



Réseau des CNR. Quelles nouveautés en 2017?

Virus des infections respiratoires

Bruno LINA

CNR des virus respiratoires, HCL,
Virpath, Université de Lyon, CIRI, U1111, UMR 5308, ENS, UCBL,
Lyon, France

Les nouveautés :

- Le périmètre passe de la grippe à l'ensemble des virus des infections respiratoires
 - Grippe, VRS, Rhinovirus (« pont » avec le CNR des enterovirus), metapneumovirus, parainfluenzavirus, adenovirus, Coronavirus, Bocavirus
 - Les virus émergents
 - Influenza aviaire et porcins
 - Coronavirus du SRAS et du MERS
 - Autres...
- Les outils
 - NGS et Bio-informatique
 - PCR multiplex
 - Evaluation des autres outils du diagnostic (TDR, Test moléculaires rapides)
- Les objectifs
 - Surveillance primaire et secondaire
 - Expertise et conseil
 - Alerte

Les nouveautés :

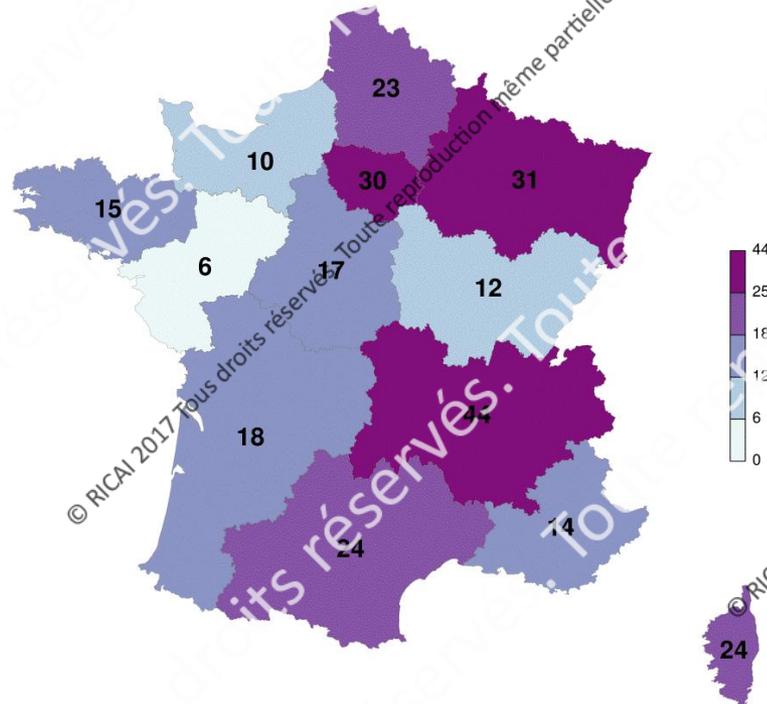
- **La structuration du réseau**
 - Recentrage vers les labos du CNR des échantillons de la surveillance primaire
 - Renforcement des données venant du réseau RENAL
- **Les collaborations et l'expertise**
 - LNR porc et aviaire
 - L'OMS
 - AIC
 - H5 ref lab
 - Réseaux Européens
 - ERLI-Net
 - Imove +
 - Autres
 - Beta testing du QCA de l'ECDC
- **Les contraintes**
 - ANSM et MOT



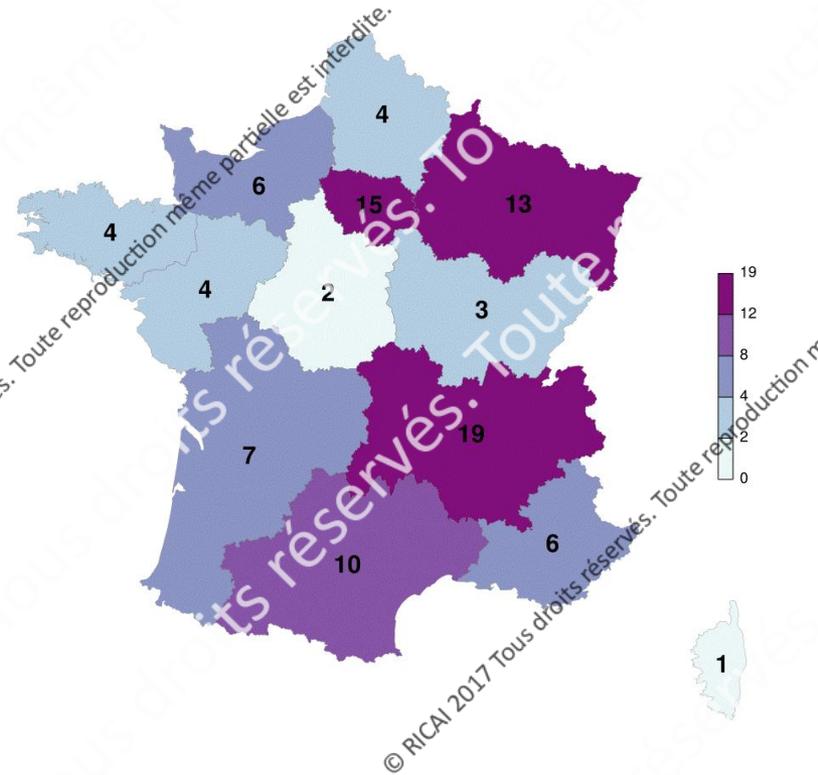
Périmètre géographique de la surveillance



Périmètre géographique de la surveillance



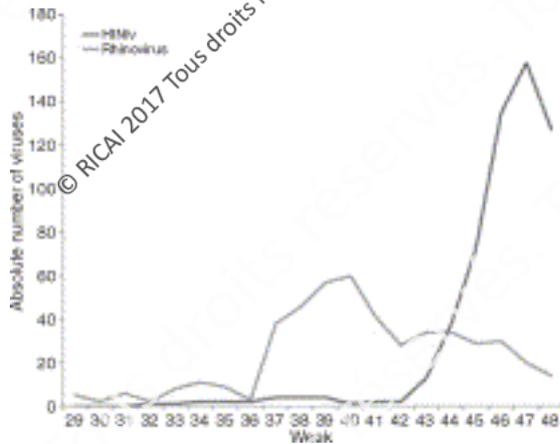
MG sentinelle Viro



Pédiatres sentinelle Viro

Périmètre microbiologie de la surveillance

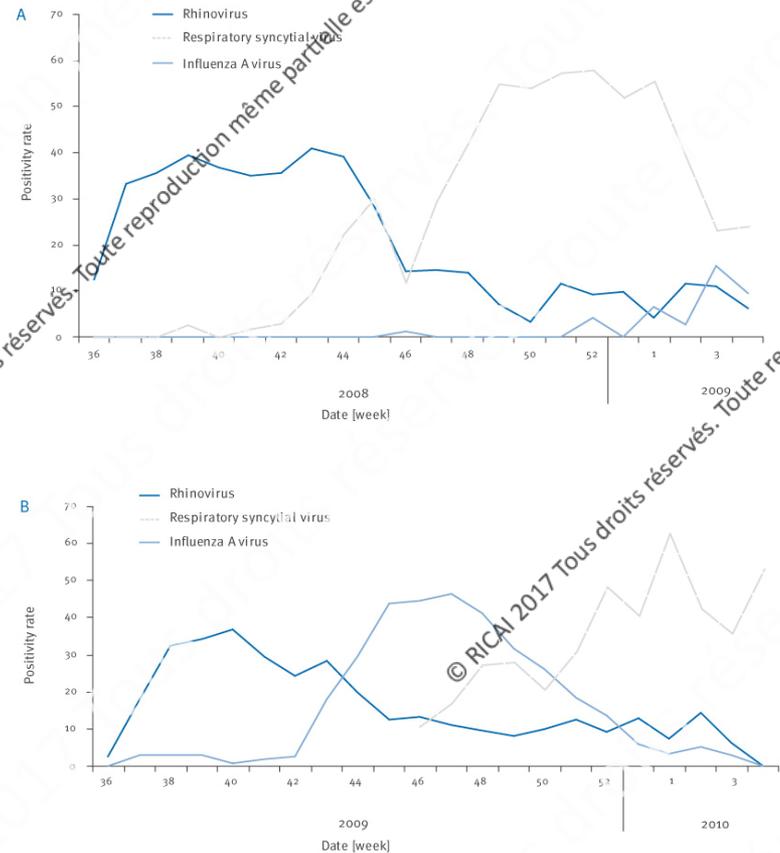
- Pourquoi étendre à tous les virus à transmission respiratoire?
 - Les virus confondants de la grippe
 - L'hypothèse de l'interférence virale



Casalegno et al, Eurosurveillance 2011
Casalegno et al, Clin Microbiol Infect 2010

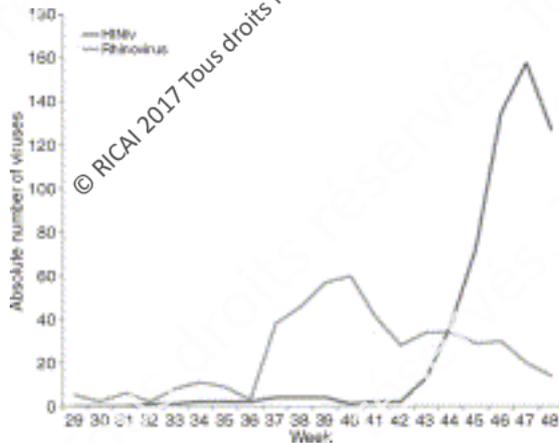
FIGURE

Positivity rates of laboratory-confirmed cases of rhinovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus during autumn and winter 2008-9 (A) and 2009-10 (B), in samples obtained from the emergency paediatric unit at 'Femme-Mère-Enfant' hospital in Lyon, France



Périmètre microbiologie de la surveillance

- Pourquoi étendre à tous les virus à transmission respiratoire?
 - Les virus confondants de la grippe
 - L'hypothèse de l'interférence virale
 - La faible spécificité de la définition de cas



TABLE

Percentage of clinical symptoms observed in paediatric patients with a positive influenza or rhinovirus laboratory-confirmed nasal sample, week 36 to 46, France 2009 (n=415)

Symptom	Influenza A(H1N1)	Rhinovirus	Odds ratio, 95% confidence interval	p
Cough	87,9	59,2	(0,12;0,32)	p<0,001
Asthenia	24,6	13,8	(0,29;0,81)	p<0,001
Myalgia	22,2	6,4	(0,11;0,47)	p<0,001
Diarrhoea	9,8	5,3	(0,90;4,10)	Not significant
Vomiting	21,8	15,7	(0,40;1,10)	Not significant
Hyperthermia	31,7	79,2	(0,50;1,38)	Not significant
Temperature ≥ 39,5°	28	25,3	(0,53;1,51)	Not significant
Swollen lymph nodes	12,1	11,8	(0,53;1,76)	Not significant
Nasal secretion	36,1	45,1	(0,98;2,16)	p<0,05
Bronchitis	3,4	5,4	(0,62;0,30)	Not significant
Dyspnoea	8,2	24,1	(1,7;41,30)	p<0,001
Otitis	8,2	2,5	(0,10;0,78)	p<0,01
Pharyngitis	32,2	8,7	(0,11;0,35)	p<0,001
Cutaneous rash	7,8	4,9	(0,27;1,39)	Not significant
ILI diagnosed	36,5	35	(0,62;1,39)	Not significant

^a Results are presented as the likelihood of the presence of symptoms and rhinovirus detection (Odds ratio, 95% confidence interval)

Périmètre microbiologie de la surveillance

- Pourquoi étendre à tous les virus à transmission respiratoire?
 - Les virus confondants de la grippe
 - L'hypothèse de l'interférence virale
 - La faible spécificité de la définition de cas
 - Le système de surveillance communautaire

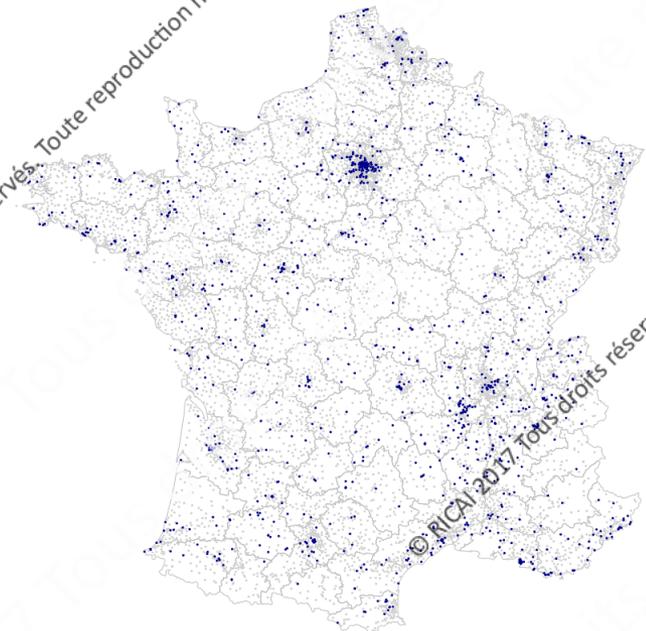
RÉSEAU UNIQUE - FRANCE-SUD

Isollements et diagnostics directs

	TOTAL POS	Auvergne Rhône-Alpes	Nouvelle Aquitaine	Occitanie	PACA	Corse
V. Grippal A/B						
A H1	5	1	1	2	1	
A H3	3	1		1	1	
V. Grippal B	4	2		1	1	
VRS	13	5	3	4	1	
Métagrippevirus	3	1	1		1	
V. Parainfluenza	1			1		
ADV						
Coronavirus	1				1	
Rhinovirus	10	3	3	3	1	
Bocavirus						
Myc. Pneumoniae						
Nb Patients	39	16	6	9	6	2

* N1 = Non Typé

Commentaire : Circulation des virus grippaux A&B (31%) et du VRS (33%) et des Rhinovirus (26%).

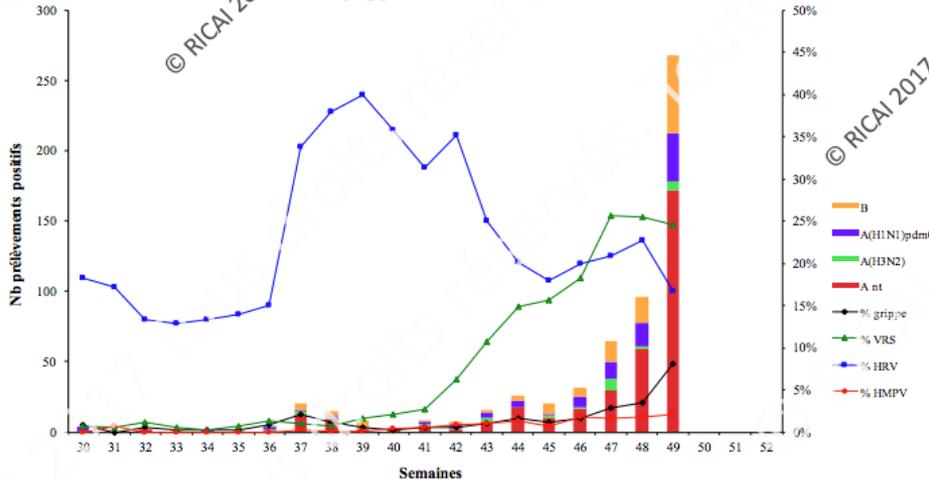


Périmètre microbiologie de la surveillance

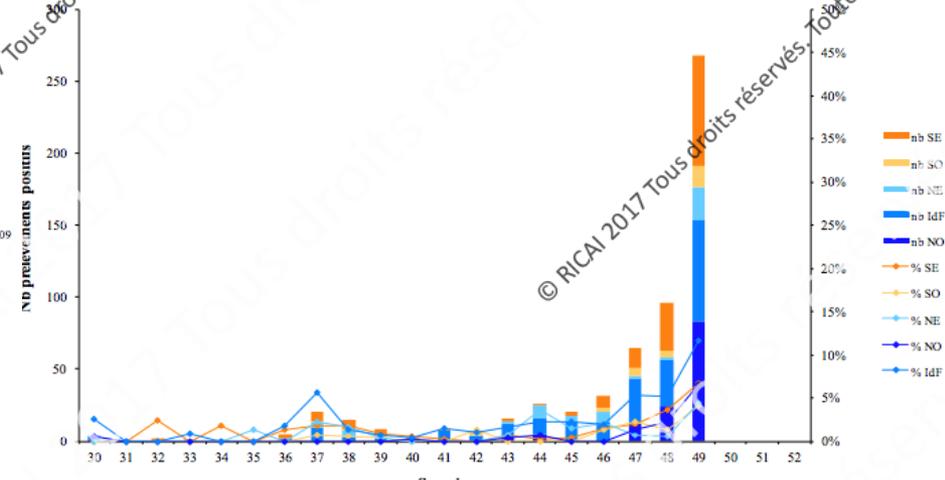
- Pourquoi étendre à tous les virus à transmission respiratoire?
 - Les virus confondants de la grippe
 - L'hypothèse de l'interférence virale
 - La faible spécificité de la définition de cas
 - Le système de surveillance communautaire et hospitalier



Réseau RENAL (saison 2017/2018)
Détection des virus grippaux, VRS, Rhin/Entero, hMPV

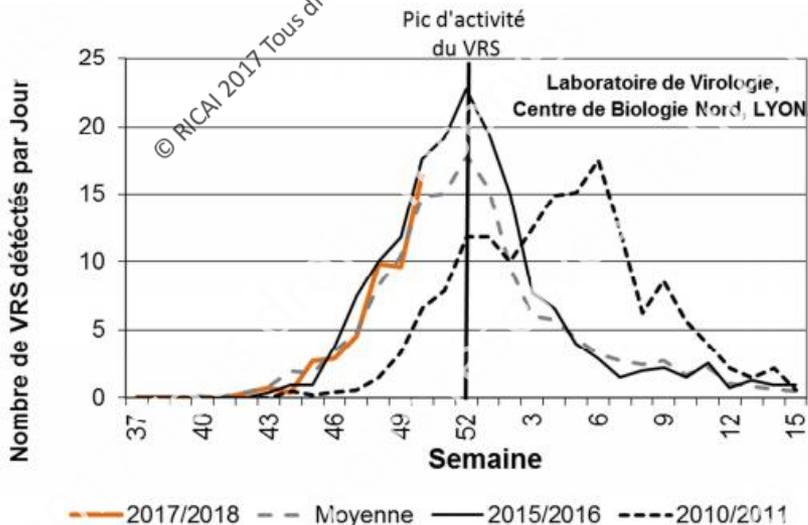


Réseau RENAL (saison 2017/2018)
Détection des virus grippaux
Répartition par zone géographique



Périmètre microbiologie de la surveillance

- Pourquoi étendre à tous les virus à transmission respiratoire?
 - Les virus confondants de la grippe
 - L'hypothèse de l'interférence virale
 - La faible spécificité de la définition de cas
 - Le système de surveillance communautaire
 - L'étude de l'épidémiologie et de la pathogénèse des VRS
 - Chez l'enfant



Casalegno BEHcl 49-2017

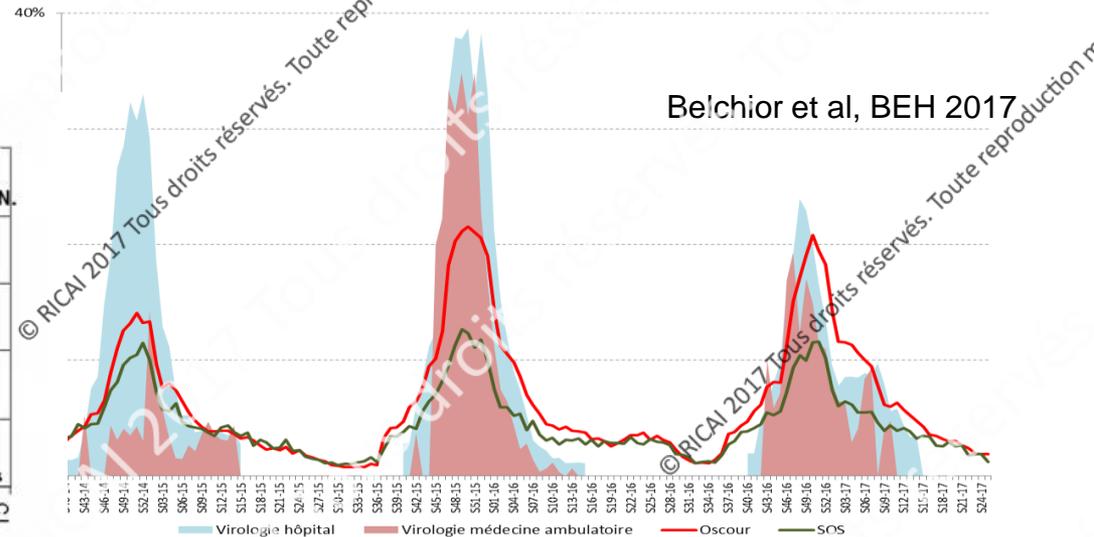
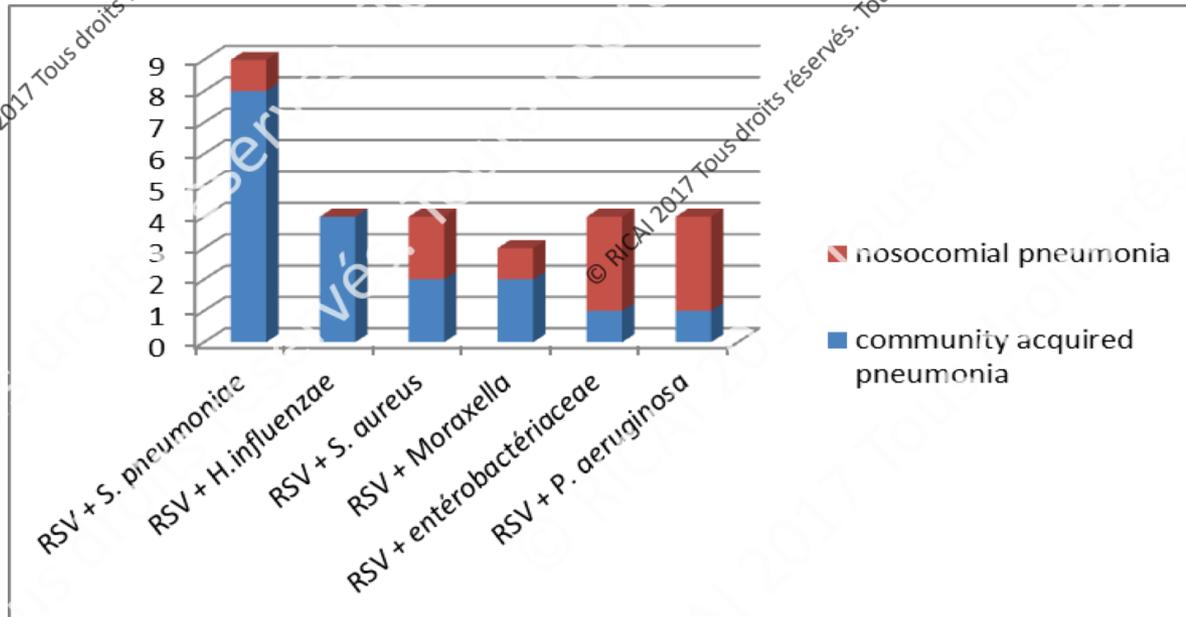


Tableau 1. Indicateurs de surveillance épidémiologique de la bronchiolite chez les enfants de moins de 2 mois à partir des données SOS médecins et OSCOUR®, comparaison des saisons de surveillance RENAL 2014-15, 2015-16 et 2016-2017, à nombre constant de structures signalantes

Périmètre microbiologie de la surveillance

- Pourquoi étendre à tous les virus à transmission respiratoire?
 - Les virus confondants de la grippe
 - L'hypothèse de l'interférence virale
 - La faible spécificité de la définition de cas
 - Le système de surveillance communautaire
 - L'étude de la pathogénèse des VRS
 - Chez la personne âgée

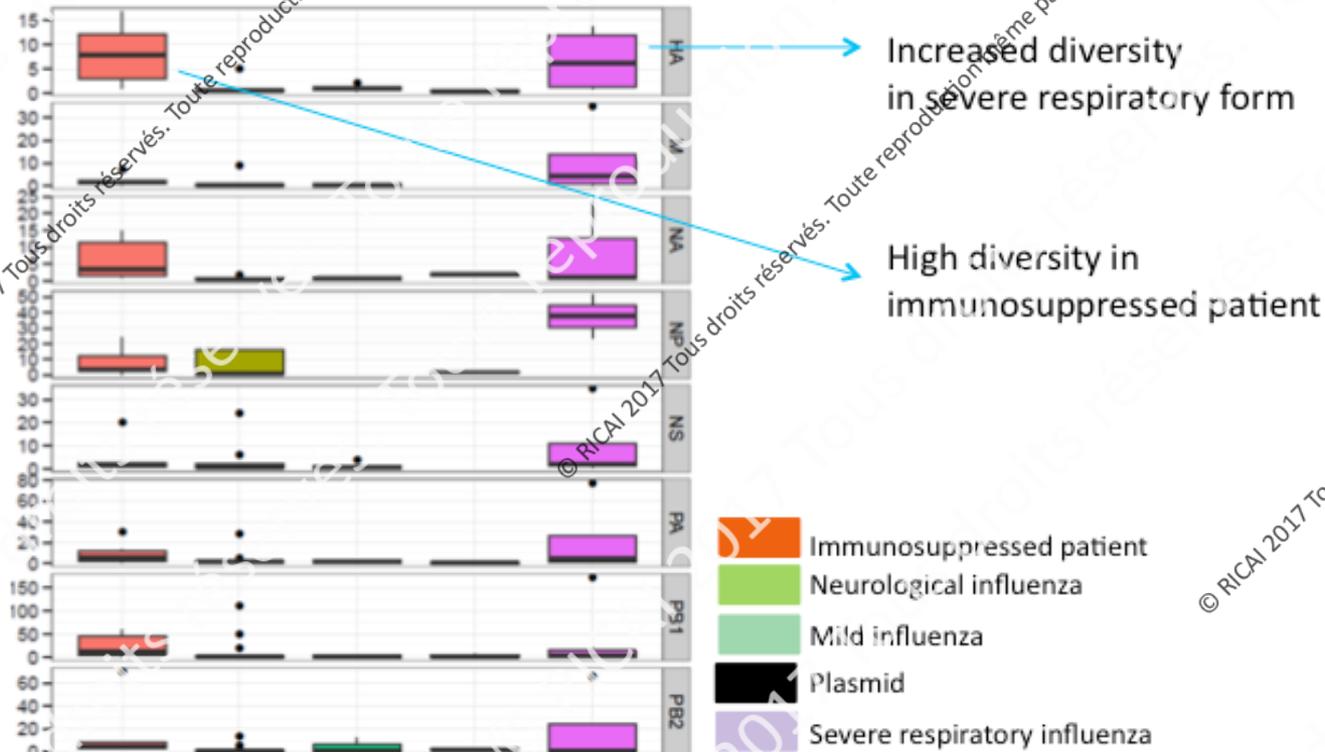


Périmètre microbiologie de la surveillance

- Pourquoi étendre à tous les virus à transmission respiratoire?
 - Les virus confondants de la grippe
 - L'hypothèse de l'interférence virale
 - La faible spécificité de la définition de cas
 - Le système de surveillance communautaire
 - L'introduction de la pathogénèse des VRS
 - L'introduction de nouveaux vaccins contre le VRS
 - Pour l'enfant,
 - Pour la femme enceinte
 - Pour la personne âgée

Le nouveau périmètre des outils

- Le NGS, le virome et la métagénomique infectieuse pour influenza
 - Rapidité et volume des informations (presque en temps réel)
 - Sensibilité de détection (suivi des quasi-espèces)



Le nouveau périmètre des outils (res#1)

Réception	Identifiant	N°CNR VI	Nature PLT	Résultats BIOFIRE			Corona ORF1a Corona UpE	Duplex A&B	Sous-typage/ Lignage	VRS&hMPV	ADV/Boce	PICO	HCoV/PIV	Myc/Chlam	Ct Cell
10/9	BOU_A_1873_H69	1874/17	nez	NT			négatif	A (20,05)	N1 (21,57)	NEG	NEG	NEG	NEG	NT	25,44
		1875/17	ATB	GRA H1			négatif	A (15,94)	N1 (17,26)	NEG	NEG	NEG	NEG	NT	20,51
10/9	SOU_Z_1849_F69	1876/17	nez+gorge	NT			négatif	A (24,29)	H3 (24,77)	VRS (30,17)	NEG	NEG	HCoV (34,41)	NT	22,73
		1877/17	aspiration NP	Corona OC43	GRA H3	VRS	négatif	A (13,13)	H3 (19,14)	VRS (27,9)	NEG	NEG	HCoV (29,06)	NT	20,56
10/9	SAL_H_1843BF74	1878/17	nez	NT			négatif	A (26,48)	N1 (27)	NEG	NEG	NEG	NEG	NT	25,15
		1879/17	crachat	GRA H1			négatif	A (20,72)	N1 (21,28)	NEG	NEG	NEG	NEG	NT	24,82
11/9	AKL_Z_1860BF69	1883/17	nez+gorge	GRB			négatif	B (22,29)	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NT	20,37
		1884/17	aspiration NP	Rhino/Entéro	GRA H1	B	négatif	B (20,63)	N1 (23,36)	NEG	NEG	NEG	NEG	NT	17,45
14/9	MAM_M_1846-F-69	1886/17	nez	NT			négatif	NEG	H3 (30,51)	NEG	NEG	NEG	NEG	NT	23,87
		1887/17	ATB	Rhino/Entéro	GRA H3		négatif	A (37,36)	H3 (35,31)	NEG	NEG	Pico (33,43)	NEG	NT	19,89
		1888/17	crachat	Invalid			négatif	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NT	22,12
14/9	BIAF_1844_F43	1889/17	nez	Négatif			négatif	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NT	31,82
		1890/17	crachat	Rhino/Entéro		Meta pneumovirus	négatif	NEG	NEG	NEG	NEG	Pico (36,46)	NEG	NT	20,54
14/9	KOC_O_1864_H01	1892/17	nez	Rhino/Entéro			négatif	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NT	31,31
		1893/17	crachat	Rhino/Entéro	GRA H3		négatif	A (26,17)	H3 (26,74)	NEG	NEG	NEG (41,52)	NEG	NT	24,25
		1897/17	crachat	Rhino/Entéro		Adv	négatif	NEG	NEG	NEG	ADV (33,14)	Pico (27,22)	NEG	NT	21,38
15/9	KOC_A_1859_F01	1898/17	nez	Rhino/Entéro			négatif	NEG	NEG	NEG	neg	Pico (31,6)	NEG	NT	20,78
		1899/17	ATB	NT			négatif	NEG	NEG	NEG	ADV (31,4)	Pico (26,32)	NEG	NT	19,53
		1900/17	ANP	Rhino/Entéro			négatif	NEG	/	NT	NT	Pico (37,51)	NT	NT	21,84
16/9	TOU_N_1858-F69	1901/17	crachat	Rhino/Entéro			négatif	NEG	/	NT	NT	NEG	NT	NT	25,05
		1902/17	nez	NT			négatif	NEG	/	NT	NT	Pico (35,95)	NT	NT	23,13
17/9	LAM_F_1848-F74	1903/17	crachat	Flu A équivoque			négatif	NEG	N1 (39,36)	NT	NT	NEG	NT	NT	20,21
		1904/17	naso-pharyngé	Flu A équivoque			négatif	A (35,5)	N1 (34,42)	NT	NT	NEG	NT	NT	22,57
17/9	HAB_L_1850_H42	1905/17	crachat	Négatif			négatif	NEG	/	NT	NT	NEG	NT	NT	24,93
		1906/17	naso-pharyngé	Négatif			négatif	NEG	/	NT	NT	NEG	NT	NT	25,42
19/9	BOU_Y_538H69	1907/17	Aspiration	Rhino/Entéro		OC43	négatif	NEG	N1 (38,14)	NT	NT	Pico (37,3)	HCoV (24,49)	NT	23,13
		1908/17	naso-pharyngé	Rhino/Entéro	H12009 équivoque	OC43	négatif	A (38,57)	N1 (38,53)	NT	NT	NEG	HCoV (23,7)	NT	24,87
21/9	TAB_M_1866_H69	1909/17	crachat	Rhino/Entéro			négatif	NEG	/	NT	NT	Pico (31,22)	NT	NT	21,42
		1910/17	naso-pharyngé	Rhino/Entéro			négatif	NEG	/	NT	NT	Pico (33,74)	NT	NT	25,19
22/9	SER_F_1833-F69	1911/17	ATB	GRB	GRA Equivoque		négatif	B (30,99)	NEG	NT	NT	NEG	NT	NT	23,74
		1912/17	crachat	GRB			négatif	B (33,92)	NEG	NT	NT	NEG	NT	NT	23,78
		1917/17	naso-pharyngé	NT			négatif	B (27,21)	N1 (35,42)	NT	NT	NEG	NT	NT	22,82
23/9	MEC_M_1845_H73	1913/17	crachat	Rhino/Entéro		OC43 + 229E	négatif	NEG	/	NT	NT	Pico (32,55)	NEG	NT	21,44
		1914/17	naso-pharyngé	Négatif			négatif	NEG	/	NT	NT	NEG	NEG	NT	23,97
24/9	ELM_O_1830_H30	1915/17	naso-pharyngé	Rhino/Entéro			négatif	NEG	/	NT	NT	Pico (25,44)	NT	NT	25,03
		1916/17	naso-pharyngé	Rhino/Entéro			négatif	NEG	/	NT	NT	Pico (25,05)	NT	NT	20,98
25/9	SOU_M_1867_F26	1918/17	crachat	GRB	Mycoplasma pn.		négatif	B (15,16)	/	NT	NT	NEG	NT	Myc (34,59)	19,84
		1919/17	naso-pharyngé	NT			négatif	B (18,61)	/	NT	NT	NEG	NT	NEG	23,69
25/9	ABE_H_1844-F69	1920/17	ANP	Rhino/Entéro			négatif	NEG	/	NT	NT	NEG	NT	NT	24,85
		1921/17	crachat	Négatif			négatif	NEG	/	NT	NT	NEG	NT	NT	21,45
		1922/17	naso-pharyngé	NT			négatif	NEG	/	NT	NT	NEG	NT	NT	23,19
26/9	HAM_B_1841-F69	1923/17	crachat	Rhino/Entéro			négatif	NEG	/	NT	NT	Pico (35,16)	NT	NT	25,4
		1924/17	ATB	Rhino/Entéro			négatif	NEG	/	NT	NT	Pico (28,06)	NT	NT	22,88
		1925/17	naso-pharyngé	NT			négatif	NEG	/	NT	NT	Pico (29,04)	NT	NT	22,13
21/10	SAN_M_1877-F69	2012/17	crachat			VRS	négatif	NEG	/	VRS (20,86)	NT	NT	NT	NT	/
		2013/17	naso-pharyngé			VRS	négatif	NEG	/	VRS (24,42)	NT	NT	NT	NT	/

Le nouveau périmètre des outils

- La RT-PCR, la ddPCR et le NGS pour l'analyse de la résistance aux antiviraux (suivi de mutations ponctuelles)

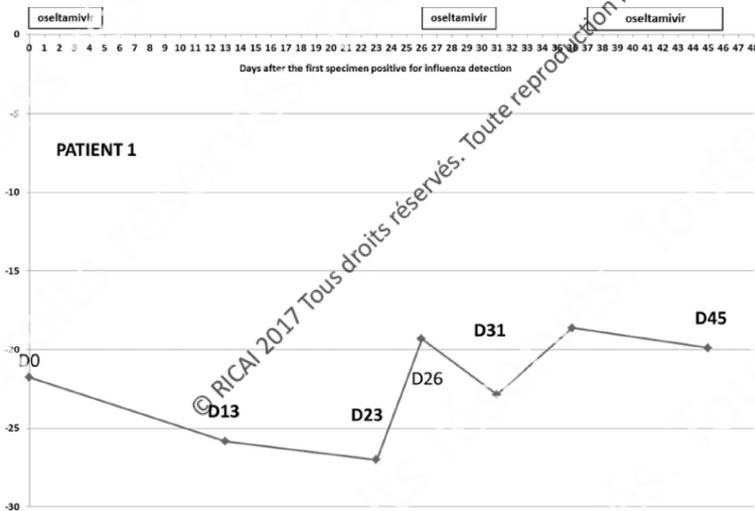


Table 1

Comparison between RT-qPCR, RT-ddPCR and NGS for the detection of influenza A virus subpopulation with H275Y-NA substitution in clinical specimens of two immunocompromised patients.

Date	Ct of routine influenza detection RT-qPCR ^a	Specific H275Y RT-qPCR			Specific H275Y RT-ddPCR				NA sequencing by NGS		Enzymatic assay for IC ₅₀ ± SD (nM)					
		H275	275Y	CV	H275	275Y	Coverage value ^b	H275	275Y	Osetamivir	Zanamivir					
		Mean (%)	Mean (Cq)	CV (%)	Mean (%)	Mean (Cq)	CV (%)	Mean (%)	CV (%)	Mean (%)	Mean (%)					
Patient 1																
Day 0	21.8	100.0%	25.0 ^d	0.0%	NA	NA	NA	100.0%	0.02%	0.0%	112.2%	769	100.0%	0.0%	0.41 ± 0.16	0.29 ± 0.14
Day 13 ^c	25.8	59.3%	30.8	2.6%	40.7%	30.5	3.76%	53.3%	2.1%	46.7%	2.3%	2972	43.5%	56.5%	36.66 ± 38.45	0.37 ± 0.05
Day 23	27.0	100.0%	31.0	NA	0.0%	NA	NA	93.8%	0.70%	6.2%	10.7%	83	NA	NA	0.39 ± 0.08	1.39 ± 0.05
Day 26	19.3	100.0%	28.2	NA	0.0%	NA	NA	100.0%	NA	0.0%	NA	12662	100.0%	0.02%	NR	NR
Day 31 ^c	22.9	0.0%	NA	NA	100.0%	28.8	NA	2.5%	7.6%	97.5%	0.2%	205	3.90%	96.1%	159.75 ± 73.04	0.53 ± 0.14
Day 45 ^c	19.9	0.0%	NA	NA	100.0%	26.6	NA	0.0%	NA	100.0%	NA	601	2.16%	97.8%	177.65 ± 33.30	0.50 ± 0.65
Patient 2																
Day 0	19.4	100.0%	28.2	NA	0.0%	NA	NA	100.0%	NA	0.00%	NA	2776	99.9%	0.1%	NR	NR
Day 7 ^c	30.0	70.7%	38.2	15.5%	29.3%	31.6	37.40%	67.6%	6.39%	32.4%	13.3%	4	NA	NA	NR	NR
Day 9 ^c	20.2	96.5%	26.2	0.5%	3.5%	30.4	14.29%	74.7%	1.47%	25.3%	4.4%	82	NA	NA	0.42 ± 0.27	0.29 ± 0.01

^a The influenza virus detection was performed using Influenza A/B r-gene[®] RTqPCR (bioMérieux, Argenteuil, France) kit.

^b Coverage value described the number of reads that align to a known reference base (here coding CAT or GAT at the amino acid position 275 of the NA segment).

^c Statistically significant differences between RT-qPCR and RT-ddPCR ($p < 0.05$).

^d All means were determined after having performed the experimentations (for RT-ddPCR and RT-qPCR) in triplicates except for D0 and D23 samples from patient 1 due to insufficient quantity of sample. All means for NGS were determined for a coverage value $> 100 \times$. Abbreviations: CV: coefficient of variance, IC₅₀: osetamivir or zanamivir concentration able to inhibit 50% of the NA activity, SD: standard deviation, NA: not applicable.

Le nouveau périmètre des outils

- Les évaluations des TROD grippe
 - Analyse comparatives des performances analytiques (en ligne sur le site du CNR)

Tableau : Recommandation pour l'utilisation de Tests Rapides d'Orientation Diagnostique (TROD) grippe basé sur l'évaluation de la sensibilité de 24 tests rapides (avec ou sans lecteur) pour la détection des virus Influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) et influenza B [lignages Yamagata et Victoria].

Sélection des 10 meilleurs TROD et description des performances.

DISPOSITIF	FABRICANT	NOM DU TEST	A H3N2 DICT ₅₀ /mL			A H1N1 DICT ₅₀ /mL			B Victoria DICT ₅₀ /mL			B Yamagata DICT ₅₀ /mL			SCORE ANALYTIQUE (/16)
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁴	
AVEC LECTEUR	ALERE-I §	Alere i Influenza A&B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	>12	
	QUIDEL / INGEN	Sofia Influenza A+B FIA	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	10	
	Fujifilm*	ImmunoAG FluA&B	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	9	
	BD Diagnostics	BD Veritor system for rapid detection of flu A+B	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	9	
SANS LECTEUR	FUJIREBIO EUROPE	Espline Influenza A&B-N	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	8	
	BENEX LIMITED / BD Diagnostics	BD Directigen EZ Flu A+B	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	7	
	ALLDIAG	Influzatop	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	6	
	DENKA SEIKEN UK	QuickNav-Flu	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	6	
	CerTest BIOTEC	CerTest Influenza A+B	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	6	
QUIDEL / INGEN	QuickVue Influenza A+B test	+	+	-	+	d ^a	-	+	-	-	+	+	6		

Les résultats des dilutions 10³ DICT₅₀/mL et au-delà ne sont pas représentés car, à part les tests ALERE-i, aucun test ne détecte un virus au-delà de la dilution. 10⁴ DICT₅₀/mL; d^a résultat douteux testé deux fois et négatif.

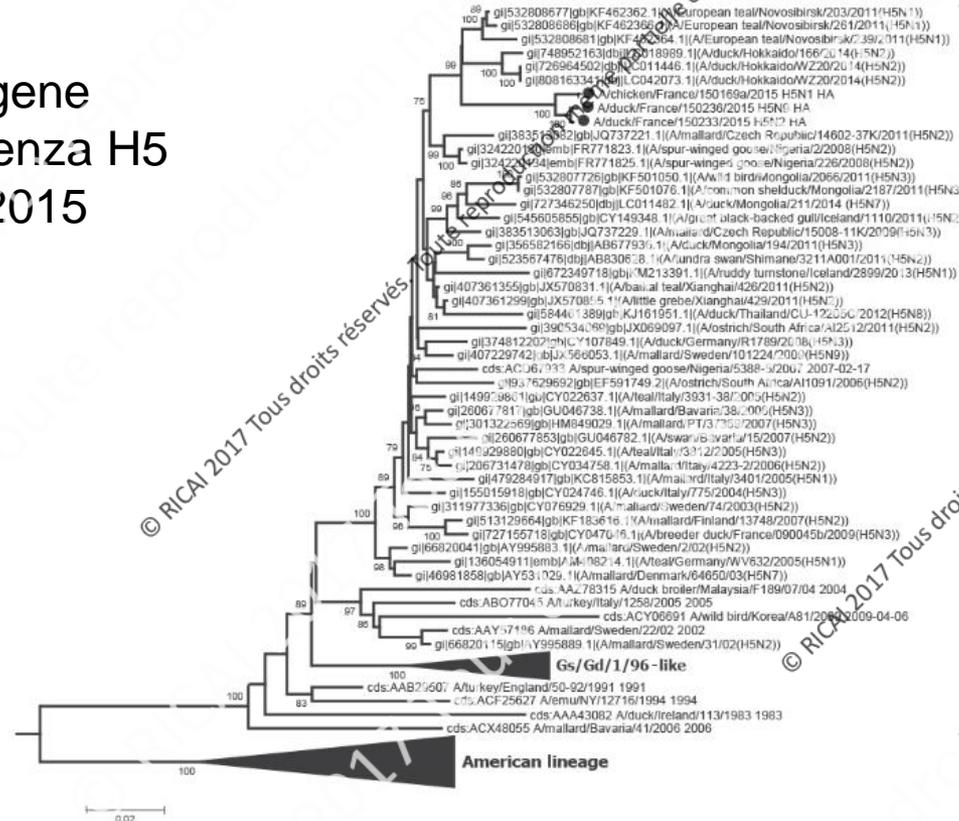
§ le test Alere-i est un test moléculaire rapide basé sur une technologie LAMP-PCR isotherme. Stricto-sensu, ce n'est pas un TROD.

* le test Fujifilm est marqué CE et sera disponible en France en 2018.

Le nouveau périmètre des collaborations

- LNR porcin et Aviaire
 - Analyse des virus H5N8 émergents et partage de matériel

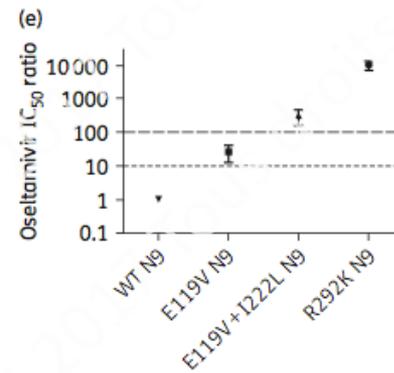
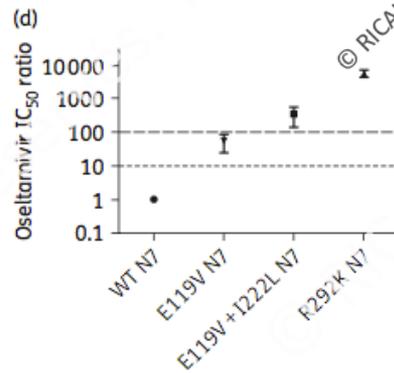
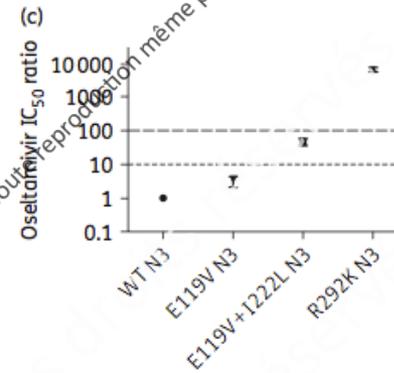
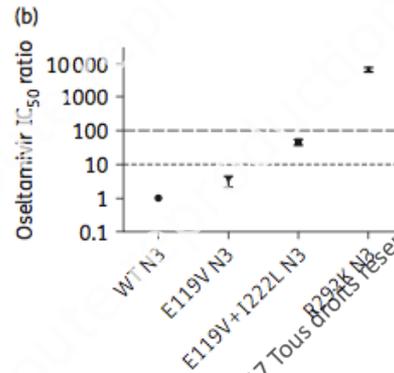
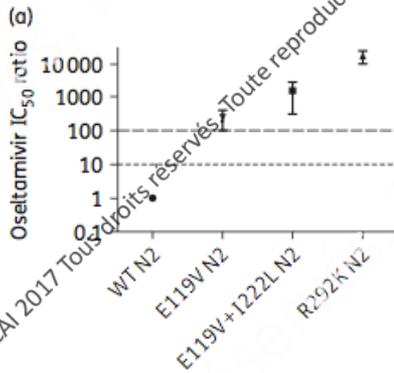
Phylogenetic tree of the H5 gene sequences, three avian influenza H5 viruses, France, November 2015



Le nouveau périmètre des collaborations

- LNR porcin et Aviaire

- Analyse du risque de résistance aux INA (exemple, virus a N du Gpe2 humaine ou non)



Les contraintes et obligations

- Les liens OMS et ECDC
 - Les deux labos en métropole sont des NIC
 - Le labo de Paris est WHO H5 ref lab
 - Le labo de Lyon est beta-testeur pour les QCA grippe produits par l'ECDC
 - Fournitures hebdomadaires d'informations agrégées et en case-based sur la plateforme TESSY, et à l'OMS (Flunet)
 - Participation à la coordination du réseau des laboratoires européens (ECDC)
 - Participation aux réunions de choix de souches vaccinales (rapport semestriel pour l'OMS)
- Les contraintes ANSM
 - Liées aux virus H5 et H7 hautement pathogènes
 - Liées aux coronavirus émergents (SRAS et MESR) qui sont dans l'annexe 1

Conclusions

- Le périmètre a considérablement évolué, en partie à la demande du CNR, accompagnant et parfois anticipant les évolutions observées à l'OMS et à l'ECDC (périmètres techniques et microbiologiques)
- La charge de travail s'est diversifiée et intensifiée
- Des compétences transversales se mettent en place dans les 3 structures (échanges de protocoles, de matériels et de techniques)
- Une certaine répartition des tâches se fait entre les laboratoires
- Le CNR reste très orienté sur sa spécificité qui est la gestion de prélèvements primaires collectés par le réseau de médecins sentinelle, en diversifiant le panel des virus surveillés

Remerciements

- **NIC Lyon:**

- Martine Valette (Lyon)
- Vanessa Escuret (Lyon)
- Maude Bouscambert (Lyon)
- Alexandre Gaymard (Lyon)
- Maxime Pichon (Lyon)
- Bruno Simon (Lyon)
- Jean Sébastien Casalegno (Lyon)
- Laurence Joset (Lyon)

Et les tech de Lyon

- Sylvie Behillil (Paris)
- Vincent Enouf (Paris)
- Sylvie Van der Werf (Paris)

Et les tech de Paris

- Dominique Rousset (Cayenne)

Et les tech de Cayenne

- WHO cc de Londres
- Les membres du réseau Sentinelles
- Les membres du réseau RENAL