



Centre National de Référence des virus entériques

Laboratoire de Virologie du CHU de Dijon

**Bilan d'activité 2009
Programme 2010-2011**

Responsable : Professeur Pierre POTHIER

Mars 2010

Centre National de Référence des virus entériques

Laboratoire de Virologie du CHU de Dijon

Site web :

<http://www.chu-dijon.fr/page.php?url=directory/centre-national-de-referance-des-virus-enteriques>

Accessible à l'aide des moteurs de recherche – Google et autres - avec la dénomination

« CNR des virus entériques »

Bilan d'activité 2009 Programme 2010-2011

Responsable : **Professeur Pierre POTHIER**

Collaborateurs :

Docteur Katia BALAY

Docteur Gaël BELLIOU

Docteur Davide AGNELLO

Docteur Alexis DE ROUGEMONT

Mademoiselle Marie ESTIENNEY

Madame Caroline FONTANA

Monsieur Jérôme KAPLON

Mademoiselle Amandine LAVAUX

Madame Ingrid MARENDA

Mademoiselle Clémence MOREY

Mademoiselle Delphine PLESSE

Mars 2010

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION ET PRINCIPAUX RESULTATS	1
1.1. ETAT DE LA QUESTION ET ENJEUX DE SANTE PUBLIQUE	1
1.2. GASTROENTERITES HIVERNALES INFANTILES A ROTAVIRUS	1
1.3. LES « CAS GROUPES » DE GASTROENTERITES	2
1.4. EPIDEMIOLOGIE DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES PAYS D'AFRIQUE.	2
2. DESCRIPTION DES MOYENS AFFECTES AU CNR VIRUS ENTERIQUES	4
2.1. RESSOURCES HUMAINES	4
2.2. DESCRIPTION DES LOCAUX ET EQUIPEMENTS	5
2.3. DEMARCHE QUALITE DU CNR	6
3. ACTIVITE D'EXPERTISE	7
3.1. CAPACITE TECHNIQUE DU CNR	7
3.1.1. Liste des techniques de référence disponibles	7
3.1.2. Collection de souches, d'antigènes ou d'anticorps de référence	7
3.2. ACTIVITE D'EXPERTISE EN 2009	9
3.2.1. Evaluation de trousse de diagnostic par le CNR	9
3.2.2. Evaluation de procédés virucides	9
3.2.3. Investigations virologiques de cas sporadiques	9
3.2.4. Investigations virologiques des épidémies	9
3.2.5. Principales souches virales caractérisées dans ces épidémies:	10
3.2.6. Caractéristiques des 185 gastroentérites collectives	10
3.2.7. Conclusion des activités d'expertise	10
4. ACTIVITE DE SURVEILLANCE	11
4.1. SURVEILLANCE MOLECULAIRE DES ROTAVIRUS EN MILIEU PEDIATRIQUE HOSPITALIER	11
4.1.1. Réseau de partenaires et répartition géographique	11
4.1.2. Principaux résultats	11
4.2. SURVEILLANCE DES GASTRO-ENTERITES COMMUNAUTAIRES	20
4.2.1. Fréquence de détection des virus	20
4.2.2. Distribution des virus selon les groupes d'âge	20
4.2.3. Distribution des génotypes des rotavirus et norovirus	22
4.2.4. Co	
nclusions	22
4.3. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES	23
4.3.1. Réseau de partenaires et répartition géographique	23
4.3.2. Caractéristiques des épidémies	24
4.4. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX	29
4.4.1. Réseaux européens* « EVENT », « DIVINE » et « EuroRotanet »	29
4.4.2. Collaborations « Egypte – Tunisie - Maroc »	29
4.5. ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	30
4.5.1. Etude comparative des infections à rotavirus G1 et G9.	30
4.5.2. Virus Aichi : études virologique et épidémiologique	30
5. ALERTE (voir également annexes A : PROCEDURES ET FORMULAIRES)	31
5.1. PROCEDURES D'ALERTE DE L'INVS ET DES AUTRES PARTENAIRES	31
5.1.1. Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR (par la DDASS, un laboratoire...): ..	31
5.1.2. Annonce d'une épidémie via la base Voozanoo de l'InVS :	31
5.1.3. Arrivée de prélèvements sans annonce préalable :	31
5.2. TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS DES CAS GROUPE DE GEA	31
6. ACTIVITE D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	32
6.1. PARTICIPATION AUX COMMISSIONS SPECIALISEES ET ACTIVITE D'EXPERTISE	32
6.2. ACTIVITE DE CONSEIL :	32
6.3. ENCADREMENT DE STAGIAIRES :	32
7. TRAVAUX DE RECHERCHE DECOULANT DE L'ACTIVITE DU CNR	33
7.1. EVALUATION ET MISE AU POINT DE REACTIFS DE DIAGNOSTIC	33
7.1.1. Rotavirus :	33
7.1.2. Norovirus :	33
7.2. EVALUATION DES ANTISEPTIQUES ET DESINFECTANTS	33

7.3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES	33
7.3.1. Epidémiologie moléculaire des rotavirus	33
7.3.2. Epidémiologie moléculaire des virus dans les pays méditerranéens	33
7.4. ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE AUX INFECTIONS A ROTAVIRUS	3
7.5. ETUDE DES INTERACTIONS NOROVIRUS-RECEPTEURS GLYCANES	3
8. LISTE DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET CONTRATS.....	35
8.1. PUBLICATIONS	35
8.1.1. Publications internationales.....	35
8.1.2. Articles soumis à publication	36
8.1.3. Publications en langue française.....	36
8.1.4. Publications didactiques.....	37
8.1.5. Communications internationales	37
8.1.6. Communications nationales.....	37
8.1.7. Conférences sur invitation	38
8.2. CONTRATS DE RECHERCHE LIES AUX ACTIVITES DU CNR	38
8.3. COLLABORATIONS	38
9. PROGRAMME D'ACTIVITE DES ANNEES 2010 ET 2011	40
9.1. MISE AU POINT DE REACTIFS	40
9.1.1. Rotavirus	40
9.1.2. Norovirus.....	40
9.2. CONTAMINATION VIRALE DES MATRICES ALIMENTAIRES	40
9.3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES	40
9.3.1. Epidémiologie moléculaire des rotavirus en milieu pédiatrique	40
9.3.2. Epidémies de gastroentérites en Etablissements pour personnes âgées.....	41
9.3.3. Epidémiologie virus des gastroentérites dans le pourtour méditerranéen.	41
9.3.4. Epidémiologie virus des gastroentérites chez les bovins.....	41
9.3.5. Gastro-entérites sans étiologie	42
9.4. ETUDES FONDAMENTALES.....	42
9.4.1. Etude de la réponse immune aux infections à rotavirus	42
9.4.2. Etudes des interactions entre norovirus et récepteurs glycanes	42
9.5. FORMATION, SOUTIEN TECHNIQUE	43
10. ANNEXES : PROCEDURES ET FORMULAIRES	44
10.1. ANNEXE A1 : Procédures	44
10.2. ANNEXE A2 : Procédures	50
10.2.1. Protocoles d'envoi d'échantillons de selles	50
10.2.2. Formulaire accompagnant les envois	50
11. ANNEXES : PUBLICATIONS.....	55

1. INTRODUCTION ET PRINCIPAUX RESULTATS

1.1. ETAT DE LA QUESTION ET ENJEUX DE SANTE PUBLIQUE

Les gastroentérites représentent un problème de santé publique mondial avec une morbidité et mortalité importante. Dans les pays moins avancés sur le plan médical et de l'hygiène les gastroentérites virales sont la cause d'une très forte mortalité infantile avec environ 500 000 décès par an.

En France, comme dans les autres pays industrialisés, les gastro-entérites se présentent en réalité sous **deux aspects posant des problèmes de santé publique totalement différents**. D'une part les **gastro-entérites infantiles à rotavirus**, cause d'une importante morbidité infantile ayant des répercussions financières sur les budgets de santé et économiques par les coûts indirects induits. C'est d'ailleurs en termes économiques que le remboursement de la **vaccination contre les rotavirus** s'est posé. D'autre part, les épidémies de gastroentérites dans des collectivités, principalement les **établissements hébergeant des personnes âgées**, qui sont majoritairement dues aux **norovirus**.

Le CNR des virus entériques a défini ses actions pour les années 2009 et suivantes autour de trois objectifs principaux de surveillance répondant aux problèmes de santé publique posés par les gastroentérites :

- Les gastroentérites hivernales infantiles à rotavirus avec le souci de répondre aux questions posées par l'introduction de deux nouveaux vaccins.
- Les gastroentérites épidémiques survenant en collectivités en axant plus particulièrement nos efforts sur les gastroentérites survenant en Etablissements Hébergeant des Personnes Agées (EHPAD).
- L'épidémiologie des virus entériques dans les pays en développement, notamment ceux du pourtour méditerranéen et des pays francophones d'Afrique. L'objectif étant d'y déceler des virus émergents susceptibles d'être responsables d'épidémies en France (qu'il s'agisse de nouveaux virus comme le virus Aichi ou de norovirus variants susceptibles d'être à l'origine d'épidémies ...).

1.2. GASTROENTERITES HIVERNALES INFANTILES A ROTAVIRUS

Les gastroentérites hivernales touchent principalement les enfants. Le principal agent étiologique en est le rotavirus contre lequel un premier vaccin avait été commercialisé aux USA en 1998, mais rapidement retiré après la constatation d'une augmentation du nombre d'invaginations intestinales aiguës après son introduction sur le marché.

Deux vaccins sont disponibles en France depuis 2006. L'un est monovalent (RotaRix[®], GlaxoSmithKline) et provient d'une souche humaine atténuée de génotype G1P[8] (ou sérotype G1P1A). Le second est pentavalent (RotaTeq[®], Sanofi Pasteur MSD) ; il est composé de virus bovins recombinants exprimant les protéines de surface de rotavirus humains VP7 de génotype G1, G2, G3, G4 et VP4 de génotype P[8] (ou sérotype P1A). Les essais cliniques puis leur large utilisation ont montré leur innocuité et leur efficacité pour la protection des diarrhées sévères.

Mais si les résultats d'efficacité sont très encourageants vis-à-vis des souches les plus répandues en Europe et aux USA, leur efficacité vis-à-vis des souches plus rares ou inhabituelles est à démontrer.

Le CNR des virus entériques réalise une surveillance d'épidémiologie moléculaire des rotavirus depuis l'hiver 2004/2005. Pour cette étude, le CNR fait partie d'un réseau européen (EuroRotaNet) et collabore avec 13 centres hospitaliers français. **Les principaux résultats obtenus de 2004 à 2009 ont montré :**

- L'émergence en 2004/2005 des souches de **génotype G9;P[8]** et, depuis cette date, leur installation comme la seconde souche circulante après le génotype G1;P[8].
- Une **fluctuation importante selon le temps et selon la région** de l'incidence des génotypes de rotavirus.
- La circulation de souches de génotypes ou de combinaisons inhabituels, certaines de ces **souches pouvant être d'origine animale ou résulter de réassortiments** entre souches humaines et animales. Ces souches représentent environ 2% de l'ensemble des souches circulantes.

1.3. LES « CAS GROUPES » DE GASTROENTERITES

Les cas groupés de gastroentérites virales touchent toutes les tranches d'âge de la population. Classiquement d'origine alimentaire ou hydrique, il s'avère que la majorité de ces épidémies sont transmises de personne à personne et touchent plus particulièrement les personnes âgées vivant en établissement.

Le CNR des virus entériques, en collaboration avec l'InVS, les CIRE, les DDASS et le réseau GROG Géroto, réalise les investigations virologiques s'intégrant dans la prise en charge épidémiologique globale de ces épidémies.

Les principaux résultats obtenus en 2009, confrontés à ceux des autres laboratoires du réseau européen, montrent :

- **La grande fréquence de ces épidémies chez les personnes âgées en EHPA** qui est très probablement la cause d'une surmortalité, non encore chiffrée.
- Outre le mode de transmission de personne à personne, ces épidémies se distinguent par le virus en cause, un norovirus du génogroupe II et du génotype 4 (GGII.4). Ces norovirus GGII.4 possèdent une étonnante capacité évolutive marquée par **l'apparition de nouveaux variants à l'origine de nouvelles épidémies**. Ce fut le cas en 2002, puis en 2004, 2006 avec 2 nouveaux variants identifiés (2006a et 2006b). Durant l'année 2009, le variant 2006b était majoritaire mais circulait également 2 nouveaux variants dont un que nous avons identifié en Egypte en 2007. Comprendre les mécanismes de cette évolutivité sera un de nos objectifs pour les années à venir.

1.4. EPIDEMIOLOGIE DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES PAYS D'AFRIQUE.

Les infrastructures sanitaires, l'hygiène et la qualité de l'eau sont responsables d'un « risque fécal » accru rendant la problématique des gastroentérites totalement différente de celle que l'on connaît en France. L'objectif de ces études est d'anticiper l'émergence de nouveaux virus à l'origine d'épidémie en France par une connaissance de la diversité génétiques des virus entériques circulant dans ces pays.

Le CNR a participé à plusieurs programmes de recherche virologique dans le domaine de la santé et de l'environnement en Tunisie et en Egypte. Ces études ont été étendues au Sénégal et prochainement au Niger.

Les principaux résultats de cette collaboration sont :

- La **formation de 2 étudiants**, l'une a soutenue sa thèse en janvier 2009, la seconde décembre 2009. Nous avons également accueilli **2 stagiaires** de nationalité marocaine et tunisienne (stages entre 2 et 9 mois).
- Une meilleure connaissance de l'épidémiologie des virus entériques notamment les norovirus et les virus Aichi.
 - o **Les infections à norovirus** ont dans ces pays une **incidence élevée** et une **gravité** égale à celles des infections à rotavirus, contrairement à ce que nous avons observé en France.
 - o Il existe une **diversité des souches de norovirus** et certaines pourraient être potentiellement émergentes en Europe ; L'analyse génétique de souches égyptienne isolées en 2006-2007 a permis de caractériser un variant qui a circulé en France en 2009.
 - o **L'incidence des infections à virus Aichi est beaucoup plus élevée** que celle observée en France où ces infections sont rares, pratiquement limitées aux gastroentérites liées à la consommation d'huîtres. Nous avons caractérisé un troisième génotype, dénommé C, qui serait présent principalement en Afrique subsaharienne de l'Ouest.

Les travaux du CNR réalisés en 2009 ont fait l'objet de **14 publications dans des journaux internationaux à comité de lecture, 2 publications dans des journaux nationaux et 3 publications didactiques. En 2009, le CNR virus entériques a été impliqué dans 1 contrat européen et 2 contrats ANR.**

2. DESCRIPTION DES MOYENS AFFECTES AU CNR VIRUS ENTERIQUES

2.1. RESSOURCES HUMAINES

Responsable du CNR des virus entériques :

POTHIER Pierre, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Chef du service de Virologie Médicale du CHU de DIJON.

Biologistes (total : 3,8 ETP) :

Personnel permanent : total 3,3 équivalent temps plein (ETP)

POTHIER Pierre : Médecin biologiste, virologie médicale, responsable du CNR, coordonnateur des réseaux nationaux, européens et internationaux. Suivi des épidémies. Rotavirus, calicivirus et autres virus entériques.

Temps consacré à l'activité CNR : 0,5 ETP

BALAY Katia : PhD, Biologiste contractuel. Biologie moléculaire, Microscopie électronique. Calicivirus et autres virus entériques. Suivi des épidémies, banque de données européenne. Responsable de projet.

Temps consacré à l'activité CNR : 0,8 ETP.

BELLIOT Gaël : PhD, Biologiste contractuel. Biologie moléculaire. Calicivirus, astrovirus et autres virus entériques. Suivi des épidémies, des réseaux européens et des relations avec le CDC. Responsable de projet.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

AGNELLO Davide : Pharmacien biologiste, Assistant Hospitalo-Universitaire. Immunologie, biologie moléculaire. Rotavirus, calicivirus. Responsable de projet.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

Personnel temporaire : 0,5 ETP

DE ROUGEMONT Alexis : Médecin biologiste, Assistant Hospitalo-Universitaire. biologie moléculaire. Rotavirus, calicivirus. Responsable de projet.

Temps consacré à l'activité CNR : 0,5 ETP.

Techniciens (total : 5,8 ETP) :

Personnel permanent : total 2,8 ETP

KAPLON Jérôme : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 0,8 ETP.

LAVAUUX Amandine : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

MARENDA Ingrid : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

Personnel temporaire : 3 ETP

ESTIENNEY Marie : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

FONTANA Caroline : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

MOREY Clémence : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

Secrétariat, agent technique (total : 1,2 ETP)

PLESSE Delphine : Secrétariat, gestion administrative : 1 ETP.

Agent technique (personnel hospitalier indifférencié : 0,2 ETP).



Figure 1 : Plan du laboratoire de virologie et place des activités liées au CNR « virus entériques ». Dans la zone biologie moléculaire microbiologie, le CNR dispose de pièces communes avec les autres activités de virologie, il s'agit des pièces de préparation des « mixt », d'extraction et celles des thermocycleurs. En post PCR, les pièces 1a sont dédiées au CNR et les pièces 2 et 3 sont partagées avec les autres activités de virologie.

2.2. DESCRIPTION DES LOCAUX ET EQUIPEMENTS

a. Les locaux

Le laboratoire de virologie et le CNR des « virus entériques » sont situés au du Plateau Technique de Biologie, 2 rue Angélique Ducoudray, bâtiment regroupant tous les laboratoires du CHU de Dijon et l'EFS Bourgogne-Franche Comté.

La surface totale du laboratoire de virologie est d'environ 500 m² et se localise au 1^{er} étage. La réception des prélèvements, les salles de réunion se situent au rez-de-chaussée.

Les surfaces dédiées au laboratoire de virologie sont représentés en ocre clair sur le plan de la figure 1. Ces pièces sont climatisées et se décomposent ainsi :

- Bureaux spécifiques pour la virologie : 6 bureaux soit 54 m² dont 18 m² spécifiques pour le CNR.
- Virologie classique, culture de cellules, de virus : 3 pièces dont une en surpression, soit 60 m² en grande partie dédiées au CNR.
- Biochimie, immunologie : 2 pièces soit 50 m² pour moitié dédiées au CNR.
- Pièces pour les ultracentrifugeuses, l'immunofluorescence.
- Zone de biologie moléculaire commune pour les services de microbiologie dont l'activité CNR :
 - Pièces Pré PCR : préparation des « mixt », pièces d'extraction.
 - Pièces pour thermocycleurs.
 - Pièces post-PCR dont 2 sont exclusivement dédiées aux activités du CNR.

Autres locaux disponibles :

Laboratoire L3 : 30 m² ; Cytométrie en flux, 1 pièce de préparation et une pièce d'analyse: environ 30 m².

Secrétariat commun.

Laverie commune.

b. Les équipements

Tout l'équipement nécessaire pour la biologie moléculaire :

Amplificateurs classiques et temps réel, électrophorèse, lecteurs de gel, salles pré et post PCR.

Extracteur automatique d'acides nucléiques (BioMérieux et Beckmann).

Ultracentrifugeuses.

Appareils d'immuno-analyse (ELISA).

Immunofluorescence, appareil pour ELISPOT ;

Tout l'équipement pour la culture de cellules et l'isolement de virus:

Hotte à flux laminaire, étuves, incubateurs à CO₂.

Salle propre en surpression de type L2.

Laboratoire de type L3 et son équipement.

Séquenceur (en service commun).

Animalerie (service commun).

Accès au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Dijon (Centre Ferdinand Cabanne).

2.3. DEMARCHE QUALITE DU CNR

Le CNR des virus entériques est associé aux activités d'analyse du laboratoire de virologie et de sérologie du CHU de Dijon et entre donc, dans le cadre de leurs activités communes, dans la démarche qualité des analyses de biologie au sein du laboratoire.

En complément de ces activités de diagnostic, les analyses spécialisées effectuées au sein du CNR des virus entériques sont régies par un **système documentaire spécifique**. Cette activité d'expertise est aussi soumise à des **contrôles de qualité internes systématiques** afin de garantir les résultats rendus par le CNR des virus entériques. Dans ce même souci de qualité, le CNR des virus entériques participe tout au long de l'année à des **contrôles de qualité externes spécifiques**. Ces contrôles de qualité sont organisés par le réseau européen de laboratoires spécialisés que nous avons constitué. Deux types de contrôles de qualité externe ont ainsi été mis en place, l'un concerne la **détection et la caractérisation des calicivirus humains** et est géré par le RIVM aux Pays Bas, l'autre concerne la **détection et la caractérisation des rotavirus** et est géré par le Laboratoire spécialisé du Public Health Agency en Grande Bretagne.

Nous avons accès au Centre de Ressources Biologiques des CHU de Dijon-Besançon (Centre Ferdinand Cabanne) qui a été accrédité en 2009.

Enfin, toujours dans son approche de qualité, le CNR des virus entériques lui-même s'est engagé **sur la voie de l'accréditation COFRAC** selon la norme ISO 15189 pour l'horizon 2010.

3. ACTIVITE D'EXPERTISE

3.1. CAPACITE TECHNIQUE DU CNR

3.1.1. Liste des techniques de référence disponibles

Nous disposons de toutes les techniques de **biologie moléculaire** permettant le diagnostic et la caractérisation génotypique des norovirus, sapovirus, rotavirus (groupe A et C), adénovirus, astrovirus, Aichi virus, Torovirus et Coronavirus. Ces techniques reposent sur l'amplification par RT-PCR ou PCR suivie d'un « séquençage » de la (ou des) portions génomiques amplifiées. Les analyses phylogénétiques des souches sont réalisées à l'aide de logiciels tels que « CodonAligner » et « Bionumériques » avec une base de données constituée de toutes les souches caractérisées dans le cadre du réseau européen, base de données qui est continuellement mise à jour.

- Nous avons développé des techniques de **PCR en temps réel** pour les **norovirus murin**, les **norovirus humains** GGI et GGII et pour les **rotavirus**. Ces techniques sont également utilisées pour apprécier la diminution de la « charge virale génomique » après traitement in vitro pour l'évaluation de l'efficacité virucide d'un traitement technologique des aliments ou in vivo chez la souris pour des essais de protection par immunisation ou autre traitement. Ces techniques de PCR temps réel sont également utilisées pour détecter et quantifier le virus excrété dans les selles de patients transplantés afin d'adapter les traitements anti-suppresseurs.
- Nous avons adapté cette technique à la détection d'autres virus entériques, notamment les **adénovirus**.
- Nous maîtrisons les techniques de **culture du norovirus murin** et nous utilisons ce virus très proche des norovirus humains comme substitut dans l'évaluation des désinfectants et antiseptiques ou l'évaluation de l'efficacité virucide d'un traitement technologique des aliments.
- Nous avons adapté les nouvelles souches de **virus Aichi** en culture sur cellules afin d'obtenir des quantités suffisantes pour sa caractérisation. Aujourd'hui, nous avons une collection des différentes souches et un stock d'antigène pour la réalisation de **tests sérologiques Aichi virus** nécessaires aux enquêtes de prévalence que nous conduisons en France et dans les pays du bassin Méditerranéen ou d'Afrique.
- Nous disposons de toutes les techniques immunologiques (ELISA, **Cytomètre en flux**, **ELISPOT**) pour détecter les antigènes de virus ou réaliser des études sur la réponse immune aux infections entériques.
- Par ailleurs, nous avons accès à un service de **microscopie électronique** par une convention entre le CHU et l'INRA.

3.1.2. Collection de souches, d'antigènes ou d'anticorps de référence

Collection de souches ou prélèvements.

○ Notre **collection de souches** parfaitement caractérisées est importante en quantité et en diversité. Elle comprend la plupart des génotypes connus de rotavirus, norovirus (plus de 1000 souches de chaque) et la plus importante collection de souches d'Aichivirus. Nous fournissons plusieurs laboratoires en Europe et dans le reste du monde en réactifs de référence.

- Elle comprend également de nombreuses souches d'astrovirus, de sapovirus avec une diversité de sérotypes ou de génotypes ;

Au total, notre collection comprend la plupart des génotypes de norovirus et de rotavirus détecté chez l'homme et une grande variété de souches de sapovirus, d'astrovirus et d'Aichi virus. Cette collection nous permet, entre autre, l'évaluation des nouveaux réactifs ainsi que la fourniture de contrôles externes aux laboratoires français souhaitant développer le diagnostic de ces virus entériques.

L'ensemble des caractéristiques des virus de notre collection est inclus dans une **banque de données européenne** (séquences génomiques, localisation de l'épidémie, origine de la contamination). Outre l'entrée de ces données, notre participation concerne la vérification et la comparaison des séquences génomiques de cette banque de données avec les virus caractérisés dans notre laboratoire.

Collection de gènes clonés et de pseudo particules virales (VLPs).

- La plupart des virus responsables de gastroentérites ne se multiplie pas sur cellules – ou pour certains difficilement - et ne peuvent donc être purifiés et concentrés. Pour les souches d'intérêt qui risqueraient de ne plus être disponibles après épuisement du prélèvement, nous avons développé un programme de **clonage de leur génome** afin de les conserver sous forme de **plasmide**. Nous pouvons ainsi disposer d'une source inépuisable du matériel génétique des souches virales d'intérêt.
- Concernant les norovirus humains, nous avons entrepris un programme d'expression du gène codant la protéine de capsid afin de fabriquer des **pseudo-particules recombinantes de norovirus (VLPs)**. Nous disposons des VLPs de plusieurs souches de norovirus de génogroupe I (GGI.1 et GGI.2) et génogroupe II (GGII.3, GGII.4 (souches Bristol, US95/96, Hunter, 2006a, 2006b, Le Caire, 2008). Les VLP GGI.1 et GGII.4(Bristol) ont été fabriquées par le NIH-USA et cet organisme nous a confié ces VLP pour des travaux académiques.

Collection d'anticorps monoclonaux.

- **Anticorps monoclonaux anti rotavirus** : Nous disposons d'une collection d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines VP6 et VP4 du rotavirus. Ces anticorps monoclonaux sont utilisés en diagnostic dans certains réactifs commercialisés.
- En collaboration avec BioMérieux, nous développons un programme de fabrication d'anticorps monoclonaux dirigés contre les norovirus humains à partir des pseudo-particules (VLP) précédemment citées. Nous disposons d'anticorps monoclonaux obtenus à partir des génogroupes I et II (GGI et GGII). Ces anticorps seront utilisés (1) pour l'étude de l'évolutivité des souches de génogroupe II et de génotype 4 (GGII.4) et (2) pour le développement d'un réactif de diagnostic par immuno-chromatographie.

Conditions de mise à disposition des souches.

- **Nos prélèvements sont conservés en aliquotes à -40°C ou -80°C et disponibles gratuitement à tous les laboratoires publics ou privés** qui en feraient la demande. Ainsi, durant l'année 2009 nous avons transmis des souches parfaitement caractérisées à plusieurs laboratoires en France et à l'étranger.

3.2. ACTIVITE D'EXPERTISE EN 2009

3.2.1. Evaluation de trousse de diagnostic par le CNR

Diagnostic des rotavirus humains.

Durant l'année 2009, nous avons évalué et comparé les différentes trousse de détection des rotavirus par immuno-chromatographie commercialisées ou en développement par les sociétés Covalab, Coris Bioconcept et Inverness medical.

Diagnostic des norovirus humains.

Nous avons évalué trousse de détection des norovirus par immuno-chromatographie commercialisées par Rd Biopharm. Pour ce réactif, nous avons trouvé une sensibilité d'environ 78,9% pour les géotypes GGII.4 mais une très faible sensibilité pour les autres géotypes de norovirus. Nous évaluons actuellement les trousse des sociétés Méridian (réactif Denka) et Biosynex. Durant l'année 2010 nous serons en mesure de fournir une évaluation comparative des trois trousse de diagnostic par immunochromatographie disponibles.

3.2.2. Evaluation de procédés virucides

Nous avons utilisé le norovirus murin (MNV) comme substitut aux norovirus humains pour évaluer différents antiseptiques et désinfectants.

Nous utilisons également ce virus murin couplé aux techniques de PCR quantitative pour évaluer **l'efficacité virucide des traitements technologiques utilisés dans l'industrie agro-alimentaire**. La maîtrise de ce savoir faire nous permet également de collaborer avec différents laboratoires publiques ou privés dans le cadre de contrats ANR (ADHERESIST et SPICECLEAN).

3.2.3. Investigations virologiques de cas sporadiques

- Contexte des demandes :
 - Entérocolites ulcéro-nécrotiques → recherche moléculaire des virus mentionnés ci-dessous.
 - Syndrome méningé sans pathogène identifié mais associé à une gastro-entérite, notamment à rotavirus. → Recherche moléculaire du virus dans le LCR.
 - Gastro-entérites survenant après vaccination anti-rotavirus. → détection moléculaire du virus puis caractérisation du géotype.
 - Infections nosocomiales chez des patients fragilisés (néonatalogie, immunodéprimés, etc..) → Conseils et recherche de virus.
 - Surveillance de patients immunodéprimés.
 - Contexte médico-légal ou autre...
- La recherche peut être ciblée sur un des virus entériques ci-dessous ou englober l'ensemble des virus susceptibles d'être la cause de la pathologie :
 - **Rotavirus, Norovirus** et aussi Sapovirus, Astrovirus, Adénovirus tous types, Virus Aichi, Entérovirus, Paréchovirus, Coronavirus, Bocavirus et Cytomégalovirus.

3.2.4. Investigations virologiques des épidémies

- Dans la quasi-totalité des épidémies, l'alerte a été effectuée par l'InVS et les DDASS concernées. Les souches ont été transmises par les laboratoires publics ou privés. L'acheminement a été effectué par voie postale dans la plupart des cas et les frais étaient remboursés au laboratoire expéditeur ou plus rarement – lorsque le nombre de prélèvements le justifiait - par un transporteur agréé ayant une convention avec le CNR (société TSE).

• Durant l'année 2009 nous avons expertisé 185 épidémies se répartissant sur l'ensemble du territoire. Cent cinquante deux (82%) étaient positives pour au moins 1 virus entérique. De ces épidémies, 756 prélèvements ont été analysés dont 509 étaient positifs pour au moins un des virus entériques.

Epidémies 2009	Virus	Aichi	Adéno	Astro	Noro	Sapo	Rota A	Entéro	Agent inconnu ou non viral
Nbre: 185	Monoinfections : 143	1	0	1	130	1	10	0	33
	Infections mixtes : 15	3*	0	3*	15*	2	4	1	

Tableau 1 : Epidémies investiguées et virus recherchés et caractérisés. (* triple infection norovirus-Aichi virus et astrovirus)

3.2.5. Principales souches virales caractérisées dans ces épidémies:

- **Norovirus** : 146 souches caractérisées.
 - 9 GGI :
 - GGI.2, GGI.4, GGI.5, GGI.10, GGI.14.
 - 137 GGII :
 - GGII.2, GGII.6, GGII.12, GGIIb/GGII.1
 - GGII.4 : variants 2006a, 2006b, Le Caire, 2008, 2006a/2008
- **Rotavirus** : les principaux génotypes G1,P[8] ; G2,P[4] ; G3,P[8] ; G4,P[8] ; G9,P[8].

3.2.6. Caractéristiques des 185 gastroentérites collectives

• *Lieu de l'épidémie*

Dans la plupart des cas (146/185 soit 78,9%) ces épidémies survenaient en **maisons de retraite**. Les autres origines étaient : une école ou une crèche (8 soit 4,3%), un service hospitalier (17 soit 9,2%), une réception (10 soit 5,4%), un centre de loisirs pour adultes (3 soit 1,6%).

• *Mode de transmission*

La transmission était inconnue pour 103 épidémies (55,7%), de personne à personne pour 57 épidémies (soit 30,8%). Une origine alimentaire a été prouvée pour 25 épidémies (13,5%).

3.2.7. Conclusion des activités d'expertise

- Les **norovirus** sont la première cause des gastroentérites collectives investiguées dans notre laboratoire et dans la grande majorité des cas il s'agit de norovirus appartenant au génogroupe II et plus précisément au génotype 4 (**GGII.4**). Souvent cette souche est responsable d'épidémies survenant en **maison de retraite** avec comme mode de contamination la **transmission de personne à personne**.
- Le second point devant être souligné est la très **grande capacité évolutive des norovirus GGII.4**. Le variant prédominant en 2008-2009 était 2006b qui a persisté durant l'année 2009. Durant cette année 2009 sont apparus deux variants – 2008 et Le Caire – qui sont resté minoritaire et pour l'hiver 2009-2010 un nouveau virus, recombinant entre 2008 pour la capsid et 2006a pour l'ORF1 a été responsable de la majorité des épidémies.

4. ACTIVITE DE SURVEILLANCE

4.1. SURVEILLANCE MOLECULAIRE DES ROTAVIRUS EN MILIEU PEDIATRIQUE HOSPITALIER

4.1.1. Réseau de partenaires et répartition géographique

Nous avons mis en place dès 2001 une procédure de surveillance moléculaire des souches de rotavirus en milieu pédiatrique en prévision de la prochaine disponibilité de vaccins anti-rotavirus. Depuis 2004 et surtout l'hiver 2006 nous avons mis en place un réseau français de surveillance épidémiologique et moléculaire des souches de rotavirus. Celle-ci implique 10 CHU de province et 3 établissements de l'Assistance Publique de Paris (figure 2). S'ajouteront pour les années 2008 à 2010 un groupement de laboratoires privés de la région parisienne (Val de marne) et un autre de la région dijonnaise.

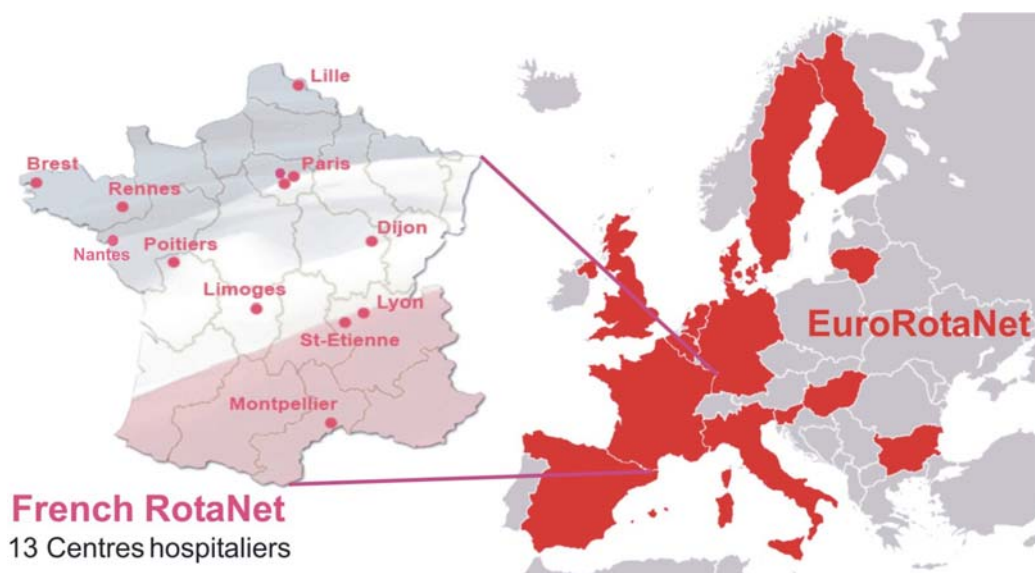


Figure 2 : Répartition des centres participant à l'étude rotavirus en milieu pédiatrique

Services concernés pour le recrutement des enfants :

- Services des urgences pédiatriques
- Services de pédiatrie générale ou de pédiatrie infectieuse.
- Services de néonatalogie
- Consultations

Les services de virologie de chaque centre étant chargés de collecter les prélèvements

Ce réseau national est connecté à un plus large réseau européen – **EuroRotanet** - calqué sur le réseau déjà mis en place avec le programme « EVENT ».

4.1.2. Principaux résultats

Saison 2008-2009 : Douze centres ont envoyé au CNR des prélèvements positifs pour les rotavirus durant la troisième saison (2008-2009) de l'étude (tableau 2a). Cela représente 644 souches totalement ou partiellement. Les principales combinaisons de

génotypes G/P ont été cette année **G1P[8] (55,7%)** suivie de **G9P[8] (25,9%)**, cumulant à elles seules **81,6% des souches détectées** (tableau 2b). Les autres combinaisons courantes G2P[4] (5,0%), G3P[8] (4,2%) et G4P[8] (5,4%) ont été tous détectés à un niveau de prévalence supérieur aux dernières saisons, notamment G4P[8] qui était absent la saison dernière. Tous les trois ont été observés dans une proportion similaire d'environ 5% de prévalence.

Centre	Nbre d'échantillon	Centre	Nbre d'échantillon
Brest	67	Nantes	54
Dijon	70	Paris Armand-Trousseau	42
Lille	41	Paris Robert-Debré	9
Limoges	50	Paris St-Vincent-de-Paul	66
Lyon	65	Poitiers	15
Montpellier	38	Saint-Etienne	128

Tableau 2a : Participation des centres durant la saison 2008-2009.

		Génotype P						Total	%
		4	6	8	14	4+8	NT		
Génotype G	1		2 (0,2%)	359 (55,7%)			3 (0,5%)	363	56,5
	2	32 (5,0%)				1 (0,2%)		33	5,1
	3		1 (0,2%)	27 (4,2%)			1 (0,2%)	29	4,5
	4	1 (0,2%)						36	5,6
	8		1 (0,2%)		1 (0,2%)			2	0,5
	9			167 (25,9%)				167	25,9
	12			1 (0,2%)				1	0,2
	1+2					1 (0,2%)		1	13 infections mixtes (2,0%)
	1+4			2 (0,3%)				2	
	1+9			7 (1,1%)				7	
	3+4			1 (0,2%)				1	
	4+9			2 (0,3%)				2	
	NT			1 (0,2%)				1	
Total	33	3	602	1	2	4	645		
%	5,1	0,5	93,3	0,2	0,3	0,6		100	

NT : non typable

Tableau 2b : Distribution des combinaisons génotypiques des rotavirus détectés au cours de la saison 2008-2009.

Bilan de la surveillance des rotavirus depuis 2006 (tableaux 3 et 4, figures 3-8) :

Durant les trois saisons de l'étude multicentrique nous avons analysé 2044 prélèvements et caractérisé le génotype de 1947 souches de rotavirus. Les résultats d'ensemble, avec la répartition mensuelle, sont présentés dans les tableaux 3a et 3b et la figure 3. Le **génotype G1 est prédominant** sur l'ensemble de l'étude (61,7% ; 55,9%-69,6%) **suivi par le génotype G9** (27,4% ; 26,6%-28,4%). La prévalence des autres génotypes varie selon l'année, notamment le génotype G2. Au contraire, les génotypes P sont largement dominés par le génotype P[8] (92,9% ; 84,8%-96,9%) (tableau 3a).

Les 5 combinaisons génotypiques majeures - G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] et G9P[8] – représentent 95,5% des souches isolées (94,2%-97%). Les 2 plus communément détectées étant G1P[8] (59,2%) et G9P[8] (25,1%). Les infections mixtes représentent 2,9% des souches soit 56 isolats. Les souches ou combinaisons génotypiques inhabituelles représentent 1,6% de l'ensemble soit 31 souches (tableau 3b).

Sur l'ensemble de la France, le pic des infections à rotavirus apparaissait en février ou mars pour les deux dernières saisons (2007-08 et 2008-09) et plus tardivement, en avril, pour la première saison (2006-07). Ces différences ne peuvent être expliquées par la prédominance d'un génotype pour une saison donnée (figure 3). Mais cette distribution globale ne reflète pas la situation de chacun des centres. Il semble que les épidémies à rotavirus apparaissent 1 à 2 mois plus tôt en région parisienne (figure 4). Ce phénomène, qui demande à être confirmé, pourrait être lié à la densité de la population dans les transports en commun plus spécifique à la région parisienne qu'aux autres centres étudiés.

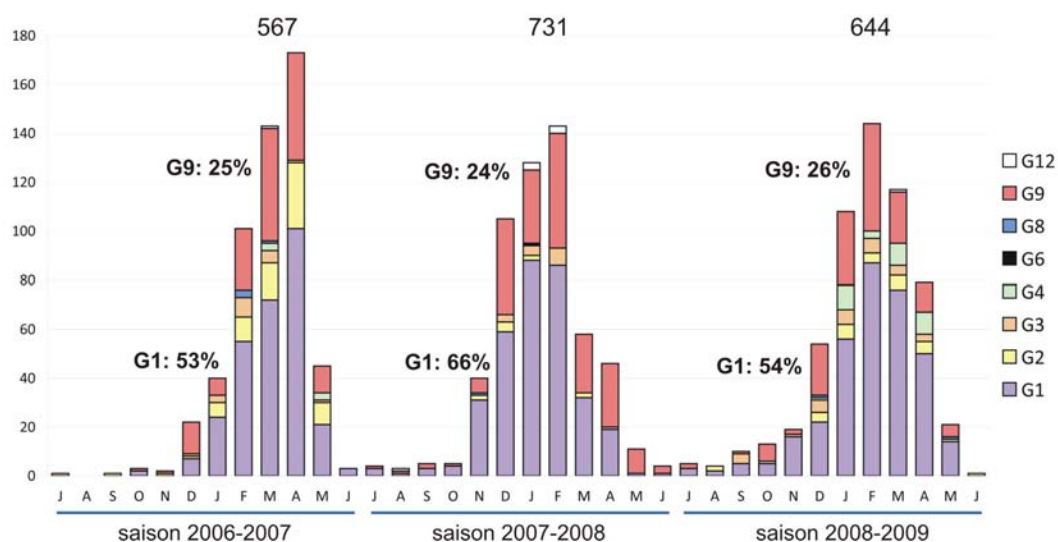


Figure 3. Distribution mensuelle des génotypes G des rotavirus (juillet 2006 à juin 2009).

Variations temporo-spatiale (figure 5 à 8) :

Nous avons détecté le génotype G9 pour la première fois en France en 1998, les études épidémiologiques que nous avons conduites par la suite ont montré que ce génotype restait rare. Mais durant l'hiver 2004-2005 le génotype G9 est devenu brusquement la souche majoritaire et reste depuis, au moins en France, le deuxième génotype en termes de fréquence, après le génotype G1.

La surveillance que nous avons conduite durant ces 3 dernières années montre cependant qu'il existe une variabilité selon les années et les centres et, pour l'étude européenne, selon les pays (figures 6 et 7). Pour ce qui concerne le génotype G9, sa prévalence reste élevée en France, de l'ordre de 25%, alors que cette prévalence décroît dans les autres pays européens.

Cette variabilité constatée pour les génotypes G n'est pas retrouvée pour les génotypes P. Le génotype P[8] est très largement majoritaire tout au long de l'étude et quelque soit le centre d'origine du prélèvement (figure 6).

Tableau 3a	Nombre de souches détectées selon les saisons (%)			Total (%)
	2006-2007 n=567	2007-2008 n=736	2008-2009 n=644	2006-2009 n=1947
Génotype G^a				
G1	317 (55,9)	512 (69,6)	373 (57,9)	1202 (61,7)
G2	77 (13,6)	15 (2,0)	34 (5,3)	126 (6,5)
G3	22 (3,9)	25 (3,4)	30 (4,7)	77 (4,0)
G4	6 (1,1)	2 (0,3)	41 (6,4)	49 (2,5)
G6	0	2 (0,3)	0	2 (0,1)
G8	4 (0,7)	1 (0,1)	2 (0,3)	7 (0,4)
G9	161 (28,4)	196 (26,6)	176 (27,3)	533 (27,4)
G12	2 (0,4)	8 (1,1)	1 (0,2)	11 (0,6)
Génotype P^a				
P[3]	1 (0,2)	0	0	1 (<0,1)
P[4]	73 (12,9)	14 (1,9)	32 (5,0)	119 (6,1)
P[6]	7 (1,2)	3 (0,4)	3 (0,5)	13 (0,7)
P[8]	481 (84,8)	713 (96,9)	615 (95,5)	1809 (92,9)
P[9]	1 (0,2)	1 (0,1)	0	2 (0,1)
P[14]	0	1 (0,1)	1 (0,2)	2 (0,1)

^aIncluant les infections mixtes

Tableau 3b	Nombre de souches caractérisées durant les 3 saisons consécutives (%)						Total	
	2006-2007 n=567		2007-2008 n=736		2008-2009 n=644		2006-2009 n=1947	
Souches communes	534	(94.2)	701	(95.2)	625	(97.0)	1860	(95.5)
G1P[8]	300	(52.9)	491	(66.7)	362	(56.2)	1153	(59.2)
G2P[4]	70	(12.3)	12	(1.6)	33	(5.1)	115	(5.9)
G3P[8]	16	(2.8)	18	(2.4)	28	(4.3)	62	(3.2)
G4P[8]	5	(0.9)	2	(0.3)	35	(5.4)	42	(2.2)
G9P[8]	143	(25.2)	178	(24.2)	167	(25.9)	488	(25.1)
Souches inhabituelles	13	(2.3)	12	(1.6)	6	(0.9)	31	(1.6)
G1/G9P[6]	2	(0.4)	0		0		2	(0.1)
G1P[6]	0		0		1	(0.2)	1	(0.05)
G2P[6]	1	(0.2)	1	(0.1)	0		2	(0.1)
G2P[8]	2	(0.4)	0		0		2	(0.1)
G3P[3]	1	(0.2)	0		0		1	(0.05)
G3P[6]	0		0		1	(0.2)	1	(0.05)
G3P[9]	1	(0.2)	0		0		1	(0.05)
G4P[4]	0		0		1	(0.2)	1	(0.05)
G6P[9]	0		1	(0.1)	0		1	(0.05)
G6P[14]	0		1	(0.1)	0		1	(0.05)
G8P[6]	4	(0.7)	1	(0.1)	1	(0.2)	6	(0.3)
G8P[14]	0		0		1	(0.2)	1	(0.05)
G12P[6]	0		1	(0.1)	0		1	(0.05)
G12P[8]	2	(0.4)	7	(1.0)	1	(0.2)	10	(0.6)
Infections mixtes	20	(3.5)	23	(3.1)	13	(2.0)	56	(2.9)

Tableau 3b. Distribution et prévalence des génotypes G ou P (tableau 3a) et des combinaisons des génotypiques G et P (tableau 3b) de rotavirus détectés en France entre 2006 et 2009.

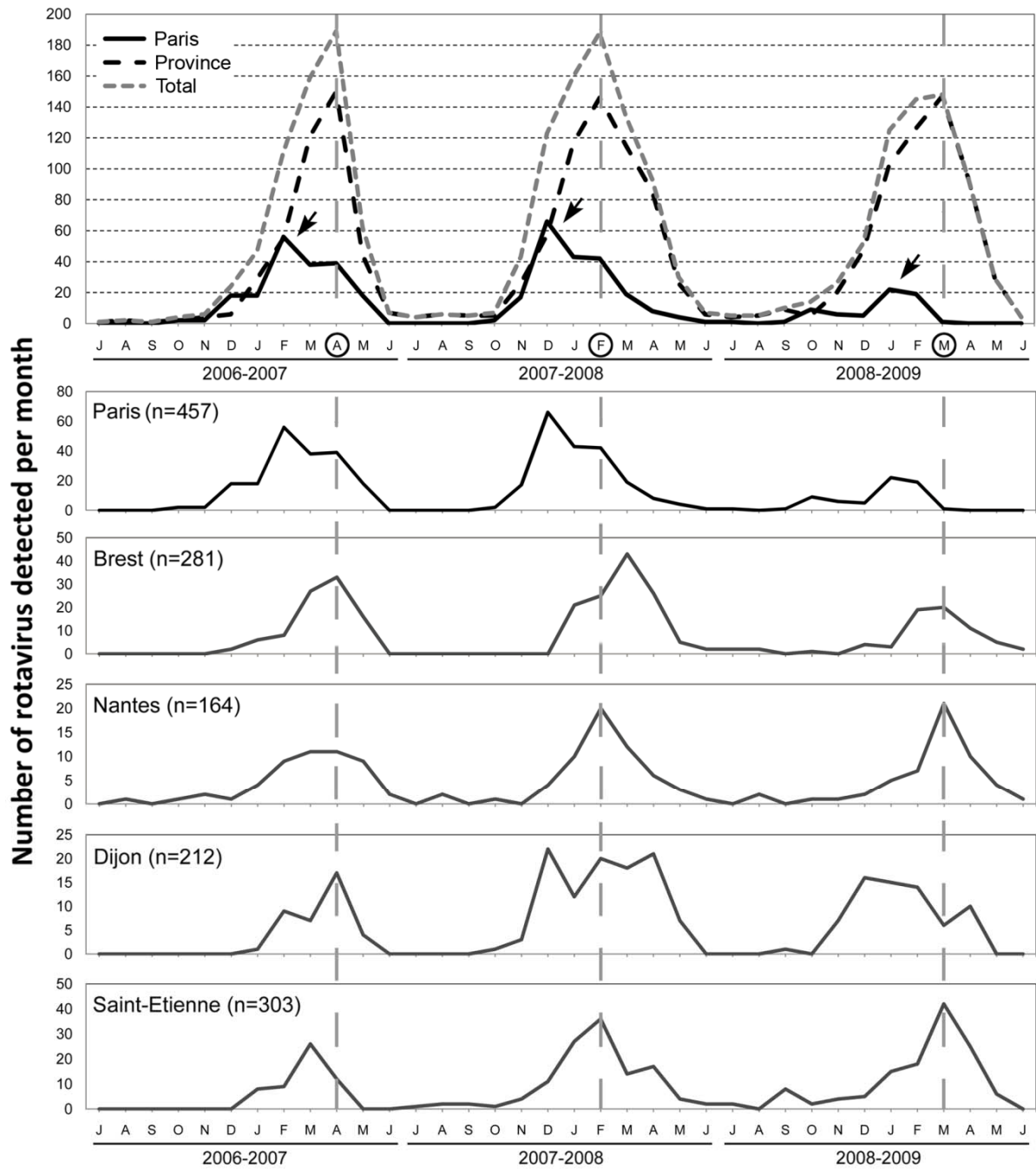


Figure 4. Distribution temporo-spatiale des rotavirus (juillet 2006 à juin 2009) pour l'ensemble de l'étude et pour 5 centres représentatifs (tableau 3b).

Variations temporo-spatiale (figure 5 à 8) :

Nous avons détecté le génotype G9 pour la première fois en France en 1998 et ce génotype était rare. Mais durant l'hiver 2004-2005 le génotype G9 est devenu brusquement la souche majoritaire et reste depuis, au moins en France, le deuxième génotype en termes de fréquence, après le génotype G1. Sur les trois saisons de l'étude (2006-07, 2007-08, 2008-09), les génotypes G1 + G9 représentaient respectivement 77,9%, 91,2% et 82,2% de la totalité des souches caractérisées.

Cependant, il existe une variabilité selon les années et les centres et, pour l'étude européenne, selon les pays (figures 6 et 7). Par exemple pour ce qui concerne le génotype G9, sa prévalence reste élevée en France, de l'ordre de 25%, alors que cette prévalence décroît dans les autres pays européens.

Cette variabilité constatée pour les génotypes G n'est pas retrouvée pour les génotypes P. Le génotype P[8] est très largement majoritaire tout au long de l'étude et quelque soit le centre d'origine du prélèvement (figure 6).

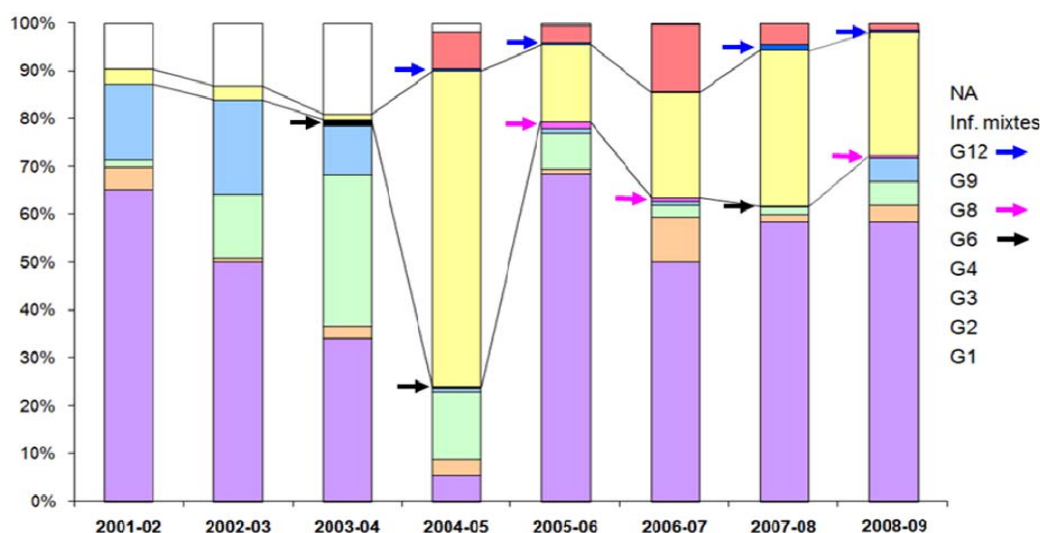


Figure 5. Evolution des génotypiques G de rotavirus en France entre 2001 et 2009.

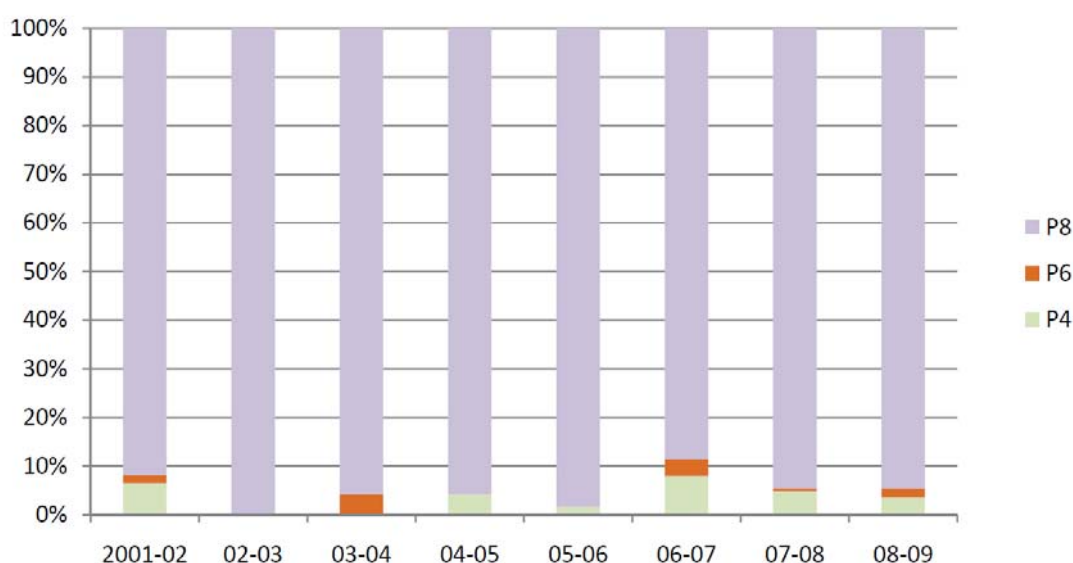


Figure 6. Répartition des génotypes P de rotavirus en France entre 2001 et 2009. Contrairement aux observations relevées pour les génotypes G, le génotype P[8] est très largement prédominant.

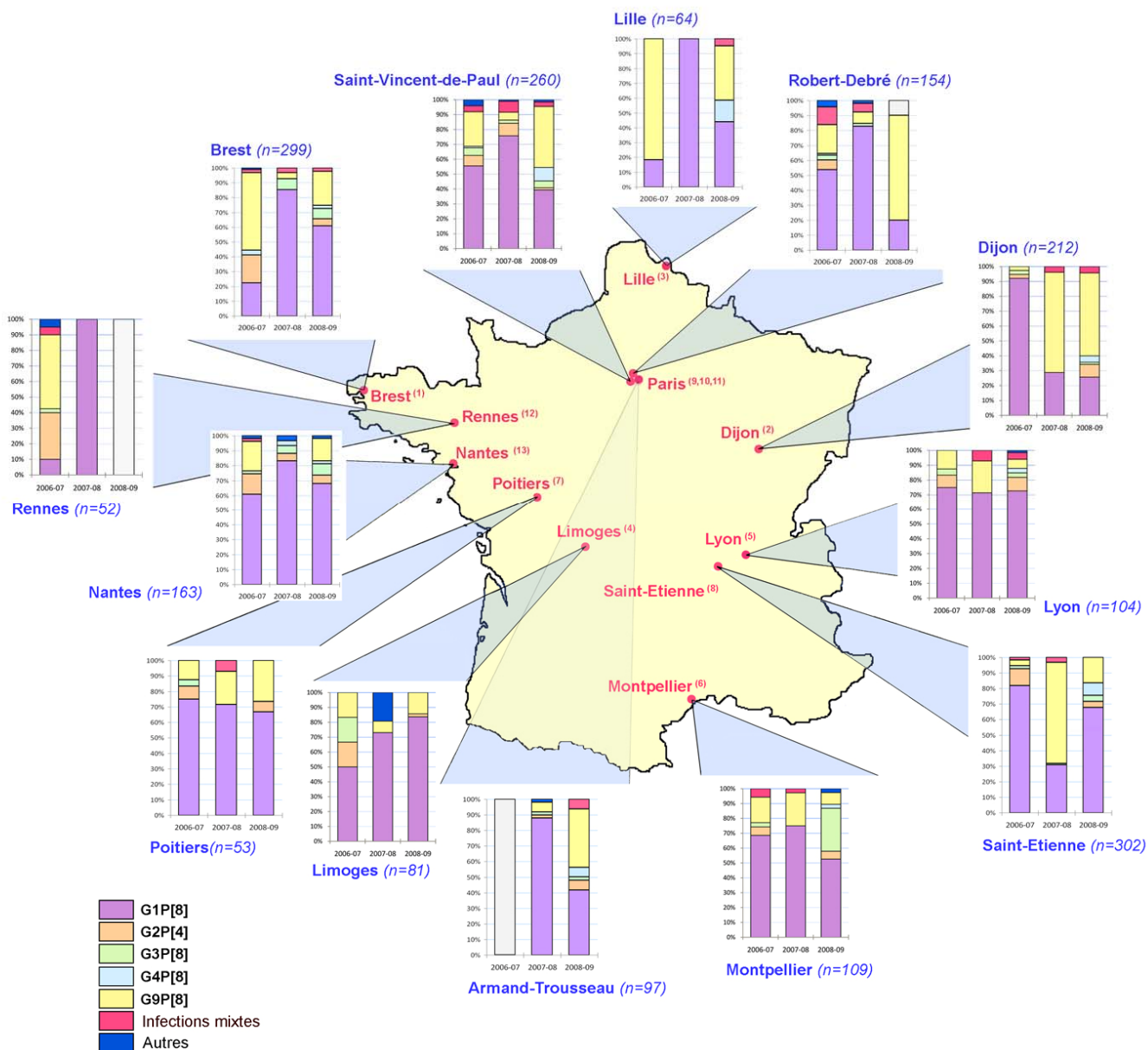


Figure 7. Répartition des combinaisons génotypiques G/P de rotavirus par centre au cours des saisons 2006-2007 et 2007-2008.

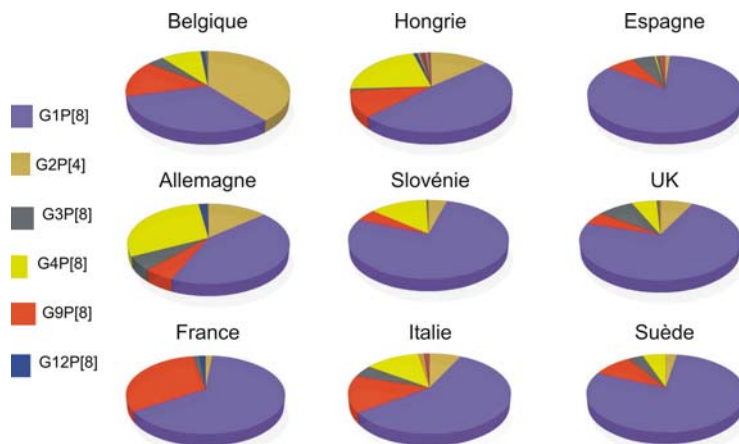


Figure 8 : Comparaison de nos résultats pour la saison 2007-2008 avec ceux d'autres pays du réseau européen du réseau EuroRotaNet.

Souches ou combinaisons inhabituelles (tableau 4 et figure 8) : Il peut s'agir de génotypes habituellement non retrouvés ou rares chez l'homme. Il s'agit des génotypes G6 (2 souches), G8 (7 souches), G12 (11 souches), P[3] (1 souche), P[6] (13 souche), P[9] (2 souche) et P[14] (2 souche). Ces souches peuvent être d'origine animale (bovin, porcin, caprin, félin ou canin). Le tableau 4 indique l'espèce animale d'origine des segments codant les protéines VP7, VP4, VP6 et NSP4 et montre ainsi la possibilité d'infections humaine par des virus réassortants dont certains gènes sont d'origine animale.

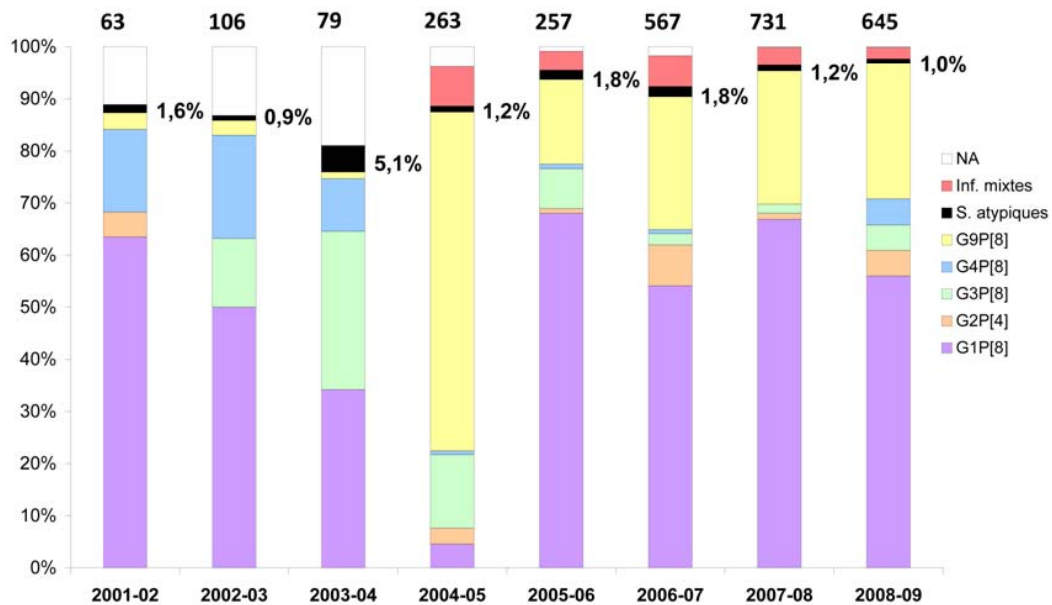


Figure 9. Evolution des génotypes ou combinaisons génotypiques inhabituels de rotavirus en France entre 2001 et 2009 (en noir)

N° de Souche	VP7(G)		VP4(P)		VP6		NSP4		Site	Saison
R2854	1	Hu	6	Hu/Po	II	Hu	B	Hu	Montpellier	2008-2009
R1404	2	Hu	6	Hu/Po	I	An	A	An	Paris SVP	2006-2007
R2776	2	Hu	6	Hu/Po	I	An	A	An	Nantes	2007-2008
R1688	2	Hu	8	Hu	I	An	A	An	Rennes	2006-2007
R1486	3	Hu	3	Hu/Ca/Fe	I	An	C	An	Brest	2006-2007
R3123	3	Hu	6	Hu/Po	I	An	A	An	Paris AT	2008-2009
R1320	3	Hu	9	Hu/Fe	I	An	A	An	Montpellier	2006-2007
R3198	3	Hu	9	Hu/Fe	I	An	A	An	Brest	2008-2009
R3136	4	Hu	4	Hu	II	Hu	B	Hu	Brest	2008-2009
R1737	6	Bo/Ov	9	Hu/Fe	I	An	A	An	St-Etienne	2007-2008
R2775	6	Bo/Ov	14	Hu/Cap	I	An	A	An	Nantes	2007-2008
R1197	8	Bo/Ov	6	Hu/Po	I	An	A	An	Paris RB	2006-2007
R1259	8	Bo/Ov	6	Hu/Po	I	An	A	An	Paris RB	2006-2007
R1265	8	Bo/Ov	6	Hu/Po	I	An	A	An	Paris RB	2006-2007
R1357	8	Bo/Ov	6	Hu/Po	I	An	A	An	Paris SVP	2006-2007
R1853	8	Bo/Ov	6	Hu/Po	I	An	A	An	Paris RB	2007-2008
R2631	8	Bo/Ov	6	Hu/Po	I	An	A	An	Paris SVP	2008-2009
R3265	8	Bo/Ov	14	Hu/Cap	I	An	A	An	Nantes	2008-2009
R1725	12	Hu	6	Hu/Po	II	Hu	B	Hu	St-Etienne	2007-2008
R2728	12	Hu	8	Hu	II	Hu	B	Hu	Nantes	2006-2007
R1196	12	Hu	8	Hu	II	Hu	B	Hu	Paris RB	2006-2007
R1945	12	Hu	8	Hu	II	Hu	B	Hu	Limoges	2007-2008
R1778	12	Hu	8	Hu	II	Hu	B	Hu	Paris SVP	2007-2008
R1956	12	Hu	8	Hu	II	Hu	B	Hu	Limoges	2007-2008
R2237	12	Hu	8	Hu	II	Hu	B	Hu	Paris AT	2007-2008
R1949	12	Hu	8	Hu	II	Hu	B	Hu	Limoges	2007-2008
R1955	12	Hu	8	Hu	II	Hu	B	Hu	Limoges	2007-2008
R1939	12	Hu	8	Hu	II	Hu	B	Hu	Limoges	2007-2008
R2836	12	Hu	8	Hu	II	Hu	B	Hu	Nantes	2008-2009
R1334	1 + 9	Hu	6	Hu/Bo	nt	-	nt	6	Montpellier	2006-2007
R1273	1 + 9	Hu	6 + 8	Hu/Bo	II	Hu	B	Hu	Paris RB	2006-2007

^aAT : Hôpital Armand-Trousseau, Paris; RB : Hôpital Robert-Debré, Paris; SVP : Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Paris.

HU : humain; An: animal; Bo: bovin; Ca: canin; Cap: caprin; Fe: félin; Ov: ovin; Po: porcine

Tableau 4. Risque d'émergence et barrière d'espèce pour les rotavirus de génotypes G6, G8 (origine bovine) et certains G3 (origine canine ou féline).

4.2. SURVEILLANCE DES GASTRO-ENTERITES COMMUNAUTAIRES

Détection et caractérisation moléculaire des virus entériques parmi les gastro-entérites communautaires

L'objectif de cette étude était de 1) détecter et caractériser les virus responsables de gastro-entérites non-hospitalisées ; 2) de conduire, au moins partiellement, cette surveillance en parallèle à celle sur les rotavirus en milieu hospitalier.

Ainsi nous avons sélectionné un premier groupe de 4 laboratoires dijonnais et un second groupe de laboratoire de la banlieue proche de Paris (Val de Marne). L'étude a commencé début novembre 2008 et les résultats présentés couvrent la période de novembre 2008 à février 2009. Les virus recherchés étaient les rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, adénovirus et les virus Aichi. Les laboratoires nous transféraient toutes les coprocultures positives ou négatives qu'ils recevaient.

4.2.1. Fréquence de détection des virus

Au total, 711 échantillons de selles ont été analysés se répartissant ainsi :

- 0-2 ans : 149 selles;
- 2-5 ans : 68 selles ;
- 5-65 ans : 329 selles;
- >65 ans : 165 selles.

Au moins 1 virus a été retrouvé dans 134 (18,8%) selles (figure 10):

- 123 mono-infections : 55 norovirus, 45 rotavirus, 9 astrovirus, 4 adénovirus, 5 virus Aichi, 5 sapovirus.
- 11 infections mixtes : norovirus avec rotavirus (4 selles), sapovirus (2), astrovirus (2), virus Aichi (1) ou bien rotavirus associé à sapovirus (2).

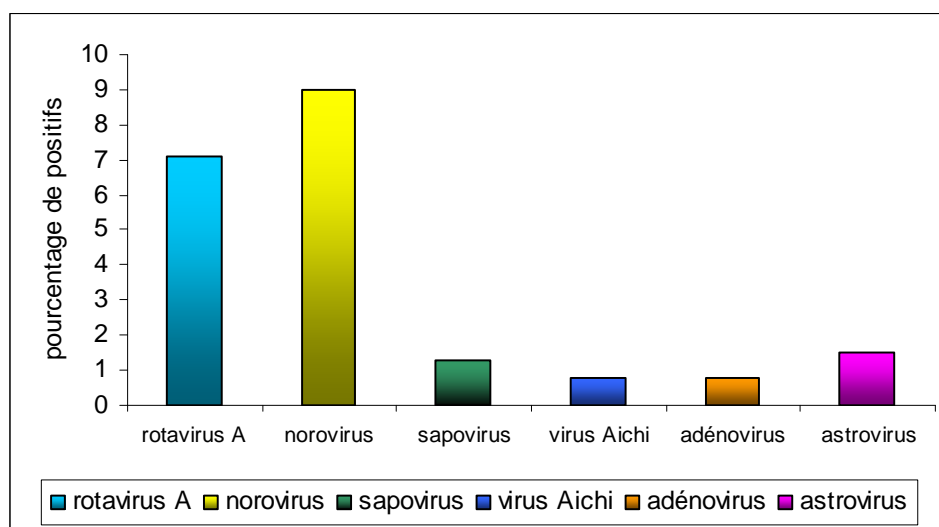


Figure 10 : Fréquence des virus entériques isolés dans les 711 selles de patients diarrhéiques non- hospitalisés.

4.2.2. Distribution des virus selon les groupes d'âge

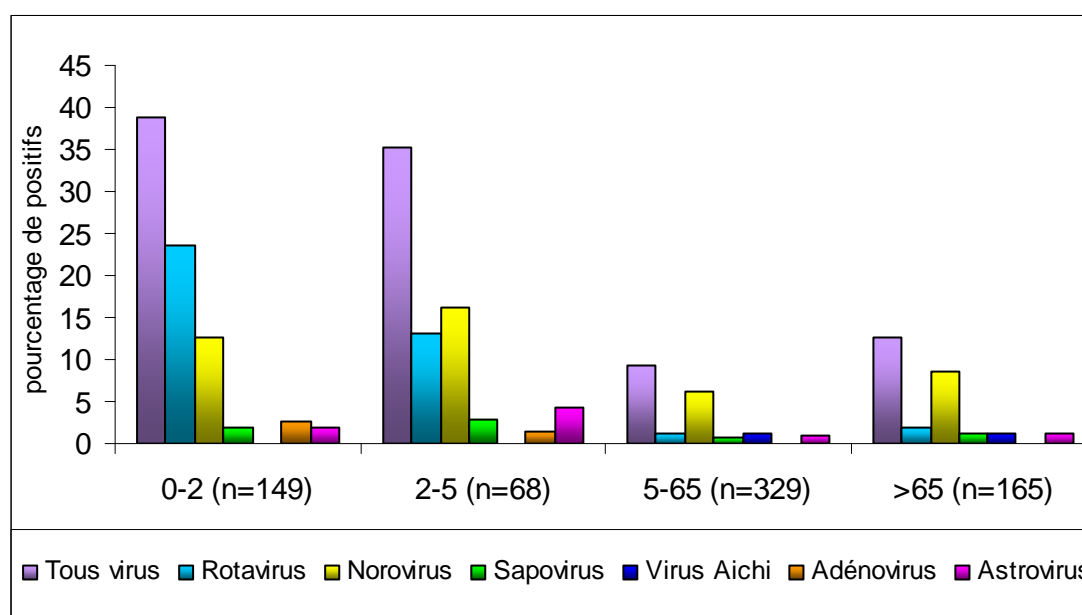
Les virus entériques sont plus fréquemment détectés chez les enfants de moins de 5 ans (figures 11a et 11b):

- 0-2 ans : 38,9% des prélèvements
- 2-<5 ans : 35,3%
- >5-65 ans : 9,4%
- > 65 ans : 12,7%

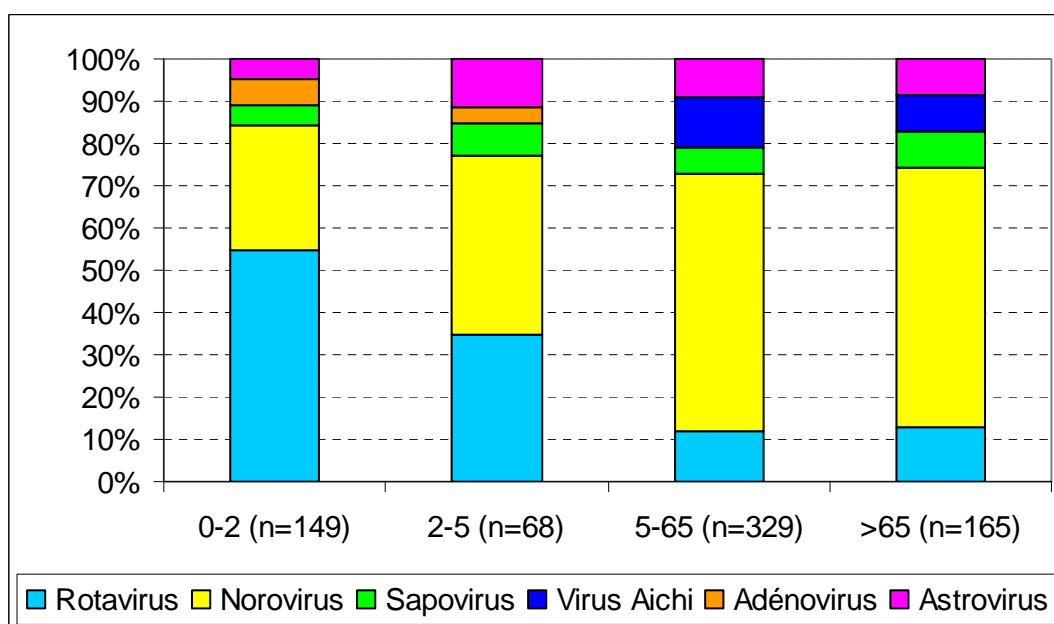
Les infections à rotavirus sont très liées à l'âge. La majorité des rotavirus est retrouvée chez les enfants de moins de 2 ans (figure 11a). Les rotavirus sont la cause de 23,5% des gastro-entérites virales dans cette tranche d'âge. Les infections à rotavirus sont moins fréquentes chez les enfants plus âgés, entre 2 et 5 ans, chez qui elles ne représentent que 13,2% des étiologies.

Les infections à norovirus sont détectées dans toutes les tranches d'âge.

- Chez l'enfant de moins de 5 ans les norovirus sont une cause importante de gastro-entérite. Chez les enfants de moins de 2 ans les norovirus sont la seconde cause derrière les rotavirus (12,7% versus 23,5%). Il sont la première étiologie de gastro-entérites chez les enfants de 2 à 5 ans (16,2% versus 13,2% pour le rotavirus).
- Les norovirus sont par contre la principale cause des gastro-entérites chez les patients de plus de 5 ans. Les autres virus étant minoritaires (figure 11a et b).



a



b

Figure 11 : Distribution des virus entériques en fonction des tranches d'âge

4.2.3. Distribution des géotypes des rotavirus et norovirus

Rotavirus : Le principal géotype de rotavirus circulant dans la population est G9P[8] (56%) suivi de G1P[8] (32%). Cette proportion était différente selon la région étudiée. Dans la région de Dijon le géotype la répartition était G9P[8] (64%) et G1P[8] (23%) alors que dans la banlieue parisienne G9P[8] et G1P[8] représentaient chacun 45% des souches. Ces différences correspondent à celle retrouvées parmi les rotavirus des enfants hospitalisés.

Norovirus : Les norovirus de génogroupe II sont largement prédominantes puisque seule 2 souches de génogroupe I ont été trouvées. Dans la région de Dijon comme dans la banlieue parisienne, les souches de génogroupe II et géotype 4 ont été le plus fréquemment retrouvées avec toutefois des prévalences différentes : 45,8% en région parisienne et 80,6% en région dijonnaise. En région parisienne, les géotypes GGII.2, GGII.6 et GGIIb/II.3 représentent 37% des souches détectées.

4.2.4. Conclusions

Les 6 virus entériques recherchés représentent 18,8% des étiologies des gastro-entérites consultant un médecin généraliste ou un pédiatre de ville. Les rotavirus et les norovirus sont les plus fréquemment détectés mais chez les enfants de moins de 2 ans les rotavirus prédominent alors que dans les autres tranches d'âge se sont les norovirus les plus fréquents.

Parmi les rotavirus, les géotypes G1P[8] et G9P[8] sont les plus fréquents avec des différences selon la région, G9P[8] prédominant à Dijon. Ces différences sont par ailleurs superposables à celles observées chez les enfants hospitalisés.

Le typage moléculaire des souches de norovirus a montré une très forte prédominance du génogroupe II. Malgré une très grande diversité au sein de ce génogroupe, le géotype GGII.4 prédomine.

4.3. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES

4.3.1. Réseau de partenaires et répartition géographique

Nos principaux partenaires sont :

- l'**InVS**, les **DDASS** et les **CIRE** et d'autres part les **services hospitaliers**, les **CLIN** ou les **services d'hygiène des établissements de soins**.

Les **DDASS** ou les **CIRE** notifient les épidémies et déclenchent l'alerte et l'investigation virologique. Plus rarement, l'alerte nous est donnée par un service hospitalier, le **CLIN** ou le service d'hygiène d'un établissement de soins.

Toutes les données nous parvenant sont immédiatement transmises à l'**InVS** pour la coordination des investigations épidémiologiques et virologiques. L'**InVS** et les **CIRE** réalisent les investigations épidémiologiques. **Un point hebdomadaire téléphonique avec l'InVS** est réalisé pour coordonner et suivre au plus près les investigations virologiques et épidémiologiques.

Outre ce point hebdomadaire, nous avons avec les **DDASS** et les établissements concernés des contacts étroits tout au long du traitement de l'épidémie (rendu rapide des résultats, éventuellement résultats intermédiaires, information sur les virus en cause et les antiseptiques ou désinfectants efficaces).

- Les laboratoires de référence pour les produits de la mer, les aliments et l'eau. dans les aliments
 - **IFREMER** - Centre de Nantes (Dr Soizick LE GUYADER) : laboratoires de référence pour les virus entériques dans les produits de la mer. Ce laboratoire fait partie du même réseau européen que le nôtre (« EVENT/DIVINE ») et nous collaborons étroitement et en temps réel pour tous les cas groupés de gastroentérites dont l'origine suspecté est un produit de la mer (alerte, investigation, comparaison des souches etc...).
 - **AFSSA** – LERQAP, Maisons Alfort (Dr Sylvie PERELLE) : laboratoire de référence pour l'eau et les aliments. Nous collaborons étroitement avec ce laboratoire réel pour tous les cas groupés de gastroentérites dont l'origine suspectée est alimentaire ou hydrique (alerte, investigation, comparaison des souches...).
 - **Centre de Référence pour l'Hépatite A**. AP.HP - Paris Paul Brousse (Pr Elisabeth DUSSAIX). Nous collaborons étroitement avec le CNR pour l'hépatite A : nous assurons la détection dans les selles lorsque ce virus est susceptible d'y être retrouvé (épidémie d'origine hydrique par exemple), en cas de positivité le virus ou le prélèvement est adressé au CNR du virus de l'hépatite A pour une caractérisation moléculaire et une enquête virologique spécifique. Par ailleurs ce CNR est intégré dans le même réseau européen « EVENT/DIVINE ».
 - **Centre de Référence de l'Hépatite E**, Hôpital du Val de Grâce, Paris (Dr E. NICAND). Nous collaborons avec le CNR pour l'hépatite E lorsqu'il y a un risque de présence du virus de l'Hépatite E dans un prélèvement. Par ailleurs ce CNR est intégré dans le même réseau européen « EVENT/DIVINE ».
 - **Centre de Référence des entérovirus**, Hospices Civils de Lyon (Pr Bruno LINA). Nous collaborons étroitement avec le CNR des entérovirus : nous assurons la détection dans les selles, en cas de positivité le virus ou le

prélèvement est adressé au CNR des entérovirus pour une caractérisation moléculaire et une enquête virologique spécifique.

4.3.2. Caractéristiques des épidémies

4.3.2.1. Nature et évolution des épidémies

Les figures 12 et 13 montrent l'évolution des épidémies depuis janvier 2008. Pour l'année 2009, période concernant ce rapport, nous avons investigué 185 épidémies (149 en 2008). Le pic des épidémies est apparu en janvier (84 épidémies investiguées) avec une **saisonnalité hivernale très marquée**.

Durant la **saison 2008-2009** l'épidémie de gastro-entérites s'est étalée de novembre 2008 à avril 2009 et nous avons traité 216 épidémies durant cette période. Ce nombre est très largement supérieur à celui des années antérieures et est en grande partie lié à une meilleure notification des épidémies. Néanmoins, la surveillance systématique de 97 établissements pour personnes âgées (EHPA) de l'inter-région Nord-Est a montré que 50% de ces établissements ont été concernés par au moins une épidémie de gastro-entérites durant cette période. Ce pourcentage semble élevé et pourrait indiquer que l'épidémie de gastro-entérites était plus forte durant cette saison 2008-2009. La limitation de l'étude à une seule saison ne nous permet pas de conclusions. Seul le suivi sur un plus long terme d'une « cohorte » d'établissements nous permettra de mieux apprécier la fluctuation annuelle du nombre des épidémies en établissements et d'en tirer des conclusions.

Les données de la **saison 2009-2010** sont partielles (jusqu'en février 2010). Le nombre d'épidémies est moins important que la saison précédente, le pic de janvier 2010 est à 51 épidémies. Le début de l'épidémie est aussi décalé puisque le nombre d'épidémies signalé en novembre et décembre 2009 était faible.

Contexte des épidémies :

Site ou établissement (figure 12): La grande majorité des épidémies son survenues dans des établissements pour personnes âgées ou maisons de retraites : 146 épidémies soit 78,9%. Les autres sites sont des services hospitaliers (17 épidémies, 9,2%), des réceptions (10 épidémies, 5,4%), des écoles (8 épidémies, 4,3%) et 3 épidémies sont survenues dans des collectivités d'adultes. Les épidémies survenant en maisons de retraite et dans les hôpitaux ont une saisonnalité très marquée, celles survenant en milieu scolaire sont observées hiver comme été.

Mode de transmission (figure 13) : Plus d'une fois sur deux, le mode de transmission est inconnu (103 épidémies, 55,7%). Le mode de transmission de personne à personne est retrouvé pour 57 épidémies (30,8%) et une origine alimentaire pour 25 épidémies (13,5%). Durant l'année 2009 nous n'avons pas investigué d'épidémies dues à de l'eau contaminée.

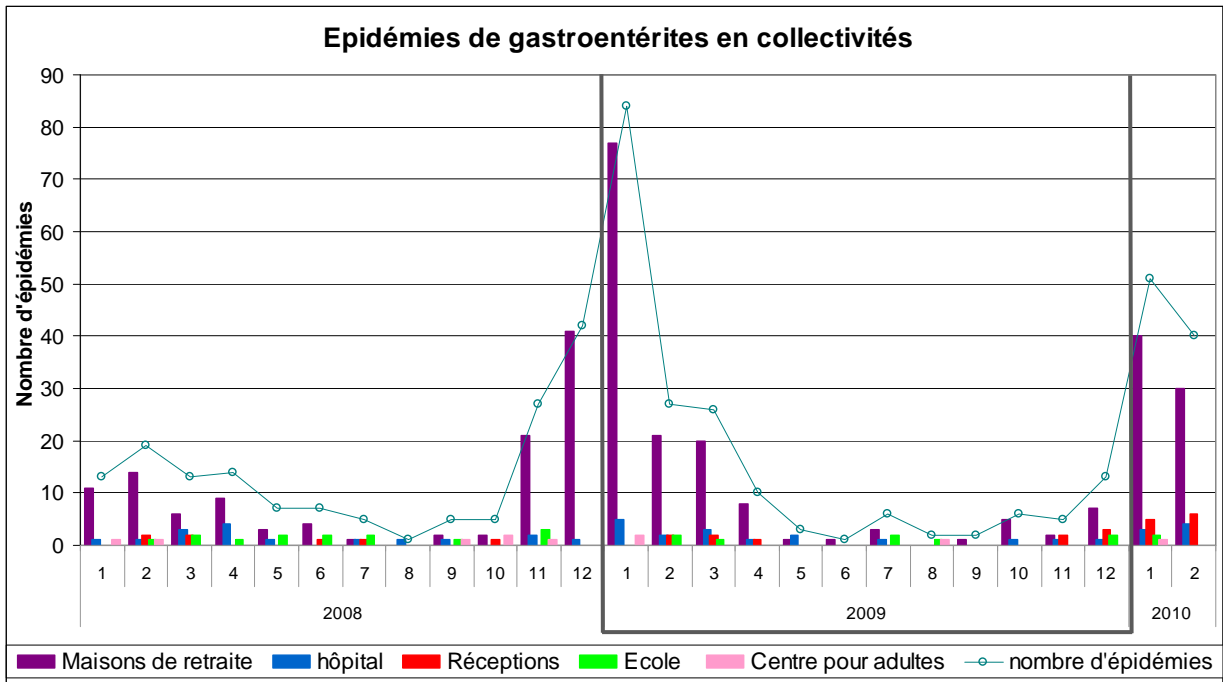


Figure 12 : Evolution des épidémies investiguées selon le site, large prédominance des épidémies en maison de retraite.

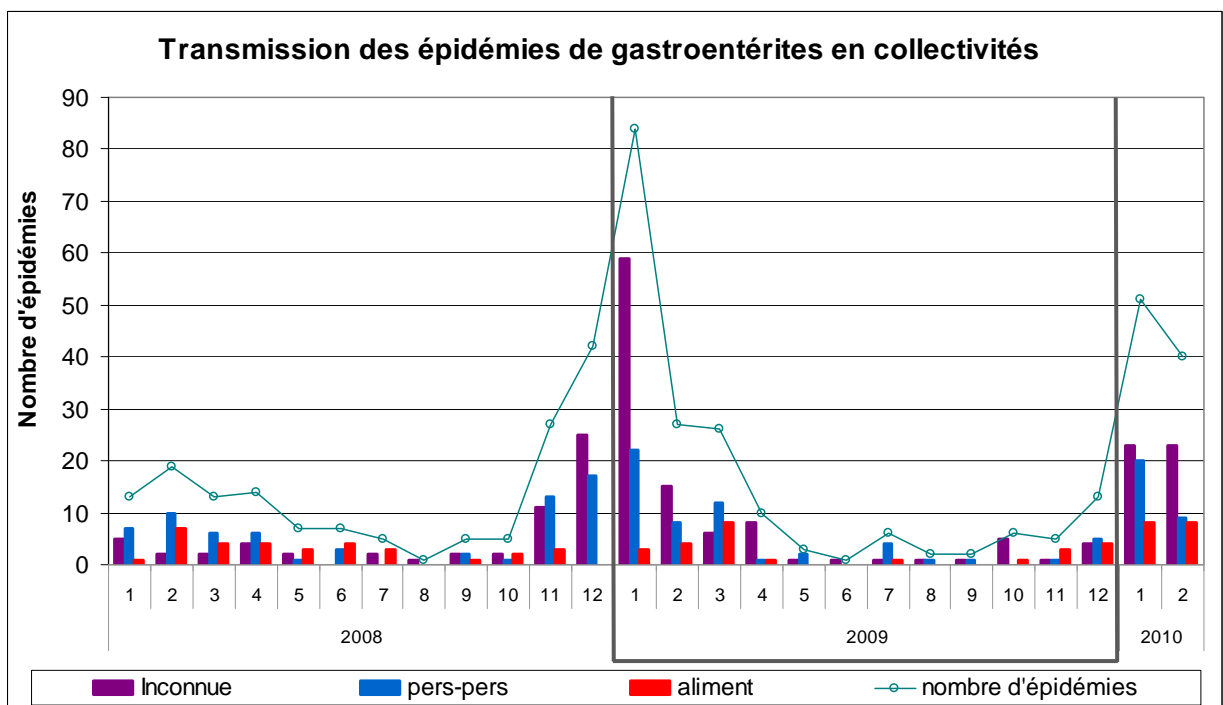


Figure 13 : Répartition des épidémies selon les 2 principaux modes de transmission de personne à personne et alimentaire (inconnue ou non documentée).

4.3.2.2. Virus en cause

Dans la très grande majorité des cas le virus en cause est un **norovirus** (139 épidémies soit 75,1%) et pour 129 épidémies (69,7%) il était le seul virus détecté (figure 14). Parmi les norovirus, ceux du génogroupe II ; et plus particulièrement le génotype 4 (GGII.4), sont largement prédominants (figure 15).

Dans 13 épidémies (7%) nous avons retrouvé un autre virus responsable : 1 **rotavirus** pour 10 épidémies, 1 astrovirus (1 épidémie) et 1 **virus Aichi** (1 épidémie).

Aucun virus était détecté pour 33 épidémies soit 17,8%.

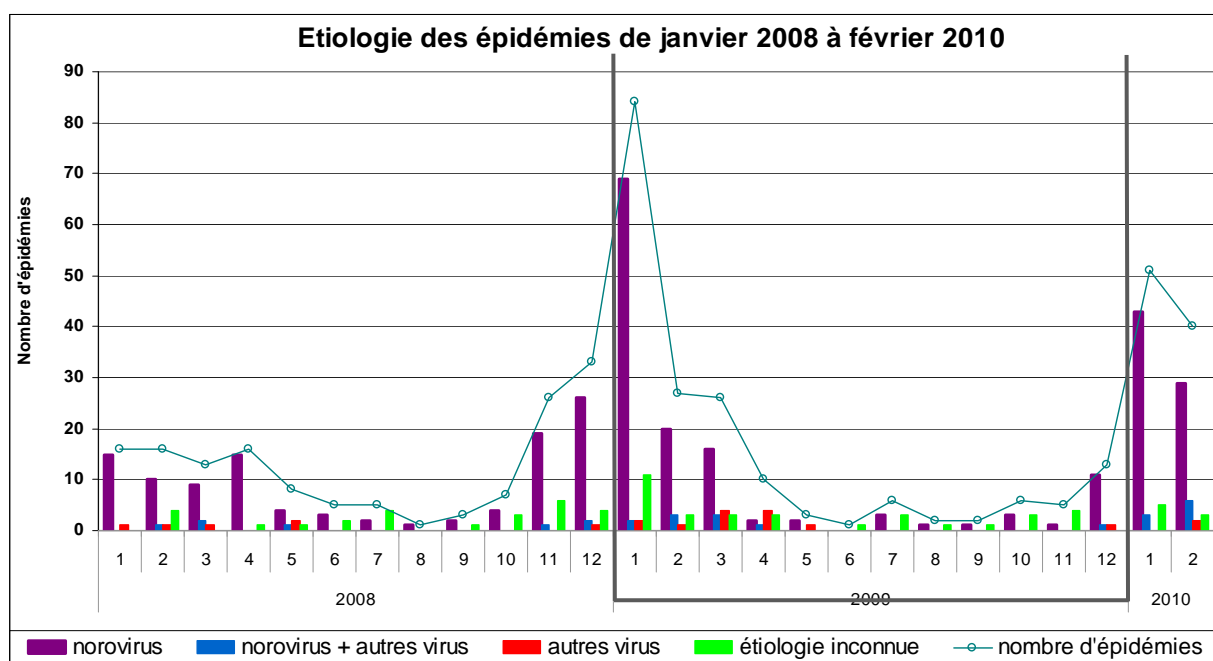


Figure 14 : virus à l'origine de l'épidémie investiguée

Les norovirus GGII.4 sont de loin les plus fréquemment retrouvés lors des épidémies. Ce génotype est responsable de 126 épidémies (figure 15). Les autres génotypes sont responsables de 7 épidémies pour les autres génotypes GGII (GGII.2 : 3, GGII.6 : 1, GGII.12 : 1 et GGIIb/II1 : 2 épidémies).

Les norovirus GGII.4 présentent une grande capacité évolutive. De nouveaux variants sont apparus en 2006 (2006a et 2006b) qui ont co-circulés jusqu'à fin 2007. Durant la saison 2008-2009 et l'année 2009 le variant 2006b était largement prédominant. Les variants 2008 et Le Caire sont apparus mais sont restés minoritaires. Le variant Le Caire avait été précédemment caractérisé par nous même lors d'une étude effectuée en Egypte en 2006-2007.

Durant l'année 2009 est apparu en Europe un nouveau virus résultant d'une recombinaison entre le variant 2006a (région de l'ORF 1 codant les protéines non structurales) et le variant 2008 (région de l'ORF 2 codant la capsid). Nous avons isolé ce nouveau virus dès février 2009 et nous constatons qu'il est le virus prédominant dans les épidémies étudiées de l'hiver en cours (2009-2010). Cette évolution des variants de norovirus est présentée dans les figures 16 et 17.

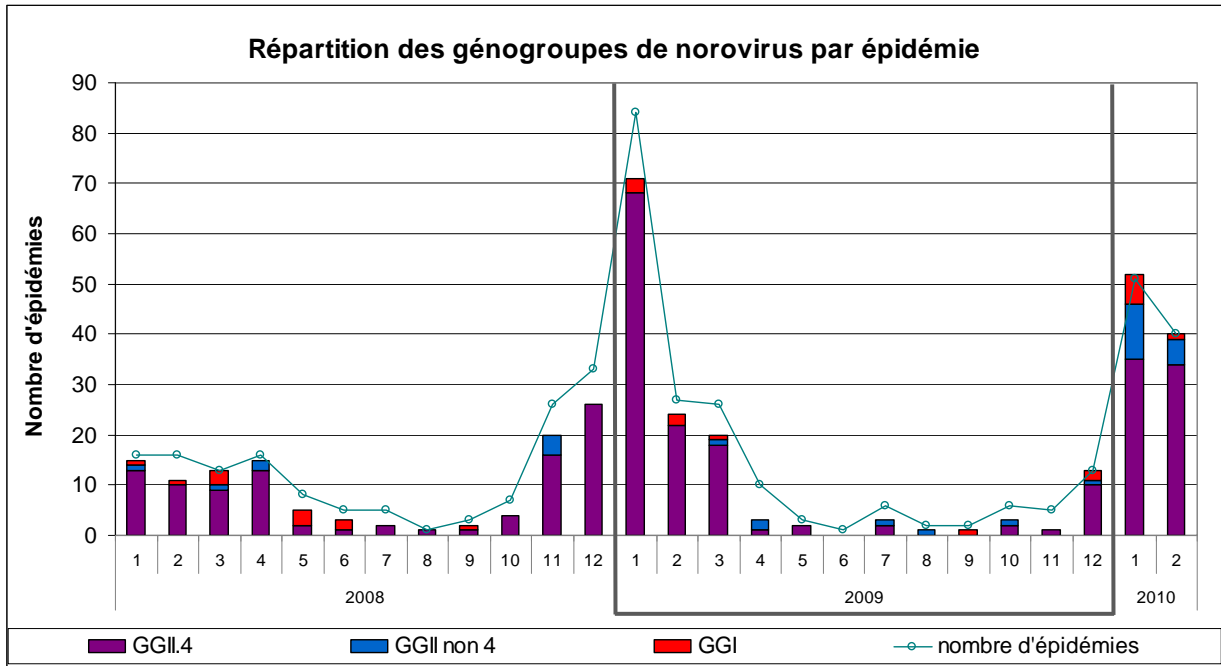


Figure 15 : Importance relative des génogroupes I et II des norovirus au cours des épidémies investiguées durant l'année 2009.

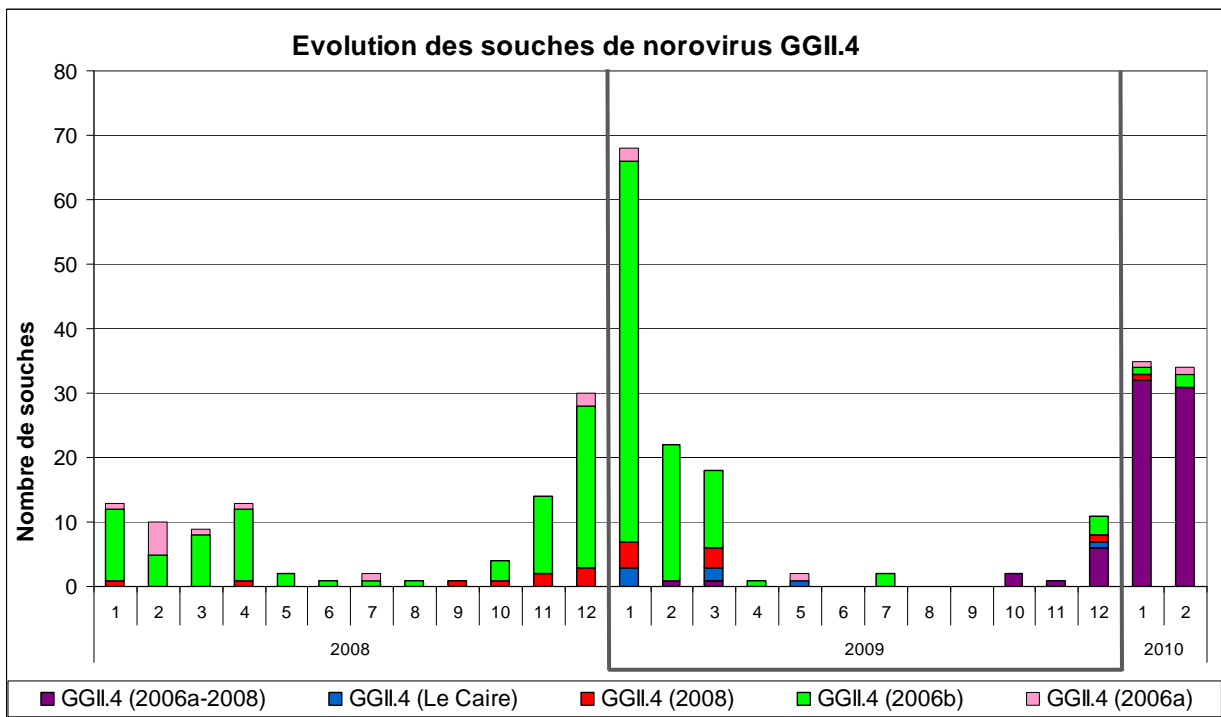


Figure 16 : Importance des différents variant des norovirus de génogroupe II et de génotype 4. L'année 2009 voit le remplacement du variant 2006b par un nouveau variant 2006a/2008. Les variants « Le Caire » et 2008 sont restés très minoritaires.

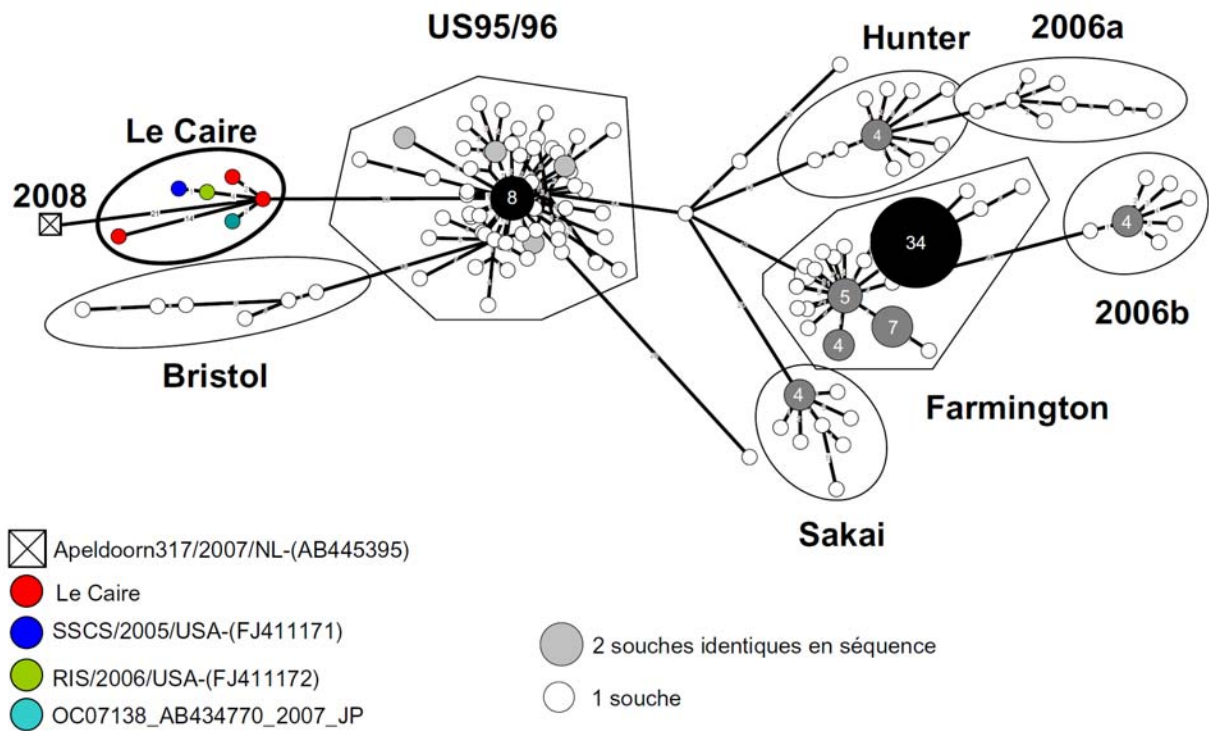


Figure 17 : Analyse phylogénétique des souches GGII.4 dans l'ORF2 sur un « arbre minimum couvrant ». Les variants 2006b dériveraient des souches « Farmington » détectées pour la première fois en 2002 ; les variants 2006a dériveraient des souches « Hunter » détectées en 2004 ; les variants 2008 seraient proches et dériveraient des souches « Le Caire » que nous avons caractérisé lors d'une étude réalisée en Egypte.

4.4. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX

4.4.1. Réseaux européens* « EVENT », « DIVINE » et « EuroRotanet »

Ces réseaux européens reçoivent ou ont reçu un soutien financier de l'Union Européenne. Le réseau « DIVINE » a pour mission la surveillance et la caractérisation des virus responsables de gastroentérites transmises par les aliments. Le réseau « EuroRotanet » a pour mission la surveillance et la caractérisation des rotavirus responsables des gastroentérites chez les enfants. Le réseau « EVENT » associait la plus grande partie des laboratoires de virologie impliqués dans les précédents réseaux, il s'est constitué autour d'un projet de recherche ayant pour objectif la compréhension des mécanismes d'évolution des virus entériques. Les contributions de notre laboratoire durant l'année 2009 ont été :

- Participation à la surveillance des épidémies à l'échelle européenne. Etude de l'épidémiologie des virus entériques, notamment des norovirus (publications n° 3, 7, 10, 11, 17, 18, 20, 22).
- Etude phylogénétique des norovirus, surveillance des nouvelles souches (publications 4 et 10).
- Participation à un réseau de surveillance des rotavirus (publications n° 1, 5, 6, 15, 17, 21, 25, 27, 28, 29).
- Evaluation des stratégies de diagnostic virologique des gastroentérites à rotavirus (publication 19).
- Etude de l'épidémiologie et de la pathogénicité des virus Aichi (publications n° 8, 13 et 14).
- Participation aux contrôles externes de qualité (rotavirus et norovirus).

*Ces réseaux regroupent 14 laboratoires de 12 pays européens : **Pays Bas**: RIVM, Bilthoven (Dr M. Koopmans) ; **Finlande**: Helsinki University Central Hospital (Dr von Bonsdorff KH) ; **Danemark**: Virus Diagnostics Laboratory, Copenhagen (Dr Böttiger) ; **Suède**: Karolinska Institutet, Solna (Dr Swensson L) ; **Grande Bretagne**: Central Public Health Laboratory, London (Dr Brown D) ; **Allemagne**: Robert Koch-Institut, Berlin (Dr Schreier E) ; **Espagne**: Institut de Salud Carlos III, Madrid (Dr Sanchez A), Universitat de Barcelona (Dr Bosch A) et Universitat de Valencia (Dr Buesa J) ; **Italie**: Istituto Superiore di Sanità, Rome (Dr Ruggeri FM), **Slovénie**: Medical Faculty of Ljubljana (Dr. Poljsak-Prijatelj M); **Hongrie**: County Institute of State Public Health Service (Dr Szucs G) ; **France**: IFREMER (Dr Le Guyader S) et CHU de Dijon (Pr Pothier).

4.4.2. Collaborations « Egypte – Tunisie - Maroc »

Ces collaborations ont été réalisées grâce aux programmes soutenus par le Ministère des Affaires Etrangères et le Ministère de la Recherche (programmes CMCU). Elles nous ont permis de former des étudiants aux techniques de diagnostic, de caractérisation moléculaire. Deux thèses d'Université (Une en co-tutelle : Université de Bourgogne et Université de Monastir, Tunisie (Madame SDIRI-LOULIZI Khira) et une seconde de l'Université de Bourgogne (Mademoiselle AZIZA Kamel) ont été soutenues en 2009.

Elles ont également pour objectif une surveillance de l'épidémiologie des virus entériques dans la population et dans l'environnement de ces pays. Cette surveillance dans les pays du pourtour méditerranéen a pour nous un très grand intérêt car l'incidence des infections entériques y est élevée avec pour conséquence le risque d'émergence de nouvelles souches virales (publications n° 2, 4, 7-10, 12-14). Ces

études nous ont également permis de mieux comprendre le rôle des virus « nouveaux » comme le virus Aichi dans les gastro-entérites.

4.5. ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE

4.5.1. Etude comparative des infections à rotavirus G1 et G9.

Ce travail a été conduit en collaboration avec le service de Pédiatrie Générale de l'hôpital Saint Vincent de Paul de l'AP-HP. L'objectif était de comparer la sévérité des gastro-entérites à rotavirus de génotype G1 et G9. Le génotype G9 est d'apparition relativement récente, la sévérité des gastro-entérites dues à ce génotype ont donné lieu a des travaux dont les résultats sont discordants, certains rapportant que ce génotype serait à l'origine de gastro-entérites plus sévères.

Nos résultats ne mettent pas en évidence de différence de sévérité entre ces 2 génotypes (Publication n°6).

4.5.2. Virus Aichi : études virologique et épidémiologique

Le virus Aichi est de découverte relativement récente. Même si sa classification est bien établie au sein de la famille des *Picornaviridae* et du genre *Kobuvirus*, ce virus reste encore méconnu sur le plan virologique, épidémiologique et clinique. Les études portant sur ce virus sont peu nombreuses et ne permettent pas d'en dégager un rôle pathogène clairement défini.

Principaux résultats et conclusions (Publications n° 8, 13 et 14) :

- **En France** et plus généralement en Europe, l'incidence du virus Aichi est faible (0,8% dans une étude de gastro-entérites non-hospitalisées) et lorsqu'il est retrouvé, sa présence témoigne d'une infection multiple telle que l'on peut observer lors des contaminations hydriques ou par consommation d'huîtres.
- L'analyse phylogénétique des souches isolées montre une certaine diversité et une des souches caractérisée est génétiquement différente des souches jusque là connue et doit être classée dans un nouveau génogroupe, le génogroupe C (travail en cours).
- **En Tunisie.** L'incidence des gastro-entérites à Aichi virus est plus élevée chez les enfants Tunisiens que Français (4,1% versus 0,8%). De même, l'acquisition des anticorps anti-virus Aichi est plus précoce, 68,8% des enfants de moins de 10 ans ont des anticorps. L'analyse phylogénétique des souches montre qu'elles appartiennent au même génotype A que celui retrouvé en France.

Le virus Aichi est détecté dans 6% des prélèvements d'eaux usées et 6,6% des prélèvements d'huîtres. Les analyses phylogénétiques montrent plusieurs « clusters » se succédant dans le temps suggérant une évolution parallèle des souches humaines et environnementales.

- **En conclusion** : Le virus Aichi est un des agents responsables de gastro-entérites. Son incidence est d'autant plus grande que le niveau sanitaire et d'hygiène du pays est bas.

5. ALERTE (voir également annexes A : PROCEDURES ET FORMULAIRES)

5.1. PROCEDURES D'ALERTE DE L'INVS ET DES AUTRES PARTENAIRES

5.1.1. Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR (par la DDASS, un laboratoire...):

- ✓ **Faxer** au demandeur les **4 formulaires** de la pochette « Épidémie : protocole et formulaires à faxer » (classeur « Formulaires ») **ou** les envoyer par **e-mail** (S:\CNR Virus Entériques\Modèles\Formulaires épidémie e-mail).
- ✓ Déterminer l'**identifiant de l'épidémie** (code à garder tout au long de l'épidémie) de la manière suivante :
code département – 2 premières lettres de la ville – mois – année
(Exemple : épidémie à La Baule en mars 2006 = 44BA0306)
- ✓ Entrer ces premières informations dans la base **Voozanoo** de l'InVS (<https://voozanoo.invs.sante.fr>) :
 - ◆ Vérifier s'il n'existe pas déjà une fiche enregistrée par l'InVS pour cette épidémie
 - ◆ Si l'épidémie n'a pas encore été annoncée à l'InVS, créer une nouvelle fiche

5.1.2. Annonce d'une épidémie via la base Voozanoo de l'InVS :

- ✓ Attendre la **réception éventuelle** des prélèvements, accompagnés des formulaires épidémiologiques qui auront été fournis par l'InVS.

5.1.3. Arrivée de prélèvements sans annonce préalable :

- ✓ Suivre la procédure décrite pour une épidémie annoncée par téléphone.
- ✓ Si les prélèvements ne sont pas accompagnés des formulaires du CNR, envoyer au prescripteur, par fax ou par mail, le formulaire n° 2 (fiche globale) pour avoir des renseignements sur l'épidémie.

Important : Penser à noter la date de réception des prélèvements sur les papiers joints (formulaire du CNR, prescription, feuille de laboratoire...)

5.2. TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS DES CAS GROUPE DE GEA

Annexe A1

Procédures de traitement d'une épidémie.

Annexe A2

**Protocoles d'envoi d'échantillons de selles.
Formulaires accompagnant les envois.**

6. ACTIVITE D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

6.1. PARTICIPATION AUX COMMISSIONS SPECIALISEES ET ACTIVITE D'EXPERTISE

Je suis personnellement membre du **Haut Conseil de Santé Public** et à ce titre expert de dossiers dont certains concernent le domaine des gastroentérites :

- Groupe de travail sur la vaccination rotavirus.
- Groupe de travail « gastro-entérites et personnes âgées » ayant débouché sur les recommandations relatives aux conduites à tenir devant des gastro-entérites aiguës dans les collectivités de personnes âgées

6.2. ACTIVITE DE CONSEIL :

- Aides à d'autres laboratoires (transmission de souches de référence, soutien technique ou autre) :
 - Divers laboratoires d'analyses Médicales.
 - Divers services de longs séjours, services hospitaliers.
 - Laboratoire Nestlé.
 - Laboratoire de contrôle Qualité, BioMérieux.
- Conseils téléphoniques destinés à des collègues biologistes, médecins hygiénistes, médecins épidémiologiste (DDASS, CIRE), médecins cliniciens.

6.3. ENCADREMENT DE STAGIAIRES :

- Encadrement d'étudiants en Médecine et Pharmacie, de stagiaires de l'IUT.
- Encadrement de stagiaires de l'Institut de Formation de technicien en analyses biomédicales, CHU de Tours (Olivier DELLINGER)
- Encadrement d'une étudiante Tunisienne (Madame Khira SDIRI-LOULIZI). La thèse en co-tutelle a été soutenue le 17 janvier 2009.
- Encadrement d'une étudiante Egyptienne (Mademoiselle Aziza KAMEL). La thèse a été soutenue le 8 décembre 2009.
- Stagiaire Marocain du 1^{er} mars 2009 à janvier 2010 (Monsieur Taoufik DOBLALI)

7. TRAVAUX DE RECHERCHE DECOULANT DE L'ACTIVITE DU CNR

Les différents travaux de recherche ont été présentés sous forme de publications dans des journaux internationaux ou nationaux, communications orales ou affichées lors de réunions scientifiques nationales ou internationales (voir chapitre 8 Liste des publications et annexes).

7.1. EVALUATION ET MISE AU POINT DE REACTIFS DE DIAGNOSTIC

7.1.1. Rotavirus :

Nous avons évalué la sensibilité et la spécificité d'une trousse de détection des rotavirus et des adénovirus par immuno-chromatographie (publication n°19).

Nous développons avec la société Covalab un test d'immuno-détection des rotavirus destiné aux pays d'Afrique.

7.1.2. Norovirus :

Nous évaluons 3 trousse de diagnostic des norovirus par méthode **immuno-chromatographique** (Rd-Biopharm, Denka commercialisée en Europe par Meridian et Biosynex). Les résultats de cette évaluation seront soumis à publication en 2010.

7.2. EVALUATION DES ANTISEPTIQUES ET DESINFECTANTS

Programmes ANR PNRA « ADHERESIST » et « SPICECLEAN » : Nous utilisons dans ces deux programmes la culture du virus murin et les techniques de PCR quantitative pour évaluer l'efficacité virucide des traitements technologiques utilisés dans l'industrie agro-alimentaire.

7.3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

7.3.1. Epidémiologie moléculaire des rotavirus

Cette étude a été présentée dans le chapitre 4.1 de ce rapport. La disponibilité des vaccins anti-rotavirus nécessite une surveillance moléculaire des souches de rotavirus afin de pouvoir anticiper des changements génétiques qui pourraient mettre en défaut la vaccination. La surveillance nationale que nous avons mise en place pour au moins 6 années impliquait en 2009 treize centres français et elle est intégrée dans un réseau européen (« EuroRotaNet ») où les données, expériences et techniques sont partagées. Ce projet a, pour la partie française, un soutien financier de la société Sanofi-Pasteur MSD et un financement européen pour l'ensemble du réseau. Les résultats ont été détaillés dans le chapitre 4.1 et ont été présentés à plusieurs congrès (RICAI et ESPID 2009) et publiés (Communications n° 25, 27, 29 et publications n° 1, 5, 17).

7.3.2. Epidémiologie moléculaire des virus dans les pays méditerranéens

Les objectifs de ces études sont les suivants :

- Aider les laboratoires de ces pays à mieux connaître l'épidémiologie des virus des gastroentérites dans ces pays (hommes, animaux et environnement) afin que ces pays puissent mesurer les risques sanitaires et prendre les mesures pour y faire face.
- Comprendre les cycles épidémiologiques des virus entériques en associant épidémiologie humaine, épidémiologie de l'environnement et recherche de transmission de l'animal à l'homme.

- Améliorer la connaissance de la diversité des souches virales qui circulent dans le pourtour méditerranéen afin d'anticiper les risque d'émergence en France de nouvelles souches à l'origine d'épidémies.

7.3.2.1. Etudes épidémiologiques en Tunisie

Les résultats des études épidémiologiques sur les virus entériques dans ce pays apportent ont été ou seront présentées dans les publications 2, 7, 8, 12-14 :

- Les norovirus sont des agents étiologiques aussi fréquents que les rotavirus dans les gastroentérites en milieu pédiatrique. Le norovirus GGII.4 est, comme en France, le principal génotype et sa variabilité est comparable à celle observée en France.
- Les virus Aichi sont un des virus entériques responsables des gastro-entérites. La circulation de ce virus en Tunisie est beaucoup plus importante qu'en France comme peuvent l'attester les études d'incidence dans les prélèvements de selles ou les études séro-épidémiologiques montrant une acquisition d'anticorps beaucoup plus précoce qu'en France.

7.3.2.2. Etudes épidémiologiques en Egypte

Nous avons étudié l'épidémiologie des virus entériques dans la population infantile et dans l'environnement. Nous avons caractérisé dans ce pays la circulation de souches de norovirus GGII.4 différentes de celles circulant alors en France. Ces variants ont été retrouvés deux années plus tard en France et se sont révélés très proches d'un nouveau variant, dénommé « 2008 » qui a circulé durant l'hiver 2008-2009. Ces travaux sont présentés dans les publications n° 4 et 9.

7.4. ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE AUX INFECTIONS A ROTAVIRUS

Nous avons poursuivi l'étude chez la souris des mécanismes de la réponse immunitaire après immunisation par des pseudo-particules virales par voie nasale, digestive ou intra rectale.

Notre objectif est de comprendre les mécanismes de la réponse immune protectrice. Les résultats obtenus jusqu'à présent montre que l'immunisation par voie intra-rectale à l'aide de VLP 2/6 de rotavirus induit une forte réponse immunitaire humorale et cellulaire contre le RV localisée au niveau de la muqueuse intestinale et cela se traduit pas une meilleure protection lors de l'infection. Ces travaux ont été présentés lors de 2 congrès internationaux (communications 23a et 23b).

7.5. ETUDE DES INTERACTIONS NOROVIRUS-RECEPTEURS GLYCANES

Nous avons étudié les capacités d'attachement de 6 variants, représentatifs des norovirus GGII.4 de 1987 à 2008, sur des sucres définissant les antigènes des groupes sanguins. L'objectif principal était de démontrer si au cours de l'évolution de ces norovirus les capacités d'attachement étaient augmentées tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif par analyse des interactions par résonance plasmonique de surface.

Nous avons montré que l'attachement des VLPs à des salives typées et des sucres de synthèse était modifié parallèlement avec la dérive des variants génotypes G GII.4.

8. LISTE DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET CONTRATS

8.1. PUBLICATIONS

8.1.1. Publications internationales

1. **de Rougemont A, Kaplon J, Lebon P, Huet F, Denis F, Alain S, Fourcade L, Grosjean J, El-Hajje MJ, Gendrel D, Pothier P.** Unexpected substitution of dominant rotavirus G genotypes in French hospitalized children over five consecutive seasons. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28:403-7.

2. **Sdiri-Loulizi K, Ambert-Balay K, Gharbi-Khelifi H, Sakly N, Hassine M, Chouchane S, Guediche MN, Pothier P, Aouni M.** Molecular Epidemiology of Norovirus Gastroenteritis among Children in Tunisia during 4-years: Detection of the Norovirus Variant GGII-4 Hunter as early as January 2003. *J Clin Microbiol.* 2009 Feb;47(2):421-9

3. Verhoef LP, Kroneman A, van Duynhoven Y, Boshuizen H, van Pelt W, Koopmans M; Foodborne Viruses in Europe Network. Selection tool for foodborne norovirus outbreaks. *Emerg Infect Dis.* 2009 Jan; 15 (1):31-8.

4. **Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, de Rougemont A, Pothier P, Belliot G.** Predominance and Circulation of Enteric Viruses in Grand Cairo. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1037-45.

5. Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Korsun N, Kroneman A, Lappalainen M, László B, Maunula L, Mathijnsens J, Midgley S, Mladenova Z, Poljsak-Prijatelj M, **Pothier P**, Ruggeri FM, Sanchez-Fauquier A, Schreier E, Steyer A, Sidaraviciute I, Tran AN, Usonis V, Van Ranst M, **de Rougemont A**, and Gray J. Rotavirus Surveillance in Europe 2005-2008: Web-Enabled Reporting and Real-Time Analysis of Genotyping and Epidemiological Data. *Journal of Infectious Diseases.* 2009;200 Suppl 1:S215-21.

6. Aupiais C, **de Rougemont A**, Menager C, Vallet C, Brasme JF, **Kaplon J, Pothier P**, Gendrel D. Severity of acute gastroenteritis in infants infected by G1 or G9 rotaviruses. *J Clin Virol.* 2009 ; 46 : 282-5.

7. **Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khelifi H, de Rougemont A, Hassine M, Chouchane S, Sakly N, Pothier P, Guédiche MN, Aouni M, Ambert-Balay K.** Molecular epidemiology of human astrovirus and adenovirus serotypes 40/41 strains related to acute diarrhea in Tunisian children. *J Med Virol.* 2009 ; 81 : 1895-902.

8. **Sdiri-Loulizi K, Hassine M, Gharbi-Khelifi H, Sakly N, Chouchane S, Guediche MN, Pothier P, Aouni M, Ambert-Balay K.** Detection and genomic characterization of Aichi viruses in stool samples from children in Monastir, Tunisia. *J Clin Microbiol.* 2009 ; 47 : 2275-8.

9. **Kamel AH, Ali MA, El-Nady HG, Aho S, Pothier P, Belliot G.** Evidence of the co-circulation of enteric viruses in sewage and in the population of Greater Cairo. *J Appl Microbiol.* 2009 Oct 1.

10. **Belliot G, Kamel AH, Estienney M, Ambert-Balay K, Pothier P.** Evidence of the Emergence of New GGII.4 Norovirus Variants from Gastroenteritis Outbreak Survey in France during the 2007-08 and 2008-09 Winter Seasons. *J Clin Microbiol.* 2010 ; 48 : 994-998.

11. Le Guyader FS, Krol J, **Ambert-Balay K**, Ruvoen-Clouet N, Desaubliaux B, Parnaudeau S, Le Saux JC, Ponge A, **Pothier P**, Atmar RL, Le Pendu J. Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. *J Clin Microbiol* 2010 ; 48 : 915-920.

12. **Sdiri-Loulizi K**, Hassine M, Aouni Z, Gharbi-Khelifi H, Chouchane S, Sakly N, Guédiche MN, **Pothier P**, Aouni M, and **Ambert-Balay K**. Detection and molecular characterization of enteric viruses in environmental samples in Monastir, Tunisia between January 2003 and April 2007. *En revision: J Appl Microbiol*.

13. **Sdiri-Loulizi K**, Hassine M, **Bour JB**, **Ambert-Balay K**, Mastouri M, Aho LS, Gharbi-Khelifi H, Aouni Z, Sakly N, Chouchane S, Guédiche MN, **Pothier P** and Aouni M. Immunoenzymatic analysis for studying Aichi virus seroprevalence in Tunisia: parallel with genomic detection and clinical presentation in Tunisian children with gastroenteritis disease. *En revision: Clin Vaccine Immunol*.

14. **Sdiri-Loulizi K**, Hassine M, Aouni Z, Gharbi-Khelifi H, Sakly N, Chouchane S, Guédiche MN, **Pothier P**, Aouni M and **Ambert-Balay K**. First Molecular Detection of Aichi Virus in Water: Sewage samples in Monastir Region, Tunisia, Between January 2003 and April 2007. *En révision: Arch Virol*.

8.1.2. Articles soumis à publication

15. **Kaplon J**, Guenau E, Asdrubal P, **Pothier P**, **Ambert-Balay K**. Bovine Caliciviruses In France: A Potentially New Genotype Among *Nabovirus* Genus. *Soumis pour publication*.

16. **Kamel AH**, Ali MA, El-Nady HG, Deraz A, Aho S, **Pothier P**, and **Belliot G**. Enteric Hepatitis Viruses Circulation in Sewage and Population of Greater Cairo. *Soumis pour publication*.

17. **de Rougemont A**, **Kaplon J**, Pillet S, Stephan JL, Pozzetto B, Gagneur A, Payan C, Tran A, Lebon P, Huet F, Coste-Burel M, Lorrot M, Bingen E, Rodière M, Foulongne V, Gillet Y, Floret D, Lina B, Nguyen-Bourgain C, Parez N, Garbag-Chenon A, Fourcade L, Alain S, Oriot D, Agius G, Lazrek M, Hober D., Dubos F, Colimon R, Gendrel D, **Pothier P**. Genotype characterization of rotavirus from acute gastroenteritis in the pediatric emergency units in France between 2006 and 2009. *Soumis pour publication*.

18. Le Guyader F.S, Krol J, **Ambert-Balay K**, Ruvoen-Clouet N, Desaubliaux B, Parnaudeau S, Le Saux J-C, Ponge A, Pommepey M, Camus P, **Pothier P**, Le Pendu J. Analyse d'une épidémie de gastroentérite liées aux huîtres : de l'environnement aux consommateurs. (*soumis à publication BEH*).

8.1.3. Publications en langue française

19. **de Rougemont A**, **Kaplon J**, Billaud G, Lina B, Pinchinat S, Derrough T, Caulin E, **Pothier P**, Floret D. [Sensitivity and specificity of the VIKIA((R)) Rota-Adeno immuno-chromatographic test (bioMérieux) and the ELISA IDEIA trade mark Rotavirus kit (Dako) compared to genotyping.]. *Pathol Biol* (Paris). 2009 Feb;57(1):86-9.

20. **de Rougemont A**, **Balay K**, **Belliot G**, **Pothier P**. Actualités sur les norovirus *Med Sciences*, 2010 ; 1 : 73-78.

8.1.4. Publications didactiques

21. De Rougemont A, Kaplon J, Pothier P. Les gastroentérites aiguës à rotavirus de l'enfant : une priorité de santé publique. *La Lettre de L'Infectiologue*, 2009 ; 24 : S2, 3-11.

22. Le Guyader SF, Le Saux JC, Delmas G, Krol J, **Ambert-Balay K.** Virus Aichi, norovirus, astrovirus, entérovirus et rotavirus impliqués dans des cas de gastroentérites suite à la consommation d'huîtres. *Virologie*, 2009 ; 13 : 327-329.

23. De Rougemont A, Pothier P. Rotavirus. *Traité de biologie clinique de l'EMC*, 2009 (sous presse)

8.1.5. Communications internationales

24. Agnello D., Lavaux A., Pothier P. Intrarectal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles induces antigen-specific immunoglobulin A (IgA) secreting cells that migrate towards the mucosae-associated epithelial chemokine (MEC)/CCL28 and recognize the mucosal addressin cell adhesion.

1a→ Tenth International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses, June 19-26th 2009, Hamilton Island, Australie.

1b→ European rotavirus biology meeting, September 13-16th 2009, Loch Lomond, Scotland.

25. de Rougemont A, Kaplon J, Fontana C, Lebon P, Stephan JL, Pillet S, Pozzetto B, Gagneur A., Tran A., Lorrot M., Bingen E., Coste-Burel M., Floret D., Lina B., Rodière M., Foulongne V., Oriot D., Agius G., Colimon R., Hober D., Martinot A., Parez N., Garbag-Chenon A., Fourcade L., Alain S., Huet F., Gendrel D., **Pothier P.** Rotavirus genotypes diversity in diarrhoeal children at the French paediatric emergency departments between 2006 and 2009.

2a→ 27th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases. June 9-12th, Brussels, Belgium.

2b→ European rotavirus biology meeting, September 13-16th 2009, Loch Lomond, Scotland.

26. Rooswell D, **Pothier P,** Lanternier F, Mamzer-Bruneel M-F, **Ambert-Balay K,** Lecuit M, Legendre C, Lortholary O, Zuber J. Norovirus-related severe and chronic diarrhea in renal transplant adult recipients. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Vienne, Austria, 10-13 apr 2010.

8.1.6. Communications nationales

27. de Rougemont A, Kaplon J, Fontana C, Lebon P, Stephan JL, Pillet S, Pozzetto B, Gagneur A, Tran A, Lorrot M, Bingen E, Coste-Burel M, Floret D, Lina B, Rodière M, Foulongne V, Oriot D, Agius G, Colimon R, Hober D., Martinot A., Parez N., Garbag-Chenon A., Fourcade L., Alain S., Huet F., Gendrel D., **Pothier P.** Diversité génotypique des infections à rotavirus chez l'enfant de moins de 5 ans aux urgences pédiatriques en France. 4-5 décembre 2009, 29^e RICAI, Paris, France.

28. Aupiais C, **de Rougemont A,** Ménager C, Vallet C, Brasme JF, **Kaplon J,** **Pothier P,** Gendrel D. Sévérité des gastroentérites aiguës chez les enfants infectés par rotavirus G1 ou G9. 4-5 décembre 2009, 29^e RICAI, Paris, France.

29. de Rougemont A, Kaplon J, Pothier P. Evolution des génotypes de rotavirus dans la population pédiatrique française. Colloque annuel de l'InVS, 28/05/2009, Paris.

8.1.7. Conférences sur invitation

1. Diarrhées dans les pays en voie de développement et l'eau. Journées scientifiques de l'infectiologie sud, Vendredi 2 octobre 2009, Marseille.
2. Diversité et évolution des génotypes de rotavirus. Journées Parisiennes Pédiatrie, 23^{èmes} Rencontres Francophones Nord-Sud. Vendredi 9 octobre 2009, Paris.
3. Les virus à transmission hydriques. 5^{èmes} Journées Scientifiques de la STM, 30 octobre-1^{er} novembre 2009, Hammamet, Tunisie.
4. Rotavirus et vaccination, enthousiasme et prudence. XI^{ème} Congrès annuel de l'Association Casablancaise des Pédiatres Privés, janv. 2010, Casablanca, Maroc.

8.2. CONTRATS DE RECHERCHE LIES AUX ACTIVITES DU CNR

1. *Conseil Régional : Contrat d'étude.*
2. *CMCU, Comité Mixte Franco-Tunisien pour la Coopération Universitaire « Suivi des virus entériques dans l'environnement : variabilité génétique, typage moléculaire-phylogénie des astrovirus, calicivirus et de l'hépatite A. Collaboration avec le Pr M. Aouni de l'Université de Tunis.*
3. *Contrats européens :*
 - 3.1. *Enteric Virus Emergence, New Tools (EVENT), 6^e PCRD (FP6-2002-SSP-1) 2004-2008.*
 - 3.2. *Prevention of emerging (food-borne) enteric viral infections: diagnosis, viability testing, networking and epidemiology (DIVINE-NET). Public health programme SANCO, decision N° 1786/2002/EC. 2004-2007.*
 - 3.3. *EuroRotaNet: Contrat Health Protection Agency : épidémiologie des rotavirus en Europe.*
4. *Contrat ANR-PRNA : ADHERESIST, 2007. Contamination of food products by enteric viruses (HAV, norovirus, enterovirus): connection between surface properties, adhesion ability and resistance induced to technological and hygienic treatments.*
5. *Contrat ANR-PRNA : SPICECLEAN, 2008. Evaluation de l'efficacité microbicide et du bénéfice organoleptique de traitements athermiques innovants de décontamination appliqués à des épices et des herbes aromatiques séchées. Porteur du projet : P Gervais, GPMA Université de Bourgogne*
6. *Partenariat Hubert Curien, programme Gundishapur Franco-Iranien : 2007-2008.*
7. *Partenariat Hubert Curien, programme Imhotep Franco-Egyptien: 2007-2008.*
8. *Bourse d'étude du gouvernement Egyptien pour KAMEL Aziza (4 années).*
9. *Contrat d'étude Sanofi-Pasteur-MSD : épidémiologie des rotavirus en France.*

8.3. COLLABORATIONS

- Collaborations institutionnelles

1. *IFREMER- DEL/MP/Microbiologie (Dr Pommepey et Le Guyader).*
2. *CNR des hépatites (Pr Elisabeth Dussaix).*
3. *CNR des entérovirus (Pr Bruno Lina).*
4. *Unité de virologie des aliments et de l'eau, AFSSA-LERQAP, 22, rue Pierre Curie 94704 Maisons-Alfort (Dr Sylvie Perelle).*
5. *Dans le cadre du contrat ANR ADHERESIST :
Unité de virologie des aliments et de l'eau, AFSSA-LERQAP, 22, rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort (Dr Sylvie Perelle).
ADRIA Normandie (Dr T. Morin).
LCPME UMR 7564, Nancy (Pr Ch. Gantzer).*

- Microbiology Safety Unit-Institut Pasteur Lille (Dr N. Deboosere) :*
Research Center Nestlé, Lauanne (Dr Sanchez-Morgas).
Anjou Research-Veolia Environnement (DrMenard-Szczebara).
6. *Dans le cadre du contrat ANR SPICECLEAN :*
Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Université de Bourgogne (Pr P. Gervais)
ADRIA Normandie (Dr T. Morin).
Laboratoire de Microbiologie du Froid, Université de Rouen (Dr N. Orange)
CRITT AGRO HALL, Evreux (Dr F. Tonon).
CRITT 2ABI AGRO ALIMENTAIRE ET BIO INDUSTRIEL, Dijon (Dr JM Delaitre)
 7. *Service de Pédiatrie Générale, Hôpital Saint Vincent de Paul, Paris (Pr D. Gendrel).*
 8. *Services de pédiatrie et de virologie des CHU de Brest, Lille, Limoges, Lyon, Montpellier, Poitiers, Saint-Etienne, des hôpitaux de l'AP-HP Trousseau, Robert-Debré et Saint-Vincent-de-Paul.*
 9. *Service de virologie, CHU de Limoges (Prs F Denis et S Alain).*
 10. *InVS (Drs Henriette de Valk, Gilles Delmas, Véronique Vaillant et Anne Gallais).*
 11. *OPEN ROME, 67 rue du Poteau, 75018 Paris (Jean-Marie Cohen).*
 12. *INSERM U 601 (Dr J. Le Pendu).*
 13. *Laboratoire des Maladies Transmissibles, Université de Tunis, Tunisie (Pr Mahjoub Aouni).*
 14. *Réseaux européens: **Pays Bas:** National Institut for Public Health, Bilthoven (Dr M. Koopmans), **Finlande:** Helsinki University Central Hospital (Dr von Bonsdorff KH), **Danemark:** Virus Diagnostics Laboratory, Copenhagen (Dr Böttiger), **Suède:** Karolinska Institut, Slona (Dr Swensson L), **Grande Bretagne:** Central Public Health Laboratory, London (Dr Brown D), **Allemagne:** Robert Koch-Institut, Berlin (Dr Schreier E), **Espagne:** Institut de Salud Carlos III, Madrid (Dr Sanchez A) and Universitat de Barcelona (Dr Bosch A), **Italie:** Istituto Superiore di Sanità, Rome (Dr Ruggeri FM), **Slovénie :** University of Ljubljana (Dr. Mateja Poljsak-prijatelj), **Hungary:** State Public Health Service (Prof. György Szücs).*

- Collaborations industrielles

1. *Argène-Biosoft, 09120 Varilhes, France.*
2. *Sanofi -Pasteur-MSD, 69348 Lyon Cedex 07, France.*
3. *BioMérieux, 69280 Marcy l'Etoile.*
4. *Covalab, 69000 Lyon.*
5. *Merial, 69000 Lyon.*

9. PROGRAMME D'ACTIVITE DES ANNEES 2010 ET 2011

9.1. MISE AU POINT DE REACTIFS

9.1.1. Rotavirus

A partir de nos anticorps monoclonaux anti-rotavirus, nous développons avec les sociétés Covalab (chapitre 7.1.) des réactifs de détection des rotavirus. Il s'agit de développer un test ELISA et un test d'immuno-chromatographie dont les coûts réduits permettraient une large utilisation dans les pays en voie de développement et ainsi permettre une surveillance virologique en cas de campagne de vaccination.

9.1.2. Norovirus

En collaboration avec la société BioMérieux, nous développons un programme de production d'anticorps monoclonaux contre les norovirus de génogroupe I et II avec deux objectifs :

- 1) Utiliser ces outils pour développer un test de détection par immuno-chromatographie suffisamment sensible pour être utilisé en diagnostic de routine. Nos premier anticorps monoclonaux sont en évaluation par BioMérieux. Un programme de production et de sélection par résonance plasmonique de surface (Biacore) est établi et bien avancé. L'objectif est d'obtenir un réactif pour la deuxième moitié de 2010 ou début 2011.
- 2) Posséder des outils moléculaires pour l'analyse des souches anciennes et nouvelles. Utiliser ces outils pour des expériences de compétition et inhiber la fixation des norovirus sur les sucres récepteurs (Collaboration avec Jacques Le Pendu INSERM U 601). Projet pour les années 2010-2011.

9.2. CONTAMINATION VIRALE DES MATRICES ALIMENTAIRES

ANR-PRNA « ADHERESIST » : Notre laboratoire participe à un programme d'étude sur la contamination de matrices alimentaires par des virus entériques (VHA, norovirus, entérovirus). Ce programme étudie les relations existantes entre propriétés de surface des virus, leur capacité d'adhésion et leur résistance aux traitements technologiques et hygiéniques. Son financement a été obtenu auprès de l'ANR-PRNA (« ADHERESIST »). Ce programme doit se terminer en 2010.

ANR-PRNA « SPICECLEAN » : Notre laboratoire participe à un programme se proposant d'évaluer l'efficacité microbicide des traitements athermiques de décontamination appliqués à des épices et des herbes aromatiques séchées. Ce programme « SPICECLEAN » a été financé par l'ANR dans le cadre du programme ALIA. Ce programme se poursuivra durant les années 2010-2011.

9.3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

9.3.1. Epidémiologie moléculaire des rotavirus en milieu pédiatrique

La poursuite de la surveillance moléculaire des rotavirus est prévue et financée pour les deux saisons à venir (1010-11 et 1011-12). Aux 13 centres précédemment cités se sont ajoutés en 2009 deux groupements de laboratoires privés de la région parisienne et de Dijon. L'inclusion de ces laboratoires privés nous permettra de toucher des cas moins sévères de gastroentérites.

Comme les quatre années précédentes, nous aurons toujours pour objectif :

- 1) La détection des souches émergentes, apprécier l'importance de la transmission inter espèce, l'étude des mécanismes de cette transmission (segments génomiques impliqués, possibilités de réassortiments).
- 2) L'amélioration des techniques de caractérisation et leur adaptation aux nouvelles souches. La diffusion de ces techniques et le soutien technologique dans les laboratoires et pays collaborant avec le CNR des virus entériques.

9.3.2. Epidémies de gastroentérites en Etablissements pour personnes âgées

Notre activité de CNR des virus entériques nous permet d'analyser un grand nombre de gastroentérites survenant dans ces établissements quelque soit leur localisation sur le territoire. Durant la saison 2008-2009 nous avons réalisé une étude épidémiologique avec l'aide du Grog-géronto et le CCLIN-NORD EST sur 97 établissements de cette inter-région. Nous avons ainsi constaté que 50% des établissements suivis avaient été touchés par au moins un épisode de gastro-entérite. Cette étude est poursuivie pour la saison 2009-2010.

En collaboration avec les professeurs de gériatrie François PUISIEUX (CHU de Lille) et Benoît de WAZIERES (CHU de Nîmes) nous envisageons une étude nationale sur trois années incluant entre 100 à 200 établissements. Un dossier de type PHRC sera déposé afin de financer cette étude. Cette étude nous permettra d'évaluer l'impact des gastro-entérites dans les EHPA et EHPAD, de comprendre les mécanismes de diffusion du virus dans cet environnement, de proposer des mesures afin de limiter la diffusion du virus dans ces établissements.

9.3.3. Epidémiologie virus des gastroentérites dans le pourtour méditerranéen.

La surveillance moléculaire des virus sera poursuivie en Tunisie et initiée au Maroc en comparant les souches circulant dans la population et les souches détectées dans les eaux usées en amont et en aval des stations de traitement des eaux.

Notre objectif étant :

- 1) d'étudier les cycles épidémiologiques des virus entériques afin de comprendre les différences observées entre la diversité des souches détectées dans l'environnement et la prédominance des norovirus GGII.4 dans la population.
- 2) De surveiller l'apparition de nouvelles souches et d'anticiper la diffusion de celle-ci en France.

Ces projets seront financés par des contrats CMCU et l'Agence Universitaire de la Francophonie.

9.3.4. Epidémiologie virus des gastroentérites chez les bovins.

En collaboration avec les Directions Départementales des Services Vétérinaires de Dijon, Limoges, Niort et Rennes nous avons commencé une étude épidémiologique dans les selles des veaux diarrhéiques.

Nous avons plusieurs objectifs :

- 1) La caractérisation de souches de rotavirus ou norovirus bovins et le risque de zoonose, l'étude de l'épidémiologie des rotavirus chez des animaux vaccinés (la vaccination antirotavirus est pratiquée depuis plus de 10 ans).
- 2) La caractérisation de nouvelles souches de virus telles que celles appartenant au genre *Nabovirus*.

Cette étude se poursuivra jusqu'en 2011 avec le soutien de la société Merial.

9.3.5. Gastro-entérites sans étiologie

Dans 17,8% des épidémies ou cas groupés que nous avons analysés, aucune étiologie n'a été retrouvée. Il en était de même pour certaines pathologies comme les entérocolites ulcéro-nécrosantes. En collaboration avec Eric DELWART, Directeur du laboratoire de Virologie Moléculaire à l'Université de Californie à San Francisco, nous avons entrepris un travail de métagénomique sur de prélèvements de selles sélectionnés. Les résultats de ce travail devraient être analysés durant l'année 2010.

9.4. ETUDES FONDAMENTALES

9.4.1. Etude de la réponse immune aux infections à rotavirus

Nous poursuivons l'étude chez la souris des mécanismes de la réponse immunitaire après immunisation par des protéines ou des pseudo-particules virales par voie nasale, orale ou intra rectale.

Etude du « homing » (ou « adressage ») : A la fin de l'année 2010 nous pensons avoir avancé dans l'étude de l'adressage des lymphocytes spécifiques d'antigène induits après immunisation par différentes voies. Nous voulons poursuivre en déterminant quels sont les récepteurs qui guident la migration des lymphocytes B mémoires, cellules différentes des cellules étudiées dans le précédent travail, et des lymphocytes T vers la muqueuse intestinale.

Nous espérons ainsi obtenir une connaissance plus complète des mécanismes gouvernant la localisation immunitaire au niveau des différents organes. Ces connaissances seront très utiles pour l'élaboration de nouvelles stratégies de vaccination.

Etude des mécanismes de protection : Par des techniques de déplétion (anti-CD4 et anti-CD8) et en utilisant des souris déficientes (souris Jh^{-/-} déficientes en lymphocytes B) nous avons montré le rôle prépondérant des lymphocytes CD4⁺. Ce travail doit être confirmé par des études complémentaires avec une déplétion plus compétente des différentes populations lymphocytaires (utilisation de cocktail d'anticorps anti-CD4 ou anti-CD8). Dans le travail qui suivra, il nous faudra déterminer quelle est la ou les molécules, par exemple quelle(s) cytokine(s), intervient dans la protection.

9.4.2. Etudes des interactions entre norovirus et récepteurs glycanes

Cette étude est la continuation des travaux déjà effectués et abordés au chapitre 7.5.

La capsidie des norovirus est constituée d'une seule protéine (VP1) codée par l'ORF2 et elle est impliquée dans le déterminisme antigénique et la fixation au récepteur. Le potentiel évolutif des norovirus de génogroupe II génotype 4 (GGII.4) est très probablement lié à la capsidie virale et plus particulièrement à la région P2 de cette capsidie VP1.

Notre objectif est de déterminer quels sont les parties de la capsidie conférant le tropisme des norovirus. Nous nous proposons de faire l'analyse comparée du domaine P2 des norovirus humains et murin et de réaliser des protéines VP1 de capsidie chimères et évaluer leur capacité à former des pseudo-particules. Des essais d'attachement des VLP modifiées seront réalisés sur des cellules RAW (norovirus murin MNV) et Caco-2 (norovirus humains) pour évaluer le changement de tropisme.

Le deuxième objectif sera d'évaluer le rôle des rafts, microdomaines spécialisés de la membrane plasmidique, riches en cholestérol et en sphingomyéline, et de leur rôle potentiel dans l'attachement du norovirus à son récepteur puis son internalisation.

Les données que nous pourrions obtenir sur le norovirus murin (MNV) serviront de base pour l'étude des norovirus humains. En absence de système de culture de ceux-ci, nous travaillerons avec des capsides que nous avons déjà produites au laboratoire.

9.5. FORMATION, SOUTIEN TECHNIQUE

Nous avons entrepris des collaborations sous forme de soutien technique, formation de biologiste ou de technicien avec plusieurs laboratoires de façon à les aider à mettre en place dans leur pays une surveillance des gastro-entérites virales. Ces collaborations sont commencées ou devraient commencer en 2010.

Il s'agit des pays suivants :

- 1) Burkina Faso, en relation avec le réseau CREPA.
- 2) Niger, en relation avec l'association Epicentre et sur place l'Institut CERMES.
- 3) Madagascar, en relation avec l'Institut Pasteur de Madagascar.
- 4) Côte d'Ivoire, en relation avec l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire
- 5) Tunisie, en relation avec la Faculté de Pharmacie de Monastir et le Centre National des Sciences et technologies Nucléaires de Sidi Thabet - Tunis.
- 6) Maroc, en relation avec la Faculté de Médecine-Pharmacie de Rabat.
- 7) Iran, en relation avec l'Institut RAZI

10. ANNEXES : PROCEDURES ET FORMULAIRES

10.1. ANNEXE A1 : Procédures

TRAITEMENT D'UNE EPIDEMIE DE GEA OU D'UNE TIAC

AVIS D'EPIDEMIE DE GEA ou TIAC

- ❑ **Annnonce d'une épidémie par téléphone au CNR (par la DDASS, un laboratoire...) :**
 - ✓ **Faxer** au demandeur les **4 formulaires** de la pochette « Épidémie : protocole et formulaires à faxer » (classeur « Formulaires ») **ou** les envoyer par **e-mail** (S:\CNR Virus Entériques\Modèles\Formulaires épidémie e-mail).
 - ✓ Déterminer l'**identifiant de l'épidémie** (code à garder tout au long de l'épidémie) de la manière suivante :
code département – 2 premières lettres de la ville – mois – année
(Exple : épidémie à La Baule en mars 2006 = 44BA0306)
 - ✓ Dans la liste « **Épidémies annoncées/reçues** » (chemise violette, casier « Épidémies en attente ») : vérifier s'il n'existe pas le même identifiant ou si l'épidémie n'a pas déjà été annoncée ; compléter la liste.

Remarque : - s'il y a déjà eu une épidémie dans la même ville, le même mois, ajouter un numéro d'ordre (Exemple : 44BA0306/2)
- de même, en cas d'ambiguïté sur l'identifiant de l'épidémie (Exple : épidémie à Batz-sur-mer également en mars 2006 : 44BA0306/2)

- ✓ Compléter une feuille **Premières informations** (classeur « Formulaires ») à ranger dans la chemise violette du casier « Épidémies en attente ».
- ✓ Entrer ces premières informations dans la base **Voozanoo** de l'InVS (<https://voozanoo.invs.sante.fr>) :
 - ◆ Vérifier s'il n'existe pas déjà une fiche enregistrée par l'InVS pour cette épidémie
 - ◆ Si l'épidémie n'a pas encore été annoncée à l'InVS, créer une nouvelle fiche

❑ **Annnonce d'une épidémie via la base Voozanoo de l'InVS :**

- ✓ Noter les données enregistrées par l'InVS sur une feuille **Premières informations** (classeur « Formulaires ») à ranger dans la chemise violette du casier « Épidémies en attente » en précisant qu'il s'agit d'une annonce InVS.
- ✓ Compléter la liste **Épidémies annoncées/reçues** » (chemise violette, casier « Épidémies en attente ») en précisant également « annonce InVS ».
- ✓ Attendre la **réception éventuelle** des prélèvements, accompagnés des formulaires épidémiologiques qui auront été fournis par l'InVS.

❑ **Arrivée de prélèvements sans annonce préalable :**

- ✓ Suivre la procédure décrite pour une épidémie annoncée par téléphone.
- ✓ Si les prélèvements ne sont pas accompagnés des formulaires du CNR, envoyer au prescripteur, par fax ou par mail, le formulaire n° 2 (fiche globale) pour avoir des renseignements sur l'épidémie.

Important : Penser à noter la date de réception des prélèvements sur les papiers joints (formulaire du CNR, prescription, feuille de laboratoire...)

RECEPTION DES PRELEVEMENTS

- ❑ **Conserver les échantillons :** à 4°C (traitement dans les 48h) ou à – 20°C.
- ❑ **Enregistrer les prélèvements :**

- ✓ Repérer sur la **coprothèque** (classeur jaune, onglet : **externes**) le ou les numéros et identifier chacun des échantillons face au numéro en fin de liste (commencer par **E....**) puis les enregistrer sur le **serveur** (*S:\CNR Virus Entériques\Coprothèques\COPROTHÈQUE Externes*).
- ✓ Enregistrer les prélèvements dans **LAB 400** :
 - ◆ Entrer en numéro de séjour le numéro « **011731380** » correspondant au « **patient CNR** » pour tous les échantillons et préciser dans l'interface « **Commentaire** » le nom, le prénom et la date de naissance de chacun des patients.
 - ◆ Pour une épidémie personne à personne ou alimentaire (hors coquillage), enregistrer en première intention :
 - Code **30990** : RT-PCR norovirus temps réel
 - ◆ Pour une épidémie liée à l'eau ou aux coquillages, enregistrer les codes d'analyses suivants :
 - Code **30995** : Seeplex (PCR adénovirus, RT-PCR astrovirus, rotavirus et norovirus G1/G2)
 - Code **30942** : RT-PCR Hépatite A
 - Code **30944** : RT-PCR Entérovirus
 - Code **30958** : RT-PCR Aichivirus
 - Code **30975** : RT-PCR Sapovirus
 - ◆ Une fois chaque patient enregistré, imprimer la **liste de travail** qui permettra de répertorier les résultats des différentes manips.
- ✓ Compléter la **liste des épidémies** (*S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats\Liste épidémies*)

□ **Mettre toutes les données dans une chemise identifiée par :**

- ◆ le **nom de la ville** qui a inspiré le numéro d'identifiant
- ◆ l'**identifiant épidémie** correspondant
- ◆ le **numéro** du carton suivi du numéro de la chemise (Exple : 15.03 correspond au carton en cours n°15, la chemise n°3 dans ce carton)
- ◆ les **numéros des échantillons** correspondants (E.... à E....)

Remarque : Joindre à la chemise le formulaire « **Premières informations** » et un exemplaire du formulaire « **Récapitulatif rendu des résultats** ».

ANALYSES

□ **Extraction des acides nucléiques :**

- ✓ manuellement, avec QIA Amp viral RNA, Qiagen
- ✓ **OU** automatiquement sur EasyMag
- ✓ **OU** automatiquement sur Bionobis

□ **Épidémie personne à personne ou alimentaire (hors coquillage) :**

- ✓ Recherche de *Norovirus* par temps réel :
 - ◆ Génogroupe 1 (amorces : JJV1NF/JJV1R, sondes : JJV1P et RING-1B)
 - ◆ Génogroupe 2 (amorces : QNIF2d/Cog2R, sonde : QNIF2)
- ✓ Si l'épidémie est positive en temps réel, PCR classique One Step :
 - ◆ Polymérase (amorces JV12/JV13)
 - ◆ Capside (amorces GISKF/GISKR et/ou GIISKF/GIISKR)
- ✓ Si l'épidémie est négative en temps réel :
 - ◆ Recherche de sapovirus (amorces SR80/NVP110)
 - ◆ Recherche immuno-enzymologie :
 - Adénovirus 40-41 (Elisa Meridian)
 - Astrovirus (Elisa Oxoid)
 - Rotavirus du groupe A (Elisa Méridian)
 - ◆ Si Elisa positif(s) :

- Rotavirus du groupe A (RT-PCR)
- Astrovirus (RT-PCR Mon244/Mon245 et si nécessaire Mon269/Mon270)
- Adénovirus (PCR Adv-hex1deg/hex2deg)

Remarque : Les kits ELISA sont stockés à + 4°C dans le frigo en pièce post-PCR (1-114) et les kits neufs dans la chambre froide à +4°C au sous-sol. Les tampons de dilution des selles, qui sont utilisés en pièce d'extraction (1-120A), ne doivent en aucun cas transiter par le secteur post-PCR. Il ne faut donc pas oublier de sortir des kits neufs avant que ceux-ci soient stockés en post-PCR. Les tampons sont, eux, stockés dans la pièce d'extraction (1-120A).

❑ **Épidémie liée à l'eau ou aux coquillages :**

- ✓ Recherche de norovirus, adénovirus, astrovirus et rotavirus du groupe A par **PCR Seeplex**. Si la PCR Seeplex est positive pour un ou plusieurs virus réaliser :
 - ◆ Norovirus en One Step : polymérase (amorces JV12/JV13) et capsid (amorces GISKF/GISKR et/ou GIISKF/GIISKR)
 - ◆ Adénovirus (PCR Adv-hex1deg/hex2deg)
 - ◆ Astrovirus (RT-PCR Mon244/Mon245 et si nécessaire Mon269/Mon270)
 - ◆ Rotavirus du groupe A (nouvelle technique)
- ✓ Recherche de sapovirus dans la polymérase (amorces SR80/NVP110)
- ✓ Recherche des entérovirus (amorces E1-E2)
- ✓ Recherche du virus Aichi : polymérase (amorces AI6261/AI6779)
- ✓ Recherche de l'hépatite A (amorces HAV1-HAV2)

❑ **Typage par séquençage des produits de PCR :**

- ✓ Purification des produits de PCR positifs
- ✓ Quantification
- ✓ Séquençage

Important : Penser à copier les manips sur le cahier EXTERNE et à synthétiser les **RÉSULTATS** sur la liste de travail à la fin de chaque manip.

RENDU DES RESULTATS

❑ **Rendre les résultats préliminaires :**

- ✓ **par téléphone** au(x) prescripteur(x) avant l'envoi définitif par courrier
- ✓ dans la base **Voozanoo** de l'InVS : <https://voozanoo.invs.sante.fr>

❑ **Rendre les résultats définitifs dans LAB 400 :**

- ✓ Ajouter, si nécessaire, les codes correspondants aux analyses complémentaires effectuées
- ✓ Entrer, pour chaque analyse, le résultat : **n+** = négatif OU **p+** = positif

ATTENTION : Les compte-rendus d'épidémie ne sont pas à sortir via LAB 400 ; cependant le logiciel garde les résultats en mémoire. Pour qu'ils ne soient pas imprimés, utiliser la **procédure d'édition n°466** mais annuler directement la tâche sur l'imprimante (VIROLOIL08).

❑ **Créer un dossier au nom de l'épidémie sur le serveur (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats\CR épidémies\dossier n°..) comprenant :**

- ✓ Un **compte rendu** (à imprimer en plusieurs exemplaires) pour :
 - ◆ la chemise de l'épidémie
 - ◆ P. Pothier
 - ◆ la DDASS (ou CIRE)
 - ◆ le laboratoire expéditeur
 - ◆ le(s) prescripteur(s)
- ✓ Un **tableau récapitulatif** de l'épidémie (à imprimer en 3 exemplaires) pour :
 - ◆ la chemise de l'épidémie
 - ◆ P. Pothier
 - ◆ le classeur Fiches épidémies

❑ **Pour les calicivirus séquencés :**

- ◆ Compléter l'**alignement des souches en fonction du génotype** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats\Alignement séquences)
- ◆ Entrer le numéro des échantillons séquencés dans les **tableaux norovirus** et/ou **sapovirus** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats>Liste des échantillons par virus)

□ **Entrer les données épidémiologiques et moléculaires (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats) :**

- ◆ Dans la base **Voozanoo** de l'InVS (<https://voozanoo.invs.sante.fr>)
Rem : Pour les épidémies annoncées mais non reçues, ne pas oublier d'entrer aussi les données
- ◆ Dans le dossier « **Banques de données** », tableau « Bq données Externes »
- ◆ Dans le dossier « **Récapitulatifs ext et hosp** », tableaux « Récapitulatif échantillons Externes » et « Récapitulatif Épidémies »
- ◆ Dans le dossier « **Liste des échantillons par virus** » (hors calicivirus)
- ◆ Dans le dossier « **CNR Entérovirus Lyon** », « Tableau récapitulatif mensuel 200_ »
- ◆ Sur le site du réseau européen **FBVE** (<http://secure.rivm.nl/mpf/norovirus/database>)

ECHANTILLON HOSPITALISE OU EXTERNE HORS CONTEXTE EPIDEMIQUE (CAS SPORADIQUE)

RECEPTION DU PRELEVEMENT

- ❑ **Noter la date de réception du ou des prélèvements sur le(s) papier(s) joint(s)** (formulaire du CNR, prescription, feuille de laboratoire...)
- ❑ **Conserver les échantillons** : à 4°C (traitement dans les 48h) ou à – 20°C.
- ❑ **Enregistrer le prélèvement** :
 - ✓ Dans la **coprothèque** (classeur jaune, onglet : hospitalisés ou externes), enregistrer l'échantillon face au numéro en fin de liste (commencer par **H...** ou **E...**) puis sauvegarder sur le **serveur** (S:\CNR Virus Entériques\Coprothèques\COPROTHÈQUE Hospitalisés ou COPROTHÈQUE Externes).
 - ✓ Enregistrer le patient dans **LAB 400** :
 - ◆ Enregistrer le nom, le prénom, la date de naissance, la date de prélèvement
 - ◆ Enregistrer les examens demandés
 - ◆ Imprimer la liste de travail ; la glisser dans une pochette plastique avec les papiers accompagnant le prélèvement et la déposer dans la pochette « **cas sporadiques et hospitalisés** », casier « **en cours d'analyse** ».

ANALYSES

- ❑ **Réaliser les analyses selon la demande**
- ❑ **Dans certains cas particuliers (exple : les hospitalisés en néonate sans prescription et les patients hospitalisés à Necker), faire toute la batterie virale par PCR** :
 - ◆ Code **30939** (Seeplex, bocavirus, coronavirus, CMV, entérovirus, paréchovirus, sapovirus et virus Aichi)
 - ◆ Et éventuellement le code **30942** (hépatite A)

Remarque : Penser à copier les manip sur le cahier EXTERNE.
Synthétiser les résultats sur la liste de travail à la fin de chaque manip.

RENDU DES RESULTATS

- ❑ **Rendre les résultats dans LAB 400** :
 - ✓ **n+** = négatif , **p+** = positif
- ❑ **Pour les Hospitalisés** :
 - ✓ Imprimer un **compte-rendu dans LAB 400** en « Edition des comptes rendus » (n°8) puis « Edition par numéro » (n°2).
 - ✓ Faire signer le compte-rendu et en faire une copie. Envoyer l'original au prescripteur par **courrier interne** (casier « **courrier** », pièce de sérologie PB-1087). Ranger la photocopie avec la feuille de travail dans la pochette plastique et l'archiver dans le **classeur bleu « Hospitalisés »**.
 - ✓ Pour les **calicivirus** séquencés : compléter l'**alignement des souches en fonction du génotype** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats\Alignement séquences) et entrer le numéro des échantillons dans les **tableaux norovirus** et/ou **sapovirus** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats>Liste des échantillons par virus).
 - ✓ Entrer les **données épidémiologiques et moléculaires** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats) :
 - ◆ Dans le dossier « **Banques de données** », tableau « Bq données Hospitalisés »

- ◆ Dans le dossier « **CNR Entérovirus Lyon** », « Tableau récapitulatif mensuel 200_ »
- ◆ Dans le dossier « **Liste des échantillons par virus** »
- ◆ Dans le dossier « **Récapitulatifs ext et hosp** », tableau « Récapitulatif Hospitalisés »

□ **Pour les Externes** :

- ✓ Faire un **compte-rendu** dans le dossier « **CR Cas sporadiques** » de l'année en cours (*S:\CNR Virus Entériques\Rendu résultats\CR Cas sporadiques\Externes\Externes 200_*) puis l'imprimer sur papier à **en-tête du CHU**.
- ✓ Faire signer le compte-rendu et en faire une copie. Envoyer l'original au **prescripteur** sous enveloppe. Ranger la photocopie avec la feuille de travail dans la pochette plastique et l'archiver dans le **classeur jaune « Cas sporadiques »**.
- ✓ Pour les **calicivirus** séquencés : compléter **l'alignement des souches en fonction du génotype** (*S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats\Alignement séquences*) et entrer le numéro des échantillons dans les **tableaux norovirus** et/ou **sapovirus** (*S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats\Liste des échantillons par virus*).
- ✓ Entrer les **données épidémiologiques et moléculaires** (*S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats*) :
 - ◆ Dans le dossier « **Banques de données** », tableau « Bq données Externes »
 - ◆ Dans le dossier « **CNR Entérovirus Lyon** », « Tableau récapitulatif mensuel 200_ »
 - ◆ Dans le dossier « **Liste des échantillons par virus** »
 - ◆ Dans le dossier « **Récapitulatifs ext et hosp** », tableau « Récapitulatif échantillons Externes »

10.2. ANNEXE A2 : Procédures

10.2.1. Protocoles d'envoi d'échantillons de selles

10.2.2. Formulaires accompagnant les envois

Renseignements disponibles sur le site :

<http://www.chu-dijon.fr/page.php?url=directory/centre-national-de-referance-des-virus-enteriques/traitement-des-prelevements>

*Site accessible par moteurs de recherche avec la dénomination suivante
« CNR virus entériques »*



Centre Hospitalier
Universitaire de Dijon

Laboratoire de Virologie

Centre National de Référence des Virus Entériques

CHU, Plateau Technique de Biologie
2, Rue Angélique Ducoudray, BP 37013, 21070 Dijon
Tél : 03-80-29-34-37 - Fax : 03-80-29-32-80
cnr@chu-dijon.fr

PROTOCOLE D'ENVOI D'ÉCHANTILLONS DE SELLES POUR INVESTIGATION D'UNE ÉPIDÉMIE DE GASTRO-ENTÉRITES

Recueil des échantillons :

- Pour l'investigation d'une épidémie de gastro-entérites, un minimum de **3 à 5 échantillons** est recommandé (un échantillon par patient).
- Chaque échantillon doit être recueilli dans un flacon type flacon à coproculture.
- Les prélèvements sont à conserver à +4°C (pour un envoi sous 48h) ou à -20°C (pour un envoi différé).
- **Les prélèvements doivent être accompagnés des formulaires n°1 (demande d'investigation), n°2 et n°3 (renseignements épidémiologiques) ci-joints.**

Réalisation du colis :

- **Les prélèvements doivent être envoyés dans un triple emballage conforme à la réglementation en vigueur pour le transport des échantillons cliniques (arrêté ADR¹) :**
 - ✓ Déposer les flacons (*réceptifs primaires*), entourés de papier absorbant, dans un sachet plastique ou une boîte rigide (plastique, métallique...) à fermeture hermétique (*emballage secondaire*), puis dans une boîte en carton ou polystyrène (*emballage extérieur*), avec interposition de matières de rembourrage appropriées.
 - ✓ Apposer sur la surface extérieure du colis la désignation « Matière Biologique, catégorie B » près de la mention UN 3373 en forme de losange.



Conditions d'envoi :

- **Le colis est à envoyer à température ambiante (max. 25°C) ou réfrigéré (max. 4°C) dans un délai rapide (48-72h) par voie postale ou par transporteur agréé.**
- Pour éviter les délais d'acheminement trop longs, il est souhaitable d'effectuer l'envoi en début ou en milieu de semaine (laboratoire ouvert tous les jours sauf le dimanche).
- Expédier le colis à l'adresse suivante :

**Centre National de Référence des Virus Entériques
Laboratoire de virologie
CHU – Plateau Technique de Biologie
2, rue Angélique Ducoudray
BP 37013
21070 DIJON CEDEX**

¹ Arrêté du 5 décembre 2002 modifiant l'arrêté du 1^{er} juin 2001 relatif au transport des matières infectieuses : instructions ADR P650 (par route) ou IATA 650 (par air).



Centre Hospitalier
Universitaire de Dijon

Laboratoire de Virologie

*Centre National de Référence
des Virus Entériques*

CHU, Plateau Technique de Biologie
2, Rue Angélique Ducoudray, BP 37013, 21070 Dijon
Tél : 03-80-29-34-37 - Fax : 03-80-29-32-80
cnr@chu-dijon.fr

**DEMANDE D'INVESTIGATION D'UNE EPIDEMIE DE GASTRO-ENTERITES
FORMULAIRE N°1**

- Expéditeur du colis** (pour le rendu de résultats) :
 - Nom
 - Institution
 - Adresse
 - Téléphone
- Médecin demandant l'investigation** (pour le rendu de résultats):
 - Nom
 - Institution
 - Adresse
 - Téléphone

Étiquette à découper et à coller sur le colis :

Nombre d'échantillons envoyés :

☞ Préciser l'identité et la date de naissance des patients ainsi que la date de prélèvement sur les pots à coproculture.



**MATIERE BIOLOGIQUE
CATEGORIE B**



Laboratoire de Virologie

Centre National de Référence des Virus Entériques

CHU, Plateau Technique de Biologie
2, Rue Angélique Ducoudray, BP 37013, 21070 Dijon
Tél : 03-80-29-34-37 - Fax : 03-80-29-32-80
cnr@chu-dijon.fr

RENSEIGNEMENTS EPIDEMIOLOGIQUES FORMULAIRE N°2 – FICHE GLOBALE

Référent (nom, qualité) :

Caractéristiques de l'épidémie :

- Lieu** (Hôpital, maison de retraite, école, restaurant, domicile...) :
.....
- Date d'apparition des signes :** - pour le premier cas :/...../.....
- pour le dernier cas :/...../.....
- Date de fin d'épidémie :**/...../.....
- Nombre de cas :**
Dont nombre de patients hospitalisés suite à l'épidémie :
Dont nombre de patients décédés suite à l'épidémie :
- Nombre de personnes exposées :**
- Nombre de cas dans les groupes d'âges suivants :**

0-4 ans	:	15-64 ans	:
5-14 ans	:	>65 ans	:
- Mode de transmission suspecté :**

<input type="checkbox"/> Personne à personne	<input type="checkbox"/> Coquillage
<input type="checkbox"/> Alimentaire (hors coquillage)	<input type="checkbox"/> Hydrique
<input type="checkbox"/> Alimentaire puis personne à personne	<input type="checkbox"/> Inconnu

Si alimentaire, préciser : - date du repas :/...../.....
- aliment(s) incriminé(s) :
- investigation virale des aliments : oui non
- Durées moyennes :** - de l'incubation : - des signes :
- Signes cliniques :** - **Nombre de cas avec :** - vomissements uniquement:
- diarrhées uniquement :
- diarrhées et vomissements :
- Autres signes cliniques:**
- Analyses microbiologiques (bactériologie & parasitologie) réalisées :** oui non
Si oui, préciser : - nombre de patients:
- résultats:



Centre Hospitalier
Universitaire de Dijon

Laboratoire de Virologie

Centre National de Référence des Virus Entériques

CHU, Plateau Technique de Biologie
2, Rue Angélique Ducoudray, BP 37013, 21070 Dijon
Tél : 03-80-29-34-37 - Fax : 03-80-29-32-80
cnr@chu-dijon.fr

RENSEIGNEMENTS EPIDEMIOLOGIQUES FORMULAIRE N°3 – FICHE INDIVIDUELLE

- Nom :**
- Prénom :**
- Date de naissance :**
- Sexe :**
- Date du prélèvement :**

- Signes cliniques* :**
 - Vomissements
 - Diarrhée
 - Fièvre
 - Nausées
 - Douleurs abdominales
 - Autres (à préciser) :

- Durée des signes cliniques :** du au
- Evolution des signes* :** Guérison Hospitalisation Autres

- Résultats des analyses microbiologiques (bactériologie et parasitologie) :**

*Cocher les cases concernées

11. ANNEXES : PUBLICATIONS

1. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009 ; 28 : 403-7.
2. *J Clin Microbiol.* 2009 ; 47 : 421-9
3. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15 : 31-8.
4. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1037-45.
5. *Journal of Infectious Diseases.* 2009;200 Suppl 1:S215-21.
6. *J Clin Virol.* 2009 ; 46 : 282-5.
7. *J Med Virol.* 2009 ; 81 : 1895-902.
8. *J Clin Microbiol.* 2009 ; 47 : 2275-8.
9. *J Appl Microbiol.* 2009 Oct 1.
10. *J Clin Microbiol.* 2010 ; 48 : 994-998.
11. *J Clin Microbiol* 2010 ; 48 : 915-920.
12. *Med Sciences,* 2010 ; 1 : 73-78.
13. *La Lettre de L'Infectiologue,* 2009 ; 24 : S2, 3-11.
14. *Traité de biologie clinique de l'EMC,* 2009 (sous presse).