention recommandées par l'ANAES en 2004 sont destinées en particulier aux personnes suivantes :

- « - les femmes enceintes en contact familial ou professionnel avec des enfants de moins de 3 ans, gardés en crèche ou bénéficiant de tout autre mode de garde collectif
- les conjoints des femmes citées ci-dessus, afin qu'ils ne s'infectent pas et ne risquent pas d'infecter leur conjointe
- les personnels travaillant en contact avec des enfants de moins de 3 ans, en crèche, dans les services d'enfants handicapés ou dans les services hospitaliers doivent limiter le contact avec les urines, la salive et les larmes de jeunes enfants de moins de 3 ans. »

Prévention secondaire :

La première approche possible est prospective par dépistage de l'infection congénitale. Le dépistage systématique chez la femme enceinte pourrait reposer sur une sérologie en début de grossesse puis un contrôle à 20 SA pour les femmes séronégatives. Cela permettrait ainsi de mettre en évidence une primo-infection chez la femme enceinte. A l'heure actuelle aucun traitement ne permet de prévenir la transmission du virus au fœtus. Une étude a cependant montré l'intérêt des Immunoglobulines intra-veineuses (IV) hyperimmunes dans la réduction du nombre d'infections congénitales chez les femmes ayant fait une primo-infection récente (Nigro *et al.*, 2005).

Le dépistage reste très débattu, le risque d'interruption de grossesse volontaire étant un aspect négatif du dépistage systématique (Revello *et al.*, 2011). Actuellement il n'est pas recommandé par l'ANAES. En 2004 un rapport précise les arguments suivants :

« le dépistage sérologique systématique de l'infection à CMV pendant la grossesse n'est pas justifié en 2004, les critères OMS n'étant pas tous remplis : (i) absence de traitement, (ii) données épidémiologiques incomplètes (infection secondaire, séquelles sensorielles tardives), (iii) performance des tests sérologiques variable, (iv) difficulté d'établir le pronostic (v) prise en charge non consensuelle, (vi) conséquences négatives du dépistage (anxiété, fausses couches iatrogènes liées à l'amniocentèse, Interruption Médicale de Grossesse IMG) prédominant sur les risques de déficit ou de séquelle grave. » (ANAES, 2004)

Dans certains centres, la sérologie est proposée à toutes les femmes lors de la première consultation : 96,7 % acceptent de réaliser cette sérologie non obligatoire connaissant les risques liés au CMV (Picone *et al.*, 2009).

La seconde approche est rétrospective par la réalisation d'un diagnostic prénatal. Devant la présence de signes échographiques en faveur d'une infection fœtale, le diagnostic est réalisé par recherche du virus dans le liquide amniotique. C'est la démarche suivie en France le plus souvent, qui amène selon le cas à l'IMG.

Prévention tertiaire :

Il s'agirait du diagnostic néonatal avec dépistage de tous les nouveaux-nés à la naissance, prise en charge du nouveau-né et mise en place d'un traitement visant à limiter la symptomatologie.

2.6. Pronostic

Lorsque le diagnostic d'infection congénitale est posé, par mise en évidence d'ADN du CMV chez le fœtus par l'intermédiaire du liquide amniotique, l'objectif principal est d'évaluer le pronostic à la naissance. Plusieurs facteurs ont une importance sur le risque d'infections symptomatiques à la naissance (Benoist *et al.*, 2013).

L'âge gestationnel : plus la transmission au fœtus survient tard au cours de la grossesse, meilleur sera le pronostic. La survenue d'une infection maternelle en période pré/péri-conceptionnelle ou au 1^{er} trimestre est un important facteur de risque de symptomatologie à la naissance ($p < 0,001$, RR= 22,6) (Picone *et al.*, 2013).

Les anomalies échographiques : la présence d'anomalies fœtales telles que les calcifications intra-crâniennes ou la ventriculomégalie exposent à un risque plus élevé de symptomatologie à la naissance. Quand le statut du fœtus est connu (infecté ou non), la sensibilité et la spécificité des anomalies échographiques pour prédire la symptomatologie à la naissance sont de 100 % et 90,2 % respectivement (Picone *et al.*, 2013).

Certains marqueurs biologiques virologiques, hématologiques ou biochimiques présentent également un intérêt pronostic.

Charge virale dans le LA :

Plusieurs études ont cherché à montrer la valeur prédictive de la charge virale dans le liquide amniotique. Les charges virales moyennes sont plus élevées chez les fœtus symptomatiques que chez les fœtus asymptomatiques. Cependant, cette différence n'est significative ($p = 0,014$) que dans une seule étude (Gouarin *et al.*, 2002). La charge virale moyenne dans le groupe des fœtus symptomatiques (à l'échographie) était de $2,8 \cdot 10^5$ cop/ml contre $8 \cdot 10^3$ cop/ml dans le groupe des fœtus sans anomalie échographique. Malgré cette différence significative, la charge virale ne permet pas d'orienter le pronostic à la naissance puisqu'il existait des fœtus symptomatiques pour lesquels la charge virale était basse et *vice versa* (Figure 9). Il a également été montré qu'il existait une corrélation positive entre la charge virale et le terme lors de l'amniocentèse (coefficient de corrélation $r = 0,866$; $p = 0,003$). Ces résultats sont expliqués par le fait que le CMV s'accumule dans le LA au cours de la grossesse (Figure 10). La quantité d'ADN dans le LA n'est donc probablement pas le reflet de la quantité de virus excrétée par le fœtus.

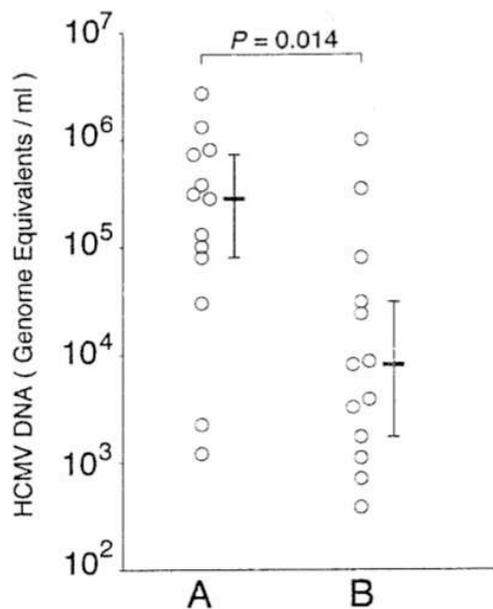


Figure 9 : Distribution des charges virales CMV (HCMV DNA) dans le LA des fœtus infectés symptomatiques (Groupe A) et des fœtus infectés asymptomatiques (Groupe B) (Gouarin *et al.*, 2002)

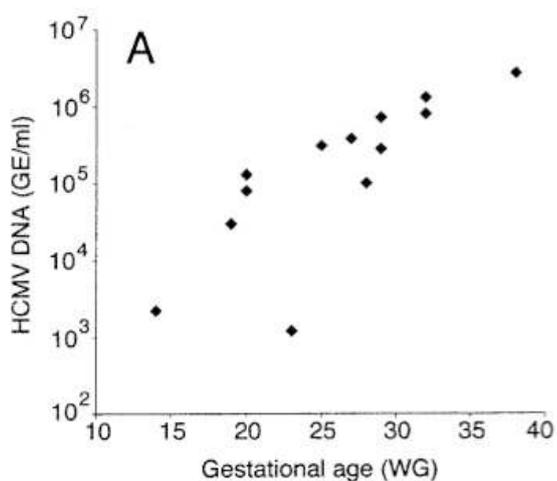


Figure 10 : Corrélation entre la charge virale CMV (HCMV DNA) et l'âge gestationnel au moment de l'amniocentèse, dans le groupe des fœtus infectés avec anomalies échographiques (Gouarin *et al.*, 2002)

Marqueurs virologiques, hématologiques et biochimiques dans le sang fœtal :

Des paramètres virologiques (IgM spécifiques, charge virale) et des paramètres non spécifiques (thrombopénie avec plaquettes < 100 000 / mm³, alanine aminotransférases (ALAT), bilirubine, gamma-glutamyltransférases (GGT), β2-microglobuline) ont été étudiés par Fabri *et al.* (2001) et Benoist *et al.* (2008). Les résultats des deux études sont différents. L'une retrouve comme facteurs pronostics significatifs la charge virale, la présence d'IgM spécifiques, la numération plaquettaire et la β2-microglobuline (Fabbri *et al.*, 2011) tandis que l'autre ne met en évidence que la thrombocytopenie (G Benoist *et al.*, 2008).

Marqueurs à la naissance :

L'étude de Boppana *et al.* (2005) a montré qu'à la naissance, les nouveaux-nés symptomatiques avaient une charge virale dans le sang et les urines significativement plus élevée que chez les asymptomatiques (p=0,001 et p=0,05 respectivement). De plus, parmi les enfants asymptomatiques, ceux dont la charge virale sanguine à la naissance est > 10⁴ cop/ml sont plus à risque de développer une surdité dans l'enfance.

2.7. Prise en charge thérapeutique de l'infection

2.7.1. Chez la femme enceinte

Il existe peu d'options thérapeutiques pour la prise en charge des fœtus infectés et aucune n'est validée à l'heure actuelle (Benoist *et al.*, 2013). Les molécules ganciclovir, cidofovir et foscarnet sont tératogènes chez l'animal, ce qui ne permet pas leur utilisation chez la femme enceinte. Le valacyclovir, utilisé en traitement préventif, est également actif sur le virus. Cette prodrogue de l'acyclovir est très bien tolérée, non tératogène et promet des résultats encourageants : l'étude de Jacquemard *et al.*, (2007) a montré l'efficacité d'un traitement par VACV (8g/j *per os* pendant 7 semaines) pour réduire la charge virale CMV dans le sang fœtal. Le VACV est actuellement en essais de phase 2 dans l'étude CYMEVAL (In UTERO Treatment of Cytomegalovirus Congenital Infection With Valacyclovir), afin de déterminer, *versus* placebo, l'intérêt d'un traitement dans la réduction de la charge virale sanguine CMV dans le sang du nouveau-né, la diminution de la symptomatologie à la naissance, et dans la réduction des IMG ("In UTERO Treatment of Cytomegalovirus Congenital Infection With Valacyclovir - ClinicalTrials.gov," n.d.).

La seconde stratégie thérapeutique repose sur l'administration IV d'Ig hyperimmunes dirigées contre le CMV chez la femme enceinte. Il a été montré que cette thérapeutique limitait le risque et la sévérité des anomalies à la naissance, lors d'une primo-infection maternelle (Nigro *et al.*, 2012, 2005).

En cas d'infection congénitale prouvée avec mauvais pronostic, reste la discussion de l'interruption médicale de grossesse (IMG). Celle-ci peut être décidée par les parents et les médecins du centre de DPN, en fonction des résultats échographiques, virologiques et biologiques du fœtus. Le taux global d'interruption de grossesse chez les femmes ayant fait une primo-infection pendant la grossesse est d'environ 15 % (Parent du Châtelet and Lévy-Bruhl, 2007).

2.7.2. Chez le nouveau-né et l'enfant

Il n'existe pas de consensus pour la prise en charge thérapeutique des enfants infectés, qu'ils soient symptomatiques ou non. Plusieurs études ont été menées utilisant le GCV par voie IV et/ou sa prodrogue le VGCV *per os* dès la naissance. Les essais de traitement au long cours pendant 6 mois à 12 mois sont encourageants, avec une diminution très rapide de la charge virale CMV dans le sang. On observe une amélioration ou stabilisation des lésions auditives et neurologiques, et une diminution des séquelles à long terme. De plus, chez les nouveaux-nés asymptomatiques à la naissance, le traitement permet d'éviter l'apparition des complications auditives dans les premières années de vie. Les traitements sont assez bien tolérés, mais la neutropénie secondaire est fréquente et requiert parfois l'administration de facteurs de croissance hématopoïétiques (Amir *et al.*, 2010; del Rosal *et al.*, 2012; Michaels *et al.*, 2003).

En conclusion, la recherche d'ADN viral dans le liquide amniotique est un outil de choix dans le diagnostic prénatal de l'infection congénitale à CMV. Les options thérapeutiques et l'issue de la grossesse (IMG) reposent en grande partie sur le résultat de cet examen. Cette analyse de biologie médicale est soumise à des exigences de qualité (au même titre que les autres analyses) explicitées dans la norme NF EN ISO 15189. De plus, en raison de l'importance du diagnostic prénatal et des conséquences pouvant découler du résultat, une réglementation particulière s'applique.

3. Accréditation des laboratoires et réglementation du diagnostic prénatal

3.1. Management de la qualité dans les laboratoires

Les laboratoires de biologie médicale (LBM) sont depuis quelques années en pleine mutation. Dans un objectif de qualité du service médical rendu, l'ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale introduit de nouvelles dispositions législatives dans la 6^{ème} partie du code de la santé publique (CSP) : les laboratoires sont désormais soumis à l'accréditation de leur activité selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189.

La norme NF EN ISO 15189 détaille les exigences particulières aux LBM concernant la qualité et les compétences. On retrouve des exigences relatives au management et des exigences techniques (AFNOR, 2012).

L'accréditation est une attestation délivrée par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) reconnaissant les compétences techniques du laboratoire permettant ainsi d'établir un niveau certain de confiance dans les résultats d'analyse.

La loi 2013-442 du 30 mai 2013 précise, entre autre, un nouveau calendrier, rendant obligatoire dans un laboratoire donné l'accréditation de 50 % des examens de biologie médicale au 1^{er} Novembre 2016, 70% au 1^{er} Novembre 2018, et 100% au 1^{er} Novembre 2020.

Dans le cadre de la démarche d'accréditation, le laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux a établi une politique qualité, avec l'objectif du déploiement de la norme NF EN ISO 15189 version 2012. La validation et mise en place de la PCR en temps réel dans le liquide amniotique s'inscrit pleinement dans cet objectif. Parallèlement, cette analyse de diagnostic prénatal est soumise à une réglementation particulière.

3.2. Diagnostic prénatal : réglementation en vigueur

Définition du diagnostic prénatal L2131-1 :

« Le diagnostic prénatal s'entend des pratiques médicales, y compris l'échographie obstétricale et fœtale, ayant pour but de détecter *in vitro* chez l'embryon ou le fœtus une affection d'une particulière gravité. »

La pratique de l'activité de diagnostic prénatal est réglementée par le code de la santé publique, modifié par la Loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique (articles L2131-1 à 5, L2161-1 à 2, R2131-1 à 9).

Examens obligatoires en cours de grossesse permettant d'évaluer un potentiel risque infectieux chez le fœtus (R2122-2):

- Premier examen prénatal avant la fin du 3^{ème} mois de grossesse : sérologies rubéole, syphilis et toxoplasmose
 - Si 1^{ère} sérologie toxoplasmose négative : sérologie mensuelle
 - Si 1^{ère} sérologie rubéole négative : nouvelle sérologie à 20 SA et vaccination après l'accouchement
- 6^{ème} mois : dépistage AgHbs

La sérologie CMV n'est pas obligatoire dans les textes de loi, mais peut être proposée par le médecin ou la sage-femme.

Consentement :

Si les tests de dépistage orientent vers un risque avéré, des examens de diagnostic prénatal peuvent être proposés par un médecin : ils sont non obligatoires. La femme enceinte doit être informée des objectifs, des modalités, des risques et des limites de ces examens (L2131-1).

« Le médecin [...] établit une attestation, cosignée par la femme enceinte, certifiant que ces informations lui ont été fournies. » (R2131-2)

« Le consentement prévu est recueilli par écrit par le médecin ou la sage-femme qui prescrit, ou, le cas échéant, qui effectue ces examens. » (L2131-1)

Le consentement et l'attestation doivent être conservés par le laboratoire d'analyses médicales dans les mêmes conditions que le compte rendu d'analyse.

Autorisation à pratiquer des examens de biologie médicale destinés à établir un diagnostic prénatal :

« Les examens de biologie médicale destinés à établir un diagnostic prénatal sont pratiqués dans des laboratoires de biologie médicale faisant appel à des praticiens en mesure de prouver leur compétences, autorisés [...] et accrédités [...]. »(L2131-1)

L'autorisation est délivrée pour une durée de cinq ans, renouvelable. Pour obtenir cette autorisation, un dossier est constitué et doit témoigner de :

- Disposition « des équipements nécessaires à la mise en œuvre de ces activités dans des conditions en garantissant la qualité et la sécurité, telles que définies par les règles de bonne pratique » (R2131-6)

- Formation spécialisée du praticien et « expérience jugée suffisante » (R2131-4)

- Personnel habilité

- Prévisions d'activité (L3131-2)

Délivrance des résultats :

Seuls les praticiens biologistes autorisés au DPN sont habilités à interpréter les analyses et à signer les comptes-rendus. Le résultat sera communiqué exclusivement au médecin prescripteur (R2131-3).

« Seul le médecin prescripteur des examens de biologie médicale destinés à établir un diagnostic prénatal est habilité à en communiquer les résultats à la femme enceinte. » (L2131-4)

Conservation des échantillons et résultats :

Les échantillons biologiques destinés au diagnostic prénatal doivent être conservés dans les conditions optimales. Les échantillons primaires sont stockés à une température de -80°C pour une durée réglementaire de 3 ans (Journal officiel du 04.04.1996). Les dossiers patients sous format papier (ordonnance, consentement, résultats, etc) sont conservés sans limite de temps.

Suivi des grossesses :

Le laboratoire étant tenu de communiquer à l'Agence de Biomédecine un rapport annuel d'activité, il est important de connaître l'issue de chaque grossesse ayant bénéficié d'un diagnostic prénatal. Un formulaire complété par le médecin ou la sage-femme est retourné au laboratoire.

Dispositions pénales :

« Le fait de procéder au diagnostic prénatal sans avoir reçu l'autorisation mentionnée à l'article L2131-1 du code de la santé publique est puni de deux ans d'emprisonnement et de 30 000 euros d'amende. » (L2161-1)

En pratique, la prise en charge et la réalisation d'un diagnostic prénatal demandent une attention particulière du fait des contraintes de temps, et des conséquences pour le fœtus. Les prélèvements fœtaux (liquide amniotique, sang fœtal) sont précieux : en effet l'acte de prélèvement est à l'origine d'une fausse couche dans 0,5 à 1 % des cas.

Il est donc important d'optimiser au maximum le parcours de l'échantillon au laboratoire afin d'éviter toute erreur diagnostique, éviter une reponction mais également garantir une qualité de rendu du résultat dans les meilleurs délais.

Le laboratoire s'appuie sur les recommandations du document SH REF 02 (COFRAC, 2013) pour répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 version 2012, relative au management de la qualité des laboratoires de biologie médicale.

Gestion des prélèvements :

Dans la mesure du possible, les prélèvements destinés au diagnostic prénatal doivent être programmés. Le consentement de la femme enceinte, ainsi qu'une fiche de renseignements (administratifs et cliniques) sont joints avec les échantillons. Le laboratoire peut ensuite retourner au prescripteur une fiche d'accusé-réception.

Structure du laboratoire :

Pour les techniques de biologie moléculaire, le laboratoire doit être organisé en 3 zones distinctes, avec un matériel spécifique pour chaque zone et un sens de circulation monodirectionnel :

- Zone d'extraction des acides nucléiques
- Zone pré-PCR (pièce du MIX)
- Zone post-PCR (analyse des produits de PCR)

Partie technique :

Le laboratoire prévoit un moyen de contrôle de la correspondance entre le tube primaire et les différents tubes utilisés pour la PCR.

Les analyses peuvent être doublées et seront accompagnées d'un contrôle négatif, un contrôle positif et un contrôle d'extraction des acides nucléiques.

OBJECTIFS

L'analyse des données de la littérature démontre que la PCR CMV en temps réel dans le liquide amniotique est l'examen de référence dans le diagnostic prénatal de l'infection congénitale à CMV.

L'objectif de notre travail est la validation et mise en place de cette méthode de diagnostic prénatal au laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux, en respectant les exigences de la norme NF EN ISO 15189 version 2012 et les obligations réglementaires auxquelles est soumis tout examen de diagnostic prénatal.

Les objectifs de notre travail sont les suivants :

- Déploiement de la norme NF EN ISO 15189 version 2012 concernant les exigences techniques de cette analyse en particulier mais aussi de manière plus générale le management qualité
- Validation de la méthode PCR CMV dans le liquide amniotique
- Réponse aux exigences réglementaires du DPN
- Obtention de l'autorisation au DPN pour les biologistes responsables

Ce travail permettra la prise en charge locale et multidisciplinaire des patientes du centre de diagnostic prénatal (Service du Pr Saura) et le développement de la communication biologiste/clinicien au CHU de Bordeaux.

MATERIEL ET METHODES

1. Echantillons

Les échantillons utilisés pour notre étude sont des liquides amniotiques (LA) recueillis par amniocentèse dans le centre de diagnostic prénatal de l'hôpital Pellegrin du CHU de Bordeaux d'avril 2013 à février 2014, et conservés à -80°C. Au cours de cette période, 32 échantillons nous ont été adressés par le service du Pr Saura (annexe 1).

Ces échantillons anonymisés ont été testés au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux. En parallèle, ces LA ont été adressés à un laboratoire national autorisé pour le DPN, afin de comparer les résultats.

L'obtention de liquides amniotiques positifs en grande quantité étant difficile, nous en avons créé artificiellement en contaminant les LA négatifs (confirmation de la négativité par PCR en temps réel dans un laboratoire extérieur) avec une préparation virale de CMV. Cette préparation (souche HCMV Merlin), est le premier standard international CMV de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et commercialisée par le NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control). Cette solution est constituée de particules virales entières obtenues à partir de culture sur MRC5 et titrée à 5.10^6 UI/ml.

Ainsi nous avons constitué une gamme de dilutions de liquides amniotiques CMV positifs contenant 10^6 à 250 UI/ml.

Les essais ont été réalisés dans un même liquide amniotique (légèrement trouble, peu cellulaire et non hématique) dans un premier temps, puis répétés sur les LA des autres patientes dans un second temps (tableau des valeurs attendues et obtenues en annexe 2).

Les différents LA n'ont pas été poolés afin d'éviter d'éventuelles incompatibilités.

2. Extraction des acides nucléiques

Quelle que soit la PCR envisagée, les acides nucléiques doivent impérativement être extraits de l'échantillon avant de procéder à la phase d'amplification. L'extraction permet de libérer le matériel nucléaire intracellulaire, mais également d'éliminer tous les composés (protéines, lipides, polysaccharides, hème...) qui pourraient inhiber l'ADN polymérase. Les acides

nucléiques extraits sont élués dans un faible volume de solution aqueuse pour les conserver et maximiser la détection.

Il existe des méthodes manuelles et automatisées.

Le laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux dispose d'un automate d'extraction MagNA Pure 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne). La trousse commerciale utilisée en routine est le MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne). Le principe d'extraction est basé sur la lyse cellulaire par la protéinase K en tampon de lyse, puis la fixation des acides nucléiques à des billes magnétiques de silice. L'ADN et l'ARN sont ensuite élués à haute température dans une plaque de 96 puits, qui servira ensuite de support à la PCR (Figure 11).

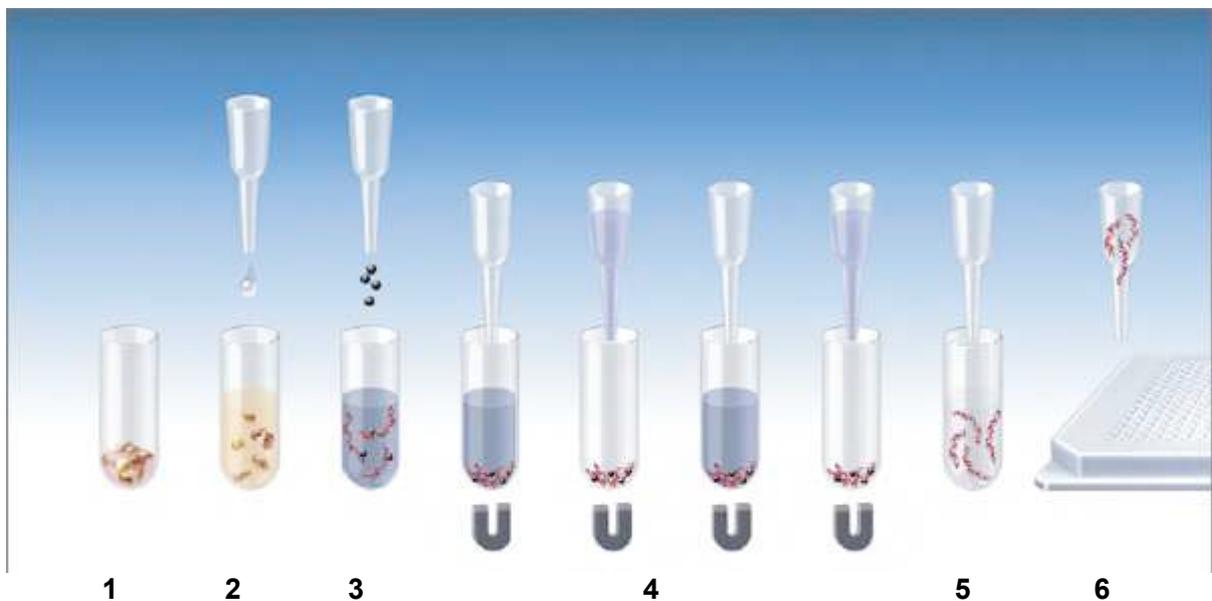


Figure 11 : Principe de l'extraction MagNA Pure 96 utilisant des billes magnétiques (Roche Diagnostics)

De gauche à droite :

1. Dépôt de l'échantillon dans le tube réactionnel
2. Lyse cellulaire et digestion protéique par addition de protéinase K en tampon de lyse
3. Ajout des billes magnétiques, fixation des acides nucléiques à leur surface
4. Étapes de lavage des billes
5. Elution des acides nucléiques
6. Microplaque 96 puits dans laquelle les éluats sont déposés

L'automate MagNA Pure 96 présente l'intérêt de pouvoir gagner un temps considérable par extraction de 96 échantillons en 1 heure. Il offre par ailleurs des performances satisfaisantes, et garantit, par son système fermé et automatisé, un moindre risque d'erreur et de contamination, une sécurité des données et une bonne reproductibilité.

Les LA ont été extraits selon le protocole Total Nucleic Acid (Total NA) à partir d'un volume d'échantillon de 200 µl et élués dans un volume final de 100 µl. Ils ont été intégrés dans la routine parmi tous les échantillons au cours de diverses séries, afin d'être représentatifs de la réalité du plateau technique.

3. Amplification des acides nucléiques

3.1. Principe

3.1.1. PCR

La méthode d'amplification des séquences nucléiques par PCR (Polymerase Chain Reaction) a été décrite en 1983 par Kary Mullis. Elle s'est implantée dans les laboratoires et a connu une importante évolution, afin d'être aujourd'hui automatisée et utilisée en routine (Espy *et al.*, 2006).

La réaction de PCR consiste à cibler une séquence d'ADN particulière dans un génome, de la recopier un grand nombre de fois et détecter ensuite la séquence amplifiée.

Afin de permettre la réaction de PCR, sont nécessaires dans le milieu réactionnel :

- L'ADN cible à amplifier
- Deux amorces, sens et anti-sens (« primers ») : ce sont des oligonucléotides (petits brins d'ADN d'environ 20 bases), capables de s'hybrider de façon spécifique grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN cible ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.
- L'enzyme permettant la réplication du brin d'ADN : Taq polymérase (TaqPol). Cette ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* a une température optimale d'action de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C. Elle synthétise, à partir d'une amorce, le brin complémentaire d'un ADN matrice.

- Quatre nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.

- Milieu tamponné : H₂O, sels (MgCl₂)...

La réaction comporte une cinquantaine de cycle comprenant chacun les 3 étapes suivantes (Figure 12) :

- Dénaturation : les deux brins de l'ADN cible sont séparés à 95°C

- Hybridation : les amorces s'hybrident chacune avec le brin dont elles sont complémentaires après diminution rapide de la température à 55°C

- Elongation : synthèse du brin complémentaire à partir des amorces par ajout successif des dNTPs dans le sens 5'-3'

A la fin de chaque cycle, l'ADN cible est copié, si bien qu'au bout de n cycles, on obtient théoriquement 2ⁿ copies (cop) ou amplicons.

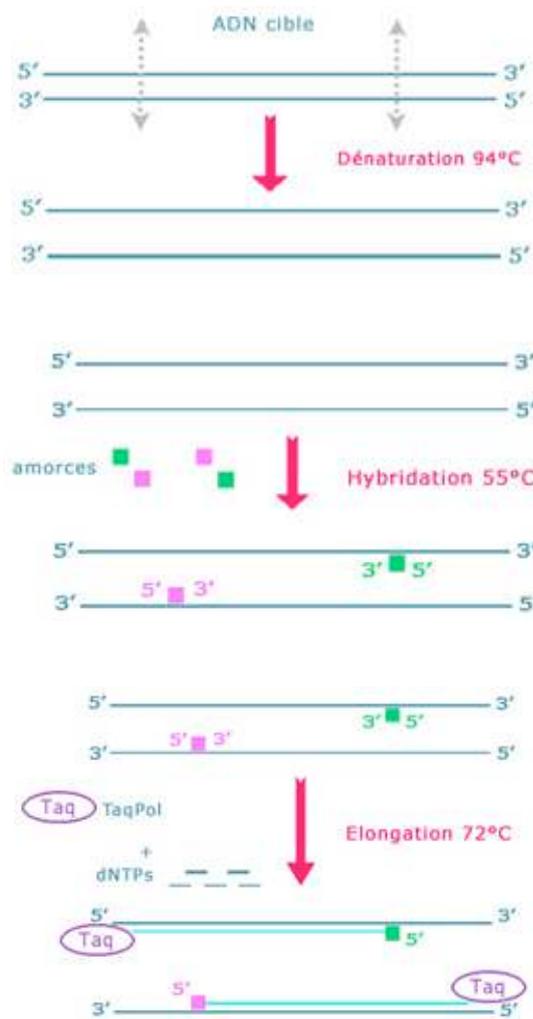


Figure 12 : Etapes de la PCR
 ("PCR en temps réel | www.ilm.pf," n.d.)

3.1.2. PCR temps réel

La PCR en temps réel combine amplification et détection simultanée des produits amplifiés. Elle utilise le principe de la PCR conventionnelle par l'amplification cyclique d'un fragment d'ADN et associe à chaque cycle d'amplification la mesure de la quantité d'ADN grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits (Espy *et al.*, 2006).

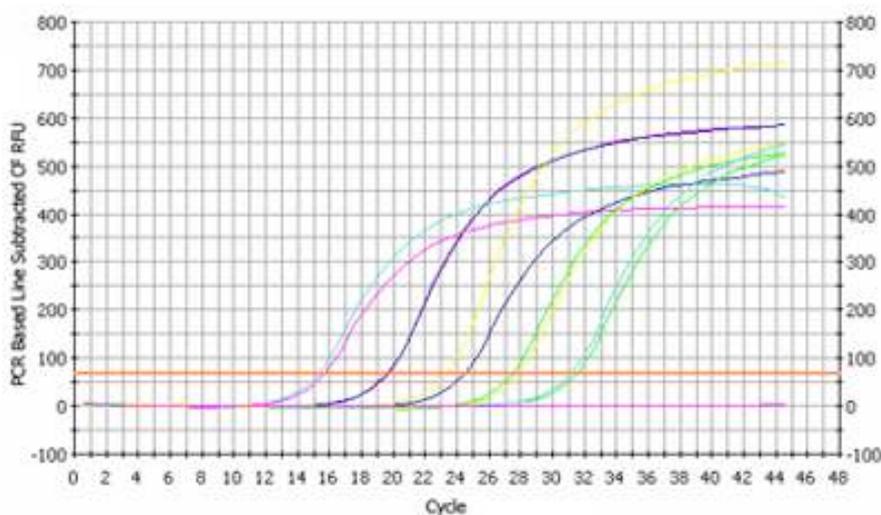


Figure 13 : Courbes d'amplification de PCR en temps réel

x : nombre de cycles ; y : fluorescence mesurée en RLU (Unité relatives de lumière)

("PCR en temps réel | www.ilm.pf," n.d.)

Cette cinétique correspond à une courbe d'allure sigmoïde (Figure 13) qui peut être divisée en 3 phases :

- Phase 1 : la fluorescence ne se démarque pas du bruit de fond.
- Phase 2 : augmentation de la fluorescence avec une phase exponentielle pendant laquelle la quantité de produit de PCR obtenue (ou fluorescence mesurée) est directement proportionnelle au nombre de copies initiales du fragment d'ADN amplifié.
- Phase 3 : phase en plateau avec un ralentissement de l'amplification dû le plus souvent à l'épuisement d'un des différents réactifs de la PCR comme les amorces.

Le cycle seuil (Ct) ou Threshold Cycle est défini comme le cycle à partir duquel le produit formé au cours de la PCR, mesuré par fluorescence, se distingue du bruit de fond de

fluorescence du mélange réactionnel. Ce Ct marque l'apparition du produit et le début de la phase exponentielle : il est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initialement présentes dans le milieu soumis à l'amplification. Plus le milieu est riche en ADN cible, plus le Ct sera précoce. La mesure en continu du signal fluorescent et la détermination du Ct permettent la quantification de l'ADN cible dans le prélèvement.

Le signal fluorescent est obtenu grâce à l'utilisation de sondes marquées (probes). Les sondes oligonucléotidiques couplées à un ou plusieurs fluorochromes, sont également complémentaires de l'ADN à amplifier, ce qui permet d'augmenter encore la spécificité de la technique. Au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux, la méthode de PCR CMV en temps réel utilisant le réactif CMV LightMix[®] Kit human Cytomegalovirus (hCMV) (TIB Molbiol, Berlin, Allemagne) et le thermocycleur LightCycler[®] 480 II Instrument (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Allemagne) est basée sur le système FRET.

Le système FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) utilise 2 sondes dont l'une est porteuse en 3' d'un fluorochrome émetteur et l'autre en 5' d'un fluorochrome accepteur (Figure 14). Les sondes sont choisies de façon à s'hybrider à leur séquence cible en n'étant séparées que de 1 à 5 bases. Lorsque les deux sondes sont séparées, le fluorochrome donneur n'émet qu'un bruit de fond de fluorescence. Lorsqu'elles sont hybridées à moins de 10 nucléotides de distances, la proximité des 2 fluorochromes permet le transfert de l'énergie du fluorochrome donneur vers le fluorochrome accepteur provoquant l'émission fluorescente de ce dernier (FRET). La fluorescence de l'accepteur, proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée, est mesurée en fin de phase d'hybridation.

Afin de vérifier la spécificité de la réaction de PCR, et donc l'amplification d'une seule séquence cible, une courbe de fusion peut être réalisée après les cycles de PCR. La température du milieu réactionnel est progressivement augmentée de 52°C à 95°C, et la fluorescence mesurée en fonction du temps. La dérivée primaire de cette courbe permet la détermination de la température de fusion (T_m) ou melting temperature, température à laquelle 50 % des doubles-brins d'ADN sont dénaturés. Le T_m est spécifique d'une séquence donnée.

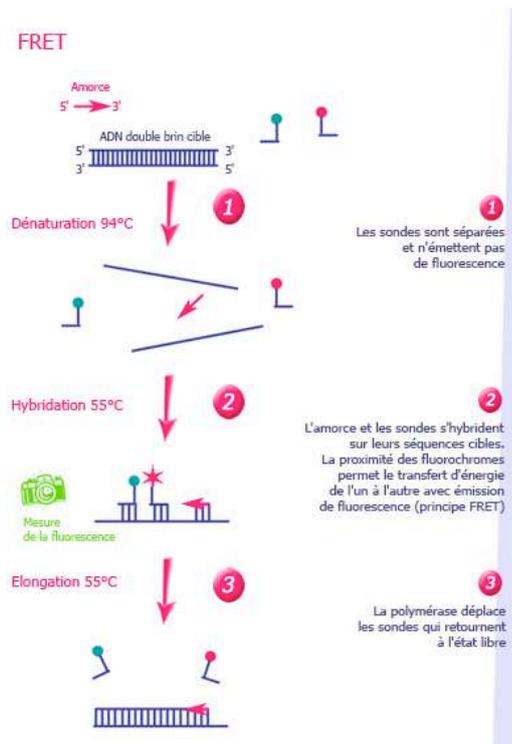


Figure 14 : Principe FRET
 ("PCR en temps réel | www.ilm.pf," n.d.)

3.2. Quantification

La quantification de la charge virale en copies d'ADN par ml dans le prélèvement est possible grâce à la mesure du Ct comparée à une gamme d'étalonnage.

Des extraits d'ADN (échantillons « Standards » de la trousse) contenant des concentrations connues d'ADN (de 2 à 6 log copies/ml) subissent la réaction de PCR et le Ct correspondant est mesuré. Une courbe d'étalonnage $Ct = f(\text{Log cop/ml})$ peut ainsi être tracée.

On sait qu'à chaque cycle de PCR, en considérant une efficacité de PCR égale à 2, la concentration en ADN dans le milieu réactionnel est multipliée par 2.

Soient :

- C_0 la concentration en ADN à t_0
- C la concentration en ADN après n cycles de PCR
- n le nombre de cycles de PCR

$$C = C_0 \cdot 2^n$$

$$\text{Log}(C/C_0) = n \text{ Log}2$$

Quand la quantité d'ADN est multipliée par 10 (1 log), on a :

$$n = \text{Log}10/\text{Log}2 = 3,3$$

Comme précisé précédemment, le Ct mesuré est inversement proportionnel au logarithme décimal de la charge virale. La courbe d'étalonnage $Ct=f(\text{Log charge virale})$ correspond à une droite de pente -3,3 (considérant l'efficacité de la PCR à 2). La détermination du Ct pour un échantillon donné permet donc de quantifier la charge virale de cet échantillon (Figure 15).

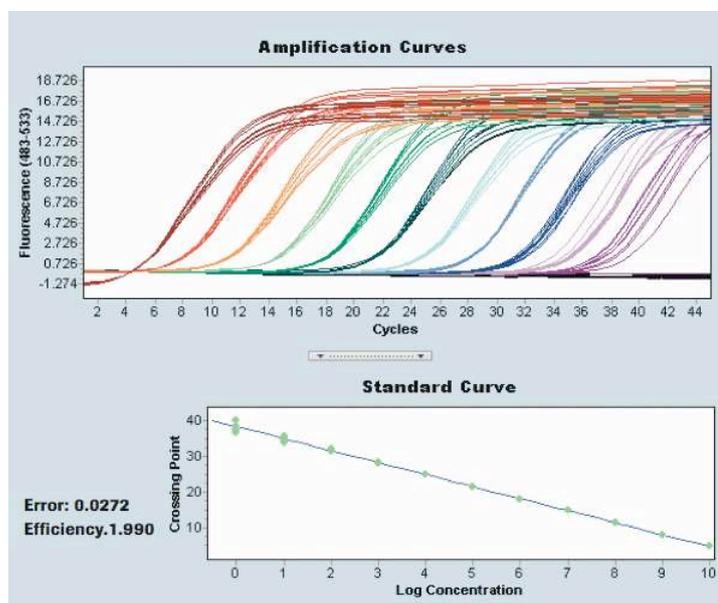


Figure 15 : Détermination de la courbe d'étalonnage en PCR en temps réel (Roche Diagnostics)

Ensuite, la quantification en Unités Internationales par ml (UI/ml) a été possible grâce à l'utilisation du standard CMV de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), constituée de particules virales entières obtenues à partir de culture sur MRC5 et titrée à 5.10^6 UI/ml. Le calcul recommandé par le Centre National de Référence (CNR) CMV et approuvé par le NIBSC est une moyenne géométrique de plusieurs essais. Il permet d'établir le facteur multiplicateur entre une charge virale en copies/ml et UI/ml pour une matrice donnée et une méthode donnée. Au laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux, le coefficient multiplicateur calculé permettant de convertir les copies/ml en UI/ml est de 0,84 pour le sang total. Ces données ont été extrapolées pour tout type de matrice.

3.3. Matériel utilisé

L'extraction est réalisée grâce à l'automate MagNA Pure 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) avec la trousse MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne). Ce couple automate/réactif marqué CE offre des performances tout à fait satisfaisantes pour l'extraction des acides nucléiques viraux du CMV dans différents types de matrice (Edelmann *et al.*, 2013). La sensibilité et la reproductibilité sont excellentes. La limite de détection est plus basse que la principale autre technique d'extraction automatisée disponible sur le marché (Roche diagnostics).

Les réactifs de PCR utilisés sont issus de la trousse LightMix® Kit *human cytomegalovirus (hCMV)* de la société TIB Molbiol (Berlin, Allemagne).

Les amorces ciblent et permettent l'amplification d'un fragment d'ADN de 226 pb situé sur le gène de la glycoprotéine B (UL55) du CytomégaloVirus humain (Schaade *et al.*, 2001).

Cette trousse présente l'intérêt d'associer une seconde réaction de PCR dans le mélange réactionnel, avec l'amplification d'un contrôle interne « IC » de 278 pb (ADN non humain).

Les sondes utilisées pour la détection des 2 séquences amplifiées utilisent la technologie HybProbes (chimie FRET). La fluorescence émise lors de l'hybridation est détectée par deux canaux différents.

La réaction de PCR est réalisée sur le thermocycleur LightCycler® 480 Instrument II de la société Roche Diagnostics (GmbH, Mannheim, Allemagne), compatible avec de nombreuses trousse (Espy *et al.*, 2006). L'appareil est programmé pour réaliser 50 cycles de PCR et une courbe de fusion en fin de réaction.

Le mélange réactionnel est constitué de 5µl d'échantillon d'ADN extrait, 4µl de solution de standard interne « IC » et 11 µl de MIX (Enzyme Roche Master, probes et primers, dNTPs...). Un témoin négatif (H₂O) et un échantillon standard de la trousse (témoin positif) sont testés dans chaque série afin de valider la réaction de PCR et ajuster la courbe d'étalonnage. L'analyse de l'IC de chaque échantillon permet de détecter un échec de la réaction dans le puits, le plus souvent lié à la présence d'inhibiteurs de PCR.

Les performances annoncées par le fournisseur sont les suivantes :

- Limite de détection : 10 copies pour 5 µl d'extrait, soit 1000 copies/ml d'échantillon primaire, soit 840 UI/ml (TibMolBiol, 2009)
- Limites de quantification : 10³ à 10⁷ copies/ml, soit 8,4.10² à 8,4.10⁶ UI/ml (TibMolBiol, 2009)

- Sensibilité analytique : 95,8% (95% CI, 89,6 à 98,8) (Schaade *et al.*, 2001)
- Spécificité analytique : 99% (95% CI, 94,8 à 99,8) (Schaade *et al.*, 2001)

4. Processus de Choix et Validation de la méthode

La méthode PCR CMV en temps réel dans le liquide amniotique appartient au processus diagnostique de l'infection congénitale à CMV. On retrouve dans ce processus d'autres méthodes comme la sérologie maternelle, l'échographie maternelle, l'analyse du sang foetal, l'analyse des urines du nouveau-né, etc.

L'objet de notre travail consiste en la validation de la méthode PCR CMV dans le LA, (avec ses trois phases pré-analytique, analytique, et post-analytique) et la mise en place de celle-ci au laboratoire.

Pour satisfaire aux obligations de la norme NF EN ISO 15189 version 2012 en terme de management qualité et exigences techniques, notre travail a été réalisé en suivant ces différentes étapes. Cette méthodologie est expliquée dans les documents d'aide à la validation : SH REF 02 (COFRAC, 2013), SH GTA 04 (COFRAC, 2011a), SH GTA 06 (COFRAC, 2012) et SH GTA 14 (COFRAC, 2011b)

- Expression du besoin initial :

Quels besoins nous ont amené à mettre en place cette nouvelle méthode au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux ?

- Choix de la méthode :

Quels réactifs et quels automates ont été choisis ?

- Analyse d'impact de la mise en place de la nouvelle méthode :

Quel impact aura la nouvelle méthode concernant le personnel du laboratoire, la qualité, la gestion de la métrologie et des équipements informatiques ?

- Méthode fournisseur ou maison ?

La méthode choisie est-elle une méthode fournisseur adaptée pour nos besoins ou est-ce une méthode maison développée spécifiquement pour répondre à notre demande?

- Validation de la méthode :

- **Description du processus analytique**
- **Définitions : mesurande, analyte, matrice...**
- **Critères de performance attendus :** Analyse de la bibliographie et recherche des informations pertinentes concernant la technique et ses performances, les paramètres à connaître impérativement, la significativité clinique, les limites d'acceptabilité.
- **Analyse et identification des points critiques :** définition et maîtrise des données d'entrée. C'est l'analyse de tous les points critiques pouvant avoir une influence sur le résultat d'analyse. Ces données peuvent être étudiées selon la méthode des 5M (Main d'œuvre, Milieu, Matériel, Méthode, Matière). L'identification de ces points critiques permet de mettre en œuvre les éléments essentiels à leur maîtrise.
- **Choix de la portée d'accréditation :** portée fixe, portée flexible standard A ou étendue B ?
- **Plan d'expérience et exploitation statistique :** choix des paramètres pertinents, réalisation du protocole de validation et vérification des performances analytiques sur site.
- **Conclusion sur l'aptitude initiale de la méthode**
- **Estimation de l'incertitude de mesure et analyse du risque résiduel :** permet d'estimer l'erreur aléatoire non prévisible, liée aux limites de la technique ou aux facteurs humains non maîtrisables.
- **Éléments de validation continue de la méthode :** exploitation des contrôles qualité internes (CIQ), de l'évaluation externe de la qualité (EEQ), réflexion sur la mise en place d'éléments de suivi pour repérer les tendances et dysfonctionnements.
- **Documents de sortie :** formalisation du travail accompli

Les résultats de ces différentes étapes du processus de choix et de validation de méthode sont exposés dans la partie suivante. L'objectif de ce processus est la mise en place de la méthode en routine.

RESULTATS

1. Expression du besoin initial

Comme nous l'avons vu précédemment, la PCR CMV dans le liquide amniotique est un examen de référence dans le diagnostic de l'infection congénitale à CMV. Le laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux a la maîtrise de la PCR CMV depuis de nombreuses années, mais n'est pas à l'heure actuelle autorisé au diagnostic prénatal, ce qui implique l'envoi des échantillons de liquide amniotique à des Laboratoires de Biologie Médicale (LBM) extérieurs. Réaliser cette analyse au CHU est un point fort pour la prise en charge des patientes avec un rendu de résultat rapide. Cet examen étant au cœur du processus diagnostique de l'infection congénitale à CMV, cela permet de réunir tous les éléments du dossier et améliorer localement la prise en charge multidisciplinaire de la patiente et de l'enfant.

2. Choix de la méthode

La première étape de la méthode consiste en la préparation de l'échantillon par extraction sur MagNA Pure 96 avec la trousse MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit. La deuxième étape est l'amplification/détection par le thermocycleur LightCycler® 480 II Instrument et la trousse TIB Molbiol LightMix® Kit human Cytomegalovirus (hCMV). Ces couples automate/réactif sont déjà utilisés en routine pour la PCR CMV dans une matrice différente : le sang total. La méthode sur sang total est validée et le personnel du laboratoire, médical ou technique, est habilité à son utilisation.

3. Analyse d'impact de la mise en place de la nouvelle méthode

Inclure les échantillons de liquide amniotique à l'activité de routine du laboratoire ne nécessite pas de changement dans l'organisation des postes de travail ni dans le flux des échantillons biologiques. Les équipements (y compris les équipements informatiques), et les réactifs sont les mêmes que pour la PCR CMV dans le sang total. En revanche la mise en place de cette nouvelle méthode dans le liquide amniotique, activité de diagnostic prénatal,

implique une nouvelle formation et habilitation du personnel, la mise en place de contrôles supplémentaires pour assurer la qualité du résultat, et une conservation des échantillons et résultats soumise à une réglementation différente. De plus, la validation biologique ne pouvant être effectuée que par un biologiste ayant reçu l'autorisation d'activité de DPN, une réorganisation de la validation, de l'édition de comptes-rendus et de la prestation de conseil est prévue.

4. Méthode fournisseur ou maison ?

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode dite « fournisseur » marquée CE (Conformité Européenne) prévue pour le liquide amniotique et disponible sur le marché. Dans un souci d'uniformisation, il a été choisi d'utiliser les mêmes couples automate/réactif que pour la PCR CMV dans le sang total et autres liquides biologiques (LCR, LBA, urine). Il s'agit donc d'une méthode adaptée à partir d'une méthode fournisseur sur un nouveau type d'échantillon : le liquide amniotique.

5. Validation de méthode

5.1. Description du processus analytique

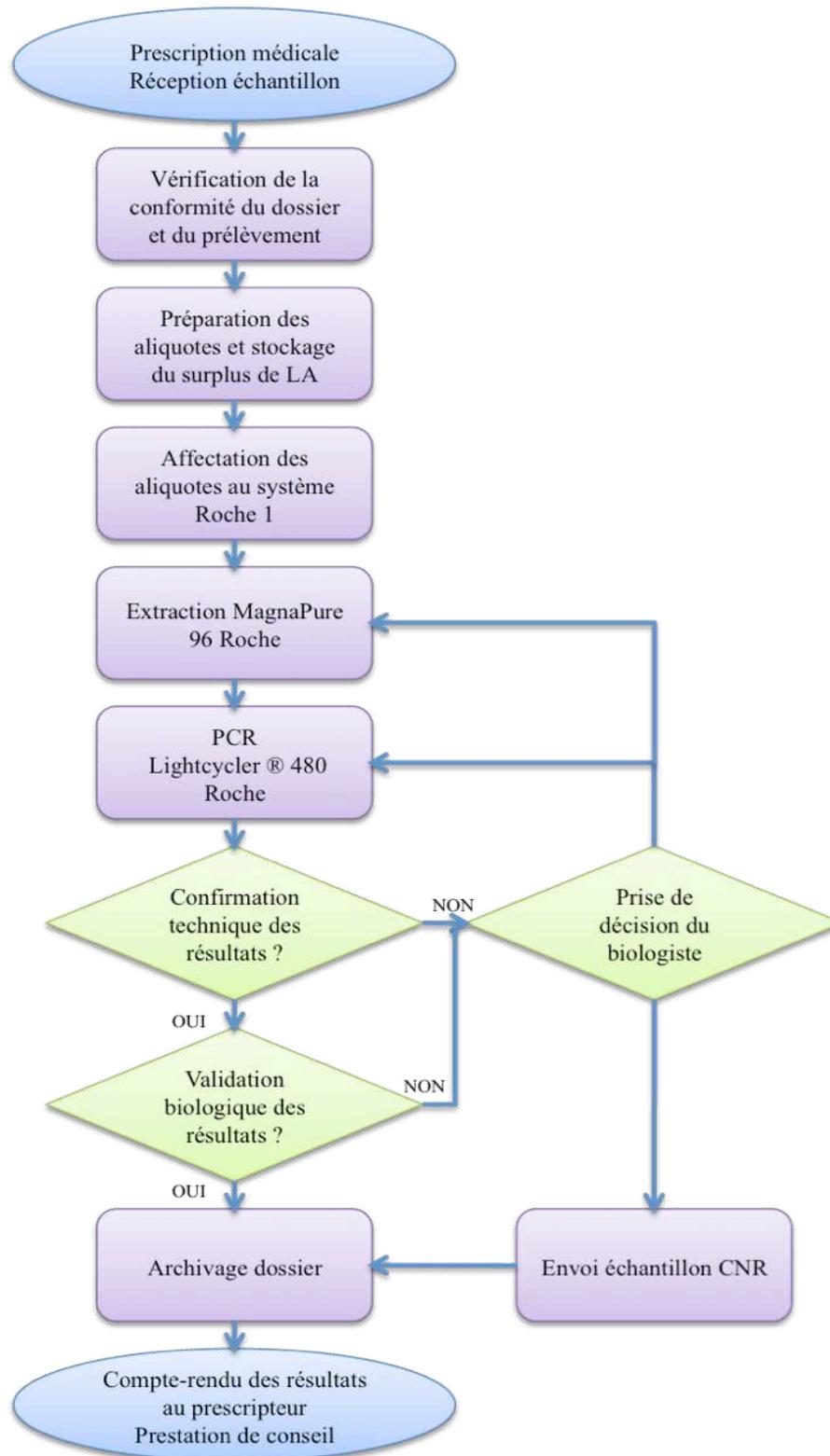


Figure 16 : Logigramme Processus analytique de la PCR CMV dans le LA

5.2. Définitions

Mesurande	Nombre de séquences nucléiques d'ADN CMV (en copies/ml, converti en UI/ml) : « Charge Virale »
Type de résultat	Quantitatif : ADN en UI/ml
Principe	Extraction, amplification et quantification des acides nucléiques CMV par PCR en temps réel
Echantillon primaire	Liquide amniotique (LA)
Contenants autorisés	Contenants stériles pour liquide amniotique
Conservation pré-analytique	A- Conservation des spécimens : REVIR 2007 : 24h à +4°C B- Conservation des réactifs : Selon recommandations des fournisseurs (Roche Diagnostics, TIB Molbiol)
Prétraitement de l'échantillon	Extraction des acides nucléiques contenus dans l'échantillon primaire (LA) et élution dans une matrice (solution aqueuse)
Matrice de la PCR	Extrait d'acides nucléiques en solution aqueuse (« Eluat »)
Instruments	Extraction sur MagNA Pure 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) et amplification sur LightCycler® 480 II Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne)
Réactifs	Trousse MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) et trousse LightMix® Kit human Cytomegalovirus (hCMV) (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Allemagne) (<u>non marquée CE</u>)
Valeur attendue	ADN non détectable (pas de signal après 50 cycles de PCR)
Méthode de mesure	Mesure de la fluorescence émise en fonction du nombre de cycles de PCR
Format des données brutes	Données qualitatives : longueur d'onde de la fluorescence mesurée en nm Données quantitatives : Intensité de fluorescence mesurée en RLU en fonction du temps

Etalonnage	Passage de 5 calibrants « standards » issus de la trousse LightMix ® Kit human Cytomegalovirus (hCMV) contenant 10^3 à 10^7 copies/ml pour réalisation de la courbe d'étalonnage à chaque changement de lot de réactifs
Contrôles internes	<p>Un contrôle positif dans chaque série : un des « standards » de la trousse</p> <p>Un contrôle négatif dans chaque série (H₂O)</p> <p>Un contrôle interne « IC » TIB Molbiol dans chaque échantillon testé (vérification de l'amplification du contrôle interne « IC » pour chaque échantillon testé) : absence d'inhibiteur de PCR</p> <p>Un CIQ « maison » : dilution du standard OMS à 1000 UI/ml dans un liquide amniotique testé CMV négatif → Vérification des étapes d'extraction et amplification</p>
Contrôles externes	Participation au programme européen d'évaluation externe de la qualité (EEQ) une fois par an : 10 à 12 échantillons QCMD « Quality Control for Molecular Diagnostics » (sang total) testés

5.3. Critères de performance attendus

La PCR CMV dans le LA est un examen de référence dans le diagnostic prénatal de l'infection congénitale à CMV. Son résultat conditionne en grande partie la prise en charge de la grossesse et le devenir de l'enfant. Le laboratoire et le biologiste responsables engagent une grande responsabilité pour la réalisation de cet examen de diagnostic prénatal, d'ailleurs soumis à une réglementation particulière. De part la nature précieuse du prélèvement, et l'importance du résultat, le biologiste attend de la méthode des critères de performance bien établis :

- Performance de la méthode dans son ensemble : aussi bien le prétraitement (extraction des acides nucléiques) que l'étape de mesure de fluorescence (amplification/quantification des acides nucléiques). En effet l'extraction est aussi une étape critique dans la méthode.
- Grande sensibilité analytique avec moyens mis en œuvre pour la détection des résultats faussement négatifs : contrôle du bon déroulement de chaque étape à l'aide de contrôles internes.

- Spécificité analytique : absence de contamination, spécificité de la méthode vis-à-vis des autres *herpesviridae* et absence de faux-positifs (détection de l'amplification non spécifique)
- Seuil de détection bas (< ou égal à 500 UI/ml)
- Stabilité des échantillons primaires pour la réalisation de la méthode

En revanche, l'étude de la bibliographie montrant des résultats discordants concernant l'intérêt pronostic de la charge virale dans le liquide amniotique, un coefficient de variation (CV) < 15% pour la quantification est tout à fait acceptable.

5.4. Analyse et identification des points critiques

L'analyse de chaque étape du processus a permis d'identifier les points critiques pouvant entraîner un risque sur la qualité des résultats. L'analyse selon la méthode des 5M (Matériel, Milieu, Méthode, Main d'œuvre et Matière) permet d'identifier de manière exhaustive chaque paramètre influençant le résultat. La criticité de ces défaillances est évaluée en fonction de leur fréquence de survenue, de la gravité des conséquences et de leur moyen de maîtrise. Un paramètre est jugé critique avec seuil d'alerte si la criticité est supérieure ou égale à 16, et il sera critique avec priorisation si la criticité est supérieure ou égale à 30.

L'analyse est en annexe 3.

5.5. Choix de la portée d'accréditation

Il s'agit d'une méthode quantitative adaptée. La portée choisie est de type flexible étendue (type B), « portée correspondant à une demande d'accréditation du LBM souhaitant avoir la possibilité, entre 2 visites d'évaluation du COFRAC, de mettre en œuvre sous accréditation, des méthodes qu'il a adaptées ou développées »

5.6. Plan d'expérience et exploitation statistique

Pour chaque paramètre de performance validé, les tests ont été effectués sur la méthode dans son ensemble, c'est-à-dire du prétraitement de l'échantillon à l'analyse en elle-même. Chaque échantillon subira donc pour chaque passage, les étapes d'extraction et d'amplification.

Au cours d'une PCR en temps réel, le signal est proportionnel au logarithme de la concentration en ADN viral. D'un point de vue clinique, les charges virales sont interprétées en log d'UI/ml. Ainsi les différents calculs sont réalisés sur les valeurs en log UI/ml.

Le liquide amniotique étant un prélèvement précieux, il a été décidé dans le plan d'expérience d'utiliser entre 5 et 20 aliquotes d'échantillon pour valider chaque paramètre.

5.6.1. Performances de quantification

Répétabilité

Test effectué	Etude de 2 échantillons (dilution du standard CMV OMS dans du liquide amniotique testé CMV négatif), de 2 niveaux de concentrations différents, testés chacun 10 fois pour chaque niveau, au cours d'une série unique				
Méthode de calcul	CV (%) = 100 x écart-type / moyenne				
Critères d'acceptation	CV acceptable en biologie moléculaire : <15%				
Résultats	Valeur cible (Log UI/ml)	Moyenne (Log UI/ml)	CV (%)	CV (%) acceptable	Acceptation
Niveau faible	3,00	3.09	12,00	15	Oui
Niveau élevé	5,00	5.15	1,45	15	Oui

Conclusion : Acceptable

Reproductibilité (Fidélité Intermédiaire)

Test effectué	Passage d'un même échantillon (de niveau faible) dans 5 séries différentes sur 5 jours, par différents opérateurs				
Méthode de calcul	CV (%) = 100 x écart-type / moyenne				
Critères d'acceptation	CV acceptable en biologie moléculaire : <15%				
Résultats	Valeur cible (Log UI/ml)	Moyenne (Log UI/ml)	CV (%)	CV (%) acceptable	Acceptation
Niveau faible	3,00	2.97	6,76	15	Oui

Conclusion : Acceptable

Approche de la justesse : Estimation de l'inexactitude

Test effectué	Passage de 5 échantillons EEQ (contrôles externes QCMD) une fois chacun			
Méthode de calcul	Inexactitude (%) = 100 x (valeur obtenue – valeur cible) / valeur cible			
Critères d'acceptation	Inexactitude < +/- 15%			
Résultats	Valeur cible (log UI/ml)	Valeur obtenue (log UI/ml)	Inexactitude (%)	Acceptation
QCMD 11-01	6,42	6,39	-0,58	Oui
QCMD 11-04	5,45	5,42	-0,51	Oui
QCMD 11-08	2,35	2,50	6,47	Oui
QCMD 11-11	3,60	3,36	-6,59	Oui
QCMD 12-01	4,39	4,91	12,1	Oui

Conclusion : Acceptable

Limite de détection

Test effectué	Passage de 3 échantillons à 250 UI/ml et 20 échantillons à 500 UI/ml
Méthode de calcul	Limite de détection = plus petite valeur pour laquelle au moins 95% des échantillons ont un résultat positif
Résultat	Echantillons à 250 IU/ml : 66% positifs Echantillons à 500 UI/ml : 100 % positifs

Conclusion : Limite de détection = 500 UI/ml soit 2,7 log UI/ml

Limite de quantification haute

Données fournisseur	La droite d'étalonnage est réalisée avec 5 points et couvre des concentrations de 3 à 7 log copies/ml
Résultat	Limite de quantification haute = 7 log copies/ml soit 6,92 log UI/ml

Conclusion : Limite de quantification haute = 6,92 log UI/ml

Limite de quantification basse

Données fournisseurs	La droite d'étalonnage est réalisée avec 5 points et couvre des concentrations de 3 à 7 log copies/ml
Résultat	Limite quantification basse = 3 log copies/ml soit 2,92 log UI/ml

Conclusion : Limite de quantification basse = 2,92 log UI/ml

5.6.2. Spécificité analytique

Recherche d'interférences

Données bibliographiques (Schaade *et al.*, 2001) : cette méthode de PCR amplifie spécifiquement un fragment d'ADN de 254 paires de bases (Genbank A13758) situé dans le gène de la glycoprotéine B, spécifique du CMV humain. La spécificité est renforcée par l'utilisation simultanée de deux amorces et de deux sondes FRET. De plus, la détermination de la température de fusion T_m permet de vérifier la spécificité du fragment amplifié.

Recherche de contaminations inter-échantillons

Test effectué	Passage dans une même série (sur une même plaque) de 10 échantillons fortement positifs à 4 log UI/ml (dilution du standard OMS dans un LA) et 10 échantillons de LA négatifs
Méthode de calcul	Les échantillons négatifs doivent impérativement être négatifs après extraction et amplification
Critères d'acceptation	Il ne doit y avoir aucune contamination
Résultats	Absence de contamination

Conclusion : Acceptable

Recherche de contaminations inter-réactifs

Non applicable : utilisation d'embouts à usage unique

5.6.3. Stabilité

Stabilité du mélange MIX - Enzyme - Eluat

Réactifs testés	Réactifs du mélange réactionnel MIX - enzyme - Eluat			
Test effectués	- Le mélange MIX - Enzyme - Eluat ne doit pas être conservé selon les données fournisseur (TibMolBiol, 2009) - Echantillons testés : gamme de standards « STD » de la trousse - Délais testés : t0 = PCR le matin, t+3h = PCR 3 heures plus tard, après mise en attente de la plaque de PCR (mélange MIX - Enzyme - Eluat) à température ambiante			
Méthode de calcul	$\text{Biais (\%)} = 100 \times (\text{moyenne t+3h} - \text{moyenne t0}) / \text{moyenne t0}$			
Critère d'acceptation	Biais < 15% sur les Ct			
Résultats	Echantillon	Moyenne à t0 (Ct)	Moyenne à t+3h (Ct)	Biais (%)
	STD 6	18,11	18,12	0,06
	STD 5	21,7	21,86	0,74
	STD 4	25,03	24,8	-0,20
	STD 3	28,4	25,52	-10,1

Conclusion : Acceptable. Une attente de trois heures à température ambiante ne modifie pas les valeurs de la gamme de standards. Le mélange MIX-Enzyme-Eluat peut être conservé pour une durée de 3h si besoin (problème informatique, indisponibilité du thermocycleur, urgence...). Au delà de 3h, une nouvelle plaque doit être préparée.

Stabilité des échantillons primaires

Données bibliographiques	REVIR (2007) : conservation 24h à +4°C		
Tests de vérification	2 échantillons de niveau faible (3 log UI/ml) (dilution du standard OMS dans 2 liquides amniotiques différents) Testés une fois à t0, puis une fois dans chaque condition de conservation : délai Δt de 24h ou 48h (t+24h et t+48h), à +4°C ou à température ambiante ($\theta+4^\circ\text{C}$ ou θ_{amb})		
Méthode de calcul	Biais (%) = $100 \times (\text{moyenne } \Delta t - \text{moyenne } t_0) / \text{moyenne } t_0$		
Critères d'acceptation	Biais acceptable pour chaque niveau de contrôle < +/- 15%		
Résultats	Condition	Moyenne (log UI/ml)	Biais (%)
	Conservation 24h à $\theta+4^\circ\text{C}$	2.86	3.6
	Conservation 24h à θ_{amb}	3.03	9.6
	Conservation 48h à $\theta+4^\circ\text{C}$	2.73	-1.2
	Conservation 48h à θ_{amb}	2.67	-3.3

Conclusion : Echantillons primaires stables à 48h même conservés à température ambiante

5.6.4. Comparaison à une autre méthode

Comparaison à une méthode existante	Test des 8 LA reçus entre Avril 2013 et Février 2014 au CHU de Bordeaux, et testés en parallèle dans un LBM extérieur. Comparaison à une méthode qualitative.		
Méthode de calcul	Comparaison qualitative des résultats : positif ou négatif		
Critères d'acceptation	Aucune discordance n'est acceptée		
Résultats	Valeur CHU Bordeaux	Valeur de comparaison	Acceptation
LA n°1 (11/04/2013)	Négatif	Négatif	Oui
LA n°2 (11/04/2013)	Négatif	Négatif	Oui
LA n°3 (26/04/2013)	Négatif	Négatif	Oui
LA n°4 (25/06/2013)	Négatif	Négatif	Oui
LA n°5 (27/03/2013)	7,13 log UI/ml	Positif	Oui
LA n°6 (04/09/2013)	Négatif	Négatif	Oui
LA n°7 (27/11/2013)	Négatif	Négatif	Oui
LA n°8 (11/02/2014)	7,72 log IU/ml	Positif	Oui

Conclusion : Acceptable, les résultats obtenus sont comparables qualitativement à la technique utilisée au LBM national autorisé.

5.7. Conclusion sur l'aptitude initiale de la méthode

Les résultats obtenus démontrent que la méthode utilisée au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux possède des performances tout à fait satisfaisantes en terme de sensibilité et spécificité analytiques. Cette méthode est validée initialement par le biologiste responsable de la réalisation du diagnostic prénatal de l'infection congénitale à CMV.

5.8. Estimation de l'incertitude de mesure et analyse du risque résiduel

Malgré les éléments de maîtrise mis en œuvre pour garantir la qualité de la méthode, il persiste un risque résiduel pouvant affecter les résultats. Il s'agit d'un risque aléatoire associé à l'erreur systématique. L'objectif de ce point de validation de méthode est d'estimer ce risque par l'incertitude de mesure, et de relever les risques en essayant de les prévenir.

L'estimation de l'incertitude de mesure de cette méthode quantitative ne présente pas de réel intérêt pour l'interprétation du résultat et la prise en charge des patientes. En effet la charge virale CMV dans le liquide amniotique ne représente pas un marqueur pronostic pour le nouveau-né (études bibliographiques discordantes à ce sujet (Avettand-Fenoël *et al.*, 2013). En revanche, l'estimation de l'incertitude est un critère de performance initiale supplémentaire de la méthode, et sa réévaluation périodique est également un élément de suivi. Sa détermination permet de connaître le niveau de confiance dans l'analyse.

Elle a été calculée selon la méthode « CIQ + EEQ » issue du SH-GTA-14. Cette méthode prend en compte l'incertitude « U(CIQ) » liée à l'erreur aléatoire (estimée par la fidélité intermédiaire) et l'incertitude « U(EEQ) » liée à l'erreur systématique (représentée par l'approche de la justesse) et permet par une moyenne quadratique de déterminer l'incertitude de mesure totale « U(C) ».

Echantillons utilisés pour le calcul	CIQ (fidélité intermédiaire) et 24 échantillons EEQ (approche de la justesse)			
Méthode de calcul	Méthode CIQ + EEQ selon le SH-GTA-04			
Critères d'acceptation	Incertitude U(C) < +/- 1 Log UI/ml : pas d'incidence clinique			
Résultats	U(CIQ) (log UI/ml)	U(EEQ) (log UI/ml)	U(C) (log UI/ml)	Acceptation
	0,20	0,64	0,67	Oui

Conclusion : Acceptable

5.9. Éléments de validation continue (suivi des performances de la méthode)

La méthode a montré initialement ses performances et a été déclarée apte. Cependant, il est indispensable de mettre en place des éléments de suivi pour la validation continue, dans le but de repérer des dérives et des tendances.

Suivi du CIQ :

Un premier lot de CIQ « maison » a été « fabriqué » à partir d'un liquide amniotique disponible en grande quantité dans lequel nous avons dilué le standard CMV OMS pour obtenir une concentration de 1000 UI/ml (3,00 log UI/ml). Ce CIQ a été initialement testé afin de montrer la concordance entre la valeur obtenue et la valeur attendue par un test statistique unilatéral (tableau des valeurs en annexe 4).

Test de Student unilatéral : comparaison d'une moyenne observée μ_0 à une valeur théorique m (on considère la distribution normale et les variances non significativement différentes)

Soient :

- μ_0 : moyenne observée du CIQ
- m : valeur théorique (3,00 log UI/ml)
- t_0 : paramètre calculé
- n : nombre d'échantillon
- s : écart type estimé
- $t_{\text{table 4 ddl}}$: paramètre de la loi de student à $n-1$ ddl ($t_{\text{table 4 ddl}} = 2,776$)

Hypothèse H_0 : $\mu_0 = m$

La concentration en ADN du CIQ maison est de 3,00 log UI/ml

Calcul t_0 : $t_0 = (m - \mu_0) / (s / \sqrt{n}) = (3,00 - 3,01) / (0,25 / \sqrt{n}) = 0,133$

Comparaison t_0 à $t_{\text{table 4 ddl}}$:

$t_0 < t_{\text{table 4 ddl}}$: H_0 acceptée, il n'existe pas de différence significative

Le lot de CIQ maison possède bien la valeur attendue de 3,00 log UI/ml. Conservé à -80°C l'ADN est stable, il sera donc utilisé dans chaque série de PCR CMV dans laquelle un liquide amniotique est analysé.

EEQ et réévaluation de l'incertitude de mesure :

Le laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux participe à un programme européen d'évaluation externe de la qualité EEQ « Quality Control for Molecular Diagnostics » (QCMD). Chaque année, 12 échantillons QCMD (échantillons de sang total CMV positifs et négatifs) sont analysés « en aveugle » comme des échantillons patients. Le laboratoire évalue ainsi la justesse de ses résultats en se comparant avec ses pairs.

De plus, en fonction des résultats des EEQ, l'incertitude de mesure sera réestimée chaque année.

Suivi des indicateurs qualité :

Deux indicateurs qualité sont suivis afin de détecter des tendances dans l'efficacité du processus diagnostic.

- délais de rendu des résultats
- non conformités : pré-analytiques, analytiques et post-analytiques (non conformité de l'échantillon primaire, échec PCR détectée par la négativité du contrôle interne, suivi des réactifs, non conformité dans le rendu du résultat au prescripteur, etc.)

En fonction des résultats de suivi, des actions correctives et préventives seront mises en place, comme une nouvelle formation/habilitation du personnel par exemple.

Suivi individuel de chaque dossier :

Pour chaque analyse réalisée dans le liquide amniotique, un suivi est obligatoire (article L2131-2 du CSP) afin d'établir un rapport annuel des résultats à communiquer à l'Agence de Biomédecine. Une fiche de suivi est mise en place et l'issue de chaque grossesse ayant eu recours au DPN (annexe 7).

5.10. Documents de sortie

Les données de sortie du processus de validation de méthode sont représentées par des documents qui formalisent le travail accompli (certains documents sont annexés pour exemple) :

- Rapport de validation de la méthode et certificat d'aptitude
- Procédure analytique (annexe 5) et modes opératoires

- Fiches de formation/habilitation du personnel
- Documents d'enregistrement des non-conformités (fiche spécifique conformité des échantillons primaires de LA, et fiche générale au laboratoire)
- Instruction pour la validation biologique (annexe 6)
- Modèle de compte-rendu
- Fiche de suivi des grossesses (annexe 7)

En parallèle, le dossier d'autorisation au DPN, qui regroupe ces résultats et des données administratives a été rédigé. Il sera envoyé prochainement à l'ARS Aquitaine.

6. Mise en place de la méthode en routine

La méthode étant validée, le personnel étant formé, habilité, et la documentation gérée, la méthode peut être utilisée en routine au laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux après l'obtention de l'autorisation légale délivrée au laboratoire et biologistes responsables.

L'utilisation de cette méthode au laboratoire est le résultat (la valeur ajoutée) du processus de choix et validation de méthode.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Réflexion sur le processus « choix et validation de méthode » et ses résultats :

La validation de méthode a été réalisée en concertation avec différents acteurs du laboratoire de Virologie et du Pôle Biologie du CHU de Bordeaux (Biologistes, Référent Assurance Qualité (RAQ) du Pôle Biologie, Ingénieur Technique, Techniciens et Internes). Ce travail d'équipe était nécessaire afin de réfléchir sur les démarches de validation initiale et continue à entreprendre afin de répondre aux exigences de la norme NF EN ISO 15189 version 2012.

Notre travail s'est porté sur la validation des couples réactifs (non marqués CE) / automates pour un seul type d'échantillon primaire : le liquide amniotique. Les automates (extracteur et thermocycleur) et trousse n'ont pas été validés initialement. De même, les trousse de réactifs n'étant pas marqués CE, il faudrait avant toute utilisation valider les durées de conservation des réactifs spécifiées par le fournisseur.

La première difficulté rencontrée est qu'il n'existe pas, au niveau du pôle biologie, de procédure formalisée explicitant le processus de choix, validation de méthode, et gestion de la portée flexible. Tout le processus a donc été défini au préalable et nous a pris du temps supplémentaire. La logique et le raisonnement suivis sont largement inspirés des documents COFRAC d'aide à l'accréditation SH REF 02, SH GTA 04, 06 et 14. La procédure est à créer rapidement afin de servir de base à tous les biologistes qui souhaitent valider les méthodes dans leur service. Cela permettra d'harmoniser les pratiques et garantir une rigueur certaine dans le travail de validation.

Le liquide amniotique (tout comme le LCR) est un prélèvement rare et précieux (contrairement aux échantillons de sang total, de serum ou d'urine faciles à obtenir). De ce fait les performances de la méthode ont été testées sur des petites séries d'échantillons (5 à 20 selon les cas). Les résultats obtenus sont très satisfaisants, mais la significativité n'a pas été déterminée.

De plus, nous avons été confrontés à d'autres problématiques qui ont compliqué l'interprétation des résultats :

- Nous ne disposons pas de LA positifs CMV en assez grande quantité pour les tests de performances. Nous avons utilisé le standard OMS pour la confection des échantillons

positifs. Ce standard international étant une solution de particules virales titrée, nous avons considéré ces échantillons comme une référence.

- Il n'existe pas d'évaluation externe de la qualité (EEQ) pour le CMV dans le liquide amniotique. Les seuls échantillons disponibles sont des échantillons de sang total ; la matrice est différente. Nous avons donc du considérer que la matrice n'avait pas d'influence pour utiliser ces résultats d'EEQ.

- Il n'existe pas de CIQ commerciaux. Ce problème a été rapidement résolu par l'utilisation du standard OMS dilué dans un LA négatif. Ce CIQ « maison » a été testé et correspond à nos attentes en terme de stabilité et valeur.

- Il n'y a pas de témoin d'extraction pour chaque échantillon. En effet, le contrôle interne « IC » est ajouté à l'extrait et non pas à l'échantillon primaire. L'analyse de l'IC permet de détecter la présence d'inhibiteur mais pas un échec de l'extraction. De ce fait, pour assurer la sécurité de cette étape de prétraitement critique, il a été décidé de tester en parallèle dans chaque série le CIQ maison, et de tester chaque échantillon 3 fois simultanément.

- Nous n'avons pas de méthode de comparaison disponible au laboratoire. La culture est une très bonne alternative à la technique de PCR, mais elle n'est plus réalisée au CHU de Bordeaux. Néanmoins, l'analyse de la bibliographie à ce sujet a prouvé les très bonnes performances de ces deux méthodes d'analyse, la PCR apparaissant légèrement plus sensible mais un peu moins spécifique (Gouarin *et al.*, 2001). Cependant, nous avons pu comparer nos résultats avec ceux d'un LBM autorisé pour le DPN CMV (phase de tests entre avril 2013 et février 2014, annexe 1). Les résultats étaient tous concordants.

Malgré ces limites, l'expérience du biologiste responsable de la validation de méthode et du DPN, concernant la connaissance de la technique et l'interprétation médicale des résultats, a servi d'arbitre pour certifier l'aptitude initiale de la méthode.

La méthode ayant été approuvée initialement, il est maintenant important de suivre les éléments de validation continue. La procédure de validation continue des méthodes n'est pas formalisée au CHU, ce document doit là encore être rédigé pour homogénéiser les pratiques.

La maîtrise continue du processus PCR CMV dans le liquide amniotique passe par le suivi des indicateurs, des CIQ, des EEQ à l'aide de fiches d'indicateurs. Les données d'entrées doivent être maîtrisées, en particulier le personnel qui doit être formé, habilité et faire preuve de rigueur. La gestion documentaire est prévue : revue des documents et mise à jour. De plus, des cycles d'audit interne sont organisés dans le laboratoire pour l'amélioration continue.

En conclusion, la méthode a démontré des performances très satisfaisantes et a été validée. Les éléments de suivi vont permettre leur maintien dans le temps, et même une amélioration continue du processus.

Intrinsèquement, la méthode maîtrisée correspond à nos attentes et nos besoins, et est conforme aux limites d'acceptabilité fixées. L'autorisation au DPN est en cours de demande. Notre réflexion s'intéresse maintenant aux limites et à l'interprétation médicale du résultat de la PCR CMV dans le liquide amniotique.

Quelles sont les limites de la PCR CMV dans le LA dans le cadre du DPN de l'infection congénitale ?

Lorsqu'il existe un risque élevé d'infection congénitale, mis en évidence par une sérologie maternelle en faveur d'une primo-infection et/ou des anomalies échographiques évocatrices chez une femme séropositive, le DPN par amniocentèse peut être proposé. C'est en effet le seul examen (avec la ponction de sang fœtal, beaucoup moins pratiquée) qui permette d'établir le diagnostic d'infection congénitale avant la naissance. Cependant, malgré les performances prouvées de la méthode, l'histoire naturelle de l'infection virale (liée à des facteurs de l'hôte ou du virus) n'est pas maîtrisée. De ce fait, la sensibilité et la spécificité diagnostiques ne sont pas parfaites, mais cela n'est pas lié à la méthode.

Pour améliorer les performances du DPN et limiter le nombre de faux-positifs (FP) et faux-négatifs (FN), deux conditions sont impérativement requises :

- Méthode performante : la méthode de PCR en temps réel utilisée a montré des performances satisfaisantes correspondant aux limites d'acceptabilité fixées, et les risques au laboratoire sont maîtrisés (cf ci-dessus)

- Moment du prélèvement, au moins 6 semaines après la survenue de la primo-infection, et au moins après 21-22 SA

Malgré ces précautions, il persiste le risque non prédictible lié à divers paramètres en particulier l'histoire naturelle de l'infection et la cinétique de la transmission materno-fœtale qui ne sont à l'heure actuelle pas totalement élucidées. Ce risque est aléatoire.

Risque de faux-positif:

Le FP « diagnostique » est défini par un résultat positif dans le LA, et un enfant non infecté à la naissance. Le principal risque de résultat faussement positif est lié à une contamination par le sang maternel lors de la ponction de liquide amniotique. Afin d'éliminer ce risque, il est

souhaitable, si possible, de réaliser une charge virale CMV dans le sang maternel avant la ponction. En pratique cela n'est pas fait.

Le second risque de FP est « analytique », par contamination du puits lors de la réalisation de la plaque de PCR. Notre méthode n'a pas montré de contamination inter-échantillon mais on ne peut exclure ce risque. Pour le prévenir, nous avons décidé d'analyser 3 échantillons simultanément sur la même plaque.

Risque de faux-négatif:

Le FN « diagnostique » est défini par un résultat négatif dans le LA, et un enfant infecté à la naissance (Bodéus *et al.*, 1999). Ces FN peuvent être liés à deux situations cliniques particulières, difficilement différenciables.

- Charge virale faible : c'est le cas des transmissions materno-fœtales tardives. Notre méthode a montré une limite de détection de 500 UI/ml, mais il est possible de détecter l'ADN en dessous de ce seuil de façon aléatoire. Effectuer la PCR sur 3 échantillons de liquide amniotique permet de multiplier les chances de détecter un échantillon faiblement positif.

- Transmission fœtale au moment de l'amniocentèse : au moment du geste, le fœtus est non contaminé, donc le liquide amniotique est négatif. Cependant, à l'issue de la ponction, le virus est transmis, le nouveau-né naîtra donc infecté. En pratique ce risque n'est pas majeur mais ne peut être exclu (Revello *et al.*, 2008).

Il existe également un risque de FN « analytique », lié à un échec de l'extraction ou de la PCR. L'utilisation d'un contrôle interne (IC) dans chaque puits, d'un contrôle négatif, et le passage de 3 échantillons simultanément permet de détecter ces FN techniques.

Les FP et FN « analytiques » sont maîtrisés, comme l'a prouvé notre travail de validation de la méthode.

En revanche les FP et FN « diagnostiques » représentent un risque aléatoire. Pour limiter ce risque, l'utilisation d'une autre méthode est inutile. Afin de garantir la sensibilité et la spécificité diagnostique, il faut se placer dans les conditions idéales pour le prélèvement et réserver la réalisation de la méthode PCR CMV dans le LA dans une population à risque : il n'y a pas lieu d'effectuer le DPN chez une femme séronégative. En effet dans certains cas de malformations fœtales inexplicées, la PCR CMV fait partie d'un ensemble d'investigations multiples dans le liquide amniotique (infectieuses, génétiques, etc...). La sérologie maternelle n'est pas toujours déterminée avant la prescription de la PCR dans le LA.

Connaissant ces risques liés au geste et les difficultés d'interprétation des résultats, le DPN doit être discuté. Le risque de fausse-couche n'est pas négligeable (environ 0,5 à 1%) et il n'existe pas de traitement disponible pour le moment, ni pour prévenir la transmission materno-fœtale, ni pour limiter l'atteinte fœtale. Le geste est également anxiogène et aucune issue « thérapeutique » n'est proposée hormis l'IMG. Cependant, l'infection congénitale à CMV étant la première cause de malformations congénitales en France et un véritable problème de santé publique, cet examen doit être maintenu. Le DPN n'est pas obligatoire, il est proposé et soumis à un consentement éclairé des parents.

Se pose la question de renouveler l'amniocentèse à quelques semaines d'intervalle en cas de problème d'interprétation des résultats. En pratique, dans les cas les plus symptomatiques, une autre méthode diagnostique prénatale est réalisée chez le fœtus par cordocentèse. La virémie déterminée dans le sang fœtal complète l'analyse du liquide amniotique pour le DPN. Divers marqueurs de souffrance fœtale (numération des PNN, plaquettes, hémoglobinémie, marqueurs de cytolysé hépatique...) sont également mesurés. Bien qu'il n'existe pas pour le moment de marqueur consensuel permettant d'évaluer le pronostic à la naissance (G Benoist *et al.*, 2008; Fabbri *et al.*, 2011), ces résultats permettent de discuter la suite de la prise en charge de la grossesse.

Dans tous les cas, le diagnostic est systématiquement confirmé à la naissance (ou sur autopsie fœtale).

Analyse rétrospective des résultats de PCR CMV dans le liquide amniotique au CHU de Bordeaux :

Sur la période d'Avril 2013 à Février 2014, le service du Pr Saura nous a fourni 8 échantillons de liquide amniotique correspondant à des suspicions d'infection congénitale à CMV. Ces LA ont également été envoyés à un laboratoire extérieur autorisé pour le DPN, qui a établi le diagnostic. Nous avons également reçu 24 échantillon de LA non suspect d'infection congénitale à CMV.

Le laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux n'étant pas autorisé au DPN, les résultats obtenus n'ont pas été communiqués au médecin prescripteur, mais leur analyse permet d'avoir une première approche de la démarche du DPN au laboratoire.

Ces échantillons ont été traités parmi la routine du laboratoire en se plaçant dans les conditions prévues pour le DPN, décrites dans les modes opératoires/instructions relatifs à la méthode d'analyse.

D'un point de vue technique, il n'y a pas eu de difficulté rencontrée lors des différentes étapes de la méthode : absence d'inhibiteurs de PCR, succès de l'extraction, succès de la PCR, bonne organisation du flux des échantillons et du stockage.

L'interprétation du résultat et la validation biologique sous la responsabilité des biologistes en charge du DPN n'ont pas engendré de problème particulier. Les 3 résultats de chacun des échantillons positifs étaient reproductibles. Nous n'avons retrouvé aucun résultat positif pour tous les échantillons négatifs passés en triplicate. La comparaison *a posteriori* avec les résultats du LBM extérieur autorisé au DPN n'a montré aucune discordance.

Parmi les 24 LA non suspects d'infection à CMV, il n'y a eu aucun échec d'extraction, et nous n'avons pas retrouvé d'inhibiteurs de PCR. Tous les résultats obtenus sont négatifs ce qui correspond aux résultats attendus (absence de FP).

Afin de faire face à toute éventuelle difficulté dans la technique ou dans l'interprétation biologique, une instruction explicitant la conduite à tenir a été rédigée (annexe 6). De plus, dans l'attente de l'autorisation pour le DPN, le laboratoire de virologie du CHU de Bordeaux continue à effectuer des essais de PCR CMV dans le LA en comparant ses résultats à ceux du laboratoire extérieur.

Commentaire sur la réalisation de ce travail :

La mise en place d'une nouvelle méthode diagnostique au laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux est une opportunité dans la démarche d'accréditation. La réflexion sur la démarche de choix et validation de méthode a été longue, mais a permis aux membres du groupe de travail (y compris moi-même) d'illustrer et appliquer la norme NF EN ISO 15189. Pendant ces quelques mois durant lesquels nous avons réalisé les essais de validation de méthode, le personnel technique s'est investi afin d'intégrer ce travail supplémentaire à l'activité de routine. La rédaction des documents, qui formalise le travail accompli, a été faite par un nombre très limité de personnes, certainement lié au fait que le personnel du laboratoire n'était pas formé à la gestion documentaire, et cela a pris un temps considérable. Je pense que ce travail est un grand pas dans la démarche qualité. L'objectif est de former tout le personnel du laboratoire pour impliquer le plus grand nombre afin d'avancer plus rapidement dans le processus d'accréditation du laboratoire du CHU de Bordeaux et également répondre à l'obligation de 50 % des analyses accréditées au 1^{er} Novembre 2016.

CONCLUSION

Pour conclure, nous retiendrons que la méthode PCR en temps réel CMV dans le liquide amniotique est l'outil de choix dans le diagnostic prénatal de l'infection congénitale à CMV. La méthode choisie et mise en place au laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux correspond à nos attentes et nos besoins et répond à la politique de déploiement de la norme NF EN ISO 15189. L'accréditation de cette méthode et l'obtention de l'autorisation au DPN sont les objectifs du laboratoire.

Dans la démarche du diagnostic prénatal, les facteurs techniques sont maîtrisés, la méthode a démontré ses performances initialement et est validée. Le laboratoire s'engage dans la validation continue. Un DPN bien mené combinant des conditions de prélèvement optimales et une méthode diagnostique performante permet d'obtenir d'excellentes sensibilité et spécificité diagnostiques.

Cependant, certains facteurs liés à l'histoire naturelle du virus, à la transmission materno-fœtale et au geste d'amniocentèse sont à prendre en compte et peuvent compliquer l'interprétation du dossier. C'est ici que le rôle du biologiste médical responsable du DPN prend tout son sens, par son expertise technique et médicale, et le dialogue qu'il établit avec le clinicien.

Dans la poursuite de ce travail, les biologistes responsables du DPN s'impliquent dans l'amélioration continue de cet examen de biologie médicale, en se tenant informés de toute nouvelle technologie innovante et en recherchant des méthodes toujours plus performantes.

Au delà du diagnostic de l'infection congénitale à CMV, il est important d'améliorer la prise en charge des cas d'infections congénitales à CMV par la détermination de marqueurs pronostic fiables de l'infection fœtale et en proposant un traitement efficace capable de prévenir la transmission materno-fœtale et de limiter les séquelles chez les enfants.

BIBLIOGRAPHIE

- Ablashi, D., Agut, H., Alvarez-Lafuente, R., Clark, D.A., Dewhurst, S., Diluca, D., Flamand, L., Frenkel, N., Gallo, R., Gompels, U.A., Höllsberg, P., Jacobson, S., Luppi, M., Lusso, P., Malnati, M., Medveczky, P., Mori, Y., Pellett, P.E., Pritchett, J.C., Yamanishi, K., Yoshikawa, T., 2013. Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses. *Arch. Virol.* doi:10.1007/s00705-013-1902-5
- AFNOR, 2012. NF EN ISO 15189 Laboratoires de biologie médicale, Exigences concernant la qualité et la compétence.
- Amir, J., Wolf, D.G., Levy, I., 2010. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection with intravenous ganciclovir followed by long-term oral valganciclovir. *Eur. J. Pediatr.* 169, 1061–1067. doi:10.1007/s00431-010-1176-9
- ANAES, 2004. Évaluation de l'intérêt du dépistage de l'infection à cytomégalovirus chez la femme enceinte en France.
- Arora, N., Novak, Z., Fowler, K.B., Boppana, S.B., Ross, S.A., 2010. Cytomegalovirus viraemia and DNAemia in healthy seropositive women. *J. Infect. Dis.* 202, 1800–1803. doi:10.1086/657412
- Avettand-Fenoël, V., Marlin, S., Vauloup-Fellous, C., Loundon, N., François, M., Couloigner, V., Rouillon, I., Drouin-Garraud, V., Laccourreye, L., Denoyelle, F., Guilleminot, T., Grabar, S., Leruez-Ville, M., 2013. Congenital Cytomegalovirus Is the Second Most Frequent Cause of Bilateral Hearing Loss in Young French Children. *J. Pediatr.* 162, 593–599. doi:10.1016/j.jpeds.2012.08.009
- Avidor, B., Efrat, G., Weinberg, M., Kra-oz, Z., Satinger, J., Mitrani-Rosenbaum, S., Yaron, Y., Shulman, L., Tepperberg-Oikawa, M., Wolf, D., Berger, S.A., Lipitz, S., Mendelson, E., Giladi, M., 2004. Insight into the intrinsic sensitivity of the PCR assay used to detect CMV infection in amniotic fluid specimens. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 29, 260–270. doi:10.1016/S1386-6532(03)00166-5
- Barbi, M., Binda, S., Caroppo, S., Calvario, A., Germinario, C., Bozzi, A., Tanzi, M.L., Veronesi, L., Mura, I., Piana, A., Solinas, G., Pugni, L., Bev??laqua, G., Mosca, F., 2006. Multicity Italian Study of Congenital Cytomegalovirus Infection: *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25, 156–159. doi:10.1097/01.inf.0000199261.98769.29
- Benoist, G., Jacquemard, F., Leruez-Ville, M., Ville, Y., 2008. Infection congénitale à Cytomégalovirus (CMV). *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 36, 248–260. doi:10.1016/j.gyobfe.2008.01.004
- Benoist, G., Leruez-Ville, M., Magny, J.F., Jacquemard, F., Salomon, L.J., Ville, Y., 2013. Management of pregnancies with confirmed cytomegalovirus fetal infection. *Fetal Diagn. Ther.* 33, 203–214. doi:10.1159/000342752
- Benoist, G., Salomon, L.J., Jacquemard, F., Daffos, F., Ville, Y., 2008. The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 115, 823–829. doi:10.1111/j.1471-0528.2008.01714.x
- Biron, K.K., 2006. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 71, 154–163. doi:10.1016/j.antiviral.2006.05.002
- Bissinger, A.L., Sinzger, C., Kaiserling, E., Jahn, G., 2002. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *J. Med. Virol.* 67, 200–206. doi:10.1002/jmv.2208
- Bodéus, M., Hubinont, C., Bernard, P., Bouckaert, A., Thomas, K., Goubau, P., 1999. Prenatal diagnosis of human cytomegalovirus by culture and polymerase chain reaction: 98 pregnancies leading to congenital infection. *Prenat. Diagn.* 19, 314–317.
- Boppana, S.B., Fowler, K.B., Pass, R.F., Rivera, L.B., Bradford, R.D., Lakeman, F.D., Britt, W.J., 2005. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J. Pediatr.* 146, 817–823. doi:10.1016/j.jpeds.2005.01.059
- Boutolleau, D., Burrel, S., 2011. Infections à cytomégalovirus humain en transplantation : diagnostic virologique et traitement antiviral. *J. Anti-Infect.* 13, 238–245. doi:10.1016/j.antinf.2011.10.002
- Britt, W.J., Boppana, S., 2004. Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum. Immunol.* 65, 395–402. doi:10.1016/j.humimm.2004.02.008
- Cannon, M.J., 2009. Congenital cytomegalovirus (CMV) epidemiology and awareness. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 46 Suppl 4, S6–10. doi:10.1016/j.jcv.2009.09.002

- Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., Spaete, R.R., 1996. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J. Virol.* 70, 78–83.
- COFRAC, 2011a. SH GTA 04 Guide Technique d'Accréditation de Vérification (Portée A) / Validation (Portée B) des Méthodes en Biologie Médicale.
- COFRAC, 2011b. SH GTA 14 Guide Technique d'Accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesures en biologie médicale.
- COFRAC, 2012. SH GTA 06 Guide Technique d'Accréditation, Contrôle de Qualité en Biologie Médicale.
- COFRAC, 2013. SH REF 02 Recueil des exigences spécifiques pour l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 : 2012.
- Cordier, A.G., Guitton, S., Vauloup-Fellous, C., Grangeot-Keros, L., Benachi, A., Picone, O., 2012. Awareness and knowledge of congenital cytomegalovirus infection among health care providers in France. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 55, 158–163. doi:10.1016/j.jcv.2012.06.022
- De Clercq, E., 2004. Antivirals and antiviral strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 704–720. doi:10.1038/nrmicro975
- Del Rosal, T., Baquero-Artigao, F., Blázquez, D., Noguera-Julian, A., Moreno-Pérez, D., Reyes, A., Vilas, J., 2012. Treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection beyond the neonatal period. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 55, 72–74. doi:10.1016/j.jcv.2012.06.001
- Dollard, S.C., Grosse, S.D., Ross, D.S., 2007. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev. Med. Virol.* 17, 355–363. doi:10.1002/rmv.544
- Ducroux, A., Cherid, S., Benachi, A., Ville, Y., Leruez-Ville, M., 2008. Evaluation of new commercial real-time PCR quantification assay for prenatal diagnosis of cytomegalovirus congenital infection. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2078–2080. doi:10.1128/JCM.02179-07
- Edelmann, A., Eichenlaub, U., Lepek, S., Krüger, D.H., Hofmann, J., 2013. Performance of the MagNA Pure 96 system for cytomegalovirus nucleic acid amplification testing in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1600–1601. doi:10.1128/JCM.03289-12
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., 3rd, Smith, T.F., 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 165–256. doi:10.1128/CMR.19.1.165-256.2006
- Fabbri, E., Revello, M.G., Furione, M., Zavattoni, M., Lilleri, D., Tassis, B., Quarenghi, A., Rustico, M., Nicolini, U., Ferrazzi, E., Gerna, G., 2011. Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 118, 448–456. doi:10.1111/j.1471-0528.2010.02822.x
- Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., 2003. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 289, 1008–1011.
- Fowler, K.B., Stagno, S., Pass, R.F., 2004. Interval between births and risk of congenital cytomegalovirus infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 38, 1035–1037. doi:10.1086/382533
- Gouarin, S., Gault, E., Vabret, A., Cointe, D., Rozenberg, F., Grangeot-Keros, L., Barjot, P., Garbarg-Chenon, A., Lebon, P., Freymuth, F., 2002. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1767–1772.
- Gouarin, S., Palmer, P., Cointe, D., Rogez, S., Vabret, A., Rozenberg, F., Denis, F., Freymuth, F., Lebon, P., Grangeot-Keros, L., 2001. Congenital HCMV infection: a collaborative and comparative study of virus detection in amniotic fluid by culture and by PCR. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 21, 47–55.
- Grangeot-Keros, L., Audibert, F., Vial-Courmont, M., 2002. CMV et grossesse. *Rev. Fr. Lab.* 2002, 41–46. doi:10.1016/S0338-9898(02)80264-5
- Hurax, J.-M., 2003. *Traité de virologie médicale. De Boeck Secundair.*
- In UTERO Treatment of Cytomegalovirus Congenital Infection With Valacyclovir - ClinicalTrials.gov, n.d. URL <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01037712>.
- Jacquemard, F., Yamamoto, M., Costa, J.-M., Romand, S., Jaqz-Aigrain, E., Dejean, A., Daffos, F., Ville, Y., 2007. Maternal administration of valaciclovir in symptomatic intrauterine cytomegalovirus infection. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 114, 1113–1121. doi:10.1111/j.1471-0528.2007.01308.x

- Jarvis, M.A., Nelson, J.A., 2002. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 403–407. doi:10.1016/S1369-5274(02)00334-X
- Kenneson, A., Cannon, M.J., 2007. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* 17, 253–276. doi:10.1002/rmv.535
- Kleiboeker, S.B., Miller, M.A., Schommer, S.K., Ramos-Vara, J.A., Boucher, M., Turnquist, S.E., 2002. Detection and Multigenic Characterization of a Herpesvirus Associated with Malignant Catarrhal Fever in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) from Missouri. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1311–1318. doi:10.1128/JCM.40.4.1311-1318.2002
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., Lembo, D., 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* 98, 269–297.
- Lazzarotto, T., Guerra, B., Lanari, M., Gabrielli, L., Landini, M.P., 2008. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 41, 192–197. doi:10.1016/j.jcv.2007.10.015
- Leruez-Ville, M., Vauloup-Fellous, C., Couderc, S., Parat, S., Castel, C., Avettand-Fenoel, V., Guilleminot, T., Grangeot-Keros, L., Ville, Y., Grabar, S., Magny, J.-F., 2011. Prospective identification of congenital cytomegalovirus infection in newborns using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 52, 575–581. doi:10.1093/cid/ciq241
- McVoy, M.A., 2013. Cytomegalovirus vaccines. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 57 Suppl 4, S196–199. doi:10.1093/cid/cit587
- Mendelson, E., Aboudy, Y., Smetana, Z., Tepperberg, M., Grossman, Z., 2006. Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV). *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 21, 350–382. doi:10.1016/j.reprotox.2006.02.001
- Michaels, M.G., Greenberg, D.P., Sabo, D.L., Wald, E.R., 2003. Treatment of children with congenital cytomegalovirus infection with ganciclovir. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 22, 504–509. doi:10.1097/01.inf.0000069767.43169.2d
- Mocarski, E.S., Jr, 1988. Biology and replication of cytomegalovirus. *Transfus. Med. Rev.* 2, 229–234.
- Morton, C.C., Nance, W.E., 2006. Newborn hearing screening—a silent revolution. *N. Engl. J. Med.* 354, 2151–2164. doi:10.1056/NEJMra050700
- Nigro, G., Adler, S.P., La Torre, R., Best, A.M., Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group, 2005. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 353, 1350–1362. doi:10.1056/NEJMoa043337
- Nigro, G., Adler, S.P., Parruti, G., Anceschi, M.M., Coclite, E., Pezone, I., Di Renzo, G.C., 2012. Immunoglobulin therapy of fetal cytomegalovirus infection occurring in the first half of pregnancy—a case-control study of the outcome in children. *J. Infect. Dis.* 205, 215–227. doi:10.1093/infdis/jir718
- Parent du Châtelet, I., Lévy-Bruhl, D., 2007. Enquête sur les infections congénitales à cytomegalovirus détectées pendant la grossesse ou à la naissance en France métropolitaine. PCR en temps réel | www.ilm.pf, n.d. URL <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel>.
- Picone, O., Vauloup-Fellous, C., Cordier, A.-G., Parent Du Châtelet, I., Senat, M.-V., Frydman, R., Grangeot-Keros, L., 2009. A 2-year study on cytomegalovirus infection during pregnancy in a French hospital. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 116, 818–823. doi:10.1111/j.1471-0528.2009.02139.x
- Picone, O., Vauloup-Fellous, C., Cordier, A.G., Guitton, S., Senat, M.V., Fuchs, F., Ayoubi, J.M., Grangeot Keros, L., Benachi, A., 2013. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat. Diagn.* 33, 751–758. doi:10.1002/pd.4118
- Revello, M.G., Fabbri, E., Furione, M., Zavattoni, M., Lilleri, D., Tassis, B., Quarenghi, A., Cena, C., Arossa, A., Montanari, L., Rognoni, V., Spinillo, A., Gerna, G., 2011. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 50, 303–307. doi:10.1016/j.jcv.2010.12.012
- Revello, M.G., Furione, M., Zavattoni, M., Tassis, B., Nicolini, U., Fabbri, E., Gerna, G., 2008. Human cytomegalovirus (HCMV) DNAemia in the mother at amniocentesis as a risk factor for iatrogenic HCMV infection of the fetus. *J. Infect. Dis.* 197, 593–596. doi:10.1086/526499
- Revello, M.G., Gerna, G., 2004. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 29, 71–83.
- Ross, S.A., Arora, N., Novak, Z., Fowler, K.B., Britt, W.J., Boppana, S.B., 2010. Cytomegalovirus reinfections in healthy seroimmune women. *J. Infect. Dis.* 201, 386–389. doi:10.1086/649903

- Schaade, L., Kockelkorn, P., Ritter, K., Kleines, M., 2001. Detection of cytomegalovirus DNA in human specimens by LightCycler PCR: melting point analysis is mandatory to detect virus strains with point mutations in the target sequence of the hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3809.
- Stone, K.M., Reiff-Eldridge, R., White, A.D., Cordero, J.F., Brown, Z., Alexander, E.R., Andrews, E.B., 2004. Pregnancy outcomes following systemic prenatal acyclovir exposure: Conclusions from the international acyclovir pregnancy registry, 1984-1999. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 70, 201–207. doi:10.1002/bdra.20013
- Tandon, R., Mocarski, E.S., 2012. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol.* 20, 392–401. doi:10.1016/j.tim.2012.04.008
- Thouvenot, D., Billaud, G., Morfin, F., 2004. Actualité de la culture cellulaire et de son application au diagnostic des infections virales. *Virologie* 8, 297–309.
- TibMolBiol, 2009. LightMix® Kit human Cytomegalovirus (hCMV), Kit with reagents for the detection of human CMV DNA using the Roche Diagnostics LightCycler® 1.x / 2.0 / 480 II Instruments. Version 090304.
- Vauloup-Fellous, C., Berth, M., Heskia, F., Dugua, J.-M., Grangeot-Keros, L., 2013. Re-evaluation of the VIDAS® cytomegalovirus (CMV) IgG avidity assay: determination of new cut-off values based on the study of kinetics of CMV-IgG maturation. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 56, 118–123. doi:10.1016/j.jcv.2012.10.017
- Vauloup-Fellous, C., Picone, O., Cordier, A.-G., Parent-du-Châtelet, I., Senat, M.-V., Frydman, R., Grangeot-Keros, L., 2009. Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 46 Suppl 4, S49–53. doi:10.1016/j.jcv.2009.09.003
- WELLER, T.H., HANSHAW, J.B., SCOTT, D.E., 1960. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 12, 130–132.
- Zalel, Y., Gilboa, Y., Berkenshtat, M., Yoeli, R., Auslander, R., Achiron, R., Goldberg, Y., 2008. Secondary cytomegalovirus infection can cause severe fetal sequelae despite maternal preconceptional immunity. *Ultrasound Obstet. Gynecol. Off. J. Int. Soc. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 31, 417–420. doi:10.1002/uog.5255

ANNEXES

Annexe 1 : Liquides amniotiques reçus au laboratoire de Virologie du CHU de Bordeaux

Résultat de la PCR CMV dans le LA		
Date ponction	CHU Bordeaux (UI/ml)	Laboratoire privé autorisé
1	04/04/2013	négatif
2	10/04/2013	négatif
3	11/04/2013	négatif
4	11/04/2013	négatif
5	26/04/2013	négatif
6	30/04/2013	négatif
7	15/05/2013	négatif
8	15/05/2013	négatif
9	25/06/2013	négatif
10	25/06/2013	négatif
11	23/07/2013	13 360 000 positif
12	23/07/2013	négatif
13	02/08/2013	négatif
14	07/08/2013	négatif
15	20/08/2013	négatif
16	27/08/2013	négatif
17	27/08/2013	négatif
18	04/09/2013	négatif
19	27/11/2013	négatif
20	10/12/2013	négatif
21	11/12/2013	négatif
22	03/01/2014	négatif
23	07/01/2014	négatif
24	08/01/2014	négatif
25	14/01/2014	négatif
26	14/01/2014	négatif
27	23/01/2014	négatif
28	23/01/2014	négatif
29	23/01/2014	négatif
30	11/02/2014	53 088 000 positif
31	14/02/2014	négatif
32	19/02/2014	négatif

Annexe 2 : Dilution du standard de l’OMS dans le LA ; valeurs attendues et résultats obtenus

1 : Gamme de dilution du standard OMS (titré à 5.10^6 UI/ml) dans un liquide amniotique (LA n°1)

Concentration attendue (UI/mL)	Concentration attendue (Log UI/ml)	Ct CI	Ct LA	Résultat concentration (Cop/ml)	Résultat concentration (UI/ml)	Résultat concentration (Log UI/ml)
1000000	6	39,9	24,19	1780000	1495200	6,17
100000	5	26,12	28,02	117000	98280	4,99
10000	4	26,85	31,53	9820	8249	3,92
1000	3	27,11	34,78	992	833	2,92
1000	3	27,14	34,57	1070	899	2,95
1000	3	27,08	34,94	824	692	2,84
500	2,70	27,29	34,88	921	774	2,89
500	2,70	27,24	35,96	399	335	2,53
500	2,70	27,23	34,66	1000	840	2,92
250	2,40	27,47	35,57	567	476	2,68
250	2,40	27,47	37,82	108	91	1,96
250	2,40	27,41	-	-	-	-

2 : Gamme de dilution du standard OMS (titré à 5.10^6 UI/ml) dans un liquide amniotique (LA n°2)

Concentration attendue (UI/mL)	Concentration attendue (Log UI/ml)	Ct CI	Ct LA	Résultat concentration (Cop/ml)	Résultat concentration (UI/ml)	Résultat concentration (Log UI/ml)
1000000	6	-	24,05	2130000	1789200	6,25
1000000	6	-	24	2200000	1848000	6,27
100000	5	26,06	27,68	164000	137760	5,14
10000	4	26,86	31,2	13700	11508	4,06
10000	4	27,27	31,29	12900	10836	4,03
10000	4	27,09	31,05	15300	12852	4,11
1000	3	27,46	34,53	1310	1100,4	3,04
1000	3	27,62	34,54	1300	1092	3,04
500	2,70	27,42	35,16	840	705,6	2,85
500	2,70	27,5	35,52	651	546,84	2,74
500	2,70	27,5	37,59	151	126,84	2,10
250	2,40	27,41	35,68	582	488,88	2,69
250	2,40	27,31	35,64	599	503,16	2,70
250	2,40	27,22	34,55	1290	1083,6	3,03

Annexe 3 : Analyse des points critiques de la méthode PCR CMV dans le LA

	Entité d'application : PTBM		ENLAB 015
	Emetteur : PBP-P2A-Virologie		Ind : 1 Page : 1/7
DOCUMENT D'ENREGISTREMENT			
Analyse de risque PCR CMV sur liquide amniotique			

Champ d'analyse (pratique, processus, équipement)	Entité concernée	Date	Membres du groupe de travail
Système 1 Roche / TibMolBiol : PCR CMV sur Liquide Amniotique	PTBM	Septembre 2013	B. Taurin, I. Garrigue, H. Frach

Gravité G	Fréquence F	DéTECTABILITÉ D
1 - <u>MINEUR</u> : Impact mineur, pas d'impact sur le résultat	1 - <u>EXCEPTIONNEL</u> <1/an, 1/10 000	1 - <u>IMMANQUABLE</u>
2 - <u>MODERE</u> : Impact sur le travail du laboratoire, mais pas sur le résultat	2 - <u>RARE</u> : <1/trimestre, <1/1000	2 - <u>FACILE</u> moyen de détection simple et systématique
3 - <u>SIGNIFICATIVE</u> : Impact sur le travail du laboratoire, le résultat mais pas la prise en charge du patient	3 - <u>PEU FREQUENT</u> <1/mois, <1/500	3 - <u>ALEATOIRE</u> moyen de détection simple mais sporadique
4 - <u>IMPORTANT</u> : Impact sur le travail du laboratoire, le résultat et sans conséquence grave pour le patient	4 - <u>FREQUENT</u> <1/semaine, <1/100	4 - <u>DIFFICILE</u> moyen de détection difficile et sporadique
5 - <u>MAJEUR</u> : Impact majeur sur la prise en charge du patient	5 - <u>TRES FREQUENT</u> <1/jour, <1/10	5 - <u>INDETECTABLE</u>

16 = seuil d'alerte
30 = seuil de priorisation

PRELEVEMENT		Étapes du processus	Élément défaillant	Risque / événement redouté / mode de défaillance (AMDEC)	Causes (F)	Effets (G)	G	F	D	IC	Moyens de maîtrise existants (D)	N°
	Mauvais conditionnement du prélèvement		Prélèvement vidé dans la pochette	Impossibilité de réaliser l'analyse	Contenant non hermétique	Impossibilité de rendre le résultat	5	1	1	5	- Information du service clinique sur le contenant et son utilisation - Récupérer si possible du prélèvement dans le service préleveur ou un autre laboratoire	
	Mauvaise manipulation du prélèvement		Tube renversé	Impossibilité de réaliser l'analyse	Inattention	Impossibilité de rendre le résultat	5	1	1	5	- Contacter le service préleveur dans le service préleveur ou un autre laboratoire	

	Erreur d'identification de l'échantillon	Mauvaise attribution du résultat	Inattention	Résultat erroné	5	1	2	10	-Vérifier la concordance flacon/demande
Anomalie concernant le contenu	Volume insuffisant	Stockage du prélèvement insuffisant	Erreur préleveur, cause physiologique (oligomnie)	Impossibilité de faire un envoi au CNR	5	1	1	5	- Information du service clinique sur le volume nécessaire
Anomalies dues à la qualité intrinsèque des réactifs	Non maîtrise de la température des zones de stockage	Réactifs détériorés, mal conservés	Surveillance métrologique	Résultats ininterprétables ou erronés	5	1	2	10	- contrôle de la température des locaux par enregistrateur qualifié - stockage conforme aux spécifications des fournisseurs
	Anomalie de la qualité des lots	Retard dans l'exécution de l'analyse	Problème fournisseur	Impossibilité de rendre le résultat dans le délai prévu	2	1	1	2	- CCI valide - appel fournisseur et remplacement réactif
Anomalies dues à la gestion des réactifs	Réactifs périmés, stock insuffisant	Retard dans l'exécution de l'analyse	Mauvaise gestion des stocks	Impossibilité de rendre le résultat dans le délai prévu	2	1	1	2	- gestion des stocks - commande en urgence
Enregistrement	Erreur enregistrement	Analyse n'apparaît pas sur la liste de travail concernée	Erreur d'un agent de l'ABC, problème synergie	Analyse non réalisée, réalisation d'analyses non demandées	2	1	2	4	- Information de l'ABC - Vérification des feuilles de prescription
PREANALYTIQUE	Biologiste DPN non prévenu	Anomalie lors de la validation biologique	Inattention du technicien ou du biologiste de réception	Validation retardée ou par biologiste non autorisé	5	2	2	20	- information technicien et biologiste de réception - communication entre biologistes DPN

ANALYTIQUE										
Préparation de l'extraction	préparation des porteurs de profils	non prise en compte de la demande de PCR : erreur de profil	inattention	Analyse non réalisée, réalisation d'analyses non demandées	2	2	1	4	rigueur et organisation EN LAB 007	2
	vérification de l'identité patient, aliqutage, étiquetage sur le plan de travail, le tube éluat et le tube archive, chargement de la plaque pré-extraction	erreur de pipetage ou d'étiquetage, erreur d'orientation de la plaque (à l'envers), même patient avec deux numéros différents	inattention, porteur éluats en position inverse (de la plaque)	erreur d'identité du patient, retard dans le rendu des résultats	5	2	3	30	rigueur et organisation	3
	choix du profil	erreur de choix de profil par rapport aux demandes	inattention	retard au diagnostic	2	2	2	6	rigueur	4
	Témoin + (CQi) spécifique à la PCR: CMV LA	Oubli, stock insuffisant	inattention	Retard au diagnostic	2	2	2	6	- rigueur et organisation - gestion des stocks	
	Extraction sur MP96	chargement du MP96	non vérification du changement de la poubelle tips	inattention	risque de contamination	4	2	4	32	- rigueur - extraction renouvelée
	chargement des réactifs sur MP96	mauvais positionnement des réactifs et consommables	inattention	absence d'extraction	1	1	1	1	signalé par l'appareil	

	programmation du profil	mauvais choix de profil	inattention	absence d'extraction de certains échantillons	3	2	1	6	rigueur, vérification lors de la transmission sur le TAD puis de la validation biologiste	6
	scan des numéros de dossiers	1 effacement d'un numéro en réécrivant par-dessus 2 scan deux fois du même numéro 3 scan d'une autre étiquette 4 scan incomplet 5 erreur du scan (8 pour 0, 7 pour 4)	inattention	omission d'un patient et confusion d'identités	4	2	2	16	rigueur et attention, l'erreur de scan ne sera détectée que sur REP Motion (confrontation des deux listes)	7
	import de la liste MP96	import d'une autre liste	inattention	confusions identités	4	2	2	16	rigueur noms évocateurs pour chaque plaque (ex : chat / perche), effacer chaque matin les listes de la journée précédente	8
Préparation de l'archivage sur EP motion	mise en configuration archivage	oubli d'import de la liste	inattention	blocage	4	2	1	6	faire l'import	9
	scan des numéros de dossiers (à partir des tubes ou du plan de travail)	inversion de tubes par rapport au plan de travail	inattention	confusions identités	4	2	1	4	comparaison de la liste importée ou contrôle des tubes, par rapport au plan scanne	10
	préparation des tubes défaut	inversion de tubes par rapport à la liste initiale	inattention	confusion identité	4	2	5	40	rigueur +++	11

Préparation des mélanges réactionnels	décongélation des réactifs sur un portoir bien organisé	erreur de sélection des réactifs	inattention	échec d'amplification, retard au rendu des résultats	2	3	1	6	rigueur et organisation, détectable après le résultat de la PCR	12
	reconstitution des réactifs	erreur de reconstitution des réactifs	inattention, pipettes inadaptées ou non exactes	échec d'amplification, retard au rendu des résultats	2	3	1	6	rigueur et organisation, vérification régulière des pipettes (métrologie)	14
	préparation des mix	erreur de pipetage	inattention, confusion avec un autre profil (4 par page), pipettes inadaptées ou non exactes	échec d'amplification, retard au rendu des résultats	2	3	1	6	cache pour masquer les profils non utilisés, rigueur et organisation, vérification régulière des pipettes (métrologie)	15
Préparation de la plaque de PCR sur EP motion	mise en place des mix, témoins négatifs et positif et standards	inversion des tubes	inattention	inversion des résultats standard et témoin négatif, échec d'amplification, retard au rendu des résultats	2	2	1	4	rigueur et organisation	16
	programmation de l'EP motion	erreur de profil	inattention	PCR inadaptées, retard au rendu des résultats	2	2	1	4	rigueur	17
	export vers LC480	oubli de conversion	inattention	bloccage	2	2	1	4	demande la conversion	18

	ajout des échantillons surnuméraires à la main (3 échantillons patient et témoin LA +)	erreur échantillon, erreur de max, confusion dans le positionnement sur la plaque	inattention	confusions identités, échec amplification, retard au rendu des résultats	5	2	3	30	rigueur, bien noter sur la feuille de travail le positionnement des échantillons rajoutés à la main dépôt effectué sous le regard d'une seconde personne	19
Lancement de la PCR sur L.C480	import de la liste EP motion	erreur d'importation de la plaque	inattention	confusion identité et résultats retard au rendu des résultats	3	2	2	12	rigueur, effacer chaque matin les listes des jours précédents	20
	démarrage de la PCR	sauvegarde au mauvais emplacement	inattention	difficulté pour retrouver la plaque archivée	1	2	2	4	déplacer le fichier dans le bon dossier à la fin du run	21
	programmation du profil	erreur de profil	inattention	retard au rendu des résultats	1	2	1	2	rigueur	22
lecture des résultats et validation technique	Contrôle IC	non prise en compte d'un négatif ou plat	inattention	Résultat(s) erroné(s)	5	2	2	20	rigueur, lecture des Tm, vérification lors de la validation biologiste	23
	Contrôle résultat CMV des témoins négatif et positif	Non prise en compte d'un résultat positif du témoin négatif ou d'un résultat négatif du témoin LA positif	inattention	Résultat(s) erroné(s)	5	2	2	20	Rigueur Contrôle lors de la validation du biologiste DPN	
	Quantification	calcul des charges avec la mauvaise gamme (mauvais lot ou mauvais paramètre) calcul sans gamme	inattention	résultat erroné	3	2	2	12	Recommencer le calcul avec la gamme adéquate	24

	Modification de liste	Oubli ou erreur de décrochage des résultats de LA (prélevement x3 et témoin +) : ne doivent pas être validés techniquement	Inattention	Résultat validé techniquement avant visa du biologiste DPN	5	2	2	20	Rigueur vigilance du biologiste DPN	25
Préparation de la série suivante	Recherche des non terminés	Oubli	Inattention	Résultats en attente	4	2	2	16	Rigueur	30
Validation biologique	Par le biologiste DPN : vérification des résultats sur papier : 3 résultats + témoin LA positif	Non vérification des IC, du résultat du témoin négatif et du témoin LA positif, de la valeur du standard, des courbes "plates"	Inattention	Résultats erronés	5	2	3	30	Validation biologiste sous synergie avec la feuille des résultats LC480 sous les yeux : 1) IC, 2) valeurs des standards, 3) courbes plates et si besoin retour au Tm (papier ou écran LC480), 4) résultat du témoin LA + 5) confrontation des 3 résultats patient 6) confrontation aux antérieurs et dossier clinique si besoin	31
	Validation par erreur par un biologiste non DPN	Biologiste non autorisé	Inattention	Délivrance non autorisée du résultat	5	2	2	20	- Revalidation par le biologiste DPN - Information biologiste non DPN	31

Annexe 4 : Résultats du CQI maison (LA négatif dans lequel est dilué le standard CMV de l'OMS)

Test du témoin positif T+LA créé (CQI maison), qui sera intégré à chaque série

Concentration attendue (UI/mL)	Concentration attendue (Log UI/ml)	Ct LA	Résultat concentration (Cop/ml)	Résultat concentration (UI/ml)	Résultat concentration Log UI/ml
1000	3	35,05	822	690	2,84
		34,8	985	827	2,92
		35,27	703	591	2,77
		33,45	2630	2209	3,34
		33,91	1890	1588	3,20

Annexe 5 : Procédure analytique « PCR CMV dans le liquide amniotique »

 CHU Hôpitaux de Bordeaux	Entité d'application : PTBM	PR-LAB 002
	Emetteur : PBP-P2A-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE	
PROCEDURE		Ind Page : 1/5
Procédure diagnostic moléculaire d'une infection congénitale par PCR en temps réel sur liquide amniotique		

TABLEAU DES EVOLUTIONS		
INDICE	DATE D'APPLICATION	MOTIF
1	A la date d'autorisation DPN	Création

Participants du groupe d'élaboration :

Hélène Frech Interne
Isabelle Garrigue MCU-PH
Simon Pichard Interne

TABLEAU D'APPROBATION					
	POUR LE GROUPE D'ELABORATION	VALIDATION (fonction qualité)	AVIS EXPERT (facultatif)	APPROBATION (responsable d'activité)	
Nom :	Hélène Frech	Frangne Valérie	Isabelle Accoceberry	Isabelle Garrigue	Véronique Blanchy
Fonction :	Interne	CAQ	MCU-PH (Parasitologue)	MCU-PH	Cadre de Santé
Date :					
Signature :					

 CHU Hôpitaux de Bordeaux	Entité d'application : PTBM	PR-LAB 002
	Emetteur : PBP-P2A-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE	
PROCEDURE		Ind Page : 1/2/5
Procédure diagnostic moléculaire d'une infection congénitale par PCR en temps réel sur liquide amniotique		

SOMMAIRE

1	Objet :	3
2	Domaine d'application :	3
3	Définition et abréviations	3
4	Documents de référence	3
5	Documents d'application	3
6	Déroulement et descriptif	3
6.1	Logigramme	4
6.2	Commentaires sur le logigramme	5

 CHU Hôpitaux de Bordeaux	Entité d'application : PTBM	PR-LAB 002
	Emetteur : PBP-P2A-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE	
	PROCEDURE	Ind Page : 1 / 3/5
Procédure diagnostic moléculaire d'une infection congénitale par PCR en temps réel sur liquide amniotique		

1 Objet :

Modalités du diagnostic moléculaire d'une infection congénitale lors de la grossesse, par recherche et quantification de l'ADN de l'agent infectieux par PCR en temps réel sur liquide amniotique, après les phases de tri par discipline et de règlement des non conformités.

2 Domaine d'application :

Ce diagnostic s'applique aux liquides amniotiques prélevés par amniocentèse chez toute femme enceinte présentant une suspicion d'infection congénitale, virale ou parasitaire.

3 Définition et abréviations

Cytomégalovirus (CMV)
 Diagnostic prénatal (DPN)

A : Acteur
 R : Responsable
 C : Contrôle
 I : Est Informé

4 Documents de référence

Virologie : Révir, référentiel de Virologie médicale, Groupe Révir de la Société Française de Microbiologie

5 Documents d'application

IN LAB 175 DPN CMV réception pré-ana et stockage
 IN LAB 008 Organisation générale de la réception des échantillons sur le PTBM
 EN LAB 032 DPN CMV Vérification conformité des échantillons primaires
 IN LAB 174 DPN Maladies infectieuses Prélèvement et acheminement du LA

MO LAB 013 Préparation d'une plaque PCR système 1 sur Ep Motion
 MO LAB 016 Lancement d'un run d'extraction sur MP96 ROCHE système 1
 MO LAB 012 Maintenance hebdomadaire des extracteurs MP96

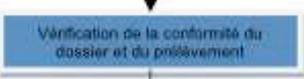
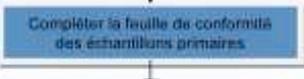
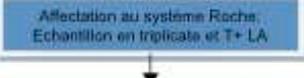
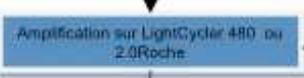
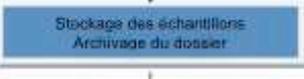
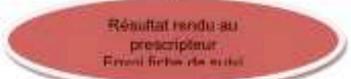
IN LAB 176 DPN CMV Dispo particulière Analytiques
 EN LAB 016 Tableau des mix système 1
 EN LAB 019 Tableau profils système 1
 EN LAB 023 Valeurs des standards PCR TIB
 IN LAB 069 Préparation des mix TIB systèmes 1 et 2 ROCHE
 IN LAB 077 Exportation des gammes TIB pour archivage
 IN LAB 085 Gammes TIB système 1 et 2 ROCHE
 IN LAB 100 PCR CMV système Roche 1 mode dégradé
 MO LAB 014 Lancement et analyse des PCR sur le LC480 II système 1 ROCHE

IN LAB 177 DPN CMV post-ana.doc
 IN-LAB-102 Sauvegarde des données des systèmes 1 et 2 Roche
 IN LAB 114 Gestion des feuilles de travail systèmes 1 et 2 Roche
 EN LAB 033 Fiche de suivi de grossesse après DPN Viro

6 Déroulement et descriptif

 CHU Hôpitaux de Bordeaux	Entité d'application : PTBM	PR-LAB 002
	Emetteur : PBP-P2A-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE	
PROCEDURE		Ind Page : 1/5
Procédure diagnostic moléculaire d'une infection congénitale par PCR en temps réel sur liquide amniotique		

6.1 Logigramme

Qui ?	Quoi ?	Où, Quand ?	Comment ?
Biologiste DPN Technicien DPN		Réception virologie 580 Réception parasitologie	IN LAB 175 IN LAB 008 EN LAB 032 IN LAB 174
A/R			
			
R			
			
R		Extraction 581 Mix 582 Amplification 624	MO LAB 013 MO LAB 016 MO LAB 012 IN LAB 176 EN LAB 016 EN LAB 019 EN LAB 023 IN LAB 069 IN LAB 077 IN LAB 085 IN LAB 100 MO LAB 014
			
			
A/R			
			
			
		Bureau biologiste 575 ; 576	
A/R		Pièce des congélateurs Secrétariat Virologie	IN LAB 177 IN-LAB-102 IN LAB 114 EN LAB 033
A/R			

 CHU Hôpitaux de Bordeaux	Entité d'application : PTBM Emetteur : PBP-P2A-VIROLOGIE-PARASITOLOGIE	PR-LAB 002
	PROCEDURE	Ind : 1 Page : 5/5
Procédure diagnostic moléculaire d'une infection congénitale par PCR en temps réel sur liquide amniotique		

6.2 Commentaires sur le logigramme

Les échantillons destinés au diagnostic prénatal sont inclus dans la routine.

Un échantillon subira 3 fois l'analyse dans la même série, et sera associé à un témoin positif LA.

Pour la recherche du CMV, l'extraction des acides nucléiques est réalisée sur système 1, et la PCR sur LC480 Roche Système 1.

Pour la recherche du toxoplasme, l'extraction des acides nucléiques est réalisée sur le système 2, et la PCR sur LC 2.0.

La non-validation technique ou biologique amène à réitérer l'extraction et/ou l'amplification à partir du spécimen d'origine conservé, selon l'appréciation du biologiste responsable.

Annexe 6 : Instruction pour la validation biologique

	Entité d'application : PTBM	IN-LAB 024
	Emetteur : PBP-P03A-Virologie	Ind : 1 Page : 1/3
INSTRUCTION		
Validation biologique de la PCR CMV dans le liquide amniotique (LA) pour le diagnostic prénatal (DPN) d'infection à CMV		

Cette instruction indique la marche à suivre pour la validation biologique des résultats de recherche d'ADN du cytomégalovirus (CMV) par PCR en temps-réel dans le liquide amniotique (LA) pour le diagnostic prénatal (DPN) de l'infection congénitale à CMV.

La PCR CMV est réalisée sur le système Roche 1.

La validation de cette analyse n'est réalisée que par un biologiste autorisé DPN et doit respecter un certain nombre de règles :

1- Vérifier systématiquement la validation technique de la série de PCR CMV à l'aide du rapport (et/ou de l'écran) du LC480 et du MO-LAB-014 (Lancement et analyse des PCR sur le LC480 II système 1 ROCHE)

Le biologiste en charge du DPN doit vérifier :

- le résultat du **témoin négatif** de la série
- les résultats des **contrôles internes (IC)** : bornes fixées par le fournisseur pour le lot considéré, données disponibles dans la pièce des PCR en temps-réel et reportées par le technicien sur le rapport papier du LC480.
- les résultats négatifs, correspondant bien à une absence de courbe d'amplification
- le résultat du **CIQ LA CMV +** (positif ou positif faible, valeur moyenne de 1000 UI/ml)
- la valeur du **standard de la gamme CMV** inclus dans la série (anomalie ou normalité doivent être mentionnées par écrit par le technicien sur le rapport). Lorsqu'un standard sort des bornes fixées par le fournisseur pour le lot de réactifs PCR considéré (données disponibles dans la pièce des PCR en temps-réel) :
 - si l'écart est inférieur ou égal à 2 Ct, le technicien valide le run et signale l'écart sur le document d'enregistrement EN LAB 009 (suivi anomalies PCR) disponible à la réception
 - si l'écart est supérieur à 2 Ct, les 3 PCR LA sont relancées à partir des mêmes éluats.
- **les résultats des LA ne doivent pas être transmis sur le TAD par le technicien** (décochage avant transmission)

2 – Interpréter les 3 résultats du LA

Vérifier la valeur négative du Témoin négatif : si positif, réextraire + PCR en triplicate

Vérifier la positivité du CQI LA CMV + : si ce témoin est négatif, ré-extraire + PCR en triplicate

Date d'application : XX/XX/2014

TABLEAU D'APPROBATION					
	POUR LE GROUPE D'ELABORATION	VALIDATION (fonction qualité)	AVIS EXPERT (facultatif)	APPROBATION (responsable d'activité)	
Nom :	Isabelle Garrigue	Valérie Frangne	Marie-Edith Lafon	Véronique Blanchy cadre de santé PTBM	Hervé Fleury
Fonction :	MCU PH	technicienne CAQ	PU PH, PAQ		PU PH chef de service
Date :					
Signature :					

	Entité d'application : PTBM	IN-LAB 024
	Emetteur : PBP-P03A-Virologie	
INSTRUCTION		Ind : 1 Page : 2/3
Validation biologique de la PCR CMV dans le liquide amniotique (LA) pour le diagnostic prénatal (DPN) d'infection à CMV		

Lorsque les 3 PCR CMV sont négatives

- avec les 3 IC dans les bornes : rendre la PCR CMV négative
- avec 2 ou 3 IC négatifs, refaire l'extraction et la PCR en triplicate.
Ne rendre un résultat négatif que lorsque l'on a au moins 2 résultats avec IC positif. Dans le cas contraire, rendre « ininterprétable, présence d'inhibiteurs de PCR dans le prélèvement ».

Lorsque 1 ou plusieurs PCR CMV sont positives

Si les 3 PCR CMV sont positives (quel que soient les résultats des IC), rendre un résultat positif :

- si les 3 quantifications sont proches (<1 log d'écart), réaliser une moyenne pour le résultat final
- si 2 quantifications sont proches, réaliser une moyenne avec ces 2 résultats pour le résultat final
- si les 3 quantifications sont significativement différentes (>1 log d'écart), refaire l'extraction et la PCR en triplicate

Ne rendre un résultat quantitatif que lorsque l'on a au moins 2 résultats quantitatifs proches (< 1 log d'écart). Dans le cas contraire, rendre le résultat positif avec quantification ininterprétable.

Si 2 ou 3 courbes de PCR CMV sont "plates" (non exponentielles), visualiser les courbes de fusion (Tm) correspondantes, soit sur l'impression papier du rapport, soit sur l'écran du LC480 (anomalie ou normalité doivent être mentionnées par écrit sur le rapport par le technicien). La liste des Tm cibles est disponible dans MO LAB 014.

- si le Tm est à la valeur attendue, rendre un résultat positif ou positif faible.
- si le Tm n'est pas à la valeur attendue, renouveler extraction + PCR en triplicate.

Si 2 PCR CMV sont positives et 1 PCR CMV est négative (IC corrects) : rendre un résultat positif.

Si 1 PCR CMV est positive et 2 PCR CMV sont négatives: répéter l'analyse en triplicate après ré-extraction.

Si 2 PCR CMV sont positives faibles et 1 PCR CMV est négative (IC corrects) : rendre positif faible.

Si 1 PCR CMV est positive faible et 2 PCR CMV sont négatives (IC corrects), le prélèvement sera envoyé dans les plus brefs délais au CNR CMV pour une recherche d'ADN CMV avec une technique PCR différente afin d'écartier tout risque de résultat faussement négatif.

3 – Saisir le résultat final sous Synergy en ERM ainsi que les commentaires associés. Valider.

Le compte-rendu doit systématiquement renseigner sur :

- l'absence de détection ou la détection d'inhibiteur de PCR
- l'absence ou la présence D'ADN CMV dans le prélèvement

Liste des codes :

DAIP	AbsenInhib	Absence de détection d'inhibiteur de PCR.
DDIP	Détecinhib	Détection d'inhibiteur de PCR.
DQIN	QuantInint	Quantification ininterprétable
DCNR	envoyé CNR	Prélèvement adressé au CNR pour expertise.
VPAC	prés.CMV	Présence d'ADN de CMV
VAAC	Abse.CMV	Absence d'ADN de CMV détecté
DQI	QI	Quantité insuffisante de liquide amniotique Envoyée au laboratoire pour réaliser l'analyse.
DRAC	RésAccorr	Résultat à corréler aux données cliniques et biologiques.
-RI	Résininter	Résultat ininterprétable
-RV	vérifié	Résultat vérifié

	Entité d'application : PTBM	IN-LAB 024
	Emetteur : PBP-P03A-Virologie	
INSTRUCTION		Ind : 1 Page : 3/3
Validation biologique de la PCR CMV dans le liquide amniotique (LA) pour le diagnostic prénatal (DPN) d'infection à CMV		

Tout problème d'interprétation conduit à l'envoi d'un échantillon au CNR CMV dans les plus brefs délais et le prescripteur est prévenu par téléphone (appel tracé sur Synergy).

4 – Communiquer le résultat par téléphone au médecin prescripteur et tracer cet appel sur le dossier Synergy. Imprimer le compte-rendu, le signer et l'adresser au prescripteur accompagné de la fiche de suivi de grossesse (EN-LAB 033) et d'une enveloppe pré-adressée au Dr I. Garrigue.

5 - Traçabilité des validations

- Pour chaque série de PCR CMV DPN, les rapports d'analyse sont
 - conservés dans le classeur d'archive CMV DPN (bureau I Garrigue) pendant 5 ans
 - sauvegardés sur disque dur externe jusqu'à 3 ans après l'arrêt de l'utilisation de l'automate LC480
- Les validations techniques et biologiques sont tracées par le système informatique du laboratoire.
- Les résultats du contrôle de qualité externe (CQE) sont enregistrés dans le disque N PTBM/gestion documentaire PTBM/virologie/13 Gestion évaluation externe de la qualité et contrôles qualité internes et sauvegardé sur le disque dur externe réservé à la qualité.

6 – Fonctionnement en mode dégradé

Les instructions concernant le fonctionnement en mode dégradé sont décrites dans le document sous N PTBM/3 PCR temps-réel / IN LAB 100 PCR CMV système Roche 1 mode dégradé V2.

Le prescripteur est prévenu pour tout retard dans la délivrance du résultat (appel tracé sur Synergy). Si le retard dépasse les délais prévus dans le catalogue des actes de virologie (>72h, jours ouvrables), un échantillon du prélèvement est adressé au CNR CMV dans les plus brefs délais et le prescripteur est prévenu par téléphone (appel tracé sur Synergy).

7- Archivage du dossier papier

Le dossier papier est archivé sans limite de temps dans le bureau du Dr I. Garrigue.

Il contient :

- Bon de prescription spécifique au DPN CMV
- attestation de consultation signée par le médecin (sur le bon de prescription)
- Consentement de la patiente
- Fiche de renseignements cliniques et administratifs
- Feuille de conformité de l'échantillon primaire EN LAB 032
- Le cas échéant, copie de la feuille de non conformités P13D EN QUA 700
- Compte-rendu analytique du LC480
- Duplicata du compte-rendu de résultat adressé au prescripteur
- Fiche de suivi de grossesse (EN-LAB 033) complétée et retournée par le prescripteur

Le retour des fiches de suivi de grossesse (EN-LAB 033) permet d'établir le rapport de l'activité annuelle du laboratoire.

Annexe 7 : Fiche de suivi des grossesses après diagnostic prénatal

 CHU Hôpitaux de Bordeaux	Entité d'application : PBP et Etablissements extérieurs Emetteur : PBP-P2A- Virologie	EN-LAB 033
	ENREGISTREMENT	
Fiche de suivi de grossesse après le diagnostic prénatal d'infection à CMV congénitale		

A compléter après tout diagnostic anténatal CMV, en vue d'établir le rapport d'activité annuel.

Médecin prescripteur : Tel/Fax :

Service (UG), Hôpital :

Nom de la patiente :

Prénom de la patiente :

Date de naissance nombre de semaines d'aménorrhée:

Indication et date du DPN :		
DPN par recherche du CMV par PCR dans le liquide amniotique		
Résultat du DPN	q ADN CMV détectéq ADN CMV non détecté

Merci de compléter les informations suivantes :

Devenir de la grossesse :

- Poursuite de la grossesse
- Interruption médicale de grossesse
 - pour l'infection recherchée
 - pour une autre affection (précisez) :
- Fausse couche spontanée
- Date et établissement de naissance, nom et prénom de l'enfant :
- Autre (précisez) :

Diagnostic chez l'enfant :

Prélèvements réalisés chez l'enfant pour le diagnostic de l'infection congénitale à CMV et résultat ?

- | | | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> urines | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |
| <input type="checkbox"/> sang de cordon | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |
| <input type="checkbox"/> sang périphérique | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |
| <input type="checkbox"/> salive | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |
| <input type="checkbox"/> autre (précisez) : | <input type="checkbox"/> positif | <input type="checkbox"/> négatif |
| <input type="checkbox"/> aucun prélèvement réalisé | | |

Nouveau-né symptomatique ?

- oui (précisez) :
- non

Merci de renvoyer cette fiche au laboratoire suivant :

Dr Isabelle GARRIGUE
 Laboratoire de Virologie, Hôpital Pellegrin, CHU Bordeaux
 Place Amélie Rabat Léon
 33076 Bordeaux CEDEX
 Tel : 05 56 79 57 40 Fax : 05 56 79 56 73

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.