

Diagnostic en virologie

Vendredi 29 mars, 14 h 00 à 15 h 30

Modération : Sandra Martin-Latil, Stéphane Paul

Communications orales : O43 à O48

Affiches : P113-P130, P133

O43

Identification de pathogènes dans des encéphalites sévères d'origine inconnue par séquençage à haut débit

Philippe Pérot¹, Danielle Seilhean², Franck Bielle², Delphine Chrétien¹, Thomas Bigot³, Charles Duyckaerts², Marc Eloit¹

¹ Laboratoire de découverte de pathogènes, Institut Pasteur, Paris, France

² Département de neuropathologie Raymond-Escourolle, Groupe hospitalier universitaire Pitié-Salpêtrière, Assistance publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), UPMC-Sorbonne Universités, Paris, France

³ Centre de bioinformatique, biostatistique et biologie intégrative (C3BI), Institut Pasteur, Paris France

<philippe.perot@pasteur.fr>

<marc.eloit@pasteur.fr>

Environ la moitié des encéphalites restent de cause indéterminée. Le séquençage à haut débit (NGS) permet la détection de pathogènes connus, inattendus ou nouveaux, sans avoir à formuler d'hypothèse *a priori*. Nous présentons les résultats de l'analyse par NGS de lésions cérébrales d'une cohorte de 16 patients décédés d'encéphalite. Pour deux patients ayant un immunodéficit primitif (maladie de Bruton), des séquences d'un astrovirus distant (patient 1) et d'un nouveau virus à ARN (patient 2) ont été identifiées. Ce deuxième patient résidant dans le Sud-Ouest, nous avons recherché et identifié des séquences virales très proches sur le plan évolutif dans des moustiques *Culex pipiens* capturés dans le sud de la France. Un cas de neuro-dengue (patient 3) a été diagnostiqué chez une femme VIH+ plus de 4 ans après un voyage au Togo. Le virus de la rage (patient 4) a été identifié chez un homme mordu par un chien dans un pays endémique 16 mois avant l'apparition des symptômes.

O44

Du terrain au laboratoire de référence : évaluation d'un protocole pour l'envoi à faible coût et sans risque infectieux de prélèvements issus de cas suspects de fièvre aphteuse

Aurore Romey¹, H.g. Ularanu, A.n. Bulut, S. Jamal, G.j. Belsham, Hamers, P. Hudelet, Anthony Relmy¹, Gorna Kamila, Eve Laloy¹, Zientara Stefan¹, Bakkali-Kassimi Labib, Blaise-Boisseau Sandra¹

¹ Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de santé animale, Laboratoire OIE de référence FMD, UMR1161 Virologie Inra, Enva, Maisons-Alfort, France

<Labib.Bakkali-Kassimi@anses.fr>

<Sandra.Blaise-Boisseau@anses.fr>

La fièvre aphteuse (FA) est l'une des maladies animales virales les plus contagieuses. Elle affecte les artiodactyles domestiques et sauvages. Cette maladie, à déclaration obligatoire, se caractérise par le développement de vésicules ou « aphtes » essentiellement dans la bouche, sur le mufile, les onglons, les espaces interdigités, et les mamelles. Malgré son faible taux de mortalité chez les adultes, la FA engendre un niveau de morbidité très élevé et donc des pertes économiques colossales dans les pays où elle est endémique ou simplement présente de manière sporadique. L'agent responsable est un Picornavirus du genre Aphthovirus. Sept sérotypes immunologiquement distincts ont été décrits pour ce virus ainsi que de nombreux sous-types, ayant une répartition mondiale définie en 7 « pools » géographiques. Au sein de chaque pool 2 à 3 sérotypes distincts

de FA circulent. L'identification des souches à l'origine de chaque nouvelle épidémie, est importante pour un contrôle efficace de la FA, notamment pour le choix de la souche vaccinale à utiliser lors d'une épidémie, et pour, à terme, permettre l'éradication mondiale de cette maladie. Cependant, en raison de l'obligation d'envoyer les échantillons suspects sous régime du froid négatif, en suivant les exigences de biosécurité, le coût de leur expédition vers les laboratoires de référence reste l'un des principaux obstacles à l'identification des souches circulantes. Nous avons précédemment développé un protocole permettant l'expédition d'échantillons issus de cas suspects de FA, à température ambiante, et sans risque infectieux (Romey *et al*, 2017). Ce protocole est basé sur l'inactivation chimique du virus de la FA sur des LFD (*lateral flow device*), tests d'immunodétection rapide, utilisables sur le terrain. Ce processus a été positivement évalué sur des souches de laboratoire et sur des échantillons de terrain issus de la collection du laboratoire national de référence français pour la FA. La présente étude, financée par l'EUFMD, vise à évaluer ce protocole sur des échantillons cliniques fraîchement collectés. L'objectif est de tester la performance et la biosécurité de l'ensemble du processus, du terrain vers le laboratoire de référence. En cours d'épidémie de FA, des prélèvements cliniques ont été collectés au Nigeria, en Turquie et au Pakistan et testés sur le terrain en utilisant des LFD. Les LFD positifs, chimiquement inactivés (ou non) selon le protocole développé précédemment, ont ensuite été soumis à deux laboratoires de référence (France et Danemark) qui réaliseront la détection, la caractérisation moléculaire et la ré-obtention du virus après transfection chimique du génome viral en cellules sensibles. Cette étude contribuera à démontrer que l'utilisation des LFD, couplée à une étape d'inactivation virale directement sur le terrain, est un moyen sûr pour le transport à température ambiante, à faible coût et sans risque infectieux, des échantillons de virus aphteux provenant de zones d'endémie.

O45

Signification du contrôle interne de 12 tests rapides d'orientation diagnostique (TRODs) et 1 test rapide de confirmation de l'infection à VIH

Valentine Gauthier¹, Hadjer Lazga¹, Isabelle Leroy¹,

Agnès Gautheret-Dejean^{1,2}

¹ AP-HP, Hôpitaux universitaires La Pitié Salpêtrière-Charles Foix, Service de virologie, Paris, France

² UFR des Sciences pharmaceutiques et biologiques, Laboratoire de microbiologie, Inserm UMR-S U1139, Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Paris, France

<agnès.gautheret@aphp.fr>

Les autorités internationales de santé publique tentent d'étendre et de faciliter le dépistage de l'infection à VIH par l'utilisation de TRODs. Ces dispositifs rapides et faciles à utiliser permettent un accès élargi pour la population, particulièrement pour les groupes à risque. Pour être commercialisés, un certain niveau de performances diagnostiques est requis. Comme les TRODs ont un contrôle interne pour permettre de valider du résultat, le but de notre étude était d'analyser la signification de ce contrôle. Au cours de cette étude nous avons testé 12 TRODs et 1 test rapide de confirmation avec de l'eau distillée, du tampon phosphate (PBS) ou du sérum de sujets infectés par le VIH-1. Les volumes d'eau et de PBS utilisés ont été les mêmes que ceux préconisés par le fournisseur pour le sérum. Les trousseaux étaient : Autotest VIH, Biosynex HIVTOP, DetermineTM HIV-1/2 Ag/Ab Combo, Exacto HIVTOP, Exacto TEST HIV PRO, First Response HIV 1-2.O Card Test, GenieTM Fast HIV1/2, GeeniusTM HIV 1/2 Confirmatory Assay (lecture automatisée et visuelle), Hexagon HIV, HIV Combo, INSTITM HIV-1/HIV-2 Antibody Test, Multisure HIV Rapid Test, Vikia HIV 1/2. Les procédures de réalisation et d'interprétation recommandées par le fournisseur ont été suivies. Les résultats ont été les suivants : pour 9 TRODs le contrôle interne a été positif en présence d'eau ou de PBS. Pour Autotest VIH, GeeniusTM HIV 1/2 Confirmatory Assay, INSTITM HIV-1/HIV-2 Antibody Test et Multisure HIV Rapid Test, le contrôle interne a été positif uniquement en présence de sérum. Le signal contrôle positif était conservé jusqu'à une dilution du sérum en PBS au

1/10 pour Autotest VIH et INSTITM HIV-1/HIV-2 Antibody Test, au 1/100 pour GeeniusTM HIV 1/2 Confirmatory Assay en lecture automatisée et 1/1000 en lecture visuelle, et au 1/100 000 pour Multisure HIV Rapid Test. En conclusion, une positivité du contrôle interne ne garantit pas la présence de sérum, plasma ou sang total pour 9 tests sur 13 testés. Seuls Autotest VIH, GeeniusTM HIV 1/2 Confirmatory Assay, INSTITM HIV-1/HIV-2 Antibody Test et Multisure HIV Rapid Test permettent la détection d'immunoglobulines humaines grâce à la présence de protéine de type protéine A.

O46

Caractérisation moléculaire des souches rétrovirales EIAV par une approche associant de la capture et un séquençage haut-débit de deuxième génération

Alexandre Deshiere¹, Nicolas Berthet², Fanny Lecouturier¹, Aymeric Hans¹

¹ Anses, Unité physiopathologie et épidémiologie des maladies équine, France

² Institut Pasteur, CNRS UMR3569, Paris, France
<aymeric.hans@anses.fr>

Le virus EIAV est un lentivirus responsable de l'anémie infectieuse des équidés (AIE). L'infection se traduit généralement par des symptômes sévères tels que de la fièvre, l'anémie, des œdèmes et un amaigrissement des animaux. Elle constitue un problème de santé majeur pour la filière équine au niveau mondial et il n'existe actuellement aucun traitement ou vaccin efficace. Le taux de mutation élevé de ce virus limite fortement le diagnostic et la caractérisation moléculaire de l'ensemble des souches en utilisant les méthodes de PCR et du séquençage des amplicons générés par la méthode Sanger. Ainsi, seul un séquençage partiel peut-être réalisé et le dépistage de l'AIE est réalisé par mise en évidence des anticorps après une séroconversion. Malheureusement, cette séroconversion peut prendre plusieurs mois pendant lesquels les équidés infectés continuent potentiellement à disséminer le virus. Dans cette étude, nous avons développé un outil de diagnostic moléculaire innovant permettant de détecter et caractériser de manière rapide et efficace l'EIAV à l'aide d'un système d'enrichissement utilisant des sondes de capture ARN associées à un séquençage de deuxième génération (NGS). Ce système permet d'obtenir rapidement la séquence complète du virus dans des échantillons infectés et ainsi de retracer les liens phylogénétiques entre les différents foyers épidémiques. À partir de biopsies (provirus intégré) et de prélèvements sanguins (virus circulant), nous avons pu obtenir le génome d'une trentaine de souches provenant de différents pays de l'Union européenne (France, Espagne, Pays-Bas, Allemagne, Roumanie et Serbie). Une analyse phylogénétique de ces échantillons révèle que la divergence des souches virales est beaucoup plus complexe que le modèle monophylétique décrit jusqu'alors. Cette méthode se révèle être un outil puissant pour mieux comprendre l'évolution du virus EIAV et devrait permettre d'identifier plus rapidement que les tests conventionnels les animaux infectés afin de lutter contre la propagation de l'AIE qui représente un enjeu économique majeur pour la filière équine.

O47

Transmission horizontale d'une souche d'HHV-6B intégrée au chromosome (iciHHV-6B) par greffe de cellules souches hématopoïétiques chez un enfant âgé de 10 ans

Alexandre Gaymard^{1,2}, Carine Halfon-Domenech³, Grégory Destras^{1,2}, Geneviève Billaud², Florence Morfin^{1,2}, Agnès Gautheret-Dejean^{4,5}, Pascale Bonnafous^{5,6}, Emilie Frobert^{1,2}

¹ CIRI, Équipe Virpath, Inserm, U1111, Université Claude-Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École normale supérieure de Lyon, Lyon, France

² Laboratoire de Virologie, Institut des agents infectieux, Groupement hospitalier Nord, Hospices civils de Lyon, Lyon, France

³ Institut d'hématologie et d'oncologie pédiatrique, Hospices civils de

Lyon, Université Claude-Bernard Lyon 1, Lyon, France

⁴ Service de virologie, Cervi, Hôpitaux universitaires la Pitié Salpêtrière-Charles Foix, APHP, Paris, France

⁵ Inserm, CIMI-Paris UMR 1135, Équipe 1 PVI, Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 6, Paris France

⁶ Service de virologie, Cervi, Hôpitaux universitaires la Pitié Salpêtrière-Charles Foix, APHP, Sorbonne Université UPMC Paris VI, Paris France
<alexandre.gaymard@chu-lyon.fr>
<emilie.frobert@chu-lyon.fr>

Le virus humain herpes de type 6 (HHV-6), qui regroupe 2 espèces distinctes, HHV6-A et HHV6-B, est à l'origine d'infections opportunistes, suite à une réactivation, survenant majoritairement chez les patients immunodéprimés. De plus, à la différence des autres Herpesviridae, ce virus est capable de s'intégrer au niveau chromosomique des cellules nucléées (Agut *et al.*, 2017). Lorsque l'intégration a lieu dans les cellules germinales, le virus peut être transmis de façon verticale et est alors présent dans chaque cellule. Les études rapportent une prévalence d'ici-HHV-6 (*inherited chromosomally integrated HHV-6*) d'environ 1 % dans la population générale (Morissette et Flamand, 2010). Ce virus intégré peut également faire l'objet d'une transmission horizontale suite à une transplantation d'organes ou à une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Hill *et al.*, 2017 ; Bonnafous *et al.*, 2018). La réactivation virale à partir d'une forme intégrée semble possible mais très peu de cas sont encore décrits dans la littérature (Endo *et al.*, 2014 ; Bonnafous *et al.*, 2018). Nous rapportons ici le cas d'une transmission horizontale d'ici-HHV-6B lors d'une greffe de moelle osseuse d'un garçon âgé de 10 ans, pour une leucémie aiguë lymphoblastique T (LAL T). À sa sortie d'aplasie, ce jeune garçon présente tout d'abord une réactivation EBV traitée par rituximab ainsi qu'une GVH cutanée. Devant la fièvre persistante, un bilan virologique complet est réalisé et révèle une charge virale HHV-6 à 6,5 log copies/ml. Malgré le traitement par ganciclovir, les charges virales sanguines restent constantes autour de 6 log copies/ml et cet enfant développe rapidement d'importantes céphalées avec vomissements initiaux. La ponction lombaire réalisée alors retrouve une charge virale HHV-6 à 4,1 log copies/ml. La poursuite du traitement avec adaptation de doses permet une régression des signes neurologiques alors que les charges virales sanguines persistent à 6 log copies/ml. La présence d'ici-HHV-6 est alors évoquée devant : 1) une charge virale sanguine HHV6 $\geq$ 6log copies/ml, constante sous traitement ; 2) une charge virale sanguine HHV-6 négative en pré-greffe ; et 3) la positivité du patient en IgG HHV-6 en pré-greffe. Les investigations du donneur sur un extrait d'ADN conservé par l'Établissement français du sang confirme alors l'ici-HHV-6B chez ce donneur avec une charge virale à 6,8 log/million de cellules et une séquence U38-U39 identique à celle retrouvée dans la plupart des souches iciHHV-6B européennes et américaines. En conclusion, nous rapportons ici la survenue de signes neurologiques chez un garçon de 10 ans dans les suites d'une greffe de moelle osseuse avec un greffon ici-HHV-6B positif, en l'absence de toute autre cause étiologique. Des analyses virologiques complémentaires seraient nécessaires afin de distinguer une forme intégrée d'une forme répliquative d'HHV-6B, permettant ainsi de prouver que cet ici-HHV-6B s'est réactivé, induisant les signes cliniques observés. Un dépistage chez les donneurs par la quantification d'HHV-6 au niveau sanguin permettrait de renforcer la sécurité virologique.

O48

Mise en évidence d'une co-infection VIH-1/M+O par l'émergence *in vivo* d'un recombinant VIH-1/MO

Alice Moisan^{1,2}, Fabienne De Oliveira¹, Charlotte Pronier¹, Jean-Marc Chaplain³, Pauline Trémeaux⁴, Pierre Cappy^{1,2}, Veronique Lemee¹, Anne Maillard⁵, Jean-Christophe Plantier^{1,2}

¹ Laboratoire associé au CNR VIH, CHU Rouen, Rouen, France

² Groupe de recherche sur l'adaptation microbienne (GRAM 2.0), Université de Rouen : EA2656, IRIB Haute-Normandie, Rouen, France

³ Service de maladies infectieuses et médecine tropicale, CHU Pontchaillou, Rennes, France

⁴ CHU Cochin, AP-HP, Service de virologie, Paris, France

⁵ Laboratoire de virologie, CHU Pontchaillou, Rennes, France

<alice.moisan@chu-rouen.fr>,

<jean-christophe.plantier@chu-rouen.fr>

Bien qu'impliquant des virus fortement divergents génétiquement, les doubles infections VIH-1/M+O peuvent favoriser l'émergence de formes recombinantes inter-groupes M et O. Au cours des 20 dernières années, plusieurs études épidémiologiques ont ainsi décrit quelques dizaines de cas de doubles infections VIH-1/M+O et d'infection par des formes recombinantes VIH-1/MO et ont permis de définir 19 URF VIH-1/MO distinctes. Cependant, aucune de ces études n'a décrit la genèse *in vivo* d'un recombinant VIH-1/MO. Ce travail décrit, pour la première fois, l'émergence *in vivo* d'un recombinant VIH-1/MO, dans un contexte de co-infection VIH-1/M+O non diagnostiquée. En 1999, une patiente de 32 ans (RBF235) est diagnostiquée VIH-1/M positive. En 2013, le génotypage de résistance, dans un contexte d'échec virologique, montre un polymorphisme différent des antécédents VIH-1/M et révèle la présence de VIH-1/O dans la protéase (PR) et de VIH-1/M dans la transcriptase inverse (TI). Cette discordance moléculaire suggérait une co-infection VIH-1/M+O et/ou un virus recombinant VIH-1/MO. Cinq échantillons d'ARN positifs, prélevés entre 2007 et 2013, ont alors été analysés, à l'aide d'outils moléculaires spécifiques de groupes et de PCR dessinées pour la détection des recombinants VIH-1/MO. L'exploration moléculaire était basée sur des (RT)-PCR nichées spécifiques des groupes M et O ciblant quatre régions génomiques (PR, RT, intégrase (IN) et gp41). Compte-tenu des résultats moléculaires discordants, une RT-PCR nichée amplifiant spécifiquement une région PR-TI recombinante [O-M] a été mise au point. Les séquences obtenues avec ces différentes (RT)-PCR ont mis en évidence une co-infection M+O depuis au moins 2007 et l'émergence d'un recombinant VIH-1/MO en 2013. Le profil du génome complet du recombinant, obtenu à partir de l'ADN intracellulaire, a confirmé un point de cassure [O-M] dans la TI, mais en a également mis en évidence un second dans les régions LTR. Les niveaux de répllication des différentes populations, mesurés avec des méthodes de charges virales non spécifiques et spécifiques de groupes, ont montré que les deux souches parentales se répliquaient activement entre 2007 et 2013 au moins, favorisant la genèse de la forme recombinante. En conclusion, ce cas met en évidence la complexité du diagnostic VIH, lorsque plusieurs populations virales divergentes sont présentes, et celle de l'utilisation des outils non spécifiques à disposition. Il souligne ainsi la nécessité d'une vigilance accrue lorsque des discordances sont observées au cours du dépistage et/ou du suivi des patients. Les impacts épidémiologique, physiopathologique, thérapeutique et immunovirologique de ces infections atypiques demeurent méconnus et restent à approfondir.

P113

Évaluation d'un test ELISA spécifique à IGM pour la détection précoce des infections à virus de la fièvre catarrhale ovine dans les sérums de ruminants domestiques

Stéphan Zientara, Axel Grolhier, Cyril Viarouge, François Donnet, Corinne Sailleau, Serafin Gutierrez, Labib Bakkali-Kassimi, Arada Abdelaziz, Loïc Comtet, Damien Vitour, Emmanuel Breard
UMR 1161 Anses-INRA-ENVA Virologie, Maisons-Alfort, France
<damien.vitour@anses.fr>,
<Emmanuel.Breard@anses.fr>

La fièvre catarrhale ovine (FCO) ou « bluetongue (BT) », est une maladie causée par le virus de la BT (BTV), transmise par des insectes hématophages du genre *Culicoides*. Le BTV appartient à la famille des *Reoviridae*, au genre *Orbivirus* et compte de multiples sérotypes (27 ont été caractérisés à ce jour). Ce virus possède sept protéines structurales différentes (VP1 à VP7) et au moins 5 protéines non structurales. Le test ELISA de compétition (c-ELISA) est le test sérologique le plus largement utilisé pour la détection des anticorps dirigés contre la protéine 7 (VP7) du BTV. Cependant, les c-ELISA du BTV ne permettent pas de distinguer les IgG des IgM. Les IgM sont générés peu de temps après la réponse immunitaire

primaire contre un agent infectieux, indiquant une infection récente ou une exposition à des antigènes, comme après la vaccination. Le génome du BTV ou l'anticorps anti-VP7 peut être détecté dans le sang des ruminants plusieurs mois après l'infection, les outils de diagnostic du BTV ne peuvent faire la distinction entre une infection récente et ancienne. Dans cette étude, nous avons évalué un prototype ELISA de capture d'IgM qui détecte les IgM anti-VP7 chez les ruminants.

Matériel et méthodes. 1650 échantillons de sérum de bovins, d'ovins ou de caprins ont été testés. Les animaux étaient naïfs vis-à-vis de BTV, ou infectés et/ou vaccinés avec BTV-1, -2, -4, -8, -9, -16 ou -27. Nous avons également inclus 30 sérums de bovins infectés par le virus de la maladie hémorragique épizootique (EHDV) sérotype 6 (un autre orbivirus). Les résultats ont montré que cette trousse ELISA est spécifique et peut détecter la présence d'IgM, avec une spécificité diagnostique et une sensibilité très satisfaisantes, de 1 à 5 semaines après l'infection par le BTV chez les ruminants domestiques non infectés ou ayant des IgG anti-VP7 (préalablement infectés ou vaccinés). Le pic d'IgM anti-VP7 est atteint lorsque les taux de virus infectieux et d'ARN de BTV dans le sang étaient les plus élevés. Il est alors possible de détecter l'ARN du BTV dans des sérums positifs en IgM, d'amplifier et séquencer partiellement le segment 2 d'ARN à double brin (codant la protéine VP2, spécifique de sérotype) et ainsi, de déterminer le sérotype. Le test ELISA permet de caractériser une introduction récente du BTV dans une zone où vivent des animaux domestiques séropositifs pour le BTV. Cette approche présente un intérêt particulier pour les études épidémiologiques rétrospectives sur des échantillons de sérum congelés. Deux exemples d'études rétrospectives effectuées avec le kit et des sérums de ruminants prélevés en Afrique (Sénégal et Tchad) seront présentés.

P114

Développement d'un ELISA pour la détection de la protéine NS1 du virus de la fièvre jaune

Elisabeth Marion, Franck Raynal, Florence Boudet, Nathalie Mantel
Sanofi Pasteur, Marcy l'Étoile, France
<nathalie.mantel@sanofi.com>

La fièvre jaune (FJ) est une maladie transmise par les moustiques pouvant provoquer des fièvres hémorragiques mortelles. Le virus de la FJ est un virus enveloppé dont le génome est un ARN monocaténaire positif codant 3 protéines structurales et 7 protéines non-structurales qui participent à la répllication virale. Parmi ces protéines non-structurales, la protéine NS1 est une protéine présente sous deux formes : une forme dimérique associée aux membranes cellulaires et impliquée dans la répllication virale, et une forme hexamérique sécrétée dont les fonctions sont moins connues. Cette dernière forme peut persister dans le sérum des patients jusqu'à 9 jours suivant l'apparition des premiers symptômes. Des vaccins vivants atténués contre la FJ existent depuis 1937. Des titres élevés en IgG anti-NS1 sont observés dans les séra humains ou animaux vaccinés avec cette souche. L'objectif de l'étude présentée ici était de mettre au point un test ELISA permettant de quantifier la protéine NS1 dans les séra prélevés dans les temps précoces post-vaccination ou post-infection pour mettre en évidence la répllication virale. Un ELISA permettant le dosage spécifique de la protéine NS1 FJ a été développé. Il s'agit d'un ELISA sandwich couplant un coating avec un anticorps monoclonal de souris anti-protéine NS1 FJ et une détection avec un sérum polyclonal de lapin immunisé avec la protéine NS1 recombinante. La présence de protéine NS1 est ensuite révélée par addition d'un anticorps anti-Ig de de lapin couplé à la peroxydase et d'un substrat coloré. Pour permettre la quantification de la protéine NS1 dans les échantillons testés, un standard basé sur des dilutions sérielles d'une protéine hexamérique NS1 FJ recombinante de concentration connue est ajouté dans chaque plaque de dosage. Au cours du développement du test, la spécificité de la technique a été évaluée en utilisant des protéines recombinantes spécifiques d'autres Flavivirus. Ce test a démontré l'absence de réactivité croisée avec les NS1 des virus dengue, Zika et encéphalite japonaise. La sensibilité de la technique a par ailleurs été établie à 7,2 ng/mL. Cette technique permet aussi de doser la protéine NS1 directement dans des suspensions virales après amplification sur cellules. La protéine NS1

a pu être dosée dans des séra de primates non humains infectés par le virus FJ sauvage, les résultats ont été comparés aux résultats de dosage de virémie effectués par qRT-PCR qui mesure spécifiquement l'ARN viral. En revanche, la protéine NS1 n'a pas pu être détectée dans les séra de primates vaccinés, même dans les échantillons où une virémie post-vaccinale avait pu être détectée par qRT-PCR. Nous avons développé un test ELISA sensible et spécifique pour détecter la protéine NS1 FJ. Il permet de doser la protéine présente dans les suspensions virales et de comparer les lots de production entre eux. Dans les études pré-cliniques, il permet de démontrer l'efficacité du vaccin testé suite au challenge et pour le groupe contrôle non vacciné de confirmer la réplication du virus. Cependant, la technique de qRT-PCR reste une technique plus sensible pour la détection de virémies post-vaccinales et post-infection avec le virus sauvage.

P115

Caractérisation d'une méthode de détection de norovirus et de virus d'hépatite A et E dans les matrices composites

Océane Dehan, Catherine Henenchart, Sandra Martin-Latil, Audrey Fraisse, Sylvie Perelle
Anses, Maisons-Alfort, France
<catherine.henenchart-collette@anses.fr>,
<sandra.martin-latil@anses.fr>,
<sylvie.perelle@anses.fr>

La transmission des virus entériques se fait essentiellement par voie féco-orale directe par contacts interhumains ou indirecte suite à la consommation d'eau ou d'aliments contaminés. Lors d'épidémies d'origine alimentaire, les virus entériques les plus souvent incriminés sont principalement les norovirus, responsables de gastroentérites, et les virus d'hépatite A (VHA) et d'hépatite E (VHE), responsables d'hépatites. L'importance de ces virus entériques dans l'étiologie des toxi-infections alimentaires (TIAC), rend le développement de méthodes de détection sensibles de ces virus dans les aliments indispensable. À ce jour, la norme ISO 15216-1:2017 décrit des méthodes permettant la détection des norovirus et du virus de l'hépatite A dans les végétaux, les fruits, l'eau et les crustacés considérés comme des aliments à risque. Mais en cas de TIAC, les demandes de recherche de norovirus, du VHA et du VHE dans des plats comprenant plusieurs aliments (féculents, végétaux, ovoproduits, poissons, viandes, salades composées, ou plats préparés) sont fréquentes. En effet, ces matrices composites peuvent être contaminées par la voie féco-orale lors de leur préparation. À partir de la norme ISO 16240-4:2018 qui décrit les protocoles pour la validation des méthodes internes dans un laboratoire et de la norme ISO 15216-1, l'objectif de cette étude est de caractériser une méthode permettant de détecter les norovirus, le VHA et le VHE dans les matrices composites. Cette méthode peut être appliquée pour des besoins de diagnostic viraux de routine en hygiène alimentaire.

P116

The Impact Of Pre-graft Serology On The Risk Of Pathologies Associated With The BK Virus In Post-Renal Transplantation Patients

Fatima El Zahraa Dakroub¹, Etienne Brochot¹, Haidar Akil²
¹ Agents infectieux, résistance et chimiothérapie (AGIR), University Picardie Jules-Verne, CHU Amiens Picardie, Amiens, France
² Laboratoire de biologie de cancer et immunologie moléculaire, Université Libanaise, Liban
<fatimadakroub20@gmail.com>

BK polyomavirus (BKV) is a small virus with a circular DNA genome, surrounded by an icosahedral capsid. BKV reaches a seroprevalence of 90 % in adults, and then persists latently in the urothelium and renal cells. In immunocompromised kidney transplant recipients, BKV can cause BKV associated nephropathy (BKVAN), which poses a real threat to graft survival. The incidence of BKVAN has increased in the previous years, and the only treatment for this condition is decreasing immunosuppression medication. Kidney transplant donors are not currently implicated

in predicting BKV infection in kidney transplant recipients. It has been postulated, however, that BKV infection originates from the kidney allograft and that high IgG levels in recipients could be protective against BKVAN. We aim to measure IgG levels against several BKV serotypes in the sera of donor-recipient pairs prior to kidney transplantation, and correlate the seroreactivity to the occurrence of BKVAN. We also aim to perform an epidemiological study to determine the seroprevalence and genotypic distribution of BKV in the Lebanese population, and then compare the genotypic and serological data between French and Lebanese populations. For the purpose, we have utilized different systems to produce BKV virus like particles (VLPs) against different serotypes of the virus, and they are used in qualitative and semi-quantitative ELISA to determine the levels of IgGs in patients' sera collected through a period of four years.

P117

Identification des Metapneumovirus aviaires (sous-groupes A, B, C et D) par une 5-plex digitale RT-PCR

Evelyne Lemaître^{1,2}, Stéphanie Bougeard¹, Paul Brown^{1,2}
¹ Anses, Ploufragan, France
² Laboratoire de référence de la rhinotrachéite infectieuse de la dinde, OIE, France
<evelyne.lemaître@anses.fr>

Les metapneumovirus aviaires (AMPV), de la famille des *Pneumoviridae* et du genre *Metapneumovirus*, ont été décrits en quatre sous-groupes (A, B, C et D) selon leurs différences antigéniques et génétiques. Ces virus sont responsables de maladies respiratoires et génitales chez les galliformes et palmipèdes. Plusieurs PCR en point final ou en temps réel ont été développées et sont soit basées sur une détection globale des AMPV, soit sur une détection d'un ou deux des quatre sous-groupes à la fois. Ces dernières ciblent les zones du génome les plus variables entre les différents sous-groupes de manière à faciliter leur développement. Le problème, avec une telle approche, est que par nature, les zones variables rendent ces PCR sensibles aux défauts de spécificité comme il a été récemment montré (Brown *et al* 2018 Athens Georgia). Il est donc actuellement nécessaire de développer une nouvelle méthode spécifique aux sous-groupes, ciblant une zone du génome conservée, moins sensible à la dérive génétique mais suffisamment différente entre ces sous-groupes pour pouvoir être différenciés. Ainsi, le présent document décrit la conception d'une RT-PCR ciblant une région du gène conservé de la polymérase, avec des sondes spécifiques de chaque sous-groupe. De plus, les réactions développées ici sont effectuées dans une seule 5-plex RT-PCR digitale en gouttelettes, ce qui implique une discrimination de tous les sous-groupes à chaque test. La PCR digitale repose sur une amplification des molécules cibles après une répartition du mélange réactionnel en plusieurs milliers de gouttelettes. Chaque réaction est lue à l'aide d'une machine regroupant les gouttelettes en fonction de leur amplitude de fluorescence sur deux canaux de lecture dans un graphique en 2D. En appliquant des concentrations différentes aux sondes, il est possible de séparer les différentes molécules cibles. Les résultats sur 31 souches d'AMPV représentant la plus grande diversité mondiale connue à ce jour ont montré une différence significative entre les sous-groupes selon leur amplitude de fluorescence. La spécificité calculée incluant une étude d'exclusivité à partir de virus du même genre et d'autres familles était de 100 %. Des dilutions sérieuses de souches de référence pour les quatre sous-groupes d'AMPV ont été analysées sur deux séries indépendantes comprenant cinq répliques. À partir de ces résultats, la limite de détection a été estimée à 101 DICT₅₀/mL pour les 4 sous-groupes, soit entre 1 et 3 copies/μL selon le sous-groupe. Les performances diagnostiques de la méthode ont été confirmées sur des écouvillons trachéaux d'échantillons issus d'expérimentations animales mimant des prélèvements terrain. L'application de cet outil ciblant en une seule réaction une région du génome présentant une variabilité bien moindre que celle des tests actuels sera indispensable, notamment dans le but de mieux définir la distribution géographique mondiale des sous-groupes d'AMPV.

P118**High-throughput sequencing for the aetiological identification of viral encephalitis, meningoencephalitis and meningitis. A narrative review and clinical appraisal**Marie-Céline Zanella¹, Lauriane Lenggenhager¹, Jacques Schrenzel², Samuel Cordey¹, Laurent Kaiser¹¹ Laboratory of Virology, Division of Laboratory Medicine and Division of Infectious Diseases, University of Geneva Hospitals, Geneva, Suisse² Laboratory of Bacteriology, Division of Laboratory Medicine and Division of Infectious Diseases, University of Geneva Medical School, Geneva, Suisse

<marie-celine.zanella@hcuge.ch>

Background. Viral aetiologies are the most common cause of central nervous system (CNS) infections. Approximately one-half of CNS infections remain of undetermined origin. High-throughput sequencing (HTS) brought new perspectives to CNS infection investigations, allowing to investigate viral aetiologies with an unbiased approach. HTS use is still limited to specific clinical situations.

Objectives. The aim of this review was to evaluate the contribution and pitfalls of HTS for the aetiological identification of viral encephalitis, meningoencephalitis and meningitis in CNS patient samples. Sources: PubMed was searched from 1 January 2008 to 2 August 2018 to retrieve available studies on the topic. Additional publications were included from a review of full-text sources.

Content. Among 366 studies retrieved, 29 used HTS as a diagnostic technique. HTS was performed in cerebrospinal fluid and brain biopsy samples of 307 patients, including immunocompromised, immunocompetent paediatric and adult cases. HTS was performed retrospectively in 18 studies and prospectively in 11. HTS led to the identification of a potential causal virus in 41 patients, with 11 viruses known and 10 unexpected to cause CNS infections. Various HTS protocols were used.

Implications. HTS additional value is difficult to quantify due to various biases. Nevertheless, HTS led to the identification of a viral cause in 13 % of encephalitis, meningoencephalitis and meningitis cases in which various assays failed to identify the cause. HTS should be considered early in clinical management as a complement to routine assays. Standardised strategies and systematic studies are needed for the integration of HTS in clinical management.

P119**Intérêts diagnostic et expérimental de la quantification du parainfluenza virus de type 3 dans des prélèvements respiratoires**Caroline Lefeuvre¹, Maud Salmona¹, Louise Bondeelle², Linda Feghouli¹, Séverine Mercier-Delaurie¹, Véronique Houdouin³, Anne Bergeron-Lafaurie², Jérôme Le Goff¹¹ Service de microbiologie, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Université Paris VII, Paris Diderot, Paris, France² Service de Pneumologie, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France³ Service de Pneumologie, Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France <lefeuvre.caroline49@gmail.com>

Introduction. Le parainfluenza virus de type 3 (PIV3) peut être responsable d'infections respiratoires sévères chez les jeunes enfants et les sujets immunodéprimés, notamment chez les receveurs de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou atteints d'hémopathie maligne. Après la greffe de CSH, les infections basses sont associées au risque de développer une bronchiolite oblitérante. De nouveaux inhibiteurs spécifiques des virus parainfluenza sont en cours d'évaluation clinique. Leur efficacité antivirale pourra être évaluée sur la réduction de la charge virale dans les sécrétions respiratoires. L'objectif de cette étude était de quantifier les charges PIV3 dans des prélèvements respiratoires de patients immunodéprimés (allogreffe de CSH, greffe d'organe solide, tumeur solide, hémopathie maligne), et de les corréler avec l'atteinte respiratoire haute ou basse.

Étude rétrospective sur des échantillons respiratoires positifs pour le PIV3 recueillis entre le 1^{er} janvier 2016 et le 31 décembre 2017. L'infection

PIV3 a été déterminée par PCR multiplex (RespiFinder 2Smart en 2016 et FilmArray RP Panel en 2017). La charge virale PIV3 a été déterminée par PCR temps réel avec une courbe étalon établie avec la souche PIV3 MK-9 (Culture Collections, Public Health England, Royaume-Uni). Une quantification du gène codant l'albumine a été réalisée afin d'évaluer la cellularité et normaliser la charge virale. Les résultats sont exprimés en équivalent TCID₅₀ (50 % Tissue culture Infective Dose) par million de cellules (TCID₅₀/10⁶ cellules). Tous les diagnostics de pneumonie ont été confirmés par relecture des résultats d'imagerie. Quatre-vingt-dix-huit patients ont présenté une infection PIV3, dont 35 % étaient allogreffés CSH et 45 % étaient suivis pour une hémopathie. Le diagnostic de pneumonie, établi sur les données cliniques et radiologiques, a été posé pour 33 patients, dont 9 avec une allogreffe de CSH. Cent onze échantillons respiratoires ont été analysés (79 écouvillons nasaux, 24 aspirations naso-pharyngées, 8 lavages broncho-alvéolaires). Quatre-vingt-six échantillons (77,5 %) avaient une charge supérieure à 6 log₁₀ TCID₅₀/10⁶ cellules. Les charges virales PIV3 médianes chez les sujets avec et sans pneumopathie n'étaient pas significativement différentes (8,3 log₁₀ TCID₅₀/10⁶ cellules vs 7,9 log₁₀ TCID₅₀/10⁶ cellules (p = 0,31) (écouvillons + aspirations). Aucune corrélation n'a été observée entre le délai début des symptômes/prélèvement (en jours) et la charge virale PIV3. Des co-infections avec d'autres agents pathogènes respiratoires ont été identifiées chez 19,2 % des patients au total. Une différence significative du pourcentage de co-infections a été identifiée entre les sujets avec et sans pneumopathie (p < 0,05). Aucune différence de charge virale PIV3 n'a été observée entre les échantillons co-infectés ou non. Les charges PIV3 dans les sécrétions respiratoires d'individus immunodéprimés symptomatiques sont élevées et ce quel que soit l'atteinte haute ou basse. La détection qualitative de PIV3 dans les sécrétions respiratoires hautes peut suffire pour confirmer l'étiologie d'un diagnostic établi de pneumonie. Ces données sont utiles pour le choix de la valeur d'inoculum PIV3 dans des modèles *ex vivo* de muqueuses respiratoires différenciées et pour l'évaluation de l'efficacité des inhibiteurs de PIV3 *in vitro* et *in vivo*.

P120**Mesure de la charge virale du HHV-6 : comparaison qRT-PCR et ddPCR**Marie Joanny¹, Philippe Magnier¹, Hadjer Lazga¹, Mathilde Levu¹, Juliette Nectoux², Lucie Orhant², Stéphanie Nguyen-Quoc^{1,3}, Pascale Bonnafous^{1,4}, Agnès Gautheret-Dejean¹¹ Centre national de référence des Herpesvirus (laboratoire associé) CIMI-Paris, Inserm U1135, CNRS : ERL8255, Sorbonne Universités, AP-HP, Groupe Hospitalier La Pitié-Salpêtrière, Université Pierre et Marie Curie [UPMC] Paris VI, Paris, France² Service de génétique et biologie moléculaires, HUPC Hôpital Cochin, APHP, Hôpital Cochin, Paris, France³ Service d'hématologie, Hôpitaux universitaires La Pitié Salpêtrière-Charles Foix, AP-HP, Paris, France⁴ Laboratoire de microbiologie, Inserm UMR-S U1139, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Paris, France <agnès.gautheret@aphp.fr>

Le HHV-6 est à l'origine d'infections opportunistes chez les sujets immunodéprimés. Le suivi se fait par mesure de la charge virale (CV) dans le sang, généralement par PCR quantitative en temps réel (qPCR). Selon la symptomatologie, la mesure de la CV dans d'autres matrices, tel le LCR lors d'encéphalite, est indiquée. Chez 1 % de la population, l'ADN du HHV-6 est intégré au génome humain dans toutes les cellules de l'organisme (iciHHV-6). Chez ces patients, la CV est > 6 log de copies de génome viral par million de cellules quelle que soit la matrice biologique. L'objectif de notre étude était de comparer deux méthodes pour mesurer la CVHHV-6, qPCR et droplet digital PCR (ddPCR), pour le diagnostic et le suivi des patients. Nous avons analysé 94 prélèvements de sang total provenant de 50 patients suivis en CV dans le laboratoire, la plupart hospitalisés dans le service d'hématologie (80 %). Le nombre de prélèvements par patient allait de 1 à 9 (moyenne 1,9). L'extraction

de l'ADN a été effectuée avec la trousse QIAamp DNA Blood MiniKit (Qiagen). La CVHHV-6, exprimée en nombre de copies d'ADN viral de HHV-6 par million de cellules (cop/M cell) a été mesurée par : i) qPCR dans les gènes U65-66 (Gautheret-Dejean *et al.* *J Virol Methods* 2002) et U42 (développée par P. Bonnafous) ; ii) ddPCR dans le gène U42 (P. Bonnafous). Le nombre de copies génomiques du HHV-6 par cellule a été déterminé par quantification parallèle du gène codant l'albumine (Laurendeau *et al.* *Clin Chem* 1999). L'ADN du HHV-6 a été détecté dans 94, 97 et 93 % pour les qPCR U65-66, qPCR U42 et ddPCR U42, respectivement. La médiane de CV était de 12950 cop/M cell [$4-102 \times 10^6$] pour la qPCR U65-66, 27800 cop/M cell [$43-208 \times 10^6$] pour la qPCR U42, et de 17900 cop/M cell [$5-26,6 \times 10^6$] pour la ddPCR U42. Une corrélation a été observée entre les deux méthodes de qPCR ($p < 0,0001$; $R^2 = 0,984$), ainsi qu'entre la qPCR U42 et la ddPCR U42 ($p < 0,0001$; $R^2 = 0,952$). En conclusion, les résultats de CVHHV-6 mesurée par qPCR (U65-66 ou U42) et ddPCR U42 étaient corrélés. Les CVHHV-6 en qPCR U42 étaient cependant supérieures à celles obtenues par qPCR U65-66 ou ddPCR U42. Par ailleurs, la sensibilité de la ddPCR était inférieure à celle des qPCR U42 ou U65-66.

P121

Évaluation de la performance des tests sérologiques semi-automatisés VirClia R pour la détection des IgM et des IgG anti-virus de l'hépatite E (VHE) dans le cadre du diagnostic d'infection par le VHE Clément Lier¹, Stéphanie Gouarin¹, Isabelle Ollivier², Cécile Schanen¹, Julia Dina^{1,3}, Astrid Vabret^{1,3}

¹ Laboratoire de Virologie, CHU de Caen, France

² Service d'hépatologie et gastro-entérologie, CHU de Caen, France

³ EA2656, Groupe de recherche sur l'adaptation microbienne GRAM, Université de Caen Basse-Normandie, France
<vabret-a@chu-caen.fr>

Introduction. Le virus de l'hépatite E (VHE) de génotype 3 est reconnu comme un pathogène émergent dans les pays industrialisés. Il peut être la cause d'infections bénignes chez les patients immunocompétents mais il est également responsable, chez les personnes immunodéprimées, d'hépatites chroniques conduisant à une fibrose rapide du foie, constituant un problème de santé publique majeur. L'algorithme diagnostique proposé en France (Kamar *et al.*, 2014) recommande chez les patients immunocompétents la recherche d'IgM anti-VHE sériques seules et chez les patients immunodéprimés la recherche combinée d'IgM anti-VHE et du génome viral dans le compartiment sanguin. La sérologie IgG anti-VHE conserve un intérêt dans les études de séroprévalence. Les performances analytiques des tests sérologiques commercialisés pour la détection d'IgG et d'IgM anti-VHE sont très variables. Les réactifs Wantai (test ELISA et test rapide immunochromatographique IgM) sont actuellement les principaux tests sérologiques utilisés en Europe.

Objectifs. Nous avons évalué les performances analytiques des tests sérologiques semi-automatisés VirClia permettant la détection d'IgG et d'IgM anti-VHE. Ces résultats ont été comparés aux résultats obtenus avec les tests sérologiques ELISA Wantai.

Matériels et méthode. La spécificité des tests sérologiques VirClia a été estimée à partir de 18 échantillons sériques de patients immunocompétents ($n = 7$) et immunodéprimés ($n = 11$) pour lesquels les recherches du génome viral, des IgG et des IgM anti-VHE (Wantai) étaient négatives. La sensibilité des tests sérologiques VirClia a été déterminée à partir de 40 échantillons sériques de patients infectés par le VHE de génotype 3, diagnostiqués par détection du génome viral dans le compartiment sanguin. Parmi ces patients 16 étaient immunodéprimés, 15 étaient immunocompétents et 9 étaient de statut immunitaire inconnu (en cours). Pour tous ces patients, nous disposons du résultat des sérologies IgG et IgM anti-VHE ELISA Wantai réalisées au laboratoire entre août 2015 et novembre 2018. **Résultats.** Spécificité : Les tests sérologiques IgG et IgM anti-VHE VirClia réalisés dans le cadre de l'évaluation de la spécificité étaient négatifs pour les 18 patients, mettant en évidence une concordance parfaite avec les résultats des tests Wantai. Sensibilité, La recherche d'IgM anti-VHE

avec le test VirClia était positive pour 39 patients infectés par le VHE (39/40 ; 97,5 %). Cette recherche était positive pour tous les patients avec le test ELISA Wantai (40/40 ; 100 %). L'unique discordance observée concerne un patient immunodéprimé. La recherche d'IgG anti-VHE avec le test VirClia était positive pour 36 patients infectés par le VHE (36/40 ; 90 %). Cette recherche était positive pour 30 patients avec le test ELISA Wantai (30/40 ; 75 %). **Conclusion.** Le test semi-automatisé IgM anti-VHE VirClia présente une très bonne sensibilité et pourrait être utilisé pour le diagnostic d'infection par le VHE. Des études d'interférences permettraient d'apprécier plus finement sa spécificité. La recherche d'IgG anti-VHE dans ce contexte d'infection aiguë n'est pas recommandé mais il est à noter une bonne sensibilité du test semi-automatisé IgG anti-VHE VirClia. La possibilité d'utilisation de ce test dans les études de séroprévalence nécessite d'être encore évaluée.

P122

Intérêt d'un dépistage de l'HHV-8 chez les patients greffés : cas rapporté d'une contamination suite à une greffe pulmonaire

Alexandre Gaymard^{1,2}, Grégory Destras^{1,2}, Geneviève Billaud, Florence Morfin, Agathe Sénéchal, Emilie Frobert^{1,2}

¹ CIRI, Équipe Virpath, Inserm U1111, CNRS : UMR5308, Université Claude-Bernard Lyon 1 (UCBL), École normale supérieure de Lyon, Univ Lyon, Lyon, France

² Laboratoire de virologie, Institut des agents infectieux, Groupement hospitalier Nord, Hospices civils de Lyon, France

<alexandre.gaymard@chu-lyon.fr>

<emilie.frobert@chu-lyon.fr>

Chez les patients immunodéprimés, l'HHV-8 est à l'origine de maladies néoplasiques comme le sarcome de Kaposi, la maladie de Castelman ou encore le lymphome primitif des séreuses (Rezouab, 2013). L'incidence de la maladie de Kaposi est 500 fois plus élevée suite à une transplantation d'organe solide que dans la population générale (Woodle *et al.*, 2001). L'évolution clinique de ces cas peut être rapidement défavorable (Riva *et al.*, 2012). En Europe, la séroprévalence des anticorps anti-HHV-8 varie de 2 à 14 %, mais peut atteindre 50 % dans certains pays d'Afrique (Marcelin *et al.*, 1998 ; Belec *et al.*, 1998). La survenue d'une infection à HHV-8 chez le sujet transplanté peut donc soit faire suite à une réactivation, soit à une nouvelle contamination. Cette dernière peut être due à la présence du virus dans l'organe greffé. De plus, la réplication de l'HHV-8 est étroitement liée au niveau d'immunodépression induite lors de la greffe, avec une possible rémission lors du rétablissement de l'immunité. Un certain nombre d'études rapportent l'incidence de ces infections chez les transplantés de rein, de foie et de cœur, mais ces cas sont peu décrits en greffe pulmonaire (Chiereghin *et al.*, 2017). Nous rapportons ici le cas d'un homme de 57 ans ayant bénéficié d'une greffe mono-pulmonaire gauche pour silicose d'origine professionnelle. Les suites immédiates post-greffe ont été simples, le patient étant rentré à domicile à J29. À 8 mois (M8) post-greffe, un épanchement pleural gauche persistant est constaté. Dans le même temps, nous sommes informés que le receveur de l'autre poumon a développé une maladie de Kaposi. À M10, la charge virale (CV) sanguine du patient revient positive à 2,8 log copies/mL. Sa sérologie HHV-8 révélera une séroconversion post-greffe. À M11, la CV a augmenté à 4 log copies/mL et l'investigation de la ponction pleurale est en faveur d'un exsudat lymphocytaire, avec la présence d'HHV-8 en limite de détection. À M12, le patient est hospitalisé de nouveau pour une majoration de sa dyspnée. L'échographie cardiaque montrera un épanchement péricardique compressif. L'analyse histologique du péricarde ne montre pas non plus d'argument pour une maladie à HHV-8 ; la PCR sur le liquide péricardique est d'ailleurs négative, malgré une CV sanguine à 3,7 log copies/mL. L'immunosuppression a été modifiée pour introduire l'évérolimus et sur le plan clinique, le patient reste actuellement asymptomatique. L'analyse moléculaire des souches HHV-8 est en cours afin de faire le lien entre ces deux infections à HHV-8 suite à une greffe pulmonaire. En conclusion, le dépistage systématique d'HHV-8 en pré-greffe permettrait de déterminer le statut immunitaire des donneurs et receveurs afin d'identifier les

patients à risque de primo-infection ou réactivation HHV-8, sans remettre en cause la qualification du don d'organes. Un suivi systématique de ces patients par une CV sanguine hebdomadaire serait alors recommandé. De plus, la mise en place d'une obligation de dépistage permettrait le développement et la diffusion de techniques sérologiques de référence faisant encore défaut actuellement.

P123

Évaluation des performances de PCR Multiplex unitaires pour la détection des virus respiratoires sur prélèvements supérieurs et profonds

Adeline Pivert^{1,2}, Emilie Przyrowski², Caroline Lefevre², Françoise Lunel-Fabiani^{1,2}, Alexandra Ducancelle^{1,2},
Hélène Le Guillou-Guillemette^{1,2}

¹ Laboratoire Hifih Upres EA3859, UFR Santé, Université d'Angers, France

² Laboratoire de virologie, CHU Angers, Institut de biologie en santé, Angers, France

<HeLeguillou@chu-angers.fr>

Les infections virales respiratoires sont à l'origine de tableaux cliniques peu différenciés. La disponibilité de méthodes diagnostiques panvirales rapides et sensibles facilite la gestion sanitaire des épidémies saisonnières, le diagnostic chez le patient immunodéprimé et la gestion du risque nosocomial. Dans ce contexte, nous avons évalué les performances des trois PCR multiplex Panther Fusion (Hologic) FluA/B/RSV, AdV/hMPV/RV et Parafllu-4 en comparaison avec la technique MWS R-GENE (Biomérieux). Nous avons d'abord testé les performances de ces tests sur aspiration nasopharyngée (ASN) et liquide broncho-alvéolaire (LBA), non validés par le fournisseur, en comparaison au prélèvement sur écouvillon en milieu UTM : un mélange d'échantillons positifs pour les 10 virus a été dilué en cascade (10-1 à 10-5) dans 3 matrices (UTM, ASN et LBA). Ensuite, une comparaison rétrospective a été réalisée sur 72 échantillons négatifs et 135 échantillons positifs avec la technique MWS R-GENE (Biomérieux) : 145 écouvillons nasopharyngés en UTM, 38ASN et 20LBA issus de la saison 2017/2018 (27 FluA, 30 FluB, 10 VRS, 5 AdV, 21 hMPV, 32 Rhinovirus/Enterovirus (RV/EV), 4 Parafllu et 7 co-infections). Enfin, nous avons comparé le temps nécessaire à la réalisation de la technique. Les matrices ASN et LBA ont montré des résultats similaires à ceux obtenus sur milieu UTM en termes de sensibilité : tous les virus ont été détectés avec au maximum une dilution d'écart entre UTM et ASN/LBA. La matrice ASN nécessite impérativement un prétraitement à la protéine kinase alors que la matrice LBA peut être analysée sans ce prétraitement sans impact sur la sensibilité. La concordance des deux techniques est de 90,8 %. Parmi 207 échantillons, 19 sont discordants. Quatre échantillons sont positifs en RV/EV (Biomérieux) et négatifs en RV (Hologic), et sont probablement positifs en Enterovirus (non vérifiables faute de quantité suffisante d'échantillons). Les autres échantillons discordants sont des échantillons faiblement positifs avec des Ct tardifs (> 37 Ct) sur l'une des 2 techniques (11) ou des RV non détectés par MWS R-GENE (4). La durée d'automatisation est similaire pour les deux techniques mais le temps de manipulation par le technicien est diminué (2h54/1h10 en MWS R-GENE versus 3h01/19min en Panther Fusion respectivement). Les 3 panels de PCR multiplex Panther Fusion ont montré des performances analytiques satisfaisantes par rapport aux tests MWS R-GENE pour les 10 virus testés. Les Coronavirus sont cependant des cibles non disponibles sur Panther Fusion à ce jour. Les prélèvements ASN et LBA peuvent être analysés avec cette technique sans impact sur la sensibilité. Enfin, la technique Panther Fusion permet une épargne de temps technique d'environ 1h. En outre le random-access évite le fonctionnement contraint en série et permettra une probable diminution du délai de rendu du résultat au clinicien (en cours d'évaluation).

P124

Opportunités et défis de la recherche virale en zone de guerre : Diagnostic des fièvres d'origine inexpliquée (FOI) dans les forces françaises basées en Afrique subsaharienne

Toscane Fourié¹, Isabelle Leparç-Goffart²

¹ Unité de virologie, Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA), Service de santé des armées, France

² Unité des virus émergents, IRD 190, Inserm U1207, IHU Méditerranée Infection, Centre national de référence des arbovirus, IRBA, Marseille, France

<isabelle.leparcgoftart@gmail.com>

Due à une instabilité politique durable, la connaissance sur la circulation virale en Afrique subsaharienne est faible. Dans le cadre d'interventions militaires, plus de 14 000 militaires français par an sont exposés aux risques infectieux dans 8 pays subsahariens et 2-5 % des forces projetées développeront une fièvre d'origine inexpliquée (FOI). Une investigation étiologique virale des FOI offre l'opportunité de : 1) découvrir de nouveaux pathogènes ; 2) une meilleure compréhension de la circulation virale dans ces territoires négligés ; et 3) une amélioration de la prise en charge médicale des syndromes fébriles. Cette étude en cours a donc pour objectif de rechercher l'étiologie virale de FOI dans des échantillons sanguins collectés par le CNR des Arbovirus, provenant de patients fébriles résidents ou ayant séjournés en Afrique subsaharienne. Par une approche non-spécifique exploitant les méthodes de diagnostic traditionnelles (isolement viral sur tapis cellulaire, détection d'ARN à double-brin par ELISA, détection de génome par PCR dégénérées) et moderne (séquençage nouvelle génération), cette étude doit faire face à de multiples défis techniques comme la dégradation des échantillons congelés, la contamination chimique provenant des tubes de collections sanguins et les risques de fièvres hémorragiques virales BLS4.

P125

Infections par le virus de l'hépatite E dans la région de Marseille, 2012-2018 à propos de 99 cas

Philippe Colson, Valérie Moal, Claire Decoster, Anne Motte, Catherine Dhiver, Sarah Aherfi, Catherine Tamalet, Amélie Ménard, Patrick Borentain, René Gérolami

¹ Mephi, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Univ, Marseille, France

<philippe.colson@univ-amu.fr>

Le virus de l'hépatite E (VHE) de génotype 3 est depuis une douzaine d'années une cause émergente d'infections autochtones en Europe, notamment en France. Il existe un réservoir porcin pour ce virus. Sur le plan clinique, il a été montré depuis 2008 que les infections par le VHE pouvaient évoluer vers la chronicité en cas d'immunodépression sévère, et aussi vers la cirrhose. Le spectre clinique de l'infection par le VHE s'est aussi élargi particulièrement son association à des troubles neurologiques. Nous décrivons les cas d'infections VHE diagnostiqués dans un contexte hospitalier dans le sud-est de la France au cours des 5 dernières années. Les échantillons sanguins testés ont été ceux adressés pour une recherche d'infection VHE au laboratoire de microbiologie-virologie des hôpitaux publics de Marseille, France. La période d'étude a été du 01/11/2012 au 30/04/2018 (5,5 ans). Les IgG/IgM anti-HEV ont été détectées par les tests Adaltis (<01/2013), Wantai (02/2013-01/2017), puis Euroimmun. La détection/quantification par PCR en temps réel de l'ARN viral et son séquençage après PCR conventionnelle ont été réalisés par des protocoles ciblant les régions ORF2/ORF3 du génome ; le génotypage a été réalisé par analyses phylogénétiques. Les cas d'infections VHE considérés sont ceux pour lesquels ≥ 1 prélèvement sanguin a été retrouvé positif en PCR. Les infections ont été considérées comme chroniques en cas de détection d'ARN VHE par PCR dans ≥ 2 prélèvements espacés de ≥ 6 mois. 99 cas ont été diagnostiqués sur les 5,5 années de l'étude. L'âge moyen des patients a été de 54 ± 16 ans, 73 % étant des hommes. Au moment du diagnostic, les alanines aminotransférases étaient élevées dans 93 % des cas (moyenne = 667 UI/L). La bilirubinémie était supérieure à la normale dans 47 % des cas. Des IgM indiquant une infection aiguë/récente étaient retrouvées pour 95 % des patients, et les IgG détectées dans 87 % des cas. La charge virale moyenne était de $5,8 \pm 1,2 \log_{10}$ copies/mL. Le génotype VHE a été 3 (sous-types f, c, i, e, a, h, ou b) dans 96 % des cas et 4 dans 2 %

des cas; ces cas étant associés à des infections autochtones. La consommation de saucisse de foie de porc a été documentée pour 30 patients. Une immunodépression a été retrouvée pour 43 patients, incluant 6 patients VIH+, 25 transplantés d'organes solides (rein=14 ; foie=2 ; poumon=5 ; cœur=4). Au moins 15 infections chroniques sont survenues. Huit patients étaient cirrhotiques, l'infection VHE étant la seule cause identifiée de cirrhose dans 2 cas. 28 patients ont été traités par ribavirine ; un échec ou une rechute étant observés dans 6 cas (21 %). Trois patients ayant une hépatopathie sous-jacente sont décédés, et 2 cas d'hépatite E aiguë sur cirrhose ont conduit à des transplantations hépatiques. Un cas de carcinome hépatocellulaire a été observé chez un patient cirrhotique présentant une hépatite E chronique comme seul facteur associé. Au total, nos résultats contribuent au changement de paradigme concernant les infections par le VHE. Ce virus s'avère être une cause commune d'hépatite aiguë autochtone, et une cause à rechercher d'hépatite chronique et sévère.

P126

Épidémiologie des entérovirus isolés chez les enfants de moins de 15 ans atteints de paralysie flasque aiguë au Maroc

Lemrabet Sanae

Institut national d'hygiène Maroc, Maroc

<sanae.lem@gmail.com>

Les entérovirus non polio causent habituellement des affections bénignes, comme de la fièvre, des symptômes respiratoires, des éruptions cutanées, des cloques buccales ou des douleurs musculaires. Certaines infections peuvent entraîner des complications plus graves touchant le cerveau, le cœur et le système nerveux, notamment la paralysie flasque aiguë (PFA), qui se caractérise par une faiblesse soudaine d'un ou de plusieurs membres. Il existe environ 100 sérotypes d'entérovirus non poliomyélitiques. Dans le contexte du plan d'éradication de la poliomyélite, la surveillance des entérovirus comporte deux axes : détection des éventuels cas de poliomyélite importés et surveillance de la circulation des entérovirus non polio chez l'homme. Un total de 599 prélèvements de selles d'enfants de moins de 15 ans présentant une paralysie flasque aiguë ou de leurs entourages entre 2017 et 2018. L'isolement des entérovirus est réalisé par culture cellulaire sur 2 types de lignées: L20B et RD. La présence des Entérovirus est visualisée directement par apparition d'un effet cytopathogène (ECP) ou destruction des cellules infectées. Les échantillons positifs en culture sont confirmés par PCR en temps réel par le kit Poliovirus rRT-PCR ITD 5.0 sur le système ABI 7500 d'Applied Biosystems. L'analyse des spécimens a permis l'isolement de 24 entérovirus soit une incidence de 5,9 % en 2017 et 2,7 % en 2018. Deux cas de souches vaccinales PSL3 ont été détectés en 2018 par rapport à une absence de cas en l'an 2017. Aucun cas de Poliovirus sauvage n'a été isolé. La présente étude a mis en évidence la circulation d'entérovirus non polio détecté à l'occasion de l'investigation des cas de paralysies flasques aiguës dans le cadre du programme de l'OMS pour l'éradication des cas de la poliomyélite. Cependant, l'incidence des cas d'entérovirus demeure très faible par rapport à l'indicateur de performance de la surveillance établi par l'OMS et qui est de 10 %. Des efforts restent à fournir en termes d'acheminement des prélèvements et surtout le respect de la chaîne de froid.

P127

MediLabSecure 2 : prévention, surveillance et contrôle des maladies virales à transmission vectorielles sur le pourtour méditerranéen et dans le Sahel

Guillain Mikaty¹, Jean-Claude Manuguerra¹, Maud Seguy², Lobna Gaayeb², Miguel-Angel Jimenez³, Jovita Fernandez Pinero³, Elisa Perez Ramirez³, Vincent Robert⁴, Marie Picard⁴, Sylvia Declich⁵, Maria-Grazia Dente⁵, Guy Hendrickx⁶

¹ Environnement et risque infectieux-CIBU (ERI-CIBU), Institut Pasteur, Paris France

² Direction internationale de l'Institut Pasteur, Paris, France

³ Centro de Investigación en Sanidad Animal -Animal Health Research Centre (CISA-INIA), Espagne

⁴ Infectious Diseases and Vectors : Ecology, Genetics, Evolution and Control (Mivegec), IRD : UMR5290, France

⁵ National Centre for Epidemiology, Surveillance and Health Promotion (ISS), Italie

⁶ AviaGIS, Belgique

<guillain.mikaty@pasteur.fr>

Les pays du pourtour méditerranéen, de la mer Noire et du Sahel partagent une même aire géographique avec un écosystème continu. Ils établissent les uns avec les autres de nombreux échanges de personnes et de biens. Par voie de conséquence, ces pays partagent de nombreux risques et menaces pour la santé publique et animale. Le projet MediLabSecure vise à créer et consolider un réseau de laboratoires de virologie humaine et vétérinaire, d'entomologistes et d'intervenants de la santé publique et animale. Le projet s'appuie sur le principe One Health qui promeut les interactions entre les différents acteurs de la santé publique, de la santé animale et de l'environnement afin d'optimiser la surveillance et la lutte contre des menaces communes et/ou transversales. MediLabSecure se concentre en particulier sur les maladies virales à transmission vectorielle, telles les arboviroses, ayant un impact sur la santé animale ou humaine. Le but du projet est de permettre la prise de conscience de tous les acteurs de la santé et d'aider à la mise en place du diagnostic, de l'évaluation des risques, de la surveillance et du contrôle des maladies virales à transmission vectorielle.

P128

Production, purification et caractérisation du domaine III d'enveloppe de Flavivirus

Sarah Attoumani^{1,2}, Jessica Denis^{3,4}, Isabelle Leparc-Goffart^{2,4}, Gilda Grard^{2,4}, Patrick Gravier^{2,4}, Bernard Tenebray^{2,4}, Annabelle Garnier³, Cyril Badaut^{3,4}, Bruno Coutard^{1,2}

¹ Architecture et fonction des macromolécules biologiques (AFMB), CNRS UMR7257, Aix-Marseille Université, Marseille, France

² Unité des virus émergents (UVE), IRD : UMRS 1207, Aix-Marseille Université : UMRS1207, Inserm : UMRS1207, Marseille, France

³ Unité de thérapies anti-infectieuses et immunité, Institut de recherche biomédicale des armées, Brétigny-sur-Orge, France

⁴ Centre national de référence (CNR) des arbovirus, Laboratoire coordinateur : Équipe résidente de recherche d'infectiologie tropicale (Errit), Institut de recherche biomédicale des armées, Hôpital d'instruction des armées Laveran, Marseille, France
<bruno.coutard@afmb.univ-mrs.fr>

Le virus Zika (ZIKV) est un arbovirus du genre Flavivirus, comme le virus de la dengue (DENV). Ces deux virus sont phylogénétiquement proches et co-circulent dans certaines régions du monde. De ce fait, il est difficile de diagnostiquer spécifiquement dans le sérum d'un patient le Flavivirus responsable d'une infection virale. Le domaine III des protéines d'enveloppe (EDIII ou DIIE) des Flavivirus a la particularité d'être immunogène et de posséder des épitopes qui pourraient être spécifiques de chaque virus. À ce titre, ce domaine représente une cible potentielle pour le développement d'outil de diagnostic sérologique. Dans ce contexte, nous avons mis au point un protocole de production et de purification d'EDIII recombinant de ZIKV et DENV. Le développement du processus a été réalisé sur l'EDIII de ZIKV. La protéine recombinante en fusion avec un tag Hexa-histidine a été produite en corps d'inclusion dans *E. coli*. Après re-solubilisation des corps d'inclusion, la protéine est purifiée en conditions dénaturantes et renaturée *in vitro*, pour caractérisation biophysique et sérologique. L'étude met en évidence que l'EDIII de ZIKV peut être produite sous forme de monomère homogène, immunogène et permettant de détecter spécifiquement des IgG dans des séra de patients. Les rendements de production étant supérieurs à 1 mg/L de culture bactérienne, le protocole développé peut être appliqué à la production d'EDIII d'autres Flavivirus.

P129**Validation d'une RT-qPCR en une étape pour la détection et la quantification du génome du virus de la diarrhée épidémique porcine**Lionel Bigault^{1,2}, Cécilia Bernard², Yannick Blanchard², Béatrice Grasland²¹ Université Bretagne Loire (UBL) Rennes, France² Ploufragan/Plouzané Laboratory, Unit of Viral Genetics and Biosecurity, Anses, PRES Université européenne de Bretagne [UEB], Ploufragan, France

<beatrice.grasland@anses.fr>

La diarrhée épidémique porcine (DEP) est une maladie porcine provoquée par un alpha coronavirus. La DEP est caractérisée par de fortes diarrhées aqueuses, des vomissements, entraîne une forte déshydratation, pouvant parfois être à l'origine de mortalités importantes chez les jeunes porcelets. Tout d'abord décrite en Angleterre dans les années 1970, elle a disséminé à travers l'Europe, où elle a été très présente jusque dans les années 1990. À partir des années 2010 de nouvelles souches à virulence accrue sont apparues en Asie entraînant une morbidité et une mortalité proche de 100 % chez les porcelets et ce, malgré l'utilisation de vaccins atténués. Depuis 2013, le virus qui était absent du continent américain a fait une apparition massive aux États Unis d'Amérique avec plus de 32 États touchés au cours des années 2013-14 puis il a réémergé en Europe au cours de l'année 2014. En France, aucune méthode officielle n'est disponible pour la détection et la quantification du vDEP. De nombreuses RT-qPCR ont été décrites pour la détection du génome viral, mais aucune validation de la méthode complète n'a été faite. Cette étude vise à pallier ce manque, en décrivant la validation d'une méthode de RT-qPCR suivant la norme NFU47-600, pour la détection et la quantification du génome du vDEP. La méthode évaluée, inclut la préparation des échantillons de fèces ou de jéjunum, l'extraction des acides nucléiques, et la RT-qPCR. Les limites de détection (LoD) et de quantification (LQ), le domaine de linéarité, ainsi que les variabilités intra- et inter-essais ont été évaluées à l'aide de transcrits d'ARN cible, et de fèces ou jéjunum artificiellement chargés par du virus produit sur culture cellulaire. La sensibilité et la spécificité de cette RT-qPCR en SYBR Green est suffisante pour identifier spécifiquement vDEP.

P130**The European Virus Archive goes global: A growing resource for research**

Christine Prat, Jean-Louis Romette

Unité des virus émergents, UMR 190, IRD : UMR190, Aix-Marseille université, Marseille, France

<christine.Prat@univ-amu.fr>

The European Virus Archive (EVA) was created in 2008 with funding from the FP7-EU Infrastructure Programme, in response to the need for a coordinated and readily accessible collection of viruses that could be made available to academia, public health organisations and industry. Within three years, it developed from a consortium of nine European laboratories to encompass associated partners in Africa, Russia, China, Turkey, Germany and Italy. In 2014, the H2020 Research and Innovation Framework Programme (INFRAS projects) provided support for the transformation of the EVA from a European to a global organization (EVAg). The EVAg now operates as a non-profit consortium, with

26 partners and 20 associated partners from 21 EU and non-EU countries. In this poster, we outline the structure and goals of the EVAg, and how EVAg has helped respond to Viral Public Health Emergencies. Our aim is to bring to the attention of researchers the wealth of products it can provide and to illustrate how end-users can gain access to these resources.

P133**Utilisation de la technologie CRISPR-Cas13a pour la détection de génomes viraux**

Gaelle Frenois-Veyrat, Olivier Flusin, Laetitia Boutin, Olivier Ferraris, Frédéric Iseni

Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA), Service de santé des armées, Breigny sur Orge, France

<gaelle.frenois-veyrat@intradef.gouv.fr>

Déployées principalement sur des théâtres d'opérations extérieures africains, les forces françaises restent très exposées aux fièvres hémorragiques comme la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (FHCC) et aux orthopox-viroses, notamment l'infection au virus Monkeypox (MPXV). Transmise par des tiques ou lors d'un contact avec un animal infecté, la FHCC est une arbovirose fatale pour l'homme dans 10 à 50 % des cas et est largement répandue dans le monde. L'agent responsable de la maladie (CCHFV) est un virus hautement pathogène de classe 4 qui est à l'origine non seulement d'infections à fort potentiel nosocomial mais aussi d'une recrudescence des cas sporadiques et des épidémies, en particulier en Europe. L'infection au MPXV (virus de classe 3) est actuellement la plus préoccupante des orthopoxviroses émergentes. Le tableau clinique est proche de celui de la variole avec un taux de mortalité moins élevé autour de 10 %. Elle provoque régulièrement des cas sporadiques et des épidémies en Afrique de l'Ouest et centrale. L'apparition pour la première fois d'une épidémie aux USA en 2003 a été à l'origine d'une prise de conscience générale de l'importance sanitaire de cette virose. Le diagnostic biologique de ces infections virales pour les laboratoires de terrain nécessite de pouvoir disposer de méthodes sensibles, rapides et peu coûteuses. À l'heure actuelle, ce diagnostic repose essentiellement sur la technique de PCR en temps réel. Récemment, une méthodologie nommée Sherlock, basée sur la technologie CRISPR/Cas13 a été développée pour la détection d'acides nucléiques [1]. Cet outil de détection moléculaire est extrêmement sensible et spécifique permettant la discrimination de séquences différant d'un seul nucléotide. En outre, l'ensemble du processus réactionnel est réalisé dans le même tube et à 37°C ce qui ne nécessite pas de thermocycleur et donc favorise son utilisation sur les théâtres d'opérations extérieures. Le système de détection est basé sur l'amplification de l'acide nucléique cible, qui est ensuite transcrit. La reconnaissance de ces ARN par le CRISPR RNA (crRNA) spécifique de l'agent à détecter permet l'activation de la RNase Cas13a qui va cliver l'ARN cible mais également un ARN rapporteur couplé à un fluorochrome, permettant ainsi la détection de l'agent infectieux en temps réel. L'objectif du projet est de mettre au point la technologie Sherlock dans le but de détecter les génomes viraux de CCHFV et de différents orthopoxvirus. À plus long terme, cette méthodologie pourra être utilisée pour la détection d'autres virus à ARN et à ADN d'intérêts.

Référence1. Gootenberg JS *et al.*, *Science* 2017 ; 356 : 438-42.