



Fiche : Gestion des prélèvements biologiques d'un patient suspect ou confirmé d'infection par le Monkeypox virus (MPXV) Version 2 _ MAJ : 16/09/2022

Recommandations de la SFM à destination des Laboratoires des Etablissements de Santé et des Hôpitaux militaires ainsi que des Laboratoires de Biologie Médicale.

Rédacteurs (Groupe de travail SFM « Micro-organismes émergents », Section Virologie SFM et Section SFM Sécurité et sûreté biologiques ; CNR Orthopoxvirus) : Maude Bouscambert, Sonia Burrel, Olivier Ferraris, Nadine Lemaitre, Sébastien Allix, Audrey Merens, Bruno Lina, Gérard Lina, Vincent Thibault, David Boutolleau, Céline Bressollette-Bodin, Sylvie Larrat

1/ Généralités

Le virus monkeypox (MPXV) est un virus de la famille des *Poxviridae* qui se compose de 2 sous-familles, les *Entomopoxvirinae* et les *Chordopoxvirinae*. Les *Chordopoxvirinae* sont divisés en 11 genres auxquels s'ajoutent les virus en attente de classement. Les *Chordopoxvirinae* peuvent infecter un très grand nombre de vertébrés. Des infections chez l'être humain ont été rapportées pour 5 genres, dont principalement les genres *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Parapoxvirus* et *Orthopoxvirus*. Les *Orthopoxvirus* sont connus pour causer des zoonoses humaines à partir de contacts avec des mammifères infectés. La transmission interhumaine du MPXV (agent viral de classe 3) est habituelle par un contact étroit cutané ou respiratoire avec un cas primaire. Avant l'alerte 2022, la plus longue chaîne de transmission décrite impliquait 6 générations successives. Les *Orthopoxvirus* sont sensibles aux désinfectants usuels tel que l'hypochlorite de sodium 0,5% (une liste d'agents actifs est disponible sur le site <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/virus-variole.html>).

La virémie lors de l'infection par le MPXV est généralement courte (1 à 2 jours) et concomitante de la fin de la phase prodromique. La fièvre dure pendant 1 à 3 jours, puis l'éruption cutanée ou rash apparaît. La phase éruptive débute par un exanthème (visage et bras) qui gagne en une seule poussée centrifuge le tronc et les membres inférieurs. Les lésions évoluent du stade de macules, vers celui de papules, puis de vésicules, pustules et croûtes simultanément sur un même territoire, à l'inverse de la varicelle, (diagnostic différentiel essentiel de l'infection par le MPXV, dont l'éruption évolue en plusieurs poussées) et sont très enchâssées dans le derme. Les cas récents indiquent que des éruptions localisées ne retrouvant que quelques vésicules sont également possibles. L'individu est contagieux jusqu'au moment où les croûtes tombent.

L'ensemble des recommandations émises par la SFM et le CNR Orthopoxvirus indiquées ci-dessous peuvent être amenées à évoluer au fur et à mesures de l'évolution de l'épidémie et des modifications réglementaires.



2/ Prélèvements recommandés pour le diagnostic virologique de l'infection par le MPXV

Le diagnostic spécifique de l'infection par le MPXV est réalisé actuellement par PCR de genre (genre *Orthopoxvirus*) puis confirmation MPXV ou directement par PCR spécifique MPXV. La culture cellulaire ne doit pas être utilisée en première intention diagnostique.

Les prélèvements recommandés pour le diagnostic virologique initial de l'infection par le MPXV selon le contexte clinique et/ou le type de lésions observées sont les suivants :

- **prélèvements cutanéomuqueux** : écouvillonnages et/ou biopsies de lésions cutanées et/ou lésions muqueuses hors sphère ORL (génitaux et anaux)
- **prélèvements de la sphère ORL** : écouvillonnages oropharyngés (nasopharyngés possibles)
- **prélèvements respiratoires** semi-profonds et profonds si signes respiratoires : aspirations trachéo-bronchiques, liquides broncho-alvéolaires, prélèvements distaux protégés, crachats induits ...
- **liquides cérébrospinaux** (LCS) si suspicion d'atteinte neurologique

Pour plus d'informations concernant les prélèvements à des fins de diagnostic virologique initial d'infection se référer aux recommandations du CNR Orthopoxvirus (<https://www.defense.gouv.fr/sante/centre-national-reference-orthopoxvirus>).

Remarques : un prélèvement par écouvillonnage d'une ou plusieurs vésicules ou lésions (ulcérations) est possible pour augmenter le rendement diagnostique. Les écouvillons doivent être déchargés en milieu de transport inactivant (attention au risque d'interférences avec les tampons de lyse de certains extracteurs ...) ou non inactivant (permettant la mise en culture cellulaire des échantillons biologiques) selon les techniques virologiques utilisées pour faire le diagnostic dans le laboratoire. Afin de permettre la mise en culture virale de ces échantillons, il est rappelé de ne pas réaliser d'inactivation par la chaleur des échantillons initiaux.

3/ Classification des prélèvements selon le risque de contamination pour le manipulateur

Les prélèvements considérés à **risque significatif de contamination** d'un patient suspect ou confirmé d'infection par le MPXV sont les suivants :

- prélèvements cutanéomuqueux, liquides biologiques tels que salive, sperme, sécrétions vaginales, prélèvements de la sphère ORL, prélèvements respiratoires semi-profonds et profonds ;
- selles et écouvillonnages rectaux si lésions anales visibles.

Les prélèvements considérés à **risque faible de contamination** d'un patient suspect ou confirmé d'infection par le MPXV sont les suivants :



- sang, sérum, urines, LCS, liquides de séreuses (sauf liquides pleuraux) ;
- selles et écouvillonnages rectaux sauf si lésions anales visibles.

4/ Conditionnement et acheminement des échantillons

Les conditionnements recommandés et les règles pour l'acheminement de matériels infectieux provenant d'un patient suspect ou confirmé d'infection par le MPXV sont détaillés ci-dessous.

- **Acheminement des échantillons primaires provenant de cas suspects** à des fins de diagnostic virologique ou hors diagnostic virologique

En inter-sites (entre deux structures distinctes géographiquement)

- Si prélèvements à risque significatif de contamination
→ Triple emballage cartonné
- Si prélèvements à risque faible de contamination
→ Sachet 95 kPa

En intra-site (entre deux structures situées sur le même site géographique)

- Si prélèvements à risque significatif de contamination
→ Sachet 95 kPa
- Si prélèvements à risque faible de contamination
→ Sachet et modalités classiques de transfert d'échantillons biologiques. En cas d'envois combinés avec des prélèvements à risque significatif de contamination, il est possible de mettre tous les échantillons dans un sachet 95 kPa.

Pour les prélèvements destinés au diagnostic, l'acheminement vers le laboratoire doit se faire selon les recommandations d'un transport UN3373 (**catégorie B numéro UN3373**, « Substance biologique de catégorie B », instruction d'emballage P650) en triple emballage ou conditionné dans un sachet 95 kPa contenant un buvard selon le contexte. Le transport par pneumatique n'est pas recommandé dans l'état actuel de l'épidémie.

Attention au risque associé aux contenants mal fermés et à la fuite de liquide contaminé dans le sachet. Ce risque est très faible pour les écouvillons. **En cas de fuite de l'échantillon dans le sachet, l'analyse du prélèvement ne doit pas être réalisée.** Il est donc indispensable de rappeler au service expéditeur la nécessité de bien fermer les contenants, et de mettre systématiquement un absorbant dans le sachet de transport.

- **Acheminement et conditionnement des échantillons provenant de cas confirmés**



- **Echantillons primaires non inactivés de patients** (potentiellement infectieux) provenant de **cas confirmés** virologiquement pour envoi au CNR **ou de culture virale : catégorie A numéro UN2814**, « Substance infectieuse affectant l'être humain », instruction d'emballage P620 avec un container rigide (emballage secondaire) placé pour le transport dans une boîte en carton. Une personne-contact d'urgence disponible 24h/24 doit être indiquée sur l'emballage en plus du nom de l'expéditeur et du destinataire. Tout envoi en catégorie A doit être accompagné d'un document de transport des marchandises dangereuses. Il convient de suivre la réglementation en vigueur pour tout envoi. Tout envoi de MOT doit faire l'objet d'une déclaration à l'ANSM.
- **Echantillons primaires inactivés de patients ou extraits d'acides nucléiques** (non infectieux) provenant de **cas confirmés** virologiquement pour envoi au CNR : **catégorie B numéro UN3373**, « Substance biologique de catégorie B », instruction d'emballage P650.

Attention : le laboratoire expéditeur ne disposant pas d'une autorisation de détention des Poxvirus par l'ANSM a **30 jours** pour envoyer tous les échantillons cliniques positifs (inactivés ou non) et tous les extraits d'acides nucléiques au CNR Orthopoxvirus. **Au-delà, l'établissement a l'obligation de détruire les dits échantillons et extraits d'acides nucléiques contenant de l'ADN viral du MPXV purifiés à partir d'échantillons cliniques et de tracer cette destruction** (Article R5139-2 du code de santé publique).

5/ Manipulation des échantillons primaires à des fins de diagnostics biologiques

5.1. Manipulations des échantillons à risque significatif de contamination à des fins d'analyses biologiques (diagnostic virologique et autres analyses non virologiques)

Selon les recommandations du HCSP et la réglementation en vigueur, la manipulation des échantillons à visée diagnostique d'un patient suspect d'infection par le MPXV doit s'effectuer en priorité dans un LSB3 sous un PSM2 en respectant les bonnes pratiques de travail. Ceci s'applique particulièrement lors des manipulations pouvant générer accidentellement des aérosols, en mettant à disposition une conduite à tenir en cas d'incident (traçabilité du personnel et des échantillons) en particulier avant l'inactivation du virus (mise en tampon de lyse pour l'extraction des acides nucléiques ...) et selon les conditions décrites dans le paragraphe 5.2.1.7 du manuel de sécurité et de sûreté biologiques.

La culture du virus est exclusivement réservée aux laboratoires détenteurs d'un LSB3 et d'une autorisation de mise en œuvre MOT (les *Orthopoxvirus*, variole humaine et variole simienne) appartiennent tous deux à l'annexe 1 de la liste des MOT).



Toutefois, dans le cadre de cette épidémie et compte tenu du mode de transmission principalement de type IST dans le contexte actuel, la manipulation dans un LSB2, sous un PSM2 en respectant les mêmes pratiques de travail que dans un LSB3 (PSM2 dédié et identifié, port de surblouse, masque FFP2, gants à usage unique, autoclavage des déchets ...) est possible uniquement pour la réalisation de tests de diagnostic moléculaire sur tous les types d'échantillons cliniques qu'ils soient à risque significatif de contamination ou à risque faible.

Il est recommandé de décontaminer les contenants à l'arrivée au laboratoire. Il y a le plus souvent une première décontamination faite par le service préleveur. Il est impératif de sensibiliser les services de soins à la bonne décontamination des contenants avant le départ du service.

Dans l'idéal, il convient d'attendre la levée de doute de l'infection par MPXV avant d'effectuer toute autre analyse biologique sur des échantillons à risque significatif de contamination. En cas de suspicion d'une co-infection sans possibilité de réaliser d'examen complémentaires, il pourra être discuté avec les infectiologues de mettre en place un traitement probabiliste.

Ainsi, étant donné les contraintes liées à une manipulation dans un LSB3 des échantillons à risque significatif de contamination, les activités à réaliser doivent être restreintes en premier lieu, à des manipulations aux fins de biologie moléculaire telles que la mise en tampon de lyse pour l'extraction des acides nucléiques.

En LSB3, la tenue de protection du manipulateur et la prise en charge des échantillons doivent suivre les recommandations classiques de la manipulation en structure de sécurité de niveau 3. La manipulation des échantillons à risque significatif de contamination (prélèvements cutanéomuqueux, liquides biologiques tels que salive, sperme, sécrétions vaginales, prélèvements de la sphère ORL, prélèvements respiratoires semi-profonds et profonds) peut s'envisager en LSB2 uniquement pour la réalisation d'analyses de biologie moléculaire mais en appliquant des procédures strictes de travail de type LSB3. Cela implique de disposer d'une salle de travail dédiée à cette activité et disposant d'au moins un PSM2.

Ces procédures doivent notamment respecter les conditions de sécurité biologique listées ci-dessous pour réduire tout risque de dissémination en cas d'accident :

- Port d'une sur-blouse, un masque FFP2, une paire de lunettes de protection et une double paire de gants jetables à usage unique (la paire supérieure peut être changée plusieurs fois (après manipulation des échantillons, après décontamination du PSM ou en cas de projections ...)).



- Toute centrifugation doit se faire en nacelle étanche et toute ouverture de nacelle de centrifugation doit se faire sous PSM2 (cf. paragraphe 5.2.3 du manuel de sécurité et de sûreté biologique SFM).
- Toute homogénéisation par utilisation d'un vortex doit être évitée autant que faire se peut. Si indispensable, elle doit se faire sous PSM2 uniquement si le tube peut rester fermé.
- Le PSM2 doit être nettoyé après usage avec un détergent-désinfectant virucide (Norme EN 14476) en suivant les recommandations du fabricant (respect de la concentration et du temps de contact).
- Disposer d'une procédure décrivant la conduite à tenir en cas de déversement de liquides biologiques ou de projections sous le PSM2.
- Procéder à une hygiène des mains avec PHA après retrait des gants.

En cas d'urgence médicale, **la manipulation des échantillons à risque significatif de contamination** (prélèvements cutanéomuqueux, liquides biologiques tels que salive, sperme, sécrétions vaginales, prélèvements de la sphère ORL, prélèvements respiratoires semi-profonds et profonds) pour **la réalisation d'analyses autres que des analyses de biologie moléculaire** doivent respecter les recommandations suivantes :

- Après décontamination des contenants, le tube échantillon peut passer sur un automate d'analyse qui ne nécessite pas d'ouverture du bouchon et qui possède une procédure de désinfection adéquate.
- S'il est nécessaire de faire un étalement et une coloration de l'échantillon biologique sur lame ou s'il est nécessaire d'ensemencer le prélèvement sur milieux de culture (bactériologiques/mycologiques), il convient de respecter une manipulation en condition LSB3 sous PSM2 ou en condition LSB2 avec les précautions de manipulation d'un LSB3. Une fois fixées, les lames peuvent être colorées en dehors du PSM2 et une fois les milieux ensemencés, ils peuvent réintégrer une chaîne robotisée pour lecture automatisée mais il est rappelé que le déchargement des boîtes de culture de la chaîne doit se faire en respectant les précautions standards (**port de gants**).

Remarque : lorsqu'il n'y a pas besoin de prétraitement ou de dilution de l'échantillon, l'ensemencement à visée bactériologique ou mycologique de milieux de culture et les dépôts sur lame et la fixation peuvent être aussi réalisés directement avec les ensemenceurs capables d'ouvrir les contenants fermés et possédant un **module d'ensemencement fermé avec traitement d'air par filtre HEPA**.



5.2. Réalisation des analyses biologiques sur des échantillons à risque faible de contamination (ex : sang, urines ...)

- Les précautions standards de manipulation des échantillons biologiques doivent inclure le port de gants, le respect de l'hygiène des mains, un suivi de procédure adéquates de désinfection en cas de projection sur une surface et un suivi des règles de bon usage des centrifugeuses.
- Les prélèvements seront traités selon les procédures standards du laboratoire (ensemencement manuel ou automatisé des prélèvements microbiologiques, coloration...).

6/ Gestion des déchets et destruction des échantillons

En LSB3, les déchets générés par la prise en charge des prélèvements adressés pour une confirmation d'infection par le MPXV suivent le mode usuel d'élimination des déchets mis en place dans le laboratoire comprenant obligatoirement **un pré-traitement par autoclavage** (*a minima* 30 minutes à 121°C recommandé) avant leur sortie définitive pour élimination par le circuit des DASRI.

En LSB2, la gestion des déchets produits dans la salle de travail dédiée doit suivre les recommandations suivantes :

1. Inactivation chimique des déchets produits sous PSM2.
2. Inactivation des effluents de lavages.
3. Élimination des déchets solides (y compris les EPI) en DASRI après décontamination chimique pour le matériel (les gants font partis du matériel à décontaminer) avant la sortie de la salle de travail dédiée.
4. Autoclavage des déchets solides et liquides dans un autoclave situé à proximité immédiate (même bâtiment), avec mise en place de procédures validées, permettant le transfert vers l'autoclave extérieur au local (ex : décontamination externe de la DASRI avant la sortie de la salle de travail dédiée).

La **réglementation en vigueur** (classement du MPXV comme agent pathogène du groupe 3) impose un **autoclavage des déchets dans tous les cas** : prise en charge en LSB3 et prise en charge de **LSB2 en conditions LSB3**.



- Si infection par le MPXV **confirmée par biologie moléculaire** :
 - Sur demande de l'ARS ou du CNR, possibilité de transfert des échantillons primaires non inactivés en transport de **catégorie A numéro UN2814** et des extraits d'acides nucléiques/échantillons primaires inactivés en transport de catégorie B numéro UN3373
 - En absence de transfert :
 - Destruction de l'ensemble des tubes primaires reçus et manipulés dans un LSB3 ou dans un LSB2 en condition LSB3 par autoclavage (*a minima* 30 minutes à 121°C) par obligation réglementaire puis élimination par le circuit des DASRI.
 - Destruction des extraits d'acides nucléiques contenant de l'ADN viral *via* cette filière d'élimination spécifique.
- Si infection par le MPXV **exclue par biologie moléculaire** : les échantillons peuvent rejoindre le circuit classique de conservation des échantillons et d'évacuation du laboratoire par la filière DASRI.

Adresse du Centre National de Référence (CNR) des Orthopoxvirus :

CNR-LE Orthopoxvirus
Institut de Recherche Biomédicale des Armées
Unité de Virologie
1 place Valérie André
91 220 Brétigny sur Orge
Tel : 06 03 87 58 59
lrba-cnropv.accueil.fct@def.gouv.fr



Références

- Manuel de sécurité et sûreté biologiques, 2^e édition, Ed. SFM, 2019.
- Laboratory testing for the monkeypox virus, WHO Interim guidance, 28 may 2022. www.who.int/health-topics/monkeypox
- Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5th Edition, CDC. <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/lab-personnel/lab-procedures.html>
- Arrêté du 27 décembre 2017 relatif à la liste des agents biologiques pathogènes et aux mesures techniques de prévention à mettre en œuvre dans les laboratoires où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.
- Manuel de sécurité biologique en laboratoire, OMS, 4^e édition. Laboratory biosafety manual: fourth edition. Geneva:World Health Organization; 2020 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337956>.
- Guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses (2019-2020), WHO/HSE/GCR 2015.2.

Abréviations

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

CDC : Center for Disease Control and Prevention

CNR : Centre national de référence

HCSP : Haut conseil de santé publique

IST : Infection sexuellement transmissible

MOT : Micro-organismes et toxines

LSB2 / 3 : Laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 / 3

OMS / WHO : Organisation mondiale de la santé

PSM2 : Poste de sécurité microbiologique de niveau 2