

## Expérience de la création, en moins d'un mois, d'un laboratoire référent grippe à la Réunion pour répondre à la demande lors de l'épidémie A(H1N1)2009.

Naze F, Bertil G, Picard M, Michault A ([alain.michault@chr-reunion.fr](mailto:alain.michault@chr-reunion.fr))

Service de Bactériologie Parasitologie Virologie et Hygiène, Groupe Hospitalier Sud Réunion CHR la Réunion

Lorsque l'épidémie de grippe à virus influenza A(H1N1)2009 a débuté à la Réunion en 2009, les prélèvements effectués chez les patients du Groupe Hospitalier Sud Réunion (GHSR) étaient envoyés au laboratoire référent grippe de la Réunion (laboratoire du Centre Hospitalier Départemental Félix Guyon (CHFG)). Ce laboratoire ayant été rapidement débordé [1] la Cire (Cellule de l'Institut de Veille sanitaire en région Réunion et Mayotte) demandait à la direction générale de la santé que le laboratoire de virologie du GHSR devienne aussi laboratoire référent. L'autorisation lui était communiquée le 21/08/2009. Le Centre National de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur Paris (IPP) n'en était informé que le 28/07/2009, date à laquelle il nous envoya les protocoles. Le 12/08/2009 l'IPP envoyait le transcrit que nous recevions le 17/08/2009.

Dès connaissance du protocole de l'IPP, nous avons procédé aux commandes de sondes et amorces chez Ti-Molbiol (Berlin, Allemagne). Notre expérience en multiplex [2] nous laissait entrevoir la possibilité de réaliser une multiplex grippe A/CI aussi avons-nous commandé une sonde pour le contrôle interne (CI) marquée Hex BHQ1 mais aussi une marquée Fam BHQ1. Une multiplex nous permettrait de réaliser une RT-PCR de moins sur chaque prélèvement, diminution considérable au moment du pic de l'épidémie, comme nous l'avait montré notre expérience lors de l'épidémie de chikungunya en 2006 [3]. Nous avons aussi commandé les réactifs chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France), réactifs du protocole CNR. Très vite nous avons rencontré des problèmes avec ce fournisseur : nous n'avions pas d'appel d'offre pour ces réactifs et ce fournisseur avait un délai de livraison supérieur à un mois. Aussi avons nous commandé le réactif QuantiTect Multiplex RT-PCR, NR kit (Qiagen, Courtabeuf, France), réactif pour lequel nous avons un appel d'offre, des réactifs en stock, une expérience [2].

Le laboratoire du CHFG ne disposait pas d'un stock en réactifs suffisant pour nous en prêter. A la fin de la première semaine d'Août, le laboratoire du CHFG avait tellement d'analyses en attente, malgré un fonctionnement 7 jours sur 7 et du personnel supplémentaire, que nous avons pris la décision de ne pas attendre la livraison des réactifs pour commencer, d'autant que notre fournisseur de sondes et amorces en Allemagne nous faisait des difficultés en raison de factures impayées. Nous disposions d'une technique RT-PCR grippe A et d'une RT-PCR grippe B. Pour valider la technique RT-PCR grippe A sur le virus A(H1N1)2009 nous avons demandé au CHFG de nous fournir des prélèvements positifs (fort, faible et limite). L'extraction avec Easy Mag (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et la RT-PCR avec notre technique permettait le diagnostic grippe A de ces échantillons. Nous avons proposé au laboratoire du CHFG de réaliser les extractions, de rechercher grippe A et B et en cas de positivité en A de lui transmettre l'ARN pour le typage (H1N1)2009. Du 17/08 au 30/08 nous avons traité 372 prélèvements (soit 1116 RT-PCR de moins pour le CHFG et 372 extractions) 137 se sont révélés positifs en A, 6 en B et 4 en A et B. Nous avons reçu le transcrit de l'IPP le 17/08 puis les sondes et amorces. Nous avons validé la technique pour le A et A(H1N1)2009 avec

les réactifs Qiagen (Courtabeuf, France), en microplaque sur Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) avec un volume total de 20 microlitres. Ensuite nous avons validé la technique en multiplex pour le A avec le CI. Enfin, nous avons validé la technique multiplex A/CI et A (H1N1)2009 avec un volume final de 10 microlitres. Ce passage à 10 microlitres et la multiplex (1 RT-PCR en moins) nous permettait de diminuer notre consommation de réactifs pour lesquels nous avions des difficultés d'approvisionnement pour faire face à l'afflux de prélèvements. Ceci nous permettait également de diminuer nos coûts et de réduire le temps de travail. Le 31 Aout, lors du pic de l'épidémie, nous réalisons les RT-PCR A avec les amorces et sonde du CNR avec le contrôle interne et nous réalisons le typage (H1N1)2009. Nous annulions notre commande chez Invitrogen.

Du 31 août au 15 septembre nous avons traité 405 prélèvements dont 197 positifs en A. Pour tous les prélèvements traités, le CI était positif témoignant de la qualité de l'extraction. Le typage A(H1N1)2009 nous a tout de suite posé problème : nous avons des RT-PCR grippe A positifs que nous ne pouvions typer (H1N1)2009. Etait-ce dû à un problème de sensibilité de la RT-PCR (H1N1)2009, à une mutation au niveau des amorces ou de la sonde, à la circulation d'un autre type de virus A ? Pour répondre à cette question nous avons mis 5 prélèvements, A positif / (H1N1)2009 négatifs, en culture. Ces cultures se sont révélées positives en (H1N1)2009 confirmant le problème de sensibilité. Nous avons envoyé les prélèvements les plus fortement positifs en A et leur ARN correspondant au CNR de Lyon. Certains prélèvements sont restés négatifs, la majorité des positifs au CNR avaient des Ct supérieurs à 35. Deux prélèvements étaient H3. Ceci confirmait le problème de sensibilité qui a conduit les CNR à changer les amorces. Après l'épidémie à la Réunion nous avons repris les ARN A positif / (H1N1)2009 négatif avec le réactif Roche, 39% sont restés négatifs.

Notre laboratoire, grâce aux techniciens du secteur de biologie moléculaire et aux heures supplémentaires effectuées, a pu répondre aux besoins diagnostiques au plus fort de l'épidémie de grippe [4] tout en mettant en place les techniques, comme ils l'avaient fait lors de l'épidémie de chikungunya. Une technicienne supplémentaire a été recrutée durant les 2 premières semaines de septembre pour prendre en charge l'enregistrement des demandes. La demande en diagnostic par RT-PCR grippe était importante car, contrairement aux recommandations du ministère, les demandes n'étaient pas faites que dans le cadre de la surveillance épidémiologique mais aussi dans un cadre diagnostique. Ce diagnostic permettait notamment de décider de traiter ou de ne pas traiter les femmes enceintes, du choix des chambres pour les patients, l'hôpital ayant encore de nombreuses chambres à 3 lits en médecine. Notre laboratoire a également pu répondre à l'augmentation des demandes pour le diagnostic différentiel entre grippe et autres pathologies donnant un syndrome grippal [5], ainsi qu'à l'augmentation des demandes due à un plus grand nombre d'entrants.

## Références

[1] Epidémie de grippe A(H1N1)2009 dans l'hémisphère Sud : les premières leçons de la gestion de la crise. BEH Web 2009;4:1-4.  
[2] Naze F, Le Roux K, Schuffenecker I, Zeller H, Staikowsky F, Grivard P, et al. Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and dengue virus typing using high resolution melting. Journal of virological methods 2009;162:1-7.

[3] Laurent P, Le Roux K, Grivard P, Bertil G, Naze F, Picard M, et al. Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. Clinical chemistry 2007;53:1408-14.  
[4] Thouillot F, Do C, Balleydier E, Rachou E, Staikowsky F, Morbidelli P, et al. Preliminary analysis of the pandemic H1N1 influenza on Reunion Island (Indian Ocean): surveillance trends (July to mid-September 2009). Euro Surveill 2009;14.  
[5] Michault A. Etiologie et séroépidémiologie des syndromes grippaux à La Réunion Revue Francophone des Laboratoires 2005;374:51-9.

## | Le point de vue d'un médecin du SAMU |

# Expérience du SAMU 974 lors de la pandémie A(H1N1)2009 à l'île de la Réunion

Henrion G ([g.henrion.samu974@chr-reunion.fr](mailto:g.henrion.samu974@chr-reunion.fr)), Bourde A, Serrano D, Zebiche Y, Artagnan M  
SAMU 974, CHR la Réunion, Saint Denis, la Réunion

Le SAMU 974 a été impliqué très tôt dans la gestion de l'épidémie A (H1N1)2009, avant même le premier cas réunionnais. En plus de sa mission princeps de régulation médicale, le SAMU 974 s'est vu confier, ces dernières années, depuis la crise sanitaire du chikungunya, une tâche de surveillance épidémiologique. L'environnement réunionnais est un environnement tropical propice à de nombreuses résurgences épidémiques (dengue, choléra ...). L'épidémie grippale A(H1N1)2009 a encore renforcé cette place dans le dispositif de réponse. Ses missions ont évolué tout au long de cette nouvelle crise.

Avant le 05 juillet, il s'agissait pour le SAMU 974 d'identifier et de prendre en charge le premier cas de grippe A(H1N1)2009. Une définition de cas possible sur l'évolution épidémiologique de la pandémie était validée chaque jour, en lien avec la Cire réunionnais. Le SAMU 974 était au centre du dispositif de surveillance par les appels directs des particuliers au Centre de Réception et de Régulation des Appels (Centre 15) mais aussi par le passage obligé pour les médecins libéraux et hospitaliers pour une possible identification par PCR des cas suspects.

Le 05 juillet 2009, était naturellement confirmé le premier cas importé de grippe A(H1N1)2009 en provenance d'Australie. L'origine australienne s'expliquait pleinement par la toute récente liaison aérienne directe Réunion - Sydney, l'Australie était en effet à ce moment là touchée de plein

fouet. A partir de cette date, le SAMU 974 a poursuivi sa mission de surveillance en continuant l'identification des cas possibles avec la Cire. Ces cas étaient dirigés vers les 2 centres hospitaliers principaux, seuls détenteurs de l'identification par PCR et de TAMIFLU. Le 23 juillet 2009, était identifié le premier cas autochtone.

Le développement de l'épidémie, les changements de prise en charge thérapeutique avec les conseils en découlant, la nécessité de dépister les cas les plus graves relevant d'une prise en charge spécialisée ont confirmé cette place centrale du SAMU 974 dans le dispositif général.

L'activité de régulation a commencé à croître significativement en semaine 31 pour atteindre son maximum en semaine 33, avec une augmentation brutale des appels le samedi 15 août (1300 affaires ; + 75%) et un deuxième pic en semaine 35 correspondant au pic épidémique avec une décroissance rapide sur les 4 semaines suivantes (Figure 1).

Le CRRA du SAMU 974 a dû alors s'organiser pour faire face à ses missions traditionnelles mais aussi à l'augmentation très importante de ces appels.

Chaque poste de régulation a été équipé d'un dossier médical complet sur la grippe A(H1N1)2009, mis à jour quotidiennement comprenant la définition des cas, l'ensemble des recommandations ministérielles très évolutives de prises en charge, les données médicales des différentes sociétés

## | Figure 1 |

Nombre d'appels au Samu toutes causes confondues et pour grippe, du 4 mai au 27 septembre 2009, la Réunion

