



FACULTÉ  
DE MÉDECINE

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

# Infection congénitale à cytomégalovirus : Amélioration des techniques diagnostiques sérologiques de l'infection maternelle et étude de marqueurs virologiques maternels de transmission materno-foétale

**Thèse présentée par Marie-Luce DELFORGE**

en vue de l'obtention du grade académique de docteur en Sciences

Biomédicales

Année académique 2018-2019

Sous la direction du Professeur Catherine DONNER,  
promotrice  
et du Professeur Robert SNOECK,  
co-promoteur

## **Jury de thèse :**

Alain LE MOINE (Université Libre de Bruxelles, Président)  
Catherine DONNER (Université Libre de Bruxelles, Secrétaire)  
Marianne LERUEZ-VILLE (Hôpital Necker, Paris, France)  
Marijke REYNDERS (AZ Sint-Jan, Brugge)  
Stéphane DE WIT (Université Libre de Bruxelles)  
Françoise MASCART (Université Libre de Bruxelles)  
Robert SNOECK (Université Libre de Bruxelles, KULeuven)  
Olivier VANDENBERG (Université Libre de Bruxelles)

# Remerciements

---

A toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidée au cours de ma carrière et ont ainsi contribué à la réalisation de ce travail, et en particulier dans le désordre :

Merci à mes deux promoteurs pour leurs encouragements et les discussions fructueuses. La collaboration de ces dernières années avec Catherine et tout l'équipe de médecine fœtale fut (et est toujours) un plaisir.

Merci aux membres de mon jury pour leurs questions pertinentes et en particulier aux 2 expertes externes, Marianne et Marijke, qui se sont déplacées.

A toute l'équipe de séro-virologie du laboratoire de l'hôpital Erasme qui a vécu l'époque des « Riches Heures » du laboratoire. Les « Riches Heures » sont en hommage et à la mémoire à Eugène Yourassowski qui m'a transmis son savoir et surtout la microbiologie au lit du patient.

Merci à Corinne de m'avoir transmis ses connaissances en sérologie infectieuse et en virologie, et notamment l'intérêt pour les infections congénitales. Ses conseils avisés et son expérience des difficultés d'interprétation des sérologies chez les femmes enceintes m'ont été précieux.

Merci à l'équipe du Laboratoire de Référence SIDA pour son enthousiasme et sa fidélité de ces dernières années, à Carine pour sa précieuse aide administrative et logistique.

Merci à Jean-Paul qui m'a toujours soutenue et cru en moi, malgré les années qui passaient...sans thèse à l'horizon. Merci à Jean-Christophe d'avoir présidé mon Comité d'Accompagnement.

A mes collègues Carlota et Deborah, qui m'ont encouragée à rédiger ce travail.

A toute ma famille, que j'adore, et qui est mon soutien indéfectible.

En particulier à ma maman qui est un modèle de dynamisme et qui me démontre encore actuellement l'importance de la volonté dans la réussite d'un projet.

A Werner qui m'a soutenue et encouragée et qui a subi mes absences pendant de très nombreux weekends.

# Résumé

---

L'infection congénitale à cytomégalovirus (CMV) représente l'infection congénitale la plus fréquente et est la cause principale de retard mental acquis et de déficience auditive neurosensorielle d'origine infectieuse chez le nouveau-né. Le risque de transmission au fœtus en cas de primo-infection maternelle est de 30 à 40%, et d'environ 1.4% chez les femmes séropositives pour le CMV avant la grossesse. L'analyse de la littérature montre que de nombreuses questions subsistent dans le domaine du CMV congénital. Le screening sérologique des femmes enceintes n'est pas systématique, entre autres à cause des difficultés fréquentes d'interprétation sérologique et des possibilités limitées de prévention et de traitement de l'infection fœtale. L'amélioration du diagnostic sérologique de l'infection à CMV est donc une étape importante dans la prise en charge des femmes enceintes.

Dans la première partie de notre travail, nous avons montré les bonnes performances des tests automatisés LIAISON®CMV IgG II, LIAISON®CMV IgM II and LIAISON®CMV IgG Avidity II tant en prospectif sur des échantillons de routine que sur des sérums sélectionnés avec date de primo-infection connue. Ces nouveaux tests sont donc utiles pour le diagnostic de la primo-infection à CMV et la détermination du statut immunitaire, avec l'avantage d'une automatisation complète. Cependant, dans 18% des cas, la mesure de l'avidité des IgG se situe dans une zone intermédiaire ne permettant pas de dater l'infection.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons évalué les capacités des immunoblots Mikrogen recomLine CMV IgG and IgG Avidity à dater une infection primaire en utilisant des sérums pour lesquels la date de primo-infection à CMV est précisément connue, et montré que ces tests donnent une interprétation correcte dans 83.1%, un résultat incorrect dans 4.5% et un résultat non concluant dans 12.4% des cas. En particulier, la combinaison des tests Mikrogen montre une meilleure sensibilité à diagnostiquer une infection <14 semaines comparé au test VIDAS IgG Avidity (85.96% vs 76.92%). Sur un second panel d'échantillons avec une avidité des IgG VIDAS intermédiaire, ces nouveaux tests ont apporté une information complémentaire quant à la datation de la primo-infection dans 79% (70/89) des cas. L'impact clinique direct est prometteur : une analyse préliminaire sur 10 femmes enceintes de moins de 14 semaines d'âge gestationnel avec une sérologie difficile à interpréter, montre que ces tests ont permis d'éviter une amniocentèse chez 5 d'entre elles.

Enfin, lorsqu'un diagnostic de primo-infection maternelle à CMV est posé ou suspecté chez une femme enceinte, nous manquons de marqueurs prédictifs de transmission materno-fœtale non invasifs pour la grossesse. Dans la troisième partie de notre travail, sur une cohorte de 150 femmes enceintes présentant une primo-infection, nous avons montré que la présence de CMV dans le sang et les urines maternelles est corrélée avec la transmission verticale et que la charge virale urinaire est plus élevée chez les femmes transmetteuses. Ces marqueurs virologiques peuvent être utiles dans l'évaluation du risque de transmission en cas de primo-infection maternelle mais nécessitent des études sur de plus larges cohortes afin de confirmer ces résultats et d'établir un seuil quantitatif.

# Liste des abréviations

---

ADN : acide désoxyribonucléique  
AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
ARN : acide ribonucléique  
CMV : cytomégalovirus  
cCMV : cytomégalovirus congénital  
DBS : dried blood spot  
EBV : Epstein Barr virus  
ELISA : Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay  
IE : immediate early  
IFN : interferon  
IgG: immunoglobuline de classe G  
IgM: immunoglobuline de classe M  
LCR : liquide céphalorachidien  
MHC : complexe majeur d'histocompatibilité  
NF-κB : nuclear factor-kappa B  
NK : natural killer  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PLA : ponction de liquide amniotique  
RCIU : retard de croissance intra-utérin  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
SNC : système nerveux central  
TCR : récepteur des lymphocytes T  
TNF : tumor necrosis factor  
TTL : tests de transformation lymphocytaire  
UI/mL : unités internationales par millilitre  
VPN : valeur prédictive négative  
VPP : valeur prédictive positive

# Table des matières

---

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>7</b>
1.1. Le cytomégalovirus.....	7
1.1.1. Description et classification.....	7
1.1.2. Réplication virale et fonctions des différentes protéines .....	9
1.1.3. Physiopathologie .....	11
1.1.1. Epidémiologie .....	14
1.1.2. Manifestations cliniques .....	16
1.1.3. Diagnostic de laboratoire .....	17
1.2. L'infection congénitale à CMV.....	20
1.2.1. CMV et grossesse : risques, épidémiologie .....	20
1.2.2. Manifestations de l'atteinte fœtale et du nouveau-né.....	23
1.2.3. Diagnostic de l'infection maternelle .....	26
1.2.4. Facteurs pronostiques de transmission fœtale.....	29
1.2.5. Diagnostic anténatal.....	33
1.2.6. Facteurs pronostiques d'atteinte fœtale .....	34
1.2.7. Prévention et traitement de l'infection fœtale.....	37
1.2.8. Diagnostic chez le nouveau-né.....	38
1.2.9. Traitement du nouveau-né infecté .....	40
<b>2. OBJECTIFS DU TRAVAIL</b> .....	<b>41</b>
<b>3. RESULTATS</b> .....	<b>42</b>
3.1. Evaluation des nouveaux tests automatisés LIAISON® CMV IgG, IgM et IgG Avidity II.....	42
3.2. Evaluation de l'apport de la technique d'immunoblot dans la datation de l'infection maternelle .....	48
3.3. Marqueurs virologiques maternels pronostiques d'infection fœtale : charge virale ADN CMV mesurée dans le sang et les urines.....	54
<b>4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>59</b>
<b>5. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>76</b>

# 1.INTRODUCTION

## 1.1. LE CYTOMÉGALOVIRUS

### 1.1.1. *Description et classification*

La première description de grandes cellules à inclusions typiques du cytomégalovirus (CMV) remonte à 1881, lorsque Ribbert et al. observent des coupes de rein de fœtus mort-nés. En 1956 et 1957, Weller, Smith et Rowe isolent chacun indépendamment un agent viral à partir de tissus humains et suspectent qu'il s'agit du même virus. Les 3 chercheurs échangent leurs isolats, confirment cette hypothèse, et Weller nomme cet agent « cytomégalovirus »(1).

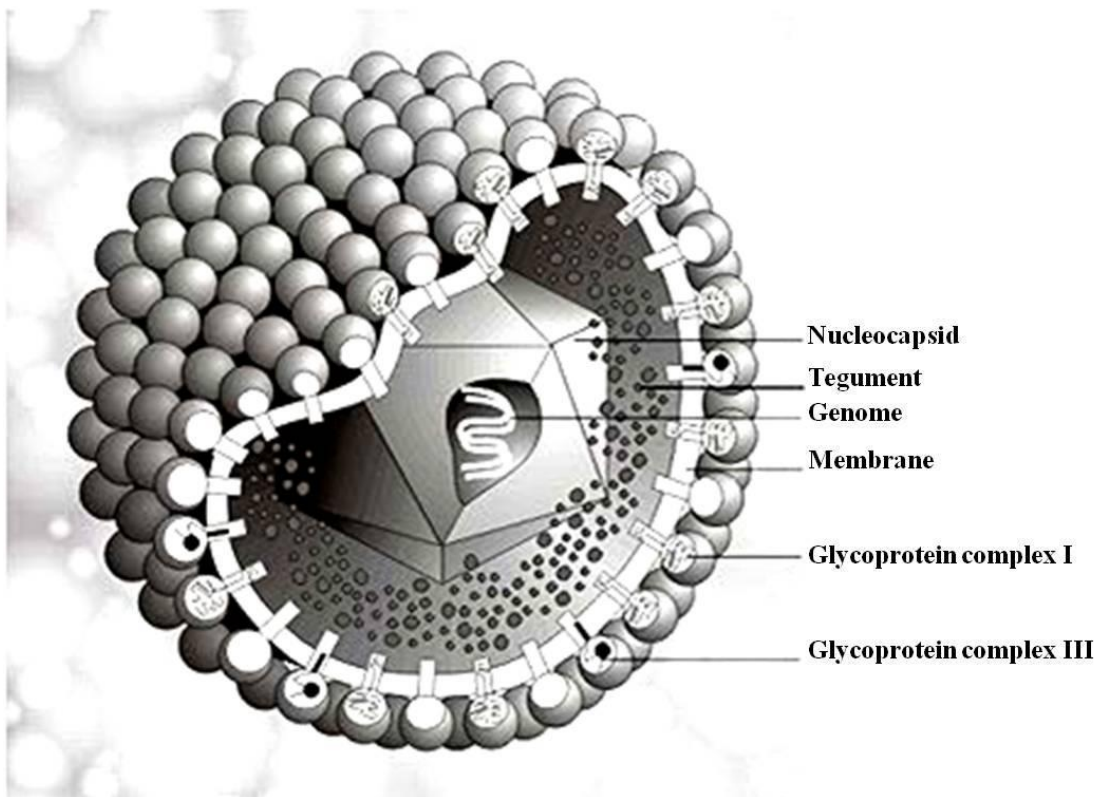


Cellule infectée par CMV : inclusion cytomégalique intranucléaire typique entourée d'un halo, et inclusion intracytoplasmique à gauche (1)

Le CMV ou human betaherpesvirus 5 est un virus ubiquitaire appartenant à la famille des *Herpesviridae*, sous-famille des *Betaherpesvirinae* (International Committee on Taxonomy of Viruses). Les *Herpesviridae* partagent des propriétés de latence, et les *Betaherpesvirinae*, qui

comprennent également les human betaherpesvirus 6 et 7 ainsi que de nombreux virus animaux, ont en commun une spécificité d'espèce, une croissance lente en culture cellulaire et l'établissement d'une latence dans les glandes salivaires, le rein et les monocytes et macrophages (2).

Les *Herpesviridae* possèdent tous un acide désoxyribonucléique (ADN) double brin linéaire. Celui du CMV est le plus grand de la famille, avec environ 240.000 paires de base et  $\pm$  165 gènes (3, 4). L'ADN est contenu dans une nucléocapside icosaédrique, elle-même entourée d'une matrice protéique, le tégument. Celui-ci est défini comme l'espace entre l'enveloppe et la capsid. Les observations au microscope électronique montrent que cette couche est généralement amorphe et non structurée, mais certaines protéines du tégument sont étroitement associées à la capsid (5). Une enveloppe lipidique double couche contenant les glycoprotéines associées à la membrane entoure le tout (6).



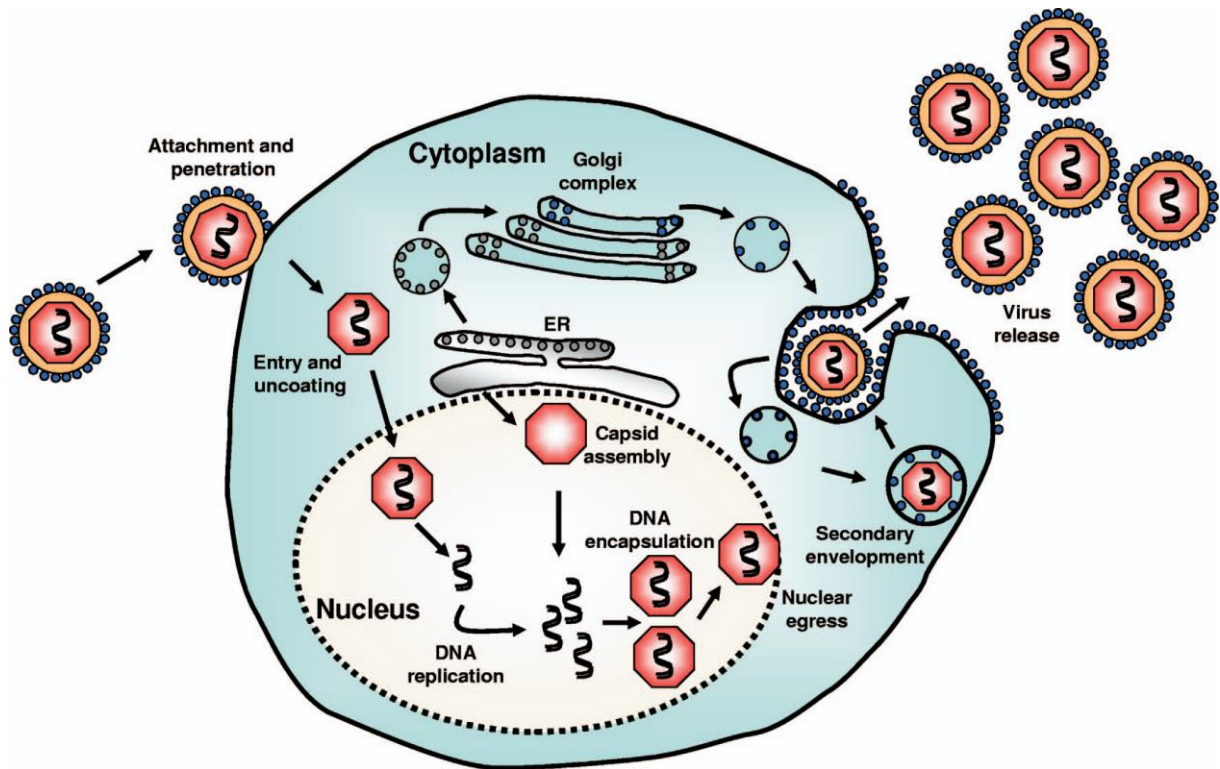
Structure schématique du CMV (26)



### 1.1.2. *Réplication virale et fonctions des différentes protéines*

Tous les herpesvirus expriment 2 glycoprotéines, gB et gH/gL, essentielles pour l'entrée du virus dans la cellule. Pour le CMV, différents complexes de gB ont été décrits comme médiateurs d'entrée dans la cellule, ils diffèrent en fonction du type cellulaire. Pour les fibroblastes, il s'agit du complexe gH/gL/gO tandis que l'entrée dans les cellules épithéliales et endothéliales et les monomacrophages est médiée par le pentamère gH/gL/UL128-131 (7, 8, 9, 10, 11, 12). Le virus se fixe à la surface cellulaire grâce à l'interaction entre ces complexes glycoprotéiques et des récepteurs cellulaires. Plusieurs d'entre eux ont été identifiés : l'Endothelial Growth Factor receptor, les intégrines, le Platelet Derived Growth Factor, le Neuropilin-2 (13, 14, 15, 16, 17,18).

Après la fusion des enveloppes virale et cellulaire et l'entrée dans la cellule, les protéines du tégument et de la capsid sont relarguées dans le cytoplasme. La nucléocapsid est ensuite transloquée dans le noyau où l'ADN viral est libéré. Cette étape initie l'activation du gène immediate early (IE). Celui-ci produit plusieurs acides ribonucléiques (ARN) messagers menant à la synthèse de protéines bien identifiées, qui ont un rôle majeur dans l'infection aiguë et la réactivation. IE1 et IE2 sont les plus abondantes et les plus importantes. IE2 est indispensable à la réplication virale et en son absence, on observe une réplication atténuée (19). Les protéines IE1 et IE2 stimulent l'expression d'autres protéines précoces qui jouent un rôle dans la réplication de l'ADN viral. Les protéines plus tardives, principalement structurales, sont ensuite synthétisées. L'ADN est encapsulé pour former la capsid. Après la réplication de l'ADN viral et l'expression des gènes viraux tardifs, s'ensuit la formation de la capsid dans le noyau et son enveloppement par les vésicules dérivées de l'appareil de Golgi. La fusion de ces vésicules avec la membrane cellulaire résulte dans la sortie de virions enveloppés (exocytose) (7,20, 21).



Cycle répliatif du CMV (21)

Certaines protéines ont été bien étudiées et ont une fonction importante dans la réplication virale et/ou dans la réponse immunitaire de la cellule hôte. En effet, les virus doivent inactiver les défenses immunitaires de façon à assurer leur réplication et leur dissémination. IE1 et IE2 sont les premières protéines synthétisées de novo lors de la primo-infection ou lors de la réactivation. Leur rôle principal est de contrecarrer la réponse immunitaire innée et intrinsèque qui vise à stopper le cycle viral à ses débuts. Dans ce but, IE1 et IE2 sont antagonistes de l'apoptose et de l'induction de cytokines et chimiokines inflammatoires (20).

Les protéines du tégment sont également importantes, notamment par leur rôle sur la réponse immunitaire à tous les niveaux : immunité innée et adaptative. Parmi les protéines du CMV répertoriées, la moitié appartiennent au tégment. Ce sont le plus souvent des protéines phosphorylées (pp). Pp65 (ou lower matrix protein) est un constituant majeur de la particule virale et se retrouve dans le noyau très tôt dans le cycle lytique. Elle est impliquée dans l'évasion du virus face à l'immunité innée et adaptative. Pp65 est la cible majeure des lymphocytes T cytotoxiques. Elle médie la phosphorylation des protéines IE, bloquant leur présentation par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I, empêchant ainsi la reconnaissance des cellules

infectées par les lymphocytes T cytotoxiques. Elle protège la cellule infectée des mécanismes de l'immunité innée en inhibant les cellules cytotoxiques natural killer (NK) et elle diminue la réponse interféron (IFN- $\alpha/\beta$ ) (5,22,23,24). IE1 est aussi impliqué dans la diminution de la production d'IFN- $\alpha/\beta$  (25). La pp150, produit du gène UL32, est très immunogène et est la seconde protéine la plus abondante du tégment, après la pp65. Elle est indispensable à la réplication virale : associée à la capsid, elle joue un rôle essentiel dans l'envoi de celle-ci vers le site d'enveloppement. Les protéines pUL47 et pUL48 forment un complexe qui facilite la libération de l'ADN viral hors de la capsid. Pp71 (ou upper matrix protein) joue un rôle dans l'expression du gène IE et le déclenchement du cycle lytique. La pp28 est une protéine très immunogène, exprimée tardivement. Elle est nécessaire pour l'enveloppement final et la production de virions infectieux (5, 28). La protéine UL25 est également très immunogène mais sa fonction est inconnue. La ppUL69 joue un rôle dans le transport de mRNA en faisant la navette entre le noyau et le cytoplasme. UL26 semble jouer un rôle dans l'assemblage/désassemblage du tégment et la stabilité de la particule virale. UL36 et UL38 inhibent l'apoptose. La ppUL97 est une kinase localisée dans le noyau. Elle phosphoryle et donc active le ganciclovir. Cette protéine n'est pas indispensable à la réplication virale, mais des mutants null-ppUL97 se répliquent 100-1000 fois moins (5).

### 1.1.3. *Physiopathologie*

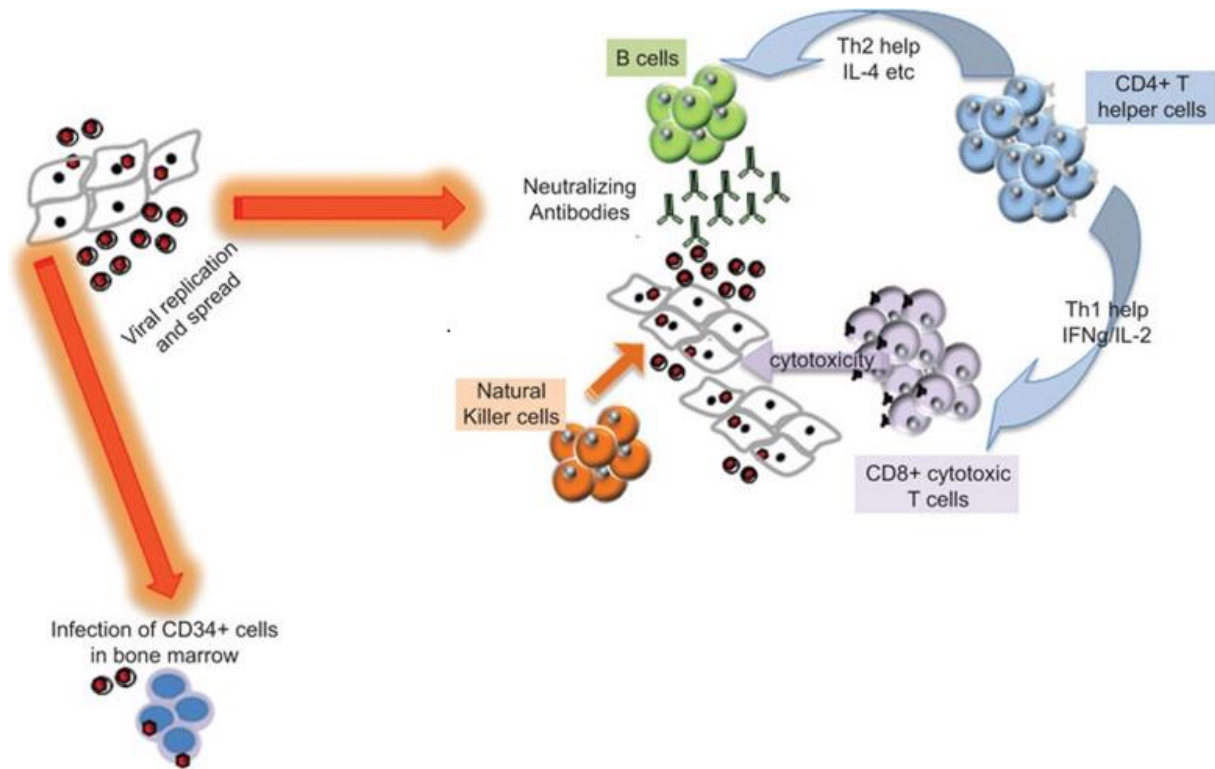
Lors d'une primo-infection acquise par contact avec une personne excréant du CMV, la réplication virale débute dans les cellules épithéliales de la muqueuse en contact avec le fluide biologique contaminant. Il s'ensuit une phase systémique de dissémination avec la présence d'une virémie liée aux leucocytes. Des monocytes immatures recrutés dans la moelle osseuse servent de disséminateurs en transportant le virus vers les différents organes, notamment les glandes salivaires et le rein où le virus peut s'y répliquer dans les cellules épithéliales (27, 28).

Cette phase systémique est associée à une excréation importante dans les urines, la salive, le lait et les sécrétions vaginales. La virémie est détectable par Polymerase Chain Reaction (PCR) pendant plusieurs semaines et disparaît 4-6 mois après la primo-infection chez la majorité des sujets immunocompétents (29, 30). L'excrétion, en particulier dans les urines, est plus longue et dure plusieurs mois chez les adultes à plusieurs années chez les jeunes enfants (30, 31). L'élimination graduelle du virus étant liée à la réponse immunitaire cellulaire plus qu'au taux d'anticorps

spécifiques, la médiocre réponse immunitaire cellulaire des jeunes enfants pourrait expliquer cette excrétion prolongée (32).

La réponse immunitaire de l'hôte à la primo-infection est intense et durable. Les cellules tueuses naturelles (ou cellules NK : natural killer), activées par la production d'IFN par les macrophages et les cellules dendritiques, sont les premières à intervenir dans le contrôle de l'infection (21, 32, 33, 34, 35). L'immunité adaptative qui suit cette réponse innée, et surtout la réponse immunitaire cellulaire, est le mécanisme le plus important dans le contrôle de la réplication virale. Une expansion de lymphocytes cytotoxiques T CD8<sup>+</sup> et T CD4<sup>+</sup> se produit avec une reconnaissance d'un large répertoire de protéines virales (précoces, tardives et structurelles) (32, 36). Le développement d'une sous-population de lymphocytes T exprimant un récepteur TCR  $\gamma\delta$ , abondants dans les muqueuses, semble également jouer un rôle important dans le contrôle de l'infection (37).

L'immunité humorale joue également un rôle non négligeable dans le contrôle de l'infection, comme le démontre la protection partielle observée dans le cadre des infections congénitales, chez le nouveau-né infecté en période périnatale ou lors d'essais vaccinaux à base de gB (38, 39, 40). La majorité des anticorps neutralisants sont dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe du virus (10, 34, 36, 42).



Réponse immunitaire à la primo-infection CMV (32)

Malgré cette réponse immunitaire large, et comme c'est le cas pour tous les herpes virus, le contrôle du virus est incomplet et une latence s'installe chez tous les individus infectés. On retrouve le génome viral dans différents types cellulaires incluant les cellules épithéliales, endothéliales, les mono-macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes et les cellules myéloïdes CD34+. Dans certaines cellules, la présence de l'ADN viral est le reflet de la phagocytose de virions plutôt que la réplication virale cellulaire. La réplication virale à bas niveau survient dans les cellules épithéliales du rein et des glandes salivaires, menant à une excrétion sporadique du virus dans la salive et les urines. Le site principal de la latence est situé dans les progéniteurs myéloïdes, les monocytes et les cellules dendritiques (43,44,45).

La réactivation à partir de la latence est un mécanisme important dans la pathogénèse de l'infection à CMV. On peut observer une réactivation suite à une immunosuppression, une inflammation, une infection ou un stress de l'hôte. Le mécanisme précis menant à la réactivation n'est pas entièrement élucidé, mais le tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , libéré dans ces conditions particulières, est considéré comme un médiateur clef. La fixation du TNF- $\alpha$  sur les récepteurs au TNF des cellules infectées active

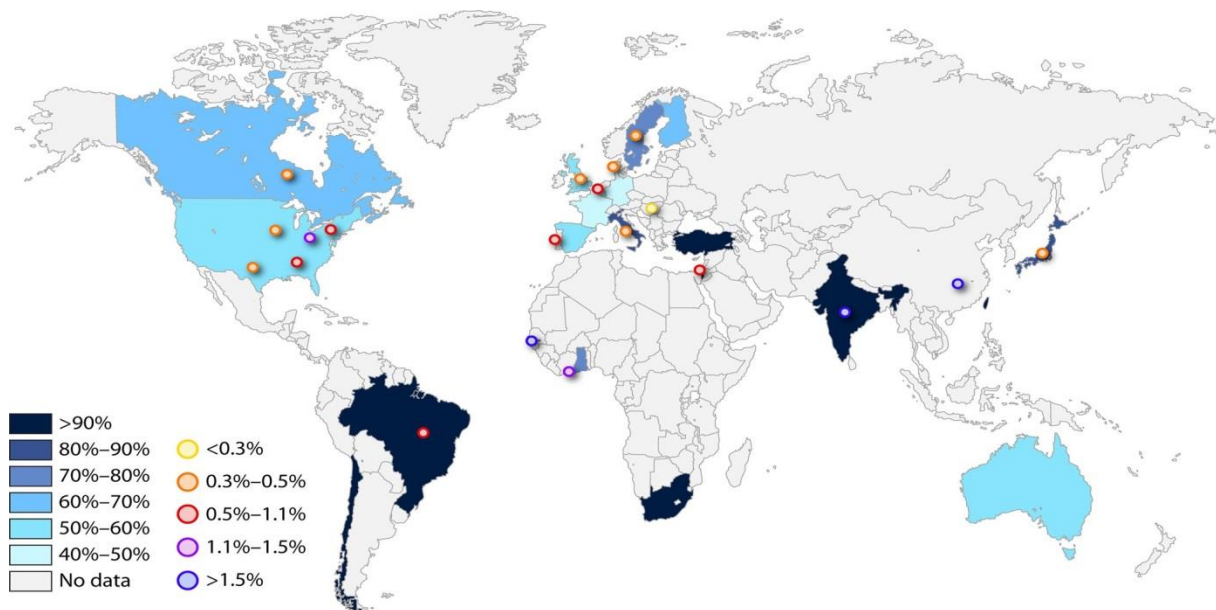
les protéines kinase C et le nuclear factor-kappa B (NF-κB). Cette activation déclenche la transcription des gènes viraux IE et par conséquent la réplication virale. La réactivation peut également être déclenchée par les catécholamines du stress, l'épinéphrine et la norépinéphrine. Celles-ci augmentent les concentrations d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), ce qui mène à la stimulation du promoteur IE. Les prostaglandines pro-inflammatoires présentes dans les processus inflammatoires promeuvent également la réplication virale via l'AMPc (21, 46,47).

La réinfection exogène avec une nouvelle souche est également possible, elle est observée notamment chez les enfants, les patients immunodéprimés et les adultes avec de nombreux partenaires sexuels (48,50,51,52). La physiopathologie des réinfections chez l'homme est mal connue, mais un modèle murin montre que l'infection avec une nouvelle souche induit une expansion des lymphocytes T CD8+ mémoire (53).

### 1.1.1. *Epidémiologie*

Le CMV est un virus ubiquitaire, infectant entre 50% et 100% de la population mondiale. La transmission se fait via le contact avec les urines ou la salive, les rapports sexuels, la transfusion et la transplantation d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques. Chez le nouveau-né, la transmission peut également survenir par les sécrétions vaginales et le lait maternel. Le passage transplacentaire mène à l'infection fœtale (31, 54).

La séroprévalence dans la population générale à l'âge adulte varie selon les régions du monde et le niveau socio-économique, de 40 à près de 100%. Elle est légèrement plus élevée chez les femmes et elle augmente avec l'âge. Elle est la plus élevée en Amérique du Sud, en Afrique et en Asie (55,56,57,58,59,60,61). Chez les femmes en âge de procréer, on observe une séroprévalence de 45 à 100 %, variant également en fonction des régions du monde et du niveau socio-économique. La séroprévalence atteint 100% dans les populations des pays à bas niveau socio-économique. Elle est la plus faible en Europe de l'Ouest et aux Etats-Unis (55, 56,57,59,62,63).



Séroprévalence CMV chez les femmes en âge de procréer (en bleu) (220)

Dans deux études réalisées en Belgique, la séroprévalence observée chez les femmes en âge de procréer varie de 30 à 56%. La différence entre les études peut être expliquée par le fait que la population étudiée dans l'une était composée de 76,3% de primipares, alors que la parité médiane était de 1.8 enfants dans l'autre (64,65). En effet, les facteurs de risque de séropositivité vis-à-vis du CMV chez les femmes sont l'âge, la parité, l'origine géographique, le statut socio-économique, un partenaire CMV positif (55,60,66).

### 1.1.2. *Manifestations cliniques*

**Patient immunocompétent** : la primo-infection est le plus souvent asymptomatique. Dans 10% des cas, le patient présente un syndrome mononucléosique avec fièvre, myalgies et adénopathies cervicales. La fièvre dure 2 à 3 semaines, mais peut persister jusqu'à 5 semaines. La primo-infection à CMV est cliniquement semblable à celle due au virus Epstein Barr (EBV), mais on observe moins fréquemment une pharyngite ou une splénomégalie (67,68,69).

Les complications sont rares mais le spectre est large et comprend l'hépatite, les arthralgies et l'arthrite, la myocardite, la pneumonie, la colite, la méningite et la méningo-encéphalite, la myélite, l'anémie hémolytique et la thrombocytopenie (68,70,71).

Les aspects particuliers liés à la femme enceinte et à l'infection fœtale seront abordés aux chapitres 1.2.2. et 1.2.3.

**Patient immunocompromis** : la présentation clinique de l'infection à CMV est fortement influencée par le statut immunitaire de l'hôte (67). Chez les transplantés d'organe solide, la primo-infection survient chez le patient séronégatif pour le CMV en cas de transplantation d'un organe provenant d'un donneur séropositif pour le CMV. Des stratégies de prévention par une prophylaxie ou un traitement préemptif avec des antiviraux permettent de réduire la morbidité et la mortalité liées à la primo-infection à CMV (72). L'infection peut également être secondaire et survient alors chez le patient transplanté séropositif pour le CMV. Il peut s'agir soit d'une réactivation du CMV endogène latent, soit d'une réinfection (ou super infection) transmise par le greffon ou par une autre voie de transmission (67).

L'infection à CMV chez le patient transplanté, qu'elle soit primaire ou secondaire, peut être asymptomatique ou mener à une maladie à CMV. Dans ces cas, on peut observer un syndrome grippal et une pneumonie, une myocardite, une pancréatite, une néphrite, en fonction de l'organe greffé. Ces atteintes peuvent mener à un dysfonctionnement et à un rejet du greffon. Une colite associée est fréquente, et des complications plus rares comme une rétinite, une méningoencéphalite et des polyradiculopathies ont également été décrites (67,68).

Chez les patients receveurs de cellules souches hématopoïétiques, le CMV est responsable de 30 à 50% des infections cliniquement significatives dans le cadre des greffes allogéniques (69).

Les facteurs de risque de développer une maladie à CMV sont la séropositivité CMV du donneur et/ou du receveur, l'utilisation de produits sanguins positifs pour le CMV ou non déleucocytés, et une réaction du greffon contre l'hôte. Les manifestations cliniques sont variables, mais la plus fréquente



et la plus sérieuse est la pneumonie, avec une incidence de 10 à 30%, évoluant vers la détresse respiratoire et le décès en l'absence de traitement antiviral (67, 68, 69).

Le patient infecté par le VIH est également à risque de développer des pathologies graves liées au CMV, mais ces atteintes sont devenues rares dans les pays développés où les traitements antirétroviraux sont largement disponibles et utilisés. La manifestation clinique la plus fréquente est la rétinite (nécrose hémorragique), survenant lorsque le taux de lymphocytes CD4+ circulants est inférieur à 50/mm<sup>3</sup>. D'autres manifestations cliniques moins fréquentes comprennent une méningoencéphalite, des polyradiculopathies, une pneumonie et des atteintes du tractus gastro-intestinal (67,68).

### 1.1.3. *Diagnostic de laboratoire*

Le diagnostic d'infection à CMV repose sur l'utilisation de méthodes directes de détection du virus (culture cellulaire, détection antigénique, amplification moléculaire) et de méthodes indirectes ou sérologiques (recherche d'anticorps).

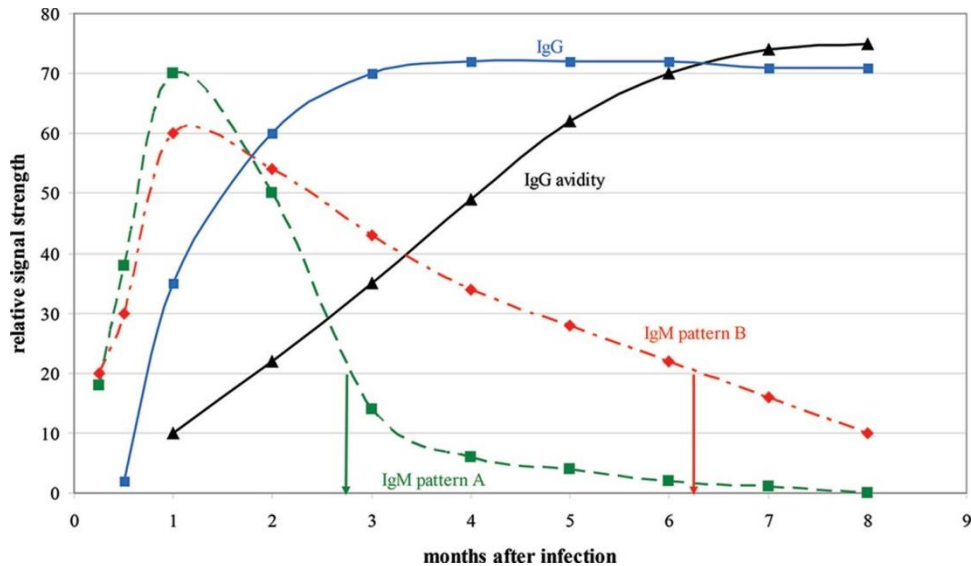
**Culture cellulaire** : La mise en évidence du CMV par culture sur des lignées cellulaires a été la seule méthode disponible pendant plusieurs décennies. Les échantillons cliniques sont inoculés sur des lignées cellulaires susceptibles au CMV, la plus couramment utilisée étant la lignée MRC-5 (fibroblastes de poumon d'embryon humain). Après une incubation de plusieurs jours à plusieurs semaines, on peut observer au microscope un effet cytopathogène causé par la réplication virale intracellulaire. La mise en évidence de CMV par culture cellulaire montre une excellente corrélation avec la maladie à CMV, mais cette technique est longue et elle manque de sensibilité. La technique de culture rapide en « shell vial », qui associe une centrifugation à faible vitesse et la détection du CMV par un anticorps monoclonal, permet de raccourcir le temps de réponse et d'augmenter la sensibilité (67,73,74).

**Détection d'antigène** : Le test appelé communément « antigénémie CMV » repose sur la détection de la protéine du tégument pp65 dans les polynucléaires en utilisant un anticorps monoclonal anti-pp65. Ce test a été mis au point à la fin des années 1980, il permet une quantification et a été largement utilisé pour le suivi des patients immunodéprimés. Il est actuellement remplacé par des techniques d'amplification moléculaire, plus sensibles et mieux standardisées (67,75,76).

**Amplification moléculaire :** Bien que la culture cellulaire soit historiquement la technique de référence pour la mise en évidence du CMV, les techniques d'amplification moléculaire, et en particulier la PCR ont supplanté les techniques de culture ces dernières années. La PCR en temps réel est la plus utilisée, elle permet une détection très sensible et une quantification du CMV dans des types d'échantillons très variés. De plus en plus de tests disponibles sur le marché sont automatisés ou semi-automatisés, permettant d'analyser un nombre important d'échantillons avec un délai de réponse court. Ils sont bien reproductibles et avec un faible risque de contamination (76,77).

La PCR quantitative dans le sang, ou charge virale, est un outil important dans le diagnostic et le suivi des patients immunodéprimés, ainsi que pour la surveillance des patients sous traitement antiviral (72). Cependant, le manque de standardisation est problématique puisqu'il est difficile de comparer les résultats d'études différentes et d'établir des seuils pour le suivi des patients immunodéprimés. Depuis quelques années, un standard international élaboré par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est disponible et est de plus en plus utilisé dans les études et dans les laboratoires de routine, permettant d'améliorer la comparaison inter-laboratoires. Son utilisation sur les prélèvements sanguins est bien validée, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour établir sa commutabilité pour d'autres types d'échantillons (78, 79).

**Sérologie :** Les tests sérologiques détectent et mesurent la réponse immunitaire humorale de l'hôte vis-à-vis du CMV. Les tests les plus fréquemment utilisés sont la recherche d'immunoglobulines de classe G (IgG) et de classe M (IgM) par des techniques d'immunoessais. Les IgM anti-CMV apparaissent entre 2 et 4 semaines après l'infection primaire, et les IgG sont détectables quelques jours après les IgM (74).



Cinétique des anticorps anti-CMV lors d'une infection primaire (82)

Les IgG persistent toute la vie et sont un marqueur d'infection par le virus. Les IgM sont un marqueur d'infection récente, mais leur spécificité dans ce cadre est limitée. La valeur prédictive positive (VPP) est de l'ordre de 50% (80). La détection d'IgM peut également se voir dans les réactivations et les réinfections, résulter d'une réaction croisée vis-à-vis de l'EBV ou de l'interférence d'un facteur rhumatoïde de classe IgM. De plus, chez 25% des individus, les IgM persistent plus de 4 mois après la primo-infection. La présence d'IgG et d'IgM chez une personne sans antécédents sérologiques connus ne permet donc pas d'affirmer qu'il s'agit d'une primo-infection. Par contre, l'apparition d'IgG et d'IgM chez une personne auparavant séronégative signe une infection récente à CMV (75,81,82).

Les particularités liées au diagnostic chez la femme enceinte, notamment le test d'avidité des IgG, seront développées au chapitre 1.2.3.

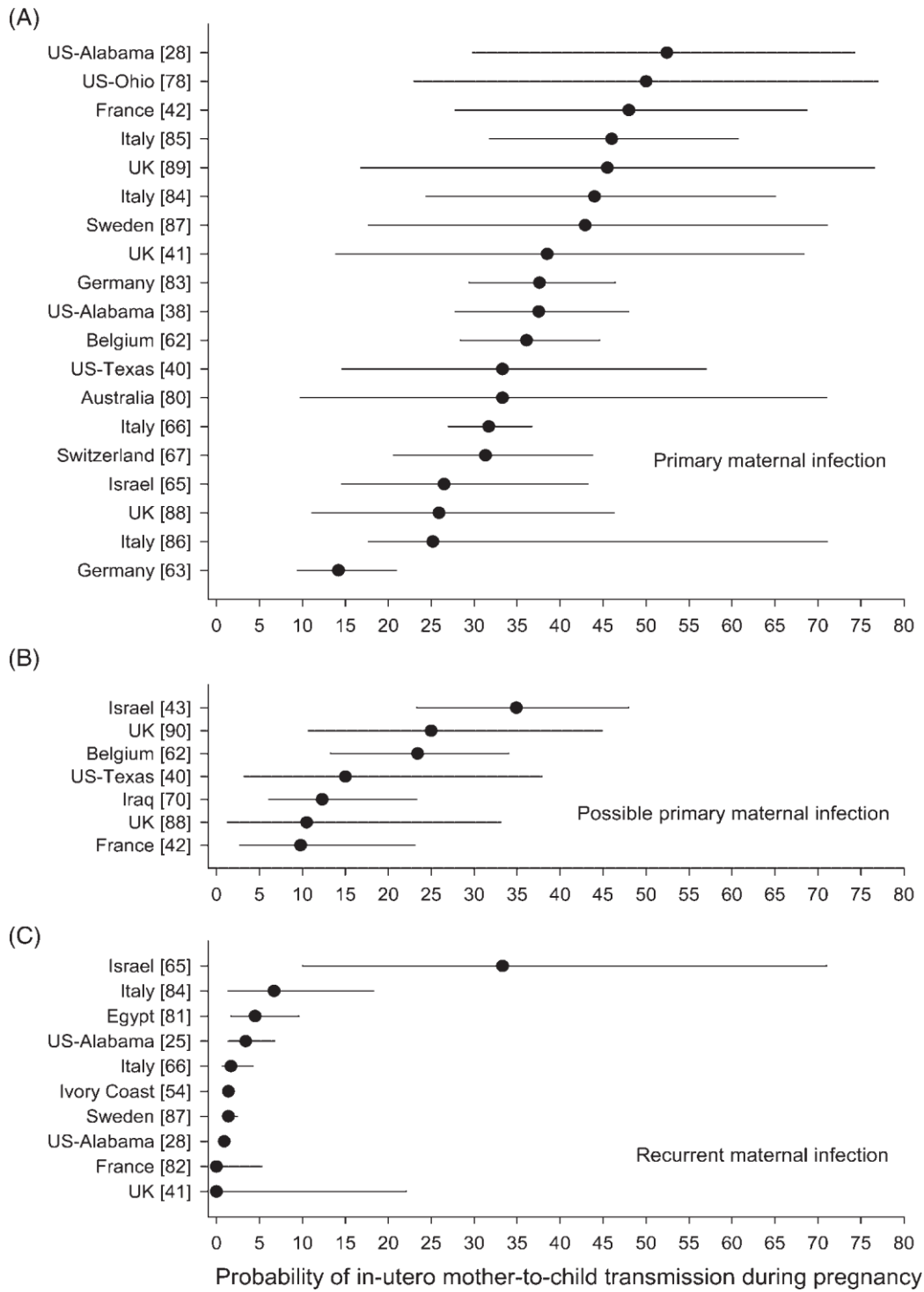
## 1.2. L'INFECTION CONGÉNITALE À CMV

### 1.2.1. *CMV et grossesse : risques, épidémiologie*

L'infection congénitale, ou infection fœtale à CMV, peut survenir suite à une primo-infection maternelle acquise pendant la grossesse, mais peut également résulter d'une réactivation ou d'une réinfection maternelle (83,84,85,86,87,88,89,90).

L'incidence de l'infection fœtale dans une population est influencée par son niveau socio-économique et par le taux de séroprévalence maternelle. Déjà en 1982, Stagno et al. décrivaient un taux d'infection fœtale de 0.6% dans une population de femmes à haut revenu versus 1.6% parmi les femmes à faible niveau socio-économique. Chez les premières, il observait que la transmission verticale survenait suite à une primo-infection maternelle dans la moitié des cas, comparé à 18% chez les secondes. Dans cette dernière population, la majorité des infections congénitales étaient donc dues à des réactivations ou des réinfections chez la mère. Le taux de séroprévalence maternelle (testé avant 18 semaines d'âge gestationnel) était de 55% chez les premières, et de 82% chez les secondes (91). Cette étude a été confirmée par d'autres, plus récentes. Dans les pays à faible séroprévalence maternelle (40-50%), le taux d'infection congénitale est de l'ordre de 0.6 à 0.7% des naissances vivantes (92,93,94).

En 2013, de Vries et al. ont développé un modèle de prédiction basé sur les populations afin d'évaluer la proportion de surdité liée au CMV congénital (cCMV) résultant d'une infection maternelle non primaire (ou récurrente). En se basant sur leur modèle, les auteurs considèrent que les infections maternelles non primaires sont responsables de la majorité des infections congénitales à CMV, et cette proportion augmente avec la séroprévalence. Elle va de 57% (95%CI 24-85%) pour une population à faible taux de séroprévalence (30%) à 96% (95%CI 88-99%) pour une population avec une séroprévalence élevée (95%) (95).



Taux de transmission fœtale en fonction du type d'infection maternelle (93)

Le taux de transmission de l'infection au fœtus est différent s'il s'agit d'une primo-infection ou d'une infection non primaire chez la femme enceinte.

En cas d'infection maternelle non primaire (réinfection ou réactivation), le taux de transmission mentionné dans la littérature est de l'ordre de 1.4%. Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes de diagnostic des infections non primaires, et cette estimation est basée sur une méta-analyse de 10 études réalisées dans différents pays (93). Une des mieux documentées est celle de Stagno et al. en 1982, qui ont réalisé un dépistage systématique du cCMV des nouveau-nés de 2698 patientes avec un statut sérologique CMV déterminé en début de grossesse et un suivi sérologique en cours de grossesse en cas de sérologie négative. Parmi les femmes initialement séropositives pour le CMV, les auteurs observent un taux d'infection congénitale de 0.5% chez les patientes à haut/moyen revenu et de 1.5% parmi les femmes à faible revenu (91). Il faut cependant noter que ce taux de transmission de 1.4% décrit dans littérature ne correspond pas réellement au taux de transmission en cas d'infection non primaire, puisque le nombre de réactivations et de réinfections maternelles n'est pas connu dans ces études. Il s'agit donc plutôt du taux de transmission observé chez les femmes séropositives vis-à-vis du CMV avant la grossesse. La part respective des réactivations et des réinfections dans la transmission fœtale n'est pas connue non plus, mais il a été démontré que les femmes séropositives pour le CMV avant la grossesse et qui se réinfectent au cours de celle-ci transmettent plus fréquemment que celles qui ne se réinfectent pas avec une nouvelle souche, suggérant que la réinfection est un facteur de risque important de transmission fœtale (84,96).

En cas de primo-infection maternelle, le risque de transmission au fœtus est de 25 à 47% (97,98,99,101). Le taux de séroconversion des IgG, et donc l'incidence de primo-infection chez la femme enceinte séronégative a été étudié dans plusieurs études. Il s'étend de 1 à 7% en Europe et aux USA (102,103). Les principaux facteurs de risques de séroconversion sont : la présence d'un enfant de moins de 3 ans dans la famille, le travail en crèche et un partenaire sexuel CMV positif (102,104).

En Belgique, Naessens et al ont montré un taux de séroconversion de 1,4% pendant la grossesse sur une cohorte de 3098 femmes séronégatives (65). Des mesures préventives d'hygiène (lavage de mains, en particulier après contact avec la salive ou les urines d'un jeune enfant, éviter le contact direct avec ces sécrétions comme ne pas embrasser sur la bouche, éviter de partager les effets de toilette, les couverts,...) permettent de diminuer significativement l'incidence d'infection primaire (105,106).

### 1.2.2. *Manifestations de l'atteinte fœtale et du nouveau-né*

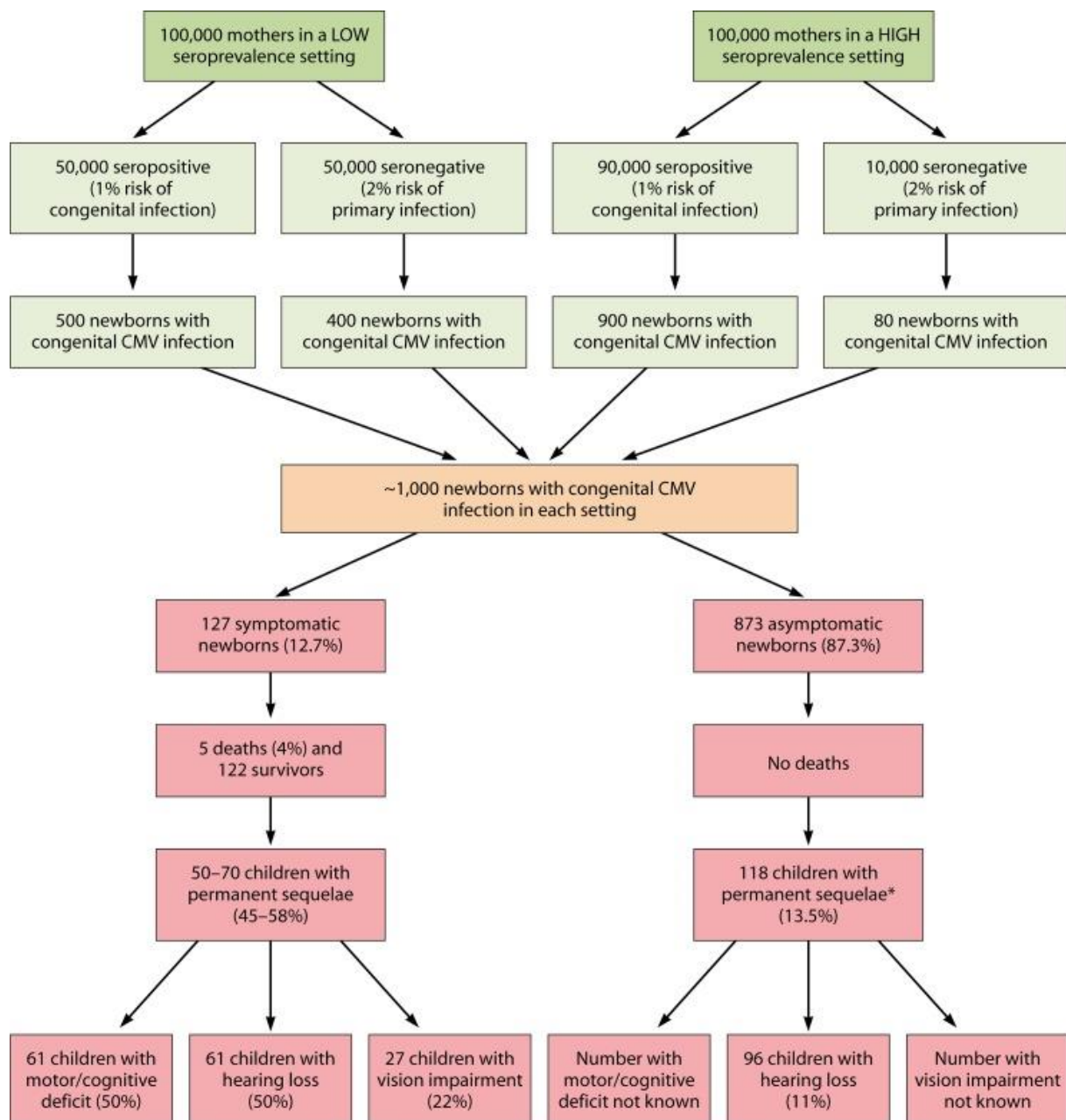
Lors de la virémie maternelle, le CMV peut infecter le placenta, disséminer au travers de celui-ci et atteindre le fœtus. L'infection ascendante par les voies génitales est également possible mais rare (107,108). Une première conséquence de l'infection placentaire est l'altération de ses fonctions nutritives et respiratoires, menant parfois à une fausse-couche ou un retard de croissance intra-utérin (109,110).

La dissémination du CMV au niveau fœtal mène à l'infection des différents organes, avec une prédilection du CMV pour le système réticuloendothélial et le système nerveux central (SNC). Le processus neuropathologique survient principalement dans les régions péri-ventriculaires, à proximité du liquide céphalorachidien (LCR) par lequel le CMV se dissémine. Les cellules germinales subépendymaires qui prolifèrent activement sont particulièrement vulnérables au virus. Un autre processus pathologique peut être observé au 2<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse, lors de la migration neuronale. Le CMV peut alors causer des troubles du développement gyral (111,112,113,114).

En ce qui concerne les signes cliniques, 85-90% des enfants infectés sont asymptomatiques à la naissance. Les 10-15% d'enfants symptomatiques présentent des signes cliniques allant de discrètes atteintes peu spécifiques à des atteintes multi-organes ciblant principalement le système réticuloendothélial et le SNC. Les signes cliniques les plus fréquents sont les pétéchies (76%), l'ictère (67%) et l'hépatosplénomégalie (60%) accompagnés d'une atteinte neurologique telle qu'une microcéphalie et de la léthargie. Une chorioretinite ou une atrophie du nerf optique est présente chez 10% des enfants. La moitié de ces enfants sont petits pour leur âge gestationnel et un tiers naissent prématurément. Au niveau des anomalies biologiques, on observe principalement une augmentation des transaminases (83%), de la bilirubine (81%) ainsi qu'une thrombopénie (77%). Une hyperprotéïnorachie est présente dans 46% des cas (92,115). Les anomalies radiologiques sont présentes chez 50-70% de ces enfants, et consistent en des calcifications cérébrales, dilatations ventriculaires, kystes et vasculopathie lenticulostrée (116,117,118). La mortalité était de l'ordre de 5-10% dans les études des années 1990 mais des données plus récentes évoquent une mortalité <5%. La moitié des enfants symptomatiques à la naissance et survivants développent des séquelles telles qu'une surdité, un retard mental (QI<70) et/ou une microcéphalie (92,115).

Parmi les 90% de nouveau-nés asymptomatiques à la naissance, 7 à 11% développent une surdité, ce qui est nettement supérieur aux 0.1 à 0.4% retrouvés dans la population générale. La moitié de ces enfants souffrent de surdité bilatérale, de sévérité variable. La perte d'audition survient souvent de façon progressive et/ou tardive, nécessitant un suivi audiolologique à long terme des enfants infectés (115,119). Certains enfants asymptomatiques à la naissance développent une microcéphalie et un déficit moteur (5%) ou une chorioretinite (2%). Ces séquelles surviennent généralement dans les 2 premières années de vie, mais elles sont parfois découvertes tardivement, lorsque l'enfant est scolarisé. Les facteurs de risque de développer des séquelles chez ces enfants asymptomatiques à la naissance ne sont pas connus, par conséquent tous les enfants avec un cCMV devraient être suivis (111,115).





Estimation de la prévalence du cCMV et de ses séquelles chez l'enfant dans les populations à revenu élevé ou bas (220)

### 1.2.3. *Diagnostic de l'infection maternelle*

Les signes cliniques d'une primo-infection à CMV chez la femme enceinte sont non spécifiques (fièvre, céphalées, asthénie, myalgies et symptômes respiratoires supérieurs) et ne sont pas différents de ceux retrouvés chez la femme immunocompétente non enceinte. Il est par contre difficile d'estimer si leur fréquence est différente, car les résultats de plusieurs études sont discordants. Nigro et al. ont analysé ces différents symptômes sur une cohorte de femmes enceintes référées pour la plupart pour une sérologie CMV suspecte. Chez les patientes présentant une primo-infection, la fièvre était présente dans 42.1% , une asthénie dans 31.4%, des myalgies dans 21.5%, une atteinte des voies aériennes supérieures dans 42.1% et un syndrome grippal (fièvre accompagnée d'un des autres signes) dans 24.5% des cas. Dans les infections non primaires, les symptômes sont moins fréquemment présents et un syndrome grippal est retrouvé dans 9.5% des cas (120).

Dans une étude portant sur 238 femmes enceintes présentant une primo-infection, Picone et al observent une absence de symptômes dans 79% des cas (97). A l'inverse, dans leur étude rétrospective évaluant 735 grossesses compliquées par une primo-infection à CMV, Revello et al retrouvent des symptômes non spécifiques (fièvre, céphalées, asthénie et symptômes respiratoires supérieurs) et/ou des altérations biochimiques ou hématologiques dans 73.5% des cas (99).

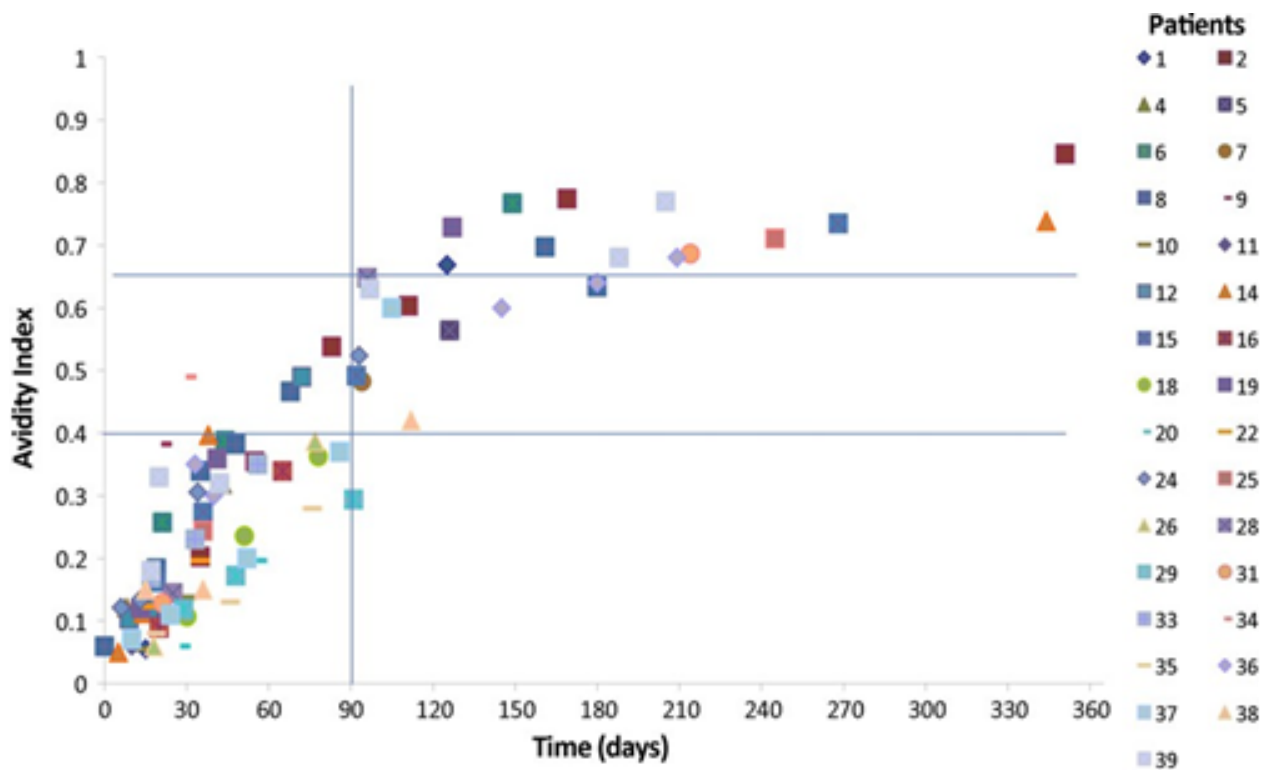
Les altérations biologiques les plus fréquemment retrouvées dans la primo-infection sont une lymphocytose, une augmentation des transaminases et parfois une hypoplaquettose (120).

Le diagnostic d'une primo-infection à CMV chez la femme enceinte se base principalement sur la sérologie spécifique. Bien que le screening sérologique ne soit pas recommandé de façon systématique (121,122), il est de pratique courante dans de nombreux pays de réaliser une sérologie CMV en période prénatale et/ou au cours du 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse.

Le diagnostic de la primo-infection est clair lorsque l'on observe une séroconversion des IgG, c'est-à-dire une apparition d'IgG anti-CMV (le plus souvent accompagnée d'IgM) chez une femme enceinte auparavant séronégative pour le CMV. Par contre, si l'on observe d'emblée la présence d'IgG et d'IgM, il est crucial de déterminer s'il s'agit ou non d'une primo-infection ayant eu lieu pendant la grossesse. La VPP de la présence d'IgM pour diagnostiquer une primo-infection n'est que de 50% (80). Il est dès lors recommandé dans cette situation de réaliser un test d'avidité des IgG (123,124,125,126).

L'avidité est définie comme la force de liaison entre des antigènes viraux et les anticorps polyclonaux correspondants de type IgG. Après l'infection, l'avidité des IgG augmente graduellement au cours du temps, reflétant la maturation des lymphocytes B qui produisent des anticorps de plus haute affinité pour l'antigène correspondant. La mesure de l'avidité est réalisée en utilisant un agent dénaturant (urée, thiocyanate). Le dosage des IgG est réalisé en testant en parallèle le sérum en l'absence et en présence de l'agent dénaturant, en utilisant des tests de type Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). La différence entre les deux dosages représente la mesure de l'avidité des IgG et est exprimée en indice ou en pourcentage. Les seuils d'interprétation doivent être définis pour chaque méthode. Les tests commerciaux fournissent généralement un seuil d'avidité élevée, permettant de dater l'infection à plus de 3 mois ; et un seuil d'avidité basse, suggestif d'une infection de moins de 3 mois. Entre ces 2 seuils, l'avidité est dite intermédiaire et ne permet pas d'interprétation (82,124,125,127).

Ces tests d'avidité des IgG sont très utiles, mais ils présentent certaines limites. Des index d'avidité faussement bas ou faussement élevé ont été observés lorsque le taux d'IgG est faible ou très élevé. Dans cette situation, le résultat de l'avidité des IgG doit être interprété avec précaution (128,129,130,131,132). Il existe de nombreux tests commerciaux, mais ils ne sont pas standardisés (133). De plus, la variabilité individuelle de la maturation des IgG a pour conséquence la persistance d'une avidité basse ou intermédiaire chez certains individus, ce qui peut limiter un diagnostic correct voire générer un diagnostic incorrect (128,134,135,136,137). Enfin, ces tests doivent être réalisés pendant le 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse afin de fournir une information utile (82,124,125,138).



Evolution de l'avidité des IgG suite à une infection primaire à CMV (218)

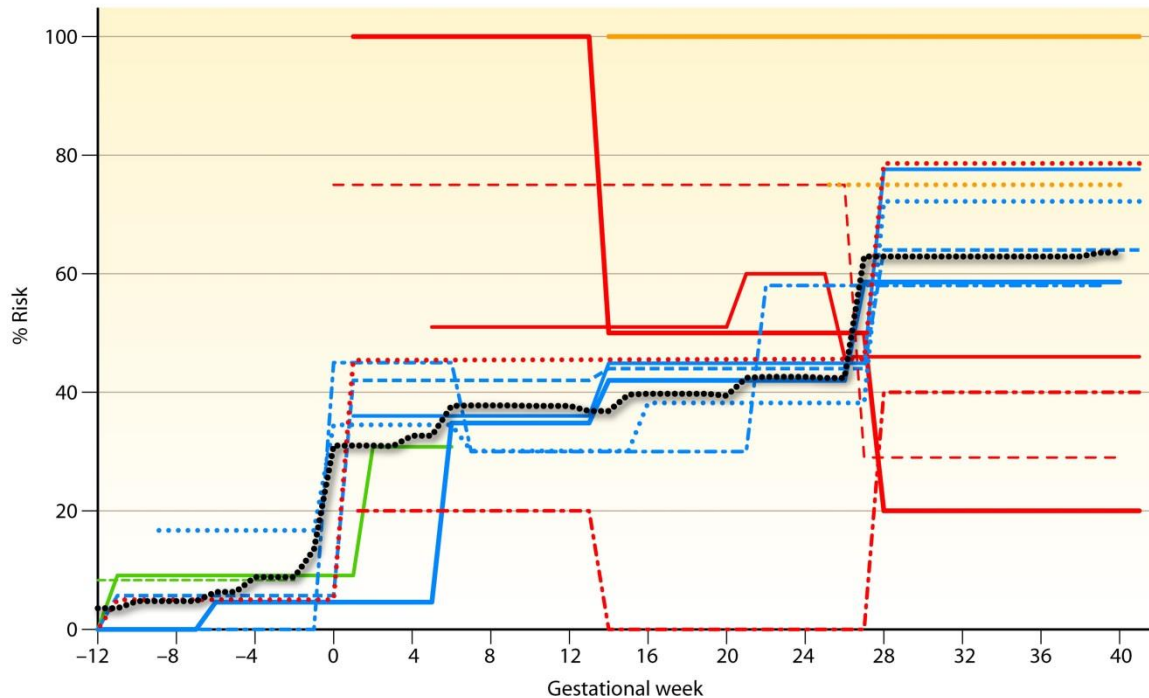
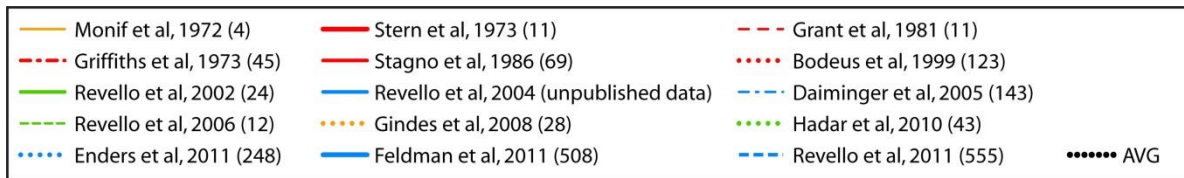
Quant au diagnostic des infections non primaires, il n'existe actuellement aucune méthode fiable pour les détecter. Dans certains cas, on peut observer une augmentation des IgG, une apparition d'IgM, une charge virale sanguine détectable ; alors que dans d'autres cas, on n'observe aucune modification de ces paramètres. La fréquence d'apparition de ces modifications du profil sérologique ou moléculaire, ainsi que leur corrélation avec une réactivation ou une réinfection, n'est pas connue (84,139, 140,141).

#### 1.2.4. *Facteurs pronostiques de transmission fœtale*

Un premier facteur qui entre en compte dans le risque de transmission au fœtus est l'âge gestationnel au moment de la primo-infection maternelle. La plupart des études montrent que le taux de transmission augmente avec l'âge gestationnel. Le taux de transmission observé dans les différentes cohortes de primo-infection est de 30.1 à 42.2% au 1<sup>er</sup> trimestre, 35.9 à 44.1% au 2<sup>ème</sup> trimestre et 42.9 à 73.3% au 3<sup>ème</sup> trimestre (97,98,99,100,101,142).

Le risque de transmission lié à une primo-infection maternelle pré ou péri-conceptionnelle est plus difficile à évaluer. D'une part, le diagnostic de primo-infection est rarement posé en dehors de la grossesse, sauf s'il y a des signes d'appel cliniques ; et d'autre part, la définition des périodes pré et péri-conceptionnelles varie d'une étude à l'autre. En cas de primo-infection maternelle pré-conceptionnelle, le taux de transmission varie de 0% (primo-infection maternelle ayant eu lieu entre 12 mois et 8 semaines avant la conception) à 16.7% (primo-infection maternelle ayant eu lieu entre 12 et 3 semaines avant la conception). En cas de primo-infection maternelle péri-conceptionnelle, le taux varie de 4.6% (période débutant 8 semaines avant et se terminant 6 semaines après la conception) à 45% (période débutant 3 semaines avant et se terminant 3 semaines après la conception) (97,99,100,142,143,144).

Les différences observées dans les taux de transmission sont probablement dues, du moins en partie, aux différentes définitions des périodes étudiées, et potentiellement aux différentes définitions du moment de la primo-infection.



Taux de transmission en fonction de l'âge gestationnel suite à une primo-infection maternelle, données compilées de 15 études (220).

En jaune les études avec des données concernant les 2<sup>ème</sup>-3<sup>ème</sup> trimestre ; en vert la période pré-conceptionnelle et/ou le 1<sup>er</sup> trimestre ; en rouge les études montrant des données pour les 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres ; en bleu les études avec des données pour la période pré-conceptionnelle et les 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres, **La ligne pointillée noire représente les données regroupées des 15 études**, à l'exception des données non publiées. Dans le cadre supérieur, les études référencées avec entre parenthèses le nombre de patientes. Le très petit nombre de patientes étudié par Stern et al. (n=11), Grant et al. (n=11) et Monif et al (n=4) peut expliquer que les résultats de ces études diffèrent des autres.

La virémie maternelle et sa cinétique semblent jouer un rôle dans la transmission au fœtus. Zavattoni et al. ont comparé le taux d'ADN CMV sanguin chez 154 femmes enceintes présentant une primo-infection pendant le 1<sup>er</sup> trimestre. Il n'y avait pas de différence entre le groupe des femmes transmetteuses de l'infection et les non transmetteuses dans le mois suivant l'infection. Par contre, entre 30-60 jours et 60-90 jours après l'infection, les auteurs observent une charge virale

statistiquement plus élevée dans le groupe des femmes transmetteuses. Ces résultats, ainsi que la cinétique de disparition de l'ADN viral, suggèrent une corrélation entre la persistance de la virémie maternelle et la transmission au fœtus (145). Leruez-Ville et al., dans une étude rétrospective sur 72 femmes enceintes présentant des IgM CMV positives au premier trimestre avec une avidité des IgG intermédiaire ou faible, observent une association entre le risque de transmission fœtale et une PCR CMV sérique positive (146). Forner et al. ont montré une corrélation positive entre la présence d'ADN dans le sang maternel et dans les urines maternelles et la transmission au fœtus dans une population de 80 femmes présentant une primo-infection (la majorité au 1<sup>er</sup> trimestre) ou une infection non primaire (147).

Dans leur étude prospective étudiant plusieurs marqueurs sérologiques, virologiques, échographiques et cliniques sur une cohorte de 300 femmes enceintes avec IgM positives, Tanimura et al. mettent en évidence une association statistiquement significative entre la présence d'ADN viral dans les sécrétions cervicales et l'infection congénitale. Comme aucune de ces patientes n'a de PCR positive dans le sang, les auteurs émettent l'hypothèse que cette excrétion au niveau cervical pourrait être le reflet d'une réactivation ou réinfection (148).

La mesure de l'avidité des IgG ainsi que la cinétique de ce paramètre et la corrélation avec la transmission au fœtus, ont été évalués dans plusieurs études dont la première a été publiée en 1999 (149). Dans leur étude rétrospective sur 83 femmes enceintes présentant des IgM CMV positives au premier trimestre avec une avidité des IgG intermédiaire ou faible, Leruez-Ville et al. observent une association significative entre le risque de transmission et l'index d'avidité (bas) combiné à une PCR CMV sérique positive ou un taux d'IgG bas (146). Dans une cohorte de 69 femmes enceintes présentant une primo-infection au 1<sup>er</sup> ou 2<sup>ème</sup> trimestre, Furione et al. ont mesuré l'avidité des IgG moins de 3 mois et plus de 3 mois après l'infection et calculé le pourcentage d'augmentation entre les 2 mesures. Les femmes qui ont un profil de maturation rapide des IgG transmettent plus (62.5%) que celles qui ont un profil de maturation lent (24.1%). L'hypothèse avancée par les auteurs est que le profil de maturation rapide serait lié à une réplication virale prolongée et une charge virale élevée menant à une stimulation de la production d'anticorps par des plasmocytes de longue et de courte durée de vie, générant plus rapidement une avidité élevée des IgG. Chez les femmes avec un profil de maturation lente, une élimination plus rapide des antigènes circulants et une disparition précoce des plasmocytes de courte durée de vie, la production d'anticorps étant maintenue par les plasmocytes de longue durée de vie et donc une maturation plus lente des IgG. La charge virale plus

élevée serait liée à un risque accru de transmission au fœtus dans le groupe à maturation rapide des IgG (150). Ebina et al. dans une étude prospective sur 759 femmes avec des IgG positives, ont montré que l'index d'avidité des IgG est significativement plus bas (médiane 35%) dans le groupe des femmes transmetteuses que dans le groupe des femmes qui ne transmettent pas le CMV (70.4%). Il est néanmoins difficile de tirer des conclusions en terme de facteur prédictif, la présence d'une primo-infection n'ayant pas été analysée et le nombre d'enfants infectés étant petit (n=14) (151). Ensuite le même groupe s'est intéressé à la cinétique de l'avidité des IgG et a suivi l'index d'avidité des IgG pendant la grossesse de 17 femmes suspectes de primo-infection. Les auteurs ont observé une corrélation entre une maturation rapide des IgG et la transmission fœtale, confirmant les données de Furione et al. (152). Ces équipes ont utilisé des tests d'avidité non commerciaux et non standardisés, ce qui rend leur transposition ou comparaison difficile par d'autres laboratoires.

Plusieurs marqueurs immunologiques ont été étudiés en relation avec la transmission fœtale.

Concernant l'immunité innée, les lymphocytes NK sont les principaux effecteurs de l'immunité cellulaire dépendante des anticorps mais ce domaine a été peu exploré jusqu'à présent dans le cadre de la transmission verticale du CMV. En ce qui concerne l'immunité adaptative, l'implication de l'immunité cellulaire et son rôle dans la transmission fœtale en cas de primo-infection maternelle avait déjà été suggéré par Stern et al. en 1986. Les auteurs ont réalisé des tests de transformation lymphocytaire (TTL), qui explorent la capacité d'activation des lymphocytes T mémoires à se transformer en blastes en réponse aux antigènes CMV (souche AD169). Parmi 8 femmes enceintes présentant une primo-infection et une réponse positive au TTL, aucune n'a transmis l'infection au fœtus. Parmi les 6 femmes avec une réponse négative, 4 ont transmis (153). Depuis lors, plusieurs études se sont intéressées à ces paramètres et ont conclu que le développement d'une réponse cellulaire T lors de la primo-infection à CMV semble crucial pour le contrôle de la transmission verticale. Le retard de développement de la réponse lymphoproliférative ou de la production d'IFN- $\gamma$  par les CD4+ CMV spécifiques est associé à la transmission verticale. Mais actuellement, aucun de ces paramètres ne peut être utilisé individuellement à des fins pronostiques à cause de la grande variabilité individuelle (38,154,155, 156).

Quant à l'immunité humorale, hormis l'index d'avidité des IgG anti-CMV décrit ci-dessus, son implication dans la transmission verticale a également été évaluée dans plusieurs études. Lilleri et al. ont observé qu'il n'existe pas de différence quant à la cinétique ou au pic d'anticorps anti-lysate viral entre les mères transmetteuses et les non transmetteuses (157). Par contre, plusieurs études ont



montré une corrélation entre un taux élevé et prolongé d'anti-gB et la transmission, suggérant que le taux d'anticorps ne reflète pas une protection et que la majorité des anti-gB ne sont pas neutralisants. Par contre, la caractérisation qualitative des anticorps montre que les taux d'anticorps neutralisants sont plus bas chez les mères transmetteuses (158,159,160). Lilleri et al. ont confirmé que c'est bien la présence d'anticorps neutralisants vis-à-vis de gB et surtout du pentamère de glycoprotéines gH/gL/pUL128-131 qui est associée à un risque réduit de transmission fœtale (157).

### 1.2.5. *Diagnostic anténatal*

En cas de primo-infection maternelle à CMV, l'échographie fœtale est nécessaire pour la détection d'éventuelles anomalies et l'évaluation de l'atteinte fœtale, mais elle ne permet pas d'établir le diagnostic d'infection congénitale avec certitude. Les anomalies fœtales sont retrouvées chez 15 à 25% des fœtus infectés, et la plupart ne sont pas pathognomoniques d'infection à CMV (161,162).

Le diagnostic d'infection fœtale s'établit par amniocentèse. Le risque de complications lié à la procédure de ponction de liquide amniotique (PLA) est de l'ordre de 0.11% (163). Il est recommandé de réaliser l'amniocentèse à partir de l'âge gestationnel de 21 semaines et au minimum 6 à 8 semaines après la primo-infection maternelle. Ce délai doit être respecté pour obtenir une bonne sensibilité du diagnostic. En effet, le CMV se réplique assez lentement, et plusieurs semaines sont observées entre l'infection maternelle, le passage transplacentaire, la réplication au niveau du rein fœtal et donc l'excrétion qui s'en suit dans le liquide amniotique. L'âge gestationnel minimum de 21 semaines doit également être respecté car la diurèse fœtale est alors bien établie (98,139,164). L'âge gestationnel de minimum 21 semaines a cependant été questionné récemment par Enders et al. Dans 2 études rétrospectives portant sur 115 et 338 grossesses compliquées par une primo-infection à CMV, les auteurs suggèrent que l'âge gestationnel serait moins important que l'intervalle entre la primo-infection maternelle et l'amniocentèse. Ils n'observent pas de différence de sensibilité du diagnostic anténatal par PCR lorsque la PLA a été réalisée entre 17 et 20 semaines d'âge gestationnel ou au-delà de 20 semaines si un délai de 8 semaines est respecté entre la primo-infection maternelle et la PLA (165,166). Cependant, avant toute modification des recommandations actuelles, ces observations devraient être confirmées par une étude prospective, comparant par exemple la PLA à 18 semaines d'âge gestationnel versus 21 semaines.

Les techniques utilisées pour la détection du CMV sur PLA sont principalement la culture cellulaire et la PCR. La sensibilité diagnostique de la culture est de l'ordre de 70-80%, cette sensibilité médiocre étant due en partie aux conditions de stockage et de transport nécessaires pour maintenir le virus viable. La technique de choix est la détection du génome viral par PCR, qui montre une sensibilité diagnostique de 90 à 98% lorsque la PLA est réalisée selon les recommandations mentionnées ci-dessus. La spécificité est bonne, de 92 à 100%, avec une absence de faux positifs dans la majorité des études (98, 139,142,166, 167,168).

La cordocentèse, ou ponction de sang foetal, est une procédure plus invasive qui comporte un risque de complications de l'ordre de 1% (169,170) dans cette indication et offre une sensibilité inférieure à l'examen du liquide amniotique pour le diagnostic anténatal. La sensibilité de la PCR CMV sur sang foetal prélevé à 21 semaines d'âge gestationnel est de 64 à 75% et la détection d'IgM anti-CMV montre une sensibilité médiocre de l'ordre de 50 à 60% (98,139,166,171).

#### 1.2.6. *Facteurs pronostiques d'atteinte fœtale*

Si l'infection fœtale est avérée, il est important de réaliser un bilan pronostique afin d'évaluer si le nouveau-né sera symptomatique ou non, et d'estimer la gravité de l'atteinte, notamment cérébrale. L'âge gestationnel au moment de la primo-infection maternelle est un premier facteur pronostique important. Dans leur cohorte de 238 patientes, Picone et al. ont montré un nombre significativement plus élevé d'anomalies échographiques quand la primo-infection maternelle survient en pré, péri-conceptionnel et au 1<sup>er</sup> trimestre comparé aux 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestres. Les auteurs n'observent pas de cas symptomatiques à la naissance si la primo-infection maternelle survient au-delà de 14 semaines d'âge gestationnel (97). Enders et al., sur un suivi de 248 grossesses avec primo-infection maternelle, n'observent pas de nouveau-nés symptomatiques lorsque l'infection maternelle a eu lieu en période pré-conceptionnelle et concluent que le risque d'atteinte sévère est plus élevé en cas de primo-infection maternelle ayant eu lieu en période péri-conceptionnelle et pendant le 1<sup>er</sup> trimestre (100).

En cas de primo-infection maternelle, la VPP de la présence d'anomalies échographiques chez un fœtus infecté pour la présence de symptomatologie à la naissance est de 35% et est bien meilleure (78%) lorsque l'infection fœtale est connue. (161). La présence d'anomalies cérébrales à l'échographie est de mauvais pronostic et entraîne une probabilité élevée de handicap moteur,

sensitif ou cognitif ou de décès in utero ou néonatal (125). Les principales anomalies cérébrales sont la ventriculomégalie, l'hyperéchogénicité ventriculaire, les calcifications cérébrales, la microcéphalie, les anomalies de gyration et les atteintes cérébelleuses. Les principales anomalies extra-cérébrales comprennent l'hyperéchogénicité intestinale, l'hépto- et la splénomégalie, les calcifications hépatiques, le retard de croissance intra-utérin (RCIU), l'oligamnios, le polyhydramnios, l'hydrops fœtal. La résonance magnétique nucléaire (RMN) est également utile dans l'évaluation du pronostic fœtal, notamment en cas d'anomalie extra-cérébrale isolée ou pour confirmer et compléter l'évaluation en cas d'atteinte cérébrale. Par ailleurs, un examen échographique fœtal normal accompagné d'une RMN normale est accompagné d'un bon pronostic avec une valeur prédictive négative (VPN) de 90% (161,162,172,173,174,175).

D'autres marqueurs pronostiques ont été étudiés, notamment les paramètres hématologiques, biochimiques et virologiques du sang fœtal. La ponction de sang fœtal ou cordocentèse, réalisée à la suite d'un diagnostic anténatal d'infection fœtale basé sur l'amniocentèse, permet d'évaluer le risque de symptomatologie à la naissance. Parmi les différents paramètres étudiés, la présence d'une thrombocytopénie, une  $\beta$ 2-microglobuline augmentée et une charge virale élevée sont des facteurs indépendants prédictifs de symptomatologie du nouveau-né (171,176,177).

Leruez-Ville et al. proposent des seuils pour les plaquettes et la charge virale et combinent ces paramètres avec l'échographie. En cas d'absence d'anomalies échographiques ou en présence d'anomalies légères, il persiste un risque de 7% d'observer des anomalies sévères au 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse. Lorsque ces résultats échographiques sont combinés avec un taux de plaquettes  $>114.000/\text{mm}^3$  et une charge virale  $<4.93\log_{10}$  unités internationales par millilitre (UI/mL), cette incertitude tombe à 0% et la VPN d'absence de symptomatologie est de 100% (177).

Certains auteurs observent également que la présence et un taux élevé d'IgM dans le sang fœtal sont corrélés à un fœtus ou un nouveau-né symptomatique, mais cette observation est controversée par d'autres études (171,176,178,179).

La charge virale dans le liquide amniotique comme facteur pronostique d'atteinte fœtale a été étudiée par plusieurs groupes et reste très controversée. Certaines études ne montrent pas de corrélation entre la charge virale mesurée par PCR quantitative et la symptomatologie fœtale, mais mettent plutôt en évidence une corrélation positive entre la charge virale et l'âge gestationnel auquel l'amniocentèse est réalisée (180,181,182). D'autres groupes observent une différence statistiquement significative de la charge virale entre les fœtus infectés symptomatiques et les asymptomatiques (183,184). Il faut néanmoins tenir compte de 2 paramètres importants dans

l'interprétation de ces résultats : 1. l'augmentation de la charge virale avec l'âge gestationnel et donc une corrélation positive entre l'âge gestationnel au moment de l'amniocentèse et la charge virale, liée à l'accumulation du CMV excrété au cours du temps et à l'augmentation de la diurèse fœtale. 2. L'intervalle entre la primo-infection maternelle et l'amniocentèse (177,184).

Dans leur étude récente tenant compte de ces paramètres, Leruez-Ville et al. ont montré qu'une charge virale élevée était associée à une symptomatologie fœtale, mais qu'elle est un moins bon facteur prédictif de lésions cérébrales tardives in utero ou de symptomatologie à la naissance que les paramètres sanguins (taux de plaquettes et charge virale CMV) (177). En 2000, Guerra et al. ont proposé un seuil de  $10^5$  à équivalents génomes/ mL permettant de prédire le développement d'une symptomatologie fœtale avec une sensibilité de 82% et une VPP de 100 % (183). Il s'agissait d'une petite série de 16 cas, et ces résultats n'ont pas été confirmés par la suite dans d'autres études. En l'absence de seuil bien défini, la charge virale dans le LA a donc un intérêt limité dans l'évaluation fœtale et dans la prise en charge individuelle.

Lorsqu'une amniocentèse est pratiquée pour le diagnostic d'infection fœtale chez une femme ayant fait une primo-infection, la sensibilité du diagnostic anténatal par PCR sur LA n'est pas de 100% même si la PLA a été réalisée dans les délais minimum recommandés. Cependant, les nouveau-nés infectés pour lesquels l'amniocentèse était négative sont significativement moins symptomatiques que les nouveau-nés avec une amniocentèse positive. L'hypothèse proposée est que ces fœtus ont été infectés après l'amniocentèse, donc tardivement dans la grossesse, avec un meilleur pronostic (185).

L'étude du peptidome dans le liquide amniotique ouvre peut-être de nouvelles perspectives dans l'évaluation du pronostic fœtal. Dans leur article paru en 2015, Desveaux et al ont identifié 34 peptides qui permettent de classer les futurs nouveau-nés sévèrement symptomatiques et asymptomatiques avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 75% respectivement (186).

La métabolomique pourrait aussi être un outil pronostique intéressant, mais doit encore être explorée dans ce cadre (187).

### 1.2.7. *Prévention et traitement de l'infection fœtale*

Deux approches sont en cours d'évaluation : les gammaglobulines hyper immunes et les antiviraux, tous deux tant en prévention de la transmission au fœtus qu'en traitement de l'infection fœtale avérée.

L'efficacité des gammaglobulines hyper immunes à diminuer la transmission verticale en cas de primo-infection maternelle a été évaluée dans une première étude publiée en 2005. Cette étude suggérait un taux d'infection fœtale plus faible lorsque la femme enceinte recevait des gammaglobulines (40% vs 16%), mais il s'agissait d'une étude non contrôlée et non randomisée (188). Revello et al., dans une étude contrôlée et randomisée publiée ultérieurement, ne montrent pas de différence significative du taux de transmission entre le groupe traité et le groupe placebo. Il y avait par contre plus de complications obstétricales dans le groupe traité (13% vs 2%). Le taux de transmission observé était néanmoins inférieur dans le groupe traité (30% vs 44%), mais le nombre de patientes insuffisant pour atteindre une puissance statistique suffisante (189). Une étude prospective randomisée ayant pour objectif d'enrôler 800 patientes ([www.clinicaltrials.gov/show/NCT01376778](http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01376778)) a démarré en 2012 mais les inclusions de patientes ont été stoppées récemment et il n'est pas sûr que cette étude apportera une réponse quant à l'efficacité des gammaglobulines en prévention de l'infection foetale (Il n'est pas recommandé actuellement de donner en routine des gammaglobulines en prévention aux femmes enceintes qui font une primo-infection à CMV (121,190,191,192,193).

L'efficacité des gammaglobulines sur l'infection fœtale a également été évaluée dans l'étude non contrôlée non randomisée de Nigro publiée en 2005. Dans le groupe des femmes traitées, 3% (1/31) ont donné naissance à un enfant symptomatique pour 50% (7/14) dans le groupe non traité (188). Visentin et al, dans leur étude cas-contrôle publiée en 2012, ont montré que les enfants ont moins de séquelles à 1 an (4/31, 13%) lorsque la mère a reçu des gammaglobulines, comparé aux enfants nés de mères non traitées (16/37, 43%) (194). Les données actuelles ne sont néanmoins pas suffisantes pour recommander en routine le traitement de l'infection fœtale par gammaglobulines hyper immunes (121,195).

Quant aux antiviraux, le ganciclovir, le foscarnet et le cidofovir ont une activité démontrée sur le CMV. Leur toxicité et leur tératogénicité ne permettent pas leur utilisation pendant la grossesse, bien que le ganciclovir ait été utilisé dans quelques cas isolés sans effets secondaires observés (196,197). L'aciclovir et le valaciclovir sont deux molécules avec un effet modéré sur le CMV qui sont utilisées en

prophylaxie chez les patients transplantés (72). Leur utilisation est possible pendant la grossesse mais actuellement seules les données d'une étude ouverte portant sur 43 fœtus modérément symptomatiques sont disponibles. Les auteurs observent que 82% des nouveau-nés naissent asymptomatiques, comparé à 43% dans une cohorte historique issue d'une revue de la littérature (198). Une étude randomisée contrôlée versus placebo évaluant l'efficacité du valaciclovir sur la prévention de la transmission au fœtus est en cours chez des femmes enceintes présentant une primo-infection pendant le 1<sup>er</sup> trimestre (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02351102>). Les données actuelles ne permettent pas de recommander le valaciclovir pour le traitement in utero du fœtus infecté (121,198).

Quant à la prévention par vaccination, c'est une approche qui est étudiée depuis des décennies, mais actuellement aucun vaccin commercialisé n'est disponible. Un candidat vaccin à base de gB, évalué dans le cadre de la prévention primaire de l'infection à CMV chez des femmes séronégatives dans une étude randomisée et contrôlée versus placebo, a montré une efficacité de 50% (199). D'autres vaccins sont en cours de développement et plusieurs études cliniques sont en cours. Il n'y a actuellement pas de données sur l'utilisation du vaccin en prévention de l'infection fœtale (40,200,201,202).

### 1.2.8. *Diagnostic chez le nouveau-né*

La sérologie a peu de place dans le diagnostic de l'infection congénitale du nouveau-né, les quantités importantes de CMV excrétées dans les urines et la salive permettant un diagnostic direct aisé. De plus, la sensibilité de la détection des IgM est limitée, de l'ordre de 70% (178). La détection des IgG n'est d'aucune utilité puisqu'elle est le reflet des IgG maternelles qui traversent la barrière placentaire.

La technique de référence a longtemps été la mise en évidence du CMV par culture cellulaire à partir d'urines ou de salive. Cette méthode est fiable mais ses principaux points faibles sont d'une part le long délai de réponse, et d'autre part sa sensibilité diminuée si les conditions et les délais d'acheminement au laboratoire ne sont pas respectés. Le premier inconvénient peut être contourné par l'utilisation de la technique de culture rapide en « shell vial », qui permet également d'augmenter la sensibilité (67,74,203).

Depuis plusieurs années, la détection du CMV par PCR remplace progressivement les techniques de culture cellulaire. La PCR en temps réel montre d'excellentes sensibilité (100%) et spécificité (98.9-100%) (203,204,205). Le débat dans la littérature se focalise actuellement sur le type d'échantillon à tester. La PCR sur urines donne d'excellents résultats, mais la collecte chez le nouveau-né n'est pas pratique, nécessitant l'utilisation de sacs collecteurs adhésifs. Plusieurs études ont évalué les performances de la détection du CMV par PCR sur urines et salive (205,206,207,208), ou comparé la PCR sur salive par rapport à la culture sur urines soit en diagnostic soit en screening (205,209). Globalement, les 2 types d'échantillons donnent de bons résultats et sont recommandés tant pour le diagnostic d'un nouveau-né suspect d'infection que pour le screening à large échelle (121). Il est important de mentionner que la salive peut donner des résultats faussement positifs, principalement liés à des contaminations lors du passage par la filière génitale ou suite à l'allaitement maternel. Ces faux positifs s'évaluent de 0.03 à 0.14% (204,205,210). Rawlinson et al., dans leur revue de consensus publiée dans le Lancet en 2017, recommandent de confirmer un résultat positif sur un second échantillon, soit urines soit salive (121).

Le moment du prélèvement est également important. Afin d'être fiable, le diagnostic d'infection congénitale doit être posé dans les 2 à 3 premières semaines de vie. Après ce délai, qui correspond à la période minimale d'incubation du CMV, il est impossible de faire la distinction entre une infection congénitale et une infection post-natale, qui ne génère pas de séquelles à long terme. Le délai de 3 semaines étant basé sur d'anciennes études qui utilisaient uniquement la culture cellulaire comme méthode diagnostique, de Vries et al. suggèrent que ce délai soit réévalué et peut-être raccourci à 2 semaines si la PCR, 100 fois plus sensible que la culture, est utilisée (203,211).

La PCR sur carte de Guthrie ou Dried Blood Spot (DBS) est une alternative qui a été largement étudiée et qui montre une sensibilité variable de 34 à 100% qui dépend de la population étudiée, de la méthode d'extraction des acides nucléiques, de la charge virale (208,212,213,214). Par conséquent, la PCR sur DBS n'est pas recommandée pour le diagnostic individuel d'un nouveau-né suspect d'infection congénitale, mais peut être utile pour un diagnostic rétrospectif dans le cas où un échantillon d'urines ou de salive n'est pas disponible avant 3 semaines de vie. Une PCR sur DBS positive permettra d'affirmer le diagnostic, alors qu'une PCR négative ne permettra pas d'exclure une infection congénitale étant donné son manque de sensibilité.

### 1.2.9. *Traitement du nouveau-né infecté*

L'utilisation du ganciclovir et du valganciclovir (prodrogue du ganciclovir à administration orale) a été évaluée dans plusieurs études et a montré un bénéfice du traitement chez les enfants symptomatiques à la naissance. On observe une amélioration des atteintes neurologiques et de la surdité chez les enfants traités. Une durée de traitement de 6 semaines versus 6 mois a montré une supériorité du traitement plus long en termes d'amélioration de la surdité et du développement neurologique. L'apparition d'une neutropénie, principal effet secondaire, s'observe chez environ 20% des enfants traités par valganciclovir (215,216,217).

Les recommandations actuelles sont de traiter avec du valganciclovir oral (16 mg/kg 2 fois par jour) les enfants avec une symptomatologie modérée ou sévère pour une durée de 6 mois. Le traitement doit être initié dans le 1<sup>er</sup> mois de vie. L'utilité de traiter les enfants asymptomatiques ou avec une surdité isolée n'a pas été démontrée et n'est pas recommandé actuellement (121,211).

L'utilisation du foscarnet a été rapportée dans quelques case reports et le cidofovir n'a pas été évalué dans le traitement des nouveau-nés atteints de cCMV (216).



## 2.OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'analyse de la littérature montre que de nombreuses questions subsistent dans le domaine du cCMV. Le screening sérologique des femmes enceintes n'est pas systématique, entre autres à cause des difficultés fréquentes d'interprétation sérologique et des possibilités limitées de prévention et de traitement de l'infection fœtale. L'amélioration du diagnostic sérologique de l'infection à CMV est donc une étape importante dans la prise en charge des femmes enceintes. La **première partie** de ce travail consiste en l'évaluation de nouveaux tests automatisés de détection des IgG et des IgM anti-CMV ainsi que de caractérisation de l'avidité des IgG anti-CMV. En présence d'IgG et d'IgM anti-CMV chez une femme enceinte, une des difficultés diagnostiques est de faire la distinction entre une infection primaire et non primaire (réactivation ou réinfection) et de déterminer si l'infection a eu lieu en cours de grossesse ou avant celle-ci. Le test le plus couramment utilisé pour aider à la datation de l'infection mesure l'avidité des IgG anti-CMV. Dans 10 à 20 % des cas, le résultat de ce test se situe dans une zone intermédiaire ne permettant pas de dater l'infection. De plus, dans certains cas particuliers, les résultats de ces tests d'avidité « de routine » ne sont pas fiables (130,218,219). D'autres tests, comme les immunoblots CMV IgG et CMV IgG avidité, sont en cours de développement. La **deuxième partie** de ce travail est consacrée à l'étude de la réactivité des anticorps maternels vis-à-vis de certains antigènes particuliers du CMV ainsi que de l'avidité de ces anticorps spécifiques afin d'évaluer l'apport de cette nouvelle technique d'immunoblot dans la datation de l'infection maternelle.

Lorsque le diagnostic d'infection primaire maternelle à CMV est posé ou suspecté chez une femme enceinte, une PLA peut être proposée afin de déterminer si le fœtus est infecté ou non. Un délai de 6 à 7 semaines doit être respecté entre l'infection primaire maternelle et la ponction afin d'obtenir une sensibilité diagnostique adéquate (98). Actuellement, nous manquons de marqueurs prédictifs de transmission materno-fœtale non invasifs pour la grossesse. La **troisième partie** de ce travail évalue des marqueurs virologiques maternels tels que la charge virale ADN CMV mesurée dans le sang et les urines et la corrélation avec la transmission materno-fœtale.

## 3. RÉSULTATS

### 3.1. EVALUATION DES NOUVEAUX TESTS AUTOMATISÉS LIAISON® CMV IgG, IgM ET IgG AVIDITY II.

**Introduction :** le diagnostic d'une infection à CMV n'est pas toujours aisé et la qualité des tests sérologiques de laboratoire est cruciale, en particulier pendant la grossesse et pour la détermination du statut sérologique des donneurs d'organes et des patients en attente de greffe.

**Objectifs :** Evaluer les performances des nouveaux tests automatisés LIAISON®CMV IgG II, LIAISON®CMV IgM II and LIAISON®CMV IgG Avidity II en comparaison avec les tests utilisés en routine dans notre laboratoire (VIDAS® CMV IgG, ETI-CYTOK-M reverse Plus, VIDAS® CMV IgG Avidity) .

**Méthodes :** L'évaluation des différents tests a été réalisée sur 383 sérums, d'une part prospectivement sur un échantillonnage de sérums de routine (n=160), et d'autre part sur des sérums sélectionnés et bien caractérisés (n=174) (infections récentes, infections anciennes, séronégatifs, infections anciennes avec IgM persistantes). Le test d'avidité des IgG a été évalué sur 88 échantillons (39 issus des 174 sérums sélectionnés et 49 supplémentaires).

**Résultats:** La concordance globale est de 98.8% pour les IgG et de 95 % pour les IgM sur l'échantillonnage de routine. Pour les sérums testés rétrospectivement, la concordance est excellente pour les patients séronégatifs (100%) et très bonne pour les infections anciennes (94.3% pour les IgG et 97.1% pour les IgM). Dans le groupe des infections récentes, on observe des discordances dans 7.1 % des cas pour les IgG et 13.1 % pour les IgM. Toutes les infections récentes ont été détectées par LIAISON®. Le test d'avidité des IgG montre une concordance de 81 % avec celui de VIDAS®. Sur 51 sérums pour lesquels la date de primo-infection est précisément connue, aucun faux positif (avidité élevée) n'est détecté dans le groupe des infections de moins de 3 mois. Dans le groupe des infections de plus de 3 mois, une avidité élevée a été obtenue sur 82% des échantillons.

**Conclusion:** Les performances des tests automatisés LIAISON® CMV II line sont comparables aux méthodes utilisées dans notre laboratoire tant en prospectif sur les échantillons de

routine que sur des sérums sélectionnés. Ces nouveaux tests sont donc utiles pour le diagnostic de la primo-infection à CMV et la détermination du statut immunitaire, avec l'avantage d'une automatisation complète.



## Evaluation of the new LIAISON® CMV IgG, IgM and IgG Avidity II assays



M.L. Delforge\*, L. Desomberg, I. Montesinos

Department of Microbiology, ULB Erasme Hospital, 808 route de Lennik, 1070 Brussels, Belgium

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 May 2015

Received in revised form 11 August 2015

Accepted 7 September 2015

## Keywords:

Cytomegalovirus

CMV IgG

CMV IgM

CMV IgG avidity

Chemiluminescence

## ABSTRACT

**Background:** The diagnosis of CMV infection is challenging and the quality of serological laboratory testing is critical, especially in pregnancy and in the determination of transplant recipients and donors serostatus. **Objectives:** Evaluate the performances of the new LIAISON® CMV II line: LIAISON® CMV IgG II, LIAISON® CMV IgM II and LIAISON® CMV IgG Avidity II in comparison with the routine methods used in our laboratory.

**Study design:** The evaluation of LIAISON® CMV IgG II and LIAISON® CMV IgM II was performed on both prospective routine samples and retrospective selected samples for a total of 383 sera. CMV IgG avidity was assessed with 88 samples.

**Results:** The overall agreement was 98.8% for the IgG and 95% for the IgM on the routine population. On selected retrospective samples, excellent agreement was found in the seronegative and past infection groups. In the recent infection group, discordances were observed in 7.1% of IgG and 13.1% of IgM. No recent infection was missed with LIAISON®. Avidity agreement with VIDAS® was 81%. On 51 sera with a known time of infection, no high avidity was found in the group infected for less than 3 months and 82% of the samples showed a high avidity in the group infected for more than 3 months.

**Conclusion:** The performances of the fully automated LIAISON® CMV II line assays are comparable to those of the reference methods used in our lab for both prospective and selected populations. This new CMV line is a useful tool for the diagnosis of CMV infections and CMV immune status in clinical settings

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Background

Human cytomegalovirus (CMV) infection is endemic worldwide and affects all age groups. CMV infections in healthy individuals are generally asymptomatic or resulting in mild and nonspecific symptoms. The diagnosis is challenging and the quality of laboratory testing is critical, especially in pregnancy and in the determination of transplant recipients and donors serostatus.

CMV is the most common cause of congenital infection. Primary CMV maternal infection rather than recurrent infection is associated with a higher risk of congenital transmission, up to 40%. The CMV intrauterine infection can lead to permanent disabilities like deafness and mental retardation [1]. Identification of pregnant women with primary infection is therefore important. Accurate determination of immune status of pregnant women is also critical for management. In CMV seronegative expectant mothers, hygienic measures can be recommended in order to reduce the risk of primary infection [2,3]. In immunocompromised patients, molecular

assays are now the gold standard for the follow-up, but the determination of correct serological pretransplant status is critical in the management of these patients [4].

Diagnosis of CMV infection is usually based on a combination of serological tests, including specific IgG, IgM and IgG avidity. Diagnosis of primary infection is easy in case of seroconversion of IgG. CMV IgM plays an important role in the diagnosis of acute CMV infection, but its presence can also be related to other reasons: cross-reaction, long-term persisting IgM, reactivation or reinfection, stimulation of the immune system. When both IgG and IgM are present, CMV avidity could be helpful to distinguish primary from non-primary infection. At the initial stage of infection, IgG of low avidity are produced. These IgG will mature over time, resulting in an increased binding affinity and thus a higher avidity a few months after infection [5–7].

## 2. Objectives

The aim of this study was to evaluate the performances of the new LIAISON® CMV II line: LIAISON® CMV IgG II, LIAISON® CMV IgM II and LIAISON® CMV IgG Avidity II (DiaSorin, Italy) in comparison with the routine methods used in our laboratory.

\* Corresponding author. Fax: +32 25556459.

E-mail addresses: [marie-luce.delforge@erasme.ulb.ac.be](mailto:marie-luce.delforge@erasme.ulb.ac.be), [mdelforg@ulb.ac.be](mailto:mdelforg@ulb.ac.be) (M.L. Delforge).<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.09.002>

1386-6532/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 3. Study design

#### 3.1. Patients and sera

##### 3.1.1. Evaluation of LIAISON® CMV II IgG and IgM

The evaluation of LIAISON® CMV IgG II and LIAISON® CMV IgM II was performed on both prospective routine samples and retrospective selected samples for a total of 383 sera.

**3.1.1.1. Routine samples.** 160 fresh residual sera sent to our laboratory for CMV testing were used to evaluate LIAISON® CMV IgG II and LIAISON® CMV IgM II.

**3.1.1.2. Selected retrospective samples.** 174 frozen sera were classified in 4 groups according to the results obtained with the serological methods used in the laboratory as well as additional clinical and diagnostic data.

**3.1.1.2.1. Group 1, recent infection samples.** 84 sequential sera from 36 patients with recent infection defined as (a) appearance of IgG in a patient known to be previously negative and presence of IgM, or (b) presence of IgM with increasing IgG or low avidity of IgG. The number of sera per patient ranged from 1 (8 patients) to 4 (6 patients). For 9 patients, a first IgG and IgM negative sample was available and tested; the time between the last negative and the first positive serum ranged from 2 to 9 weeks.

**3.1.1.2.2. Group 2, seronegative samples.** 35 sera from seronegative patients defined as IgG and IgM negative.

**3.1.1.2.3. Group 3, past infections.** 35 sera from patients with past infections, defined as IgG positive and IgM negative.

**3.1.1.2.4. Group 4, long lasting IgM samples.** 20 sera from patients with long lasting IgM, defined as presence of IgM for more than one year. All these samples show positive IgG.

##### 3.1.2. Evaluation of LIAISON® CMV IgG Avidity II

For the evaluation of LIAISON® CMV IgG Avidity II, the study was performed with 31 seroconversion samples (19 from the group 1 described above and 12 supplementary sera), 37 sera with positive CMV IgG and IgM on which VIDAS® avidity was routinely performed, and the 20 long lasting IgM from the group 4.

For the 31 seroconversion sera, the time of infection was established on the presence of clinical symptoms and/or laboratory abnormalities. When absent, the delay from the onset of infection was arbitrary set between the last IgG and IgM negative sample and the first IgG positive sample, or at the first IgM positive IgG negative sample.

#### 3.2. Methods

LIAISON® CMV II line tests are based on an indirect chemiluminescent immunoassay. LIAISON® CMV IgG II is intended for the quantitative determination of IgG antibodies to CMV in human serum and plasma. Results were compared to those obtained with VIDAS® CMV IgG (bioMérieux, France), an enzyme linked fluorescent immunoassay.

LIAISON® CMV IgM II is used for the semi-quantitative determination of IgM antibodies to CMV in human serum and plasma. Results were compared with those obtained with the qualitative capture immunoenzymatic assay ETI-CYTOK-M reverse Plus run on ETI-Max 3000 (DiaSorin, Italy).

VIDAS® CMV IgM was also performed in case of discordant results. LIAISON® CMV Avidity II is intended for the determination of antigen-binding avidity of IgG antibodies to CMV in human serum and plasma, comparing the signal of untreated sample with the signal of the same sample after treating with urea. The avidity index ranges from 0.000 to 0.950. Results were compared to those obtained with VIDAS® CMV IgG Avidity.

**Table 1**

Comparison of LIAISON® CMV II and VIDAS® assays for CMV IgG antibodies on routine samples.

Assays	LIAISON® CMV II IgG			Total
		Positive	Negative	
VIDAS® CMV IgG	Positive	89	2	91
	Negative	0	69	69
	Total	89	71	160

**Table 2**

Comparison of LIAISON® CMV II and capture EIA for CMV IgM antibodies on routine samples.

Assays	LIAISON® CMV II IgM				
		Positive	Equivocal	Negative	Total
ETI-CYTOK-M reverse plus	Positive	1	0	2	3
	Equivocal	0	0	1	1
	Negative	2	3	151	156
	Total	3	3	154	160

All three LIAISON® assays were run on the fully automated random access LIAISON® XL analyser. All assays were performed according to the recommendations of the manufacturers.

#### 3.3. Statistical analysis

Proportional agreement and chi-square test were calculated and analysed. A  $p$  value  $<0.001$  was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with MedCalc software (Mariakerke, Belgium).

### 4. Results

#### 4.1. LIAISON® CMV II IgG et IgM

The overall agreement was 97.4% ( $p < 0.001$ ) (373/383) for IgG and 91% ( $p < 0.001$ ) (304/334) for IgM.

##### 4.1.1. Performances observed on routine samples

Comparison between LIAISON® CMV II assays and the reference method on the routine population showed an overall agreement of 98.8% ( $p < 0.001$ ) for the IgG (Table 1) and 95% ( $p < 0.001$ ) for the IgM (Table 2).

Comparison of LIAISON® CMV IgG II and VIDAS® CMV IgG showed 2 discordances, both VIDAS® positive and LIAISON® negative. These 2 samples came from the same patient to whom we observed appearance of CMV IgG with VIDAS® without IgM post liver/kidney transplantation. CMV PCR remained negative.

Comparison of LIAISON® CMV IgM II and ETI-CYTOK-M reverse Plus (ETI) showed 8 discordances. Two positive and one equivocal sample with ETI were found negative by LIAISON®. As VIDAS® CMV IgM was negative on all samples, they were considered as ETI false positive results. One serum showed a high level of rheumatoid factor. Three negative samples with ETI were found equivocal with LIAISON®. All 3 were negative with VIDAS®. Two negative samples with ETI were found positive by LIAISON®. One of them belongs to a patient presenting a CMV primary infection 3 months before, the other was considered as false positive result since VIDAS® was negative.

##### 4.1.2. Performances observed on selected retrospective samples

**4.1.2.1. Group 1, recent infection samples.** As shown in Tables 3 and 4, comparison between LIAISON® CMV II assays and the reference methods showed an overall agreement of 92.9% ( $p < 0.001$ ) for the IgG and 86.9% ( $p < 0.001$ ) for the IgM.

**Table 3**  
Comparison of LIAISON® and VIDAS assays for CMV IgG antibodies on recent infections samples.

Assays	LIAISON® CMV II IgG				Total
	Positive	Equivocal	Negative		
VIDAS® CMV IgG	Positive	60	2	1	63
	Equivocal	0	0	1	1
	Negative	2	0	18	20
	Total	62	2	20	84

Six discordant results were observed for the IgG. Three of them are minor and can be explained by close timing of the follow-up. For the 3 other cases, we observed on sequential samples that LIAISON® gave positive IgG results before VIDAS® in 2 cases and VIDAS® before LIAISON® in 1 case.

Eleven discordant results were observed for the IgM. In 3 cases, ETI was found negative or equivocal and LIAISON® positive: One sample collected 3 months after infection was negative with ETI and positive with LIAISON®, 1 sample collected 7.5 weeks after infection was equivocal with ETI and positive with LIAISON®, 1 sample collected 12 weeks after infection was negative with ETI and positive with LIAISON®. In 3 other cases, ETI was found positive and LIAISON® negative. We were able to perform VIDAS® IgM for two of them: one sample taken 5 weeks after the first IgG/IgM positive serum was equivocal and one with no possibility of dating of infection was positive. For the third one, we did not have enough sample to perform VIDAS®, this sample was taken 7.5 months after infection. Five positive samples with ETI were found equivocal with LIAISON®.

4.1.2.2. *Group 2, seronegative samples.* 100% agreement on both IgG and IgM was observed on these 35 samples.

4.1.2.3. *Group 3, past infections.* We observed a 94.3% agreement for IgG on these 35 samples: 2 sera expected to be positive were classified as negative with LIAISON® XL. The first sample belongs to the same transplanted patient described in Table 1. The second belongs to a transfused lungs transplanted patient who was tested CMV IgG negative by VIDAS® one year later. In this case, we can assume that the IgG detected by VIDAS® are those acquired from transfusion.

A 97.1% agreement for IgM was observed: 1 sample expected to be negative was found equivocal with LIAISON® XL.

4.1.2.4. *Group 4, long lasting IgM samples.* On the 20 samples with persistent IgM detected by ETI, we found 10 positive, 6 equivocal and 4 negative results with LIAISON® XL. All these samples showed a positive IgG result with both tests.

#### 4.2. LIAISON® CMV Avidity II

The results of IgG avidity performed on the 37 samples in comparison with VIDAS® are shown in Table 5. The agreement between both tests is 59.5% when the VIDAS® cut off of 0.8 is chosen and 81% when the VIDAS® cut off of 0.65 is chosen.

**Table 4**  
Comparison of LIAISON® and capture EIA for CMV IgM on recent infections samples.

Assays	LIAISON® CMV II IgM				Total
	Positive	Equivocal	Negative		
ETI-CYTOK-M reverse	Positive	63	5	3	71
	Equivocal	1	0	0	1
	Negative	2	0	10	12
	Total	66	5	13	84

**Table 5**  
Comparison between LIAISON® and VIDAS® CMV IgG avidity according to the two different cut off chosen for VIDAS.

LIAISON®	CMV IgG avidity					
	No. of samples with the indicated result by the following assay					
	VIDAS®(cut off 0.8)			VIDAS®(new cut off 0.65)		
	High	Moderate	Low	High	Moderate	Low
High	12	9	0	17	4	0
Moderate	0	3	1	0	2	2
Low	0	5	7	0	1	11

**Table 6**  
Results of LIAISON® CMV IgG avidity according to the estimated time of infection.

LIAISON® CMV IgG avidity II	Time of infection		
	Low	Moderate	High
≥3 months	0	5	21
≥2 months, <3 months	0	1	0
>1 month, <2 months	4	2	0
≤1 month	16	2	0

Table 6 presents the results of the avidity performed on the 31 seroconversion samples and the 20 long lasting IgM samples in relation to the estimated time of infection. No high avidity results were found in the group infected for less than 3 months. In the group infected for more than 3 months, 82% (23/28) of the samples showed a high avidity. Among the 5 samples showing a moderate avidity, 4 of them came from patients infected between 3 and 3.5 months ago.

## 5. Discussion

In this study, we evaluated the performance of the new LIAISON® CMV II line with a total of 383 samples in comparison with the routine methods used in our laboratory.

There is no gold standard for CMV antibodies therefore, as done in several other studies, comparison was made with methods used in the laboratories for several years of experience. Relative agreement between methods is reported. On the routine population we found an excellent agreement of 98.8% for the IgG and 95% for the IgM. We found an overall agreement of 97.4% for IgG and 91% for IgM which is comparable to studies comparing other commercial assays [8–10].

A less good agreement among commercial assays for CMV IgM is well known, and is due to the different assays formats, to the use of different antigen and to the different assay threshold [9]. In the recent infections group, we found eleven discordant results for the IgM. In 3 cases of positive expected result in comparison with our routine test, LIAISON® IgM was found negative. In 1 case the third method (VIDAS®) was equivocal, in the second case VIDAS® was positive but we were not able to date the infection. In the third case the sample was taken 7.5 months after infection.

Several studies showed that CMV IgM detection is a sensitive marker for primary infection, but with a poor specificity. About 50% of CMV IgM-positive individuals have primary infection [7,11,12]. The importance to correctly identify CMV primary infection is of particular interest during pregnancy: the severity and the frequency of congenital CMV infection make it necessary but, as the infection is often asymptomatic, only laboratory tests can identify a possible primary infection. Among the available tests, IgM searches are used widely, but any positive results need to be interpreted correctly because of the possible non-specificity of the tests themselves and the fact that the presence of IgM may be due to reactivation or reinfection. In this setting, IgG avidity assays have

proved to be a valuable tool for interpretation of a positive IgM result in presence of IgG. In most assays low IgG avidity is indicative of primary infection within the preceding 3 months while high avidity excludes that primary infection was acquired less than three months before sampling.

LIAISON<sup>®</sup> CMV Avidity II showed good results of IgG avidity allowing us to exclude in 82% of the cases an infection within the preceding 3 months in our sampling collection. Contrary to other studies evaluating several avidity commercial kits, we found no high avidity in the group infected for less than 3 months [13,14].

Comparing to VIDAS<sup>®</sup> avidity, we found a much better agreement between the two techniques when the VIDAS<sup>®</sup> new cut off of 0.65 is chosen. In their study, Vauloup-Fellous et al. showed that changing the VIDAS<sup>®</sup> avidity index cut-off value from 0.80 to 0.65 significantly improve the performance of the kit. They also showed that the concordance percentage between VIDAS<sup>®</sup> IgG avidity and other kits is poor and mainly explained by equivocal results with VIDAS<sup>®</sup> when the cut-off of 0.80 is used. The agreement of 81% observed in our cohort between LIAISON<sup>®</sup> and VIDAS<sup>®</sup> avidity is good and much better than comparison between other kits [13,14].

In transplant patients, CMV serology is of crucial importance, in particular in the pretransplantation management. Serology should be performed pretransplant on both the organ donor and the recipient. A test that measures anti-CMV IgG should be used, because IgG serologic tests have better specificity than IgM tests. Because donor and recipient serostatus are such key predictors of infection risk and management, it is imperative to use a test with high sensitivity and specificity [4]. In the routine sample, the seronegative and the past infection groups, we observed an excellent agreement between VIDAS<sup>®</sup> and LIAISON<sup>®</sup> IgG allowing the use of LIAISON<sup>®</sup> CMV IgG II in this clinical setting.

In conclusion, the performances of the fully automated LIAISON<sup>®</sup> CMV II line assays are comparable to those of the reference methods used in our lab for both prospective and selected populations. This new CMV line is a useful tool for the diagnosis of CMV infections and CMV immune status in clinical settings.

#### Funding

This study was partially funded by DiaSorin S.p.A.

#### Competing interests

None declared.

#### Ethical approval

Not required.

#### References

- [1] A. Kenneson, M. Cannon, Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection, *Rev. Med. Virol.* 17 (2007) 253–276.
- [2] K.B. Fowler, S. Stagno, R.F. Pass, Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection, *JAMA* 289 (February (8)) (2003) 1008–1011.
- [3] S.P. Adler, G. Nigro, Prevention of maternal-fetal transmission of cytomegalovirus, *Clin. Infect. Dis.* 57 (Suppl. 4) (2013) S189–S192.
- [4] C.N. Kotton, D. Kumar, A.M. Caliendo, A. Asberg, S. Chou, L. Danziger-Isakov, A. Humar, on behalf of the Transplantation Society International CMV Consensus Group, Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation, *Transplantation* 96 (August (4)) (2013) 333–360.
- [5] M. Bodéus, S. Feyder, P. Goubau, Avidity of IgG antibodies distinguishes primary from non-primary cytomegalovirus infection in pregnant women, *Clin. Diagn. Virol.* 9 (January (1)) (1998) 9–16.
- [6] L. Grangeot-Keros, M.J. Mayaux, P. Lebon, F. Freymuth, G. Eugene, R. Stricker, E. Dussaix, Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women, *J. Infect. Dis.* 175 (April (4)) (1997) 944–946.
- [7] H.E. Prince, M. Lapé-Nixon, Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy, *Clin. Vaccine Immunol.* 21 (October (10)) (2014) 1377–1384.
- [8] K. Lagrou, M. Bodeus, M. Van Ranst, P. Goubau, Evaluation of the new architect cytomegalovirus immunoglobulin M (IgM), IgG and IgG avidity assay, *J. Clin. Microbiol.* 47 (June (6)) (2009) 1695–1699.
- [9] M. Gentile, C. Galli, P. Pagnotti, P. Di Marco, S. Tzantzoglou, F. Bellomi, M.L. Ferreri, C. Selvaggi, G. Antonelli, Measurement of the sensitivity of different commercial assays in the diagnosis of CMV infection in pregnancy, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28 (August (8)) (2009) 977–981.
- [10] P. Carlier, N. Harika, R. Bailly, G. Vranken, Laboratory evaluation of the new Access<sup>®</sup> cytomegalovirus immunoglobulin IgM and IgG assays, *J. Clin. Virol.* 49 (November (3)) (2010) 192–197.
- [11] M. De Paschale, C. Agrappi, M.T. Manco, P. Clerici, Positive predictive value of anti-HCMV IgM as an index of primary infection, *J. Virol. Methods* 168 (September (1–2)) (2010) 121–125.
- [12] M. Leruez-Ville, Y. Sellier, L. Salomon, J. Stirnemann, F. Jacquemard, Y. Ville, Prediction of fetal infection in cases with cytomegalovirus immunoglobulin M in the first trimester of pregnancy: a retrospective cohort, *Clin. Infect. Dis.* 56 (2013) 1428–1435.
- [13] C. Vauloup-Fellous, M. Berth, F. Heskia, J.M. Dugua, L. Grangeot-Keros, Re-evaluation of the VIDAS<sup>®</sup> cytomegalovirus (CMV) IgG avidity assay: determination of new cut-off values based on the study of kinetics of CMV-IgG maturation, *J. Clin. Virol.* 56 (February (2)) (2013) 118–123.
- [14] M.G. Revello, E. Genini, G. Gorini, C. Klersy, A. Piralla, G. Gerna, Comparative evaluation of eight commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays, *J. Clin. Virol.* 48 (August (4)) (2010) 255–259.

## 3.2. EVALUATION DE L'APPORT DE LA TECHNIQUE D'IMMUNOBLOT DANS LA DATATION DE L'INFECTION MATERNELLE

**Introduction :** Les tests commerciaux mesurant l'avidité des IgG anti-CMV sont largement utilisés dans les laboratoires de biologie clinique et sont utiles pour aider à la datation d'une infection primaire chez la femme enceinte présentant des IgG et des IgM positives vis-à-vis du CMV. Néanmoins, ces tests ne sont pas standardisés et ils donnent un résultat non concluant (avidité intermédiaire) dans 12 à 25% des cas. D'autres marqueurs sont donc nécessaires dans ce contexte.

**Objectifs :** Le premier objectif de cette étude est d'évaluer les capacités des nouveaux tests Mikrogen *recomLine* CMV IgG and IgG Avidity à dater une infection primaire. Dans un second temps, nous avons déterminé si ces tests pouvaient apporter des informations complémentaires sur la date de l'infection primaire lorsque le test d'avidité de routine (VIDAS CMV IgG avidity) est non concluant.

**Méthodes :** Pour le premier objectif de l'étude, nous avons utilisé 89 sérums séquentiels provenant de 40 femmes dont le moment de l'infection était précisément connu. Pour la deuxième partie de l'étude, 89 sérums provenant de 78 femmes enceintes présentant des IgG et IgM positives vis-à-vis du CMV ainsi qu'un test d'avidité des IgG non concluant.

**Résultats:** Dans le premier groupe de sérums pour lesquels la date de primo-infection est précisément connue, on observe une interprétation correcte des tests Mikrogen *recomLine* CMV IgG and IgG Avidity dans 83.1% (74/89), un résultat incorrect dans 4.5% (4/89), et un résultat non concluant dans 12.4% (11/89) des cas. La combinaison des tests Mikrogen montre une meilleure sensibilité à diagnostiquer une infection <14 semaines comparé au test VIDAS (85.96% vs 76.92%). Pour le second objectif de l'étude, parmi le groupe de 89 sérums présentant une avidité non concluante avec le VIDAS CMV IgG Avidity, la combinaison des tests *recomLine* a apporté une information complémentaire quant à la datation de l'infection primaire dans 79% (70/89) des cas.

**Conclusion:** Nous avons évalué les performances des immunoblots Mikrogen *recomLine* CMV IgG and IgG Avidity et démontré que ces nouveaux tests sont utiles pour aider à dater une infection primaire chez la femme enceinte présentant des IgG et des IgM positives, en particulier au 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse.





Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)

## Combination of line immunoassays Mikrogen *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG Avidity helps to date the onset of CMV primary infection

Marie-Luce Delforge<sup>a,\*</sup>, Joëlle Eykmans<sup>a</sup>, Deborah Steensels<sup>a</sup>, Elena Costa<sup>b</sup>, Catherine Donner<sup>b</sup>, Isabel Montesinos<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology, National Reference Center for Congenital Infections, CUB-Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

<sup>b</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, CUB-Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 June 2018

Received in revised form 6 September 2018

Accepted 26 September 2018

Available online xxxxx

#### Keywords:

Cytomegalovirus primary infection

Pregnancy

CMV IgG avidity testing

Immunoblot CMV IgG

### ABSTRACT

CMV IgG avidity assays are widely used and can be helpful in pregnant women to date the onset of CMV primary infection; however, these tests are not standardized and sometimes give inconclusive results. We evaluated the performances of Mikrogen *recomLine* CMV IgG and IgG Avidity compared to the VIDAS CMV IgG Avidity. On a first sample set of 89 sequential sera collected from 40 women with precisely determined onset of CMV primary infection, the combination of Mikrogen *recomLine* CMV IgG and IgG Avidity showed an accurate interpretation in 83.1% (74/89), an incorrect result in 4.5% (4/89), and an inconclusive result in 12.4% (11/89) and showed a better sensitivity to diagnose infections <14 weeks compared to VIDAS (85.9% vs. 76.9%). On a second sample set of 89 sera with an intermediate VIDAS CMV IgG Avidity, the combination of line immunoassays provided additional information on the time of infection in 79% (70/89) of the samples. This combination of line assays is useful as additional confirmatory testing and can help to date more precisely the onset of CMV primary infection.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Human cytomegalovirus (CMV) is a herpesvirus which has a ubiquitous and worldwide distribution, and is the most frequent cause of congenital infection (Kenneson and Cannon, 2007). The prevalence is around 0.5–1% of all live births and is the leading cause of sensorineural hearing loss and mental retardation (Dollard et al., 2007; Stagno, 1986). CMV congenital infection can result from primary infection, reinfection, or reactivation among pregnant women. The risk of vertical transmission from mothers with primary infection during pregnancy ranges from 30% to 45% (Bodeus et al., 2010; Enders et al., 2011; Liesnard et al., 2000; Picone et al., 2013; Revello et al., 2011), and the risk is going down to 1.4% in case of nonprimary infection (Kenneson and Cannon, 2007). In order to counsel about the fetal risk, it is of major importance to differentiate CMV primary infections occurring before pregnancy from those occurring during pregnancy. The maternal infection is mostly asymptomatic, and when symptoms are present, they are mostly mild (Daiminger et al., 2005). Particularly before 12–14 weeks of gestation, the presence of IgG and IgM without knowing about the previous serologic status can be a source of anxiety for parents and of difficult management for professionals. Supplementary tests are then needed to define primary infection onset. IgG avidity assays are widely used in case of positive IgG and IgM in pregnant women. These tests determine the strength of antigen–antibody

bond, which increases over time after the primary infection. The IgG avidity is initially low during the early weeks and will mature to high avidity a few months after primary infection (Prince and Lapé-Nixon, 2014). In 12–25% of cases, the result of these conventional IgG avidity assays is inconclusive (intermediate avidity index); therefore, other markers are needed to help to date the onset of CMV primary infection (Enders et al., 2014; Leruez-Ville et al., 2013; Prince and Lapé-Nixon, 2014). Recently, other assays such as reactivity against specific CMV antigens and neutralizing antibodies were reported as additional tools for dating the onset of primary infection in pregnancy (Enders et al., 2013; Lilleri et al., 2016).

In this study, we aimed first to evaluate the ability of the line immunoassays Mikrogen *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG Avidity (Mikrogen GmbH, Neuried, Germany) to date the onset of CMV primary infection comparing to VIDAS CMV IgG Avidity (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and, secondly, to evaluate the added value of the combination of *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG Avidity in cases of intermediate VIDAS avidity.

### 2. Study design

#### 2.1. Subjects and samples

For the first objective of this study, 89 sequential sera collected from 40 women with precisely determined onset of CMV primary infection were evaluated. We retrospectively selected sera drawn in the weeks

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; CI, confidence interval.

\* Corresponding author. Tel.: +32-25555783; fax: +32-25556459.

E-mail address: [marie-luce.delforge@erasme.ulb.ac.be](mailto:marie-luce.delforge@erasme.ulb.ac.be) (M.-L. Delforge).

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.013>  
0732-8893/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article as: Delforge M-L, et al, Combination of line immunoassays Mikrogen *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG Avidity helps to date the onset of CMV primary i..., *Diagn Microbiol Infect Dis* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.013>

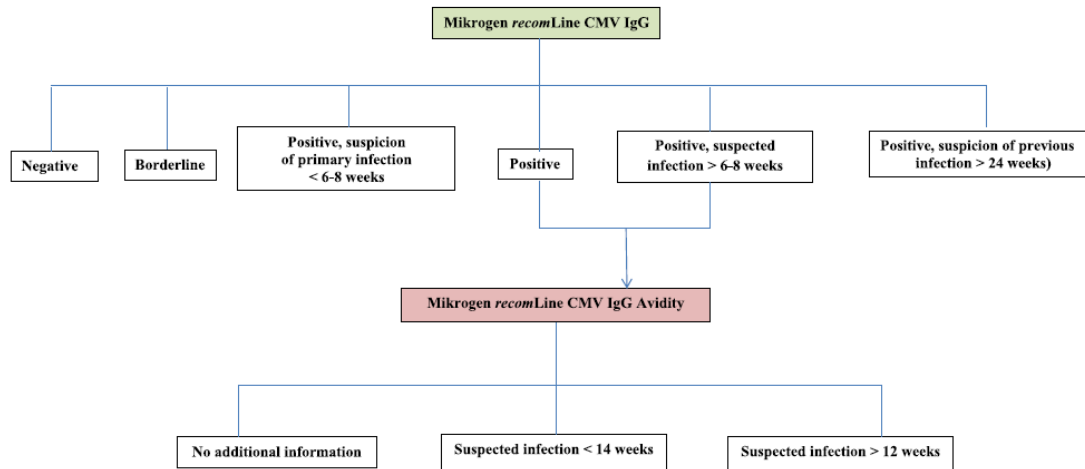


Fig. 1. Flow diagram of *recomLine* CMV IgG and CMV IgG Avidity interpretations.

and months following the diagnosis of primary infection. The number of sera per woman was between 1 and 8, depending on the availability of samples in the laboratory (1 serum for 16 women, 2 sera for 11 women, 3 sera for 7 women, 4 sera for 4 women, 6 sera for 1 woman, and 8 sera for another one).

The onset time of primary infection was determined by one of the following criteria:

- In presence of seroconversion of IgG and when both IgG and IgM are present at the first positive serology, the onset was arbitrary set at the mid time between the last IgG-negative and the first IgG-positive sample ( $n$  patients = 16,  $n$  sera = 40). For these 16 patients, the interval between last negative and first positive sample was  $\leq 6$  weeks, except for 3 patients (7, 7, and 8 weeks)
- In the presence of a seroconversion of IgG and when only IgM was positive at the first positive serology, the onset of primary infection was set at that point ( $n$  patients = 11,  $n$  sera = 25).
- In the presence of clinical symptoms and/or biological alterations compatible with CMV infection in the presence of CMV-specific IgM antibodies and a significant rise of IgG, the onset was established at the time of the symptoms ( $n$  patients = 7,  $n$  sera = 16)

The panel also included samples from women who experienced CMV primary infection in the past but presenting long-lasting CMV IgM ( $n$  patients = 7,  $n$  sera = 8).

For the second objective of this study, 89 sera collected from 78 pregnant women presenting positive CMV IgG and IgM and an intermediate avidity with VIDAS CMV IgG Avidity were evaluated. For 11 patients, we tested 2 sequential sera with an interval of 1 to 7 weeks between samples.

## 2.2. Methods

The *recomLine* IgG and IgG Avidity is a line immunoassay allowing the identification of antibodies against 6 specific antigens of CMV: IE1, CM2, p150, p65, gB1, and gB2. The detection of phase-specific IgG and the avidity allow to differentiate between an acute and a previous infection. Assays were performed according to manufacturer's recommendations. For all samples, 2 test strips were incubated in parallel (1 treated with avidity reagent and the other not) in order to differentiate IgG antibodies with low avidity and IgG with high avidity. The test procedure lasts approximately 3 h.

After 2 h of drying, the evaluation of each strip was done using the test strip analysis software *recomScan* (Mikrogen). The software measures the stain intensity of the occurring bands and determines the reactivity of each band. For each specific antigen band, a point value is given and the test result of the IgG is determined by adding the point values. Moreover, according to the pattern of IgG reactivity, the time of infection can be determined in a certain number of cases. The different possible interpretations of the IgG blot results are described in Fig. 1.

In cases of positive IgG result and positive IgG, suspected infection  $> 6-8$  weeks, the test strip incubated with avidity reagent was also interpreted.

By measuring the difference of intensity between both strips, the software is able to evaluate the avidity of IgG against IE1, CM2, p150, and gB2. A decrease of 40% or less indicates high avidity, a decrease of 50–100% indicates low avidity, and a decrease of 40–50% is regarded as intermediate avidity. According to the avidity of the respective IgG antibodies against the 4 different antigens, different possible interpretations are given by the software (Fig. 1). In our study, the final results were considered: either the combination of the 2 line assays or the result of the *recomLine* IgG only in cases of negative IgG, borderline IgG, positive IgG with suspicion of primary infection  $< 6-8$  weeks, and positive IgG with suspicion of previous infection  $> 24$  weeks. Positive IgG without additional information is considered as inconclusive result.

The VIDAS CMV IgG Avidity was performed and interpreted according to manufacturer's recommendations using a cutoff index  $< 0.40$  for low avidity and  $\geq 0.65$  for high avidity. Avidity indexes between 0.40 and 0.65 are intermediate and reported as inconclusive results. Avidity testing was not performed if concentration of VIDAS CMV IgG was below 6 AU/mL.

The tests routinely used for the diagnosis of CMV infection were the LIAISON® CMV IgG II and the LIAISON® CMV IgM II assays.

Table 1A

Results obtained with VIDAS on the sample set with precisely determined onset of CMV primary infection.

Onset of primary infection	VIDAS CMV IgG avidity		
	$\leq 12$ weeks	Inconclusive	$> 12$ weeks
$\leq 12$ weeks $n = 52$	40	11	1
$> 12$ weeks $n = 37$	0	13	24

Please cite this article as: Delforge M-L, et al, Combination of line immunoassays Mikrogen *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG Avidity helps to date the onset of CMV primary infection, *Diagn Microbiol Infect Dis* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.013>

**Table 1B**  
Results obtained with *recomLine* on the sample set with precisely determined onset of CMV primary infection.

Onset of primary infection	MIKROGEN <i>recomLine</i> CMV IgG and CMV IgG Avidity							
	IgG negative	IgG borderline	Infection < 6-8 weeks	Infection >6-8 weeks and <14 weeks	Infection <14 weeks	Infection >12 weeks	Infection >24 weeks	IgG positive, no additional information
<14 weeks n = 57 (<6-8 weeks n = 32)	2 <sup>a</sup>	0	9	1 <sup>b</sup>	37	1 <sup>c</sup>	0	7
>12 weeks n = 37 (>24 weeks n = 18)	0	0	0	1 <sup>d</sup>	4 <sup>e</sup>	21	5 <sup>f</sup>	6

Five samples taken at 13 weeks after the onset of infection were counted twice: 2 of them were scored as infection <14 weeks, 1 as infection >12 weeks, and 2 as positive IgG with no additional information.

Supplementary information for some specific samples:

- <sup>a</sup> : Very recent infections: 0 week, 3 weeks.
- <sup>b</sup> : Twelve weeks.
- <sup>c</sup> : Thirteen weeks.
- <sup>d</sup> : Fourteen weeks.
- <sup>e</sup> : Thirteen, 13, 17, and 17 weeks
- <sup>f</sup> : Eighteen, 22, 28, 31, and 62 weeks.

2.3. Statistical analysis

We produced diagnostic accuracy measurements (sensitivity and specificity) for the VIDAS CMV IgG Avidity and for the *recomLine* IgG and IgG Avidity assays and computed 95% confidence interval (CI) according to the exact method. We excluded inconclusive test results from the computation of accuracy measurements, which are reported in the tables and in the text. As in the clinical practice, we have to consider the inconclusive avidity results, so we also calculated accuracy measurements including these results and counted them as incorrectly classified by the test.

We encountered a challenge in the computation of accuracy measurements since the line immunoassay can discriminate between infections of more than 12 weeks and less than 14 weeks, leaving out infections estimated at 13 weeks. Since infections occurring at 13 weeks are both >12 weeks and <14 weeks, we always considered them as classified correctly by the test.

3. Results

3.1. Samples with well-defined onset of infection

Fifty-two sera were drawn within 12 weeks of infection, and 37 were obtained more than 12 weeks after primary infection. The results

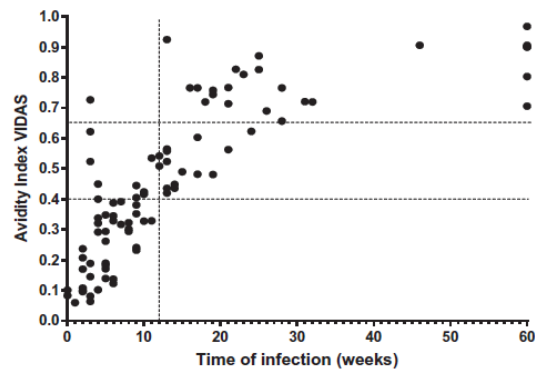


Fig. 2. VIDAS CMV IgG avidity index according to the time of infection. Samples taken more than 60 weeks after infection are plotted at 60 weeks.

obtained on the 89 samples with VIDAS CMV IgG Avidity and the combination of *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG avidity are summarized in Tables 1A and 1B.

According to the determined onset of primary infection, VIDAS CMV IgG Avidity showed an accurate interpretation in 71.9% (64/89) of cases, an incorrect result in 1.1% (1/89), and inconclusive results (intermediate avidity) in 27% (24/89). The falsely high avidity result obtained with VIDAS CMV IgG avidity came from a woman with a proven primary infection having taken place 3 weeks before sampling. The combination of *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG avidity scored this serum correctly as an infection <14 weeks.

Fig. 2 shows the VIDAS CMV IgG avidity index according to the time of infection.

According to the determined onset of primary infection, the combination of line immunoassays Mikrogen *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG Avidity showed an accurate interpretation in 83.1% (74/89) of samples tested, an incorrect result in 4.5% (4/89), and an inconclusive result in 12.4% (11/89) (positive IgG). The 4 samples not correctly scored by the combination of immunoblot were as follows: 2 infections scored <14 weeks at 17 weeks and 2 infections scored >24 weeks at 18 and 22 weeks of infection. For one of the samples not

**Table 2**  
Accuracy of VIDAS CMV IgG Avidity to diagnose an infection ≤12 weeks and of MIKROGEN *recomLine* CMV IgG and CMV IgG Avidity to diagnose an infection <14 weeks.

	VIDAS CMV Ig Avidity Diagnosis of an infection ≤12 weeks	Mikrogen <i>recomLine</i> <sup>a</sup> Diagnosis of an infection <14 weeks
Number of inconclusive results excluded	24/89 (27%)	11/89 (12.4%)
Number of samples evaluated	65	83 <sup>a</sup>
Sensitivity	97.6% (40/41) 95% CI 87.1–99.9%	98% (49/50) 95% CI 89.35–99.95%
Specificity	100% (24/24) 95% CI 91.2–100%	78.8% (26/33) 95% CI 61.09–91.02%
Number of inconclusive results included	24/89 (27%)	11/89 (12.4%)
Number of samples evaluated	89	89
Sensitivity	76.9% (40/52) 95% CI 67.20–84.43%	85.9% (49/57) 95% CI 76.76–91.91%
Specificity	64.9% (24/37) 95% CI 52.18–75.75%	70.3% (26/37) 95% CI 57.31–80.63%

<sup>a</sup> The test has a double threshold of >12 weeks/<14 weeks. Samples whose true status was 13 weeks (n = 3) were always considered correct.

Please cite this article as: Delforge M-L, et al, Combination of line immunoassays Mikrogen *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG Avidity helps to date the onset of CMV primary i..., *Diagn Microbiol Infect Dis* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.013>

**Table 3**  
Accuracy of MIKROGEN *recomLine* CMV IgG and CMV IgG Avidity to diagnose an infection >24 weeks and an infection <6–8 weeks.

	>24 weeks	<6–8 weeks <sup>a</sup>
Total number of samples evaluated: 78		Total number of samples evaluated: 79
Number of samples excluded due to an inconclusive result: 11 (12.4%)		Number of samples excluded due to an inconclusive result: 11 (12.4%)
Sensitivity	16.7% (3/18) 95% CI 3.58–41.42%	34.4% (11/32) 95% CI 18.57–53.19%
Specificity	96.7% (58/60) 95% CI 88.47–99.59%	100% (47/47) 95% CI 71.51–100%

<sup>a</sup> The test has a double threshold of ><=6 weeks/>8 weeks. Samples whose true status was 7 weeks (n = 1) were always considered correct.

correctly scored at 17 weeks, the time of infection was set at the mid time between the last negative serology and the first positive serology, but the interval in between the two samples was 8 weeks, inducing a possible misclassification of this sample. The 2 samples incorrectly scored at 18 and 22 weeks were more precisely timed, based on the first positive serology with IgM positive only, and came from the same patient.

Tables 2 and 3 show the sensitivity and specificity of both tests to date correctly a CMV infection. Table 2 presents the computation either by excluding the inconclusive results or by including them in order to be more representative of the reality of the clinical setting.

**3.2. Samples with unknown onset of infection and intermediate VIDAS CMV IgG Avidity**

The combination of line immunoassays yielded 5 infections <6–8 weeks, 8 infections >6–8 weeks without additional statement, 11 infections between 6–8 and 14 weeks, 13 infections >12 weeks, 1 infection >24 weeks, 29 infections <14 weeks, 2 negative IgG, 1 intermediate IgG, and 19 cases of noncontributory positive IgG (Table 4).

Taking into account all the results giving useful information (including the negative and borderline IgG), the combination of line immunoassays provided additional information on the time of infection in 79% (70/89) of the samples.

**4. Discussion**

In this study, we evaluated the performance of the *recomLine* IgG and IgG Avidity with a total of 178 samples. Half of them came from women with precisely determined onset of CMV primary infection, and half of them were sera with an intermediate VIDAS IgG avidity.

CMV IgG avidity tests are widely used as a useful tool to date CMV infection, especially in pregnant women presenting with positive CMV IgG and IgM, but they are not standardized (Revello et al., 2010). Several comparative studies have shown discrepancies between commercial assays, in particular false high positive results (Revello et al., 2010; Sellier et al., 2015; Vauloup-Fellous et al., 2013). We also observed a false high positive result in this study, previously described as a case report (Delefortrie et al., 2016). Other limitations are, on the one hand, the restricted usefulness of these tests after the first trimester of pregnancy and, on the other hand, the reported unusually long persistence of

intermediate or low CMV IgG avidity in some cases (Lumley et al., 2014; Revello et al., 2010; Sellier et al., 2015; Vauloup-Fellous et al., 2013). Therefore, we have to be cautious with their interpretation, and other tests such as immunoblot assays may be useful in this setting.

The first part of the study evaluated the accuracy of *recomLine* IgG and IgG Avidity to date CMV infection: In our study, 83.1% of samples tested matched onset dates compared to 71.9% with VIDAS avidity. Moreover, the number of inconclusive results (intermediate avidity for VIDAS, positive IgG without additional statement for *recomLine*) is smaller with the combination of line immunoassays (27% vs. 12.4%).

Considering the performances of the combination of *recomLine* assays for timing primary infection according to the interpretations proposed by the manufacturer, we showed that their sensitivity to diagnose an infection <14 weeks is good (98%) even after including the inconclusive results (86%). An advantage of the *recomLine* assay should be its capacity to diagnose correctly infections >24 weeks, in order to rule out a primary infection during pregnancy when women attend prenatal care late after the first trimester. Unfortunately, our results showed a sensitivity of 16.67% (3/18) to exclude an infection <24 weeks. For the 15 other samples, the test scored correctly as infections >12 weeks, but this result does not help in the management of these women presenting late in the pregnancy. This poor sensitivity has also been observed by Enders et al. They did not obtain the characteristic blot pattern for late infection >24 weeks among a sample set of 30 infections >20–40 weeks. However, we have to mention that the manufacturer improved the quality of the antigen used for the *recomLine* assay compared to *recomBlot* tested by Enders, so the results may not be fully comparable. As mentioned by Enders et al., these results highlight the importance of performing CMV antibody testing during the first trimester or beginning of the second trimester in order to date correctly a primary infection (Enders et al., 2013). We observed also a low sensitivity of the *recomLine* assay to diagnose precisely an infection <6–8 weeks (34.38%, 11/32), but in this sample set, the test scored correctly the majority of the serum as infections <14 weeks (21/32).

Conventional CMV IgG avidity assays have proved to be a helpful tool to date infection in pregnant women with positive CMV IgG and IgM; however, they give an intermediate or inconclusive result in 12–25% of cases, depending on the population studied and the method used (Enders et al., 2014; Leruez-Ville et al., 2013; Prince and Lapé-Nixon, 2014, personal data). In the second part of our study, we showed that among the sample set of inconclusive results with VIDAS CMV IgG Avidity, the combination of line immunoassays could help to determine the timing of infection in 79% of samples. We took into account in these useful interpretations 2 negative and 1 borderline IgG. This is perhaps questionable, but as these samples were clearly positive with 2 different IgG immunoassays (and IgM positive), we considered that this information was useful, helping to suspect a very recent infection. Obviously, this has to be confirmed on a second sample. Considering the results of the second part of our study, the sequential use of conventional avidity testing followed by the line assays in case of inconclusive conventional avidity results may therefore help in the management of pregnant women presenting with a positive CMV IgG and IgM serology, especially during the first trimester of pregnancy.

In conclusion, we assessed the performances of the Mikrogen *recomLine* CMV IgG and CMV IgG Avidity, and we demonstrated that this combination of line assays is useful as additional confirmatory testing and can help to date more precisely the onset of CMV primary infection.

**Table 4**  
Results obtained on the sample set with borderline VIDAS CMV IgG Avidity (unknown onset of infection).

n = 89	MIKROGEN <i>recomLine</i> CMV IgG and CMV IgG Avidity								
	IgG negative	IgG borderline	Infection <6–8 weeks	Infection >6–8 weeks	Infection >6–8 weeks and <14 weeks	Infection <14 weeks	Infection >12 weeks	Infection >24 weeks	Positive, no additional information
	2	1	5	8	11	29	13	1	19

Please cite this article as: Delforge M-L, et al, Combination of line immunoassays Mikrogen *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG Avidity helps to date the onset of CMV primary i..., Diagn Microbiol Infect Dis (2018), <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.013>

**Conflict of interests**

Funding: none.

Competing interests: none declared.

Ethical approval: This study was approved by the Ethics Committee of the CUB-Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles (P2017/392).

**Contributors**

M.L.D. designed the study and wrote the manuscript; J.E. performed the experiments; C.D., M.L.D., D.S., and I.M. recruited patients; E.C. performed statistical analysis. All contributors critically revised the paper.

**Acknowledgments**

Kits were provided free of charge and at a reduced price by Mikrogen.

**References**

- Bodeus M, Kabamba-Mukadi B, Zech F, Hubinont C, Bernard P, Goubau P. Human cytomegalovirus *in utero* transmission: follow up of 524 maternal seroconversions. *J Clin Virol* 2010;47:201–2.
- Daiminger A, Bader U, Enders G. Pre- and periconceptional primary cytomegalovirus infection: risk of vertical transmission and congenital disease. *BJOG* 2005;112:166–72.
- Delefortrie Q, Delforge ML, Cimiez JM, Schatt P, Auger I, Vankerkhoven P, et al. CMV seroconversion associated with a high avidity in a previously seronegative pregnant woman during her first trimester of pregnancy. *Curr Trends Biomed Eng Biosci* 2016;1(1). [CTBEB.MS.ID.555552].
- Dollard S, Grosse S, Ross D. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 2007;17:355–63.
- Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation with gestational age. *J Clin Virol* 2011;52:244–6.
- Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Schimpf Y, Enders M. The value of CMV IgG avidity and immunoblot for timing the onset of primary CMV infection in pregnancy. *J Clin Virol* 2013;56:102–7.
- Enders M, Daiminger A, Exler S, Enders G. Author's reply to letter to the editor regarding "Comments on an alternative calculation of cytomegalovirus IgG avidity indexes on VIDAS" [J Clin Virol 60 (2014) 76–77]. *J Clin Virol* 2014;61(2):309–10.
- Kenneson A, Cannon M. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007;17:253–76.
- Leruez-Ville M, Sellier Y, Salomon L, Stimmann J, Jacquemard F, Ville Y. Prediction of fetal infection in cases with cytomegalovirus immunoglobulin M in the first trimester of pregnancy: a retrospective cohort. *Clin Infect Dis* 2013;56:1428–35.
- Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk. *Obstet Gynecol* 2000;95:881–8.
- Lillieri D, Gerna G, Furione M, Zavattoni M, Spinillo A. Neutralizing and ELISA IgG antibodies to human cytomegalovirus glycoprotein complexes may help date the onset of primary infection in pregnancy. *J Clin Virol* 2016;81:16–24.
- Lumley S, Patel M, Griffiths PD. The combination of specific IgM antibodies and IgG antibodies of low avidity does not always indicate primary infection with cytomegalovirus. *J Med Virol* 2014;86:834–7.
- Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, Guitton S, Senat MV, Fuchs F, et al. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat Diagn* 2013;33:1–8.
- Prince H, Lapé-Nixon M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy. *Clin Vaccine Immunol* 2014;21(10):1377–84.
- Revello MG, Genini E, Gorini G, Klersy C, Piralla A, Gerna G. Comparative evaluation of eight commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *J Clin Virol* 2010;48:255–9.
- Revello MG, Fabbri E, Furione M, Zavattoni M, Lillieri D, Tassis B, et al. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience. *J Clin Virol* 2011;50:303–7.
- Sellier Y, Guilleminot T, Ville Y, Leruez-Ville M. Comparison of the Liaison® CMV IgG Avidity II and the VIDAS® CMV IgG Avidity II assays for the diagnosis of primary infection in pregnant women. *J Clin Virol* 2015;72:46–8.
- Stagno S. Cytomegalovirus infection: a pediatrician's perspective. *Curr Probl Pediatr* 1986;16:629–67.
- Vauloup-Fellous C, Berth M, Heskia F, Dugua JM, Grangeot-Keros L. Re-evaluation of the VIDAS CMV IgG avidity CMV-IgG assay: determination of new cut-off values based on the study of kinetics of CMV-IgG maturation. *J Clin Virol* 2013;56:118–23.

Please cite this article as: Delforge M-L, et al, Combination of line immunoassays Mikrogen *recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG Avidity helps to date the onset of CMV primary i..., *Diagn Microbiol Infect Dis* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.09.013>

### 3.3. MARQUEURS VIROLOGIQUES MATERNELS PRONOSTIQUES D'INFECTION FŒTALE : CHARGE VIRALE ADN CMV MESURÉE DANS LE SANG ET LES URINES.

**Introduction:** La transmission du CMV au fœtus peut survenir lors d'une primo-infection maternelle, mais également lors d'une réactivation ou d'une réinfection ; cependant le risque de transmission est nettement plus élevé en cas de primo-infection. Le risque augmente également avec l'âge gestationnel. D'autres facteurs de risques ont été décrits mais il subsiste encore de nombreuses questions quant aux facteurs maternels qui influencent la transmission verticale.

**Objectifs:** Les buts de cette étude étaient d'évaluer une éventuelle corrélation entre la présence de CMV dans le sang et les urines d'une part, et la quantité de CMV dans ces mêmes fluides d'autre part, et la transmission au fœtus dans une cohorte de femmes enceintes ayant présenté une primo-infection pendant leur grossesse.

**Méthode :** Nous avons réalisé la détection du CMV par PCR dans 150 échantillons d'urines et 114 échantillons sanguins provenant de patientes enceintes avec une primo-infection démontrée par des tests sérologiques. Lorsque la détection du CMV était positive, la quantification était effectuée par PCR en temps réel.

**Résultats:** Le taux de transmission verticale était de 36.7% (55/150) dans notre cohorte, ce qui est comparable aux résultats d'autres études. Nous avons trouvé une association statistiquement significative entre la présence de CMV dans les urines maternelles et la transmission au fœtus (OR 2.03 95% CI 1.03-3.99), et entre la présence de CMV dans le sang maternel et la transmission (OR 3.14 95% CI 1.38-7.16). La quantification du CMV a été réalisée sur 79 urines positives et 34 échantillons sanguins positifs. La médiane de la charge virale observée dans les urines était significativement plus élevée chez les patientes qui ont transmis l'infection comparé aux non-transmetteuses (P=0.015). Nous n'avons pas observé de corrélation entre la charge virale sanguine et la transmission au fœtus.

**Conclusion:** Dans notre cohorte, la présence de CMV dans le sang et les urines maternelles sont corrélées avec la transmission verticale et la charge virale urinaire est plus élevée chez les femmes transmetteuses. Ces marqueurs virologiques peuvent être utiles dans l'évaluation du risque de transmission en cas de primo-infection maternelle mais nécessitent des études sur de plus larges cohortes afin de confirmer ces résultats et d'établir un seuil quantitatif.



## Presence of Cytomegalovirus in urine and blood of pregnant women with primary infection might be associated with fetal infection



Marie-Luce Delforge<sup>a,\*</sup>, Elena Costa<sup>b</sup>, Françoise Brancart<sup>a</sup>, Deborah Goldman<sup>b</sup>, Isabel Montesinos<sup>a</sup>, Siham Zaytouni<sup>b</sup>, Arnaud Marchant<sup>c</sup>, Catherine Donner<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology, Hôpital Universitaire Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

<sup>b</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Hôpital Universitaire Erasme, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

<sup>c</sup> Institute for Medical Immunology, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 August 2016

Received in revised form 5 January 2017

Accepted 5 March 2017

#### Keywords:

Cytomegalovirus

Pregnancy

Congenital infection

CMV DNA in maternal urine and blood

### ABSTRACT

**Background:** Cytomegalovirus (CMV) congenital infection can result from primary infection, reinfection or reactivation among pregnant women. The risk of vertical transmission is much higher in case of primary infection, and the transmission rate increases with gestational age.

However there are still many questions about maternal markers that can predict whether the virus will be transmitted to the fetus.

**Objectives:** To investigate the relationship between the presence and the quantity of CMV in urine and blood of women presenting a primary CMV infection during pregnancy and the presence of congenital infection in their offspring.

**Study design:** Detection and quantification of CMV DNA was performed on 150 urine samples and 114 blood samples from 150 pregnant women with proven CMV primary infection.

**Results:** Transmission rate was 36.7% (55/150). A statistically significant association was found between the presence of CMV in maternal urine and newborn infection (OR 2.03 95%CI 1.03–3.99). A clearly significant association was found between the presence of CMV in maternal blood and newborn infection (OR 3.14 95% CI 1.38–7.16). Taking into consideration those samples that are positive for CMV in maternal urine, the median value of viral load was significantly higher in those patients who transmitted to offspring ( $P = 0.015$ ). No significant association between viral load in maternal blood and newborn infection was observed.

**Conclusion:** The presence of CMV in maternal urine and maternal blood correlated to the transmission of CMV to offspring in our cohort. The median viral load in urine is higher in women who transmitted. These markers may help to identify pregnant women at risk to transmit to the fetus.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Background

Human cytomegalovirus (CMV) is a herpesvirus which has a ubiquitous and worldwide distribution, and is the most frequent cause of congenital infection [1]. In developed countries, the prevalence is around 0.5–1% of all live births and is the leading cause of sensorineural hearing loss and mental retardation [2,3]. CMV congenital infection can result from primary infection, reinfection or reactivation among pregnant women. The mean rate of vertical transmission from mothers with primary infection during the

pregnancy ranges from 35% to 45% [4–7] and the rate is going down to 1.4% in case of non-primary infection [1]. Despite numerous publications in the past decades, questions about the factors influencing the transmission to the fetus are still pending. Transmission rate increases with gestational age but the fetus is at greater risk of becoming symptomatic when maternal infection occurs during the periconceptional period or in the first trimester [4,5]. However there are still many unanswered questions about markers in the mother that can predict whether the virus will be transmitted to the fetus.

## 2. Objectives

The primary objective of this study was to investigate the relationship between the presence of CMV in urine and blood of women

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [marie-luce.delforge@erasme.ulb.ac.be](mailto:marie-luce.delforge@erasme.ulb.ac.be), [mdelforg@ulb.ac.be](mailto:mdelforg@ulb.ac.be) (M.-L. Delforge).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2017.03.004>

1386-6532/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

presenting a primary CMV infection during pregnancy and the presence of congenital infection in their offspring. As a secondary objective, we aimed to investigate the relationship between CMV viral load in urine and blood of the same patients and the presence of congenital infection in their offspring.

### 3. Study design

#### 3.1. Patients and samples

Between November 2001 and November 2011, we investigated 150 pregnant women with CMV primary infection. Primary infection was diagnosed by one of the following criteria: presence of a seroconversion of IgG, presence of IgM with low IgG avidity, a significant rise of IgG in presence of IgM, clinical symptoms and/or biological alterations compatible with CMV infection in the presence of CMV-specific IgM antibodies.

Maternal age, gestational age and time between infection and sampling were collected. The time of infection was arbitrarily estimated on gestational age at detection of the first positive serology. Pregnant women negative for CMV antibodies were routinely screened approximately every month. The median interval between last CMV antibodies negative blood (when known: 141/150) and first positive serology was 5 (p25: 4, p75: 7) weeks. Maternal urine and blood were collected at first visit, after written informed consent was obtained.

#### 3.2. Detection and quantification of CMV in urine and whole blood samples

Between November 2001 and March 2004, CMV DNA was detected using an in-house nested polymerase chain reaction (PCR) targeting the pp150 CMV gene, performed as previously described [8]. Samples collected between April 2004 and January 2011 were assayed using a real-time in-house PCR targeting the pp150 CMV gene. Extraction was done using the Qiagen DNA blood mini kit (Qiagen, Benelux). PCR was performed on a Light Cycler480 PCR system (Roche Diagnostics) with the forward primer 5'-CTG ATG AGG TTT GGG CTT TAA-3', the reverse primer 5'-TCC GAG GAG TCG TCG TCT T-3', and the probe 5'-FAM-CAA ACT GCA GAG TCA CCG GTC GAA-TAMRA-3'.

All positive samples were retrospectively quantified using the CMV R-gene kit (BioMérieux, France). The PCR was carried out on a LightCycler 480 PCR system (Roche Diagnostics, Belgium). The kit is a 5' nuclease real-time assay, targeting the gene coding for ppUL83 protein.

#### 3.3. Diagnosis of congenital infection

A congenital infection in a newborn was determined by the detection of CMV by PCR in either urine or blood or saliva samples obtained during the two first weeks of life. In cases of termination

of pregnancy, the detection of CMV was done by PCR on amniotic fluid, fetal blood and fetal tissues when available.

#### 3.4. Statistical analysis

We performed all statistical analysis using STAT IC 12. Categorical variables were described giving absolute number of cases and percentage, and were analyzed using a chi square test. As a measure of association odds ratios (OR) were calculated. Confidence interval (CI) was calculated using the Cornfield formula. Quantitative variables were described using mean and standard deviation when normally distributed, median and first and third quartile when not normally distributed and were analyzed using Student *t*-test when prerequisites for the test were met and with a Wilcoxon Mann-Whitney test if they were not. Statistical significance was considered when the *p* value was <0.05.

### 4. Results

In our total cohort, the rate of intrauterine transmission was 36.7% (55/150). For these 150 patients the presence of CMV in maternal urine was analyzed.

In Table 1 baseline characteristics and presence of CMV in maternal urine are summarized in transmission and non-transmission groups. The OR between the presence of CMV in maternal urine and transmission of the virus to offspring was found to be significant at 2.03 (95% CI 1.03–3.99, *p*=0.041). There was no statistically significant difference between maternal age, gestational age at seroconversion and time elapsed between infection and sampling between those patients whom transmitted the virus to their offspring and those who did not.

In a sample subgroup when blood sample was available (*n*=114), we also analyzed the presence of CMV in maternal blood. In Table 2 baseline characteristics and presence of CMV in maternal blood are summarized in transmission and non-transmission groups. Presence of CMV in maternal urine was also analyzed for this subgroup. There was no statistically significant difference between maternal age, gestational age at seroconversion, time elapsed between infection and sampling between those patients who transmitted the virus to their offspring and those who did not.

In this subgroup the OR between the presence of CMV in maternal urine and transmission of the virus to offspring was 1.9 (95% CI 0.87–4.13, *p*=0.1). The OR between the presence of CMV in maternal blood and transmission of the virus to offspring was found to be clearly statistically significant at 3.14 (95% CI 1.38–7.16, *p*=0.006).

The analysis of the difference of virus transmission to offspring in function of viral load in the positive urine and blood samples is summarized in Table 3. Taking into consideration those samples that are positive for CMV in maternal urine (*n*=79), there was a significant higher value of viral load in the samples of patients who transmitted the virus to the offspring compared to those who did not (*p*=0.015). When only the subgroup of 114 pregnancies was considered (59 positive urine samples), the viral load in those

**Table 1**

The relationship between the presence of CMV in maternal urine and transmission to the fetus. Descriptive statistics of baseline characteristics and univariate analysis.

	n	Transmission n=55 (36.7%)		Non transmission n=95		OR	95%CI	p-value
Maternal age (years)	150	29.4 <sup>a</sup>	4.6 <sup>b</sup>	30.3 <sup>a</sup>	4.3 <sup>b</sup>			0.2
Gestational age at infection (completed weeks)	150	18 <sup>c</sup>	12–24 <sup>d</sup>	16 <sup>c</sup>	12–21 <sup>d</sup>			0.26
Time between infection and sampling (completed weeks)	150	6 <sup>c</sup>	3–9 <sup>d</sup>	5 <sup>c</sup>	3–8 <sup>d</sup>			0.29
Presence of CMV in maternal urine sample (n)	150	35	63.6%	44	46.3%	2.03	1.03–3.99	0.041

<sup>a</sup> Mean.

<sup>b</sup> Standard deviation.

<sup>c</sup> Median.

<sup>d</sup> p25–p75.



**Table 2**

The relationship between the presence of CMV in maternal blood and transmission to the fetus. Descriptive statistics of baseline characteristics and univariate analysis.

	n	Transmission n = 42 (36.8%)		Non transmission n = 72		OR	9%CI	p-value
Maternal age (years)	114	28.8 <sup>a</sup>	4.76 <sup>b</sup>	30.3 <sup>a</sup>	4.3 <sup>b</sup>			0.094
Gestational age at infection (completed weeks)	114	19.5 <sup>c</sup>	13–25 <sup>d</sup>	17 <sup>c</sup>	12–21.5 <sup>d</sup>			0.16
Time between infection and sampling (completed weeks)	114	6 <sup>c</sup>	3–9 <sup>d</sup>	5 <sup>c</sup>	3–8 <sup>d</sup>			0.7
Presence of CMV in maternal urine sample (n)	114	27	64.3%	35	48.6%	1.90	0.87–4.13	0.1
Presence of CMV in maternal blood sample (n)	114	19	45.2%	15	20.8%	3.14	1.38–7.16	0.006

<sup>a</sup> Mean.<sup>b</sup> Standard deviation.<sup>c</sup> Median.<sup>d</sup> p25–p75.**Table 3**

Comparison of viral load in maternal positive urine sample and maternal positive blood sample and transmission to the fetus.

	n	Transmission		Non transmission		p-value
		median	p25–p75	median	p25–p75	
Viral load in maternal urine sample for the whole sample (copies/mL)	79	4480	2060–11100	2570	598–4345	0.015
Viral load in maternal urine sample in maternal blood subgroup (copies/mL)	59	4030	2060–8740	3210	596–4460	0.24
Viral load in maternal blood sample in maternal blood subgroup (copies/mL)	34	2270	1300–5280	1940	1180–5780	0.45

patients who transmitted the virus was higher than the median viral load of those who did not, but the values did not reach statistical significance. There were 34 patients with positive CMV in maternal blood, the median of the viral load was higher in the transmission group, but was not statistically significant.

## 5. Discussion

In this study we analyzed the relationship between the presence of CMV in maternal urine and blood of women presenting a primary CMV infection during pregnancy and the infection of the fetus. We found a rate of maternal-fetal transmission of 36.7%, which is comparable to those found among primary infections in other studies [4,7]. We observed a marginal statistically significant association between the presence of CMV in maternal urine sample and fetal infection. This marginal association could be due to the limited number of cases.

In a longitudinal study of 2477 pregnant women with positive screening for IgM antibodies, Lazzarotto et al. found low predictive rates for congenital CMV infection when the mother shed virus in the saliva and/or urine during the first two trimesters of pregnancy but no precision was given about the method of detection used and the time of sampling [9].

In the subgroup of 114 pregnancies, we detected CMV DNA in blood samples in 34/114 (30%) which is quite lower than the results of 75% reported by Revello et al. [10]. Many reasons could explain this difference, including the different methods used, the different inclusion criteria and the timing of sampling. In this subgroup we found a statistically significant association between the presence of CMV in maternal blood sample and fetal infection. Leruez-Ville et al. studied serological parameters (IgM level and IgG avidity) and CMV PCR on serum in women with positive CMV IgM in the first trimester. They observed a continuous increased risk of vertical transmission with decreasing IgG avidity. The risk of transmission is also increased with low IgG titers or a positive PCR in maternal serum [11]. In their study, Revello et al. support that determination of DNAemia may complement serologic testing, substantially help in the identification of women with acute or recent primary infection and, therefore, help to identify women at risk to transmit [10]. In a recent study, Forner et al. showed a positive correlation between the presence of CMV DNA in maternal blood, maternal urine and transmission to the fetus in a population of primary and non-primary infections [12]. According to these previous studies,

our results also support the hypothesis that CMV PCR on blood samples may help to better identify fetus at risk of congenital infection.

The median viral load in maternal urine and blood is higher in women who transmitted the disease to offspring; however statistical significance is achieved only for the urine sample. This lack of association on blood samples could be due to the limited number of cases (n = 34). However, this observation reinforces the hypothesis of the correlation between presence of CMV in urine and blood and fetal transmission.

Saldan et al. and Forner et al. showed that CMV-specific cell-mediated immunity represents a relevant marker in assessing the likelihood of congenital CMV transmission, particularly in combination with low IgG avidity. One of their hypotheses is that the high levels of cell-mediated immunity may be correlated with the duration and the magnitude of the maternal viremia. This hypothesis needs to be verified and is in agreement with our findings, however primary and non-primary infections are mixed up in these two studies, so one should remain cautious comparing these to our results [12,13].

In conclusion, the presence of CMV in maternal urine and maternal blood correlates to the transmission of CMV to offspring. The viral load found in urine of mothers who transmitted CMV to their newborn is statistically higher than the viral load in urine of mothers who did not transmit. To our knowledge, this is the first study evaluating the correlation between the presence and the quantification of CMV DNA in maternal urine and blood and the fetal transmission. Further studies on larger cohorts are needed to validate the hypothesis. The usefulness of the CMV viral load in urine and blood should also be further evaluated in order to determine a quantitative threshold which could help to identify women at risk to transmit.

## Funding

None.

## Competing interests

None declared.

## Ethical approval

The study was approved by the ethic committee of ULB-Hôpital Erasme.

## References

- [1] A. Kenneson, M. Cannon, Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection, *Rev. Med. Virol.* 17 (2007) 253–276.
- [2] S. Stagno, Cytomegalovirus infection: a pediatrician's perspective, *Curr. Probl. Pediatr.* 16 (1986) 629–667.
- [3] S. Dollard, S. Grosse, D. Ross, New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection, *Rev. Med. Virol.* 17 (2007) 355–363.
- [4] O. Picone, C. Vauloup-Fellous, A.G. Cordier, S. Guitton, M.V. Senat, F. Fuchs, J.M. Ayoubi, L. Grangeot Keros, A. Benachi, A serie of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome, *Prenat. Diagn.* 33 (2013) 1–8.
- [5] G. Enders, A. Daiminger, U. Bäder, S. Exler, M. Enders, Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation with gestational age, *J. Clin. Virol.* 52 (2011) 244–246.
- [6] M. Bodeus, B. Kabamba-Mukadi, F. Zech, C. Hubinont, P. Bernard, P. Goubau, Human cytomegalovirus *in utero* transmission: follow up of 524 maternal seroconversions, *J. Clin. Virol.* 47 (2010) 201–202.
- [7] M.G. Revello, E. Fabbri, M. Furione, M. Zavattoni, D. Lillieri, B. Tassis, A. Quarengi, C. Cena, A. Arossa, L. Montanari, V. Rognoni, A. Spinillo, G. Gerna, Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection: a 20-year experience, *J. Clin. Virol.* 50 (2011) 303–307.
- [8] C. Liesnard, C. Donner, F. Brancart, F. Gosselin, M.L. Delforge, F. Rodesch, Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection: prospective study of 237 pregnancies at risk, *Obstet. Gynecol.* 95 (June) (2000) 881–888.
- [9] T. Lazzarotto, B. Guerra, M. Lanari, L. Gabrielli, M.P. Landinin, New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection, *J. Clin. Virol.* 41 (2008) 192–197.
- [10] M.G. Revello, M. Furione, V. Rognoni, A. Arossa, G. Gerna, Cytomegalovirus DNAemia in pregnant women, *J. Clin. Virol.* 61 (2014) 590–592.
- [11] M. Leruez-Ville, Y. Sellier, L. Salomon, J. Stirnemann, F. Jacquemard, Y. Ville, Prediction of fetal infection in cases with cytomegalovirus immunoglobulin M in the first trimester of pregnancy; a retrospective cohort, *Clin. Infect. Dis.* 56 (2013) 1428–1435.
- [12] G. Forner, A. Saldan, C. Mengoli, N. Gussetti, G. Palù, D. Abate, Cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot assay but not QuantiFERON assay is a novel biomarker to determine risk of congenital CMV infection in pregnant women, *J. Clin. Microbiol.* 54 (8) (2016) 2149–2154.
- [13] A. Saldan, G. Forner, C. Mengoli, N. Gussetti, G. Palù, D. Abate, Strong cell-mediated immune response to human cytomegalovirus is associated with increased risk of fetal infection in primarily infected pregnant women, *Clin. Infect. Dis.* 61 (2015) 1228–1234.

## 4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'infection congénitale à CMV est la première cause de surdité non génétique et une cause importante de retard mental ; son impact en termes de santé publique reste encore sous-estimé au niveau mondial, et également dans nos pays occidentaux. Le fait que la plupart des infections maternelles et des nouveau-nés sont asymptomatiques, que les séquelles apparaissent tardivement chez 10 à 15% des enfants asymptomatiques à la naissance, et que l'infection congénitale symptomatique peut survenir chez des enfants nés de mère « immunes » vis-à-vis du CMV sont des facteurs pouvant expliquer le manque de reconnaissance des problèmes liés au cCMV (220,221). En Belgique, le taux de cCMV à la naissance est estimé à 0.52%, ce qui correspond à approximativement 650 enfants/an dont 120 garderont des séquelles (222).

Dans ce travail, après une revue extensive de la littérature et malgré une recherche active dans le domaine, nous avons pu identifier plusieurs lacunes et questions encore sans réponses concernant l'infection congénitale à CMV et nécessitant des travaux de recherche complémentaire. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à deux aspects précis : l'amélioration du diagnostic de la primo-infection maternelle pendant la grossesse et l'étude de la corrélation entre les marqueurs virologiques maternels et la transmission foétale.

### **1. Dépistage sérologique de l'infection maternelle et évaluation de nouveaux tests automatisés CMV IgG, IgM et IgG avidité**

Le screening sérologique systématique des femmes enceintes fait l'objet d'un long débat dans la littérature et il n'est actuellement recommandé par aucun organisme officiel dans aucun pays. L'Allemagne et l'Italie recommandent le dépistage dans certains cas, notamment avant la grossesse ou en début de grossesse en vue de recommander des mesures d'hygiène chez les femmes séronégatives à risque. Le Conseil Supérieur de la Santé en Belgique a également proposé cette recommandation d'un screening sérologique unique dans son avis de 2015 (223). Les habitudes varient selon les régions mais dans les pays développés, de nombreux praticiens qui suivent les grossesses réalisent des tests sérologiques CMV. Un premier argument en faveur d'un dépistage sérologique est l'importance du diagnostic des primo-infections puisque celles-ci sont associées à un haut risque (35-40%) de transmission au fo tus. Un autre argument est la possibilité de prodiguer des conseils d'hygiène aux femmes séronégatives pour le CMV pendant leur grossesse. Il a en effet

été démontré que ces mesures diminuent le taux de primo-infections (105,106). Comme une proportion importante de cCMV survient chez des enfants nés de mère ayant fait une infection non primaire, certains auteurs préconisent ces mesures d'hygiène à toutes les femmes enceintes afin d'éviter les réinfections, cependant aucune étude n'a encore démontré l'efficacité de ces mesures chez les femmes séropositives pour le CMV. De même aucune étude n'a analysé l'impact des mesures d'hygiène appliquées au futur père.

Les arguments contre le dépistage systématique comprennent l'absence de moyens de prévention de l'infection fœtale et de traitement de l'infection in utero, le fait que le cCMV peut survenir suite à une primo-infection ou une infection non primaire maternelle et que seuls 17 à 20% des nouveau-nés infectés développent des séquelles (92,121,124, 223,225,226).

En Belgique, depuis juin 2017 le remboursement de la sérologie CMV chez la femme enceinte a été supprimé alors qu'il reste autorisé pour la toxoplasmose. Un groupe d'experts internationaux a récemment publié des recommandations sur la prévention, le diagnostic et le traitement du cCMV (121). En ce qui concerne le screening, les auteurs ne recommandent pas de réaliser systématiquement des tests sérologiques chez toutes les femmes enceintes, mais bien en cas de suspicion clinique de primo-infection maternelle ou d'anomalies échographiques fœtales suggestives de cCMV. Il faut rappeler cependant que cette infection congénitale est la principale cause infectieuse d'atteinte neurologique fœtale et la première cause de surdité non héréditaire. La charge pour la société en termes de DALYs (disability-adjusted life years), correspondant au nombre d'années en bonne santé perdues, est comparable à celle du syndrome de Down et est 10 fois supérieure à celle de la toxoplasmose congénitale (222).

Plusieurs publications et de récentes communications reposent la question de la stratégie de dépistage (124,223,225, 227,228,229,230,231,232). Cahill et al. ont étudié le rapport coût-efficacité de 3 stratégies de dépistage avec intention de traiter par des gammaglobulines en cas de dépistage positif. La 1 re stratégie consiste à réaliser les tests sérologiques chez toutes les femmes enceintes une seule fois à 20 semaines ou au-delà, la 2 me   dépister uniquement les femmes à risque (contacts réguliers avec des enfants de moins de 4 ans)   20 semaines et dans la 3 me stratégie, la sérologie est réalisée uniquement en cas d'anomalies échographiques compatibles avec une infection fœtale à CMV. La 1 re stratégie, celle du dépistage systématique, est celle dont le rapport coût-efficacité est le meilleur, mais la faiblesse de cette étude est qu'elle se base sur l'étude non contrôlée et non randomisée de Nigro et al. de 2004 qui montre une réduction de 60% de transmission en cas d'injection de gammaglobulines. Cette efficacité n'a pas été confirmée par l'étude contrôlée et

randomisée de Revello et al. publiée en 2014 (188,189,227). Une estimation du rapport coût-bénéfice montre que le traitement (gammaglobulines ou autre) doit atteindre un niveau d'efficacité de 47% pour être en faveur d'un dépistage systématique. Il sera donc intéressant de réévaluer les conclusions de Cahill et al. par rapport aux différentes stratégies de dépistage lorsque les résultats de l'étude prospective en cours évaluant la prévention de l'infection fœtale par injection de gammaglobulines seront disponibles ([www.clinicaltrials.gov/show/NCT01376778](http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01376778)), et s'ils sont exploitables étant donné l'arrêt prématuré de l'enrôlement des patientes. Un autre point discutable de cette étude est le timing du screening unique à 20 semaines. Son inconvénient principal est qu'il ne permet pas une datation précise de l'infection maternelle, information utile pour le pronostic fœtal et pour la réalisation éventuelle d'une amniocentèse au moment adéquat. D'autres auteurs ont proposé des algorithmes de dépistage avec une sérologie CMV pré-conceptionnelle ou réalisée le plus tôt possible pendant la grossesse et un suivi régulier de la sérologie chez les femmes séronégatives. Cette stratégie permet d'identifier toutes les primo-infections, donc les infections maternelles le plus à risque de transmettre, et de conseiller des mesures d'hygiène aux femmes séronégatives (225). Un algorithme alternatif, ou dépistage ciblé, permettant de diminuer le nombre de sérologies réalisées et donc le coût global du dépistage, propose un dépistage le plus tôt possible pendant la grossesse suivi de sérologies mensuelles uniquement chez les femmes séronégatives considérées à risque (contact avec des enfants <3ans) (226). Cette dernière stratégie est intéressante, mais son efficacité devrait être évaluée, notamment par rapport à la capacité à bien identifier les femmes à risque de contracter une primo-infection. L'application de ces différentes stratégies de dépistage et de suivi sérologique des femmes enceintes dépend entre autres des possibilités de prévention et de traitement de l'infection fœtale, et les études en cours sur l'efficacité des gammaglobulines et du valaciclovir pourraient faire évoluer les algorithmes de dépistage sérologique du CMV dans un futur proche.

Dans le cadre de ce débat, que ce soit pour du screening systématique ou du dépistage ciblé, il est d'autant plus important que les tests sérologiques soient fiables, c'est-à-dire sensibles, spécifiques et reproductibles. Leur facilité d'utilisation et la rapidité de réponse est également un atout. Jusqu'il y a quelques années, la sérologie infectieuse était peu automatisée, à l'exception des tests de dépistage des hépatites et du VIH. Avec le progrès des technologies, et notamment de l'adaptation de la chimioluminescence aux immunoessais, les laboratoires de sérologie infectieuse se sont de plus en plus automatisés, avec un panel de tests commerciaux disponibles de plus en plus vaste. Le premier objectif de notre travail a été d'évaluer un des premiers tests sérologiques CMV entièrement

automatisés comprenant les 3 tests nécessaires au diagnostic des primo-infections, les IgG, les IgM et l'avidité des IgG. Nous avons évalué les performances de ces tests sur un échantillonnage de sérums bien caractérisés, dont une partie de sérums séquentiels prélevés dans le cadre de primo-infections, et sur des sérums testés en routine au laboratoire de sérologie infectieuse de l'hôpital Erasme. Les méthodes servant de comparateur étaient des tests partiellement automatisés.

La spécificité des IgG est une première qualité importante des tests sérologiques. Un manque de spécificité peut mener à de faux diagnostics de séroconversion. Au moment où notre étude a été réalisée, il n'existait pas de standard titré en UI/mL pour le dosage des IgG. Nous avons évalué ces nouveaux tests par rapports à un comparateur utilisé en routine dans notre laboratoire et obtenu une concordance globale sur les 2 types d'échantillons de 97.4%, ce qui est comparable à d'autres études (128,233,235). Récemment, en 2017, un groupe d'experts de l'OMS a élaboré un standard international (236). Le but de ce standard est qu'il soit utilisé, entre autres, pour calibrer les tests commerciaux et ainsi améliorer la reproductibilité inter-laboratoires. Il n'y a pas encore d'études publiées évaluant son apport dans l'amélioration de la standardisation des tests IgG anti-CMV. Ce type d'étude devrait être conduit car, si l'on compare au standard existant pour les IgG anti-rubéole, on observe une disparité importante et un manque de reproductibilité entre les tests commerciaux alors qu'ils sont tous calibrés vis-à-vis de ce standard international. Ce problème est inhérent, entre autres, à la composition du standard lui-même (237).

La spécificité des IgM est également un problème bien connu. En effet, la VPP positive des IgM pour le diagnostic d'une primo-infection est de l'ordre de 50%. Cette valeur est probablement approximative car dans l'étude de Paschale et al., le diagnostic de primo-infection est établi par rapport à la présence d'une avidité faible ou modérée, et non par rapport à la date précise de l'infection déterminée par exemple par l'observation d'une séroconversion (80). Néanmoins, dans notre expérience, une proportion importante des IgM positives ne sont pas liées à des primo-infections mais à une persistance d'IgM pendant plusieurs mois ou années après la primo-infection, une activation polyclonale liée à une autre infection, une réaction croisée lors d'une infection à EBV ou la présence d'un facteur rhumatoïde. La présence d'IgM peut également être liée à une infection récurrente à CMV. Il n'existe pas de standard international pour les IgM. Dans notre étude, nous avons observé une concordance de 91% avec le test comparateur, ce qui est comparable à d'autres études (128,233,234, 238,239,240) mais illustre bien le problème de la spécificité des IgM et le besoin d'autres tests pour le diagnostic des primo-infections.

En présence d'IgG et d'IgM chez une femme enceinte, la détermination de l'avidité des IgG est le test complémentaire recommandé pour dater l'infection maternelle (121,125). Nous avons évalué le test LIAISON® CMV IGG AVIDITY II qui est entièrement automatisé. Le test LIAISON® a montré une meilleure sensibilité à diagnostiquer les infections de plus de 3 mois par rapport au test VIDAS, néanmoins dans 18% des cas l'avidité intermédiaire ne permettait pas de dater l'infection. Nous n'avons pas observé de résultats d'avidité des IgG faussement élevés contrairement à l'étude de Seillier et al. (130), mais notre expérience de Centre National de Référence pour les infections congénitales nous a permis d'observer ultérieurement un cas similaire d'infection très récente accompagné d'une avidité des IgG faussement élevée (241). Ces cas sont rares, néanmoins ils mettent en exergue la nécessité d'interpréter avec prudence les tests d'avidité des IgG, l'importance d'interpréter l'ensemble des tests sérologiques, et de compléter la mise au point par un contrôle sur un 2<sup>ème</sup> sérum prélevé 2 à 3 semaines plus tard.

Notre étude montre également qu'il est important de bien définir les valeurs des seuils d'avidité élevée et d'avidité basse. Lorsque ceux-ci sont mal positionnés, le risque d'erreur dans la datation de la primo-infection est présent. Par exemple, le seuil d'avidité du test VIDAS a été surévalué pendant de nombreuses années, conduisant à un pourcentage élevé d'avidités intermédiaires et donc une absence d'aide à la datation dans de nombreux cas de primo-infection remontant à de plus de 3 mois (135,218).

Comme nous l'avons vu, les tests sérologiques classiques sont utiles mais ont des lacunes, et nous avons voulu trouver d'autres marqueurs sérologiques afin d'aider les cliniciens à évaluer le risque d'infection fœtale, en particulier chez les femmes enceintes qui présentent des IgG et des IgM anti-CMV sans notion de sérologie antérieure.

## **2. Apport de la technique d'immunoblot dans la datation de la primo-infection maternelle**

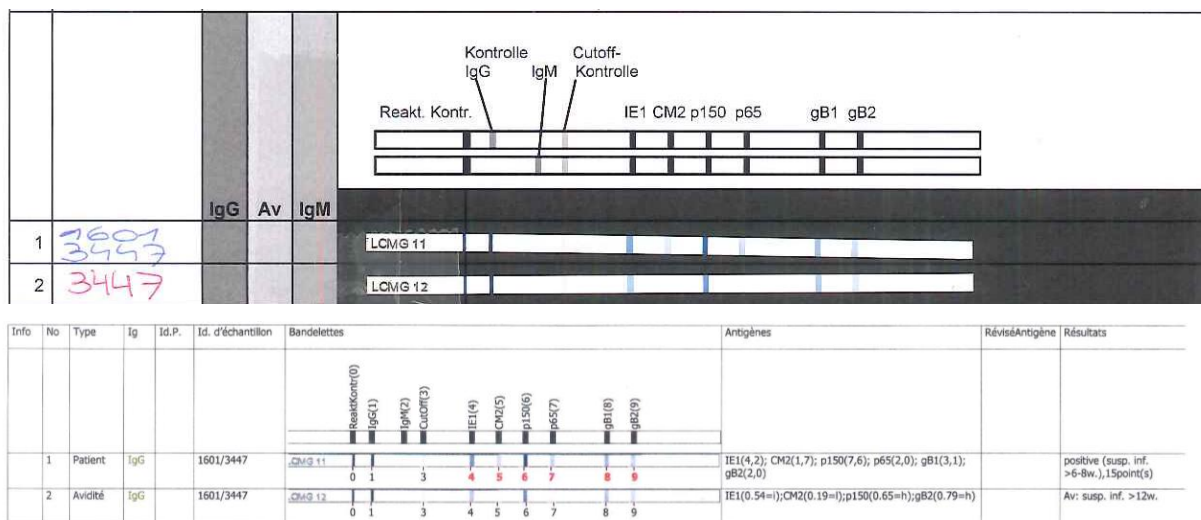
Les western blot et immunoblot sont utilisés depuis longtemps en sérologie infectieuse pour vérifier et confirmer la présence d'anticorps vis-à-vis d'un agent infectieux suite à un test de dépistage positif par exemple HIV, HCV, Borrelia. Dans le cadre des infections congénitales, quelques applications marginales existent, comme la comparaison des anticorps maternels et du nouveau-né en cas de suspicion de toxoplasmose congénitale (242,243).

Dans le domaine du cCMV et en particulier du diagnostic des primo-infections chez la femme enceinte, la détection des anticorps vis-à-vis de différents antigènes du CMV mesurée par western blot et immunoblot reste peu utilisée. Nous avons trouvé 5 études sur ce sujet dans la littérature.

Lazzarotto et al en 2000 ont évalué leur immunoblot « maison » (comprenant des antigènes natifs et des antigènes recombinants) CMV IgM par rapport à la transmission foétale. Pour les sérums prélevés entre 6 et 18 semaines d'AG, les auteurs ont obtenu une VPP de 30% comparable à celle de l'index d'avidité des IgG (34%) mais une VPN de 90%, inférieure à celle de l'index d'avidité (100%) (244). Le même groupe a évalué la stratégie de confirmation des IgM par immunoblot IgM associé à la mesure de l'avidité des IgG dans une cohorte de 2477 femmes enceintes présentant des IgM positives. Lorsque l'immunoblot IgM est négatif (55% des cas) et est associé à une avidité des IgG élevée, l'infection à CMV est considérée non active et le taux de transmission observé est de moins de 0.1%. Lorsque la présence d'IgM est confirmée par immunoblot et est associée à un index d'avidité des IgG faible ou modéré, le taux de transmission observé est de 25% et est comparable à celui observé dans le groupe des femmes ayant présenté une séroconversion (30%), démontrant l'intérêt de l'immunoblot IgM dans ce contexte (167). Eggers et al. en 2001 ont montré l'utilité de la détection des anticorps anti-gB et gH pour aider au diagnostic d'une primo-infection. Sur un groupe de 40 patientes et 170 sérums, toutes ont une réactivité anti-pp150 ou pp65 démontrant le contact avec le CMV, mais aucune n'a de réactivité anti gB ou gH sur le sérum précoce. L'apparition des anti-gB et gH coïncide avec l'apparition des anticorps neutralisants, soit 10 à 17 semaines après la séroconversion. L'absence de réactivité gB et gH est donc fortement suggestive d'une infection récente (160). En 2013 Rajasekariah et al ont évalué les performances du *recomBlot* CMV IgG, IgG avidité et IgM (Mikrogen) (245). Les sensibilités, spécificités, VPP et VPN obtenues sont modestes, mais sont calculées par rapport aux tests sérologiques conventionnels et non par rapport à la date de séroconversion, inconnue pour la plupart des patientes. L'utilisation des tests sérologiques conventionnels comme comparateur de référence rend cette étude peu utile en pratique puisque l'on sait que la VPP des IgM pour diagnostiquer une primo-infection est de 50%. Récemment, Enders et al. ont évalué ce même immunoblot, le *recomBlot* CMV IgG et CMV IgG avidité, sur une cohorte de 61 patientes (188 sérums) avec une primo-infection dont la date est bien documentée. Ces auteurs obtiennent une VPP de 100% pour le diagnostic d'une infection moins de 6 à 8 semaines et de 96.9% pour le diagnostic d'une infection de moins de 14 semaines. La VPN qui permet d'exclure une infection de moins de 6 à 8 semaines est de 87.9% (219). Ces bons résultats contrastent avec ceux de Rajasekariah et al. mais sont plus fiables étant donné qu'ils ont été obtenus sur une cohorte de patientes dont la date de primo-infection est connue.



Dans la première partie de notre étude, nous avons voulu évaluer les capacités des nouveaux tests Mikrogen *recomLine* CMV IgG and IgG Avidity à dater une infection primaire. Ceux-ci diffèrent des tests *recomBlot* évalués dans les études antérieures, le procédé de production étant modifié. Le *recomBlot* est composé d'une mixture d'antigènes recombinants séparés par électrophorèse et transférés sur une membrane de nitrocellulose. Pour le *recomLine*, chaque antigène recombinant est transféré séparément sur la membrane. La structure secondaire des antigènes est mieux préservée grâce à l'absence d'électrophorèse en milieu dénaturant. La place de chaque antigène sur la bandelette est fixe et précise, permettant une lecture aisée par scanner (246).



*recomLine* CMV IgG and *recomLine* CMV IgG Avidity : exemple de réactivité des IgG (bandelette 11) et de l'avidité des IgG (bandelette 2). Evaluation et interprétation par le software *recomScan*.

Il nous a semblé important de valider les performances de ce test par rapport à la date connue de la primo-infection, et non par comparaison avec d'autres tests sérologiques. Lorsque la date de la primo-infection est bien documentée selon des critères précis, l'évaluation est réalisée par rapport à un standard de référence solide. C'est un point fort de notre étude alors que beaucoup d'études qui évaluent les tests d'avidité comparent les tests entre eux. Ces études permettent d'évaluer la concordance entre tests mais pas la sensibilité et la spécificité par rapport à la date réelle de la primo-infection.

Nous avons montré que les tests Mikrogen *recomLine* CMV IgG and IgG Avidity obtiennent une interprétation correcte dans 83.1% (74/89), un résultat incorrect dans 4.5% (4/89), et un résultat non concluant dans 12.4% (11/89) des cas. La combinaison des tests Mikrogen montre une meilleure

sensibilité à diagnostiquer une infection de moins de 14 semaines par comparaison au test VIDAS (85.96% vs 76.92%). Par contraste avec ces infections récentes pour lesquelles de bons résultats sont obtenus, on observe que les 4 sérums incorrectement classés sont des infections plus anciennes remontant à 17 (n=2), 18 et 22 semaines. Chez la première patiente, on observe une réactivité vis-à-vis de tous les anticorps sauf gB2 mais une avidité faible persistante à 17 semaines vis-à-vis d'IE1, CM2 et p150, résultant en une interprétation d'une infection de moins de 14 semaines. Chez la 2<sup>ème</sup> patiente, on observe une réactivité vis-à-vis de IE1, p150 et gB2 avec une avidité faible vis-à-vis de IE1 et p150, menant également à une interprétation d'une infection de moins de 14 semaines. Pour ces 2 patientes, l'avidité polyclonale mesurée par VIDAS est intermédiaire. Pour la 3<sup>ème</sup> patiente, pour laquelle nous avons 2 sérums incorrectement interprétés à 18 et 22 semaines, le profil est différent. Neuf semaines après le début de l'infection, on observe déjà une absence d'anticorps vis-à-vis des antigènes de phase précoce (IE1, CM2 et p65) et une apparition assez précoce, entre 13 et 18 semaines, des anticorps anti-gB. A 18 semaines, cette patiente présente une réactivité uniquement vis-à-vis de p150 et gB, profil typique des infections anciennes et interprété comme une infection de plus de 24 semaines par le test *recomLine* CMV IgG.

Ces quelques cas illustrent la disparité individuelle de la réponse immunitaire humorale, tant en termes de réactivité des IgG vis-à-vis des différents antigènes viraux que d'avidité des IgG. La variabilité individuelle de la maturation des IgG, et donc de l'avidité de celles-ci, ainsi que la concordance limitée entre les méthodes ont déjà été montrées dans plusieurs études en ce qui concerne les tests classiques de mesure de l'avidité polyclonale des IgG (128,130,135,138,218). Notre étude montre qu'il en est probablement de même pour l'avidité vis-à-vis d'antigènes spécifiques du CMV, mais ceci devrait être confirmé sur un nombre plus important d'échantillons.

Le test montre de bonnes performances pour diagnostiquer les infections récentes (<14 semaines) mais est moins performant pour le diagnostic d'infections plus anciennes. D'une part, les 4 cas mal classés sont des infections datant de 17, 18 et 22 semaines et d'autre part, la sensibilité du test à diagnostiquer les infections de plus de 24 semaines n'est que de 16.7%. Cette première partie de notre étude sur les immunoblot, réalisée sur des sérums bien caractérisés par rapport au moment de la primo-infection, pourrait permettre d'améliorer les performances du test. Une analyse fine des profils des anticorps obtenus fournirait un matériel supplémentaire à la firme qui produit ce test, permettant une amélioration de l'algorithme décisionnel du logiciel d'interprétation. Une autre perspective pourrait être l'utilisation de l'intensité de la bande fournie par la lecture au scanner. Actuellement, le logiciel d'interprétation se base sur la présence ou l'absence de réactivité pour

définir le profil, mais il serait utile d'étudier de façon plus fine l'intensité des bandes observées, par exemple pour observer la cinétique des anticorps sur des sérums prélevés de façon séquentielle.

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons déterminé si ces tests pouvaient apporter des informations complémentaires sur la date de l'infection primaire lorsque le test d'avidité de routine est non concluant, et nous avons montré que c'est le cas dans près de 80%. La mesure de l'avidité par immunoblot diffère de l'avidité mesurée par les tests classiques. Ceux-ci mesurent une avidité globale, polyclonale, des anticorps vis-à-vis des antigènes présents dans le test et qui sont généralement issus d'une souche de référence CMV inactivée. L'établissement d'un profil d'anticorps de type IgG d'une part, et d'autre part la mesure de l'avidité des IgG vis-à-vis d'antigènes recombinants séparés expliquent probablement l'apport des tests de type immunoblot dans ces circonstances.

S'il est évident au vu des résultats obtenus que ce test peut apporter une aide lorsqu'il est réalisé au 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse en cas d'avidité des IgG intermédiaire, son impact dans d'autres circonstances est limité. Sa faible sensibilité à diagnostiquer les infections de plus de 24 semaines limite son intérêt lorsque la sérologie est réalisée tardivement pendant la grossesse. L'intérêt clinique de l'immunoblot réalisé au premier trimestre de la grossesse chez les patientes avec des IgM positives et une avidité des IgG intermédiaire est a priori conséquent, mais son impact en pratique sur la prise en charge des patientes doit encore être évalué. Nous avons réalisé une analyse préliminaire des cas suivis à la clinique de médecine fœtale de l'Hôpital Erasme. Sur 10 patientes se présentant avec une grossesse de moins de 14 semaines, des IgG et des IgM positives et une avidité des IgG intermédiaire, 5 amniocentèses ont été évitées. Pour 3 d'entre elles, l'infection a été définie comme clairement pré-conceptionnelle. Pour les 2 autres, l'infection a été précisée comme pré-conceptionnelle mais ayant eu lieu probablement dans le mois qui précède la conception, donc avec un risque faible de transmission de l'ordre de 4-5%. Ces patientes ont eu un suivi échographique spécifique rapproché et une RMN vers 31-32 semaines. Une troisième patiente dans la même situation a préféré bénéficier d'une amniocentèse. Deux patientes pour lesquelles l'immunoblot était non informatif, et une pour laquelle une primo-infection en cours de grossesse a été démontrée, ont eu une amniocentèse. Pour une patiente avec une grossesse non évolutive, l'immunoblot a permis d'exclure un primo-infection à CMV comme cause de fausse-couche.

Il apparaît dans ces quelques exemples que l'immunoblot IgG et avidité des IgG a sa place dans la stratégie décisionnelle de prise en charge de patientes enceintes présentant une suspicion de primo-

infection à CMV pendant le 1<sup>er</sup> trimestre de la grossesse et devrait faire l'objet d'une étude sur un plus grand nombre de cas.

### **3. Marqueurs virologiques maternels prédictifs d'infection fœtale**

Lorsqu'une primo-infection à CMV est diagnostiquée ou suspectée chez une femme enceinte, il est important dans sa prise en charge d'évaluer les risques de transmission de l'infection au fœtus. Les facteurs pronostiques maternels de transmission fœtale sont encore mal connus mais de plus en plus étudiés. Dans la troisième partie de notre travail, nous avons montré que la présence de CMV détecté par PCR dans les urines et le sang maternels corrèle avec la transmission au fœtus. Il s'agissait de la première étude publiée étudiant les marqueurs virologiques concomitamment sur le sang et les urines maternels dans une cohorte de femmes enceintes présentant une primo-infection. Un lien entre l'excrétion du virus en quantité importante et la transmission fœtale est déjà suggéré par Stern en 1986: « *There is therefore support for the observation that women who shed high titres of cytomegalovirus during pregnancy are at increased risk of being delivered of a congenitally infected baby.* » (153). L'observation des résultats de Stern et Tucker en 1973 permet déjà d'évoquer cette hypothèse. Sur un suivi de 1040 femmes enceintes, les auteurs observent 11 primo-infections. Cinq d'entre elles excrètent du virus dans les urines à terme, ces 5 patientes transmettent. Les 6 patientes qui n'ont pas de virurie détectable à terme ont des enfants non infectés (247). Nankervis et al. en 1984 étudient une population de 1089 jeunes femmes enceintes de moins de 20 ans et observent un risque accru de transmission fœtale lorsqu'il existe une virurie maternelle. Il faut noter que dans cette étude de Nankervis et al, la majorité des patientes viruriques sont des infections non primaires (n=121), seules 3 d'entre elles présentent une primo-infection (248).

Ces études datent des années 1970-1980 et sont basées sur des techniques de culture cellulaire qui mettent en évidence du virus vivant. Avec l'essor des techniques de biologie moléculaire dans les années 90, il était nécessaire d'évaluer les outils actuels de détection du CMV, nettement plus sensibles mais qui détectent les acides nucléiques viraux non nécessairement liés à la présence de particules virales infectieuses. Les toutes premières études utilisant la PCR ne montrent pas de corrélation entre la présence de CMV dans le sang et la transmission fœtale mais le nombre de patientes étudié était limité (249,250). Par contre, les études publiées plus récemment, et dont la plupart évaluent également des paramètres immunologiques, montrent une corrélation entre la présence d'une virémie maternelle et la transmission (146,147,251).

La virurie, ou présence de CMV dans les urines détectée par PCR, a été peu étudiée. Un article publié en 2008 décrit une faible VPP pour la transmission au fœtus de l'excrétion de CMV dans les urines et/ou la salive pendant les 2 premiers trimestres de la grossesse, mais aucune précision n'est apportée quant aux méthodes de détection utilisées et au nombre de patientes évaluées (167). Dans leur étude récente publiée en 2016, Forner et al. observent une corrélation positive entre la présence d'une virémie et d'une virurie maternelle et la transmission au fœtus dans une cohorte de femmes présentant soit une primo-infection (n=57) soit une infection non primaire (n=23), sans faire de différence entre ces 2 groupes dans leur analyse (147). Nos résultats confirment l'hypothèse que la présence de CMV dans le sang et les urines maternels est un marqueur utile dans l'évaluation du risque de transmission fœtale chez les patientes présentant une primo-infection.

Ces quelques études sur la virémie/virurie maternelles évaluent un seul dosage, prélevé à des moments différents par rapport à la primo-infection et par rapport à l'âge gestationnel. Notre étude est également transversale, analysant un seul échantillon, collecté au moment où la patiente se présente à sa première consultation en médecine fœtale, en moyenne 6.4 semaines après la primo-infection. Ces observations ne permettent donc pas d'évaluer l'importance de la durée de la virémie et/ou de la virurie ni l'impact de l'âge gestationnel au moment du prélèvement sur la transmission fœtale. Or si l'on observe les travaux de Stern et Tucker publiés en 1973, leurs résultats posent question à cet égard puisque c'est la virurie à terme qui semble être un facteur de risque de transmission fœtale chez les 11 femmes avec une primo-infection (247). On peut dès lors se poser la question de l'importance de la durée de la virurie et surtout, de la virémie. En regard de la durée de la virémie, cette hypothèse a été abordée dans 2 études. La première montre que la durée de la virémie est significativement inférieure chez les femmes non transmetteuses comparé aux femmes transmettant l'infection à leur fœtus (32 vs 93 jours) (157). La deuxième étude, rétrospective, décrit 3 types d'élimination virale en comparant la charge virale maternelle lors de la première consultation par rapport à celle prélevée au moment de l'amniocentèse (disparition de la virémie, virémie persistante, augmentation de la virémie) et montre que les 2 derniers types sont corrélés à la transmission au fœtus (145). Ces résultats suggèrent une corrélation entre la persistance de la virémie maternelle et la transmission au fœtus.

Quant à la charge virale, ou quantification des acides nucléiques viraux par PCR, nous avons montré que lorsqu'elle est détectée sur les urines, elle est significativement plus élevée chez les femmes transmetteuses comparé aux non transmetteuses (médiane 4480 vs 2570 copies/mL), mais avec une superposition des valeurs entre les 2 groupes. Aucune autre étude n'a actuellement analysé le lien

entre la charge virale urinaire maternelle et la transmission mais, à l'instar de la charge virale sanguine où une superposition des valeurs est également observée (145), nous n'avons pas pu établir un seuil quantitatif lié au risque de transmission.

Contrairement à d'autres auteurs, nous n'avons pas observé de corrélation entre la charge virale sanguine et la transmission fœtale, probablement à cause du nombre limité de cas évalués pour ce paramètre (n=34). La charge virale observée chez les femmes transmetteuses est légèrement supérieure à celle des non transmetteuses (médiane 2270 vs 1940 copies/mL) mais cette différence n'est pas statistiquement significative. Trois études qui ont évalué la relation entre la charge virale sanguine maternelle et la transmission fœtale ont montré une corrélation positive (145,157,251). Deux d'entre elles se sont en priorité intéressées à des marqueurs immunologiques. Saldan et al. observent une corrélation entre la réponse immunitaire cellulaire spécifique vis-à-vis du CMV et la transmission et formulent l'hypothèse que cette réponse immunitaire forte corrélée à la transmission est une conséquence de la durée et de l'intensité de la virémie maternelle, et que c'est celle-ci qui induit une réponse immune intense (252). Mais les résultats de PCR sanguine ne sont pas décrits dans leur étude, et cette hypothèse n'a pas été vérifiée par d'autres auteurs. Au contraire, Lilleri et al. suggèrent que c'est la réponse immune maternelle qui est responsable du contrôle de l'infection et non l'inverse. Une charge virale basse suite à une primo-infection détermine un risque moindre de transmission et une réponse immune maternelle plus rapide. Son hypothèse est que le développement rapide d'anticorps neutralisants associé à une réponse T fonctionnelle induit un blocage rapide de la dissémination du virus et une clearance virale sanguine plus rapide (157). Fornara et al. obtiennent des résultats similaires : une bonne réponse T spécifique et une virémie faible sont associées à un risque moindre de transmission (251). Ces études suggèrent que le contrôle rapide de la virémie par les réponses immunitaires est associé à un risque moindre de transmission au fœtus. Cependant aucun paramètre individuel ne permet de déterminer quelle femme enceinte va transmettre ou non. Le point commun de ces études est la présence d'une charge virale CMV plus élevée chez les patientes transmetteuses. Il s'agit clairement d'un paramètre qu'il faut analyser plus finement, notamment en étudiant sa cinétique pendant la grossesse et la corrélation avec la transmission, en tenant compte de l'âge gestationnel.

Sur bases des données disponibles actuellement, il est difficile d'évaluer si c'est l'amplitude ou la durée de la virémie qui est un facteur de risque de transmission. La durée de la virémie, donc la persistance d'une réplication virale, pourrait être un facteur plus important que l'amplitude de la virémie pour le passage transplacentaire, mais ces deux paramètres ont probablement une certaine

importance respective. Une étude prospective et multicentrique étudiant la cinétique de la virémie et la corrélation avec la transmission au fœtus, en tenant compte du moment de la primo-infection et de l'âge gestationnel, permettrait de répondre à ces questions. Un seuil quantitatif de charge virale ainsi qu'un seuil de durée de la virémie lié à la transmission pourrait être établi. L'existence d'un standard international en UI/mL pour la PCR quantitative permettra une utilisation des seuils par d'autres laboratoires. Cette étude nécessitera de nombreux prélèvements sanguins au cours de la grossesse. En parallèle, la virurie devrait être mesurée afin de confirmer nos résultats et de déterminer l'intérêt de ce paramètre complémentaire dans l'évaluation du risque de transmission fœtale.

Un algorithme intégrant les paramètres virologiques tels que la charge virale CMV dans le sang et dans les urines, ainsi que des paramètres immunologiques, serait un outil précieux pour les cliniciens dans la prise en charge des femmes présentant une primo-infection en cours de grossesse.

Dans cette perspective, il est important de diagnostiquer les primo-infections. La revue de la littérature et les résultats de notre travail de recherche apportent plusieurs arguments en faveur du dépistage sérologique chez la femme enceinte. L'efficacité des mesures d'hygiène chez la femme enceinte CMV séronégative en prévention d'une primo-infection a été démontrée. La connaissance du statut maternel avant ou en début de grossesse est donc importante. Les performances du diagnostic sérologique se sont améliorées ces dernières années, notamment avec les tests d'avidité des IgG et depuis peu l'apport de l'immunoblot pour les cas difficiles à dater. En cas de primo-infection maternelle, le taux de transmission au fœtus est de 30 à 40% et la majorité des cCMV symptomatiques surviennent lorsque la primo-infection a eu lieu au 1<sup>er</sup> trimestre. L'identification d'une primo-infection ainsi que le moment de la séroconversion pendant la grossesse sont importants pour une prise en charge la plus adéquate possible. Un suivi échographique rapproché et la possibilité d'un diagnostic anténatal par ponction amniotique au moment adéquat (à partir de 21 semaines et 6-8 semaines minimum après la primo-infection maternelle) peuvent être proposés. La détection des anomalies échographiques est meilleure lorsque le statut infectieux du fœtus est connu. Certaines séquelles, en particulier la surdité, peuvent apparaître tardivement chez les enfants infectés mais asymptomatiques à la naissance. Il est important de cibler ces enfants à risque et de les diagnostiquer à la naissance de façon à suivre leur audition et   les prendre en charge rapidement. Le dépistage de l'infection maternelle et/ou le screening universel des nouveau-nés permettent de rencontrer cet objectif.

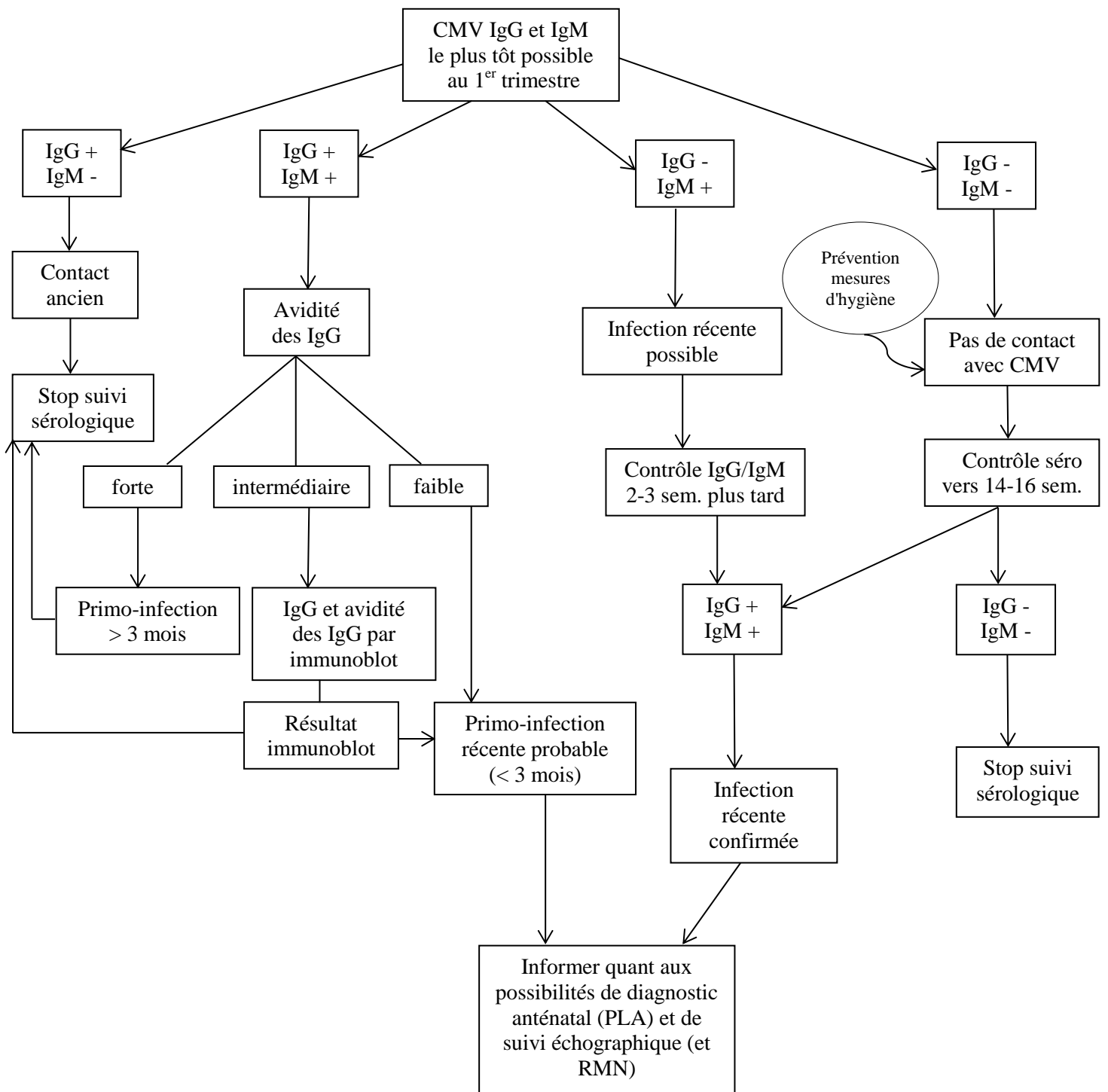
Le cCMV survient à la suite d'une réactivation ou d'une réinfection maternelle dans près de la moitié des cas mais actuellement nous ne disposons pas de moyens diagnostiques de routine de ces infections récurrentes. Cette situation n'est pas un argument pour ne pas dépister les primo-infections.

Dépister ne doit pas être une obligation mais devrait être proposé dans le cadre d'une information systématique donnée aux futurs parents à propos des risques du cCMV, en leur permettant de faire le choix ou non d'un dépistage sérologique maternel.

La situation particulière de la Belgique en termes de remboursement pose question puisque la sérologie CMV pendant la grossesse n'est plus prise en charge par la sécurité sociale à l'exception des cas de suspicion d'infection aigüe. Pour rappel l'impact du cCMV en termes de charge pour la société est aussi important que celui du syndrome de Down, pour lequel le dépistage non invasif est actuellement remboursé par la sécurité sociale pour toutes les femmes enceintes. La charge pour la société du cCMV est 10 fois supérieure à celle de la toxoplasmose congénitale pour laquelle le remboursement de la sérologie maternelle existe également. Restreindre le remboursement de la sérologie CMV aux femmes enceintes qui présentent des symptômes de primo-infection n'identifie qu'une faible proportion des femmes à risque de transmettre car la majorité d'entre elles ne présente pas de symptômes lors de la primo-infection, ou ceux-ci sont peu spécifiques. Les arguments développés en faveur du dépistage pourraient à terme modifier cette décision politique et permettre le suivi optimal dans notre pays de cette infection congénitale.

Dans cette hypothèse l'algorithme suivant pourrait être proposé :





Cet algorithme devrait idéalement être complété par un dépistage sérologique avant la grossesse lorsque c'est possible, et par un contrôle à l'accouchement ou en post-partum immédiat, de façon à identifier les séroconversions du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre. Ce dernier point est sujet à discussion car les études les plus récentes montrent que les séquelles chez l'enfant sont rares lorsque la primo-infection maternelle survient après le 1<sup>er</sup> trimestre.

Quant aux techniques d'immunoblot, une perspective de leur utilisation qui sort du cadre de l'aide au diagnostic de la primo-infection chez la femme enceinte est l'étude de la réponse immunitaire humorale maternelle à l'infection et son impact sur la transmission au fœtus. Plusieurs études sur le sujet ont été publiées, mettant en évidence que la présence d'anticorps neutralisants vis-à-vis de gB et surtout du pentamère de glycoprotéines gH/gL/pUL128-131 est associée à un risque réduit de transmission fœtale (157,158,159,160).

Nous nous sommes posé la question de l'intérêt de l'immunoblot pour étudier la présence ou l'absence d'anticorps maternels vis-à-vis des différentes protéines virales et leur corrélation avec la transmission au fœtus. Dans une étude préliminaire portant sur 31 patientes enceintes avec une primo-infection dont la date est connue pour 15 d'entre elles et inconnue pour 16 d'entre elles (présence d'IgM avec une avidité intermédiaire), nous n'avons pas observé de corrélation entre la présence ou l'absence d'anticorps anti-IE1, CM2, p150, p65 et gB1 et la transmission fœtale. Les anticorps anti-gB2 étaient présents chez 25% des femmes non transmetteuses et absents chez toutes les femmes transmetteuses mais cette différence n'était pas statistiquement significative (253). Une éventuelle implication de la présence d'anti-gB2 sur la transmission fœtale devrait être évaluée sur un nombre plus important de patientes, de façon à tenir compte du moment de l'infection et de l'âge gestationnel au moment de la mesure des anticorps. Une corrélation entre la présence d'anti-gB2 et une transmission fœtale réduite pourrait être simplement le reflet d'une infection antérieure à la grossesse, les anti-gB2 étant absents dans les 6 à 8 semaines après le début de l'infection. Cette corrélation pourrait aussi être due à un parallélisme entre la cinétique des anticorps anti-gB et celle des anticorps neutralisants, comme démontrés par Eggers et al. (160).

En regard des études qui ont montré un lien entre l'augmentation rapide de l'index d'avidité des IgG et la transmission fœtale, une analyse de la cinétique des différents anticorps et la cinétique de l'avidité des IgG vis-à-vis de différents antigènes du CMV et la transmission fœtale est également une perspective intéressante pour cette technique d'immunoblot. Une étude prospective enrôlant des femmes enceintes avec une primo-infection documentée, réalisant un suivi régulier des

anticorps et de leur avidité vis-à-vis des différents antigènes, permettrait de répondre d'une part à la question sur la présence ou l'absence d'anticorps maternels vis-à-vis des différentes protéines virales et leur corrélation avec la transmission au fœtus, et d'autre part à l'impact de la cinétique de ces différents anticorps et de leur avidité dans la transmission fœtale. Cette étude devrait être multicentrique pour obtenir un nombre suffisant de sujets.

De nombreuses questions demeurent dans le domaine du cCMV. Nous nous sommes intéressés aux primo-infections de la femme enceinte, mais les atteintes fœtales survenant après une infection maternelle non primaire sont aussi importantes en termes de santé publique. Les modalités de transmission dans les infections non primaires ne sont pas connues, notamment une éventuelle différence de transmission entre les réactivations endogènes et les réinfections, liée à la protection immunitaire partielle. Les études sur les facteurs de transmission liés à une infection non primaire sont difficiles, car il existe peu de moyens diagnostiques prospectifs de ces infections.

Un vaccin efficace et universel pourrait révolutionner l'approche de la femme enceinte par rapport au cCMV mais, malgré des progrès récents dans le domaine, aucun vaccin n'est actuellement disponible. Le cCMV reste un problème important qu'il faut continuer d'aborder et prendre en charge avec les moyens actuels.

En conclusion, nous avons apporté notre contribution à l'étude des facteurs virologiques prédictifs de transmission fœtale et une amélioration des possibilités de dater la primo-infection chez la femme enceinte. Les recommandations de screening sérologiques des femmes enceintes ou en âge de procréer pourraient évoluer, notamment si des possibilités de prévention ou de traitement de l'infection fœtale sont disponibles. Les recherches dans ce sens continuent (gammaglobulines, antiviraux, vaccin) et les résultats d'études prospectives sont attendus. La perspective d'interventions efficaces dans la prévention et le traitement de l'infection fœtale pourraient mettre le diagnostic sérologique de la primo-infection à CMV à l'avant-plan et dans ce cadre, nos 2 premiers axes de recherche contribuent à l'amélioration de ses performances. Indépendamment de ces avancées probables en termes de traitement et de prévention, l'amélioration de la datation des primo-infections permet dès maintenant une meilleure prise en charge des cas suspects d'infection maternelle en période péri-conceptionnelle et au premier trimestre de la grossesse.

## 5. BIBLIOGRAPHIE

1. Ho M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197: 65–73
2. Roizman B, Baines J. The diversity and unity of *Herpesviridae*. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1991; 14 (2): 63-79
3. Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, McGeoch DJ, Hayward GS. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol* 2003; 84: 17–28
4. Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, Dargan DJ, McGeoch DJ, Gatherer D, Emery VC, Griffiths PD, Sinzger C, McSharry BP, Gavin W. G. Wilkinson GWG, Davison AJ. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2004; 85: 1301–1312
5. Kalejta RF. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72 (2): 249-265
6. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E. The Order *Herpesvirales*. *Arch Virol* 2009; 154(1): 171–177
7. Vanarsdall AL, Johnson DC. Human cytomegalovirus entry into cells. *Curr Opin Virol* 2012; 2(1): 37-42
8. Vanarsdall AL, Howard PW, Wisner TW, Johnson DC. Human Cytomegalovirus gH/gL Forms a Stable Complex with the Fusion Protein gB in Virions. *PLoS Pathog* 2016; 12(4): e1005564
9. Sathiyamoorthy K, Chen J, Longnecker R, Jardetzky TS. The COMPLEXity in herpesvirus entry. *Curr Opin Virol* 2017; 24: 97–104
10. Gerna G, Revello MG, Baldanti F, Percivalle E, Lilleri D. The pentameric complex of human Cytomegalovirus : cell tropism, virus dissemination, immune response and vaccine development. *J Gen Virol* 2017; 98: 2215–2234
11. Cui X, Freed DC, Wang D, Qiu P, Li F, Fu T-M, Kauvar LM, McVoy MA. Impact of Antibodies and Strain Polymorphisms on Cytomegalovirus Entry and Spread in Fibroblasts and Epithelial Cells. *J Virol* 2017; 91(13): 1-17
12. Wu Y, Prager A, Boos S, Resch M, Brizic I, Mach M, Wildner S, Scrivano L, Adler B. Human cytomegalovirus glycoprotein complex gH/gL/gO uses PDGFR- $\alpha$  as a key for entry. *PLoS Pathog* 2017; 13(4): e1006281

13. Chan G, Nogalski MT, Yurochko AD. Activation of EGFR on monocytes is required for human cytomegalovirus entry and mediates cellular motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 29; 106(52): 22369-74.
14. Semblano Carreira Falcão A, da Costa Vasconcelos PF, de Fátima Lobato da Silva D, de Jesus Viana Pinheiro J, Magno Falcão LF, Simões Quaresma JA. Mechanisms of human cytomegalovirus infection with a focus on epidermal growth factor receptor interactions. *Rev Med Virol*. 2017; 27: e1955
15. Feire AL, Roy RM, Manley K, Compton T. The glycoprotein B disintegrin-like domain binds beta 1 integrin to mediate cytomegalovirus entry. *J Virol*. 2010; 84(19): 10026-37.
16. Wang X, Huang DY, Huong SM, Huang ES. Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus. *Nat Med*. 2005; 11(5): 515-21.
17. Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*. 2008; 455(7211): 391-5
18. Martinez-Martin, N.; Marcandalli, J.; Huang, C.S.; Arthur, C.P.; Perotti, M.; Foglierini, M.; Ho, H.; Dosey, A.M.; Shriver, S.; Payandeh, J.; et al. An Unbiased Screen for Human Cytomegalovirus Identifies Neuropilin-2 as a Central Viral Receptor. *Cell* 2018, 174, 1158–1171.
19. Sanchez V, Clark CL, Yen JY, Dwarakanath R, Spector DH. Viable human cytomegalovirus recombinant virus with an internal deletion of the IE2 86 gene affects late stages of viral replication. *J Virol*. 2002; 76(6): 2973-89.
20. Paulus C, Nevels M. The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Proteins as Antagonists of Intrinsic and Innate Antiviral Host Responses. *Viruses* 2009; 1(3): 760-779
21. Crough T, Khanna R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 76–98
22. Kern F, Bunde T, Faulhaber N, Kiecker F, Khatamzas E, Rudawski IM, Pruss A, Gratama JW, Volkmer-Engert R, Ewert R, Reinke P, Volk HD, Picker LJ. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis*. 2002 Jun 15;185(12):1709-16.
23. Gerna G, Lilleri D. Human cytomegalovirus (HCMV) infection/re-infection: development of a protective HCMV vaccine. *New Microbiol*. 2019 Jan;42(1):1-20.
24. Abate DA, Watanabe S, Mocarski ES. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol*. 2004 Oct;78(20):10995-1006.

25. Paulus C, Krauss S, Nevels M. A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 7;103(10):3840-5
26. Tomitschen JP. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology* 2012; 9(22): 1-8
27. Plachter B, Sinzger C, Jahn G. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* 1996; 46: 195-261
28. Mocarski E, Shenk T, Griffiths P, Pass R. 2013. Cytomegaloviruses. In *Fields Virology*. Philadelphia. 1988
29. Gerna G, Lilleri D, Fornara C, Bruno F, Gabanti E, Cane I, Furione M, Revello MG. Differential kinetics of human cytomegalovirus load and antibody responses in primary infection of the immunocompetent and immunocompromised host. *J Gen Virol* 2015; 96: 360-369
30. Zanghellini F, Boppana S, Emery V, Griffiths P, Pass R. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis* 1999; 180: 702-7
31. Cannon MJ, Hyde TB, Schmid DS. Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 2011; 21(4): 240–255
32. Wills MR, Poole E, Lau B, Krishna B, Sinclair JH. The immunology of human cytomegalovirus latency : could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies ? *Nature Cel Mol Immunol* 2015; 12: 128–138
33. Rölle A, Olweus J. Dendritic cells in cytomegalovirus infection: viral evasion and host countermeasures. *APMIS* 2009; 117: 413–26
34. Jackson SE, Mason GM, Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Research* 2011; 157: 151–160
35. Rossini G, Cerboni C, Santoni A, Landini MP, Landolfo S, Gatti D, Gribaudo G, Varani S. Interplay between Human Cytomegalovirus and Intrinsic/Innate Host Responses: A Complex Bidirectional Relationship. *Mediators Inflamm*. 2012; 2012: 607276
36. Hanley PJ, Bollard CM. Controlling Cytomegalovirus: Helping the Immune System Take the Lead. *Viruses* 2014; 6: 2242-2258
37. Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Bergé F, Potaux L, Moreau JF, Déchanet-Merville J. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis*. 2001; 184(5): 533-41

38. Lilleri D, Gerna G. Maternal immune correlates of protection from human cytomegalovirus transmission to the fetus after primary infection in pregnancy. *Rev Med Virol* 2017 Mar; 27(2).
39. Ehlinger EP, Webster EM, Kang HH, Cangialose A, Simmons AC, Barbas KH, Burchett SK, Gregory ML, Puopolo KM, Permar SR Maternal cytomegalovirus-specific immune responses and symptomatic postnatal cytomegalovirus transmission in very low-birth-weight preterm infants. *J Infect Dis.* 2011; 204(11): 1672-82
40. Plachter B. Prospects of a vaccine for the prevention of congenital cytomegalovirus disease. *Med Microbiol Immunol* 2016; 205: 537–547
41. Dauby N, Sartori D, Kummert C, Lecomte S, Haelterman E, Delforge M-L, Donner C, Mach M, Marchant A. Limited Effector Memory B-Cell Response to Envelope Glycoprotein B During Primary Human Cytomegalovirus Infection. *J Inf Dis* 2016; 213: 1642-1650
42. Landini MP, La Placa M. Humoral immune response to human cytomegalovirus proteins : a brief review. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1991; 14: 97-105
43. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2006; 87: 1763-79
44. Collins-McMillen D, Goodrum FD. The Loss of Binary : Pushing the Herpesvirus Latency Paradigm. *Curr Clin Micro Rpt* 2017; 4: 124–131
45. Goodrum F. Human cytomegalovirus latency : approaching the Gordian Knot. *Annu Rev Virol* 2016; 3(1): 333–357
46. Prösch S, Wendt CE, Reinke P, Priemer C, Oppert M, Krüger DH, Volk HD, Döcke WD. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology.* 2000; 272(2): 357-65.
47. Stein J1, Volk HD, Liebenthal C, Krüger DH, Prösch S. Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells. *J Gen Virol.* 1993; 74: :2333-8.
48. Bale JF Jr, Petheram SJ, Souza IE, Murph JR. Cytomegalovirus reinfection in young children. *J Pediatr.* 1996; 128(3): 347-52.
49. Spector SA, Hirata KK, Newman TR. Identification of multiple cytomegalovirus strains in homosexual men with acquired immunodeficiency syndrome. *J Infect Dis.* 1984; 150(6): 953-6.
50. Chou SW. Acquisition of donor strains of cytomegalovirus by renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 1986; 314(22): 1418-23

51. Chandler SH, Handsfield HH, McDougall JK. Isolation of multiple strains of cytomegalovirus from women attending a clinic for sexually transmitted disease. *J Infect Dis.* 1987; 155(4): 655-60.
52. Ishibashi K1, Tokumoto T, Shirakawa H, Hashimoto K, Kushida N, Yanagida T, Shishido K, Aikawa K, Yamaguchi O, Toma H, Tanabe K, Suzutani T. Strain-specific seroepidemiology and reinfection of cytomegalovirus. *Microbes Infect.* 2008; 10(12-13): 1363-9.
53. Trgovcich J, Kincaid M, Thomas A, Griessler M, Zimmerman P, Dwivedi V, Bergdall V, Klenerman P, Cook CH. Reinfections Stimulate CD8 T-Memory Inflation. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0167097.
54. Kaye S, Miles D, Antoine P, Burny W, Ojuola B, Kaye P, Rowland-Jones S, Whittle H, van der Sande M, Marchant A. Virological and Immunological Correlates of Mother-to-Child Transmission of Cytomegalovirus in The Gambia. *J Infect Dis* 2008; 197: 1307–14
55. Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol* 2010; 20: 202–213
56. Hassan J, O'Neill D, Honari B, De Gascun C, Connell J, Keogan M, MD, Hickey D. Cytomegalovirus Infection in Ireland Seroprevalence, HLA Class I Alleles, and Implications. *Medicine* 2016; 95 (6) : 1-4
57. Siennicka J, Dunal-Szczepaniak M, Trzcińska A, Godzik P, Rosińska M. High Seroprevalence of CMV Among Women of Childbearing Age Implicates High Burden of Congenital Cytomegalovirus Infection in Poland. *Pol J Microbio* 2016, 65 (4): 425–432
58. Korndewal MJ, Mollema L, Tcherniaeva I, vanderKlis F, Kroes ACM, Oudesluys-Murphy AM, Vossen ACTM, de Melker HE. Cytomegalovirus infection in the Netherlands : Seroprevalence, risk factors, and implications. *J Clin Virol* 2015; 63: 53–58
59. Antona D, Lepoutre A, Fonteneau L, Baudon C. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in France in 2010. *J Infect Dis* 2017; 145 (7): 1471-1478
60. Enders G, Daiminger A, Lindemann L, Knotek F, Bäder U, Exler S, Enders M. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in pregnant women, bone marrow donors and adolescents in Germany, 1996–2010. *Med Microbiol Immunol* 2012; 201: 303–309
61. Naing ZW, Scott GM, Shand A, Hamilton ST, van Zuylen WJ, Basha J, Hall B, Craig ME, Rawlinson WD. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy: a review of prevalence, clinical features, diagnosis and prevention. *Australian NZJ Obstet Gynaecol* 2016; 56: 9–18
62. Ludwig a, Hengel h. Epidemiological impact and disease burden of congenital cytomegalovirus infection in Europe. *Eurosurveillance* 2009; 14 (9): 26-32
63. Puhakka L, Sarvikivi E, Lappalainen M, Surcel HM, Saxen H. Decrease in seroprevalence for herpesviruses among pregnant women in Finland: cross-sectional study of three time points 1992, 2002 and 2012. *J Infect Dis* 2016; 48 (5): 406-410



64. Leuridan E, Ieven M, Hens N, Van Damme P. High susceptibility to cytomegalovirus infection of pregnant women in Flanders, Belgium. *Facts Views Vis ObGyn*, 2012, 4 (2): 76-81
65. Naessens A, Casteels A, Decatte L, Foulon W. A serologic strategy for detecting neonates at risk for congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 2005; 146: 194-7
66. Kuessel L, Husslein H, Marschalek J, Brunner J, Ristl R, Popow-Kraupp T, Kiss H. Prediction of Maternal Cytomegalovirus Serostatus in Early Pregnancy: A Retrospective Analysis in Western Europe. *PLoS ONE* 2015; 10(12): e0145470
67. Dioverti MV, Razonable RR. Cytomegalovirus. *Microbiol Spectrum* 2016; 4(4): 1-26
68. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 725–38
69. Sissons J G P, Carmichael A J. Clinical Aspects and Management of Cytomegalovirus Infection. *J Infect* 2002; 44: 78 – 83
70. Wreghitt TG1, Teare EL, Sule O, Devi R, Rice P. Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis*. 2003; 37(12): 1603-6
71. Lancini D, Faddy HM, Flower R, Hogan C. Cytomegalovirus disease in immunocompetent adults. *Med J Aust* 2014; 201 (10): 578-580
72. Kotton C, Kumar D, Caliendo A, Huprikar S, Chou S, Danziger-Isakov L, Humar A. The third international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation* 2018; 102: 900-931
73. Friedman HM, Koropchak C. Comparison of WI-38, MRC-5, and IMR-90 cell strains for isolation of viruses from clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1978; (4): 368-71.
74. Razonable R, Paya C, Smith T. Role of the Laboratory in Diagnosis and Management of Cytomegalovirus Infection in Hematopoietic Stem Cell and Solid-Organ Transplant Recipients. *J Clin Microbiol* 2002; 40(3): 746-52
75. Halwachs-Baumann G. Recent developments in human cytomegalovirus diagnosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5(3): 427-439.
76. Eguchi H, Horita N, Ushio R, Kato I, Nakajima Y, Ota E, Kaneko T. Diagnostic test accuracy of antigenemia assay for polymerase chain reaction proven cytomegalovirus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23(12): 907-915
77. Atkinson C, Emery VC. Cytomegalovirus quantification: Where to next in optimising patient management ? *J Clin Virol* 2011; 51: 219– 224
78. Engelmann I, Alidjinou EK, Lazrek M, Ogiez J, Pouillaude JM, Chazard E, Dewilde A, Hober D. Comparison of two commercial quantitative PCR assays and correlation with the first WHO International Standard for human CMV. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018; 91: 27-33

79. Fryer J, Heath A, Minor P, the collaborative study group. A collaborative study to establish the 1<sup>st</sup> WHO international Standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals* 2016; 44: 242-251
80. De Paschale M, Agrappi C, Manco MT, Clerici P. Positive predictive value of anti-HCMV IgM as an index of primary infection. *J Virol Methods* 2010; 168: 121–125
81. Revello MG, and Gerna G. Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15 (4): 680–715
82. Prince HE, Lapé-Nixon M. Role of Cytomegalovirus (CMV) IgG Avidity Testing in Diagnosing Primary CMV Infection during Pregnancy. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21(10): 1377–1384
83. Boppana SB, Fowler KB, Britt WJ, Stagno S, Pass RF. Symptomatic Congenital Cytomegalovirus Infection in Infants Born to Mothers With Preexisting Immunity to Cytomegalovirus. *Pediatrics* 1999; 104: 55– 60
84. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Boppana SB, Novak Z, Wagatsuma VM, de Frizzo Oliveira P, Duarte G, Britt WJ. Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202: 297.e1-8
85. Puhakkaa L, Renkob M, Helminenc M, Peltolad V, Heiskanen-Kosmae T, Lappalainenf M, Surcelg HM, Lonnqvisth T, Saxeni H. Primary versus non-primary maternal cytomegalovirus infection as a cause of symptomatic congenital infection – register-based study from Finland. *Infect Dis* 2017; 49(6): 445-453
86. Leruez-Ville M, Magny J-F, Couderc S, Pichon C, Parodi M, Bussièrès L, Guilleminot T, Ghout I, Ville Y. Risk Factors for Congenital Cytomegalovirus Infection Following Primary and Nonprimary Maternal Infection : A Prospective Neonatal Screening Study Using Polymerase Chain Reaction in Saliva. *Clin Infect Dis* 2017; 65(3): 398–404
87. Hadar E, Dorfman E, Bardin R, Gabbay-Benziv R, Amir J, Pardo J. Symptomatic congenital cytomegalovirus disease following non-primary maternal infection: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2017; 17(1): 31
88. Yamada H, Tanimura K, Tairaku S, Morioka 3, Deguchi M, Morizane M, Nagamata S, Ozaki K, Ebina Y, Minematsu T. Clinical factor associated with congenital cytomegalovirus infection in pregnant women with non-primary infection. *J Infect Chemother.* 2018; 24(9): 702-706.
89. Townsend CL, Forsgren M, Ahlfors K, Ivarsson SA, Tookey PA, Peckham CS. Long-term Outcomes of Congenital Cytomegalovirus Infection in Sweden and the United Kingdom. *Clin Infect Dis* 2013; 56(9): 1232–9
90. Giannattasio A, Di Costanzo P, De Matteis A, Milite P, De Martino D, Bucci L, Augurio MR, Bravaccio C, Ferrara T, Capasso L, Raimondi F. Outcomes of congenital cytomegalovirus disease following maternal primary and non-primary infection. *J Clin Virol* 2017; 96: 32–36

91. Stagno S, Pass RF, Dworsky ME, Henderson RE, Moore EG, Walton PD, Alford CA. Congenital Cytomegalovirus infection. The Relative Importance of Primary and Recurrent Maternal Infection. *N Engl J Med.* 1982; 306: 945-9
92. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 2007; 17: 355–363
93. Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007; 17: 253–276
94. van Zuylen WJ, Hamilton ST, Naing Z, Hall B, Shand A, Rawlinson WD. Congenital cytomegalovirus infection : Clinical presentation, epidemiology, diagnosis and prevention. *Obstet Med* 2014; 7(4): 140–146
95. de Vries JJC, van Zwet EW, Dekker FW, Kroes ACM, Verkerk PH , Vossen ACTM. The apparent paradox of maternal seropositivity as a risk factor for congenital cytomegalovirus infection : a population-based prediction model. *Rev Med Virol* 2013; 23: 241–249
96. Boppana SB, Rivera LB, Fowler KB, Mach M, Britt WJ. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med* 2001;344(18): 1366-71.
97. Picone O, Vauloup-Fellous C, Cordier AG, Guitton S, Senat MV, Fuchs F, Ayoubi JM, Grangeot Keros L, Benachi A. A series of 238 cytomegalovirus primary infections during pregnancy: description and outcome. *Prenat Diag* 2013; 33: 751–758
98. Liesnard C, Donner C, Brancart F, Gosselin F, Delforge ML, Rodesch F. Prenatal Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection : Prospective Study of 237 Pregnancies at Risk. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 881– 8
99. Revello MG, Fabbri E, Furione M, Zavattoni M, Lilleri D, Tassis B, Quarenghi A, Cena C, Arossa A, Montanaria L, Rognoni V, Spinillo A, Gernad G. Role of prenatal diagnosis and counseling in the management of 735 pregnancies complicated by primary human cytomegalovirus infection : A 20-year experience. *J Clin Virol* 2011; 50: 303–307
100. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Enders M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol* 2011; 52: 244– 246
101. Bodeus M, Kabamba-Mukadi B, Zech F, Hubinont C, Bernard P. Human cytomegalovirus in utero transmission : Follow-up of 524 maternal seroconversions. *J Clin Virol* 2010; 47: 201–202
102. Hyde TB, Schmid DS and Cannon MJ. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: implications for congenital CMV. *Rev Med Virol* 2010; 20: 311–326
103. Gaytant MA1, Steegers EA, Semmekrot BA, Merkus HM, Galama JM. Congenital cytomegalovirus infection: review of the epidemiology and outcome. *Obstet Gynecol Surv.* 2002; 57(4): 245-56

104. Francisse S, Revelard P, De Maertelaer V, Strebelle E, Englert Y, Liesnard C. Human Cytomegalovirus Seroprevalence and Risk of Seroconversion in a Fertility Clinic Population. *Obstet Gynecol* 2009; 114: 285–91
105. Vauloup-Fellous C, Picone O, Cordier A-G, Parent-du-Châtelet I, Senat M-V, Frydman R, Grangeot-Keros L. Does hygiene counseling have an impact on the rate of CMV primary infection during pregnancy? Results of a 3-year prospective study in a French hospital. *J Clin Virol* 2009; 46S: S49–S53
106. Revello MG, Tibaldi C, Masuelli G, Frisina V, Sacchi A, Furione M, Arossa A, Spinillo A, Klersy C, Ceccarelli M, Gerna G, Todros T. Prevention of Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy. *EBioMedicine* 2015; 2: 1205–1210
107. Itell HL, Nelson CS, Martinez DR, Permar SR. Maternal immune correlates of protection against placental transmission of cytomegalovirus. *Placenta*. 2017; 60 Suppl 1: S73-S79.
108. Muller WJ1, Jones CA, Koelle DM. Immunobiology of herpes simplex virus and cytomegalovirus infections of the fetus and newborn. *Curr Immunol Rev*. 2010; 6(1):38-55.
109. Weisblum Y1, Panet A, Haimov-Kochman R, Wolf DG. Models of vertical cytomegalovirus (CMV) transmission and pathogenesis. *Semin Immunopathol*. 2014; 36(6): 615-25.
110. Pereira L, Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J. Congenital cytomegalovirus infection undermines early development and functions of the human placenta. *Placenta*. 2017; 59 Suppl 1: S8-S16.
111. Nigro G. Hyperimmune globulin in pregnancy for the prevention of congenital cytomegalovirus disease. *Expert Review Of Anti-Infective Therapy* 2017; 15(11): 977–986
112. Cheeran MC1, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(1): 99-126
113. Schleiss MR. Congenital Cytomegalovirus Infection: Molecular Mechanisms Mediating Viral Pathogenesis. *Infect Disord Drug Targets* 2011; 11(5): 449–465
114. Kawasaki H, Kosugi I, Meguro S, Iwashita T. Pathogenesis of developmental anomalies of the central nervous system induced by congenital cytomegalovirus infection. *Pathol Int* 2017; 67: 72–82
115. Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital Cytomegalovirus Infection: Clinical Outcome. *Clin Infect Dis* 2013; 57(S4): S178–81
116. Averill LW, Kandula VVR, Akyol Y, Epelman M. Fetal Brain Magnetic Resonance Imaging Findings In Congenital Cytomegalovirus Infection With Postnatal Imaging Correlation. *Semin Ultrasound CT MRI* 2015; 36(6): 476–486
117. Noyola DE, María E. Jiménez-Capdeville ME, Gail J. Demmler-Harrison GJ. Central nervous system disorders in infants with congenital cytomegalovirus infection. *Neurol Res* 2010; 32(3): 278-284

118. Kagan KO, Hamprecht K. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2017; 296: 15–26
119. Bartlett AW, McMullan B, Rawlinson WD, Palasanthiran P. Hearing and neurodevelopmental outcomes for children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection: A systematic review. *Rev Med Virol* 2017; 27: e1938
120. Nigro G, Anceschi MM, Cosmi EV, The Congenital Cytomegalic Disease Collaborating Group. Clinical manifestations and abnormal laboratory findings in pregnant women with primary cytomegalovirus infection. *BJOG* 2003; 110: 572–577
121. Rawlinson WD, Boppana SB, Fowler KB, Kimberlin DW, Lazzarotto T, Alain S, Daly K, Doutré S, Gibson L, Giles ML, Greenlee J, Hamilton ST, Harrison GJ, Hui L, Jones CA, Palasanthiran P, Schleiss MR, Shand AW, van Zuylen WJ. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: e177–88
122. KCE report 248Bs 2015. Good clinical practice. Quels sont les examens recommandés pendant la grossesse?  
[https://kce.fgov.be/sites/default/files/atoms/files/KCE\\_248Bs\\_examens\\_recommand%C3%A9s\\_pendant\\_grossesse\\_Synthese.pdf](https://kce.fgov.be/sites/default/files/atoms/files/KCE_248Bs_examens_recommand%C3%A9s_pendant_grossesse_Synthese.pdf)
123. Mace M, Sissoeff L, Rudent A, Grangeot-Keros L. A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *Prenat Diagn* 2004; 24: 861–863
124. Saldan A, Forner G, Mengoli C, Gussetti N, Palù G, Abate D. Testing for cytomegalovirus in pregnancy. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 693–702
125. Pass R, Arav-Boger R. Maternal and fetal cytomegalovirus infection: diagnosis, management and prevention. *F1000Res*. 2018; 7: 255
126. Lazzarotto T, Varani S, Guerra B, Nicolosi A, Lanari M, Landini MP. Prenatal indicators of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 2000; 137: 90-5
127. Bodeus M, Feyder S, Goubau P. Avidity of IgG antibodies distinguishes primary from non-primary cytomegalovirus infection in pregnant women. *Clin Diag Virol* 1998; 9: 9–16
128. Lagrou K, Bodeus M, Van Ranst M, Goubau P. Evaluation of the New Architect Cytomegalovirus Immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgG Avidity Assays. *J Clin Microbiol* 2009; 47 (6): 1695–1699
129. Berth M, Grangeot-Keros L, Heskia F, Dugua JM, Vauloup-Fellous C. Analytical issues possibly affecting the performance of commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 1579–1584
130. Sellier Y, Guilleminot T, Ville Y, Leruez-Ville M. Comparison of the LIAISON® CMV IgG Avidity II and the VIDAS® CMV IgG Avidity II assays for the diagnosis of primary infection in pregnant women. *J Clin Virol* 2015; 72: 46–48
131. Dangel V, Bäder U, Enders G. Improvement of cytomegalovirus avidity testing by adjusting the concentration of CMV-specific IgG in test samples. *J Clin Virol* 2006; 35: 303–309

132. Chiereghin A, Pavia C, Gabrielli L, Piccirilli G, Squarzone D, Turello G, Gibertoni D, Simonazzi G, Capretti MG, Lanari M, Lazzarotto T. Clinical evaluation of the new Roche platform of serological and molecular cytomegalovirus-specific assays in the diagnosis and prognosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Virol Methods* 2017; 248: 250–254
133. Revello MG, Gerna G. Maternal, fetal and neonatal diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection, *Expert Opin Med Diagn* 2008; 2(5): 547-563
134. Bodeus M, Beulné D, Goubau P. Ability of Three IgG-Avidity Assays to Exclude Recent Cytomegalovirus Infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 248–252
135. Revello MG, Genini E, Gorini G, Klersy C, Piralla A, Gerna G. Comparative evaluation of eight commercial human cytomegalovirus IgG avidity assays. *J Clin Virol* 2010; 48: 255–259
136. Vauloup-Fellous C, Lazzarotto T, Revello MG, Grangeot-Keros L. Clinical evaluation of the Roche Elecsys® CMV IgG Avidity assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 1365–1369
137. Maine GT, Stricker R, Stricker R. Kinetics of CMV seroconversion in a Swiss pregnant women population. *Diag Microbiol Infect Dis* 2012; 73: 275–277
138. Lumley S, Patel M, Griffiths PD. The Combination of Specific IgM Antibodies and IgG Antibodies of Low Avidity Does not Always Indicate Primary Infection with Cytomegalovirus. *J Med Virol* 2014; 86: 834–837
139. Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L1, Lanari M, Landini MP. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1285–1293
140. Picone O, Grangeot-Keros L, Senat MV, Fuchs F, Bouthry E, Ayoubi JM, Benachi A, Vauloup-Fellous C. Cytomegalovirus non-primary infection during pregnancy. Can serology help with diagnosis? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017; 30(2): 224–227
141. Simonazzi G, Curti A, Cervi F, Gabrielli L, Contoli M, Capretti MG, Rizzo N, Guerra N, Farina A, Lazzarotto T. Perinatal Outcomes of Non-Primary Maternal Cytomegalovirus Infection : A 15-Year Experience. *Fetal Diagn Ther* 2018; 43(2): 138-142
142. Feldman B, Yinon Y, Tepperberg Oikawa M, et al. Pregestational, periconceptional, and gestational primary maternal cytomegalovirus infection : prenatal diagnosis in 508 pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 205: 342.e1-6
143. Daiminger A, Bäder U, Enders G. Pre- and periconceptional primary cytomegalovirus infection : risk of vertical transmission and congenital disease. *BJOG* 2005; 112: 166–172
144. Hadar E, Yogev Y, Melamed N, Chen R, Amir J, Pardo J. Periconceptional cytomegalovirus infection : pregnancy outcome and rate of vertical transmission. *Prenat Diagn* 2010; 30: 1213–1216

145. Zavattoni M, Furione M, Lanzarini P, Arossa A, Rustico M, Tassis B, Piralla A, Baldanti F. Monitoring of human cytomegalovirus DNAemia during primary infection in transmitter and non-transmitter mothers. *J Clin Virol* 2016; 82: 89–93
146. Leruez-Ville M, Sellier Y, Salomon LJ, Stirnemann JJ, Jacquemard F, Ville Y. Prediction of Fetal Infection in Cases With Cytomegalovirus Immunoglobulin M in the First Trimester of Pregnancy: A Retrospective Cohort. *Clin Infect Dis* 2013; 56(10): 1428–35
147. Forner G, Saldan A, Mengoli C, Gussetti N, Palù G, Abatea D. Cytomegalovirus (CMV) Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay but Not CMV QuantiFERON Assay Is a Novel Biomarker To Determine Risk of Congenital CMV Infection in Pregnant Women. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 2149–2154
148. Tanimura K, Tairaku S, Ebina Y, Morioka I, Nagamata S, Deguchi K, Morizane M, Deguchi M, Minematsu T, Yamada H. Prediction of Congenital Cytomegalovirus Infection in High-Risk Pregnant Women. *Clin Infect Dis* 2017; 64(2): 159–65
149. Bodeus M, Goubau P. Predictive value of maternal-IgG avidity for congenital human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 1999; 12: 3–8
150. Furione M, Rognoni V, Sarasini A, Zavattoni M, Lilleri D, Gerna G, Revello MG. Slow Increase in IgG Avidity Correlates With Prevention of Human Cytomegalovirus Transmission to the Fetus. *J Med Virol* 2013; 85: 1960–1967
151. Ebina Y, Minematsu T, Sonoyama A, Morioka I, Inoue N, Tairaku S, Nagamata S, Tanimura K, Morizane M, Deguchi M, Yamada H. The IgG avidity value for the prediction of congenital cytomegalovirus infection in a prospective cohort study. *J Perinat Med* 2014; 42(6): 755–759
152. Ebina Y, Minematsu T, Morioka I, Deguchi M, Tairaku S, Tanimura K, Sonoyama A, Nagamata S, Morizane M, Yamada H. Rapid increase in the serum Cytomegalovirus IgG avidity index in women with a congenitally infected fetus. *J Clin Virol* 2015; 66: 44–47
153. Stern H, Hannington G, Booth J, Moncrieff D. An early marker of fetal infection after primary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Br Med J* 1986; 292(6522): 718-20.
154. Revello MG, Lilleri D, Zavattoni M, Furione M, Genini E, Comolli G, Gerna G. Lymphoproliferative response in primary human cytomegalovirus (HCMV) infection is delayed in HCMV transmitter mothers. *J Infect Dis.* 2006; 193(2): 269-76.
155. Fornara C, Furione M, Arossa A, Gerna G, Lilleri D. Comparative magnitude and kinetics of human cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses in pregnant women with primary versus remote infection and in transmitting versus non-transmitting mothers: Its utility for dating primary infection in pregnancy. *J Med Virol.* 2016; 88(7): 1238-46.
156. Schleiss MR. Cytomegalovirus in the Neonate: Immune Correlates of Infection and Protection. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 501801
157. Lilleri D, Kabanova A, Revello MG, Percivalle E, Sarasini A, Genini E, Sallusto F, Lanzavecchia A, Corti D, Gerna G. Fetal Human Cytomegalovirus Transmission Correlates

with Delayed Maternal Antibodies to gH/gL/pUL128-130-131 Complex during Primary Infection. PLoS ONE 2013; 8(3): e59863

158. Alford CA, Hayes K, Britt W. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy: comparison of antibody responses to virus-encoded proteins between women with and without intrauterine infection. *J Infect Dis.* 1988; 158(5): 917-24.
159. Boppana SB, Britt WJ. Antiviral Antibody Responses and Intrauterine transmission after Primary Maternal Cytomegalovirus Infection. *J Infect Dis* 1995; 171(5): 1115-1121
160. Eggers M, Radsak K, Enders G, Reschke M. Use of Recombinant Glycoprotein Antigens gB and gH for Diagnosis of Primary Human Cytomegalovirus Infection During Pregnancy. *J Med Virol* 2001; 63: 135- 42
161. Guerra B, Simonazzi G, Puccetti C, Lanari M, Farina A, Lazzarotto T, Rizzo N. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198(4): 380.e1-7
162. Lipitz S, Hoffmann C, Feldman B, Tepperberg-Dikawa M, Schiff E, Weisz B. Value of prenatal ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of congenital primary cytomegalovirus infection. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2010; 36: 709–717
163. Akolekar R1, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jan; 45(1): 16-26.
164. Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM), Hughes BL, Gyamfi-Bannerman C. Diagnosis and antenatal management of congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214: B5-B11
165. Enders M, Daiminger A, Exler S, Ertan K, Enders G. Amniocentesis for prenatal diagnosis of cytomegalovirus infection : challenging the 21 weeks' threshold. *Prenatal Diagn* 2017; 37: 940–942
166. Enders M , Daiminger A, Exler S, Ertan K, Enders G, Bald R. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 115 cases : a 5 years' single center experience. *Prenat Diagn* 2017; 37: 389–398
167. Lazzarotto T, Guerra B, Lanari M, Gabrielli L, Landini MP. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2008; 41: 192–197
168. Ducroux A, Cherid S, Benachi A, Ville Y, Leruez-Ville M. Evaluation of New Commercial Real-Time PCR Quantification Assay for Prenatal Diagnosis of Cytomegalovirus Congenital Infection. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (6): 2078–2080
169. Berry SM, Stone J, Norton ME, Johnson D, Berghella V, Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM). Fetal blood sampling. *Am J Obstet Gynecol* 2013; 209(3): 170-80



170. Donner C, Simon P, Karioun A, Avni F, Rodesch F. Experience of a single team of operators in 891 diagnostic funipunctures. *Obstet Gynecol.* 1994; 84(5): 827-31.
171. Benoist G, Salomon LJ, Jacquemard F, Daffos F, Ville Y. The prognostic value of ultrasound abnormalities and biological parameters in blood of fetuses infected with cytomegalovirus. *BJOG* 2008; 115: 823–829
172. Malinger G, Lev D, Lerman-Sagie T. Imaging of Fetal Cytomegalovirus Infection. *Fetal Diagn Ther* 2011; 29: 117–126
173. Picone O, Simon I, Benachi A, Brunelle F, Sonigo P. Comparison between ultrasound and magnetic resonance imaging in assessment of fetal cytomegalovirus infection. *Prenat Diagn* 2008; 28: 753–758
174. Cannie MM, Devlieger R, Leyder M, Claus F, Leus A, De Catte L, Cossey V, Foulon I, Van der valk E, Foulon W, Cos T, Bernaert A, Oyen R, Jani JC. Congenital cytomegalovirus infection: contribution and best timing of prenatal MR imaging. *Eur Radiol.* 2016; 26(10): 3760-9
175. Leruez-Ville M, Ville Y. Fetal cytomegalovirus infection. *Best Practice & Res Clin Obstet Gynaecol* 2017; 38: 97-107
176. Fabbri E, Revello MG, Furione M, Zavattoni M, Lilleri D, Tassis B, Quarenghi A, Rustico M, Nicolini U, Ferrazzi E, Gerna G. Prognostic markers of symptomatic congenital human cytomegalovirus infection in fetal blood. *BJOG* 2011; 118: 448–456
177. Leruez-Ville M, Stirnemann J, Sellier Y, Guilleminot T, Dejean A, Magney JF, Couderc S, Jacquemard F, Ville Y. Feasibility of predicting the outcome of fetal infection with cytomegalovirus at the time of prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215: 342e1-9
178. Revello MG, Zavattoni M, Baldanti F, Sarasini A, Paolucci S, Gerna G. Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus load and IgM antibody in blood of congenitally infected newborns. *J Clin Virol* 1999; 14: 57–66
179. Enders G, Bäder U, Lindemann L, Schalasta G, Daiminger A. Prenatal diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in 189 pregnancies with known outcome. *Prenat Diagn.* 2001; 21(5): 362-77.
180. Goegebuer T, Van Meensel B, Beuselinck K, Cossey V, Van Ranst M, Hanssens M, Lagrou K. Clinical Predictive Value of Real-Time PCR Quantification of Human Cytomegalovirus DNA in Amniotic Fluid Samples. *J Clin Microbiol* 2009; 47 (3): 660–665
181. Picone O, Costa JM, Leruez-Ville M, Ernault P, Olivi M, Ville Y. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotype and CMV DNA load in the amniotic fluid of infected fetuses. *Prenat Diagn.* 2004; 24(12): 1001-6.
182. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of Human Cytomegalovirus DNA in Amniotic Fluid of Mothers of Congenitally Infected Fetuses. *J Clin Microbiol* 1999; 37(10): 3350–3352

183. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, Lanari M, Bovicelli L, Nicolosi A, Landini MP. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(2): 476-82
184. Gouarin S, Gault E, Vabret A, Cointe D, Rozenberg F, Grangeot-Keros L, Barjot P, Garbarg-Chenon A, Lebon P, Freymuth F. Real-Time PCR Quantification of Human Cytomegalovirus DNA in Amniotic Fluid Samples from Mothers with Primary Infection. *J Clin Microbiol* 2002, 40(5): 1767–1772
185. Bilavsky E, Pardo J, Attias J, Levy I, Magny J-F, Ville Y, Leruez-Ville M, Amir J. Clinical Implications for Children Born With Congenital Cytomegalovirus Infection following a Negative Amniocentesis. *Clin Infect Dis* 2016; 63(1): 33–8
186. Desveaux C, Klein J, Leruez-Ville M, Ramirez-Torres A, Lacroix C, Breuil B, Froment C, Bascands JL, Schanstra JP, Ville Y. Identification of Symptomatic Fetuses Infected with Cytomegalovirus Using Amniotic Fluid Peptide Biomarkers. *PLoS Pathog* 2016; 12(1): 1-21
187. Fattuoni C, Palmas F, Noto A, Barberini L, Mussap M, Grapov D, Dessì A, Casu M, Casanova A, Furione M, Arossa A, Spinillo A, Baldanti F, Fanos V, Zavattoni M. Primary HCMV infection in pregnancy from classic data towards metabolomics: An exploratory analysis. *Clinica Chimica Acta* 2016; 460 : 23–32
188. Nigro G, Adler SP, La Torre R, Best M. Passive Immunization during Pregnancy for Congenital Cytomegalovirus Infection. *N Engl J Med* 2005; 353: 1350-62
189. Revello MG, Lazzarotto T, Guerra B, Spinillo A, Ferrazzi E, Kustermann A, Guaschino S, Vergani P, Todros T, Frusca T, Arossa A, Furione M, Rognoni V, Rizzo N, Gabrielli L, Klersy C, Gerna G. A Randomized Trial of Hyperimmune Globulin to Prevent Congenital Cytomegalovirus. *N Engl J Med* 2014; 370: 1316-26
190. Revello MG, Fornara C, Arossa A, Zelini P, Lilleri D. Role of human cytomegalovirus (HCMV)-specific antibody in HCMV-infected pregnant women. *Early Hum Dev* 2014; 90(S1): S32–S34
191. Hamilton ST, van Zuylen W, Shand A, Scott GM, Naing Z, Hall B, Craig ME, Rawlinson WD. Prevention of congenital cytomegalovirus complications by maternal and neonatal treatments : a systematic review. *Rev Med Virol* 2014; 24: 420–433
192. Minsart AF, Smiljkovic M, Renaud C, Gagné MP, Lamarre V, Kakkar F, Boucher M, Boucoiran I. Use of Cytomegalovirus-Specific Hyperimmunoglobulins in Pregnancy: A Retrospective Cohort. *J Obstet Gynaecol Can.* 2018; 40(11): 1409-1416
193. Blázquez-Gamero D, Galindo Izquierdo A, Del Rosal T, Baquero-Artigao F, Izquierdo Méndez N, Soriano-Ramos M, Rojo Conejo P, González-Tomé MI, García-Burguillo A, Pérez Pérez N, Sánchez V, Jose Ramos-Amador T, De la Calle M. Prevention and treatment of fetal cytomegalovirus infection with cytomegalovirus hyperimmune globulin: a multicenter study in Madrid. *J Maternal-Fetal Neonat Med* 2019; 32(4): 617-625
194. Visentin S, Manara R, Milanese L, Da Roit A, Forner G, Salviato E, Citton V, Marciani Magno F, Orzan E, Morando C, Cusinato R, Mengoli C, Palu G, Ermani M, Rinaldi R, Cosmi E, Gussetti N. Early Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnancy : Maternal

- Hyperimmunoglobulin Therapy Improves Outcomes Among Infants at 1 Year of Age. *Clin Infect Dis* 2012; 55(4): 497–503
195. Khalil A, Jones C, Ville Y. Congenital cytomegalovirus infection : management update. *Curr Opin Infect Dis* 2017; 30(3): 274-280.
196. Leruez-Ville M., Ville Y. Optimum treatment of congenital cytomegalovirus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016; 14(5): 479-88
197. Seidel V, Feiterna-Sperling C, Siedentopf JP, Hofmann J, Henrich W, Bühner C, Weizsäcker K. Intrauterine therapy of cytomegalovirus infection with valganciclovir : review of the literature. *Med Microbiol Immunol* 2017; 206: 347–354
198. Leruez-Ville M, Ghout I, Bussièeres L, Stirnemann J, Magny JF, Couderc S, Salomon LJ, Guillemainot T, Aegerter P, Benoist G, Winer N, Picone O, Jacquemard F, Ville Y. In utero treatment of congenital cytomegalovirus infection with valacyclovir in a multicenter, open-label, phase II study. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215: 462.e1-10
199. Pass RF1, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang ML, Corey L, Hill J, Davis E, Flanigan C, Cloud G. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 2009; 360(12): 1191-9.
200. Adler SP. Immunization to prevent congenital cytomegalovirus infection. *Br Med Bull* 2013; 107: 57-68
201. Wang D, Fu TM. Progress on human cytomegalovirus vaccines for prevention of congenital infection and disease. *Curr Opin Virol* 2014; 6: 13–23
202. Griffiths PD. Cytomegalovirus vaccine: timing is important. *Rev Med Virol* 2018; 28(4): e1986.
203. de Vries JJC, van der Eijk AA, Wolthers KC, Rusman LG, Pas SD, Molenkamp R, Claas EC, Kroes ACM, Vossen ACTM. Real-time PCR versus viral culture on urine as a gold standard in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2012; 53 : 167– 170
204. Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, Sánchez PJ, Bernstein DI, Tolan Jr RW, Novak Z, Chowdhury N, J. Britt WJ, Fowler KB. Saliva Polymerase-Chain-Reaction Assay for Cytomegalovirus Screening in Newborns. *N Engl J Med* 2011; 364(22): 2111–2118
205. Ross SA, Ahmed A, Palmer AL, Michaels MG, Sánchez PJ, Bernstein DI, Tolan Jr RW, Novak Z, Chowdhury N, Fowler KB, Boppana SB. Detection of Congenital Cytomegalovirus Infection by Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Saliva or Urine Specimens. *J Infect Dis* 2014; 210(9): 1415–8
206. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, Moura Brito R, Frizzo Carvalho Oliveira P, Bonadio Coelho T. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection ? *J Clin Virol* 2006; 36: 228–230

207. Pinninti SG, Ross SA, Shimamura M, Novak Z, Palmer AL, Ahmed A, Tolan Jr RW, Bernstein DI, Michaels MG, Sánchez PJ, Fowler KB, Boppana SB. Comparison of Saliva PCR Assay versus Rapid Culture for Detection of Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatr Infect Dis J* 2015; 34(5): 536–537
208. Kadambari S, Williams EJ, Luck S, Griffiths PD, Sharland M. Evidence based management guidelines for the detection and treatment of congenital CMV. *Early Human Develop* 2011; 87: 723–728
209. Barkai G, Ari-Even Roth D, Barzilai A, Tepperberg-Oikawad M, Mendelson E, Hildesheimer M, Kuint J. Universal neonatal cytomegalovirus screening using saliva – Report of clinical experience. *J Clin Virol* 2014; 60: 361–366
210. Ross SA, Michaels MG, Ahmed A, Palmer AL, Sánchez PJ, Bernstein DI, Feja K, Stewart A, Boppana SB, Fowler KB. Contribution of Breastfeeding to False-Positive Saliva Polymerase Chain Reaction for Newborn Congenital Cytomegalovirus Screening. *J Infect Dis* 2018; 217(10): 1612-1615
211. Luck SE, Wieringa JW, Blázquez-Gamero D, Henneke P, Schuster K, Butler K, Capretti MG, Cilleruelo MJ, Curtis N, Garofoli F, Heath P, Iosifidis E, Klein N, Lombardi G, Lyall H, Nieminen T, Pajkrt D, Papaevangelou V, Posfay-Barbe K, Puhakka L, Roilides E, Rojo P, Saavedra-Lozano J, Shah T, Sharland M, Saxen H, Vossen ACTM; ESPID Congenital CMV Group Meeting, Leipzig 2015. Congenital Cytomegalovirus: A European Expert Consensus Statement on Diagnosis and Management. *Pediatr Infect Dis J.* 2017; 36(12): 1205-1213
212. Boppana SB, Ross SA, Novak Z, Shimamura M, Tolan Jr RW, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, Sánchez PJ, Bernstein DI, Britt WJ, Fowler KB. Dried Blood Spot Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays To Screen Newborns For Congenital Cytomegalovirus Infection. *JAMA* 2010; 303(14): 1375–1382
213. de Vries JJC, Claas ECJ, Kroes ACM, Vossen ACTM. Evaluation of DNA extraction methods for dried blood spots in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2009; 46S: S37–S42
214. Wang L, Xu X, Zhang H, Qian J, Zhu J. Dried blood spots PCR assays to screen congenital cytomegalovirus infection: a meta-analysis. *Virol J* 2015; 12:60
215. James SH, Kimberlin DW. Advances in the Prevention and Treatment of Congenital Cytomegalovirus Infection. *Curr Opin Pediatr* 2016; 28(1): 81–85
216. Mareri A, Lasorella S, Iapadre G, Maresca M, Tambucci R, Nigro G. Anti-viral therapy for congenital cytomegalovirus infection: pharmacokinetics, efficacy and side effects. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016; 29(10): 1657–1664
217. Ziv L, Yacobovich J, Pardo J, Yarden-Bilavsky H, Amir J, Osovsky M, Bilavsky E. Hematologic Adverse Events Associated with Prolonged Valganciclovir Treatment in Congenital Cytomegalovirus Infection. *Pediatr Infect Dis J.* 201; 38(2): 127-130
218. Vauloup-Fellous C, Berth M, Heskia F, Dugua J-M, Grangeot-Keros L. Re-evaluation of the VIDAS® cytomegalovirus (CMV) IgG avidity assay : Determination of new cut-off values based on the study of kinetics of CMV–IgG maturation. *J Clin Virol* 2013; 56: 118– 123

219. Enders G, Daiminger A, Bäder U, Exler S, Schimpf Y, Enders M. The value of CMV IgG avidity and immunoblot for timing the onset of primary CMV infection in pregnancy. *J Clin Virol* 2013; 56: 102– 107
220. Manicklal S, Emery VC, Lazzarotto T, Boppana SB, Gupta RK. The “Silent” Global Burden of Congenital Cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26: 86–102
221. Lanzieri TM, Dollard SC, Bialek SR, Grosse SD. Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *Int J Infect Dis.* 2014; 22 : 44–48
222. Smit GSA, Padalko E, Van Acker J, Hens N, Dorny P, Speybroeck N, Devleeschauwer B. Public Health Impact of Congenital Toxoplasmosis and Cytomegalovirus Infection in Belgium, 2013: A Systematic Review and Data Synthesis. *Clin Infect Dis* 2017; 65(4): 661-668
223. Avis du Conseil Supérieur de la Santé n°9262 : La problématique du cytomegalovirus chez la femme enceinte. Novembre 2015.
224. Johnson JM, Anderson BL. Cytomegalovirus: Should We Screen Pregnant Women for Primary Infection ? *Am J Perinatol* 2013; 30: 121–124
225. Walker SP, Palma-Dias R, Wood EM, Shekleton P, Giles ML. Cytomegalovirus in pregnancy: to screen or not to screen. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2013; 13: 96
226. Adler SP. Screening for cytomegalovirus during pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2011; 2011: 1-9.
227. Cahill AG, Odibo AO, Stamilio DM, Macones GA. Screening and treating for primary cytomegalovirus infection in pregnancy: where do we stand? A decision-analytic and economic analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 201(5): 466.e1-7.
228. Dorronsoro I, Lopez Azorin M, Garcia Flores J, Tamartit I, Recio M, Hernandez Calvin J, Caballero M, Pellicer A, Cabañas F. Human cytomegalovirus congenital infection: implementation of a screening program during pregnancy. Abstract of the first European Congenital CMV Initiative Meeting, April M2016.Venice, Italy (ID 065).
229. Morand A, Zandotti C, Minodier P, Sarles J, De Lamballerie X, Chabrol B, Charrel R. Cytomegalovirus Congenital Infection: It Is Urgent To Do Neonatal Screening! Abstract of the Second European Congenital CMV Initiative Meeting, May 2018, Brussels, Belgium.
230. Modrow S, Buxmann H, Enders M, Gembruch U, Goe R. Management Of Congenital CMV infection: Updated Recommendations In Germany. Abstract of the Second European Congenital CMV Initiative Meeting, May 2018, Brussels, Belgium.
231. Tanimura K, Tairaku S, Morioka I, Ozaki K, Nagamata S, Morizane M, Deguchi M, Ebina Y, Minematsu T, Yamada H. Universal Screening With Use of Immunoglobulin G Avidity for Congenital Cytomegalovirus Infection. *Clin Infect Dis* 2017; 65(10): 1652–8

232. Kourí V, Correa CB, Verdasquera D, Martínez PA, Alvarez A, Aleman Y, Perez L, Golpe MA, Someilan T, Chong Y, Fresno C, MD, Navarro MA, Perez E, Moro I, Sanchez R, Llanusa C, Melin P. Diagnosis and Screening for Cytomegalovirus Infection in Pregnant Women in Cuba as Prognostic Markers of Congenital Infection in Newborns. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29: 1105–1110
233. Gentile M, Galli C, Pagnotti P, Di Marco P, Tzantzoglou S, Bellomi F, Ferreri ML, Selvaggi C, Antonelli G. Measurement of the sensitivity of different commercial assays in the diagnosis of CMV infection in pregnancy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 977–981
234. Carlier P, Harikaa N, Bailly R, Vrankenb G, Laboratory evaluation of the new Access® cytomegalovirus immunoglobulin IgM and IgG assays. *J Clin Virol* 2010; 49: 192-197
235. Juhl D, Vockel A, Luhm J, Ziemann M, Hennig H, Görg S. Comparison of the two fully automated anti-HCMV IgG assays : Abbott Architect CMV IgG assay and Biotest anti-HCMV recombinant IgG ELISA. *Transfusion Medicine* 2013; 23: 187–194
236. Wissel N, Hanschmann KM, Scheiblaue H and the Collaborative Study Group. Report of the WHO Collaborative Study to establish the First International Standard for Detection of IgG antibodies to Cytomegalovirus (anti-CMV IgG). Expert committee on biological standardization Geneva, 17 to 20 October 2017
237. Dimech W, Grangeot-Keros L, Vauloup-Fellous C. Standardization of Assays That Detect Anti-Rubella Virus IgG Antibodies. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29(1): 163-74
238. Lazzarotto T, Galli C, Pulvirenti R, Rescaldani R, Vezzo R, La Gioia A, Martinelli C, La Rocca S, Agresti G, Grillner L, Nordin M, Van Ranst M, Combs B, Maine GT, Landini MP. Evaluation of the Abbott axsym cytomegalovirus (CMV) immunoglobulin m (IgM) assay in conjunction with other CMV IgM tests and a CMV IgG avidity assay. *Clin Diag Lab Immunol* 2001; 8(1): 196-198
239. Bal TA, Armstrong G, Han XY. Evaluation of the IMMULITE® 2000 CMV IgM assay. *Herpesviridae* 2012; 3: 2 – 5
240. Prince HE, Lapé-Nixon M, Brenner A, Pitstick N, Couturier MR. Potential Impact of Different Cytomegalovirus (CMV) IgM Assays on an Algorithm Requiring IgM Reactivity as a Criterion for Measuring CMV IgG Avidity. *Clin Vaccine Immunol* 2014; 21 (6): 813–816
241. Delefortrie Q, Delforge ML, Cirriez JM, Schatt P, Auger L, Vankerkhoven P, Grimmelprez A. CMV seroconversion associated with a high avidity in a previously seronegative pregnant woman during her first trimester of pregnancy. *Curr Trends Biomedical Eng & Biosci* 1(1): CTBEB.MS.ID.555552, Dec 2016
242. Rilling V, Dietz K, Krczal D, Knotek F, Enders G. Evaluation of a commercial IgG/IgM Western blot assay for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22(3): 174-80
243. Magi B, Migliorini L. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *New Microbiol* 2011; 34(1): 93-5

244. Lazzarotto T, Varani S, Spezzacatena P, Gabrielli L, Pradelli P, Guerra B, Landini MP. Maternal IgG avidity and IgM detected by blot as diagnostic tools to identify pregnant women at risk of transmitting cytomegalovirus. *Viral Immunol* 2000; 13(1): 137-41.
245. Rajasekariah H, Scott G, Robertson PW, Rawlinson WD. Improving Diagnosis of Primary Cytomegalovirus Infection in Pregnant Women Using Immunoblots. *J Med Virol* 2013; 85 : 315–319
246. Goettner G, Schulte-Spechtel U, Hillermann R, Liegl G, Wilske B, Fingerle V. Improvement of Lyme Borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (8): 3602
247. Stern H, Tucker SM. Prospective study of cytomegalovirus infection in pregnancy. *Br Med J* 1973; 2(5861): 268-70.
248. Nankervis GA, Kumar ML, Cox FE, Gold E. A prospective study of maternal cytomegalovirus infection and its effect on the fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 1984; 149(4): 435-40.
249. Revello MG, Zavattoni M, Sarasini A, Percivalle E, Simoncini L, Gerna G. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *J Infect Dis* 1998; 177(5): 1170-5.
250. Lazzarotto T, Gabrielli L, Lanari M, Guerra B, Bellucci T, Sassi M, Landini MP. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum Immunol.* 2004; 65(5): 410-5.
251. Fornara C, Cassaniti I, Zavattoni M, Furione M, Adzasehoun KMG, De Silvestri A, Comolli G, Baldanti F. Human Cytomegalovirus–Specific Memory CD4+ T-Cell Response and Its Correlation With Virus Transmission to the Fetus in Pregnant Women With Primary Infection. *Clin Infect Dis* 2017; 65(10): 1659–65
252. Saldan A, Forner G, Mengoli C, Gussetti N, Palù G, Abate D. Strong Cell-Mediated Immune Response to Human Cytomegalovirus Is Associated With Increased Risk of Fetal Infection in Primarily Infected Pregnant Women. *Clin Infect Dis* 2015; 61(8): 1228–34
253. Ait Amara I. Cytomegalovirus congenital : profil des anticorps maternels et risque de transmission au fœtus (résultats préliminaires). 2018 Travail de fin d'études Master 3 Medecine. Université Libre de Bruxelles