

Rapport annuel d'activité

2018

Centre national de référence des ARBOVIRUS

CNR coordonnateur
IRBA Marseille
Responsable : I. Leparc-Goffart

CNR Laboratoire associé
Région Antilles Guyane
Institut Pasteur de la Guyane
Responsable : D. Rousset

CNR Laboratoire associé
Région Océan Indien
CHU Saint Denis Réunion
Responsable : M-C. Jaffar-Bandjee

Année d'exercice
2017

Résumé analytique

Les maladies virales transmises par les arthropodes hématophages (arboviroses) rassemblent un grand nombre de pathologies pouvant affecter différentes espèces animales et/ou l'homme. L'impact en santé publique et les répercussions économiques peuvent être conséquentes, comme illustré par plusieurs années consécutives d'émergences arbovirales majeures (Chikungunya et Zika). Ces émergences ont également montré le potentiel d'expansion extraordinaire des zones de circulation géographique des virus concernés, représentant un défi majeur pour les dispositifs de surveillance et d'alerte nationaux, ainsi que pour la gestion du risque vectoriel. En 2017, le volume d'activité lié à la surveillance des arbovirus majeurs que sont les virus de la Dengue, du Chikungunya et maintenant du Zika, a correspondu à une situation qui peut être qualifiée d'inter-épidémique.

La situation épidémiologique est restée calme dans les Départements Français d'Amérique. Aucun cas de Dengue ou de Chikungunya n'a été détecté, et seulement quelques cas de Zika ont été diagnostiqués en début d'année 2017. Cependant, en marge de l'épidémie soutenue de Fièvre Jaune sévissant au Brésil, un cas mortel d'infection par ce virus a été diagnostiqué en Guyane en Août 2017, alors qu'aucun cas autochtone n'avait été détecté depuis 1998 dans ce département d'outre-mer.

Pour la zone de l'Océan Indien, comme les années précédentes, une circulation autochtone du virus de la Dengue a été mise en évidence par la surveillance d'abord dans l'Ouest, puis dans le Sud de l'île de La Réunion en début d'année. Néanmoins, une persistance inhabituelle de circulation à bas bruit a été observée pendant l'hiver austral, avec une reprise de la circulation plus soutenue au dernier trimestre 2017, rappelant les prémices similaires de l'épidémie de Chikungunya sur l'île en 2005-2006.

En France métropolitaine, la période de surveillance renforcée estivale sur les 33 départements colonisés par le moustique tigre *Aedes albopictus* a été marquée par une émergence du virus Chikungunya, avec 17 cas autochtones répartis sur deux communes du Var en région PACA, après une importation en provenance du Cameroun mise en évidence par enquête épidémiologique, séquençage de la souche et analyse phylogénétique. Deux cas isolés d'infection par le Virus West-Nile ont également été détectés dans le département des Alpes-Maritimes.

Abstract

Viral diseases transmitted by arthropods (arboviral diseases) regroup a large number of illnesses affecting various animal species and/or human populations. The impact on public health and the potential economical consequences can be substantial, as illustrated by the several consecutive years of major arboviral emergence (Chikungunya and Zika). These emergence episodes also showed the tremendous potential for these arboviruses' geographical expansion, representing a major challenge for the French national surveillance and alert plans and measures, as well as for the vector risk management. In 2017, the volume of activity linked to the surveillance of the major arboviruses Dengue, Chikungunya and now Zika corresponded to an interepidemic period.

The epidemiological situation stayed quiet in the French Departments in the Americas. No Dengue or Chikungunya cases were detected, and only a few Zika cases were diagnosed at the beginning of the year. Meanwhile, concurring with the Yellow Fever epidemic spreading in Brazil, a deadly case of this arboviral disease was diagnosed in French Guiana in August of 2017, as no cases had been detected since the last deadly one in 1998 in this French overseas department.

In the Indian Ocean region and likewise the past few years, a Dengue virus autochthonous circulation was highlighted through local surveillance first in the west part, and then in the south part of La Réunion island at the beginning of 2017. However, an unusual low level circulation of the virus persisted during the austral winter time period, with a burst of cases afterwards during 2017 last trimester, reminding the similar premises to the major Chikungunya outbreak on La Reunion Island in 2005-2006.

In metropolitan France, the summer reinforced surveillance plan in the 33 departments where the tiger mosquito *Aedes albopictus* is implanted allowed the detection of a Chikungunya virus emergence episode, with 17 autochthonous cases diagnosed in two different nearby cities in South France. The circulating strain originated from Cameroon according to epidemiological survey, genome sequencing and phylogenetic analysis. Besides, two cases of West-Nile infections were reported in the Alpes Maritimes department.

1 Missions et organisation du CNR

Les nouvelles missions sont définies dans l'appel à candidature de l'agence nationale de santé publique (Santé Publique France) le 19 juin 2016 et confiées par arrêté du 7 mars 2017, pour la période allant du 1^{er} avril 2017 au 31 mars 2022, à l'IRBA (laboratoire coordonnateur), à l'Institut Pasteur de Guyane à Cayenne et au CHU de Saint-Denis à La Réunion (laboratoires associés).

Les missions du CNR Arbovirus n'ont pas évoluées au cours de l'année 2017. Voir l'Annexe 1 pour le rappel des missions.

1.1.1 Les équipes

1.1.1.1 CNR Arbovirus-IRBA (laboratoire coordonnateur)

La Figure 1 rappelle les personnels et l'organisation du laboratoire coordonnateur CNR Arbovirus, IRBA Marseille, sous forme d'organigramme.

Il est à noter que la VSSA Sana Johanna, occupant le poste de secrétaire, a quitté l'Unité Arbovirus en Mai 2017. Le poste de secrétaire est resté vacant pour le reste de l'année. Par ailleurs, les personnels vacataires ont été remplacés au début du 3^{ème} trimestre 2017, nécessitant une période de formation qui, si elle n'a pas eu un impact immédiat sur l'activité de l'équipe technique du CNR pour la diagnostic, a cependant induit des délais dans la réalisation des activités de recherche et développement du CNR.



Figure 1 : Organigramme de l'Unité des Arbovirus, IRBA.

* Personnels vacataires présents à la fin de l'année d'exercice 2017 (nouveaux arrivants)

diagnostic Biologie Moléculaire ; diagnostic Sérologie ; mise en culture et séroneutralisation

Locaux et équipements de laboratoire

Aucun changement majeur n'est intervenu dans le laboratoire coordonnateur. Le descriptif est présenté en annexe 2.

Démarche Qualité et Aspects Règlementaires

Suite à la visite initiale du COFRAC en Octobre 2016, le CNR Arbovirus a travaillé à la levée de tous les écarts critiques conditionnant l'accréditation. Ceci inclut un écart critique qui a retardé l'accréditation. Il concernait l'autorisation de signature de la Directrice et de ses deux adjointes scientifiques mais non biologistes médicaux. Cette autorisation a été donnée lors de la séance du 6 Décembre 2017, par la Commission Nationale de Biologie Médicale de la Direction Générale de la Santé. Le CNR Arbovirus a donc été accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 au 1^{er} Janvier 2018. Cette accréditation, en portée B, concerne la détection du génome viral par qRT-PCR et la détection des anticorps IgM et IgG des virus de la Dengue et du virus Chikungunya, représentant 50% de l'activité diagnostique du CNR.

Le CNR envisage une extension de l'accréditation au diagnostic sérologique et moléculaire du virus Zika pour l'année 2019.

1.1.1.2 CNR-LA-IPG (CNR Laboratoire associé IP Guyane)

Organigramme

Le financement accordé par Santé Publique France pour le CNR-LA-IPG étant inchangé par rapport à la dernière mandature, il n'a pas été possible de faire évoluer l'organisation du CNR-LA-IPG conformément aux propositions présentées dans le dossier de candidature pour le mandat 2017-2021. Les effectifs de personnels au sein du CNR-LA-IPG sont donc inchangés par rapport à la précédente mandature (figure 2 et annexe 1).

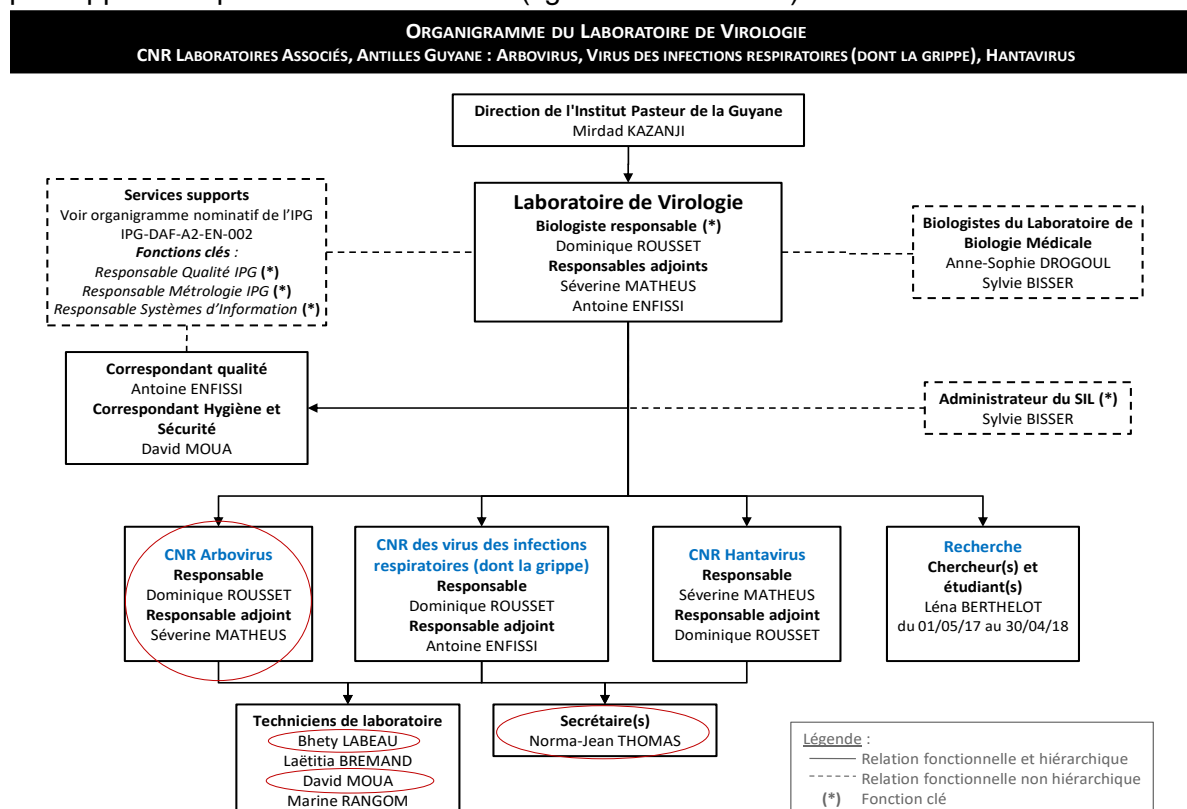


Figure 2 : Organigramme du laboratoire de virologie hébergeant le CNR Arbovirus, laboratoire associé IP Guyane au 31/12/2017 (en rouge : CNR arbovirus -LA-IPG)

Locaux et équipements de laboratoire

Le descriptif est présenté en annexe 2.

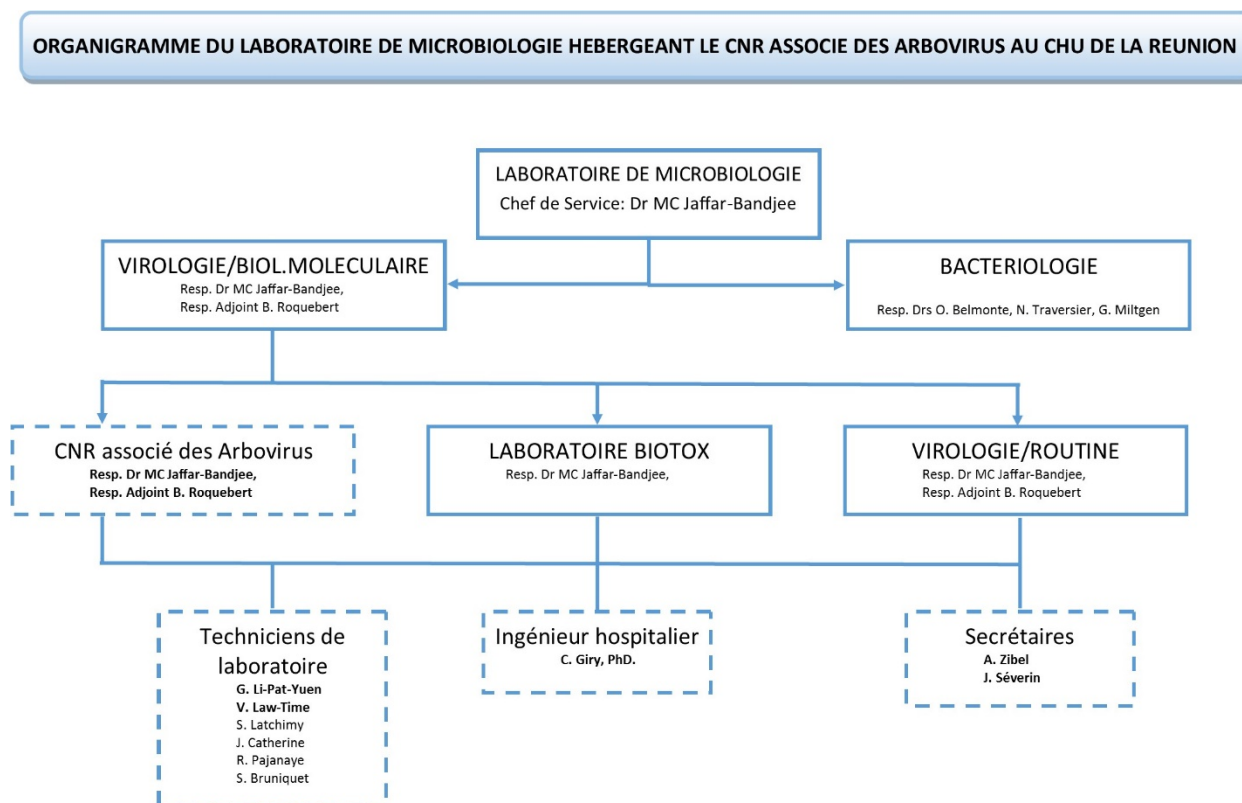
Le fait marquant pour le CNR-LA-IPG est la qualification du nouveau laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 mis en service en août 2017. Au cours de l'année 2017, dans le cadre d'un projet de recherche, le laboratoire s'est également doté de la technologie Luminex.

Démarche Qualité et Aspects Règlementaires

Le laboratoire de virologie qui héberge le CNR-LA-IPG, est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 et les règles d'application du COFRAC sous le numéro 8-3373 depuis Nov. 2014 pour la version 2007 et depuis Nov. 2015 pour la version 2012 de cette norme (sous-famille concernée : sérologie infectieuse / portée A). Le maintien de cette accréditation a été obtenu en août 2017 suite à la visite de suivi S3. Une demande d'extension du périmètre d'accréditation a été déposée en septembre 2017 pour la sous famille : VIROH pour les techniques de détection moléculaire (portée B). Une seconde demande d'extension du périmètre d'accréditation pour la sous famille : ISEROBM pour les techniques de sérologie arbovirus « maison » / portée B) a été préparée pour un dépôt effectif en janvier 2018. Ces 2 demandes d'extension seront évaluées par le COFRAC lors de l'audit de renouvellement prévu en juillet 2018.

1.1.1.3 CNR-LA-LR (CNR Laboratoire associé La Réunion)

Organigramme



Locaux et équipements de laboratoire

Déménagement prévu :

Au cours du dernier trimestre 2018, l'ensemble du pôle Laboratoire du CHU Félix Guyon déménagera dans des nouveaux locaux du Bâtiment des Soins Critiques sur le même site. Le CNR Associé intégrera la plate-forme de biologie moléculaire de 200 m² qui comprend 2 blocs d'extraction/amplification de 42 m² chacun, une salle d'électrophorèse de 17 m², une salle blanche, une salle de post-PCR 14 m², une sérothèque 20 m². La sérologie sera réalisée dans une pièce de 12 m². Un nouveau laboratoire P3 sera livré aussi. Par ailleurs, le service de génétique est en cours d'acquisition d'une plate-forme de séquençage NGS, ce qui nous permettra dans le cadre de collaboration de réaliser sur place les analyses des séquences génomiques.

Démarche Qualité et Aspects Règlementaires

En 2017 , le laboratoire a été accrédité Cofrac ISO 15189 pour 62% du total des analyses du laboratoire (8-3832 Rév3). La validation de méthode en portée B a été réalisée pour la multiplexe Chikungunya/Dengue/leptospirose dans la famille Microbiologie /virologie.

2 Activités d'expertise

Les techniques de référence, la liste des marqueurs épidémiologiques, les collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence disponibles ainsi que les conditions de stockage, et de mise à disposition de ces collections sont décrites dans l'annexe 2

2.1 Évolutions des techniques

2.1.1 CNR Arbovirus-IRBA

➤ Développement d'un test ELISA spécifique du virus Zika

Partenaires : Unité de Biothérapie Infectieuse et ImmunitéArchitecture (IRBA, Brétigny-sur-Orge) et Unité Fonctions des Macromolécules Biologiques (UMR 7257 CNRS – Aix Marseille Université).

En raison des sérocroisements observés entre différents flavivirus, les tests ELISA ne permettent pas de les distinguer avec fiabilité. La spécificité des tests sérologiques est d'autant plus nécessaire que ces virus co-circulent en zone épidémo-endémique. Seule la séroneutralisation, manipulation coûteuse et chronophage, lève toute ambiguïté. Le CNR travaille en collaboration avec ses partenaires à la mise au point d'un test ELISA basé sur la reconnaissance du domaine III de la protéine d'enveloppe du virus Zika (protéine recombinante), présentant une faible homologie de séquence avec les autres flavivirus. Nous avons sélectionné 199 sérums de patients répartis en trois groupes afin de valider cette technique et nous avons obtenu une sensibilité de 92% et spécificité de 90%, alors que le kit de référence sur le marché (EuroImmuno) présente une sensibilité de 96% et une spécificité de 84%. Ces travaux sont en cours de rédaction.

2.1.2 CNR-LA-IPG

Techniques développées :

Mise en place de nouvelles techniques moléculaires

- qRT-PCR virus Fièvre Jaune (technique Taqman développée en complément de la technique Sybergreen déjà disponible au laboratoire)
- qRT-PCR multiplex virus Oropouche et virus Mayaro
- qRT-PCR multiplex virus West Nile et virus Encéphalite Japonaise

2.1.3 CNR-LA-LR

- Mise en place de la sérologie Zika (kit Euroimmun) essentiellement pour le suivi des femmes enceintes et de leur conjoint provenant d'un séjour en zone d'endémie selon les recommandations de l'Agence de Biomédecine.
- Développement en cours de la technique de séquençage « Long Range » du virus de la dengue avec externalisation de la prestation NGS (en attendant la mise en place de la plateforme NGS du service de Génétique du CHU)

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

2.2.1 CNR Arbovirus-IRBA

Evaluation du kit diagnostic « Arbovirus Fever Mosaic » de la société Euroimmun

Partenaires :

- CHU de Poitiers, Laboratoire de Virologie et Mycobactériologie
- CHU de Montpellier St Eloi, Pôle Biologie Pathologie, Laboratoire de Virologie

Le kit **Arbovirus Fever Mosaic** est un kit d'immunofluorescence pour la détection simultanée des anticorps anti Chikungunya, Zika et Dengue 1 à 4 sur une même puce. Ce kit est phase finale d'évaluation.

Le CNR a testé la présence d'IgM par MAC-ELISA et d'IgG par ELISA indirect pour les virus Chikungunya, Dengue et Zika pour les 2 panels de sérum suivants :

- 20 contrôles négatifs qui étaient toutefois positifs pour d'autres étiologies telles que paludisme, hépatite C, hépatite A, EBV, CMV, parvovirus B19 etc, pouvant induire une stimulation polyclonale
- 27 sérums sélectionnés par nos collaborateurs de Poitiers en fonction des résultats obtenus avec le kit Arbovirus Fever Mosaic.

Conjointement, le CNR a sélectionné 60 sérums issus de la sérothèque avec des profils sérologiques variés : positifs en IgM et/ou IgG pour Dengue, Chikungunya, Zika, vaccinés Fièvre Jaune ou non. Ces sérums ont été envoyés au CHU de Poitiers pour être testé avec le kit **Arbovirus Fever Mosaic**.

Les résultats sont en cours d'analyse et seront connus courant 2018.

Evaluation de la trousse multiplex Viasure « Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR Detection Kit » - Partenariat CHU Clermont-Ferrand/CNR Arbovirus-IRBA

Dans le cadre de l'évaluation des performances du kit Multiplex Zika, Dengue & Chikungunya de la trousse Viasure (répétabilité et fidélité) et en comparaison des trois trousse Altona version 2.0 en individuel pour ces 3 virus, le CNR a fourni au laboratoire du CHU de Clermont-Ferrand des gammes de virus Zika, Dengue et Chikungunya caractérisées au CNR avec nos techniques « maison » pour Dengue et Chikungunya, et le kit Altona pour le Zika.

Les résultats seront prochainement publiés.

2.2.2 CNR-LA-IPG

- Evaluation de techniques de diagnostic sérologique : kits commerciaux (Euroimmun, et DiaPro) et techniques maison (MAC, GAC et AAC -ELISA) :

- ❖ **Evaluation des performances des tests Euroimmun, et DiaPro à l'aide d'un panel de 199 sérums prélevés entre J3 et J20 après le début des symptômes :**

- **90** sérums de patients Zika positifs,
- **109** sérums de patients Zika négatifs (35 prélèvements de Dengue confirmées, 29 prélèvements de Chikungunya confirmés et 45 prélèvements Dengue, Chikungunya et Zika négatifs)

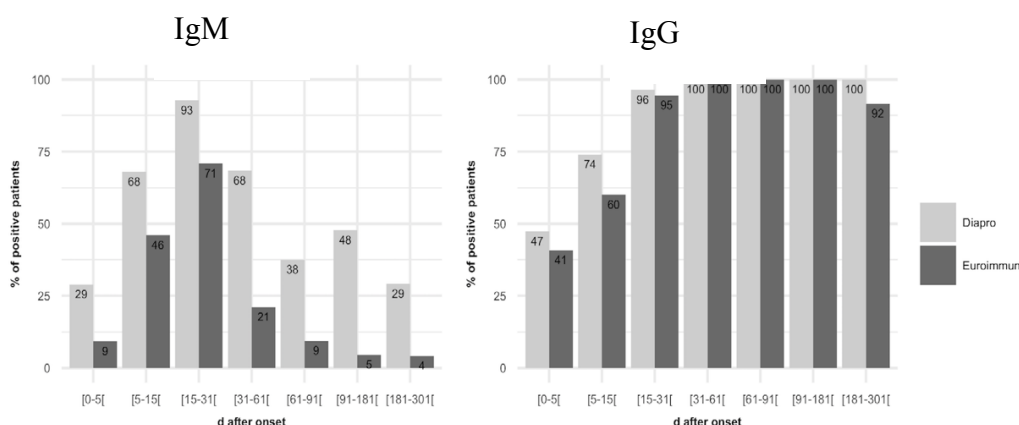
Résultats :

- EUROIMMUN
 - *IgM* : Se : 49% (38-60) ; Spe : 99% (97-100)
 - *IgG* : Se : 71% (61-81) ; Spe : 70% (61-79)
- DIA-PRO
 - *IgM* : Se : 69% (59-79); Spe : 96% (92-100)
 - *IgG* : Se : 79% (70-88) ; Spe : 62% (53-71)

Défaut de sensibilité des IgM associé à un défaut de spécificité des IgG.

A noter, la spécificité des tests est largement impactée par la circulation d'autres flavivirus.

- ❖ Etude de la cinétique des anticorps à l'aide d'un panel de 300 serums de 124 patients avec une infection par le virus Zika confirmée par PCR et prélevés entre J0 et J300 après le début des symptômes :



Résultats.

Défaut de sensibilité particulièrement marqué pour la détection des IgM anti Zika avec le kit Euroimmun

Persistance prolongée possible de la détection des IgM avec le kit DiaPro.

Communications associées :

Guerard Alexandre, « Difficultés diagnostiques du virus Zika chez les femmes enceintes et leurs nouveaux-nés lors de l'épidémie de 2016 en Guyane ». Doctorat en Pharmacie et Mémoire de DES de biologie médicale, Bordeaux, Oct 2017.

Rousset D, « Enjeux et challenges du diagnostic biologique du Zika » présentation aux RSPAG Cayenne, janv 2018.

Matheus S et al, « Performances of two commercial serological for diagnosis of Zika infection : challenges and limitations », publication soumise début 2018.

- Mise en place et évaluation d'une technique Luminex MIA pour la détection en multiplex des anticorps dirigés contre les arbovirus suivants : Dengue, Zika, West Nile, Fièvre Jaune, Chikungunya, et Mayaro : en cours. Cette technique est utilisée dans le cadre d'un projet de recherche visant à estimer la séroprévalence des arboviroses prioritaires en Guyane (cf& 6.1.2.3 **FEDER EPI-Arbo** : Séro-épidémiologie des arboviroses prioritaires en Guyane).

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Pas de transferts de techniques pour 2017.

2.4 Collections de matériel biologique

2.4.1 CNR Arbovirus-IRBA

La collection de souches virales du CNR Arbovirus-IRBA a été enrichie d'isolats contemporains en 2017, grâce à la mise en culture systématique de tout prélèvement positif en détection moléculaire de génome (RT-PCR). Le succès de l'isolement étant lié à la quantité de virus présent dans le prélèvement initial, une mise en culture ne se traduit pas systématiquement par l'isolement du virus. Au total 18 isolats viraux ont été obtenus en 2017, sur 26 mises en culture (taux de succès à l'isolement de 70%). Le tableau 1 résume les données d'isolement pour 2017 en fonction de l'origine du prélèvement.

		DEN 1	DEN 2	DEN 3	CHIKV
Asie	Thailande		1	3	
	Sri Lanka		1		
	Inde	1	1	2	
Afrique	Togo				
	Congo	1		2	
	Côte d'Ivoire			1	
Pacifique	Polynésie Française	1			
Caraïbes	Cuba		1		
Europe	France				3

Tableau 1 : Isolements viraux en fonction des virus et des zones géographiques.

Les ressources biologiques suivantes ont été distribuées par le CNR Arbovirus-IRBA, dans le cadre de sa mission d'expertise :

- Pour le CHU de Clermont-Ferrand, le CNR a transmis des gammes de virus titrés destinées à l'évaluation du kit Viasure "Zika, Dengue & Chikungunya Real Time PCR detection kit ». Nous avons envoyé les gammes de virus Chikungunya, Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3, Dengue 4 et Zika.
- A l'unité INSERM U1259, le CNR a envoyé un aliquot des virus suivant pour le développement de tests de neutralisation: Chikungunya, Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3, Dengue 4, Zika et West-Nile. Nous avons également fourni un sérum contrôle positif Zika pour la validation de leur test ELISA.
- La société Euroimmun a reçu du CNR Arbovirus-IRBA 27 échantillons de sérum/plasma positifs en RT-PCR pour les virus de la Dengue ou du Chikungunya (200 µl par échantillon) pour le développement de tests diagnostic.
- Pour l'évaluation d'un kit d'immunofluorescence Euroimmun en collaboration avec les CHU de Poitiers et de Montpellier, le LABM du CHU de Poitiers a reçu un panel de 60 sérums échantillonnés entre 2010 et 2016, et caractérisés IgM/IgG pour Chikungunya, Dengue ou Zika (voir paragraphe 2.2)

2.4.2 CNR-LA-IPG

Rien à signaler.

2.4.3 CNR-LA-LR

Notre collection biologique s'est enrichie avec 3 souches de dengue 2 isolées en 2017. D'autres

isolements sont prévus.

2.5 Activités d'expertise

2.5.1 CNR Arbovirus-IRBA

Pour le bilan de l'activité de diagnostic du CNR Arbovirus-IRBA en 2017, un total de 4735 prélèvements ont été reçus pour analyse (comprenant les plans de surveillance Dengue/Chikungunya/Zika et West-Nile), contre 3700 en moyenne sur les années inter-épidémiques 2012, 2013 et 2015. Le tableau 2 détaille les types d'analyses réalisées sur ces prélèvements.

Analyses réalisées	Nb dossiers
Pas d'analyses	959
Au moins 1 analyse réalisée	3776
Sérologie ELISA	2426
RT-PCR	1839
Séroneutralisation	568
(RT-PCR+Sérologie)	(899)
(RT-PCR+Sérologie+Séroneutralisation)	(16)
Total de dossiers	4735

Tableau 2 : Bilan du nombre de prélèvements reçus et d'analyses réalisées pour l'année 2017.

Le surcroît d'activité lié à l'épidémie de Zika dans les DFA en 2016 s'est maintenu sur le premier semestre 2017, en lien notamment avec les nombreuses demandes de sérologies et séroneutralisations Zika pour le suivi des grossesses en zone de circulation du virus. Cette activité s'est réduite suite à la décision du CNR Arbovirus-IRBA, en concertation avec SPF, de ne plus réaliser de séroneutralisations Zika pour des personnes asymptomatiques dont les grossesses ont débutées après la fin de l'épidémie Zika dans les DFA, déclarée en Janvier 2017. En effet, les techniques sérologiques, incluant la séroneutralisation, ne permettant pas de dater les anticorps éventuellement détectés, la réalisation de ce test coûteux, long et lourd en ETP ne semblait plus se justifier. Suite à cette décision et sur le reste de l'année 2017, l'activité du CNR Arbovirus-IRBA a été similaire à celle d'une année inter-épidémique (Figure 3).

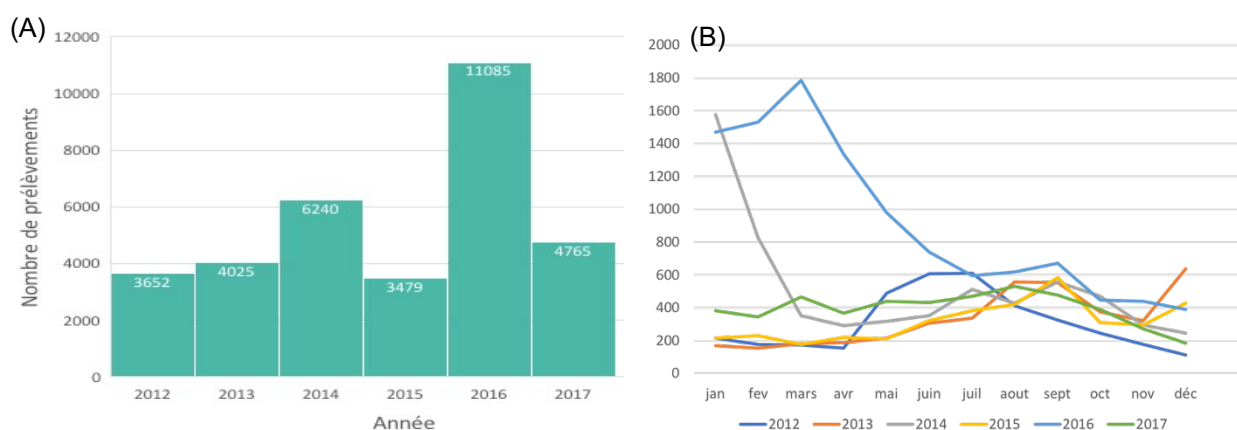


Figure 3 : Evolution du nombre de prélèvements 2012-2017 pour le CNR coordonnateur Arbovirus-IRBA. (A) Nombre total de prélèvements reçus par années d'exercice. (B) Nombre de prélèvements reçus par mois, pour chaque années d'exercice.

Les tableaux 3 et 4 détaillent la provenance et l'origine des prélèvements reçus en 2017.

Origine	Nb de dossiers
Autre	227
CH + CHU + HIA	3016
LABM	1477
Non renseigné	15

Tableau 3 : Nombre de prélèvements reçus en fonction de leur provenance. CH = Centre Hospitalier ; CHU = Centre Hospitalier Unversitaire ; HIA = Hopital d'Instruction des Armées ; LABM = Laboratoire de Biologie Médicale ; Autre = Postes militaires, Greffes, Médecins Sans Frontière, etc.

Notion de séjour	Nb de dossiers
Non renseigné	174
Hors métropole	3452
Métropole (Corse incl.)	1109

Tableau 4 : Nombre de prélèvements reçus en fonction de leur origine géographique.

Les tableaux 5 et 6 présentent le détail des analyses réalisées par type de diagnostic : virologique (détection du génome viral par RT-PCR en temps réel) ou sérologique (MAC ELISA pour la détection des IgM et ELISA indirect pour celle des IgG) pour les pricipaux arbovirus recherchés.

	Dengue					CHIK	Zika
	Pan	D1	D2	D3	D4		
Afrique							
Tchad							1
Guinée							1
Congo		2		1			
Côte d'Ivoire		1	8	1			
Burkina Faso		2		1			
Togo				1			
Mali		1	1				
Mauritanie			1				
Ethiopie			1				
Djibouti	1						
La Réunion	1		1				
Total Afrique		5	12	4	-	-	2
Asie							
Philippines				2			
Indonésie		1					
Thaïlande		5	8	4			
Vietnam		1					
Cambodge	1						
Singapour				1			
Inde	1	1	1	2			
Sri Lanka		1	3				
Birmanie		1					
Total Asie		10	12	9	-	-	-
Caraïbes							
Cuba			1				2
République Dominicaine							1
Total Caraïbes		-	1	-	-	-	3
Amérique							
Total Amérique		-	-	-	-	-	-
Pacifique							
Polynésie Française	2	5					1
Nouvelle Calédonie		1	2	2			
Total Pacifique	2	6	2	2	-	-	1
Total «inconnu »*		2	4	1			

Tableau 5 : Nombre de cas importés confirmés positifs par détection du génome viral par RT-PCR en temps réel, en fonction des virus (Dengue, Chikungunya et Zika) et des zones géographiques. *notion de voyage avec destination non renseignée.

Virus cible	DENV		ZIKV		CHIKV		Flavivirus	
	IgM*	IgG*	IgM*	IgG*	IgM*	IgG*	IgM**	IgG**
Détection isolée* / croisée**								
Nombre total d'analyses	2384		1829		2369		NA	
Europe								
Espagne		1				1		1
France dont Corse		11	3		16	36		36
Italie					2	2		2
Total Europe	-	12	3	-	18	39	-	39
Afrique								
Benin		1				1		
Burkina Faso	2				1	1		5
Cameroun		3				2		2
Cap Vert								1
Centrafrique					1	2		2
Comores		1				1		3
Congo		1						4
Côte d'Ivoire	6	1				4	3	18
Djibouti						2		1
Ethiopie								1
Gabon		1						
Guinée Conakry						1		3
Madagascar		1				2		
Madère		1						
Mali	1					1		4
Mozambique						1		
Niger						1		
Réunion		1				2		2
Tanzanie								1
Tchad						4		11
Togo	1						1	4
Total Afrique	10	11	-	-	2	25	4	62
Asie								
Bengladesh						1		
Birmanie	1		1			1		2
Cambodge								1
Chine						1		1
Inde	1		1			5	1	8
Indonésie						3		4
Japon						1		
Laos						1		2
Malaisie							2	2
Russie						1		
Sri Lanka						1	2	2
Thaïlande	7	1				2	4	16
Turquie						2		
Vietnam								2
Total Asie	9	1	2	-	-	19	9	40
Caraïbes								
"Antilles" non précisé						1		3
Bahamas						1		
Caraïbes						1		
Cuba			3			3		1
Guadeloupe		1		2	1	47		79
Haiti						1		1
Martinique	1	7			2	49		99
République Dominicaine						1		1
Saint Barthélemy						1		2
Saint Martin		1		1		2		2
Total Caraïbes	1	9	3	3	3	107	-	188
Amérique								
Bolivie						1		

Brésil			3		2	4		10
Chili				1				
Colombie		1	1					1
Costa Rica			1			1		
Guyane		4				5		11
Mexique						1		3
Nicaragua								1
Pérou								1
Etats Unis d'Amérique						9		2
Total Amérique	-	5	5	1	2	21	-	29
Pacifique								
Australie						2		
Nouvelle Calédonie	1					2	3	8
Philippines	1						4	1
Polynésie		2			1	8		10
Tahiti	1						2	3
Total Pacifique	3	2	-	-	1	12	9	22
Total « inconnu »	-	-	-	-	-	4	-	1

Tableau 6 : Bilan des analyses sérologiques en fonction de l'origine des prélèvements pour les principales arboviroses recherchées (Dengue, Chikungunya, Zika). * IgM ou IgG isolées. \$ IgM ou IgG positifs pour plusieurs Flavivirus ou Arbovirus.

Un cas d'infection par le virus de l'Encéphalite Japonaise a également été diagnostiqué au retour de Thaïlande et confirmé par séroneutralisation.

Deux cas d'infection par le virus de l'encéphalite à tiques ont été détectés par sérologie : un cas importé de Suède, et un cas autochtone en Haute-Loire, avec confirmation par séroneutralisation (voir § 3.2.1).

Enfin, deux cas autochtones d'infection par le virus West-Nile ont été mis en évidence dans le département des Alpes-Maritimes (région de Nice) par sérologie avec confirmation par séroneutralisation, ainsi qu'un foyer de cas autochtones d'infection par le virus Chikungunya dans le département du Var (voir § 4.1.1)

Le délai de restitution des résultats du CNR Arbovirus-IRBA aux laboratoires est de 48h en moyenne à partir de la réception des prélèvements accompagnés d'une fiche de renseignement complète. Ce délai est réduit à 24h en cas d'urgence.

Pour les analyses par séroneutralisation, la partie technique étant beaucoup plus longue et lourde, le délai moyen de rendu de résultat est de 1 mois à partir de la réception du prélèvement. Le délai peut être réduit à 10 jours en cas d'urgence.

2.5.2 CNR-LA-IPG

En 2017, le CNR, Laboratoire Associé pour les arbovirus de l'Institut Pasteur de la Guyane, a reçu 10896 prélèvements pour expertise, diagnostic et/ou confirmation de diagnostic d'infection par un arbovirus.

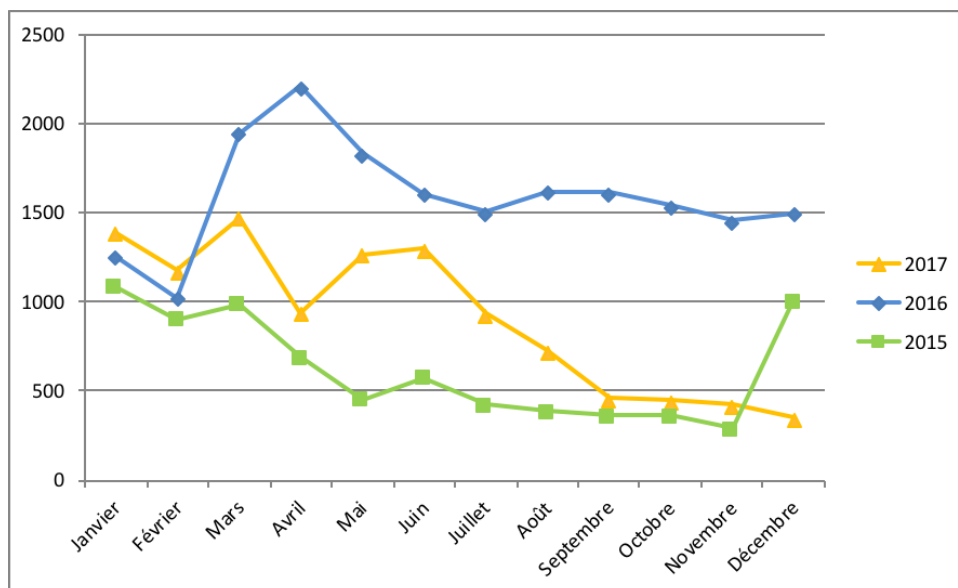
Activités	Nombre de prélèvements	Nombres d'analyses
Diagnostic/confirmation	10896	Virologiques : 2456
		Sérologiques : 17113
IgAZika	58	58 (neg)
Séroneutralisation Zika	79	79 (28 pos / 51 neg)

Tableau 7 : Bilan du nombre de prélèvements reçus et d'analyses réalisées en 2017 par le CNR-LA-IPG

Une diminution d'activité a été observée sur le second semestre de 2017 pour atteindre un niveau cohérent avec une activité de période inter-épidémique. La diminution d'activité observée par rapport à 2016 s'avère particulièrement marquée pour le nombre d'analyses virologiques réalisées avec une diminution d'un facteur 4. Cette diminution s'explique par la réalisation de techniques moléculaires pour la détection des arbovirus Dengue, Chikungunya et Zika, dans une majorité des laboratoires de biologie médicale de Guyane (laboratoire de l'Hôpital de Kourou mais aussi laboratoires privés) associée à l'absence de demande de

confirmation et/ou de typage en raison de l'absence de circulation détectable de ces virus en 2017.

L'activité qui est restée néanmoins élevée en début d'année pour une année inter-épidémique, a été en grande partie liée au suivi des infections par le virus Zika en cours de grossesse et de



leurs conséquences chez les nouveaux nés en Guyane. Ce suivi s'est en effet poursuivi pendant 9 mois après la fin de l'épidémie en Guyane correspondant jusqu'en septembre, à plus de 50% des prélèvements reçus. (Tableaux 7 à 10 et figure 4).

Figure 4 : Evolution du nombre mensuel de prélèvements reçus par le CNR-LA-IPG de 2015 à 2017

Les tableaux 8, 9 et 10 présentent le détail des prélèvements reçus, en fonction de leur origine, ainsi que le nombre d'analyses virologiques et/ou sérologiques réalisées et les résultats obtenus.

ORIGINE	plvts reçus en 2017	PCR DENV		PCR ZIKV		PCR YFV		PCR WNV		PCR SLEV		PCR CHIKV		PCR TONV		PCR MAYV		PCR OROV	
		Nbre	Pos	Nbre	Pos	Nbre	Pos	Nbre	Pos	Nbre	Pos	Nbre	Pos	Nbre	Pos	Nbre	Pos	Nbre	Pos
Saint Barth	1	1										1							
Guadeloupe																			
Martinique	12					3		12											
Guyane	10880	579		1222	4	15	2*	5		2		579		13		10		5	
CH Cayenne	1981	17		56		2	1*	5		2		16		9		4			
CH St Laurent	5400	82		582		1						83							
Labo CH Kourou	392	133		266		9	1*					133							
Labo St Laurent	24			2															
Centres de Santé	988	3		5	1	2						4				2		2	
CMIA (Armées)	107	64		48								64		1		2		1	
Labos ile de Cayenne	1775	280		261	3	1						279		3		2		2	
PMI	213			2															
Suriname	3					3								3		3			
Total général	10896	580	0	1222	4	21	2*	17	0	2	0	580	0	16	0	13	0	5	0

Tableau 8 : Prélèvements reçus en 2017 en fonction de leur origine avec bilan des analyses virologiques réalisées et résultats de ces analyses

* les 2 prélèvements positifs en PCR Fièvre Jaune proviennent d'un seul patient)

DENV = virus Dengue, ZIKV = virus Zika, YFV = virus de la Fièvre Jaune, WNV = virus West Nile, SLE = virus de l'Encéphalite Saint Louis, CHIKV = virus Chikungunya, TONV = virus Tonate, MAYV = virus Mayaro, OROV = virus Oropouche

ORIGINE	Total plvts reçus en 2017	Nb tests IgM "panel arbo"	Résultats sérologies IgM "panel arbo"								Nb plvts testés WN	IgM WN pos	Nb plvts testés SLE	IgM SLE pos	Nb plvts testés IgG Chik	Résultats IgG Chik		
			Neg	IgM DEN isol.	IgM YF isol.	IgM Tonate isol.	IgM Mayaro isol.	IgM CHIK isol.	IgM alpha.*	IgM Flavi+ alpha						Neg	Dout.	Pos
Saint Barth	1																	
Guadeloupe																		
Martinique	12	6	5						1					6	6			
Guyane	10880	1603	1313	17	57	137	22	32	16	9	3		167	2	1603	1233	13	357
CH Cayenne	1981	345	283	4	10	36	3	6	2	1	3		37	1	345	263	4	78
CH St Laurent	5400	113	104		1	6	2						20		113	84	2	27
Labo CH Kourou	392	6	5		1										6	4		2
Labo St Laurent	24	20	15			2	1	1	1	1					20	13	1	6
Centres de Santé	988	24	21		1	1	1						1		24	18	1	5
CMIA (Armées)	107	62	38		13	4	3		1	3			9		62	59		3
Labos ile de Cayenne	1775	1026	843	13	31	87	11	24	12	5			100	1	1026	789	5	232
PMI	213	7	4			1	1	1							7	3		4
Suriname	3	3	2			1									3	3		
Total général	10896	1612	1320	17	57	138	22	33	16	9	11	0	167	2	1612	1242	13	357

Tableau 9 : Prélèvements reçus en 2017 en fonction de leur origine avec bilan des analyses sérologiques hors sérologies Zika réalisées et résultats de ces analyses

DEN = virus Dengue, YF = virus de la Fièvre Jaune, Chik = virus Chikungunya, WN = virus West Nile, SLE = virus de l'Encéphalite Saint Louis

{IgM «x»isol.} : recense les prélèvements présentant des IgManti«x» isolées

{IgMFlavi} : recense les prélèvements associant des IgM anti Dengue à des IgM anti Fièvre Jaune (YF).

{IgMalphav} : recense les prélèvements associant des IgM anti Chikungunya à des IgM dirigées contre d'autres alphavirus, IgM anti Tonate et/ou IgM anti Mayaro.

{IgMFlavi + alphav} : recense les prélèvements associant des IgM anti Flavivirus et anti alphavirus

ORIGINE	Total plvts reçus en 2017	Sérologie Zika		
		Nbre Plvts testés	% IgM et IgG neg	% IgM Pos
Saint Barth	1			
Guadeloupe				
Martinique	12	4	50,0%	0,0%
Guyane	10880	8868	29,0%	10,5%
CH Cayenne	1981	1827	28,5%	12,4%
CH Saint Laurent	5400	5091	25,8%	9,3%
Labo CH Kourou	392	7	57,1%	0,0%
Labo Saint Laurent	24	2	0,0%	50,0%
Centres de Santé	988	977	39,1%	10,2%
CMIA (Armées)	107	37	81,1%	2,7%
Labo ile de Cayenne	1775	718	38,9%	14,1%
PMI	213	209	19,6%	12,4%
Suriname	3	3	100,0%	0,0%
Total général	10896	8875	29,0%	10,4%

Tableau 10 : Prélèvements reçus en 2017 en fonction de leur origine avec bilan des analyses sérologiques Zika réalisées et résultats de ces analyses

Le délai moyen de restitution des résultats aux laboratoires est pour les analyses de diagnostic de + 2,6 jours ouvrables par rapport à la date de réception au laboratoire (remarque : les analyses sérologiques « maison » sont réalisées sur 2 jours ouvrables).

En cas de besoin, ce délai peut être restreint (ex : suspicion d'infection par le virus de la Fièvre Jaune : PCR rendue dans la journée).

Le délai de restitution des résultats pour une séroneutralisation est par contre beaucoup plus long et extrêmement variable en fonction de la charge de travail du laboratoire : avec seulement 2 techniciens au CNR-LA-IPG, cette technique lourde reste difficile à réaliser et nécessite, le plus souvent, le recours à un technicien supplémentaire.

2.5.3 CNR-LA-LR

Malgré le passage à la nomenclature de la RT PCR, en 2017 la totalité des RT-PCR arbovirus a été réalisée par le CHU dont 85 % par le CNR-LR, et 15% par le laboratoire sud du CHU. Le CNR-LR a réalisé les sérologies des établissements hospitaliers (CH Gabriel Martin et Saint-Benoît), les laboratoires privés réalisant eux-mêmes leurs sérologies, acte NABM. A la demande express de la CIRE, nous réalisons des confirmations ou des analyses pour les cas suspects autour d'un cas index.

Prélèvements réalisés pour les établissements extérieurs :

	Nombre de demandes
Etablissements Extérieurs	2779
Laboratoires extérieurs	2777
CH Gabriel Martin Laboratoire	294
RT PCR CHIKUNGUNYA	58
RT PCR DENGUE	114
SERO CHIKUNGUNYA	36
SERO DENGUE	86
LABM SAINT BENOIT	214
RT PCR CHIKUNGUNYA	64
RT PCR DENGUE	102
RT PCR ZIKA	2
SERO CHIKUNGUNYA	21
SERO DENGUE	25
Laboratoires privés	2269
RT PCR CHIKUNGUNYA	738
RT PCR DENGUE	1498
RT PCR ZIKA	17
SERO CHIKUNGUNYA	7
SERO DENGUE	9
Total général	2779

Prélèvement réalisés pour le CHU Nord, le CHU sud réalisant ses propres analyses:

	Nombre de demandes
CHU - Saint-Denis	472
RT PCR CHIKUNGUNYA	93
RT PCR DENGUE	118
SERO CHIKUNGUNYA	125
SERO DENGUE	120
ZIKA	18
Total général	472

Dans le cadre de la restructuration du pôle laboratoire du CHU, toutes les analyses concernant les arboviroses seront regroupées sur le site nord au CNR-LA-LR en juin 2019.

2.6 Activités de séquençage

2.6.1 CNR Arbovirus-IRBA

Pour les besoins de séquençage, le CNR Arbovirus-IRBA a accès à une plateforme de séquençage NGS située au sein de l'UMR 190 Unité des Virus Emergents (Dr : Xavier de Lamballerie), que le CNR a officiellement rejoint depuis le 1^{er} janvier 2018. La plateforme est localisée actuellement à l'Université Aix-Marseille, sur le campus de la Timone. Elle utilise la technologie IonTorrent sur le séquenceur Ion S5™ System. L'UVE a également fourni son expertise en bio-informatique au CNR pour la reconstitution des contigs et l'analyse phylogénétique. Les séquences sont traitées avec le logiciel payant CLC genomicsWorkbench 11.0.1. Les analyses phylogénétiques sont faites à l'aide des logiciels open sources : Clustal W, MEGA, PHyML, RAxML et RecombinationDetection Program (RDP).

En 2017, les activités de séquençage NGS et d'analyse phylogénétique ont été utilisées pour :

- Caractériser la souche de virus Chikungunya responsable de l'épidémie survenue en métropole en juillet 2017 et montrer le lien entre le foyer de Taradeau et Le Cannet des Maures.
- Participer à la description de la transmission sexuelle du virus Zika chez une femme enceinte
- Confirmer la présence d'ARN du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift dans le sang total de patients jusqu'à 67 jours après les symptômes.

2.6.2 CNR-LA-IPG

Le CNR-LA-IPG a un accès possible à la plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) de l'Institut Pasteur, qui est ouverte à l'ensemble des CNR ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteurs et extracteurs permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

Les CNR ont à l'heure actuelle la possibilité de faire appel à une expertise bio-informatique, en sollicitant les services supports en interne à l'Institut Pasteur. Ils ont actuellement accès aux bio-informaticiens du Centre de Bio-informatique, Bio-statistique et Biologie Intégrative (C3BI), qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données sortantes. Ces bio-informaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNR, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Malheureusement, la demande est très supérieure à l'offre (1,2 ETP dédié) et les CNR ne peuvent donc pas être aidés simultanément. Les CNRs et les unités qui les hébergent doivent donc faire appel à des ingénieurs ou bio-informaticiens membres de leur équipe de recherche ou employés sur contrat dédié. Par ailleurs, le nombre d'ETP de bio-informaticiens affecté à la plateforme dédiée aux CNRs fait l'objet d'une négociation interne annuelle.

Par ailleurs, dans le cadre de projets de recherche (voir § 6.1.2.4 FEDER EFAG), le CNR-LA-IPG prévoit, en collaboration avec le laboratoire « Interaction virus-hôtes » de l'IPG spécialisé dans cette activité, la réalisation de séquençage génomique de type WGS et NGS pour l'exploration de fièvres d'étiologie indéterminée.

En 2017, aucune activité de séquençage génomique de type WGS et NGS n'a été demandée dans le cadre des activités de Santé Publique et d'expertise du CNR en l'absence de circulation significative d'arbovirus (année inter-épidémique). Parallèlement, du fait d'un retard à la mise en place du financement du projet FEDER EFAG, les activités de séquençage correspondantes ne

pourront démarrer qu'en 2018.

Seules des activités de séquençage classique ont été réalisées en 2017 sur les prélèvements positifs pour le virus de la Fièvre Jaune : séquençage de la région de l'enveloppe et analyse phylogénétique du virus responsable du décès par Fièvre Jaune détecté en Guyane en Août 2017(cf§ 4.2).

2.6.3 CNR-LA-LR

Nous avons débuté la mise en place de la technique de séquençage « Long Range » du virus de la dengue avec externalisation de la prestation NGS afin d'étudier la phylogénie des dengue de type 2 qui ont circulé depuis 2010. En effet, nous avons plusieurs souches de dengue 2 importées notamment de la région Océan Indien (Seychelles, Mayotte, Comores) et d'Asie (Inde, Bali, Thaïlande, Sri Lanka, Birmanie) et des cas autochtones. L'étude de leur degré de filiation est intéressante, permettant d'identifier éventuellement l'origine de l'épidémie débutée en 2017. L'installation d'une plate-forme Illumina dans le service de génétique est prévue pour 2019 rendant possible la réalisation de l'étude. Une formation en bioinformatique pour l'analyse en épidémiologie génomique est envisagée pour Claude Giry, l'ingénieur du CNR-LA-LR.

Nous travaillons également sur un projet de comparaison de génome partiel de la protéine d'enveloppe E de la dengue entre les prélèvements humains et les prélèvements isolés à partir d'*Aedes albopictus*, en collaboration avec le service de Lutte antivectorielle (J-Sébastien Dehecq) et l'UMR PIMIT (Patrick Mavingui).

3 Activités de surveillance

- Dans les TFA (territoires français des Amériques), après une succession d'épidémies et d'émergences quasi ininterrompues depuis 2012, l'année 2017 a été marquée par une absence de détection des virus Dengue, Chikungunya et de rares cas confirmés d'infection par le virus Zika au premier trimestre.
- L'année 2017 a également été marquée en Guyane par la détection, en août, d'un cas mortel d'infection par un virus Fièvre Jaune en Guyane: la patiente, d'origine brésilienne, travaillant dans un camp d'orpaillage clandestin dans les environs du lac de Petit Saut et ayant voyagé au Brésil (Amapa) dans les semaines ayant précédé son décès, il n'a pas été possible de conclure avec certitude sur le lieu de la contamination. Pour mémoire, le dernier cas de Fièvre Jaune autochtone détecté en Guyane datait de 1998 et il s'agissait d'un cas mortel.
- En France métropolitaine, un foyer de 17 cas autochtones d'infection par le virus Chikungunya a été détecté et contenu dans le département du Var. Deux cas d'infection par le virus West-Nile ont également été mis en évidence et investigués en partenariat avec la Cire et l'ARS PACA/Corse.
- La surveillance des Arbovirus sur l'île de la Réunion a mis en évidence une circulation à bas bruit du virus de la Dengue de type 2 à partir de la fin du premier trimestre 2017 jusqu'à la fin de l'année. Notamment, cette circulation s'est maintenue pendant l'hiver austral, période qui est normalement marquée en situation inter-épidémique par une absence quasi-totale de circulation arbovirale. Cette situation rappelle celle précédant l'épidémie de Chikungunya de 2005-2006.

3.1 Description du réseau de partenaires

3.1.1 CNR Arbovirus-IRBA

Le CNR Arbovirus-IRBA a développé avec Santé Publique France un réseau de laboratoires participant à la surveillance annuelle et regroupant les LABM Biomnis et CERBA, ainsi que des laboratoires hospitaliers répartis sur tout le territoire français et permettant ainsi une bonne couverture globale (Figure 5).



Figure 5. Répartition des laboratoires hospitaliers (★) du réseau de surveillance Arbovirus sur le territoire français (métropole).

La surveillance des arboviroses en métropole repose sur les interactions étroites entre le CNR, le réseau de laboratoires, les Agences Régionales de Santé et leurs CIRE associées.

D'après le plan anti-dissémination Chikungunya, Dengue et Zika (CDZ), le CNR n'est plus en première ligne pour le diagnostic de ces arboviroses. Celui-ci est réalisé par les laboratoires du réseau grâce à la mise à la nomenclature des analyses moléculaires et sérologiques pour le diagnostic de la Dengue, Chikungunya et de l'infection Zika, le CNR Arbovirus-IRBA se positionnant en seconde ligne pour un diagnostic de confirmation et d'expertise : diagnostics d'autres arboviroses (West-Nile, TBE, Fièvre Jaune, Encéphalite Japonaise, Mayaro, Toscana, Fièvre de la Vallée du Rift notamment), sur des matrices alternatives au sérum/plasma (LCR, urines, sperme, etc), confirmation de cas suspects par séroneutralisation, sérologies et séroneutralisations Zika pour le suivi des femmes enceintes exposées et de leurs nouveaux nés.

3.1.2 CNR-LA-IPG

- Description des partenaires :

Dans les DFA, la surveillance des arboviroses repose sur une surveillance menée en partenariat avec les CIRE Antilles et Guyane en collaboration aux Antilles avec les laboratoires hospitaliers, l'Institut Pasteur de Guadeloupe voire les laboratoires privés et en Guyane avec les laboratoires hospitaliers, les laboratoires privés ainsi que les Centres Délocalisés de Prévention et de Soins (CDPS).

Le CNR-LA-IPG, en lien avec les CIRE concernées, participe à l'investigation des cas selon les modalités définies par les plans de lutte contre ces virus, en vigueur dans les DOM de la région : PSAGE (Programme de Surveillance, d'alerte et de Gestion des Epidémies) - Dengue ou -Chikungunya ou -Zika.

- Répartition par type d'activités :

L'introduction à la nomenclature des actes de biologie médicale des diagnostics sérologiques et surtout moléculaires des virus Dengue, Chikungunya et plus récemment Zika a largement contribué à la mise en place de ces techniques au sein de nombreux laboratoires hospitaliers mais aussi privés des Antilles et de Guyane ces 2 dernières années réduisant d'autant le recours au CNR-LA-IPG pour les demandes de diagnostic biologique de première intention.

Parallèlement le nombre de demandes de confirmation de détection positive pour un arbovirus est resté faible pour cette année inter-épidémique pour les arbovirus sur les Antilles comme la Guyane.

Les prélèvements reçus par le CNR-LA-IPG ont ainsi majoritairement concerné :

- des demandes de diagnostic sérologique Zika dans le cadre du suivi des infections par le virus Zika chez les femmes enceintes et les nouveaux nés (correspondant à 68% des analyses). En effet, les premiers tests commerciaux disponibles (IgM Euroimmun) présentant un grand défaut de sensibilité, certains laboratoires ont préféré différer leur mise en place.
- des demandes d'expertise (confirmation et /ou vérification de résultats, séroneutralisations Zika...) ou des demandes de diagnostics spécifiques (arbovirus autres (ex : demandes de diagnostic de virus Tonate, Mayaro, West Nile, ou encore Fièvre Jaune..)
- des demandes de diagnostic sur des prélèvements particuliers (liquide amniotique, LCR, sperme, placenta...).

3.1.3 CNR-LA-LR

Nous participons au groupe de travail avec la CIRE-OI, les professionnels de santé publique et privés. Le CNR associé intervient en tant que membre expert au sein du réseau SEGA (Surveillance des Epidémies et Gestion des Alertes) de l'Océan Indien. Il participe aux Comités de pilotage 1 à 2 fois par an. Il a été sollicité début 2016 pour la mise au point de la RT-PCR Zika dans les pays de la zone Maurice, Seychelles et Madagascar.

Le système de surveillance des arboviroses à l'île de la Réunion repose sur le signalement à la Cire océan Indien (Cire OI, antenne régionale de l'InVS) par les laboratoires de tout résultat biologique compatible avec une infection récente par le virus du chikungunya ou de la dengue (RT-PCR positive ou présence d'IgM spécifiques). Chaque signalement entraîne une investigation épidémiologique réalisée conjointement par la CIRE et la lutte anti-vectorielle (LAV) de l'ARS Océan Indien et la mise en place de mesures de gestion. Le CNR associé est un acteur majeur de ce système de surveillance : d'une part, il est amené à signaler des résultats positifs au même titre que les autres laboratoires ; d'autre part, il est régulièrement sollicité par la Cire OI pour des examens complémentaires (typage) ou des analyses chez les sujets symptomatiques retrouvés dans le cadre de la recherche active autour des cas.

Nous participons à la rétro-information auprès des professionnels de santé et de l'ensemble du réseau régional de santé publique par l'envoi régulier d'un bulletin épidémiologique bimensuel.

Réseau de partenaires :

- Equipe de la CIRE Océan Indien avec transmission par Fax automatisée de tous les résultats positifs ainsi que de la feuille de renseignement. Concertation pour valider la feuille de transmission.
- Les établissements hospitaliers de l'ouest (Hôpital Gabriel Martin) et de l'Est (Groupe Hospitalier Est)
- Les LABM privés Réunilab et Cerballiance

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1 CNR Arbovirus-IRBA

➤ **Plan anti-dissémination Chikungunya, Dengue et Zika (CDZ)– France Métropolitaine**

La surveillance en France métropolitaine met l'accent sur les arbovirus potentiellement transmissibles sur le territoire par le moustique tigre (*Aedes albopictus*) : Chikungunya, Dengue et Zika. Un signalement des cas importés est transmis par le CNR Arbovirus-IRBA de manière sécurisée et hebdomadaire au département des Maladies Infectieuses de SPF (hors période de surveillance renforcée). Lors de la détection d'un phénomène anormal, le CNR contacte immédiatement son correspondant à Santé Publique France.

En période de surveillance renforcée (Mai-Octobre), le CNR Arbovirus-IRBA est en contact étroit et constant avec les ARS et CIREs associées pour le signalement et le suivi des cas importés/autochtones suspects, probables et confirmés, via l'utilisation du portail unifié Voozadoo de SPF (enquêtes de suivi des cas Voozarbo).

En 2017, le CNR Arbovirus-IRBA a reçu 1202 prélèvements dans le cadre de la surveillance renforcée CDZ du mois de Mai au mois d'Octobre (inclus), pour les départements d'implantation du moustique *Aedes albopictus* (départements de niveau 1). La répartition de la provenance de ces prélèvements est illustrée dans la figure 6.

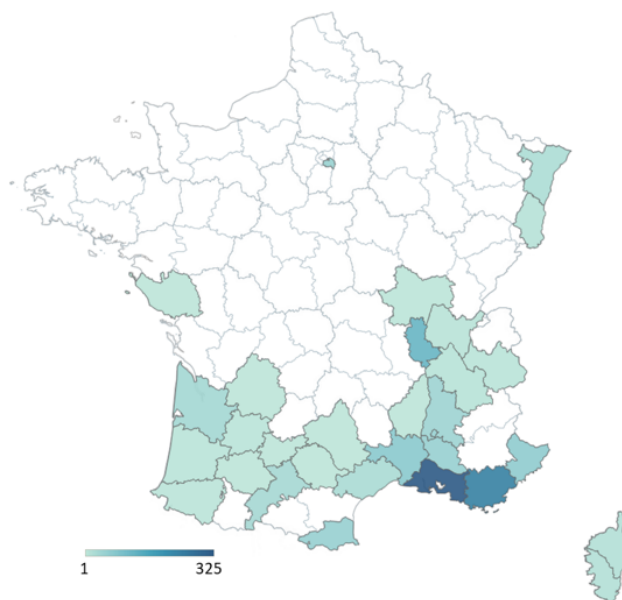


Figure 6 : Origine des prélèvements reçus par le CNR Arbovirus-IRBA en provenance des départements de niveau 1 pendant la période de surveillance renforcée, de Mai à Novembre 2017.

Pendant cette période, le CNR Arbovirus-IRBA a participé au diagnostic et à la confirmation par RT-PCR de 51 cas importés d'infection par le virus de la Dengue, dont 13 dans les départements de niveau 1, et de 2 cas importés d'infection par le virus Zika (cf § 4.1). Aucun cas importé d'infection au virus Chikungunya n'a été détecté.

➤ **Plan de surveillance du virus West-Nile - France métropolitaine**

La surveillance du virus West-Nile s'étend de Juin à Novembre, et concerne les départements du pourtour méditerranéen. Les échantillons de LCR clair provenant de patients adultes (>15 ans) hospitalisés et présentant un état fébrile avec manifestations neurologiques sans étiologie identifiée sont transmis au CNR Arbovirus-IRBA pour analyse. Le CNR informe l'ARS et Santé Publique France en cas de résultats positifs via le portail Voozadoo et communication directe.

En 2017, cette surveillance n'a pas permis la mise en évidence de cas sévères de fièvre à virus West-Nile (82 patients testés). Il est à noter cependant que 2 cas d'infection par le virus West-Nile sans manifestations neurologiques ont été détectés en Septembre 2017 par la surveillance CDZ dans la région de Nice (voir § 4.1.1), montrant les limites de la surveillance saisonnière West-Nile, du fait de la seule prise en compte des cas sévères neurologiques.

La surveillance des autres arboviroses d'intérêt se fait au fil de l'eau et toujours en lien avec les ARS et CIRE en région pour la détection de cas et leur suivi.

➤ **Détection d'un cas d'infection par le virus TBE en Haute-Loire**

Le 30 Juin 2017, le CNR a détecté un cas de TBE en Haute-Loire chez un patient de 76 ans pris en charge au CHU de St Etienne. Des échantillons de sérum et de LCR ont été prélevés environ 2 semaines après le début des symptômes. Les deux matrices biologiques ont montré des IgM et des IgG pour le virus TBE, signant une synthèse intrathécale des anticorps. Le CNR a informé la Cire Auvergne-Rhône-Alpes par courriel. La zone géographique étant inhabituelle pour la circulation du virus TBE, le CNR a ensuite confirmé le cas par séroneutralisation.

L'enquête épidémiologique n'a révélé aucun contact avec les régions habituelles de circulation du virus TBE (ni voyage ni denrée alimentaire). Deux semaines avant la maladie, le patient avait effectué une randonnée dans les forêts de Haute-Loire avec piqûres d'insectes non identifiés, ce qui a amené à la suspicion d'une extension géographique de la zone à risque d'infection à virus TBE. Suite à la détection de ce cas, une fiche d'information a été rédigée par Santé Publique France à destination de la DGS.

3.2.2 CNR-LA-IPG

La surveillance des arbovirus aux Antilles et en Guyane porte en priorité sur la circulation des virus Dengue, Chikungunya et Zika. Cette surveillance est essentiellement réalisée au moyen d'outils moléculaires qui permettent un diagnostic de certitude.

En 2017, cette surveillance n'a pas permis de mettre en évidence de circulation significative des arbovirus Dengue, Chikungunya et Zika (cf chapitre 2.5.2 tableau 8). Après une succession d'épidémies et émergences quasi ininterrompues depuis 2012, l'année 2017 a été en effet marquée par un niveau de détection inhabituellement faible (quasi absence de détection) des virus Dengue et Chikungunya sur l'ensemble des territoires Français des Amériques tandis que seuls de rares cas d'infection par le virus Zika étaient confirmés en début d'année (tableau 11). Ces rares cas confirmés se sont avérés être, au moins pour certains d'entre eux, des cas importés.

	GUYANE	MARTINIQUE	GUADELOUPE	ST MARTIN	ST BARTHELEMY
Dengue	Août 2016*	Juil 2017*	Avr 2016	Mai 2016	Oct 2017
Chikungunya	Jan 2017	Fév 2016	Jan 2015	Avr 2015	na
Zika	Avr 2017	Fév 2017	Jan 2017	Fév 2017	Fév 2017

Tableau 11 : Date des derniers cas d'infection confirmée par virus et par territoire - *cas importés (source : PE Cire Antilles et Cire Guyane)

Pour un diagnostic d'infection par un arbovirus, la sérologie présente différentes limites : grandes variations de performances (sensibilité et spécificité) entre les différents tests, persistance prolongée possible des IgM ou encore existence de réactivation et/ou réactivité sérologiques croisées. Dans le contexte épidémiologique de la région Antilles et Guyane (circulation endémo-épidémique de différents arbovirus), ces limites rendent l'interprétation des résultats difficiles et conduisent le système de surveillance des arbovirus à évoluer en diminuant le poids des diagnostics sérologiques (cas probables) au profit des diagnostics virologiques (cas confirmés).

L'analyse des résultats de la surveillance sérologique pour l'année 2017, sur la base des résultats obtenus sur le panel testé en routine par le CNR-LA-IPG (virus Dengue, Fièvre Jaune, Chikungunya, Tonate et Mayaro), confirme un faible niveau de circulation de ces arbovirus, à l'exception, du virus Tonate. 12.3% des prélèvements testés présentent en effet des IgM anti Tonate positives (majoritairement isolées et dans une moindre part combinées à des IgM dirigées contre d'autres alphavirus), en faveur d'une circulation toujours endémique de ce virus en Guyane (cf chapitre 2.5.2 tableau 9).

Parallèlement, l'analyse des résultats de sérologies Zika, en grande partie réalisées dans le cadre de la surveillance de l'infection chez les femmes enceintes et les nouveaux-nés, met en évidence une prévalence des IgM anti Zika de l'ordre de 10%, soit 2 fois plus faible que celle observée sur l'année 2016 Guyane (cf chapitre 2.5.2 tableau 10). Ces résultats, qui restent élevés au regard d'une circulation du virus non détectable à partir du mois d'avril en Guyane, s'expliquent par la persistance prolongée des IgM observée lors de l'évaluation des techniques sérologiques (cf§2.2). De plus, compte tenu du défaut de spécificité observé notamment dans la détection des IgG du fait d'une importante réactivité croisée entre flavivirus, la proportion de patients n'ayant pas été en contact avec le virus Zika est très probablement largement supérieure aux 30% de sérologies négatives observés.

3.2.3 CNR-LA-LR

Tous les cas de dengue diagnostiqués en 2017 (59 par RT-PCR) ainsi que toutes les sérologies positives en IgM sont transmis systématiquement à la CIRE-OI Santé Publique France avec la feuille des renseignements cliniques, le laboratoire transmetteur et le médecin prescripteur dès que le résultat est validé afin de permettre l'intervention du service de la lutte antivectorielle. Le typage réalisé dans un second temps est aussi transmis. Le CNR répond à toute sollicitation de la CIRE Oi, de l'ARS (complément d'analyse, vérification de résultat...) ou des analyses chez les sujets asymptomatiques retrouvés dans le cadre de la recherche active autour des cas. En fonction de la date du début des signes, les analyses RT-PCR et/ou sérologie sont ajustées. Le diagnostic rapide de cas dans une région peu ou pas atteinte par la Dengue permet l'intervention rapide de la Lutte antivectorielle. Le CNR au cours du dernier trimestre 2017 a rencontré les responsables de la LAV (service de la Lutte anti vectorielle) et de l'UMR PIMIT afin de coordonner le recueil de moustiques autour des cas confirmés afin d'identifier l'espèce en cause de la transmission (*Aedes albopictus* ou *aegypti*). A la Réunion, nous avons de façon très majoritaire *Aedes albopictus* comme aux Seychelles et contrairement à l'île Maurice ou Mayotte où *Aedes aegyptii* est prédominant.

3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

- *Non applicable*

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé publique France et les CIRE: au travers de l'envoi hebdomadaire par fichier sécurisé des résultats de surveillance Chikungunya, Dengue et Zika en métropole et en Guyanne, mais aussi l'envoi au fil de l'eau dès la détection d'une infection par un arbovirus rare (exemple fièvre de la Vallée du Rift).

Ces différents types de recueil de données font l'objet de "Points Epidémiologiques Périodiques", mensuels ou hebdomadaires en fonction du contexte épidémiologique. Ces bulletins de rétro-information sont édités par les Cires en collaboration avec les différents partenaires impliqués. Ils sont disponibles sur le site Internet de Santé Publique France (SPF) et permettent d'assurer une rétro-information auprès des différents professionnels de santé du département, des DFA, de SPF et de la DGS, tout en faisant le point sur la situation épidémiologique du moment.

Le CNR-LA-LR est membre du réseau SEGA de l'Océan Indien : appui à la mise en place de techniques (RT PCR Zika aux Seycheles, Maurice), réalisation de typage de dengue pour les Seychelles.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3.5.1 CNR Arbovirus-IRBA

Estimation de l'incidence du virus Zika chez les voyageurs Français de retour d'Amérique Latine et des Caraïbes durant l'été 2016 – Cohorte ZikAmerica. Partenariat CHU Bordeaux.

Nos partenaires du CHU de Bordeaux ont effectué le recrutement, le suivi des patients et les tests diagnostiques de 1ere intention : RT-PCR Zika et sérologies IgM / IgG avec le kit EuroImmun pour les virus Dengue, Zika et Chikungunya. Le CNR a effectué les sérologies avec les tests ELISA IgM/IgG maison utilisant comme antigène du virus entier inactivé. Le cas échéant le CNR a effectué les sérologies EuroImmun manquantes. Lors de résultats discordants et/ou de cas cliniques particuliers le CNR a effectué les explorations complémentaires par séroneutralisation.

Avancement. L'étude est en cours de finalisation. Soixante-quinze voyageurs ont été inclus dans l'étude et trente-huit ont rapporté des symptômes. La date médiane de prélèvement des patients était de 45 jours après le retour en France. Tous les participants étaient négatifs en

IgM. Quatre participants étaient positifs en IgG EuroImmune. Deux d'entre eux, par ailleurs négatifs avec l'ELISA du CNR, ont été infirmés par séroneutralisation. Les deux autres cas, dont l'un avec des résultats sérologiques discordants, ont été confirmés par séroneutralisation. Un 5^{ème} cas dont les analyses sérologiques étaient négatives ou en limite d'interprétation selon le test utilisé a finalement été confirmé par séroneutralisation. Le taux d'incidence final a été estimé à 4.4 cas pour 100 personnes/mois.

Les résultats ont été présentés lors du congrès « International Symposium on Zika virus Research » à Marseille le 04-06 Juin 2018.

3.5.2 CNR-LA-IPG

Participation du CNR-LA-IPG à un projet de recherche portant sur l'étude de la séroprévalence des arboviroses prioritaires en Guyane : Projet FEDER EPI-Arbo : « Séro-épidémiologie des arboviroses prioritaires en Guyane », en cours : cf& 6.1.2.3 FEDER EPI-Arbo.

3.5.3 CNR-LA-LR

Pas d'enquête réalisée en 2017.

4 Alerte

4.1 CNR Arbovirus-IRBA

➤ Identification de 2 cas autochtones d'infection par le virus West-Nile

Dans le cadre de la surveillance Chikungunya-Dengue-Zika (CDZ), la Cire PACA a reçu le 13 septembre le signalement d'un cas suspect autochtone de dengue (IgM isolés) dans la région de Nice. Le prélèvement précoce a été transféré au CNR pour lequel les résultats se sont avérés négatifs. Un 2nd prélèvement a été effectué au laboratoire Biomnis, montrant une séroconversion des IgG pour la dengue le 03 Octobre. Ce prélèvement a également été transféré au CNR qui a informé par courriel la Cire PACA et Santé Publique France le 09 octobre que la patiente avait un profil sérologique suggérant fortement une infection par le virus West-Nile et non par le virus de la dengue. Le CNR a ensuite confirmé l'infection à virus West-Nile par séroneutralisation le 20 Octobre.

Différentes enquêtes ont été menées. Le CNR a pris contact avec le CHU de Nice afin de tester les prélèvements de patients avec un LCR clair sans étiologie retrouvée, hospitalisés à partir du 1^{er} août. Soixante et un cas ont été testés, tous négatifs. Conjointement, la Cire PACA a recherché d'autres cas parmi les signalements reçus dans le cadre de la surveillance CDZ : étude rétrospective (à partir du 1^{er} août) dans les Alpes-Maritimes et sélection des cas avec un tableau clinique compatible avec une infection à virus West-Nile. Six cas suspects ont été sélectionnés et leurs prélèvements transférés vers le CNR. Un second cas d'infection à virus West-Nile a ainsi été identifié dans la région de Nice, avec des IgM et des IgG anti West-Nile identifiés sur un prélèvement précoce (j6) par le CNR, suivi d'une confirmation par séroneutralisation sur un 2nd prélèvement plus tardif.

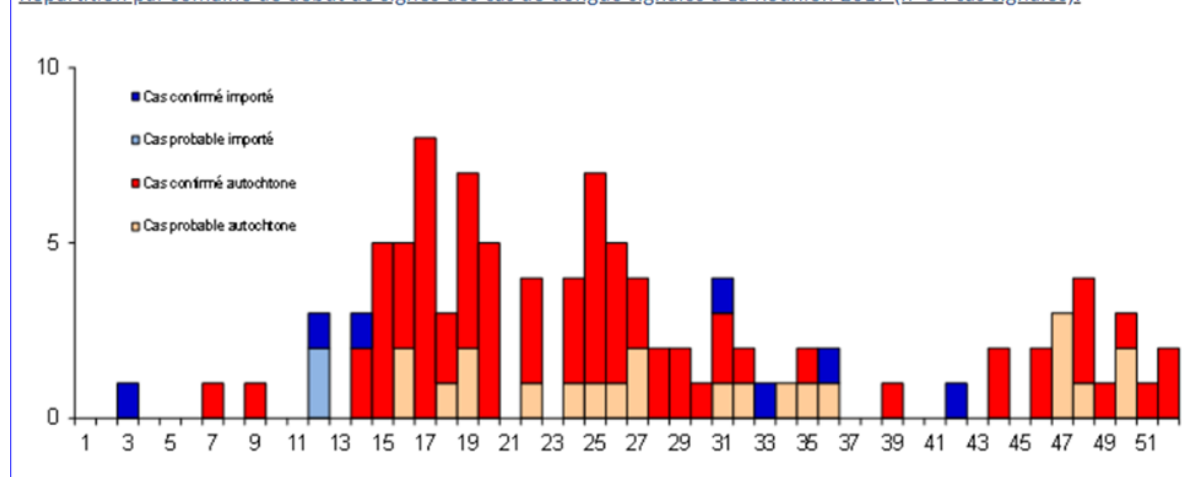
➤ Foyers de cas autochtones de Chikungunya

Le 09 Août 2017, le laboratoire Biomnis a signalé une qRT-PCR positive pour le virus Chikungunya chez un patient résident au Cagnet-des-Maures (commune du Var) et n'ayant pas voyagé. A la demande de la Cire PACA, le prélèvement a été transféré au CNR qui a confirmé les résultats le 11 Août 2017. Au total, 17 cas autochtones ont été recensés sur Le Cagnet-des-Maures et la commune voisine de Taradeau. Huit cas ont été confirmés par le CNR. Le séquençage de la souche virale a été réalisé par l'Unité des Virus Emergents du Pr. Xavier de Lamballerie via la collaboration avec le CNR. L'analyse de séquences a montré que (i) la souche virale appartenait au lignage génétique ECSA (East-Central-South Africa), (ii) elle avait vraisemblablement été introduite depuis l'Afrique Centrale, et (iii) elle portait la mutation de l'enveloppe virale [A226V] facilitant la transmission par le vecteur *Aedes albopictus*.

- Sri-Lanka type 2
- Inde type 2
- 52 cas autochtones de type 2
- Cas diagnostiqués par sérologie avec présence d'IgM : 2 cas

L'estimation de la couverture du réseau pour les cas confirmés est de 73% pour le diagnostic par RT-PCR et sérologie .

Répartition par semaine de début de signes des cas de dengue signalés à La Réunion 2017 (n=94 cas signalés).



Réalisation : Santé publique France, océan Indien (Cire OI) Réalisation : Santé publique France, océan Indien (Cire OI)

5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1 CNR Arbovirus-IRBA

Le CNR est toujours à la disposition des professionnels de santé pour répondre à tous leurs questionnements. Cette mission du CNR a pris une part particulièrement importante avec l'émergence du virus Zika. Depuis 2016, environ 2h cumulées par jour sont consacrées à cette mission en répondant aux patients, biologistes, médecins, sage-femmes et gynécologues. Nous avons aussi accepté de nombreuses invitations (ARS, Centres d'Aide médicale à la procréation, sociétés savantes) pour présenter régulièrement les dernières avancées scientifiques sur le virus Zika dans le but de tenir informés un maximum de professionnels de santé. Pour les questions plus médicales (traitement, etc.), un infectiologue référent prend le relais: Dr Fabrice Simon, Chef du service d'Infectiologie Tropicale de l'Hôpital d'Instruction des Armées de Laveran (Marseille).

Cette expertise est aussi reconnue au niveau européen et international, et le CNR Arbovirus-IRBA participe aux recommandations rédigées par l'ECDC et l'OMS.

5.1.2 CNR-LA-IPG

- *Accueil de stagiaires :*

- ✓ Novembre 2016 à mai 2017 : accueil d'un interne en pharmacie de l'université de Bordeaux en 7^{ème} semestre de biologie médicale (Guerard Alexandre).
Sujet de Thèse : Difficultés diagnostiques du virus Zika chez les femmes enceintes et leurs nouveau-nés lors de l'épidémie de 2016 en Guyane (soutenue le 27/10/2017 à Bordeaux).
- ✓ Mai 2017 à novembre 2017 : accueil d'un interne en médecine de l'université Antilles Guyane en 7^{ème} semestre de biologie médicale (Berthelot Léna).
- ✓ Novembre 2017 à mai 2018 : accueil d'un interne en médecine de l'université Antilles

Guyane en 8^{ème} semestre de biologie médicale (Berthelot Léna).

- *Modalités et cibles de la diffusion des données de surveillance et des productions du CNR :*

Les modalités de diffusion des données de surveillance auprès des partenaires sont détaillées au § 3.4.

L'Institut Pasteur de la Guyane dispose d'un site web faisant l'objet de mises à jour régulières sur lequel est présenté le laboratoire de virologie et le CNR des arbovirus.

Pendant les heures ouvrables, les responsable et responsable adjoint peuvent être contactés par téléphone, mail ou fax. Une adresse électronique générique cnrarbo@pasteur-cayenne.fr (automatiquement redirigée sur les boîtes mail des responsables) est également disponible.

Les activités de conseil auprès des professionnels de santé (Cliniciens, Biologistes, Réseau Périnat..) sont exclusivement réalisées par le responsable ou le responsable adjoint du CNR essentiellement par téléphone ou par courrier électronique. Bien qu'en forte baisse en 2017 à l'occasion d'une année inter-épidémique, ces activités restent plurihebdomadaires.

5.1.3 CNR-LA-LR

Transmission de la feuille de renseignements aux laboratoires revue et corrigée, mise en ligne sur le site du CHU dans le Manuel de prélèvement (<http://lbm-chureunion.manuelprelevement.fr>).

Rétro-information en collaboration avec la CIRE OI : les résultats sont diffusés aux professionnels de santé (médecins, laboratoires) et à l'ensemble du réseau régional de santé publique par l'émission d'un Bulletin Point Epidémiologique bimensuel : nombre de cas de dengue, niveau de l'épidémie, recommandations.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

5.2.1 CNR Arbovirus-IRBA

La responsable du CNR Arbovirus-IRBA, I. Leparc-Goffart apporte son expertise auprès des différentes instances impliquées dans la santé publique (Santé Publique France, DGS, HAS, HCSP, ANSM, ABM, CNAM), notamment pour les recommandations émises en lien direct avec les Arboviroses d'intérêt national. La responsable adjointe du CNR Arbovirus-IRBA, Gilda Gard a également apporté son expertise auprès de l'INRS pour la mise à jour et la publication des fiches EFICATT Dengue et Fièvres Hémorragiques Virales.

Cette expertise est également reconnue au niveau européen et international, avec une participation aux recommandations rédigées par l'ECDC et l'OMS. De plus, I. Leparc-Goffart fait partie du « management board » du réseau européen des laboratoires experts pour les maladies virales importées : EVD Labnet (anciennement ENIVD), subventionné par l'ECDC.

5.2.2 CNR-LA-IPG

- Activités de conseil et expertise auprès des **ARS** Martinique, Guadeloupe, Guyane, **Cire** Antilles et **Cire** Guyane
- Activités d'expertise auprès de l'**OMS** dans le cadre du processus EUAL (« Emergency Use Assessment and Listing (EUAL) of in-vitro diagnostics (IVDs) for ZIKV disease ») cf travaux de recherche : Validation d'outils de diagnostic moléculaire de l'infection par le virus Zika
- D. Rousset :
 - Membre du Comité d'Expert des Maladies à Caractère Epidémique (CEMCE) Guyane
 - Membre du réseau RELDA (Arbovirus Diagnosis laboratory Network of the Americas) de la **PAHO** (Pan American Health Organization).
 - Membre du Comité de Pilotage des projets ZIKA DFA FE et ZIKA DFA BB

5.2.3 CNR-LA-LR

- Membre de la cellule de veille, d'alerte et de gestion sanitaires (CVAGS) de l'ARS

- Membre de la Cellule de Vigilance Dengue du CHU dans le cadre du plan ORSEC de lutte contre la dengue
- Activité de conseil et d'expertise auprès de l'ARS et CIRE Réunion Mayotte, auprès des laboratoires privés, des cliniciens.

6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1 Activités de recherche pour l'année 2017

6.1.1 CNR Arbovirus-IRBA

6.1.1.1 Développement de tests rapides à bas coût pour le diagnostic des arboviroses.

Partenariat: BioMerieux, Innovations New Immuno-Concepts, Marcy-l'Etoile, France.

Publication associée :

- Theillet G, Rubens A, Foucault F, Dalbon P, Rozand C, Leparc-Goffart I, Bedin F. Laser-cut paper-based device for the detection of dengue non-structural NS1 protein and specific IgM in human samples. Arch Virol. 2018 Mar 10.

Abstract

The incidence of flavivirus infections has increased dramatically in recent decades in tropical and sub-tropical areas worldwide, affecting hundreds of millions of people each year. Dengue viruses are typically transmitted by mosquitoes and can cause a wide range of symptoms from flu-like fever to organ impairment and death. Although conventional diagnostic tests can provide early diagnosis of acute dengue infections, access to these tests is often limited in developing countries. Consequently, there is an urgent need to develop affordable, simple, rapid, and robust diagnostic tools that can be used at 'Point of Care' settings. Early diagnosis is crucial to improve patient management and reduce the risk of complications. In the present study, a novel laser-cut device made of glass-fiber paper was designed and tested for the detection of the dengue Non Structural 1 (NS1) viral protein and specific IgM in blood and plasma. The device, called PAD, was able to detect around 25 ng/mL of NS1 protein in various sample types in 8 minutes, following a few simple steps. The PAD was also able to detect specific IgM in human plasmas in less than 10 minutes. The PAD appears to have all the potential to assist health workers in early diagnosis of dengue fever or other tropical fevers caused by flaviviruses.

Une seconde publication sera soumise en 2018 pour la finalisation de ces travaux.

6.1.1.2 Séroprévalence des arbovirus au Tchad

Partenariat : Médecin sans Frontière

Contexte de l'étude : en 2017, Médecin sans Frontière a initié une étude de séroprévalence du Virus de l'Hépatite E en contexte d'épidémie de syndrome hépatique aigu au Tchad. Le programme comprend un volet d'identification d'autres étiologies virales dont le CNR est responsable pour les arboviroses. Nous avons reçu 1200 prélèvements pour lesquels nous avons effectués la recherche des IgG pour les virus Dengue, Fièvre Jaune, Fièvre de la Vallée du Rift, Zika, West Nile et Chikungunya. La présence d'IgM est en cours d'investigation.

6.1.1.3 Séroprévalence des arbovirus chez les chevaux de Nouvelle Calédonie et Polynésie Française

Partenariat : UMR 1161 Virology, ANSES, INRA, ENVA, ANSES Animal Health Laboratory, EURL on equine diseases, 94704 Maisons-Alfort, France

Résumé : Une enquête séro-épidémiologique a été réalisée sur 293 équins prélevés en Septembre 2015 et Avril 2016. Les sérums ont tout d'abord été analysés par un ELISA de compétition à l'UMR 1161. Les sérums positifs ont été confirmés par un immuno-essai en microsphère et par séroneutralisation. Le CNR a réalisé les séroneutralisations Dengue, West Nile et Zika pour 40 sérums équins. L'étude démontre l'infection des chevaux par les virus

West-Nile et Encéphalite Japonaise mais surtout une séroprévalence bien plus élevée pour les virus Dengue 1 et Zika. Les résultats sont en cours de publication.

6.1.1.4 Diagnostic des fièvres d'origine inexpliquée (FOI) dans les forces françaises basées en Afrique Sub-Saharienne.

Objectifs : Due à une instabilité politique durable, la connaissance sur la circulation virale en Afrique Sub-Saharienne est faible. Dans le cadre d'interventions militaires, plus de 14000 militaires français par an sont exposés aux risques infectieux dans 8 pays sub-sahariens et 2-5% des forces développeront une fièvre d'origine inexpliquée (FOI). Une investigation étiologique virale des FOI offre l'opportunité de : (1) découvrir de nouveaux pathogènes, (2) une meilleure compréhension de la circulation virale dans ces territoires négligés et (3) une amélioration de la prise en charge médicale des syndromes fébriles. Cette étude a donc pour objectif de rechercher l'étiologie virale de FOI dans des échantillons sanguins collectés par le CNR, provenant de patients fébriles résidants ou ayant séjournés en Afrique Sub-Saharienne.

Etat d'avancement : 580 prélèvements précoces de sérum et plasma ont été sélectionnés pour cet étude. Par une approche non-spécifique exploitant les méthodes de diagnostic traditionnelles (isolation virale sur tapis cellulaire, détection d'ARN double-brin par ELISA, détection de génome par PCR dégréées) et moderne (séquençage nouvelle génération), cette étude doit faire face à de multiples défis techniques comme la dégradation des échantillons congelés et la contamination chimique provenant des tubes de collections sanguins.

En 2017, nous avons réussi à :

- Neutraliser les effets cytotoxiques des contaminants chimiques présent dans la totalité des plasmas. Grâce à un traitement court sans impact sur l'infection virale, les isolements sur tapis cellulaire sont désormais possibles à partir de plasma.
- Intensifier la capacité d'isolement (validation de méthode en plaque 96 puits). Cette méthode intensifiée permettra également au CNR de faire face à des situations épidémiques où les cadences sont multipliées.
- Nous avons également exploré la modulation de l'autophagie dans l'optique de rendre les cellules plus permissives à l'infection et ainsi augmenter le taux de succès de l'isolement. Deux modulateurs d'autophagie ont été testés sur deux lignées cellulaires et de plusieurs arbovirus. Les résultats préliminaires montrent des résultats incompatibles avec une approche non spécifique, le traitement étant d'une part cytotoxique et d'autre part virus-dépendant.

Ces travaux donneront lieu à publication en 2018 et 2019.

6.1.2 CNR-LA-IPG

6.1.2.1 Projet ZIFAG : Etude descriptive prospective de la maladie à virus Zika au sein de la communauté des Forces Armées en Guyane

Projet mené en collaboration avec le Service de Santé des Armées (Dr S Briolant et Dr F De Laval)

Suivi longitudinal d'une année de patients infectés par le virus Zika avec description clinique biologique et immunologique de l'infection aiguë et de son évolution : analyse de la cinétique virale et de l'infectiosité dans différents compartiments (sang veineux, sang capillaire et sperme) ainsi que de la cinétique de la réponse humorale.

50 patients Zika positifs ont été inclus parmi lesquels 21 ont accepté le suivi de leur charge virale dans le compartiment capillaire, et 12 dans le sperme.

La comparaison des charges virales entre les compartiments veineux et capillaire au cours de la maladie a permis de mettre en évidence chez 12 des 21 patients, une durée de détection plus longue de l'ARN viral dans le compartiment capillaire vs veineux, et une durée maximale de persistance de l'ARN viral dans le compartiment capillaire jusqu'à 18 jours après le début des symptômes. Ces travaux ont par ailleurs montré que la charge virale au niveau capillaire

était corrélée à celle observée dans le compartiment veineux mais significativement plus importante dans le compartiment capillaire.

L'étude de la cinétique de détection du virus Zika dans le sperme de 12 patients Zika positifs a, quant à elle, permis de mettre en évidence deux groupes de patients : un pour lequel l'excrétion est de moins de 15 jours (42%) et un pour lequel l'excrétion est d'au moins un mois (58%). La durée maximale de détection observée dans cette étude était de 45 jours. Aucune association n'a été observée entre la charge virale dans le sérum et le sperme suggérant une répllication locale indépendante dans les testicules ou les glandes séminales.

Les travaux incluant la description clinique et le suivi sérologique des patients inclus sont en cours.

Publications :

- Matheus S, de Laval F, Moua D, Nguyen C, Martinez E, Rousset D, Briolant S. Zika RNA in capillary blood samples. Emerg Infect Dis, 2017 Nov;23(11). doi: 10.3201/eid2311.170337. Epub 2017 Nov 17.
- de Laval F, Matheus S, Labrousse T, Enfissi A, Rousset D, Briolant S. Kinetics of Zika Viral Load in Semen. N Engl J Med, 2017, Aug 17 ; 377 (7): 697-699.

6.1.2.2 Validation d'outils de diagnostic moléculaire de l'infection par le virus Zika dans le cadre du processus EUAL de l'OMS (« Emergency Use Assessment and Listing (EUAL) of in-vitrodiagnostics (IVDs) for ZIKV disease »)

KitRealStar® Zika Virus RT-PCR Kit (altona Diagnostics GmbH) : Finalisation de l'évaluation et publication

Ölschläger S, Enfissi A, Zaruba M, Kazanji M, Rousset D. Diagnostic Validation of the RealStar® Zika Virus RT-PCR Kit for Detection of Zika Virus RNA in Urine and Serum Specimens. Am J Trop Med Hyg, 2017, Oct;97(4):1070-1071. doi: 10.4269/ajtmh.17-0268. Epub 2017 Jul 19.

6.1.2.3 FEDER EPI-Arbo :Séro-épidémiologie des arboviroses prioritaires en Guyane

Les objectifs du projet visent à :

- Déterminer la séroprévalence des principales arboviroses
- Déterminer la couverture vaccinale de la Fièvre Jaune
- Constituer une sérothèque utile à la réalisation de diverses études de prévalence dans le domaine des maladies infectieuses et tropicales en Guyane
- Produire les données nécessaires à la modélisation de la dynamique de transmission des épidémies survenues en Guyane.

Partenariat entre l'Unité d'épidémiologie de l'IPG (C Flamand), le laboratoire de Virologie de l'IPG qui héberge le CNR-LA-IPG (D Rousset), l'Unité de modélisation des maladies infectieuses et prioritaires de l'IPP (S Cauchemez) et l'Unité de Recherche et d'expertise Environnement et risques infectieux à l'IPP (JC Manuguerra).

Dans ce projet le CNR-LA-IPG apporte ses compétences et ses outils de diagnostic sérologiques pour détecter un large éventail d'arbovirus d'intérêt médical (avec notamment des virus de la famille des Flaviviridae (Dengue, Fièvre Jaune, Encéphalite ou encore West Nile) et des Togaviridae (virus Chikungunya, Tonate, Mayaro).

Après l'obtention des autorisations réglementaires, le démarrage de l'étude est intervenu en Juin 2017. Au total, après tirage au sort de logements stratifiés par commune, 2717 personnes ont été enquêtées sur l'ensemble des communes de Guyane de juin à octobre 2017.

Parallèlement une technique Luminex MIA pour la détection en multiplex des anticorps dirigés contre les arbovirus suivants : Dengue, Zika, West Nile, Fièvre Jaune, Chikungunya, et Mayaro a été mise en place au laboratoire de virologie.

L'analyse des 2717 prélèvements est en cours par la technique Luminex complétée par des analyses en séroneutralisation.

6.1.2.4 FEDER EFAG : Etiologie des Fièvres Aigues en Guyane

Les objectifs : Améliorer les connaissances sur l'étiologie des fièvres aiguës d'origine infectieuse en Guyane (EFAG) en explorant les fièvres restant inexplicables après une démarche classique de diagnostic :

- (i) en complétant l'identification et apprécier les proportions respectives des agents infectieux (viraux, bactériens, fongiques ou parasitaires) responsables de fièvres en Guyane,
- (ii) détectant de nouveaux variants voire de nouveaux agents pathogènes afin d'anticiper les futurs risques sanitaires pour la population guyanaise.

Ce projet s'intègre dans une Etude descriptive prospective et recherche des Fièvres au sein de la communauté de défense des Forces Armées en Guyane (2FAG).

Partenariat entre le laboratoire de Virologie de l'IPG qui héberge le CNR-LA-IPG (D Rousset), le laboratoire Interactions Virus-Hôte (LIVH) de l'IPG (V Lacoste), le Service de santé des Armées (S Briolant et F de Laval) et l'Unité des Maladies Infectieuses et Tropicales du Centre Hospitalier André Rosemon (UMIT-CHAR) (F Djossou).

Dans ce projet le CNR-LA-IPG assure la coordination et apporte ses compétences et ses outils de diagnostic moléculaires et sérologiques pour détecter un large éventail d'arbovirus.

Si le projet 2FAG a démarré mi 2017, le projet FEDER EFAG est toujours en attente de l'envoi par la Collectivité territoriale de Guyane (Pôle Affaires Européennes) de la notification de décision d'attribution de laide européenne pour le démarrage du volet EFAG.

6.1.3 CNR-LA-LR

Le Dr M-Christine Jaffar-Bandjee fait partie du Comité de suivi de la thèse de Yosra BEDOUI démarré à l'UMR 1187 PIMIT en 2016 sur l'étude des mécanismes physiopathologiques des arthrites chroniques induites par le virus du Chikungunya et l'évaluation du rôle immunomodulateur et antiviral du méthotrexate et d'extraits de plantes endémiques de La Réunion. L'article « *Immunomodulatory drug methotrexate used to treat patients with rheumatic disorders post-chikungunya does not impair the antiviral responses of human synovial fibroblasts* » a été soumis au journal PLOS Neglected Tropical Diseases.

Le CNR-LA-LR a participé à l'élaboration du projet DEMARE_Projet d'épidémiologie de terrain sur 2 îles de l'océan indien (Réunion et Madagascar) mené par Olga de Santis dans le cadre de sa thèse de Sciences, sous la responsabilité du Pr Flahault (Global Health Institute, Genève) et en collaboration avec le CIC (Drs Catherine Marimoutou et Olivier Maillard). Ce projet a été soumis et le financement a été obtenu (N° 179532). Ce projet devrait débuter en septembre 2018. Il a pour objectif principal d'estimer la prévalence d'infections au virus de la dengue de toutes formes cliniques (asymptomatique, classique à sévère) dans la communauté, selon un design en cluster géographique autour de cas index de dengue.

Ces données permettront d'avoir une vision plus précise de l'ampleur réelle de l'épidémie, de ces formes cliniques et de l'immunité de la population ; de modéliser la circulation virale et d'avoir des pistes pour une meilleure prédiction de l'évolution ; de conserver des échantillons pour de futures recherches en génétique humaine et virale.

Deux objectifs supplémentaires sont prévus à la Réunion : estimer la performance des tests de diagnostics rapides et évaluer la transmission cas asymptomatique-A.albopictus". Le CNR assurera la réalisation des tests RT PCR , de sérologie ainsi que la réalisation des tests rapides pour la Réunion.

6.2 Publications et communications

6.2.1 CNR Arbovirus-IRBA

Publications internationales :

1. Rozé B, Najjoulah F, Fergé JL, Dorléans F, Apetse K, Barnay JL, Daudens-Vaysse E, Brouste Y, Césaire R, Fagour L, Valentino R, Ledrans M, Mehdaoui H, Abel S, Leparc-Goffart I, Signate A, CabiéA; Guillain-Barré Syndrome ZikaWorking Group of Martinique. Guillain-Barré Syndrome Associated With Zika Virus Infection in Martinique in 2016: A

Prospective Study. Clin Infect Dis. 2017 Oct 16;65(9):1462-1468.

2. Calba C, Guerbois-Galla M, Franke F, Jeannin C, Auzet-Caillaud M, Grard G, Pigaglio L, Decoppet A, Weicherding J, Savaill MC, Munoz-Riviero M, Chaud P, Cadiou B, Ramalli L, Fournier P, Noël H, De Lamballerie X, Paty MC, Leparc-Goffart I. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. Euro Surveill. 2017 Sep;22(39).
3. Velay A, Solis M, Kack-Kack W, Gantner P, Maquart M, Martinot M, Augereau O, De Briel D, Kieffer P, Lohmann C, Poveda JD, Cart-Tanneur E, Argemi X, Leparc-Goffart I, de Martino S, Jaulhac B, Raguét S, Wendling MJ, Hansmann Y, Fafi-Kremer S. A new hot spot for tick-borne encephalitis (TBE): A marked increase of TBE cases in France in 2016. Ticks Tick Borne Dis. 2018 Jan;9(1):120-125.
4. Charrel R, Mögling R, Pas S, Papa A, Baronti C, Koopmans M, Zeller H, Leparc-Goffart I, Reusken CB. Variable Sensitivity in Molecular Detection of Zika Virus in European Expert Laboratories: External Quality Assessment, November 2016. J Clin Microbiol. 2017 Nov;55(11):3219-3226.
5. Gake B, Vernet MA, Leparc-Goffart I, Drexler JF, Gould EA, Gallian P, de Lamballerie X. Low seroprevalence of Zika virus in Cameroonian blood donors. Braz J Infect Dis. 2017 Jul - Aug;21(4):481-483.
6. Schaub B, Vouga M, Najioullah F, Gueneret M, Monthieux A, Harte C, Muller F, Jolivet E, Adenet C, Dreux S, Leparc-Goffart I, Cesaire R, Volumenie JL, Baud D. Analysis of blood from Zika virus-infected fetuses: a prospective case series. Lancet Infect Dis. 2017 May;17(5):520-527.
7. Lafri I, Prat CM, Bitam I, Gravier P, Besbaci M, Zeroual F, Ben-Mahdi MH, Davoust B, Leparc-Goffart I. Seroprevalence of West Nile virus antibodies in equids in the North-East of Algeria and detection of virus circulation in 2014. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2017 Feb;50:8-12.
8. Penot P, Brichtler S, Guilleminot J, Lascoux-Combe C, Taulera O, Gordien E, Leparc-Goffart I, Molina JM. Infectious Zika virus in vaginal secretions from an HIV-infected woman, France, August 2016. Euro Surveill. 2017 Jan 19;22(3). pii: 30444.
9. Penot P, Balavoine S, Leplatois A, Brichtler S, Leparc-Goffart I, Alloui AC, Flusin O, Guilleminot J, Amellou M, Molina JM. Five cases of acute Zika virus infection in French women of reproductive age returning from Central and South America. Rev Med Interne. 2017 Aug;38(8):547-550.
10. Gallian P, Leparc-Goffart I, Richard P, Maire F, Flusin O, Djoudi R, Chiaroni J, Charrel R, Tiberghien P, de Lamballerie X. Epidemiology of Chikungunya Virus Outbreaks in Guadeloupe and Martinique, 2014: An Observational Study in Volunteer Blood Donors. PLoSNegl Trop Dis. 2017 Jan 12;11(1):e0005254.
11. Maquart M, Dahmani M, Marié JL, Gravier P, Leparc-Goffart I, Davoust B. First Serological Evidence of West Nile Virus in Horses and Dogs from Corsica Island, France. Vector Borne Zoonotic Dis. 2017 Apr;17(4):275-277.
12. Aletti M, Lecoules S, Kanczuga V, Soler C, Maquart M, Simon F, Leparc-Goffart I. Transient myocarditis associated with acute Zika virus infection. Clin Infect Dis. 2017 Mar 1;64(5):678-679.
13. Gallian P, Cabié A, Richard P, Paturel L, Charrel RN, Pastorino B, Leparc-Goffart I, Tiberghien P, de Lamballerie X. Zika virus in asymptomatic blood donors in Martinique. Blood. 2017 Jan 12;129(2):263-266.

Communications nationales :

- Leparc-Goffart I. Nouveaux virus : le centre de référence, un outil d'expertise. Exemple du virus Zika. ABM 2017

- Leparc-Goffart I. Maladies Infectieuses Emergentes, Problématique du diagnostic et rôle d'un CNR. MIE Paris Mars 2017
- Communications ARS PACA Juin 2017(Bilan d'activité 2016), ARS Rhone-Alpes Mars 2017 (Zika),

Communications internationales :

- Leparc-Goffart I. Autochthonous CHIKV circulation in the Var region-France, August 2017. 2nd Annual EVD-Labnet meeting, Rotterdam, October 2017.
- C. Calba, M. Guerbois-Galla, F. Franke, C. Jeannin, M. Auzet-Caillaud, G. Grard, L. Pigaglio, A. Decoppet, J. Weicherding, M.C. Savail, M. Munoz-Riviero, P. Chaud, B. Cadiou, L. Ramalli, P. Fournier, H. Noël, X. de Lamballerie, M-C. Paty, I. Leparc-Goffart. Autochthonous chikungunya outbreak in France / July-September 2017. Poster communication. ESCAIDE, Stockholm 2017.

Conférences sur invitations :

- Leparc-Goffart I. (1) Arbovirus et Voyages. (2) Zika et microcéphalies fœtales. Congrès ANTECHO Martinique Janvier 2017.
- Leparc-Goffart I. FEMS Invitation Valencia Juillet 2017
- Leparc-Goffart I. Prévention des Arboviroses. Exemple pour le virus West-Nile. Journées Franco-Maghrébines de Virologie, Marakech Octobre 2017

6.2.2 CNR-LA-IPG

Publications internationales :

1. Fritzell C, Rousset D, Adde A, Kazanji M, Van Kerkhove MD, Flamand C. Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: a scoping review. *PLOS Neglected Tropical Disease*, in press.
2. Fontaine A, de Laval F, Belleoud D, Briolant S, Matheus S. Duration of Zikaviremia in serum. *Clin Infect Dis*. 2018 Mar 30. doi: 10.1093/cid/ciy261
3. Hoen B, Schaub B, Funk AL, Ardillon V, Boullard M, Cabié A, Callier C, Carles G, Cassadou S, Césaire R, Douine M, Herrmann-Storck C, Kadhel P, Laouenan C, Madec Y, Monthieux A, Nacher M, Najioullah F, Rousset D, Ryan C, Schepers K, Stegmann-Planchard S, Tressières B, Voluménie JL, Yassinguez S, Janky E, Fontanet A. Pregnancy Outcomes after Zika infection in the French Territories of America. *N Engl J Med*, 2018, March 15, 378;11, 985-994
4. Simonnet C, Okandze A, Matheus S, Djossou F, Nacher M, Mahamat A. Prospective evaluation of the SD BIOLINE Dengue Duo rapid test during a dengue virus epidemic. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Dec;36(12):2441-2447. doi: 10.1007/s10096-017-3083-8. Epub 2017 Aug 22.
5. Flamand C, Fritzell C, Matheus S, Dueymes M, Carles G, Favre A, Enfissi A, Adde A, Demar M, Kazanji M, Cauchemez S and Rousset D. *Eurosurveillance* 2017 Nov; 22(44). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.44.17-00102.
6. Matheus S, de Laval F, Moua D, Nguyen C, Martinez E, Rousset D, Briolant S. Zika virus persistence and higher viral loads in cutaneous capillaries than in venous blood. *Emerg Infect Dis*, 2017 Nov; 23(11). doi: 10.3201/eid2311.170337. Epub 2017 Nov 17.
7. de Laval F, Matheus S, Labrousse T, Enfissi A, Rousset D, Briolant S. Kinetics of Zika Viral Load in Semen. *N Engl J Med*, 2017, Aug 17; 377 (7): 697-699.
8. Olschlager S, Enfissi A, Zaruba M, Kazanji M, Rousset D. Diagnostic Validation of the RealStar® Zika Virus Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Kit for Detection of Zika Virus RNA in Urine and Serum Specimens. *Am J Trop Med Hyg*, 2017, Oct; 97(4):1070-1071. doi: 10.4269/ajtmh.17-0268. Epub 2017 Jul 19.
9. Flamand C, Fritzell C, Prince C, Abboud P, Ardillon V, Carvalho L, Demar M, Boukhari R, Papaix-Puech M, Elenga N, Rousset D, Matheus S, Nacher M, Quenel P, Djossou F.

- Epidemiological assessment of dengue epidemics severity in French Guiana. *PLOS One*, 2017, Feb 14; 12(2):e0172267.
10. Pomar L, Malinger G, Benoist G, Carles G, Ville Y, Rousset D, Hcini N, Pomar C, Jolivet A, Lambert V. Association between Zika virus and fetopathy: a prospective cohort study in French Guiana. Preliminary report. *Ultrasound ObstetGynecol*, 2017, Jun; 49(6):729-736.
 11. Pomar L, Rousset D, Jolivet A, Pomar C, Lambert V. Reply. *Ultrasound ObstetGynecol*, 2017, Jun 49(6):810.

Communications :

D. Rousset : Atelier Diagnostic : Difficultés de confirmation des diagnostics des cas de ZIKA dans les DFA - RETEX épisodes épidémiques d'arboviroses en 2016 dans les territoires ultramarins - Paris - 03/02/2017

D. Rousset : Enjeux et challenges du diagnostic biologique de Zika. Rencontres de Santé Publique des Antilles et de la Guyane. 17-19 janvier 2018

Conférences sur invitations :

D. Rousset : Emergent arbovirus : experience from the Institut Pasteur of French Guiana Arbovirus Diagnosis Laboratory Network in the Region of the America. RELDA Annual Meeting, Panama, May 15-16, 2017.

6.2.3 CNR-LA-LR

Liste de publications :

1. Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan® assay. Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. *BMC Microbiol*. 2017 Jul 24;17(1):164.
2. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. *BMC Microbiol*. 2017 May 3;17(1):105.
3. Blunting CHIKV infection by keeping T cells in check. Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. *SciTransl Med*. 2017 Feb 1;9(375).

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

Le CNR Arbovirus-IRBA et le LNR West-Nile de Maison Alfort échangent de nombreuses informations sur la circulation des virus West-Nile et Usutu. Ces 2 laboratoires collaborent sur la détermination de la spécificité des anticorps anti-flavivirus chez les chevaux.

8 Programme d'activité pour les années suivantes

8.1.1 CNR Arbovirus-IRBA

- Déménagement du CNR de l'HIA Laveran vers l'Institut Hospitalier Universitaire « Méditerranée Infection » à Marseille (Campus de La Timone). Comme lors du précédent déménagement du CNR au cours du mandat 2012-2016 (du Pharo à l'HIA Laveran), ce nouveau déménagement sera sans aucun impact en termes de continuité opérationnelle sur toutes les missions du CNR et sur la réception des échantillons.
- Etude de séroprévalence en Nouvelle-Calédonie sur la circulation des arbovirus chez l'homme, en partenariat avec l'URE Dengue et Arboviroses de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie.

- Finalisation de l'étude de séroprévalence des Arbovirus au Tchad (Partenariat Médecins Sans Frontières, voir § 6.1.1.2) : sérologie IgM
- Projet européen Medilabsecure : Ce projet, financé par la commission européenne – DEVCO, vise à renforcer la préparation des laboratoires aux infections virales émergentes dans les régions du bassin méditerranéen et de la mer Noire. Dans le cadre de ce projet, le CNR Arbovirus-IRBA a été sollicité pour la mise en place et la participation à des essais inter-laboratoires et à des évaluations de kits commerciaux sur les cibles arbovirales suivantes : Fièvre Jaune, Encéphalite Japonaise, Dengue, Chikungunya, Zika et Wets-Nile.
- Evaluation des capacités de l'automate Panther Fusion pour le transfert des techniques de détection moléculaire des Arbovirus d'intérêt pour le CNR
- Projet d'automatisation de la séroneutralisation : Etude de faisabilité
- Extension de l'accréditation selon la norme NF 15189 au diagnostic sérologique et moléculaire de l'infection au virus Zika.

8.1.2 CNR-LA-IPG

- Activités de surveillance et d'expertise : réflexion à mener sur l'optimisation de la surveillance des arboviroses dans les TFA
- Poursuite de la mise en place, et de la validation de techniques moléculaires permettant la détection d'un plus large panel d'arbovirus endémiques
- Activités de recherche : poursuite des projets en cours : projets FEDER, Epi-Arbo et EFAG (2017-2020).
- COFRAC 15189 : poursuite de l'extension de l'accréditation des techniques utilisées par le CNR-LA-IPG

8.1.3 CNR-LA-LR

- 2018 :
 - Etude génétique des souches de dengue 2, responsable de l'épidémie 2017-18 en collaboration avec le CNR coordonnateur, la CIRE OI et la plateforme de séquençage de l'UVE Marseille.
 - Etude phylogénétique avec séquençage full-génome des souches de type 2 dans l'Océan Indien (2012-2018) : Réunion, Seychelles, Mayotte, Comores ainsi que des souches importés d'Asie (Inde, Sri Lanka, Asie du sud-est).
 - Etude comparative des souches de dengue humaine et isolées de moustiques en collaboration avec l'UMR PIMT.
 - Mise en route du projet DEMARE d'Olga de Santis.
- 2019 :
 - Test de sérologie multiplex en technique multiplex avec l'UMR PIMIT
 - Tester un test de diagnostic rapide Vidas NS1/IgM en collaboration avec Biomérieux
 - Accréditation des tests de biologie moléculaire et de sérologie de routine (chikungunya, dengue).

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses laboratoires associés

Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR des Arbovirus et des laboratoires associés, en fonction des situations épidémiologiques existantes dans leur territoire :

Apporter une expertise microbiologique :

- ✓ En développant et/ou validant les techniques diagnostiques sérologiques et moléculaires des arboviroses
- ✓ En apportant son expertise aux laboratoires pour le diagnostic des arboviroses en France métropolitaine et dans les DOM
- ✓ En mettant les techniques à disposition des laboratoires désignés par les ARS ou intéressés
- ✓ En disposant d'une expertise pour l'identification et la caractérisation des souches d'arbovirus autochtones et importées en France métropolitaine et dans les DOM

Fournir un service de conseil :

- ✓ En collaboration avec les structures expertes en entomologie pour suivre la situation des vecteurs potentiels en métropole et dans les DOM
- ✓ En collaboration avec les structures en charge de la surveillance des arboviroses chez l'animal.

Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'Agence Nationale de Santé Publique :

- ✓ Plus particulièrement en lien avec les CIREs, et notamment celles des DOM
- ✓ En contribuant à la surveillance épidémiologique des arboviroses et à l'investigation d'éventuels cas groupés, selon les modalités définies par les plans concernant la lutte contre ces virus en vigueur en France métropolitaine et dans les DOM ;
- ✓ En contribuant aux réseaux de surveillance européens ou internationaux ;
- ✓ En contribuant à la veille internationale sur les arboviroses.

Contribuer à l'alerte :

- ✓ En signalant à l'Agence Nationale de Santé Publique tout événement inhabituel ou émergent : augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés, modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), introduction de nouveaux arbovirus sur le territoire, etc.

1.2 Organisation du CNR Arbovirus et de ses laboratoires associés

1.2.1 Laboratoire coordinateur, CNR Arbovirus-IRBA

Noms et prénoms	Fonction	Organisme payeur	ETP
Leparc-Goffart Isabelle, PhD, HDR	Responsable	IRBA, SSA	0,6
Grard Gilda, PhD	Adjointe	IRBA, SSA	0,7
Guerbois-Galla Mathilde, PhD	Adjointe	IRBA, SSA	0,7
Gravier Patrick	Technicien	IRBA, SSA	0,6
Tenebray Bernard	Technicien	IRBA, SSA	0,8
Geulen Manon	Technicien	IRBA, SSA	0,6
Bosio Laurent	Technicien	IRBA, SSA	0,8
Canivez Thomas	Technicien	CDD IRBA, SSA	0,8
Combe Pierre	Technicien	CDD IRBA, SSA	0,8
Sana Johanna (départ Mai 2017)	Secrétaire	IRBA, SSA	0,8

Tableau 1 : Personnels affectés aux activités du CNR des Arbovirus, IRBA Marseille

1.2.2 CNR-LA-IPG

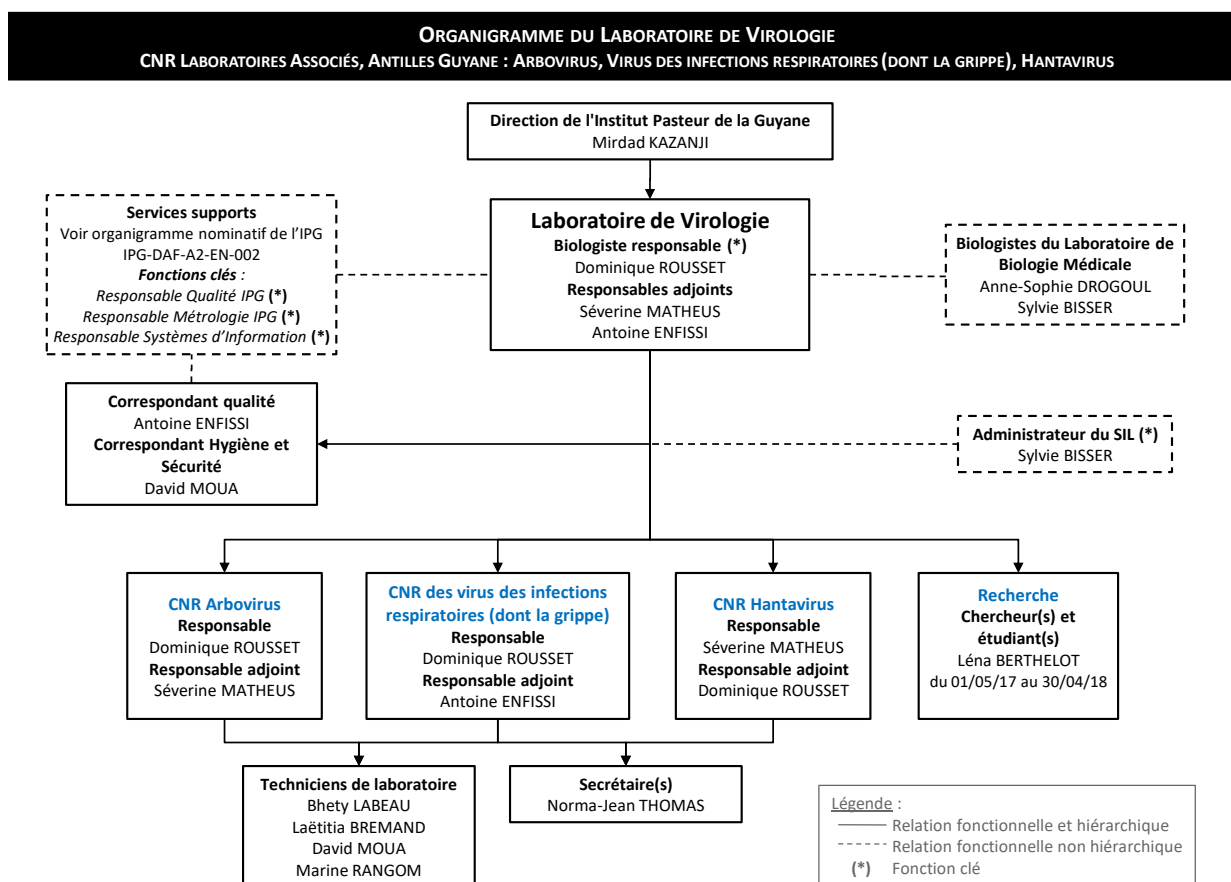


Figure 1 : Organigramme du CNR Arbovirus, laboratoire associé IP Guyane au 31/12/2017

Cinq membres du laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Guyane sont impliqués dans les activités du laboratoire associé, CNR des Arbovirus pour la région Antilles-Guyane : un médecin biologiste, une ingénieure de recherche, deux techniciens et une secrétaire.

Nom	Prénom	Fonction	Qualification	Organisme payeur	ETP CNR Arbovirus
ROUSSET	Dominique	Responsable	MD, PhD	IP, Paris (CDI)	0,7
MATHEUS	Séverine	Responsable adjoint	PhD	IP, Paris (CDI)	0,5
LABEAU	Bhéty	Technicien supérieur	DELAM	IP, Guyane (CDI)	1
MOUA	David	Technicien supérieur	BTS	IP, Guyane (CDI)	1
THOMAS	Norma-Jean	Secrétaire	-	IP, Guyane (CDI)	0,5

Tableau 2 : Personnels affectés aux activités du CNR Arbovirus, laboratoire associé IP Guyane au 31/12/2017.

1.2.3 CNR-LA-LR

Nom	Prénom	Fonction	Qualification	Organisme payeur	ETP CNR Arbovirus
JAFFAR-BANDJEE	M-Christine	Responsable	MD, PhD	CHU Réunion	0,3
ROQUEBERT	Bénédicte	Responsable adjoint	Pharm, PhD	CHU Réunion	0,2
GIRY	Claude	Ingénieur	PhD	CHU Réunion	1
LEE PAT YUEN	Gislaine	Technicien supérieur	BTS	CHU Réunion	1
LAW-TIME	Valérie	Technicien supérieur	BTS	CHU Réunion	1
ZIBEL	Anne	Secrétaire	-	CHU Réunion	0,2

Tableau 3 : Personnels affectés aux activités du CNR Arbovirus, laboratoire associé de la Réunion au 31/12/2017.

1.3 Locaux et équipements

1.3.1 CNR Arbovirus-IRBA

Description des locaux :

L'unité des Arbovirus est installée au sein de l'Hôpital d'Instruction des Armées Laveran. Nos activités sont localisées dans 3 zones de l'hôpital :

- Sérologie et activités préanalytiques : laboratoire standard de 50 m²
- Biologie moléculaire : 3 pièces d'environ 10 m² chacune (pièce blanche, extraction et amplification) avec une marche en avant. Ces locaux sont partagés avec le laboratoire de biologie de la Fédération des Laboratoires de l'HIA Laveran.
- Activités de virologie classe 3 : une zone sécurisée comprend le laboratoire de culture cellulaire (NSB2, 15 m²) et le laboratoire de confinement de niveau 3 (NSB3, 20 m²).

- Salle de stockage : les souches virales sont stockées dans un congélateur -80°C dédié et fermé à clef. L'ensemble du site, militaire, est soumis à une surveillance 24h/24, 7j/7.

Principaux Equipements :

- Plate-forme sérologie : un PSM, une centrifugeuse réfrigérée, deux bain-marie, un incubateur, un pH-mètre, trois laveurs de plaques, un lecteur de plaques, un réfrigérateur, un congélateur -20°C et un congélateur -80°C.
- Plate-forme biologie moléculaire : mini-hotte mix, trois centrifugeuses de paillasse, appareils de PCR en temps réel (deux QS5 et 3 Light Cyclers).
- Laboratoires confinés NSB3 et NSB2 : PSM (deux en NSB2 et un en NSB3), incubateurs dédiés (deux en NSB2 et deux en NSB3), une ultracentrifugeuse en NSB2, deux microscopes dont un microscope à fluorescence en NSB3.

Il est à noter que notre unité ayant rejoint l'Unité Mixte de Recherche 190 dirigée par Pr X. De Lamballerie, notre laboratoire déménagera fin 2018 dans les nouveaux locaux de l'Institut Hospitalier Universitaire « Méditerranée Infection » à Marseille, dévolu à la recherche en maladies infectieuses et tropicales.

Au sein de l'IHU, nous aurons pour locaux :

- des laboratoires NSB2 pour :
 - o l'activité pré-analytique (72 m²)
 - o la sérologie (72 m²)
 - o la biologie moléculaire : une pièce d'extraction et une pièce de mix (20 m² chacune) spécifiques pour le diagnostic, ainsi qu'une pièce d'extraction spécifique pour la recherche (20 m²)
- un laboratoire NSB3 avec 3 box de 15 m², permettant une augmentation du nombre de postes de travail par rapport à nos capacités actuelles.

Pour les équipements, nous aurons accès à des automates, notamment en plateforme biologie moléculaire (toutes nos activités sont réalisées manuellement actuellement), qui pourront nous permettre de répondre de manière plus efficace en période d'urgences.

1.3.2 CNR-LA-IPG

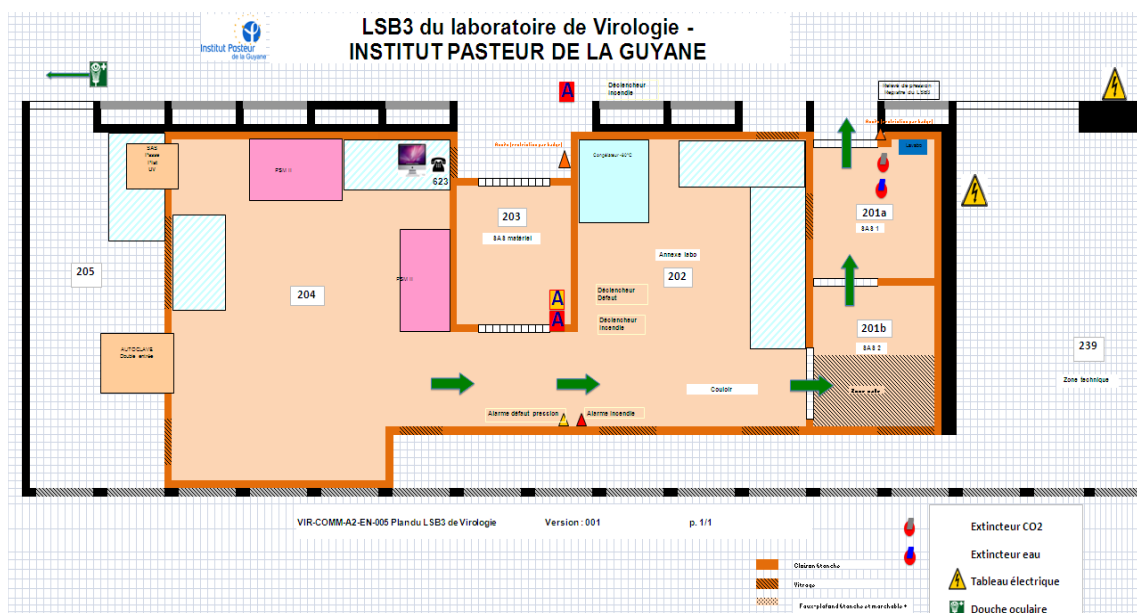
Description des locaux et équipements associés :

Le laboratoire de virologie de l'IP Guyane dispose actuellement d'une superficie globale de 310 m² répartie entre bureaux et laboratoires.



Figure 2 : Plan général du laboratoire de virologie

- un laboratoire (pièce 248) où sont réalisés la réception et l'aliquotage des échantillons (35 m²). Ce local est équipé d'un PSM, d'une centrifugeuse réfrigérée, d'un automate Evolis, d'un bain-marie, d'un incubateur, d'agitateurs magnétiques, d'un pH-mètre, d'une balance de précision, d'un congélateur -20°C, d'un laveur de plaques, d'un lecteur de plaques, d'un réfrigérateur, d'une machine à glace et d'une hotte chimique.
- un laboratoire NSB2 (pièces 247 et 246) dédié à l'entretien des cultures cellulaires, et à l'isolement des virus de classe 2 (25 m²). Ce laboratoire est équipé de deux PSM, d'une centrifugeuse réfrigérée, de 3 incubateurs (28°C, 37°C et 37°C atmosphère 5% CO₂) et d'un microscope inversé.
- un laboratoire dédié aux activités de biologie moléculaire de 20 m² comprenant une pièce pour la préparation des mix réactionnels (pièce 244b) et une pièce pour l'extraction des ARN (pièce 244). Cet espace est équipé d'un PSM pour la préparation des mix, d'une centrifugeuse réfrigérée haute vitesse, de trois micro-centrifugeuses, de deux congélateurs -20°C, de deux réfrigérateurs, d'une hotte UV utilisée pour le dépôt des ARN et de deux blocs chauffants.
- Un nouveau laboratoire NSB3 de 70 m² pour isolement et amplification virale des agents de classe 3, ainsi que pour les préparations d'antigènes. Ce laboratoire NSB3 construit grâce à un financement européen a été qualifié en août 2017. Il est équipé de deux PSM type II, d'une centrifugeuse réfrigérée, de 2 incubateurs (28°C, et 37°C atmosphère 5% CO₂), d'un microscope inversé, un congélateur -80°C, un ordinateur et un autoclave double-entrée.



Le laboratoire partage également avec l'ensemble des équipes de l'Institut, une plateforme technique de biologie moléculaire. Le laboratoire y dispose de trois thermocycleurs (GeneAmp 9700 AppliedBiosystems), de trois thermocycleurs de PCR en temps réel (AppliedBiosystems ABI7300, StepOnePlus® et Roche LC480) et d'une hotte PCR située dans une pièce spécifique, dédiée à la préparation des PCR nichées. Plusieurs générateurs et cuves d'électrophorèse horizontales ainsi qu'une station de capture d'image sont également mutualisés entre différents laboratoires de l'IPG.

L'IP Guyane dispose également d'une animalerie souris et d'un laboratoire de type P2 équipé d'un PSM de type II. Cette animalerie présente toutes les caractéristiques nécessaires à l'accueil d'un élevage de souris (contrôle de la température, de l'hygrométrie, arrivée d'eau...). L'agrément nécessaire à l'exploitation de cette animalerie a été délivré par la Direction des Services Vétérinaires de la Guyane fin 2008.

Le laboratoire dispose par ailleurs de 3 congélateurs -20°C et de 5 congélateurs -80°C situés dans une salle climatisée.

1.3.3 CNR-LA-LR

Le laboratoire fait partie des laboratoires de niveau 2 du réseau Biotox-Piratox et dispose depuis juin 2005 d'un laboratoire L3 qui a été audité par l'afssaps en 2008. D'une superficie de 90m², ce laboratoire confiné comprend, outre la prézone et les sas personnel et matériel, 3 pièces techniques (virologie, mycobactérie, microscope informatique). L'activité Biologie Moléculaire, y compris celle des Arboviroses, est réalisée dans les pièces suivantes :

- une salle d'extraction 25 m²
- une salle blanche 6 m²
- 2 salles de PCR de 15 m² chacune
- 1 salle de post-PCR (commune avec l'activité recherche) 25 m²
- une salle de culture 10 m²
- une salle post-L3 8m²

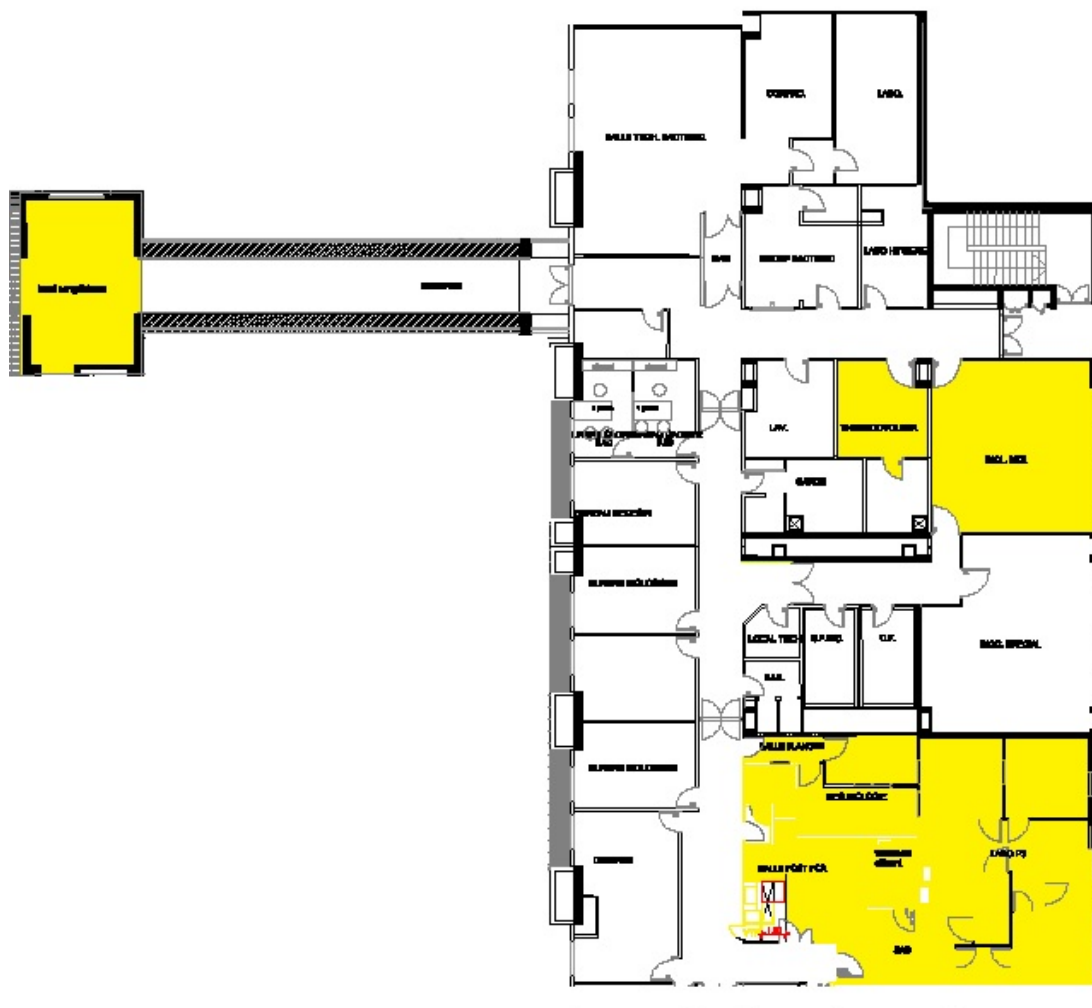
L'activité de sérologie est réalisée dans la salle de séro-immunologie (25m²) qui dispose d'un automate Liaison et de laveurs automatiques et lecteurs de plaques.

Autres automates de biologie moléculaire dont le laboratoire dispose :

- extracteurs d'acides nucléiques : MagNa Compact, EasyMag de Biomérieux
- thermocycleurs : 2 Light-cycler 480, Smart-cycleur, Eppendorf Mastercycler, NucliSensEasyQ

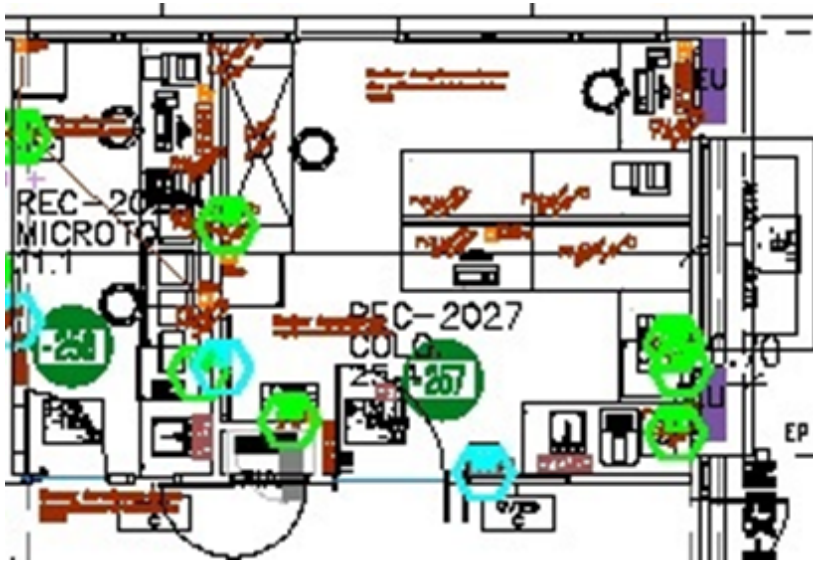
Enceintes froides : 2 congélateurs -80°C, 2 combi +4/-20°C.

Plan des locaux actuels :

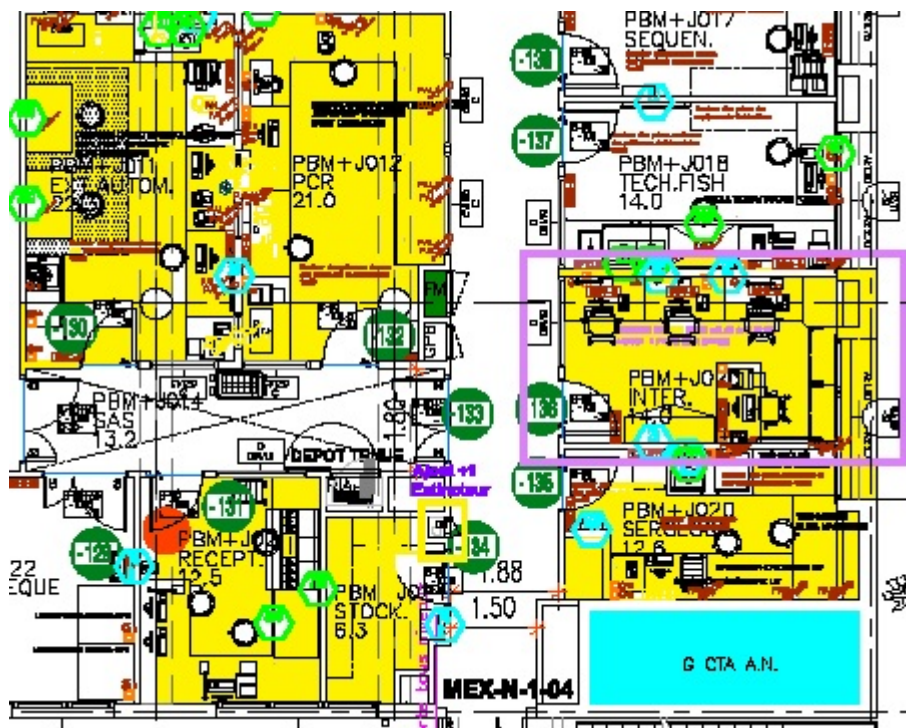


En novembre 2018, nous déménagerons dans le Bâtiment des Soins Critiques, le CNR-LR sera sur 2 niveaux :

- niveau 0 : partage du P3 avec la bactériologie, cultures cellulaires (182m²)



- niveau -1 : mutualisé avec l'activité de virologie du laboratoire réception (12.5m²) plateau de biologie moléculaire (43m²) , sérologie(12.6 m²), stock (6.3m), salle des enceintes froides (20.6m)(en jaune)



1.4 Collections de matériel biologique

1.4.1 CNR Arbovirus-IRBA

Famille	Genre	Virus	Souches	Antigènes	Immunsérums
Flaviviridae	Flavivirus	Dengue	OUI	OUI	OUI
		West Nile	OUI	OUI	OUI
		Usutu	OUI	OUI	OUI
		Encéphalite de St Louis	OUI	OUI	OUI
		Encéphalite Japonaise	OUI	OUI	OUI
		Fièvre Jaune	OUI	OUI	OUI
		Wesselsbron	OUI	OUI	OUI
		TBE (Langat)	OUI	OUI	OUI
		Ntaya	OUI	NON	NON
		Saboya	OUI	NON	NON
		Zika	OUI	OUI	OUI
		Rocio	OUI	NON	NON
Togaviridae	Alphavirus	Chikungunya	OUI	OUI	OUI
		O'Nyong Nyong	OUI	OUI	NON
		Mayaro	OUI	OUI	OUI
		Semliki Forest	OUI	OUI	NON
		Tonate	OUI	OUI	OUI
		Sindbis	OUI	OUI	OUI
		VEE	OUI	OUI	NON
		EEE	OUI	NON	NON
		WEE	OUI	NON	NON
		Ross River	OUI	OUI	OUI
Bunyaviridae	Orthobunyavirus	Bunyamwera	OUI	OUI	OUI
		Ilesha	OUI	NON	NON
		Bwamba	OUI	NON	NON
		Ingwavuma	OUI	NON	NON
		Lumbo	OUI	NON	NON
		Nyando	OUI	NON	NON
		Bahig	OUI	NON	NON
		Tahyna	OUI	OUI	OUI
	Nairovirus	Dugbe	OUI	OUI	OUI
		Erve	OUI	NON	NON
	Phlebovirus	Toscana	OUI	OUI	OUI
		Sandfly Naples	OUI	OUI	NON
		Sandfly Sicilian	OUI	OUI	OUI
		Fièvre de la Vallée du Rift	OUI	OUI	OUI

Tableau 4 : Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

- Conditions de stockage : congélateurs -80°C sécurisés, dans une pièce sécurisée
- Caractérisation des souches : Titrage, séquençage partiel ou complet, phylogénie.
- Mise à disposition :
 - Isolats de virus : sous MTA pour la traçabilité des souches (application de l'arrêté du 22 Septembre 2001 ; SANP012410A). Le CNR arbovirus IRBA a intégré courant 2013 la collection européenne EVA. Les souches isolées dans les activités de Centre National de Référence sont transférées vers la collection EVA pour mise à disposition de la communauté scientifique internationale. Ces souches sont ainsi complètement caractérisées (titre et séquence). Les exemples les plus représentatifs sont la mise à disposition *via* EVA de la séquence complète du virus Chikungunya responsable de l'épidémie à Saint-Martin en 2014, 5 jours seulement après la confirmation des premiers cas sur l'île, suivie rapidement par la disponibilité de l'isolat viral, ainsi que la mise à

disposition de la souche Zika ayant circulé en Polynésie Française, avant son émergence au Brésil.

- Sérums caractérisés : Le CNR Arbovirus-IRBA a décidé de distribuer gratuitement quel que soit la société demandeuse les ressources biologiques (dans la limite de disponibilité) nécessaires pour le développement de nouveaux tests diagnostiques en particulier pour la détection des IgM et des IgG Chikungunya et Zika. Nous avons aussi distribué de nombreuses ressources biologiques aux laboratoires des CHU pour la validation du diagnostic du virus Zika.

1.4.2 CNR-LA-IPG

Souches, antigènes, immuns-sérums de référence

- Collections de souches, antigènes ou immuns-sérums de référence :

Le laboratoire de virologie de l'IP Guyane détient une collection de virus de référence lyophilisés pouvant permettre d'élargir le panel d'antigènes en vue d'enquêtes épidémiologiques ou à des fins diagnostiques, ainsi que les ascites correspondantes.

Il détient une collection d'échantillons biologiques d'origine humaine évaluée à 60000 sérums ou plasmas conservés à -20°C et 40000 sérums ou plasmas conservés à -80°C (infectés ou non par des arbovirus).

Ces collections sont déclarées chaque année depuis 2007 à la Direction Médicale de l'Institut Pasteur à Paris, qui assure ensuite sa déclaration auprès du Ministère de la Recherche. L'exploitation des prélèvements humains de ces biothèques pour les activités propres au CNR ou dans le cadre de demande de mise à disposition se fait sous conditions de l'obtention de la non-opposition des patients pour les prélèvements collectés depuis 2011 suite à la mise en place d'une procédure ad hoc par le laboratoire de Virologie à l'IP Guyane. Pour les prélèvements antérieurs, une procédure de dérogation à l'obtention de la non-opposition est entreprise spécifiquement pour chaque étude auprès du CPP territorialement compétent.

- Conditions de stockage :

Les collections de prélèvements, d'isolats et de souches virales sont conservées à -80°C dans des congélateurs localisés dans des zones à accès sécurisé par badge ou clef. Un système de sondes de mesure de température relié à un dispositif d'enregistrement continu et à une centrale d'alarme est également mis en place.

1.4.3 CNR-LA-LR

Le CNR-LA-LR dispose de collections de souches répertoriées et conservées à -80°C dans le laboratoire P3 d'accès contrôlé (2 portes avec codes, traçabilité notée des entrées et sorties) :

- Chikungunya (souches) : 206 souches de l'épidémie de 2006, 1 souche 2009, 1 souche 2012
- Dengue (souches) : 18 souches de 2010 à 2014.

Conditions de mise à disposition : établissement d'une MTA précisant le matériel (volume, caractéristiques) ainsi que le cadre et les objectifs d'utilisation.

Antigène West-Nile : 2 ml (IRBA)

Antigène RVF : 2.5 ml (IRBA)

Antigène Chikungunya : 5 ml (IRBA)

Antigène Dengue : 0.5 ml (IRBA)

Ascite Chikungunya : 0.1 ml (IRBA)

Ascite dengue : 1 ml (IRBA)

Ascite RVF : 0.1 ml (IRBA)

Ascite WN : 4 ml (IRBA)

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNR Arbovirus-IRBA est suivi par une agence de consultants spécialisée dans l'accompagnement pour l'accréditation 15189 des LABM et sélectionnée en 2015 sur les conseils de notre réseau de laboratoires.

Suite à l'obtention de l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 pour l'analyse diagnostic des virus de la Dengue et du Chikungunya, une extension de cette accréditation au virus Zika pour le diagnostic par détection moléculaire et sérologie est à l'étude pour 2019. Le CNR Arbovirus-IRBA a également engagé les démarches nécessaires au bon déroulement selon la Norme NF EN ISO 15189 du déménagement de ses services en 2018, afin de maintenir l'accréditation.

Le laboratoire de virologie qui héberge le CNR- LA-IPG, est accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 et les règles d'application du COFRAC sous le numéro 8-3373 depuis Nov. 2014 pour la version 2007 et depuis Nov. 2015 pour la version 2012 de cette norme (sous-famille concernée : sérologie infectieuse / portée A). Le maintien de cette accréditation a été obtenu en août 2017 suite à la visite de suivi S3. Une demande d'extension du périmètre d'accréditation a été déposée en septembre 2017 pour la sous famille : VIROH pour les techniques de détection moléculaire (portée B). Une seconde demande d'extension du périmètre d'accréditation pour la sous famille : ISEROBM pour les techniques de sérologie arbovirus « maison » / portée B) a été préparée pour un dépôt effectif en janvier 2018. Ces 2 demandes d'extension seront évaluées par le COFRAC lors de l'audit prévu en juillet 2018.

Le CNR-LA-LR fait partie intégrante du laboratoire de microbiologie du l'hôpital Félix Guyon du CHU de la Réunion. Le laboratoire du CHU a mis en place une politique Qualité depuis 2008. Il a obtenu l'Attestation de Qualification le 18 février 2013 par BioQualité, lui permettant de respecter la première échéance réglementaire de "preuve d'entrée dans la démarche d'accréditation" fixée au 1er novembre 2013. Une revue de direction biennale animée par l'ingénieur Qualité évalue le système Qualité par la mesures des écarts par processus (métrologie, SIL, pré-analytique avec la prescription connectée, achats, ressources humaines...). Plusieurs audits croisés ont été réalisés avec le site sud du CHU (GHSR). Le laboratoire a été accrédité ISO 15189 en 2017 sur 62% du total des analyses (Attestation d'Accréditation 8-3832 Rev3). La validation de méthode en portée B a été réalisée pour la RT PCR multiplexe chikungunya/dengue/leptospirose dans la famille Microbiologie/virologie

Contrôles qualité externes

En tant que laboratoires de référence, les CNR Arbovirus-IRBA, LA-IPG et LA-LR participent au programme CQE-SEGA d'IQLS semestriel pour le diagnostic de la Dengue et du Chikungunya. Ils participent également aux CQE OMS quand ils sont proposés (WHO international PTP for the detection of Arboviruses (dengue, Chikungunya and Zikaviruses by PCR).

Par ailleurs, des contrôles qualités (détection du génome viral de la dengue, détection des anticorps contre les virus de la dengue et du chikungunya) sont également organisés régulièrement par le CNR Arbovirus-IRBA avec le CNR-LA-LR et pour son réseau de laboratoires en métropole. Le CNR-LA-IPG organise des CIL (sérologie Chikungunya , antigène NS1 ..) pour les laboratoires de Guyane intéressés.

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1 CNR Arbovirus-IRBA

Pour rappel, le parcours suivi par un échantillon reçu au CNR Arbovirus-IRBA est illustré dans la figure 4 ci-dessous.

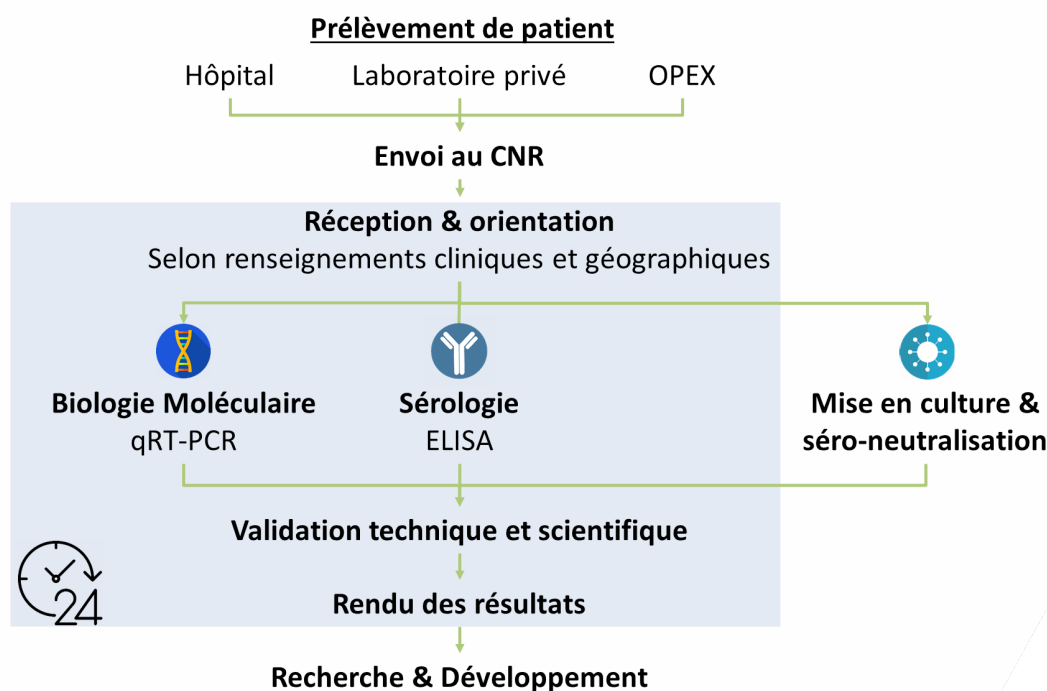


Figure 4 : Diagramme illustrant le traitement d'un échantillon patient par le CNR des Arbovirus. En surlignage bleu figure la partie diagnostic à laquelle est soumis l'échantillon.

Liste des techniques disponibles pour l'analyse des échantillons :

- **Sérologie** : ELISA indirect IgG, capture des IgM (MAC-ELISA), immunofluorescence, séroneutralisation (test de neutralisation par réduction de titre), immunoblot, détection de la protéine NS1 de la Dengue par ELISA
- **Détection moléculaire** : Détection d'ARN viral par qRT-PCR en temps réel, génotypage (séquençage de produits d'amplification génique, séquençage génome complet, analyse comparative et phylogénétique), en collaboration avec l'UMR du Pr Xavier de Lamballerie.
- Isolements viraux sur lignées cellulaires en culture (invertébrés et vertébrés), titrages de virus.
- Production et validation de réactifs sérologiques : préparations antigéniques (cellules infectées fixées, surnageants viraux précipités et inactivés), protéines virales recombinantes à but diagnostic ; anticorps mono- et polyclonaux.

Tous les tests de sérologie et de biologie moléculaire sont applicables sur sérum, plasma, LCR et spot de sang sur papier buvard.

Genre	Virus	Sérologie	Culture	Identification			Biol. Moléculaire	
		Elisa IgM / IgG		IF	Neutralisation	Western blot (IRBA)	RT-PCR (temps réel)	RT-PCR (classique)
Alphavirus								•
	Chikungunya	•#	•	•	•		•#	
	O' Nyong Nyong	•	•	•	•			
	Ross River	•	•	•	•			
	Sindbis	•	•	•	•			
	Semliki Forest	•	•	•	•			
	Mayaro	•	•	•	•		•	
	Tonate	•	•	•	•			
	VEEV	•	•	•	•			•
	WEEV	•	•	•	•			
Flavivirus								•
	Fièvre jaune	•	•	•	•		•	
	Dengue \$	•#	•	•	•		•#	
	West Nile	•	•	•	•	•	•	
	Usutu	•	•	•	•		•	
	Wesselsbron	•	•	•	•			
	TickbornEnc	•	•	•	•		•	
	JapaneseEnc	•	•	•	•		•	
Saint Louis Enc	•	•	•	•		•		
Zika	•	•	•	•		•		
Bunyavirus								•
	Bunyamwera	•	•	•	•			
Tahyna	•	•	•	•				
Phlebovirus								•
	Rift Valley fever	•	•	•	•		•	
	Toscana	•	•	•	•		•	
	Sandfly Sicilian	•	•	•	•		•	
Sandfly Naples	•	•	•	•		•		

Tableau 5 : Techniques d'analyse disponibles par virus.

: techniques accréditées NF EN ISO 15189 au 1^{er} Janvier 2018

\$: détection antigénique (antigène NS1) possible à l'aide de tests commerciaux de type immunoenzymatique et immunochromatographique dans le sérum de patients infectés pendant la phase aiguë de la maladie.

2.1.2 CNR-LA-IPG

- Sérologie : IgM (MAC-ELISA)*, IgG (ELISA ou GAC-ELISA)*, immunofluorescence, séroneutralisation, (* : techniques en cours d'accréditation)
- Détection d'ARN viral par RT-PCR en temps réel,
- Détection de la protéine NS1 de la dengue par ELISA, (technique accréditée)
- Génotypage (séquençage classique ou NGS),
- Isolements viraux sur lignées cellulaires (moustiques et mammifères), titrages de virus,
- Production et validation de réactifs sérologiques : préparations d'antigènes (en culture cellulaire ou sur cerveaux de souriceaux nouveaux-nés) et productions d'ascites de souris hyper-immunes,

Genre	Virus	Sérologie	Culture	Typage		Biologie moléculaire	
		ELISA (IgM /IgG/IgA*)		IFI	Neutralisation	RT-PCR temps réel	RT-PCR
Alphavirus	Chikungunya	x	x	x		x	
	Tonate	x	x	x			x
	Mayaro	x	x	x		x	x
	Encéphalite équine vénézuélienne		x	x			
Flavivirus	Fièvre jaune	x	x	x	x	x	x
	Dengue	x*	x	x	x	x	x
	Dengue typage		x	x	x	x	x
	West Nile	x	x	x		x	x
	Encéphalite de Saint Louis	x	x	x			x
	Zika	x*	x	x	x	x	
	Encéphalite japonaise					x	
Bunyavirus	Oropouche		x	x		x	
	Catu		x	x			
	Guama		x	x			
	Murutucu		x	x			
	Caraparu		x	x			
	Oriboca		x	x			

Tableau 6 : Liste de techniques validées et mises en œuvre par le laboratoire associé IPG (en rouge les nouvelles techniques mises en place en 2017)

2.1.3 CNR-LA-LR

- Chikungunya : RT-PCR (IRBA), sérologie
- Dengue : RT-PCR, typage (IRBA), sérologie
- Typage de dengue
- Multiplexe chick/dengue/leptospirose (CNR Réunion)
- Zika : RT-PCR (Faye et al, Virology Journal 2013) et kit Altona
- Fièvre du Rift : RT-PCR (IRBA)
- Fièvre du West-Nile : RT-PCR (IRBA), sérologie
- RT-PCR pan-Flavivirus (Patel et al, Virology Journal 2013), pan-Alphavirus (CNR-Réunion)

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Dans le cadre de leurs activités d'expertise, le CNR Arbovirus-IRBA et ses CNR associés ont réalisés l'évaluation de différents kits commerciaux pour le diagnostic des arboviroses au cours de leurs années de mandat. Voici les kits que le CNR Arbovirus-IRBA recommande pour le diagnostic des infections par les virus de la Dengue, du Chikungunya et le virus Zika :

- Détection moléculaire du virus Zika : Altona RealStarZika virus RT-PCR kit 1.0
- Sérologie : kits EUROIMMUN
 - o ELISA dengue virus IgGet ELISA dengue virus IgM
 - o ELISA anti-chikungunya virus IgG et ELISA anti-chikungunya virus IgM